

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

DISSERTATION

Klinische Variabilität und Expression des mutierten 657 $\Delta$ 5-  
Allels beim Nijmegen Breakage Syndrom

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité . Universitätsmedizin Berlin

von

Stephan Lins

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. M. Digweed  
2. Prof. Dr. rer. nat. B. Kaina  
3. Prof. Dr. rer. nat. L. Wiesmüller

Datum der Promotion: 23.06.2013

## Inhaltsverzeichnis

### 1. Einleitung

1.1.	Zelluläre Antwort auf DNA-Schäden	1
1.2.	Zellzyklus und Zellzykluskontrolle	1
1.2.1.	Der G1/S-Phase-Checkpoint	2
1.2.2.	Der S-Phase-Checkpoint	3
1.2.3.	Der G2/M-Checkpoint	3
1.3.	Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen	3
1.3.1.	Homologe Rekombination	4
1.3.2.	Nichthomologe Endverknüpfung	4
1.4.	Nijmegen Breakage Syndrom	5
1.4.1.	Klinisches Bild des Nijmegen Breakage Syndroms	5
1.4.2.	DNA-Reparaturdefekte und Krebsrisiko	6
1.4.3.	Störung in der Zellzykluskontrolle in NBN-Zellen	7
1.5.	Das NBN-Gen	7
1.5.1.	Mutationen im NBN-Gen	8
1.6.	NBN als haploinsuffizientes Tumorsuppressor-Gen	9
1.7.	Nibrin	10
1.7.1.	Der Mre11/Rad50/Nibrin-Komplex	11
1.7.2.	Die Rolle von Nibrin in der DNA-DSB-Reparatur	12
1.7.3.	Die trunkierten Proteinfragmente der 657 $\Delta$ 5-Mutation	12
1.8.	Nonsense-mediated-mRNA-decay (NMD)	14
1.9.	Ziel der vorliegenden Arbeit	15

### 2. Material

2.1.	Chemikalien und Verbrauchsmittel	17
2.1.1.	Zellkultur	17
2.1.2.	Immunpräzipitation und Western Blot	17
2.1.3.	Standardpuffer und Lösungen	18
2.1.4.	Primer und Sonden	20

2.1.5. PCR, RT-PCR, Sequenzierung und Real-Time PCR	20
2.1.6. Sonstiges	21
2.2. Antikörper	22
2.2.1. Primäre Antikörper	22
2.2.2. Sekundäre Antikörper	22
2.3. Lymphoblastoide Zelllinien und Fibroblasten	23
2.4. Verwendete Kits	23
2.5. Geräte	24
2.5.1. Inkubationssysteme	24
2.5.2. Elektrophorese- und Blotsysteme	24
2.5.3. Zentrifugen	24
2.5.4. Sonstige Geräte und Software	24
<b>3. Methoden</b>	<b>25</b>
3.1. Analyse der Wachstumseigenschaften von Zelllinien	25
3.1.1. Zellkultur	25
3.1.2. Kultivierung von Fibroblasten	25
3.1.2.1. Passagieren von Fibroblasten	25
3.1.3. Kultivierung von LCL-Zellen	26
3.1.4. Zellzahlbestimmung	26
3.1.5. Anlegen von Wachstumsreihen	27
3.2. RNA-Isolierung	27
3.3. Real-Time PCR	28
3.3.1. Reverse Transkription	28
3.3.2. GAPDH-Amplifikation aus der cDNA	29
3.3.3. Theoretische Grundlagen der Real-Time PCR	29
3.3.4. Relative Real-Time PCR und Housekeeping-Gene	30
3.3.5. Messung der Fluoreszenz und Berechnung des Ct-Wertes	31
3.3.6. Durchführung der Real-Time PCR	33
3.3.7. Relative Quantifizierung mittels $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode	34
3.3.8. Sondendesign	35
3.3.9. Schmelzkurvenanalyse	36

3.4.	Quantifizierung der p70-Nibrinexpression in NBS-Patientenzellen mittels Immunpräzipitation	36
3.4.1.	Proteinisolation	36
3.4.2.	Immunpräzipitation	36
3.4.3.	Elektrophorese und Membranentwicklung	37
3.4.4.	Transfernachweis	38
3.4.5.	Quantifizierung der p70-Nibrin Bandenstärke	38
3.5.	Westernblot	39
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>40</b>
4.1.	Auswahl der homozygoten Zelllinien	40
4.2.	Untersuchung des Wachstumsverhaltens homozygoter, heterozygoter und gesunder Zelllinien	41
4.3.	Vergleich der p70-Nibrin und der NBN-mRNA-Mengen	46
4.3.1.	Wahl der endogenen Kontrolle (Housekeeping-Gen)	46
4.3.2.	Untersuchung der Ct-Wertschwankungen in den Housekeeping-Genen	47
4.3.3.	Bestimmung der NBN-mRNA-Mengen in Patienten- und Wildtypzelllinien	53
4.4.	Quantifizierung der p95-Nibrinwerte	54
4.4.1.	Vergleich der p70-Nibrin- und NBN-mRNA-Mengen	57
4.4.2.	Quantifizierung von NBN-mRNA in Abwesenheit des NMD	57
4.5.	Nibrin-Proteinabbau nach Proteasom-Inhibition	59
4.6.	Quantifizierung von p70-Nibrin in heterozygoten Zellen	61
4.6.1.	Auswahl der Zelllinien	61
4.6.2.	Nachweis der p70-Nibrin Expression in lymphoblastoiden NBS-Patientenzelllinien	62
4.6.3.	Quantifizierung der p70-Nibrinexpression in lymphoblastoiden Patientenzelllinien	63
4.6.4.	Darstellung der p70-Nibrinmengen in Stammbäumen	67

4.6.5. Schwankungen der p70-Nibrinmengen in heterozygoten Zellen	72
<b>5. Diskussion</b>	<b>73</b>
5.1. Transkriptionskontrolle	73
5.2. Posttranskriptionelle Kontrollmechanismen	74
5.2.1. Kontrolle des mRNA-Abbaus	75
5.2.2. Kein Nonsense-mediated-decay der NBN-mRNA	76
5.3. Nonsense-enrichment-Index (NEI)	77
5.4. Translationseffizienz	78
5.5. Proteolyse	78
5.5.1. p70-Nibrinsensitivität für proteasomalen Abbau	80
5.6. EBV-transformierte Zellen als mRNA- und Protein-Quelle	80
5.7. Validität der ausgewählten Housekeepingen-Gene in der Real-Time PCR	83
5.8. Vererbung von p70-Nibrinmengen	84
5.8.1. Modifizierende Einflüsse auf p70-Nibrin in homozygoten und heterozygoten NBS-Zelllinien	85
5.8.2. Erheblicher Einfluss des sonstigen genetischen Hintergrunds	86
5.8.3. p70-Mengenzustände in heterozygoten NBS-Zelllinien	86
5.8.4. Geringe Heritabilität bei der Vererbung der p70-Nibrinmengen	86
5.9. Ausblick	89
5.9.1. Proteasomeninhibitoren als möglicher Therapieansatz neoplastischer Erkrankungen bei NBN-Patienten	89
<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>92</b>
<b>7. Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>94</b>
<b>8. Literaturverzeichnis</b>	<b>96</b>
<b>9. Anhang</b>	<b>105</b>
<b>10. Danksagung</b>	<b>108</b>
<b>11. Erklärung</b>	<b>109</b>

### 1. Einleitung

#### 1.1. Zelluläre Antwort auf DNA-Schäden

Das Erbmateriale aller Zellen ist permanent exogenen und endogenen Noxen physikalischer und chemischer Natur ausgesetzt, die zu schädigenden Veränderungen führen. Akkumulieren diese Schäden unerkannt in der DNA, können daraus entstehende Mutationen die genomische Stabilität der Zelle stören. Bis zu einer Million dieser DNA-Veränderungen treten innerhalb eines Tages pro Zelle auf und können deren Funktion in unterschiedlichem Maße beeinträchtigen<sup>1</sup>. Zum Schutz vor diesen Folgen haben sich in Zellen aller Lebewesen Mechanismen entwickelt, die diese Schäden schnell erkennen und effektiv reparieren können. Mehrzellige Organismen verfügen über die Möglichkeit, irreparabel geschädigte Zellen durch programmierten Zelltod (Apoptose) zu eliminieren. In gesunden Zellen wird durch die Schädigung der DNA eine Kaskade von zellulären Vorgängen aktiviert, die DNA-Schadensantwort genannt wird.

In dieser Arbeit soll das autosomal rezessive Nijmegen Breakage Syndrom (NBS) untersucht werden. Das NBS gehört zur Gruppe der Chromosomeninstabilitätssyndrome und weist eine fehlerhafte DNA-Schadensantwort auf, welche Teil der Zellzykluskontrolle ist. Ursache der Erkrankung ist eine Mutation im NBN-Gen, welche zu einer fehlerhaften Bildung des Proteins Nibrin führt. Bevor weiter auf besondere Formen der physiologischen und auf die fehlerhafte Schadensantwort des NBS eingegangen wird, soll zum besseren Verständnis die Zellzykluskontrolle dargestellt werden.

#### 1.2. Zellzyklus und Zellzykluskontrolle

Der Zellzyklus verläuft in mehreren Phasen und ist der Zellzykluskontrolle unterworfen, welche den regelrechten Ablauf der Zellteilung sichert. Der Zellzyklus wird in Mitose und Interphase unterteilt. Die Interphase unterteilt sich wiederum in die G1, S- und G2-Phase<sup>2/3</sup>. Eine Zelle, die sich in der G1-Phase befindet, hat mehrere Möglichkeiten der Weiterentwicklung. Sie kann entweder einen erneuten Zellteilungszyklus durchlaufen,

in eine Ruhephase (G<sub>0</sub>) oder in einen Differenzierungsprozess eintreten. In der G<sub>1</sub>-Phase bereitet die Zelle die Replikation des genetischen Materials vor. 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, und während der Mitose findet die Kernteilung statt. Hiernach beginnt ein neuer Zellzyklus.

Die Prozesse der Replikation und Verteilung der DNA sind fehleranfällig und begünstigen daher die Entstehung von Mutationen. Wie bereits beschrieben, können diese für die Zellen letal sein oder zur Entartung der Zellen führen, und sie werden daher von Prozessen kontrolliert, die zusammengefasst DNA-Schadensantwort genannt werden. Um dieserart Schäden zu erkennen, werden Dauer und Abfolge der Zellzyklusphasen von sogenannten Kontrollpunkten (Checkpoints) überwacht. Diese stellen sicher, dass die Zelle erst dann in den nächsten Schritt des Zellzyklus eintritt, wenn der vorhergehende fehlerfrei abgeschlossen ist. Treten DNA-Schäden auf, wird der Zellzyklus von diesen Kontrollmechanismen arretiert. Bei irreparablen DNA-Schäden wird die Zelle in die Apoptose geführt. Checkpoints, welche für die Kontrolle von DNA-Schäden verantwortlich sind, werden generell über zwei Pathways vermittelt<sup>4/5</sup>. Der ATM/ATR-Chk1/Chk2-Cdc25 Pathway führt zu einer schnellen und vorübergehenden Antwort, der zweite Pathway ist p53-abhängig und führt direkt zur Apoptose. Hierfür sind besonders drei Checkpoints von Bedeutung.

### **1.2.1. Der G<sub>1</sub>/S-Phase-Checkpoint**

Der Übergang von der G<sub>1</sub>-Phase in die S-Phase erfordert einen Anstieg von Cyclin E<sup>6</sup>. Cycline führen zur Aktivierung Cyclin-abhängiger Kinasen (Cdk), die den Eintritt der Zellen in den Zellzyklus und dessen Progress regulieren<sup>2/7/8</sup>. Die Cyclin-E-Synthese wird durch exogene Mitogene stimuliert. Durch Cyclin E nimmt die Aktivität von Cdk zu. Diese Zunahme stimuliert den Übergang von der G<sub>1</sub> in die S-Phase<sup>9/10</sup>. Treten DNA-Schäden während der G<sub>1</sub>-Phase auf, phosphoryliert ATM (Ataxia telangiectasia mutated) Chk2 und sorgt somit für dessen Aktivierung. Chk2 phosphoryliert Cdc25A, welches hierdurch abgebaut wird. Durch den Chk2 induzierten Cdc25A-Abbau kommt es somit zu einer Blockierung des Zellzyklusprogress<sup>10</sup>. Der zweite Pathway wird über p53 vermittelt. p53 wirkt bei der Aktivierung des G<sub>1</sub>-Kontrollpunktes als

Transkriptionsfaktor für p21. Dieses verhindert die Aktivierung von Cdk2 und führt somit zu einer Arretierung des Zellzyklus.

### **1.2.2. Der S-Phase-Checkpoint**

Der S-Phase-Checkpoint verzögert oder verhindert die Progression der S-Phase. Dieser Checkpoint besteht aus mehreren Pathways. Der erste wird über ATM/ATR, Chk1, Chk2 sowie Cdc25A vermittelt. Treten Schäden während der Replikation auf, phosphoryliert ATR Chk1, welches über Cdc25A und Cdk2 vermittelt die DNA-Synthese vorübergehend stoppen kann. An zwei Pathways ist Nibrin beteiligt. Bei einem der beiden wird über ionisierende Strahlung ATM aktiviert, welches Chk2 phosphoryliert. Dieses vermittelt über Cdc25A sowie Cdk2 den S-Phase-Arrest <sup>11</sup>. Zwei weitere Checkpoints werden über ATM/NBN/Smc1 sowie über den ATM/NBN/FANCD2 Pathway vermittelt <sup>12</sup>.

### **1.2.3. Der G2/M-Checkpoint**

Der G2/M-Checkpoint regelt den Eintritt in die Mitose. Der Übergang von der G2-Phase in die Mitose wird von Cdc2 reguliert. Für den Eintritt in die Mitose muss diese Proteinkinase durch Cdc25 dephosphoryliert werden. DNA-Schäden in diesem Abschnitt des Zellzyklus aktivieren ATM und ATR <sup>13/14</sup>, welche mittels Phosphorylierung Chk1 und Chk2 <sup>13-18</sup> aktivieren. Chk1 und Chk2 können Cdc25 phosphorylieren, sodass dieses nicht mehr in der Lage ist, Cdc2 zu aktivieren. Dadurch wird der Zellzyklusprogress in der G2-Phase arretiert <sup>19</sup>.

## **1.3. Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen**

Schäden der DNA können von unterschiedlicher Natur und Genese sein. Daher haben sich jeweils entsprechende Reparaturmechanismen entwickelt. Sie lassen sich in mehrere Kategorien unterteilen. So gibt es z.B. verschiedene Reparaturmechanismen, die spezifisch DNA-Einzelstrangbrüche oder den Einbau von defekten Nukleotiden in die DNA reparieren. Mehrere zehntausende Einzelstrangbrüche ereignen sich jeden Tag pro Zelle. Während diese Schäden nur jeweils einen Strang der DNA-Doppelhelix

betreffen, liegt bei DNA-Doppelstrangbrüchen (DNA-DBS) eine Kontinuitätsunterbrechung beider Helixstränge vor. Doppelstrangbrüche treten wesentlich seltener auf, haben jedoch schwerwiegendere Folgen für Zellen und entstehen vor allem durch ionisierende Strahlung und mutagene Substanzen wie Radiomimetika. Nur ein einziger derartiger Schaden kann letal für die betroffene Zelle sein. Eukaryote Zellen verfügen über zwei Mechanismen, um diese Schäden zu reparieren. Diese werden nichthomologe Endverknüpfung (NHEJ = non-homologous end-joining) und homologe Rekombination (HR = homologous recombination) genannt. Aufgrund ihrer Bedeutung für das Nijmegen Breakage Syndrom werden sie im Folgenden genauer besprochen.

### **1.3.1. Homologe Rekombination (HR = homologous recombination)**

Bei diesem Mechanismus wird der homologe DNA-Abschnitt des Schwesterchromatid als Vorlage für die Reparatur herangezogen. Dieser Prozess verläuft weitgehend fehlerfrei und ist auf die G<sub>2</sub>- und S-Phase beschränkt. An den Bruchenden werden zunächst 3qÜberhänge produziert. Danach bindet Rad51 an den so entstandenen einzelsträngigen Abschnitt und führt diesen zur homologen Sequenzen im homologen Schwesterchromatid oder homologen Chromosom. Im Folgenden kommt es mittels eines Strangaustauschs zur Basenpaarung zwischen beiden DNA-Molekülen<sup>20</sup>. Die geschädigten Sequenzen werden komplementär zu den intakten Einzelstrangbereichen repliziert. Hiernach werden beide intakten DNA-Moleküle durch eine Resolvase voneinander getrennt<sup>21</sup>. Bei der homologen Rekombination handelt es sich um einen evolutionär hoch konservierten Prozess. Man findet ihn sowohl in Bakterien als auch bei höheren Säugetieren. Sie gilt als fehlerfrei.

### **1.3.2. Nichthomologe Endverknüpfung (NHEJ = non-homologous end-joining)**

Im Gegensatz zur homologen Rekombination kommt es bei der nichthomologen Endverknüpfung (NHEJ) stets zu Deletionen, da hierbei die direkte Verknüpfung der durch den Bruch freigewordenen DNA-Enden erfolgt. Während der Reparatur werden am 5'-Ende der Läsion Nukleotide reseziert, sodass am 3'-Ende Überhänge

entstehen. Für das NHEJ sind die Proteine Ku70 und Ku80 von entscheidender Bedeutung. Diese leiten das NHEJ ein, binden an freie DNA-Enden, schützen diese vor nukleolytischer Degradation und rekrutieren Proteinkinasen an die Bruchenden heran<sup>22</sup>. Hierdurch werden DNAPKcs und Artemis, eine Endo- und Exonuklease, rekrutiert, welche die DNA-Enden zusammenhalten. Zum Schluss verknüpft der Ligase IV/XRCC4-Proteinkomplex die beiden DNA-Enden<sup>23</sup>. Die NHEJ stellt den vorherrschenden Prozess in Säugetierzellen dar.

### **1.4. Nijmegen Breakage Syndrom**

Störungen in den oben beschriebenen Kontroll- und Reparatursystemen können schwerwiegende Folgen für den Organismus haben. Eine Krankheit, die solcherart Störungen aufweist, ist das Nijmegen Breakage Syndrom. Das Nijmegen Breakage Syndrom wurde erstmals 1981 bei Patienten aus Nijmegen in Holland beschrieben<sup>24</sup>. Die Vererbung ist autosomal rezessiv mit vollständiger Penetranz. Wie das Bloom-Syndrom, die Fanconi-Anämie und die Ataxia Telangiectasia gehört das Nijmegen Breakage Syndrom zu den Chromosomeninstabilitätssyndromen, die eine erhöhte Chromosomenbrüchigkeit aufweisen<sup>9</sup>. Das Nijmegen Breakage Syndrom tritt besonders häufig in der polnischen, ukrainischen und tschechischen Bevölkerung auf.

#### **1.4.1. Klinisches Bild des Nijmegen Breakage Syndroms**

Homozygot Betroffene haben eine charakteristische Gesichtsmorphologie, welche durch ein prominentes Mittelgesicht, ein fliehendes Kinn und eine flache Stirn gekennzeichnet ist (Abb.1). Die Mehrheit der NBS-Patienten wird mit einer Mikrozephalie geboren, sie tritt jedoch bei 25% der Patienten erst einigen Monaten nach der Geburt in Erscheinung. Geburtsgröße und -Gewicht liegen überwiegend im Normbereich. Erst im späten Verlauf des ersten Lebensjahres ist das Wachstum retardiert. In der frühen Kindheit verläuft die geistige Entwicklung von NBS-Patienten normal. Erst im späteren Verlauf zeigt sich bei ca. 20% der Patienten eine progressive, leichte geistige Retardierung<sup>25</sup>. Die geistige Entwicklung ist bei 35% der NBS-Patienten normal, bei 45% zeigt sich ein IQ im unteren Normbereich<sup>26</sup>. Es wurden Hauterscheinungen wie Café au lait-Flecken und Vitiligo, Pigmentflecken der Retina

und kutane Teleangiektasien beschrieben. Des Weiteren leiden Patienten an Fehlbildungen, wie Klino- und Syndaktylien, es wurden Analatresie, Hydronephrose und Hüftdysplasie beschrieben <sup>25</sup>.



**Abbildung 1:** Geschwisterkinder mit Nijmegen Breakage Syndrom ( 7J., 1J.) (Abbildung dankenswerterweise von Prof. E. Seemanova zur Verfügung gestellt). Deutlich sind die charakteristischen Merkmale von NBS-Patienten zu sehen, dazu gehören das Gesicht mit flacher Stirn, Retrognathie, große gerade Nase mit flacher Nasenwurzel und die tiefsitzenden Ohrmuscheln.

### 1.4.2. DNA-Reparaturdefekte und Krebsrisiko

NBS-Patienten weisen ein stark erhöhtes Krebsrisiko auf <sup>27</sup>. Etwa 40 % der NBS-Patienten entwickeln bis zum 20. Lebensjahr eine Neoplasie, insbesondere Tumoren des lymphatischen Systems wie z.B. das periphere T-Zell Lymphom. Besonders häufig treten bereits im Jugendalter Non-Hodgkin-Lymphome, insbesondere das diffuse large B-cell lymphoma auf <sup>28</sup>. Zellen von NBS-Patienten weisen Defekte sowohl in der humoralen sowie der zellulären Immunantwort auf. Dadurch leiden sie häufig an Infektionen, unter denen Atemwegsinfekte die häufigsten sind. Obwohl Nibrin nicht in der V(D)J-Rekombination involviert ist, konnte an Mäusemodellen gezeigt werden, dass Nibrin im Class-switching von Immunoglobulinen eine Rolle spielt <sup>29</sup>. Die meisten Patienten weisen eine Dys- oder Agammaglobulinämie auf, nur bei 10% ist der

Immunglobulin-Status regelrecht. Zellen von NBS-Patienten zeigen Auffälligkeiten, die auf Störungen in der Zellzykluskontrolle und DNA-Reparatur hinweisen und sich durch eine erhöhte Chromosomenbrüchigkeit manifestieren. Werden z.B. NBS-Zellen ionisierender Strahlung oder Radiomimetika ausgesetzt, tritt im Vergleich zu Kontrollzellen eine erhöhte Chromatidbrüchigkeit auf<sup>33/34</sup>. FISH-Chromosomenanalysen zeigten, dass bei NBS-Zellen eine dreifach erhöhte Rate von Chromosomentranslokationen im Vergleich zu gesunden Zellen besteht<sup>31/32</sup>. Es konnte gezeigt werden, dass die Reaktionsintensität der Zellen von heterozygoten Trägern nach Bestrahlung zwischen der von homozygoten Trägern und der gesunder Individuen liegt<sup>30/31</sup>.

### **1.4.3. Störung in der Zellzykluskontrolle in NBS-Zellen**

Eine eindeutige Zellzyklus-Störung in NBS-Zellen ist in der S-Phase nachweisbar<sup>35-37</sup>. Sie betrifft die regulierte Hemmung der DNA-Synthese nach einer mutagenen Belastung. In Untersuchungen an nullmutanten Mauszellen wurde ein beschädigter intra-S-Phase-Checkpoint nachgewiesen<sup>38</sup>. Es wurden Störungen beim Übergang von der G1- zur S-Phase (G1/S-Phase-Checkpoint)<sup>9/39/40</sup> und beim Eintritt von der G2-Phase in die Mitose gefunden (G2/M-Checkpoint)<sup>36</sup>. In Analysen von nullmutanten Mausfibroblasten, welche mit Bleomycin behandelt wurden, stellte man einen defekten G2/M-Checkpoint fest<sup>41</sup>. Demgegenüber wurde ein regelrechter G2/M-Übergang bei Fibroblasten und Lymphoblasten von NBS-Patienten beobachtet<sup>42/125</sup>. Neben der unmittelbaren Beteiligung an der DNA-Reparatur scheint Nibrin, vermutlich als Teil des Komplexes mit Rad50 und Mre11, eine weitere Signalfunktion auszuüben<sup>43</sup>.

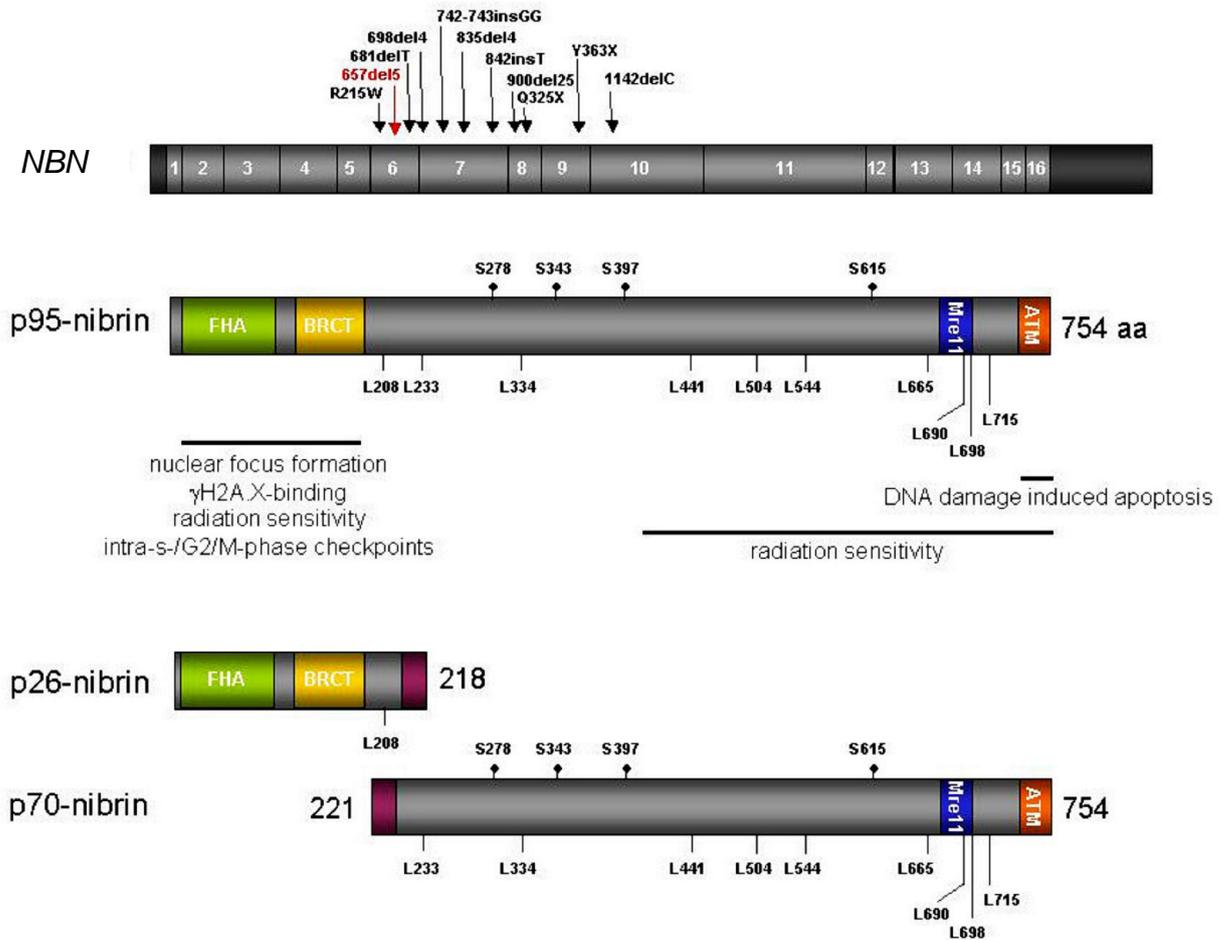
### **1.5. Das NBN-Gen**

Für das Nijmegen Breakage Syndrom ist eine Mutation im NBN-Gen verantwortlich. Das Gen konnte 1997 durch Kopplungsanalyse bei betroffenen Familien auf Chromosom 8q21 kartiert werden<sup>35</sup>. Im folgenden Jahr identifizierten mehrere Gruppen unabhängig voneinander das Gen<sup>45/46</sup>. Das NBN-Gen besteht aus 16 Exons und ist etwa 50kbp groß<sup>46-48</sup>. Durch alternative Polyadenylierung entstehen zwei mRNA-Transkripte von 2,4kbp und 4,4kbp Länge. Die Transkripte werden in allen

Zellen gleichmäßig exprimiert, nur in Testes und Ovarien konnte eine erhöhte Expression des 2,4kbp-Transkript nachgewiesen werden <sup>46/49/50</sup>.

### 1.5.1. Mutationen im NBN-Gen

Über 90% der analysierten NBS-Patienten sind homozygot für eine 5bp-Deletion 657 5 <sup>25/51</sup>. Diese Foundermutation tritt besonders häufig in slawischer Bevölkerung auf. So wurde eine hohe Heterozygotenfrequenz von etwa 1/177 in der Tschechischen Republik, Polen und der Ukraine festgestellt <sup>52</sup>, während sie in nicht-slawischen Bevölkerungsgruppen geringer ist. So liegt sie in Berlin bei 1/900. Es konnten weitere Mutationen nachgewiesen werden, die alle in unmittelbarer Nähe der 657 $\Delta$ 5-Mutation, zwischen Nukleotid 657 und 1142 lokalisiert sind <sup>46</sup>. Ebenso wie die 657 $\Delta$ 5-Foundermutation, führen diese zu einem vorzeitigen Abbruch der Translation nach der aminoterminalen breast cancer carboxy-terminal-Domäne (BRCT) und der fork head associated-Domäne (FHA) (Abb. 2).



**Abbildung 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 dargestellt. Darunter ist das Protein Nibrin mit seinen Bindungsstellen, funktionellen Regionen und Phosphorylierungsstellen dargestellt. Darunter die Proteinfragmente, die in Patienten mit NBN nachgewiesen werden konnten. BRCT: breast cancer carboxy-terminal, FHA: forkhead-associated, Ser: Serinrest; nach Demuth und Digweed <sup>53</sup>

### 1.6. NBN als haploinsuffizientes Tumorsuppressor-Gen

Heterozygote Mutationsträger sind phänotypisch unauffällig. In Zellkulturen heterozygoter Zellen ist jedoch die genomische Instabilität leicht aber nicht signifikant erhöht <sup>30</sup>. Auch das Risiko, an Krebs zu erkranken, ist für Heterozygote im Vergleich zur Normalbevölkerung erhöht <sup>27/54-56</sup>. Erste Hinweise auf diese Korrelation ergaben sich 1990 in Familienstudien, die zeigten, dass unter Blutsverwandten von NBS-Patienten, die heterozygot für die 657Δ5-Foundermutation waren, eine höhere

Karzinominzidenz bestand <sup>27</sup>. Diese Befunde wurden durch weitere Studien an 344 Blutsverwandten (ersten bis vierten Grades) von NBS-Patienten bestätigt, die von 1998 bis 2003 durchgeführt wurden. Dreizehn Blutsverwandte entwickelten maligne Neoplasien. Darunter waren elf Träger der 657Δ5-NBN-Mutation <sup>51</sup>. Anders als bei NBN-Homozygoten, bei denen Lymphome die Mehrzahl der Malignome darstellen, leiden Heterozygote an einem weiteren Spektrum von Neoplasien <sup>51</sup>.

In mehreren Studien wurde untersucht, ob das Wildtyp-Allel des NBN-Gens in Tumorgewebe von Heterozygoten mutiert ist. Obwohl in manchen Tumoren von Heterozygoten auch das zweite NBN-Allel mutiert war <sup>55</sup>, ist dies in der Mehrzahl der Tumoren nicht der Fall <sup>57</sup>. Die vollständige Inaktivierung des Gens scheint somit nicht die Ursache für die Tumorentstehung zu sein <sup>53</sup>.

Somit gehört NBN zu der Gruppe der haploinsuffizienten Tumorsuppressor-Gene. Ein Tumorsuppressor-Gen schützt Zellen vor unkontrolliertem Wachstum. Das klassische „Two-hit“-Modell der Tumorgenese von Knudsen besagt, dass Krebs entsteht, wenn in einer Zelle beide Allele eines Tumorsuppressor-Gens durch eine Mutation ihre Funktion verlieren <sup>58</sup>. Bei haploinsuffizienten Tumorsuppressor-Genen hingegen reicht die Inaktivierung nur eines Wildtyp-Allels, um die Tumorgenese zu begünstigen. Die Tumorgenese ist hierbei allein auf die Dosisminderung des Genprodukts zurückzuführen <sup>59</sup>.

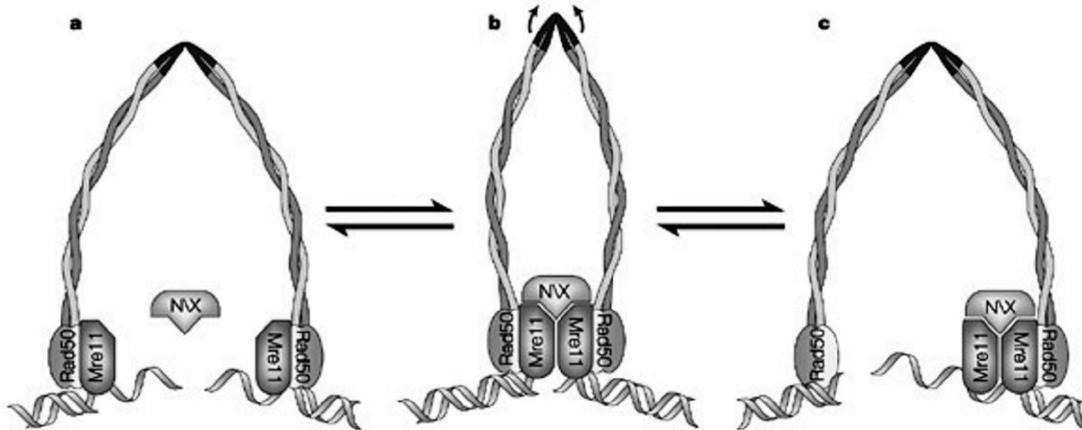
### 1.7. Nibrin

Das Produkt des NBN-Gens heißt Nibrin (p95) und besteht aus 754 Aminosäuren <sup>46</sup>. Nibrin wird in drei funktionelle Bereiche unterteilt: die carboxyterminale, die zentrale und die aminoternale Region. Im aminoternalen Bereich befinden sich zwei funktionelle Regionen, die „forkhead associated“-Domäne (FHA) und die „breast cancer carboxy-terminal“-Domäne (BRCT). Diese beiden Regionen vermitteln die Wechselwirkung von Nibrin mit dem Histon H2AX. Dieses ist in die Reparatur von Doppelstrangbrüchen (DSB) involviert <sup>50</sup>. Am carboxyterminalen Ende liegt die Mre11 Bindungsdomäne <sup>60</sup>. Beide Domänen sind in eukaryoten Zellen hochgradig konserviert und finden sich in vielen Proteinen, die an der Zellzykluskontrolle beteiligt sind. Treten

DNA-Doppelstrangbrüche auf, so sind die Domänen in die Kernlokalisierung und Phosphorylierung von Nibrin involviert. Des Weiteren spielen sie bei der Bildung von Foci eine entscheidende Rolle. Die an der Reparatur beteiligten Proteine bilden im Zellkern Konglomerate, welche mittels Immunfluoreszenz sichtbar gemacht werden können. Diese Konglomerate werden Foci genannt und sie können lichtmikroskopisch direkt beobachtet werden. Mutationen in den oben beschriebenen Regionen führen zum Verlust dieser Funktionen <sup>38/60</sup>. In der zentralen Region des Nibrin sind an Position 278 und 343 Serinreste lokalisiert. Diese werden durch ATM phosphoryliert. In phosphoryliertem Zustand sind sie an der Aktivierung des MRN-Komplexes beteiligt. <sup>61/62</sup>.

### 1.7.1. Der Mre11/Rad50/Nibrin-Komplex

Nibrin, Mre11 und Rad50 bilden einen funktionellen Komplex, der Mre11/Rad50/Nibrin-Komplex (MRN) genannt wird <sup>63/49</sup>. Mre11 ist ein 80kDa großes Protein und Rad50 ist ein 150kDa großes Protein. Sie sind normalerweise im Zellkern verteilt und akkumulieren ohne Nibrin nicht an DNA-Doppelstrangbrüche. Der humane Mre11/Rad50/Nibrin-Komplex (MRN) entspricht dem Mre11/Rad50/Xrs2-Komplex der Hefe <sup>64</sup>. Dieser ist an der homologen Rekombination und am non-homologous end-joining beteiligt <sup>64/65</sup>. Es konnte gezeigt werden, dass der MRN-Komplex in die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen in menschlichen Zellen involviert ist <sup>66</sup>. Der MRN-Komplex ist eine brückenartige Struktur und Mre11 bildet das Kernelement dieses Komplexes <sup>67/68</sup>. Rad50 bildet eine sV-ähnliche Struktur, die mit ihren beiden Armen die Bruchenden bindet und so die Chromosomenfragmente zusammenhält <sup>69/70</sup>. Der Doppelstrangbruch wird am aktiven Zentrum von Mre11 repariert (Abb. 3). Hiernach entlässt Rad50 das DNA-Molekül <sup>71/72</sup>.



**Abbildung 3:** Der Mre11/Rad50/Nibrin-Komplex (MRN) besteht aus jeweils einem Rad50- und Mre11-Dimer und ist mit einem Nibrin bzw. Xrs2 assoziiert. Es ist anzunehmen, dass das flexible Rad50-Dimer in a und c in geöffneter Konformation vorliegt. In b ist die Struktur geschlossen <sup>69</sup>.

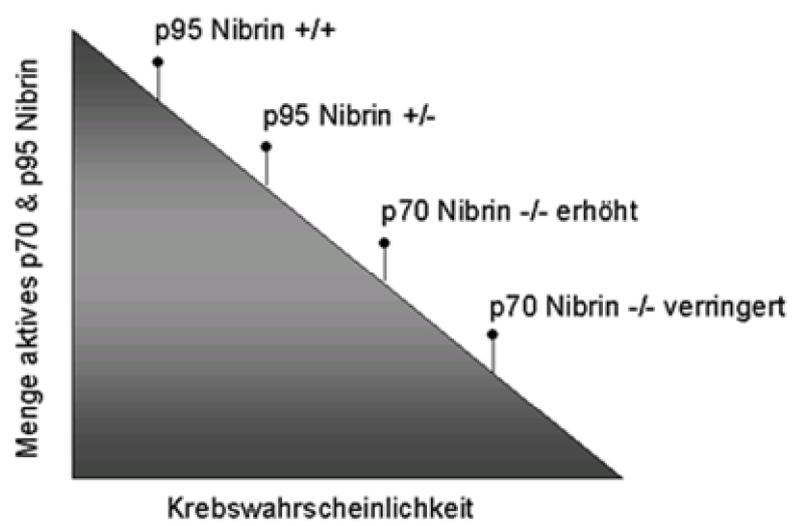
### 1.7.2. Die Rolle von Nibrin in der DNA-DSB-Reparatur

Die deutlich erhöhte Rate an Chromosomenbrüchen in NBN-Zellen nach Bestrahlung zeigt, dass Nibrin in der DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur eine entscheidende Rolle spielt. Ebenso wie Nibrin wird H2AX von ATM phosphoryliert und bildet in Antwort auf Doppelstrangbrüche Foci im Zellkern <sup>73</sup>. Mit seiner FHA/BRCT-Domäne bindet Nibrin direkt an das phosphorylierte Histone H2AX und wird mitsamt dem MRN-Komplex an den DSB herangeführt <sup>74</sup>. Es konnte gezeigt werden, dass bei Fehlen der FHA/BRCT-Domäne, so wie es bei p70-Nibrin bei NBS-Patientenzellen der Fall ist, sich diese Foci nach Bestrahlung der Zellen nicht bilden. Die Interaktion von H2AX und Nibrin scheint somit essentiell für die Rekrutierung der Reparaturmoleküle an die Doppelstrangbrüche.

### 1.7.3. Die trunkierten Proteinfragmente der 657 $\Delta$ 5-Mutation

Intaktes Nibrin wird in NBS-Zellen nicht gefunden. Die NBN-657 $\Delta$ 5-Mutation führt zu einer Leserahmenverschiebung, die ein vorzeitiges Stopcodon in den Leserahmen schiebt. Von der korrespondierenden mRNA wird ein verkürztes aminotermiales 26kD-Fragment (p26-Nibrin) gebildet <sup>44</sup>. Komplementär hierzu wird ein 70kD-Fragment

(p70-Nibrin) synthetisiert, das den carboxyterminalen Bereich des Wildtyp-Proteins repräsentiert. Dieses 70kD-Fragment wird, ausgehend von einem kryptischen, stromaufwärts gelegenen Startcodon, durch alternative Initiation der Translation gebildet<sup>44</sup>. Einige der Funktionen des Wildtyp-Proteins, wie z.B. die Bindung an Mre11 und Rad50 und die Aktivierung von ATM werden von diesem funktionell relevanten 70kD Proteinfragment (p70) ausgeführt<sup>68/75</sup>. So versterben NBN-nullmutante Mäuse bereits während der Embryonalentwicklung<sup>76/77</sup>, während sie bei Expression des p70-Nibrinfragments überleben<sup>78/79</sup>. Wahrscheinlich ist das exprimierte p70-Nibrin somit für das Überleben der NBS-Patienten verantwortlich. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass nullmutante Murinzellen nach dem Transfer von humaner cDNA mit der 657Δ5-Mutation und der Expression von p70-Nibrin deutlich besser überleben<sup>79/41</sup>. Es konnte gezeigt werden, dass die Mengen dieses p70-Proteinfragments in lymphoblastoiden NBS-Patienten-Zelllinien stark variiert. Bei 26 lymphoblastoiden B-Zelllinien von Patienten wurde von Krüger et al. 2007<sup>80</sup> die Menge von p70-Nibrinmengen gemessen und mit dem klinischen Phänotyp verglichen. Bis August 2005 hatten vierzehn dieser Patienten Krebs entwickelt, wovon neun bereits gestorben waren. Bei elf dieser malignen Tumoren handelte es sich um Lymphome. Vergleiche zwischen den Patienten ergaben eine signifikante Korrelation zwischen dem Auftreten von Krebs und der Menge des in den Patientenzellen gebildeten p70-Nibrin. Krüger et al. 2007<sup>80</sup> zeigten, dass Patienten, deren Zellen geringe p70-Nibrinmengen aufweisen, häufiger Neoplasien entwickelten, als Patienten mit hohen p70-Nibrinwerten. So gab es innerhalb der Gruppe von Patienten mit hohen p70-Nibrinwerten keine Todesfälle, während sieben Patienten aus der Gruppe mit geringen p70-Nibrinwerten gestorben waren (Abb. 4). Damit reiht sich NBS in eine besondere Gruppe von genetischen Erkrankungen ein, die eine dosisabhängige Haploinsuffizienz aufweisen.



**Abbildung 4:** Ergebnis Krüger et al. 2007<sup>80</sup> Krebswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit der Menge funktionellen p70- und p95-Nibrins.

### 1.8. Nonsense-mediated-mRNA-decay (NMD)

Durch die 657 $\Delta$ 5-Mutation im NBN-Gen wird ein vorzeitiges Stopcodon in den Leserahmen geschoben. Alle eukaryoten Zellen sind in der Lage, mRNA-Moleküle, die ein vorzeitiges Stopcodon enthalten, zu erkennen und abzubauen. Dieser Mechanismus wird "Nonsense-mediated-mRNA-decay" (NMD) genannt<sup>81-83</sup>. Er dient der mRNA-Qualitätskontrolle. Hierdurch wird die Synthese von anormalen Proteinen mit potentiell toxischen Effekten vermindert. In Säugetierzellen wird ein Stopcodon als regelrecht interpretiert, wenn ihm kein Intron mehr als 50 Nukleotide downstream folgt<sup>84/85</sup>. Da vorzeitige Stopcodons während der Translation identifiziert werden<sup>86/87</sup>, müssen die Stellen des Übergangs zwischen den entfernten Introns und den folgenden Exons vom Translationsapparat erkannt werden. Dies ist möglich, da die prä-mRNA im Zellkern von mehreren Proteinkomplexen markiert wird. Die prä-mRNA-Enden werden durch den cap-binding-complex (CBC), einem Heterodimer, welches aus zwei Untereinheiten aufgebaut ist, am 5' markiert. Die exon-exon Grenzen werden während des splicings durch Splicisomen mit dem "exon-junction-complex" (EJC) etwa 20-24 Nucleotide upstream der Grenze markiert<sup>86/87</sup>. Dieser Multiproteinkomplex dient als Bindungsplattform für NMD-Faktoren. Im Verlauf des Translationsprozesses

wird der EJC durch das vorrückende Ribosom entfernt. Die Translation kommt am regulären Stopcondon zum Stillstand und Terminationsfaktoren werden aktiviert. Handelt es sich jedoch um ein vorzeitiges Stopcodon, so befindet sich downstream davon ein weiterer EJC. Das derzeitige Modell geht davon aus, dass nach Translationsende der verbliebene EJC das Protein UPF1 rekrutiert und dieses in Verbindung mit dem Ribosom aktiviert. Bei UPF1 handelt es sich um ein komplexes Phosphoprotein, welches bei Translationsende zur mRNA hin rekrutiert wird. Über eine weitere Protein-Aktivierungs-Kaskade führt dies zur Entfernung der CBC-Komplexe an den mRNA-Enden. Von den freien Enden wird die mRNA darauf von Exonuklease abgebaut<sup>87</sup>.

### **1.9. Ziel der vorliegenden Arbeit**

Um die Ursachen der Tumorentstehung bei NBS-Patienten sowie bei Patienten mit ähnlichen Erkrankungen besser verstehen zu können, ist es nötig, die Grundlagen dieser Phänomene besser zu beleuchten.

Die Genexpression wird in eukaryoten Zellen an mehreren Stellen reguliert. Da durch die Leserasterverschiebung der 5bp-Deletion ein vorzeitiges Stopcodon in den Leserasterrahmen geschoben wird, unterliegt die mRNA des NBN-Gens möglicherweise dem Nonsense-mediated-mRNA-decay (NMD). Unterschiedliche Effektivitätsraten dieses Prozesses könnten Variationen der mRNA-Mengen erklären und somit die Variationen von p70-Nibrin.

Folgende Arbeitshypothesen wurden aufgestellt:

1. Die mutierte NBN-mRNA unterliegt dem Nonsense-mediated-mRNA-decay.
2. Die von Krüger et al. 2007 ermittelten p70-Werte korrelieren in Patientenzellen mit den mRNA-Mengen des NBN-657 $\Delta$ 5-Allels.
3. Die p70-Nibrinvarianz wird polygen vererbt.

Um die mRNA-Mengen des NBN-Gens homozygoter Patienten mit denen gesunder Patienten vergleichen zu können, wurden neun Zelllinien gesunder Probanden in die

Untersuchungen einbezogen. Grundlage dieser Untersuchungen waren die Ergebnisse der Arbeit von Krüger et al. 2007<sup>80</sup>.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit soll geklärt werden, ob die Fähigkeit der Patientenzellen, hohe bzw. niedrige Mengen an p70-Nibrin zu produzieren, mittels einfacher Erbgänge weitergegeben wird. Dafür wurden die heterozygoten Eltern und Geschwister der Patienten in die Untersuchung einbezogen. Hierfür standen Zelllinien von 48 heterozygoten Individuen mehrerer Familien aus Prag zur Verfügung.

## 2. Material

### 2.1. Chemikalien und Verbrauchsmittel

#### 2.1.1. Zellkultur

Actinomycin D	Serva
Bleomycin	Medac GmbH
Clocemid	Gibco
Coulter Clenz Cleaning Agent	PAA
DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)	PAA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich GmbH
Emetine	PAA
FKS (fetales Kälberserum)	PAA
Isotonische Lösung: Isoton® II	PAA
Natrium-Pyruvat-Lösung	Sigma
Penicillin/Streptomycin	PAA
Pytohemagglutinin (PHA-L)	Biochrom AG
RPMI-1640 mit L-Glutamin	PAA
Trypsin-EDTA	PAA
Gewebskulturflaschen	Falcon

#### 2.1.2. Immunpräzipitation und Western Blot

2-Mercaptoethanol	Sigma
Blockierungsreagenz, RotiBlock	Roth
Bradford Färbelösung	USB
DTT (Dithiothreitol)	Fermentas
Dynabeads Protein A	Dynabeads
Complete Mini	Roche
Dynabeads Protein G	Dynal
ECL <sup>i</sup> -Western Blot Detektionssystem Lsg. 1 und 2	Amershaw
EDTA (Ethylendiaminotetraessigsäure)	Merck
Entwicklerlösung G138i	Agfa
Fixierkonzentrat Adefofix	Adefo Chemie
Gel-Blotting-Papier	Schleicher & Schuell

Glycerophosphat	Aldrich
Hybond ECLTM, Nitrocellulose Membran	Amersham
Immobilon-P, PVDF Membran	Millipore
Magnetic Particle Concentrator	Dynal
NaPi	Aldrich
Natriumfluorid, NaF	Aldrich
Nitrocellulose-Membran	Amersham
NuPage 4-12 % Bis-Tris Gradienten Gel	Invitrogen
NuPage Antioxidant	Invitrogen
NuPage LDS Sample Puffer	Invitrogen
NuPage MOPS-SDS-Transferpuffer	Invitrogen
NuPage Sample Reducing Agent	Invitrogen
NuPage Transfer Buffer	Invitrogen
PMSF	Sigma
Ponceau S-Lösung	AppliChem
Protease Inhibitor, Complete Mini Tablets	Roche
Protein Ladder, prestained	Fermentas
Protein Molecular Weight Marker, BlueRanger	Pierce
Protein Molecular Weight Marker, RainbowTM	Amersham
Proteinauftragspuffer, Roti-Load, reduzierend	Roth
Scientific Imaging Film, X - OMATTM	Kodak
Sepharose, GammaBind Plus	Amersham
sponge pads	Invitrogen
Triton-X-100	Roche

### 2.1.3. Standardpuffer und Lösungen

Alle Standardpuffer und Lösungen, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind im Folgenden in ihren Zusammensetzungen aufgeführt.

DNase I Puffer (10x)                      200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 20 mM MgCl<sub>2</sub> , 500 mM KCl, vial of 25 mM EDTA (pH 8.0).

## Material

---

Färbelösung für Proteingele	0,25 % Coomassie 30 % Methanol 50 % Methanol 7 % Essigsäure 9,2 % Essigsäure
Laufpuffer für SDS-PAGE (Bis-Tris-Gele)	1/20 Volumen SDS-MES-Puffer (20x) 4 % (v/v) Antioxidant
Lyse-Puffer	50 mM NaPi (pH 7,5) 25 mM NaF 25 mM Glycerophosphat 2 mM EDTA 2 mM DTT 1 fach Complete Mini 0,5 % Triton X-100
NDD-Puffer	1% Nonidet-P40 0,5 % Natriumdeoxycholat 0,01 % Doxtransulfat 50 ml 25 mM Tris/HCl (pH 7,4) 130 mM NaCl 5 mM KCl
NuPAGE-LDS-Proben- Puffer (1x)	141 mmol/L Tris-HCl, (pH 8,5) 2 % (w/v) Lithiumdodecylsulfat (LDS) 10 % (v/v) Glycerol 0,51 mmol/L EDTA, pH 8,5 0,22 mmol/L SERVA® Blue G250 0,175 mmol/L Phenolrot
PCR-Puffer (10x)	200 mmol/L Tris (pH 8,4) 500 mmol/L KCl

TBS-T	20 mol/L Tris (pH 7,5) 137 ol/L NaCl 0,1 % (v/v) Tween 20
TNK-Puffer	25 mM Tris/HCl (pH 7,4) 130 mM NaCl 5 mM KCl
Transferpuffer	10 % (v/v) Methanol 0,1 % (v/v) Antioxidant

#### 2.1.4. Primer und Sonden

##### Primer Real-time PCR:

GAPDH-F	5'-tac cag gaa atg agc ttg ac- 3'
GAPDH-R	5'-cat gtt tgt cat ggg tgt ga- 3'
HPRT Ex6.F	5'-aaa aca atg cag act ttg ctt tcc-3'
HPRT Ex7/8.R	5'-agg tct ggc tta tat cca aca ctt cg-3'
NBN Ex7/8.F	5'-atg gat atg ctc caa agg caa gg-3'
NBN Ex8/9.R	5'-atg ggg acc gga atg cct acg-3'

##### Sequenzierung:

NBN Ex6.F	5'-cag ata gtc act ccg ttt aca a- 3'
NBN Ex6.R	5'-aca att gca taa agt aaa ac- 3'

##### Taq-Man-Sonden:

NBN-Sonde: Ex8	5'-tag acc tat tcc tga agc aga aat tgg att gg-3'
HPRT-Sonde: Ex6/7	5'-tcc aaa gat ggt caa ggt cgc aag c-3'

#### 2.1.5. PCR, RT-PCR, Sequenzierung und Real-Time PCR

Big Dye	Perkin Elmer
Cy3-dUTP	Amersham
dNTPs	Rapidozym

MgCl	Invitrogen
Reaktionspuffer	Invitrogen
Reverse Transkriptase M-MLV Enzym	Invitrogen
Radom Hexamer Primer	Invitrogen
SYBR® Green PCR Master Mix	Applied Biosystems
Taq Solis	Biodyne

### 2.1.6. Sonstiges

Chloroform	JT Baker
Coomassie	Serva
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma
EDTA	Merck
Eisessig	Merck
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Sigma
Giemsa Lösung	Merck
HCl	Merck
Isopropanol	Merck
KCl	Merck
Methanol	JT Baker
NaCl	Merck
Nonidet-P-40	Sigma
PBS-Ohne	MP Biomedicals
Propidijodid	BD Bioscience
Proteinkinase K	Roche
SDS	Sigma
Tween 20	Aldrich
Tris	Merck
Trizol Reagent	Invitrogen

## 2.2. Antikörper

### 2.2.1. Primäre Antikörper

Anti-Mre11 12D7, Maus, monoklonal	GeneTex
Anti-p95-Nibrin/NBS1 1D7, Maus, monoklonal	GeneTex
Anti-Nibrin, C19, Ziege, polyklonal, sc 8580	Santa Cruz
Anti-Nibrin, H300, Ziege, polyklonal, sc 11431	Santa Cruz
Anti-Nibrin, N19, Ziege, polyklonal, sc 8579	Santa Cruz
Anti-p95-Nibrin Mre11, Kanninchen, polyklonal	Novus
Anti-p95-Nibrin/NBS1, Kanninchen, polyklonal	Novus
Anti- -Actin , Maus, monoclonal	Abcam

### 2.2.2. Sekundäre Antikörper

Bovine-anti-goat IgG HRP, sc 2350	Santa Cruz
Bovine-anti-rabbit IgG HRP, sc 2370	Santa Cruz
Cy2 konjugierter goat-anti-rabbit IgG	Jackson
Donkey-anti-mouse IgG HRP	Amersham
Donkey-anti-rabbit IgG HRP	Amersham

### 2.3. Lymphoblastoide Zelllinien und Fibroblasten

LCL	NBN-Genotyp	LCL	Genotyp	LCL	NBN-Genotyp	LCL	NBN-Genotyp
04P385	+/del5	06P0039	+/del5	C520	Kontrolle	JaCe	del5/del5
04P386	+/del5	06P0040	+/del5	L39	Kontrolle	RoZd	del5/del5
04P387	+/del5	06P0041	+/del5	NL553	Kontrolle	94P196	del5/del5
04P388	+/del5	06P119	+/del5	94P120	Kontrolle	94P548	del5/del5
04P689	+/del5	06P120	+/del5	94P197	Kontrolle	94P473	del5/del5
04P690	+/del5	06P309	+/del5	95P446	Kontrolle	95P195	del5/del5
04P691	+/del5	06P310	+/del5	96P124	Kontrolle	95P511	del5/del5
04P762	+/del5	06P311	+/del5	96P126	Kontrolle	95P558	del5/del5
04P763	+/del5	06P312	+/del5	98P651	Kontrolle	97P0081	del5/del5
04P764	+/del5	06P314	+/del5			97P0082	del5/del5
04P765	+/del5	06P315	+/del5			98P320	del5/del5
04P766	+/del5	06P316	+/del5				
06P078	+/del5	06P317	+/del5				
04P917	+/del5	06P319	+/del5				
04P918	+/del5	06P320	+/del5				
04P919	+/del5	06P321	+/del5	LN9SV	+/+		
04P920	+/del5	06P495	+/del5	GM7166VA7	-/-		
04P921	+/del5	06P497	+/del5				
05P774	+/del5	06P498	+/del5				
06P0028	+/del5	06P499	+/del5				
06P 0037	+/del5	06P0812	+/del5				
06P0038	+/del5						

### 2.4. Verwendete Kits

Big Dye Terminator Kit

DyeEx<sup>TM</sup> Spin Kit

Microcon-PCR Centifugal Filter Devices

Plasmid Midi Kit

Qiaquick PCR Purification Kit

Applied Biosystems

Qiagen

Millipore

Qiagen

Qiagen

## 2.5. Geräte

### 2.5.1. Inkubationssysteme

Brutschrank	Heraeus
Brutschrank ATP Line	Biometra
Thermomixer 5436	Eppendorf
Wasserbad	GFL
Wasserbadschüttler	GFL

### 2.5.2. Elektrophorese- und Blotsysteme

NuPage Gel System	Invitrogen
Gelkammer	Renner GmbH
Spannungsgerät EPS 600	Pharmacia Biotech

### 2.5.3. Zentrifugen

Tischzentrifuge Biofuge primo	Heraeus
Tischzentrifuge Centrifuge 5415 C	Eppendorf
Zentrifuge Megafuge	Heraeus
Zentrifuge Megafuge 20R	Heraeus

### 2.5.4. Sonstige Geräte und Software

Excell	Microsoft Office
GeneQuant II	Pharmacia Biotech
I-Cyclers	BioRad
ImageQuant	Molecular Dynamics
Mikroskop Telaval 31	Zeiss
Photoshop	Adobe
TaqMan™ II	
ScanMaker	Microtek

### **3. Methoden**

#### **3.1. Analyse der Wachstumseigenschaften von Zelllinien**

##### **3.1.1. Zellkultur**

Alle Schritte der Zellkultivierung wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Laminairflow-Werkbank durchgeführt. Es wurden sterile Medien, Lösungen und Materialien verwendet. Die Zellkulturen wurden bei 37°C unter 5% CO<sub>2</sub> in Gewebezuchtflaschen in einem Brutschrank inkubiert. Das verwendete Zellkulturmedium (RPMI) wurde mit 15% fetalem Kälberserum (FKS) und Antibiotika (Penicillin und Streptomycin) versetzt und bei 4°C aufbewahrt.

##### **3.1.2. Kultivierung von Fibroblasten**

Für die Kultivierung der Fibroblasten wurde DMEM mit Penicillin und Streptomycin versetzt und als Vollmedium verwendet. Es wurde jeweils 1 ml Aliquots des in flüssigem Stickstoff gelagerten DMEM-Vollmedium aufgetaut, in eine 25 cm<sup>2</sup> Kulturflasche (T25) zu 9 ml vorgelegtem DMEM pipettiert und vorsichtig resuspendiert. Zur Kultivierung der Zellen wurden die Flaschen anschließend liegend im Brutschrank bei 37°C unter 5% CO<sub>2</sub> und unter reduziertem O<sub>2</sub>-Gehalt von 10% gelagert. Als adhärenente Zellen haben Fibroblasten die Eigenschaft, sich an den mit Zuckermolekülen beschichteten Untergrund der Kulturflaschen anzuheften.

##### **3.1.2.1. Passagieren von Fibroblasten**

Der Wachstumszustand wurde regelmäßige mittels lichtmikroskopischer Kontrollen überprüft. Bei Erreichen der Konfluenz (vollständiger Bewuchs des Flaschengrundes und Einstellung der mitotischen Aktivität) wurde das Kulturmedium mit einer Saugpumpe mit abgeflamtem Glaspipettenaufsatz abgesaugt. Es erfolgte zweimaliges Waschen mit gleichem Volumen PBS, um Mediumreste zu entfernen. Durch Zugabe von 0,5 ml Trypsin/EDTA lösen sich die Zellen vom Untergrund (Trypsinierung), sodass diese in 9,5 ml Vollmedium resuspendiert und zur weiteren

Kultivierung in eine nächst größere Kulturflasche überführt (T25 → T75 → T175) werden konnten. Bei großen Flaschen (T175) wurden zuvor 10 ml Vollmedium vorgelegt (Gesamtvolumen 20 ml). Die Umsetzung der Zellen in größere Kulturgefäße gewährleistete die Züchtung ausreichender Zellmengen. Um entsprechende Kulturmengen zu erhalten, mussten diese anschließend regelmäßig ausgedünnt passagiert werden. Die SV40-transformierten Fibroblasten wurden 1:10 verdünnt.

### **3.1.3. Kultivierung von LCL-Zellen**

Die zu untersuchenden Zelllinien waren in mit 10% DMSO versetztem Kulturmedium in einem Stickstofftank bei -180°C eingefroren. Sie wurden aufgetaut, in 9 ml Kulturmedium überführt und 10 min bei 800 rpm sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 5 ml frischem Kulturmedium resuspendiert, in eine Gewebezuchtflasche (50 ml) überführt und in einem Brutschrank inkubiert. Das Kulturmedium wurde zwei Mal wöchentlich abgenommen und durch frisches Kulturmedium ersetzt. Nach Erreichen einer genügenden Zelldichte wurden die Zellen in größere Gewebezuchtflaschen (275 ml) überführt.

### **3.1.4. Zellzahlbestimmung**

Die Zellzahl wurde durch einen automatischen Partikelzähler der Firma Beckmann-Coulter bestimmt. Das Prinzip der Zählung und Größenbestimmung beruht auf der Messung der Widerstandsänderung, die eine Zelle auslöst, wenn sie in einer elektrisch leitfähigen Lösung suspendiert durch eine Kapillaröffnung tritt. Die zu messende Partikelgröße wurde auf 7,7-13,4 µl Durchmesser, die durchschnittliche Lymphozytengröße, eingestellt. Für die Zählung wurden 200 µl der resuspendierten Zellsuspension in 10 ml Isoton-II-Lösung überführt, woraus sich eine Verdünnung von 1:50 ergab. Das Beckmann-Coulter-Gerät zählt jeweils zweimal 500 µl und mittelt das Ergebnis. Auf einem Display wurden die Zellzahl und die Größenverteilung der Zellen angezeigt. Das Ergebnis wurde mit dem Faktor 100 multipliziert, um die Zellzahl / ml zu ermitteln. Jede Zelllinie wurde insgesamt siebenmal gemessen.

### 3.1.5. Anlegen von Wachstumsreihen

Um den Zeitpunkt der maximalen, exponentiellen Wachstumsgeschwindigkeit der verschiedenen LCL-Zelllinien zu ermitteln, wurden Kulturen mit einer Dichte von  $2,0 \times 10^5$  Zellen / ml in RPMI 1640 Medium mit 10 % fötalem Kälberserum und 1.000 U / L Penicillin / 1 mg / L Streptomycin in einer 25-well Gewebekulturplatte angesetzt. Dazu wurden pro Zelllinie in jeweils zwölf Wells 2 ml resuspendierte Zelllösung angesetzt. Die Zellen ließ man zwölf Tage im Brutschrank wachsen. Um ein ungestörtes Wachstum der Zellen auch während der Untersuchungszeit zu gewährleisten, wurden jeden Tag aus nur einem Well die Zellen resuspendiert und im Coulter Counter gemessen. Die ermittelte Zellzahl wurde mit 100 multipliziert, da das Messvolumen 0,5 ml betrug.

### 3.2. RNA-Isolierung

Die Gesamt-RNA wurde aus  $1 \times 10^7$  LCL-Zellen extrahiert, die sich im exponentiellen Wachstum befanden. Die Zellsuspension wurde in ein Zentrifugationsgefäß überführt und 10 min bei 1000 rpm sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 1 ml PBS aufgenommen, in ein Eppendorfgefäß (1,5ml) überführt und 2 min bei 6000 rpm gewaschen. Danach wurden die Zellen auf Eis gestellt, einmal mit TNK-Puffer gewaschen und darauf in 400 µl TNK-Puffer resuspendiert. Die Zellyse erfolgte durch Zugabe von 100 µl NDD-Puffer. Die Zellkerne wurden darauf abgetrennt, indem das Pellet 30 sec bei 6000 rpm zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß (1,5 ml) überführt, 500 µl PCA, 25 µl 20% SDS und 15 µl 5M NaCl hinzugefügt und das Pellet 10 sec gevortext. Durch anschließende zweiminütige Zentrifugation bei 11000 rpm erfolgte eine Phasentrennung in eine farblose, klare Oberphase, eine weiße, flockige Interphase und eine braune, trübe Unterphase.

Im folgenden Schritt wurde die wässrige, DNA-enhaltende Oberphase in ein neues Eppendorfgefäß (1,5 ml) überführt, 500 µl PCA hinzu gegeben, das Pellet 10 sec gevortext und die RNA durch zweiminütige Zentrifugation bei 11 000 rpm extrahiert. Im Anschluss wurde dieser Extraktionschritt nochmals mit PCA und einmal mit Chloroform wiederholt. Nach Beendigung der Extraktion wurde die wässrige Phase

erneut in ein neues Eppendorfgefäß (1,5 ml) überführt, 1 ml 100% Ethanol hinzugefügt und die RNA bei -20°C über Nacht gefällt. Anschließend wurde die RNA 15 min bei 11 000 rpm sedimentiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde anschließend durch Zugabe von 1 ml 80% Ethanol und zehnmünütige Zentrifugation bei 11 000 rpm gewaschen. Danach wurde das Pellet im Heizblock bei 37°C getrocknet. Hierauf schloss sich der DNase-Verdau an. Dazu wurde das RNA-Pellet in 88 µl DEP-H<sub>2</sub>O gelöst, 10 µl 10x DNase I Puffer und 2 µl DNase I (10 U / µl) zugegeben und die enthaltene DNA durch 15-minütige Inkubation im Heizblock bei 37°C verdaut.

Um überschüssige DNase zu entfernen, wurde die RNA anschließend durch zweimalige Extraktion mit 100 µl PCA und einmalige Extraktion mit 100 µl Chloroform gereinigt. Danach wurde die RNA durch Zugabe von 250 µl Ethanol und 10 µl 3 M Naac (pH 6.0) über Nacht bei -20°C gefällt. Im nächsten Schritt wurde die RNA 15 min zentrifugiert, in 80% Ethanol gewaschen und anschließend bei 37°C im Heizblock getrocknet. Im Anschluss wurde das Pellet in TE aufgenommen und die Dichte der RNA photometrisch bestimmt.

### 3.3. Real-Time PCR

#### 3.3.1. Reverse Transkription

Zur weiteren Analyse wurde die RNA mittels reverser Transkription in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. 200 ng RNA wurden in 8 µl TE gelöst, 5 min bei 56°C denaturiert und danach auf Eis gestellt. Anschließend wurde folgender Reaktionsansatz je RNA-Probe hinzugefügt. Die Inkubation wurde mit folgendem Temperaturprofil durchgeführt.

#### RT-Bedingungen

10'	20 °C
40'	42 °C
8'	99 °C
∞	4 °C

#### Reaktionsansatz

10-fach PCR-Puffer	2,0 µl
MgCl 25 mM	4,0 µl
dNTPs	8,0 µl
Hexamere 50 mM	1,0 µl
Reverse Transkriptase	1,0 µl
Random Primer (3 µg/ l)	1,0 l

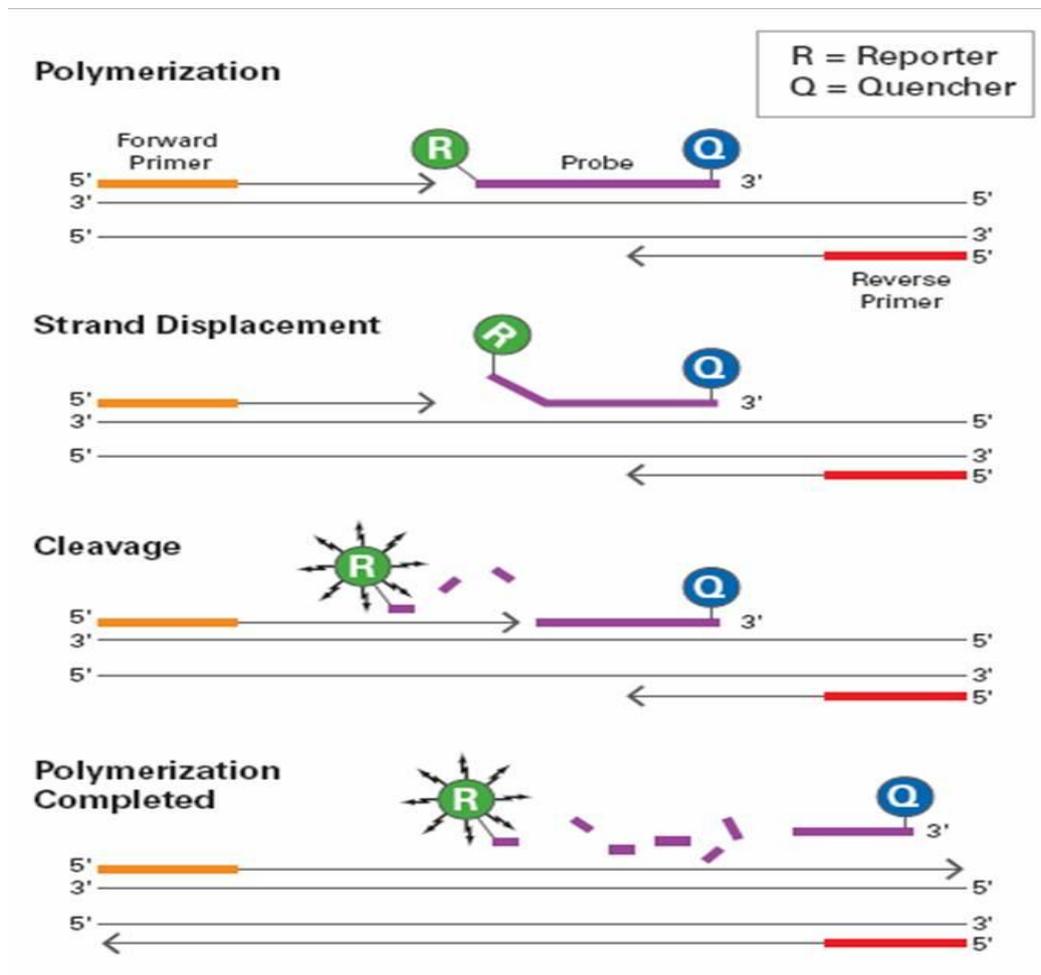
Hiernach wurde die gewonnene cDNA bei -20°C im Tiefkühlschrank aufbewahrt.

### **3.3.2. GAPDH-Amplifikation aus der cDNA**

Mit Hilfe dieser Methode ist es möglich, Nukleotidsequenzen (DNA, cDNA) enzymatisch zu vervielfältigen. Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) verläuft in drei Phasen. In der ersten wird die doppelsträngige DNA bei einer Temperatur von 95°C denaturiert. In der zweiten Phase lagern sich bei einer Temperatur zwischen 45°C und 65°C synthetische Oligonukleotide (Primer) an die DNA an (Annealing). Die Primer sind komplementär zu den Bereichen der DNA, die die Zielsequenz flankieren. In der dritten Phase synthetisiert das Enzym Taq-Polymerase vom 3'-Ende der Primer ausgehend den Gegenstrang der Zielsequenz mit dNTPs. Dieser Schritt wird 25-35 malig wiederholt, sodass das gewünschte Produkt exponentiell vervielfältigt wird.

### **3.3.3. Theoretische Grundlagen der Real-Time PCR**

Die quantitative Real-Time PCR wurde in den frühen 90er Jahren aus der Polymerase Kettenreaktion (PCR) weiterentwickelt. Mit Hilfe der Real-Time PCR ist es möglich, im Verlauf der PCR die entstehenden PCR-Produkte zu messen. Hierzu wird ein Fluoreszenz-Farbstoff (SYBR-Green) verwendet, der mit dem DNA-Doppelstrang interkaliert und dadurch fluoresziert oder es werden Oligonukleotidsonden verwendet. Diese Oligonukleotidsonden (Taqman-Sonde) sind am 5'-Enden mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Reporter, R) und am 3'-Ende mit einem Unterdrückerfarbstoff (Quencher, Q) markiert (Abb. 5). Die Taqman-Sonden sind so konzipiert, dass durch die räumliche Nähe der Farbstoffe ein Fluoreszenz-Energietransfer (FET) vom Reporter hin zum Quencher stattfindet<sup>88</sup>. Hierdurch ist das Fluoreszenzsignal des Reporters erniedrigt. Während der PCR lagert sich die Taqman-Sonde im Rahmen des Annealing am Zielgen zwischen den beiden Primern an. Während der Verlängerung der Primer wird die Sonde durch die Taq-Polymerase gespalten. Dadurch werden Reporter und Quencher räumlich getrennt und der FET aufgehoben. Infolgedessen wird das Reporter-Signal stärker. Der Anstieg des Reporter-Signals spiegelt den Anstieg der Menge der PCR-Produkte wider<sup>89/90</sup>.



**Abbildung 5:** Funktion der Taqman-Sonde Grafik aus: [www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com)

### 3.3.4. Relative Real-Time PCR und Housekeeping-Gene

Ein Zielgen kann mittels Real-Time PCR absolut und relativ quantifiziert werden. Bei der absoluten Quantifizierung wird die Zahl der Startkopien der cDNA in den einzelnen Proben bestimmt. Diese Methode ist jedoch fehleranfällig, da methodisch bedingte Ungenauigkeiten bei der Aufarbeitung der Proben die eingesetzten cDNA-Mengen beeinflussen und somit die Aussage verfälschen können. Um die mRNA-Kopiezahlen der Zielgene je Zelle innerhalb unterschiedlicher Proben vergleichen zu können, wird zusammen mit der Zielsequenz ein Housekeeping-Gen als endogene Kontrolle amplifiziert. Es wird angenommen, dass diese Housekeeping-Gene in allen

Zellen in gleicher Kopiezahl vorhanden sind und dass bei der Probenaufarbeitung sowohl Ziel- als auch Housekeeping-Gene von gleichen Faktoren beeinflusst werden. In dieser Arbeit wurden die drei Housekeeping-Gene  $\beta$ -Aktin, UBC und HPRT miteinander verglichen, um das geeignetste Kontrollgen herauszufinden.

### 3.3.5. Messung der Fluoreszenz und Berechnung des Ct-Wertes

Während der PCR wird nach jedem Sequenzierungszyklus die Fluoreszenzintensität gemessen. Anschließend werden diese Daten durch die TaqMan™ II-Software analysiert, welche diese in einzelne Komponenten zerlegt. Die Rohdaten bestehen aus dem Reporter-Farbstoff, dem Quencher-Farbstoff und der Passive Referenz ROX (Hauptbestandteil 6-carboxy-X-rhodamine), welche jeder Reaktion in konstanter Menge beigemischt wird. Des Weiteren existiert ein Hintergrundsignal aus Streulicht und Eigenfluoreszenz anderer Reaktionspartner.

Die Software ermittelt den Quotienten aus dem Signal des verwendeten Reporter-Farbstoffes und dem Signal von ROX. Dieser Quotient wird normalisiertes Reporter-Signal ( $R_n$ ) genannt. Die Basislinie wird aus den Mittelwerten aller normalisierten Reporter-Signale berechnet. Sie ist ein Maß für das Hintergrundsignal. Das System ermittelt die Basislinie während der ersten Zyklen, in denen sich das Fluoreszenzsignal nicht verändert. Um dieses Hintergrundsignal zu eliminieren, wird hiernach der  $\Delta R_n$  ermittelt, indem die Basislinie vom normalisierten Reporter-Signal abgezogen wird. Als nächster Schritt wird der Schwellenwert (Threshold) festgelegt, er beschreibt den Wert des Reporterfluoreszenzsignals, welcher in die Messungen eingeht. Dieser Wert muss oberhalb des Hintergrundsignals liegen. Der Schwellenwert wird willkürlich festgelegt. Er muss jedoch so gewählt werden, dass sich die Amplifikationsplots aller Wells in der exponentiellen Phase befinden (Abb. 7).

Der Cycle-Threshold (Ct) beschreibt den Zyklus, an dem der Amplifikationsgraph erstmalig den Schwellenwert (Threshold) überschreitet. Mit diesem Wert lässt sich relativ die Zahl der Startkopien in der korrespondierenden Reaktion ermitteln. Überschreitet beispielsweise der Amplifikationsplot in einem Well die Schwelle einen Zyklus später als in einem anderen, ist also der Ct um 1 größer, so war die

Startkopienzahl in diesem Well um die Hälfte niedriger (Abb. 6). Ist der Ct um 2 größer, war die Startkopienzahl um den Faktor vier niedriger.

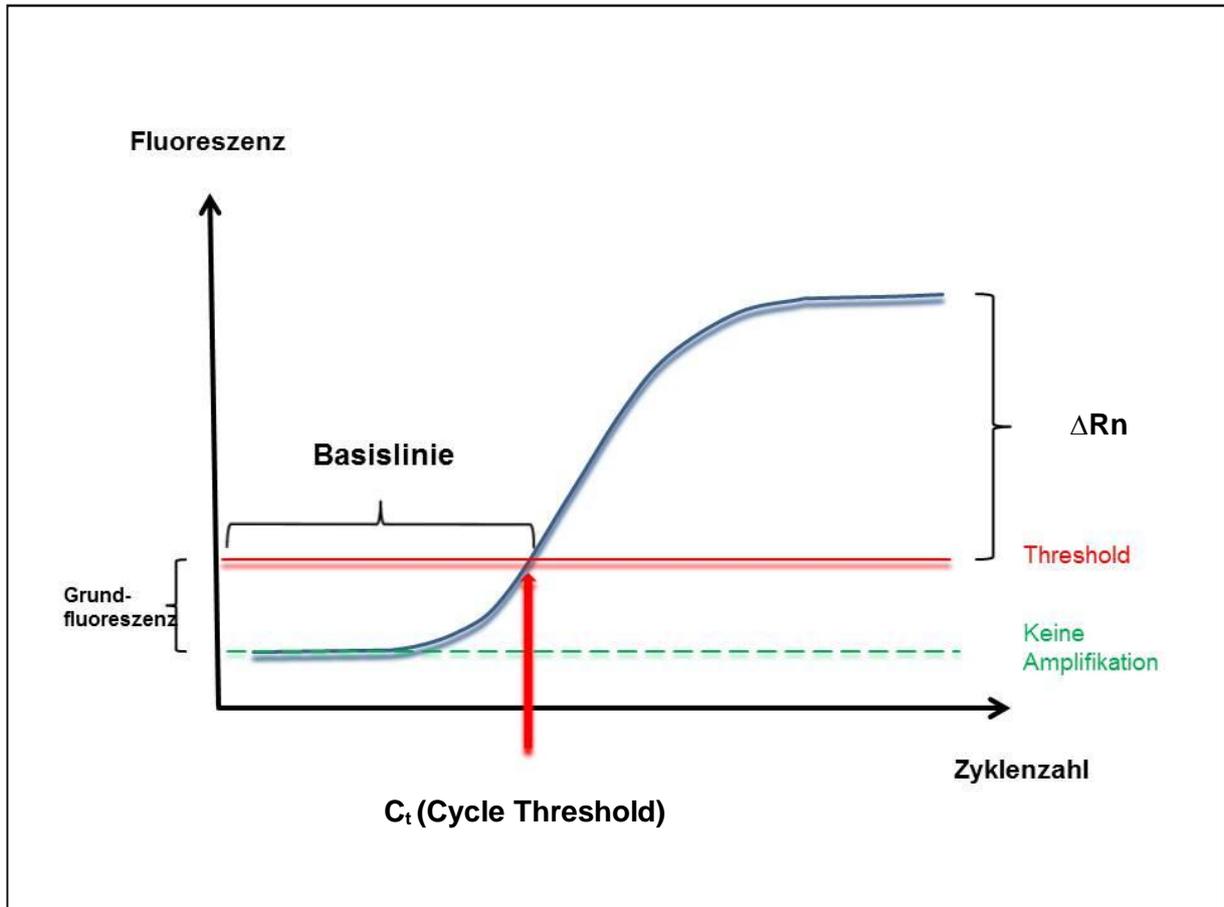
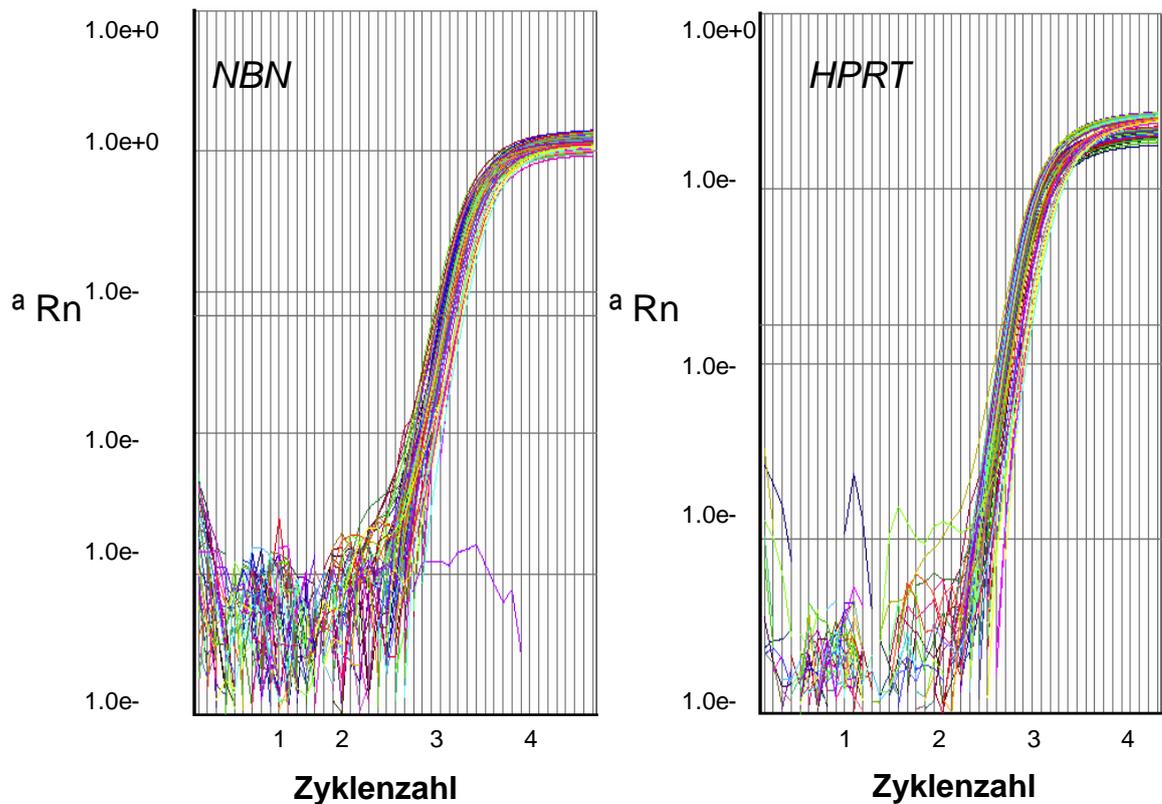


Abbildung 6



**Abbildung 6 und 7:** Darstellung einer Amplifikationsgraphik. Die gemessene Fluoreszenz (Ordinate) wird gegen die Zykluszahl (Abszisse) aufgetragen. Dabei zeigt der Reaktionsansatz ein Hintergrundsignal, bevor es zur Amplifikation kommt. Der Schwellenwert (Threshold) beschreibt den Wert des Reporterfluoreszenzsignals, welcher in die Messungen eingeht. Der Ct wird willkürlich festgelegt. Er muss jedoch so gewählt werden, dass sich die Amplifikationsplots aller Wells in der exponentiellen Phase befinden. Der Schnittpunkt zwischen Amplifikationsgraph und Schwellenwert wird als Cycle-Threshold (Ct) bezeichnet. Er markiert den Anstieg der Fluoreszenz über den Schwellenwert.

### 3.3.6. Durchführung der Real-Time PCR

Das Reaktionsvolumen betrug 25  $\mu$ l und setzte sich zusammen aus

- 20  $\mu$ l Mastermix
- 1,0  $\mu$ l Sense-Primer (Forward Primer) (300 nM)
- 1,0  $\mu$ l Antisense Primer (Reverse Primer) (300 nM)
- 1,0  $\mu$ l Sonde (Probe)
- 1,0  $\mu$ l H<sub>2</sub>O
- 1,0  $\mu$ l cDNA

Diese Reagenzien wurden in eine 96-Microtiterplatte pipettiert. Zur Analyse wurde die Microtiterplatte in das ABI PRISM<sup>®</sup> 7700 Detection System überführt. Dieses verfügt über einen eingebauten Thermocycler, in welchem die Proben 40 mal den folgenden Zyklus durchlaufen:

2 min 50°C (ab dem zweiten Zyklus Strangsynthese)

10 min 95°C (primärer Denaturierungsschritt)

### 3.3.7. Relative Quantifizierung mittels $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode

Mittels der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode ist es möglich, ohne die vorherige absolute Quantifizierung das Verhältnis von Zielgen und Housekeeping-Gen zu bestimmen. Bei dieser Quantifizierung wird das Verhältnis der Menge an eingesetzter RNA/cDNA in der Probe 1 zu der Menge eingesetzter RNA/cDNA in einer Probe 2 bestimmt. Neben der eigentlichen Zielsequenz wurde auch ein Referenzgen HPRT als Housekeeping-Gen mitamplifiziert. Dieses setzt die Menge an Ziel-RNA ins Verhältnis zu der insgesamt in der Probe vorhandenen RNA:

$$C_t = C_{tx} \cdot 2^{-C_{thkg}}$$

$C_{tx}$  ist der normalisierte Ct für das Zielgen (NBN)

$C_{thkg}$  ist der normalisierte Ct für das Housekeeping-Gene (HPRT)

Geht man von einer Verdopplung der Kopienzahl pro Zyklus aus, so gilt folgende Gleichung:

$$\text{Relative Genexpression} = 2^{-\Delta\Delta C_t} \text{ (angegeben ohne Einheiten)}$$

### 3.3.8. Sondendesign

Beim Design der Sonden sollten folgende Punkte beachtet werden <sup>91</sup>:

Das 5'-Ende der Sonde sollte sich in relativer Nähe des 3'-Endes des PCR Primers befinden.

Der GC-Gehalt sollte zwischen 40 und 60 % betragen.

Der Quencher sollte am 3'-Ende der Sonde liegen.

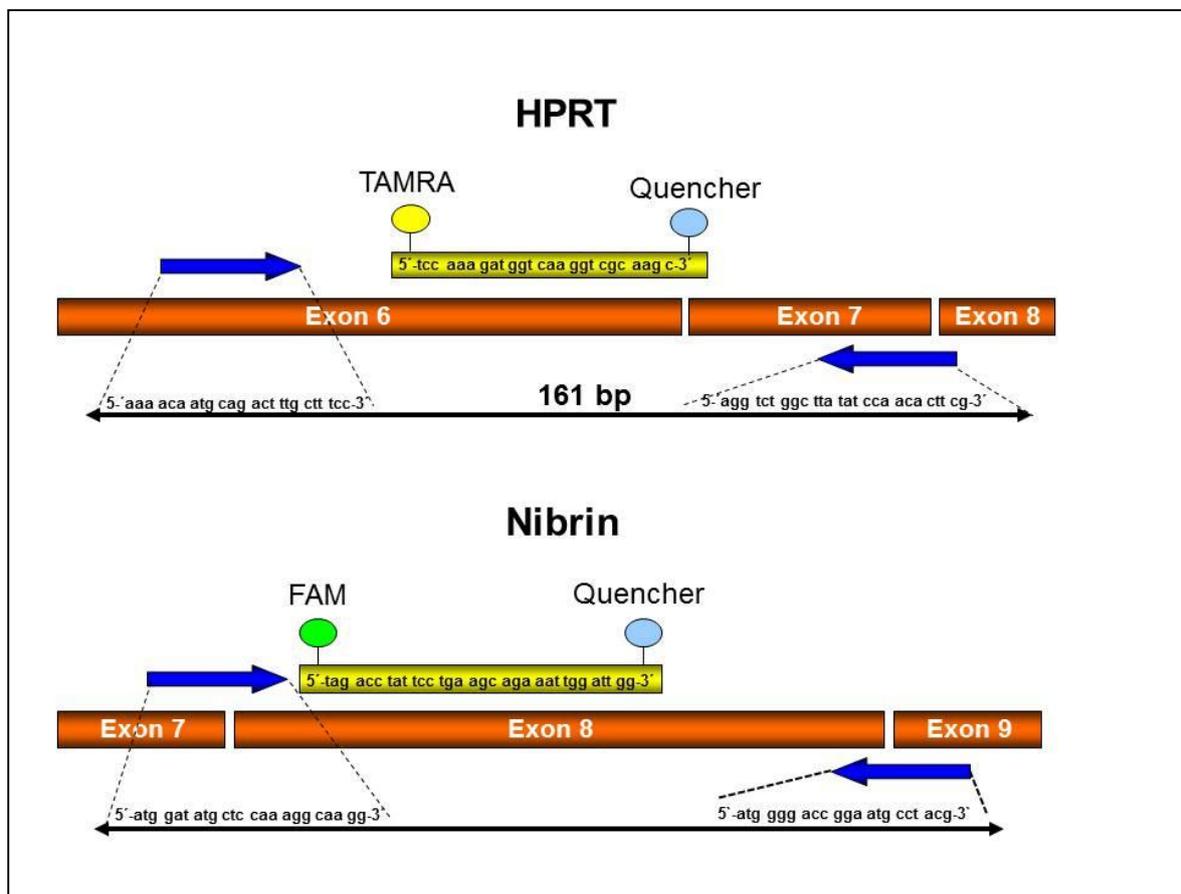
Die Sonde sollte 20-30 Basen groß sein.

Am 5'-Ende sollte kein G liegen.

Der Schmelzpunkt der Sonde muss mindestens 5 bis 10 °C über dem der Primer liegen.

Es sollten keine komplementären Regionen zwischen Sonde und PCR-Primern auftreten.

Es sollten keine Auffälligkeiten in der Sekundärstruktur der Sonden auftreten.



**Abbildung 8:** Schematische Darstellung des Aufbaus und der Bindungstellen der Sonden und Primer am HPRT-Gen und NBN-Gen sowie Darstellung der Primer- und Sonden-Sequenzen.

### 3.3.9. Schmelzkurvenanalyse

Durch eine Schmelzkurvenanalyse wurde die charakteristische Schmelztemperatur der PCR-Produkte bestimmt. Um eine Schmelzkurve zu erstellen, erhöht man direkt im Anschluss an eine Real-Time PCR die Temperatur kontinuierlich und misst dabei die Fluoreszenz. Mit steigender Temperatur trennen sich die DNA-Doppelstränge und verlieren den SYBR-Green Farbstoff bzw. den Sondenfarbstoff, wodurch die Fluoreszenzaktivität abnimmt. Je nach Länge des Produktes entsteht ein spezifischer Schmelzkurvenverlauf, der eine Unterscheidung zwischen einer Kontamination oder der Bildung von Primer-Dimeren zulässt.

### 3.4. Quantifizierung der p70-Nibrinexpression in NBS-Patientenzellen mittels Immunpräzipitation

#### 3.4.1. Proteinisolation

Es wurden  $1 \times 10^7$  sich in exponentiellem Wachstum befindliche LCL-Zellen geerntet. Die Zellen wurden 10 min bei 1.000 rpm abzentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen. Das Pellet wurde in 20 ml PBS-Puffer vorsichtig resuspendiert und wiederum für 10 min bei 1.000 rpm zentrifugiert. Danach wurde das Pellet in 1 ml PBS-Puffer resuspendiert, in ein Eppendorfgefäß überführt, zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 0,2 ml Lyse-Puffer resuspendiert. Die Lyse wurde für 20 min bei 4° C durchgeführt und der Überstand der folgenden Zentrifugation bei . 80°C gelagert.

#### 3.4.2. Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation wurde mit polyklonalen Antikörpern durchgeführt (anti-p95-Nibrin, rabbit polyclonal, Novus und anti-Mre11, rabbit polyclonal, Immunnogen, Novus). Der Antikörper anti-p95-Nibrin (Immunnogen) bindet an das C-terminale Ende des Nibrinproteins und präzipitiert somit das p70-Nibrinfragment. Beide Antikörper wurden in identischem Verhältnis zu je 0,9 l mit 12 l Dynabeads

Protein-G (Dyna) für 1,5 h bei 4 °C inkubiert. Dabei bindet die Fc-Region der Antikörper hydrophob an die mit Protein-G beschichteten Magnetpartikeln. Nach der Inkubation wurden 880 µg Proteinlysate zugegeben und für 1,5 h bei 4°C geschüttelt. Während dieses Schrittes binden die F(ab)-Bereiche der anti-p95-Nibrin- und anti-Mre11-Antikörper die spezifischen Epitope des p95-Nibrin bzw. p70-Nibrin sowie des Mre11-Proteins. Danach wurde der Beads-Antikörper-Protein-Komplex vom Restlysat mittels des magnetic particle concentrator (Dyna) abgetrennt und somit alle unspezifischen Proteine entfernt. Die Lösung wurde anschließend kurz zentrifugiert und der Überstand mittels magnetic particle concentrator verworfen und die Beads mit PBS gewaschen. Der Vorgang wurde zweimal wiederholt. Der Beads-Antikörper-Protein-Komplex wurde in Gellaufpuffer aufgenommen, hiernach bei 100 °C für 5 min im Wasserbad erhitzt wodurch die Proteine und Antikörper von den Magnetpartikeln getrennt wurden. Die Magnetpartikel wurden mittels magnetic particle concentrator entfernt und die spezifischen Proteine sowie die präzipitierenden Antikörper gelelektrophoretisch separiert.

### **3.4.3. Elektrophorese und Membranentwicklung**

Die präzipitierten Proteine und Antikörper wurden gelelektrophoretisch (NuPage Gel System) auf einem vorproduzierten Bis-Tris Gel bei 150 V für 1,5 h separiert. Vor Transfer wurden sponge pads und blotting-Papier in MOPS-SDS-Transferpuffer getränkt. Die Nitrocellulose-Membran für Western Blots Hybond ECL wurde mit Wasser benetzt und in MOPS-SDS-Transferpuffer getränkt. Nachdem die Elektrophorese abgeschlossen war, wurde die Gelkassette aufgebrochen und das Gel im Transfermodul mit den anderen Komponenten zusammengesetzt. Der Elektroblot wurde für 1,5 h bei 30 V durchgeführt. Nach Abschluss des Transfers wurde die Membran zur vorläufigen Auftragskontrolle mehrmals mit ddH<sub>2</sub>O gespült und danach für 5-10 min mit Ponceau S-Lösung gefärbt und kontrolliert. Nachfolgend wurde die Membran mit dem Blockierungsreagenz (Roti<sup>R</sup>-Block) der Firma Roth über Nacht abgesättigt, um eine unspezifische Bindung der zum Nachweis benutzten Antikörper zu vermeiden. Danach wurde die Membran mit den primären Antikörpern Mre11-12D7 (mouse monoclonal) und p95-Nibrin/NBN-1D7 (mouse monoclonal) in einer Verdünnung von 1:1.000 in Roti<sup>R</sup>-Block für 1 h bei Raumtemperatur gerollert.

Nach mehrmaligem Waschen mit TBS-T-Puffer wurde für 1 h bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper anti-mouse-HRP-IgG in einer Verdünnung von 1:1.000 in Roti<sup>R</sup>-Block inkubiert.

Die Membran wurde danach mit TBS-T-Puffer gespült und mit jeweils 1-2 ml ECL Western Blot Detektionslösungen 1 und 2 für 1 min inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 10 min mit TBS-T wurde mit dem zweiten Meerettich-Peroxidase-konjugierten Antikörpern (HRP) behandelt. Durch die Zugabe der Western Blot Detektionslösungen kommt es durch den zweiten, an das HPR gekoppelten Antikörper zur Oxidation des Luminols und hierdurch zur Lichtemission. Diese emittierten Signale wurden auf Kodak Scientific Imaging Film, X-OMAT<sup>TM</sup> belichtet und dieser anschließend entwickelt und fixiert.

### **3.4.4. Transfernachweis**

Zur Überprüfung des Proteintransfers vom Gel auf die Nitrocellulose-Membran wurde das Gel für 1 h in Coomassie-Färbelösung geschwenkt, um sicherzustellen, dass die Proteine vollständig transferiert wurden.

### **3.4.5. Quantifizierung der p70-Nibrin Bandenstärken**

Zur Quantifizierung der p70-Nibrin-Bandenstärken wurde der belichtete Film mittels Durchlicht-Scan digitalisiert und die Bilddateien mittels dem Programm Photoshop in das für ImageQuant notwendige Format umgewandelt. Anschließend wurden unter Abzug des Hintergrundrauschens, die einzelnen Volumenwerte der p70-Nibrinbanden in Bezug zu dem Wert der Mre11-Bande der gleichen Probe gesetzt. Mre11 diente als interne Auftragskontrolle und standardisierte den Volumenwert der p70-Nibrinbanden innerhalb der verschiedenen Experimente. Des Weiteren wurden alle p70-Nibrinwerte in Relation zum Verhältnis der Volumenwerte der p95-Nibrin- und Mre11-Bande einer Kontrollzelllinie gesetzt, um einen Vergleichswert zwischen den einzelnen Gelen zu erhalten.

### **3.5. Western-Blot**

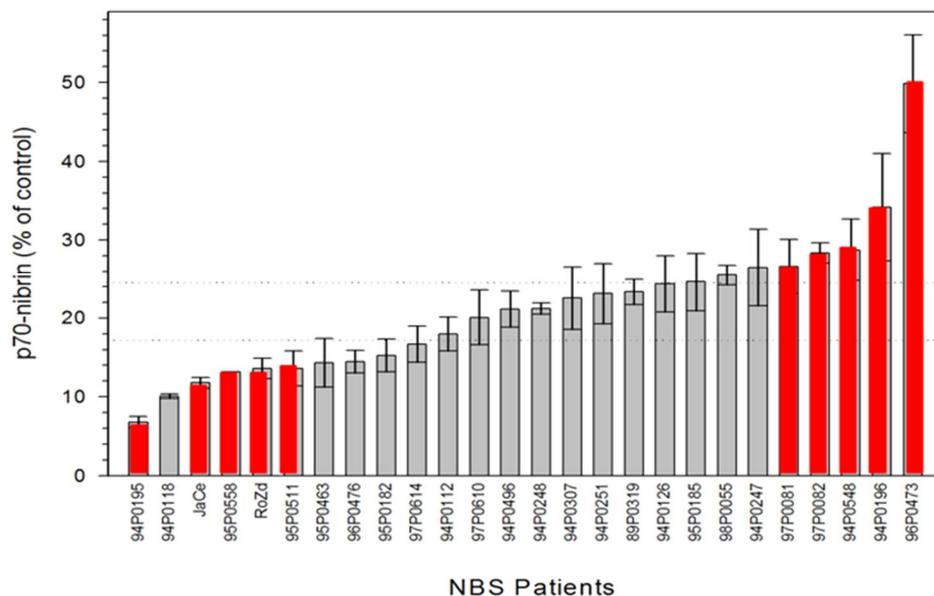
Hierbei werden extrahierte Proteine auf einem Gel elektrophoretisch ihrer Größe nach aufgetrennt und durch einen Geltransfer auf eine Trägermembran aus Nitrocellulose übertragen. Hierauf können sie selektiv durch Antigen-Antikörperreaktion nachgewiesen werden. Zur Durchführung wurden Gele, Puffer sowie das Gel Blot Modul der Firma Invitrogen verwendet.

Zur Gewinnung der Proteine wurden  $1 \times 10^6$  sich im exponentiellen Wachstum befindenden Zellen geerntet, 10 min bei 1000rpm sedimentiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden die Zellen durch 10-minütige Zentrifugation bei 1000 rpm in PBS gewaschen, der Überstand verworfen und das Pellet hierauf in 50  $\mu$ l PBS resuspendiert. Danach wurden 50  $\mu$ l 2fach NuPAGE-LDS-Sample-Buffer von Invitrogen hinzugefügt, durch welchen die Zellen lysiert wurden. Im Zelllysats befindliche DNA wurde anschließend mittels Ultraschall 30 sec. gesichert, um deren störende Viskosität zu vermindern. 10  $\mu$ l des Lysats wurden danach in ein neues Eppendorfgefäß (200 $\mu$ l) überführt und 1  $\mu$ l Reducing Agent zur Aufhebung der Protein-Sekundärstruktur durch Spaltung kovalenter Disulfidbrücken hinzugefügt. Die Proben wurden anschließend 5 min bei 70°C im Heizblock denaturiert.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Auswahl der homozygoten Zelllinien

Bei den untersuchten Zellen wurden bereits von Krüger et al. 2007<sup>80</sup> Mutationsanalysen vorgenommen. Alle Patientenzellen waren homozygot für die 657 $\Delta$ 5-Mutation. Ziel der Untersuchung dieser Arbeit war es, mögliche Ursachen für die quantitativen Unterschiede in den Nibrinmengen der Patientenzellen zu finden. Um die mRNA-Mengen des NBN-Gens in den ausgewählten Patienten- und Kontrollzelllinien zu bestimmen, wurden zwei Versuchsreihen durchgeführt. Es wurden diejenigen fünf lymphoblastoiden homozygoten Zelllinien ausgewählt, die in der Untersuchung von Krüger et al. 2007<sup>80</sup> die jeweils höchsten und die jeweils geringsten p70-Nibrinmengen aufwiesen (Abb.9). Desweiteren wurden neun gesunde Zelllinien als Kontrollen untersucht, um deren NBN-mRNA-Mengen mit denen der Patientenzelllinien vergleichen zu können.



**Abbildung 9:** Mittelwerte der p70-Nibrinmenge von mindestens vier Immunpräzipitationen jeder Patientenzelllinie (Krüger et al. 2007<sup>80</sup>). Rot markiert sind diejenigen Zellen, deren mRNA in die Untersuchung einbezogen wurden. Die zwei Linien zeigen das obere und untere 95%ige Konfidenzintervall an.

**In die Untersuchung einbezogene Zelllinien**

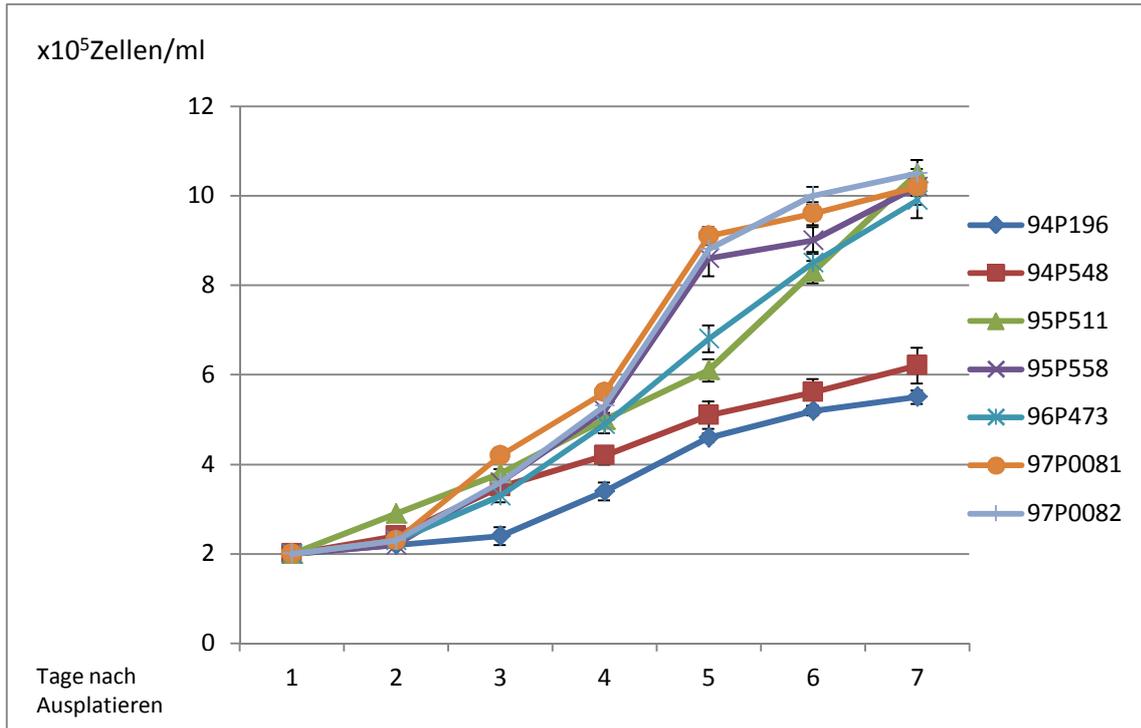
	Zelllinie	Relative P70-Nibrin-Mengen
wenig Nibrin	94P195	6,78%
	JaCe	11,77%
	95P558	13,14%
	RoZd	13,59%
	95P511	13,60%
viel Nibrin	97P0081	26,64%
	97P0082	27,84%
	94P548	28,71%
	94P196	34,14%
	96P473	49,85%

**Tabelle 1:** Tabelle der zwei Gruppe der LCL´s, die in die Untersuchung einbezogen wurden. Dargestellt sind die codierten Zelllinien und deren von Krüger et al. 2007<sup>80</sup> ermittelten relativen p70-Nibrinmengen.

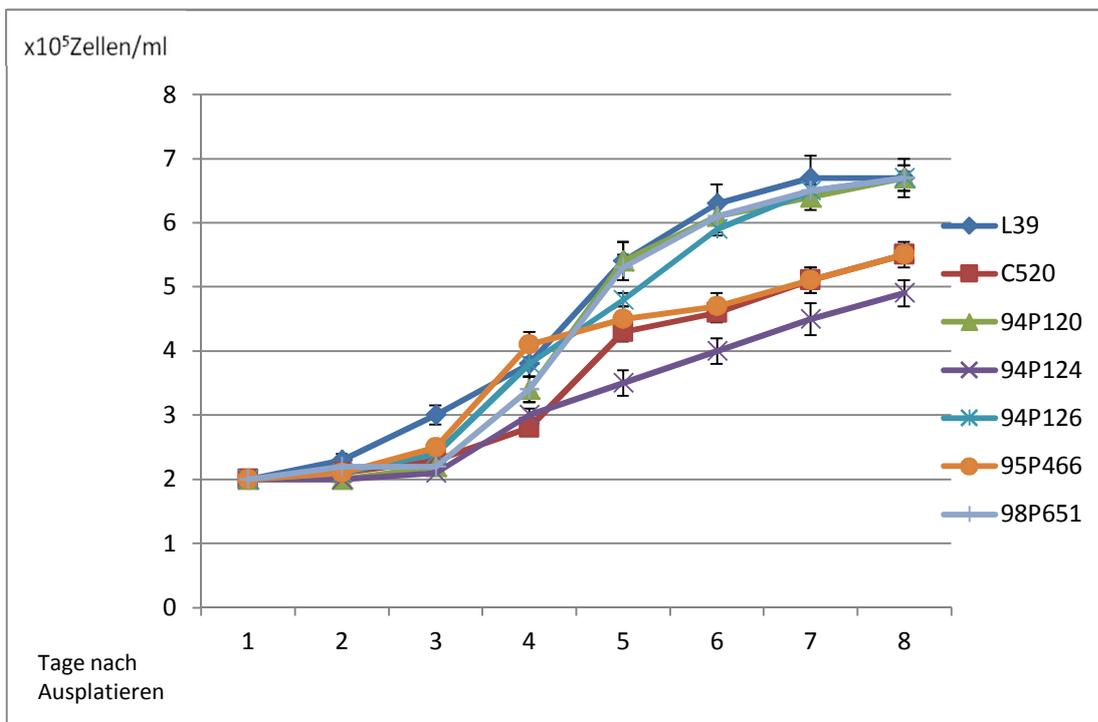
**4.2. Untersuchung des Wachstumsverhaltens homozygoter, heterozygoter und gesunder Zelllinien**

Von den zehn zu untersuchenden NBS-Patientenzelllinien und den neun Kontrollzelllinien wurden Wachstumskurven angefertigt. Die Zellzahl wurde über zwölf Tage täglich im Coulter Counter gemessen. Der Zeitpunkt des maximalen Wachstums wurde ermittelt, um sicherzustellen, dass die Zellen in der stoffwechselaktivsten Phase untersucht wurden. An allen heterozygoten Zelllinien, deren p70-Nibrin Expressionsunterschiede im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, wurden die gleichen Untersuchungen durchgeführt. Um mögliche Fehlerquellen zu erkennen, die aus Unterschieden im Wachstumsverhalten resultieren, wurden die Wachstumseigenschaften der nibrinreichen und nibrinarmen homozygoten Zellen sowie das Wachstumsverhalten zwischen homozygoten Zellen und Wildtypzellen verglichen. Diese Daten bildeten die Grundlage für die Etablierung der Standardbedingungen für nachfolgende Experimente, da die Wachstums- und Proliferationseigenschaften entscheidenden Einfluss auf die Reproduzierbarkeit weiterer Versuche hatten.

## Ergebnisse



**Abbildung 10:** 7-tägiges Wachstum der NBS-Patientenzelllinien (LCL's) mit der 657Δ5-Mutation. Die Ausgangszellichte betrug  $2,0 \times 10^5$  Zellen / ml in 40ml RPMI.



**Abbildung 11:** 8-tägiges Wachstum der Kontrollzelllinien (LCL's). Die Ausgangszellichte betrug  $2,0 \times 10^5$  Zellen / ml in 40ml RPMI.

## Ergebnisse

LCL's	max. Zellzahl x 10 <sup>5</sup> /ml	max. Wachstumssteigung	max. Wachstumssteigung nach Tagen
<i>Kontrollen</i>			
L39	7,8	1,42	72h-96h
C520	6,9	1,52	72h-96h
94P120	8,0	1,58	72h-96h
94P124	6,5	1,42	48h-72h
95P466	7,2	1,64	48h-72h
98P651	8,1	1,55	72h-96h
∅	<b>7,4</b>	<b>1,52</b>	
<i>Patienten</i>			
94P196	6,8	1,33	72h-96h
94P548	8,8	1,21	72h-96h
95P511	13,3	1,36	96h-120h
95P558	12,8	1,65	72h-96h
97P0081	13,0	1,62	72h-96h
97P0082	13,5	1,66	72h-96h
96P473	13,4	1,52	72h-96h
∅	<b>11,6</b>	<b>1,48</b>	

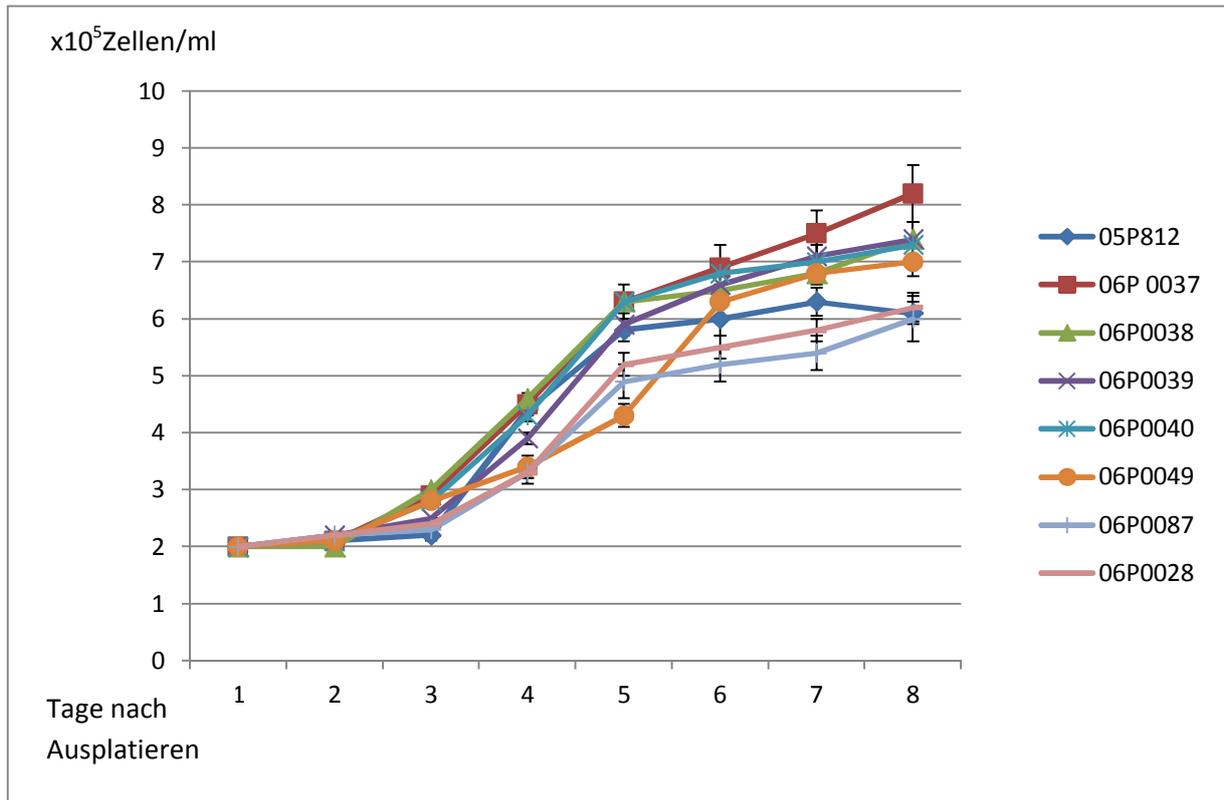
**Tabelle 2:** Darstellung der maximalen Wachstumssteigung sowie des Zeitpunkts der maximalen Wachstumssteigung der Kontroll- und Patientenzelllinien. Während die Kontrollen durchschnittlich  $7,4 \times 10^5/\text{ml}$  erreichen, beträgt die maximale Zellzahl der Patienten  $11,6 \times 10^5/\text{ml}$ . Sowohl Kontrollen als auch Patienten haben mit 1,52 bzw. 1,48 annähernd identische, maximale Wachstumssteigungen.

Die untersuchten Zellen wiesen eine hohe Variabilität im Wachstumsverhalten auf. Unter den Patientenzelllinien fallen 94P196 und 94P548 durch langsames Wachstum auf. Es zeigt sich jedoch keine Korrelation zwischen Nibrinmengen der Patientenzellen und deren Wachstumsverhalten. So weist 94P196 in der Untersuchung von Krüger et al. 2007<sup>80</sup> den zweithöchsten p70-Nibrinwert auf. 97P0082 hingegen wies sowohl einen hohen Nibrinwert als auch mit 1,66 eine hohe maximale Wachstumsgeschwindigkeit auf. Ebenso zeigt die Zelllinie 96P473, welche in der Untersuchung von Krüger et al. 2007<sup>80</sup> den höchsten Nibrinwert aufwies, mit 1,52 eine durchschnittliche Wachstumssteigung. Ebenso zeigte sich weder ein Zusammenhang zwischen Nibrinwerten und maximaler Zellzahl, noch hatte der Zeitpunkt des maximalen Wachstums Einfluss auf die Nibrinmengen.

Die Kontrollzelllinien wiesen im Vergleich zu den Patientenzelllinien einen um ca. 24 Stunden früheren Beginn der exponentiellen Wachstumsphase auf. Des Weiteren

## Ergebnisse

erreichten die Patientenzelllinien mit durchschnittlich  $11,6 \times 10^5$  Zellen/ml eine höhere Zellzahl als die der gesunden Individuen mit einem Durchschnitt von  $7,4 \times 10^5$  Zellen / ml. Die Zelllinien wurden über insgesamt 12 Tage gemessen, um die maximale Zellzahl / ml zu ermitteln.



**Abbildung 12:** 8-tägiges Wachstum heterozygoter Zelllinien (LCL's). Die Ausgangszelldichte betrug  $2,0 \times 10^5$  Zellen / ml in 40 ml RPMI.

## Ergebnisse

LCL's	max. Zellzahl x 10 <sup>5</sup> /ml	max. Wachstumssteigung	max. Wachstumssteigung nach Tagen
<i>Heterozygote</i>			
05P812	9,8	1,32	72h-96h
06P0037	8,4	1,40	72h-96h
06P0038	7,3	1,37	72h-96h
06P0039	9,5	1,51	72h-96h
06P0040	8,6	1,47	72h-96h
06P0049	7,0	1,47	96h-120h
06P0087	6,3	1,48	72h-96h
06P0028	6,8	1,57	72h-96h
∅	<b>8,0</b>	<b>1,44</b>	

**Tabelle 3:** Darstellung der maximalen Wachstumssteigung sowie der maximalen Zellzahl. Die maximale Zellzahl betrug  $8,0 \times 10^5$  / ml. Damit liegen die Heterozygoten nahe dem Wert der Kontrollzelllinien. Die maximale Wachstumssteigung liegt mit 1,44 nahe der Werte der Patienten- und Kontrollzelllinien.

Wachstumsverhalten der heterozygoten Trägerzelllinien variierte ebenso wie das der Patientenzelllinien und Kontrollzelllinien. Die maximale Zellzahl der Trägerlinien lag mit durchschnittlich  $8,0 \times 10^5$  / ml nahe dem der gesunden Kontrollzelllinien mit  $7,4 \times 10^5$  / ml. Die maximale Wachstumssteigung lag mit 1,44 niedriger als die der Patienten- und Kontrollzelllinien. Dennoch liegen die einzelnen Werte innerhalb der Variationsbreite der Patientenzellen (Tab. 3).

Der Zeitpunkt der maximalen Wachstumsgeschwindigkeit variiert von Zelllinie zu Zelllinie. Bei allen jedoch setzt das maximale Wachstum nicht früher als ca. 72 h und nicht später als 96 h nach Ausplattieren ein. Kontrollzelllinien und Patientenzelllinien wiesen mit 1,52 bzw. 1,48 vergleichbare maximale Wachstumssteigungen auf. Die Vergleichbarkeit war auf Grund der Unabhängigkeit der Nibrinmengen sowohl von Zellzahl, maximaler Wachstumssteigung als auch vom Zeitpunkt des maximalen Wachstums gewährleistet. Für jede Zelllinie wurde der Zeitpunkt des maximalen exponentiellen Wachstums ermittelt und die Zellextraktion zu diesem Zeitpunkt durchgeführt.

### 4.3. Vergleich der p70-Nibrin und der NBN-mRNA-Mengen

Die ausgewählten Zelllinien wurden jeweils zwei Mal separat in exponentielles Wachstum versetzt. Zum Zeitpunkt der maximalen Wachstumsgeschwindigkeit wurde jeweils mRNA aus  $1 \times 10^7$  Zellen extrahiert. Von der extrahierten mRNA wurde jeweils 1 nl zweimalig in cDNA umgeschrieben. Von jeder Zelllinie standen somit vier cDNA-Proben zur Verfügung. Deren NBN-mRNA-Mengen wurden darauf mittels Real-Time PCR untersucht. Die Berechnung der Expressionsunterschiede des 657 $\Delta$ 5-Allels wurde mit der  $\Delta\Delta$ Ct-Methode durchgeführt. In der Untersuchung wurden von jeder Probe sechs Werte analysiert. Als endogene Kontrolle wurden  $\beta$ -Aktin, Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT) und Ubiquitin (UBC) verwendet.

#### 4.3.1. Wahl der endogenen Kontrolle (Housekeeping-Gen)

Die Wahl eines ungeeigneten Housekeeping-Gens kann die Ergebnisse der Real-Time PCR-Untersuchungen verfälschen, inkorrekte Zusammenhänge vortäuschen oder vorhandene Korrelationen verschleiern<sup>92</sup>. Die Variabilität der Expression der Housekeeping-Gene ist gewebeabhängig. So wird z.B. die Phosphatglycerindehydrogenase (GAPDH), eines der am häufigsten verwendeten Housekeeping-Gene, insbesondere im Myokard vielfältig reguliert und weist große Expressionsschwankungen auf<sup>92</sup>. Daher müssen für jeden Zelltyp geeignete endogene Kontrollen ermittelt werden. Um unter den zur Verfügung stehenden Housekeeping-mRNA ein geeignetes zu bestimmen, wurde jeweils der  $\Delta$ Ct-Wert des Housekeeping-Gen mit dem NBN-mRNA ermittelt und verglichen sowie die Schwankungsbreite der Ct-Werte innerhalb der verschiedenen Proben der Housekeeping-Genen untersucht.

Die mRNA eines geeigneten Housekeeping-Gen sollte in allen untersuchten Zelllinien unabhängig von Zellstadium und äußeren Einflüssen mit konstanter Kopiezahl exprimiert werden. Schwanken die Ct-Werte aufgrund hoher Expressionsvariabilität innerhalb der einzelnen Proben, so können geringe Unterschiede im Zielgen unerkant bleiben<sup>93</sup>. In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit schwankten die Ct-Werte der Housekeeping-Gene in unterschiedlichem Maße. Da es sich bei den Versuchen aber nicht um absolute,

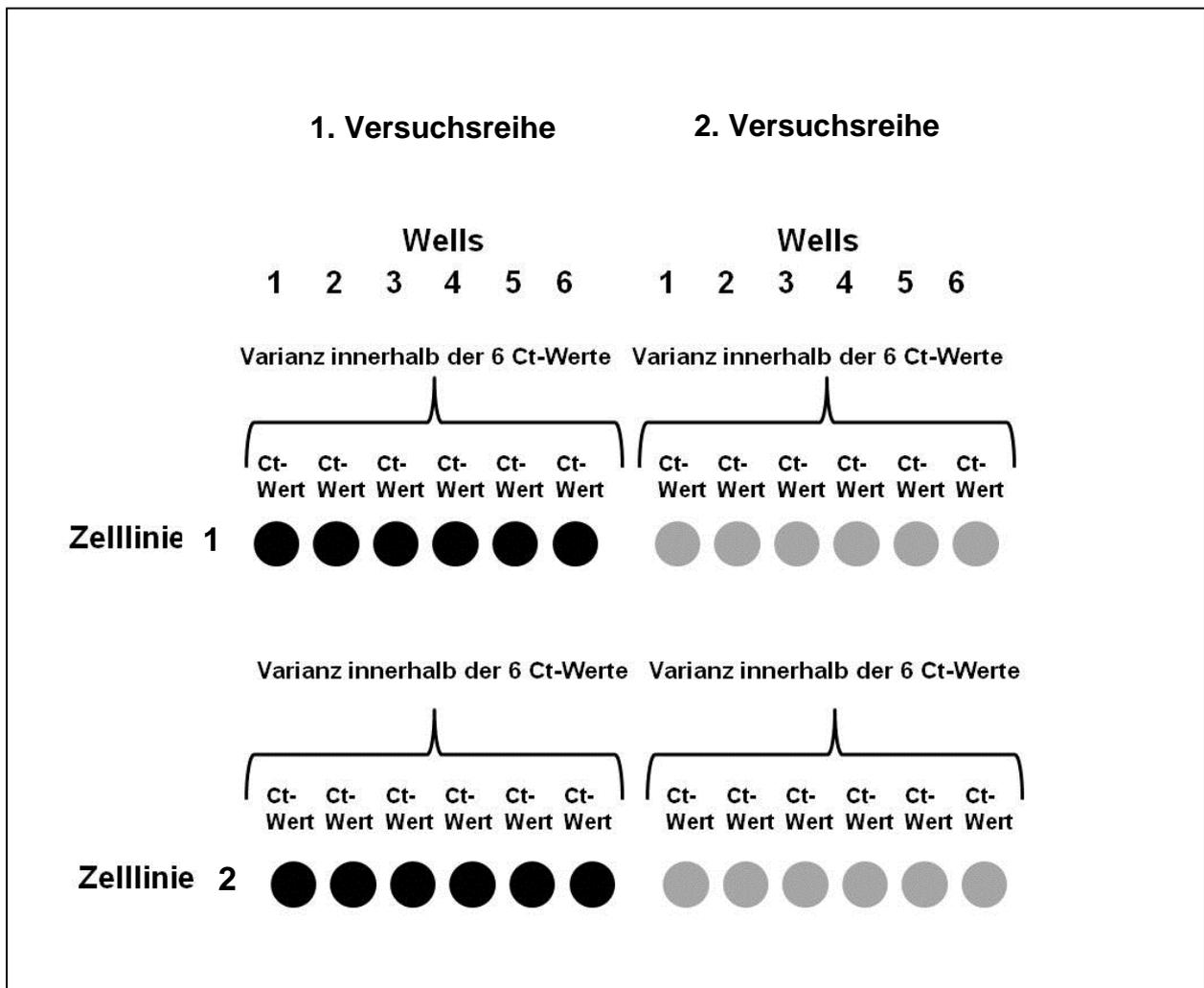
sondern um relative Quantifizierungen handelte, konnten die Ursachen für Schwankungen der Ct-Werte nicht eindeutig ermittelt werden. Prinzipiell kamen hierfür sowohl Expressionsvariabilität, unterschiedliche Effizienzzraten bei der Reversen Transkription als auch unterschiedliche Mengen an eingesetzter cDNA in Frage.

### **4.3.2. Untersuchung der Ct-Wertschwankungen in den Housekeeping-Genen**

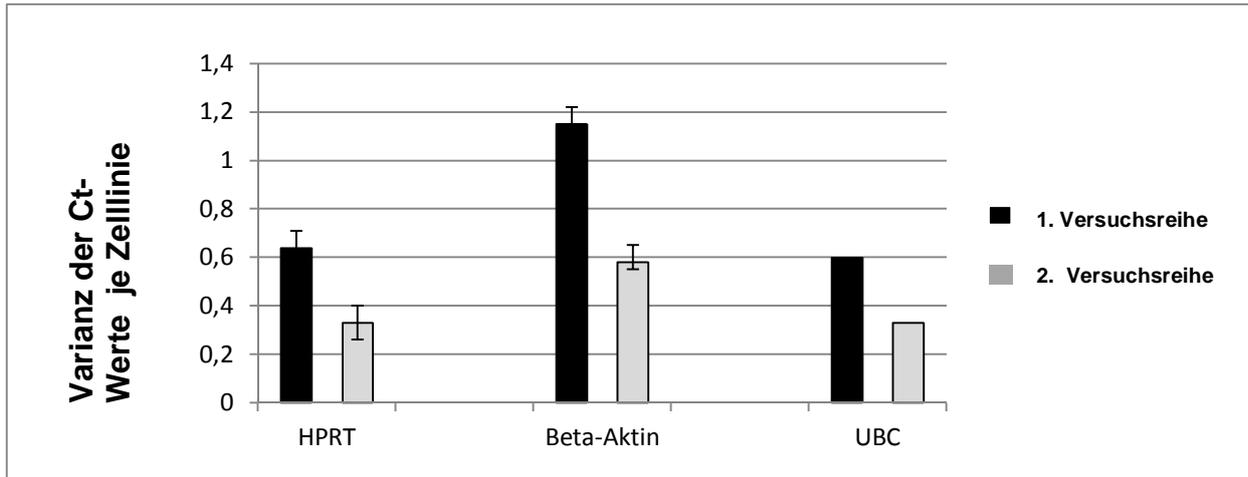
Um eine Aussage über die Expressionskonstanz der einzelnen Housekeeping-Gene treffen zu können, wurden mehrere Parameter von drei Kontrollzelllinien und von vier Patientenzelllinien untersucht.

Von jeder der sieben Zelllinien wurden zwei unabhängige RNA-Proben extrahiert. Jede dieser RNA-Proben wurde mittels Reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Von jeder dieser cDNA-Proben wurden je sechs Wells in der Real-Time-PCR untersucht. Somit standen pro Zelllinie aus jeder der zwei cDNA-Proben sechs Ct-Werte zur Verfügung.

- 1. Analyse:** Es wurden die Ct-Wertschwankungen innerhalb der sechs Wells von jeder cDNA-Probe untersucht. Schwankten z.B. die sechs Ct-Werte einer Zelllinie zwischen 29,0 und 30,0, so war die Ct-Wertschwankung 1,0. Für jedes Housekeeping-Gen wurde der Mittelwert der Ct-Wertschwankungen aller Zelllinien ermittelt (siehe Abb. 13 und 14). Damit konnte eine Aussage über die Expressionskonstanz des Housekeeping-Gens innerhalb identischer Zelllinien gemacht werden.



**Abbildung 13:** Schematische Darstellung der ersten Analyse zur Validität der Housekeeping-Gene. Aus jeder Zelllinie wurden unabhängig zwei RNA-Proben extrahiert. Die Ct-Werte dieser beiden Versuchsreihen sind zur besseren Unterscheidung grau und schwarz dargestellt. Jede dieser RNA-Proben wurde mittels Reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Von jeder dieser cDNA-Proben wurden pro Housekeeping-Gen sechs Ct-Werte untersucht. Die Schwankungen innerhalb der sechs Ct-Werte jeder cDNA-Probe wurde berechnet. Pro Housekeeping-Gen wurden die Mittelwerte der Ct-Wertschwankungen aller sieben Zelllinien ermittelt.

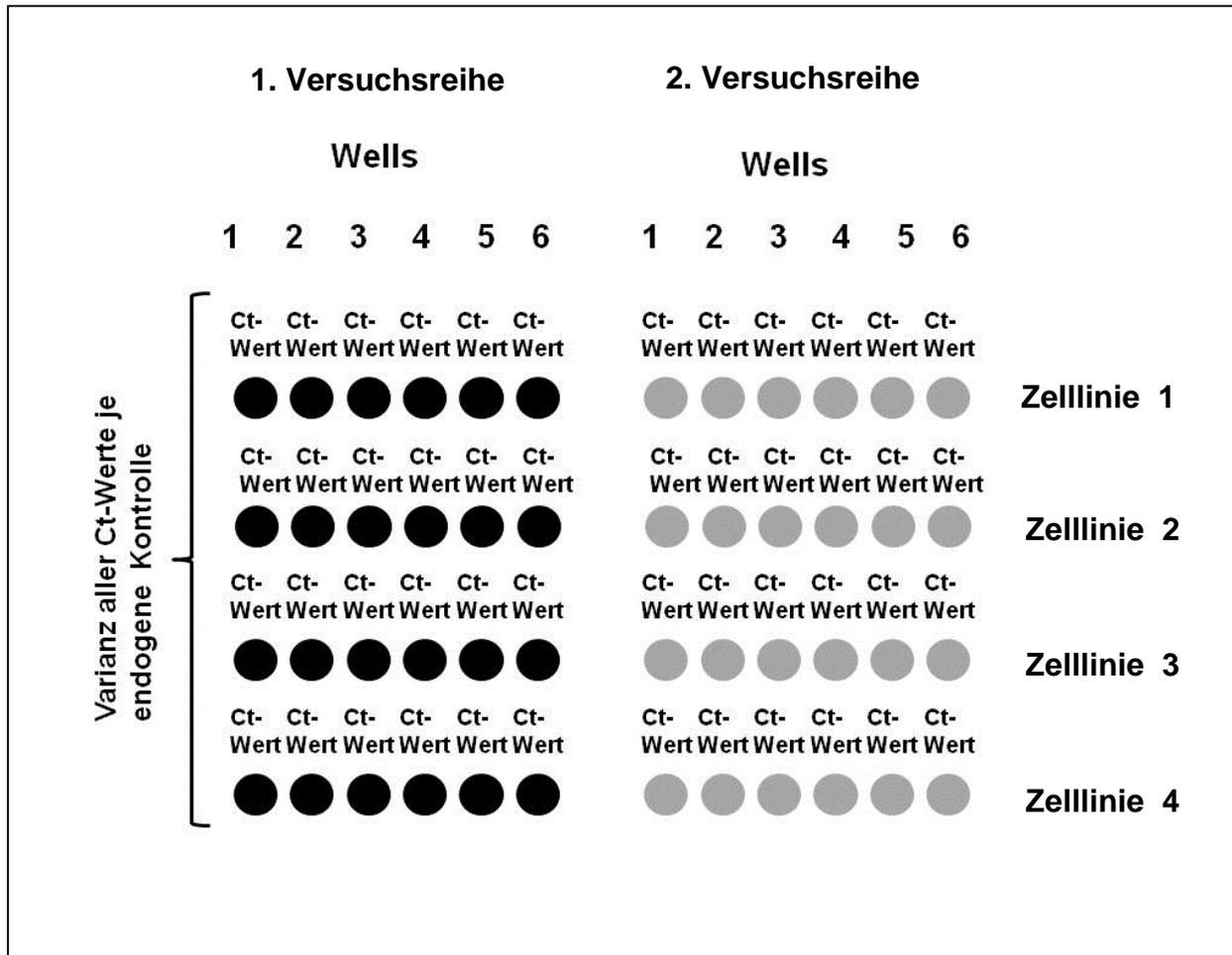


**Abbildung 14:** Darstellung der durchschnittlichen Ct-Wertschwankung innerhalb der sechs Werte einer Zelllinie. Zum Vergleich wurden mRNA-Proben indentischer Zelllinien von zwei unabhängigen Extraktionen einbezogen.

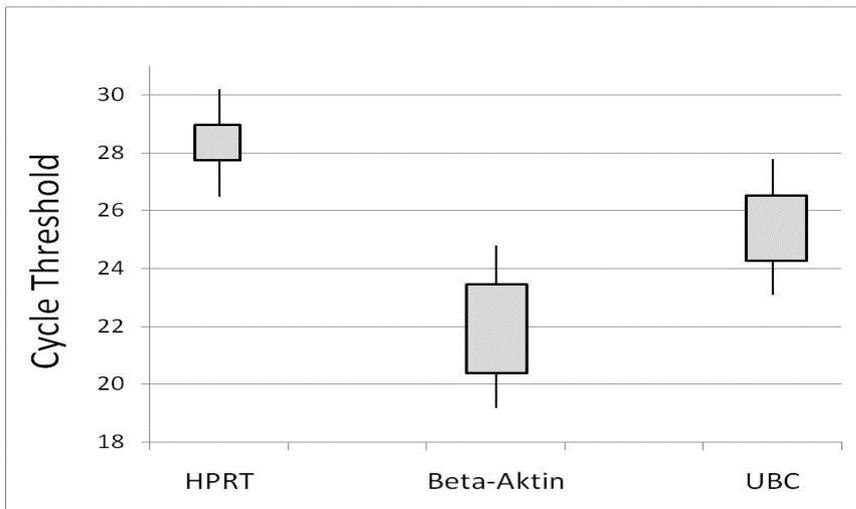
Die Spanne der Ct-Wertschwankungen variierte zwischen den beiden Versuchsreihen. Die Werte von HPRT mit 0,63 in der ersten Extraktion und 0,33 in der zweiten Extraktion und von UBC mit 0,6 in der ersten und 0,33 in der zweiten Extraktion waren vergleichbar. -Aktin wies mit 1,15 und 0,59 eine höhere Schwankung der Ct-Werte auf. Interessanterweise zeigte sich jedoch, dass die Spanne der Ct-Wertschwankungen der zweiten Extraktion in allen Housekeeping-Genen ca. 55% der Spanne der Proben der zweiten Extraktion betrug. Diese höhere Spanne der Ct-Wertschwankungen innerhalb von -Aktin schien nicht durch bloße Pipettierfehler verursacht, da sie konstant in den Werten der Proben aller Zelllinien in zwei unabhängigen Extraktionen auftrat. Vielmehr lässt sich ein Zusammenhang mit einer konstanten Fehlerquelle vermuten.

**2. Analyse:** Danach wurde für jede endogene Kontrolle die absolute Schwankungsbreite der Ct-Werte aller sieben Zelllinien ermittelt. Hierfür wurden für jedes Housekeeping-Gen alle Ct-Werte ermittelt und die Schwankung zwischen maximalen und minimalen Ct-Wert dargestellt (Abb. 15 und 16). Z.B. schwankten die HPRT-Ct-Werte der Zelllinie 96P124 zwischen 30,1 und 29,5. Die HPRT-Ct-Werte der Zelllinie 95P466 schwankten zwischen 26,3 und 26,9. Die HPRT-Ct-Werte der übrigen Zelllinien lagen zwischen 30,1 und 26,3. Damit schwankten die Ct-Werte für HPRT absolut zwischen 30,1 und 26,3. Die absolute Schwankungsbreite ergab sich

aus der Differenz des maximalen HPRT-Ct-Werts (30,1) und des minimalen HPRT-Ct-Werts (26,3). Aus diesen Werten konnten Rückschlüsse über die Expressionskonstanz der Housekeeping-Gene in unterschiedlichen lymphoblastoiden Zellen gezogen werden.



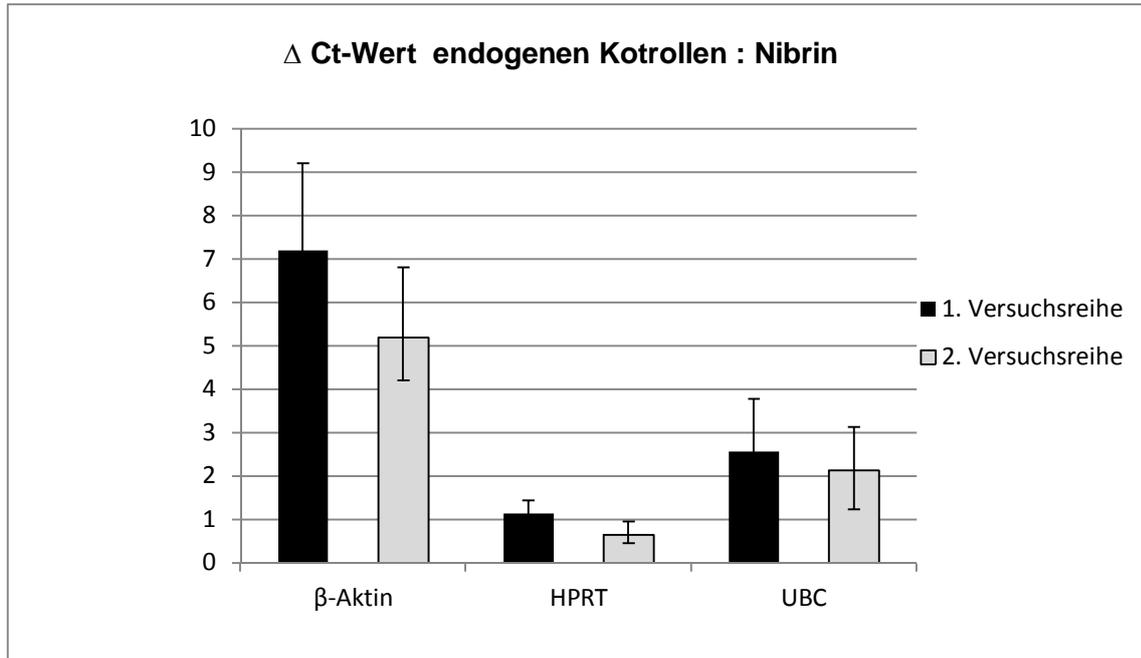
**Abbildung 15:** Schematische Darstellung der zweiten Analyse zur Validität der Housekeeping-Gene. Aus jeder Zelllinie wurden unabhängig zwei RNA-Proben extrahiert. Die Ct-Werte dieser beiden Versuchsserien sind zur besseren Unterscheidung grau und schwarz dargestellt. Jede dieser RNA-Proben wurde mittels Reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Von jeder dieser cDNA-Proben wurden pro Housekeeping-Gen sechs Ct-Werte untersucht. Für jede endogene Kontrolle wurde die absolute Schwankungsbreite der Ct-Werte aller sieben Zelllinien ermittelt und diese untereinander verglichen.



**Abbildung 16:** Darstellung der Real-Time-PCR Cycle-Threshold-Werte aller sieben Zelllinien. Von den Expressionswerten der Housekeeping-Gene sind 25zigste Perzentile und 75zigste Perzentile sowie Fehlerbalken dargestellt.

Hierbei schwankten die Ct-Werte von  $\beta$ -Aktin zwischen 19,1 und 25,3 und wiesen mit 6,2 die höchste Schwankungsbreite auf, während HPRT zwischen 26,3 und 30,1 schwankten und mit 3,8 die geringste Schwankungsbreite aufwiesen.

**3. Analyse:** Danach wurden von jeder Probe der  $\Delta$ Ct-Wert für Nibrin mit jeweils  $\beta$ -Aktin, HPRT und Ubiquitin errechnet. Für jede Zelllinie wurde der Mittelwert für die  $\Delta$ Ct-Werte gezogen und diese miteinander verglichen (Abb. 17).



**Abbildung 17:** Zeigt den durchschnittlichen  $\Delta$ Ct-Wert von Nibrin und den drei Housekeeping-Genen -Aktin, UBC und HPRT. -Aktin hat mit 7,2 den höchsten  $\Delta$ Ct-Wert. HPRT wies mit 1,2 und 0,65 den geringsten Abstand zum Ct-Wert von Nibrin auf.

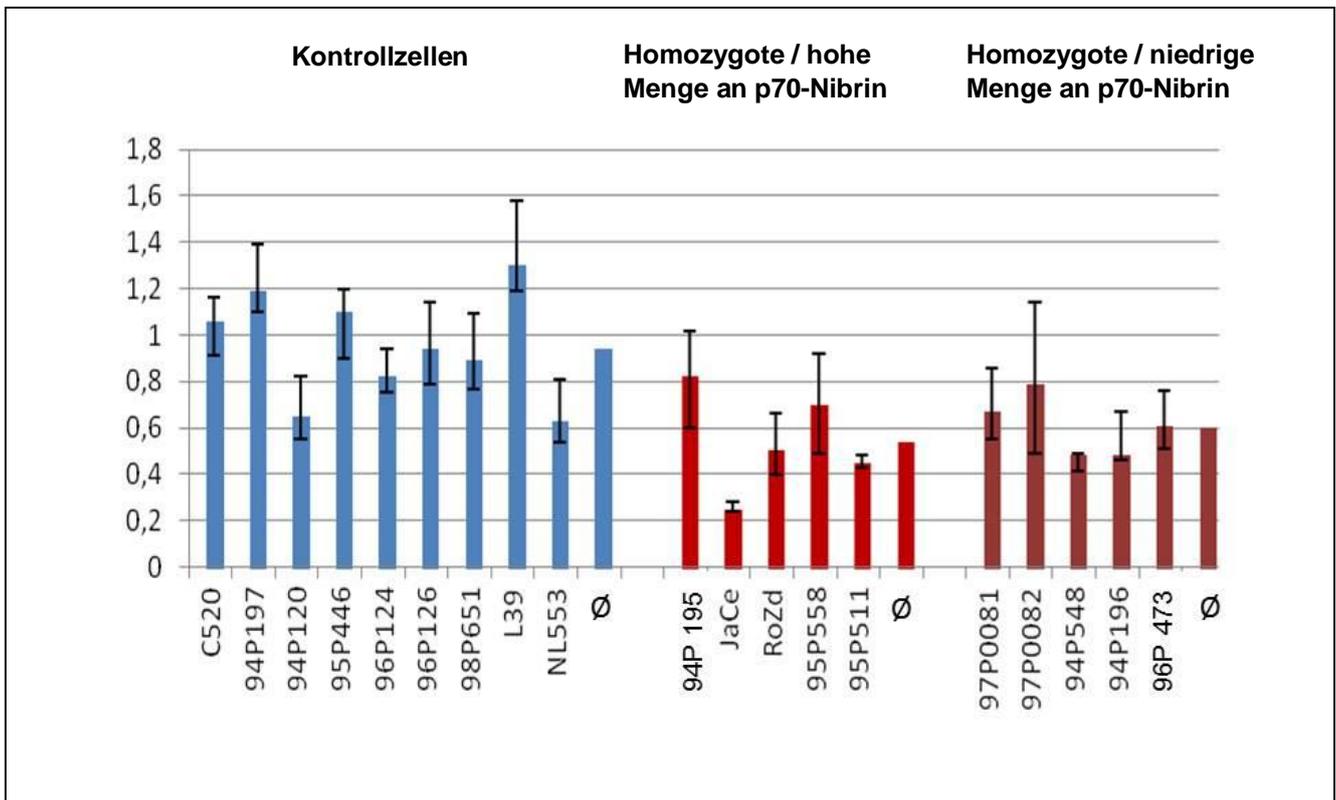
Die  $\Delta$ Ct-Werte schwanken zwischen den mRNA-Mengen der beiden Versuchsreihen. -Aktin weist in beiden Extraktionen mit 7,2 und 5,2 den höchsten Wert auf, HPRT mit 1,2 und 0,65 den geringsten Wert. Geringe  $\Delta$ Ct-Werte zwischen Housekeeping-Gen und Zielgen werden als Auswahlkriterium für Housekeeping-Gene in der Real-Time PCR betrachtet.

Nach Zusammenschau der Ergebnisse aller Untersuchungen wurde sich für HPRT als Housekeeping-Gen entschieden, da es den geringsten  $\Delta$ Ct-Wert mit dem Zielgen, als auch eine niedrige Schwankung der Ct-Werte aufwies.

Des Weiteren wurde HPRT in einer Untersuchung zur Validität von Housekeeping-Genen von Dheda & Bustin 2004<sup>93</sup> als eines derjenigen Gene mit der geringsten Expressionschwankungsbreite in mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) beschrieben.

### 4.3.3. Bestimmung der NBN-mRNA-Mengen in Patienten- und Wildtypzelllinien

Jede der neunzehn untersuchten Zelllinien wurde zur Mengenbestimmung der NBN-mRNA-Mengen zweimal separat ins exponentielle Wachstum versetzt und danach mRNA aus den Zellen extrahiert. Aus jeder der zwei RNA-Proben wurde zweimalig cDNA umgeschrieben, sodass pro Zelllinie vier cDNA-Proben zur Verfügung standen. Von jeder der vier Proben wurden vier Werte mittels Real-Time PCR nach der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode bestimmt.



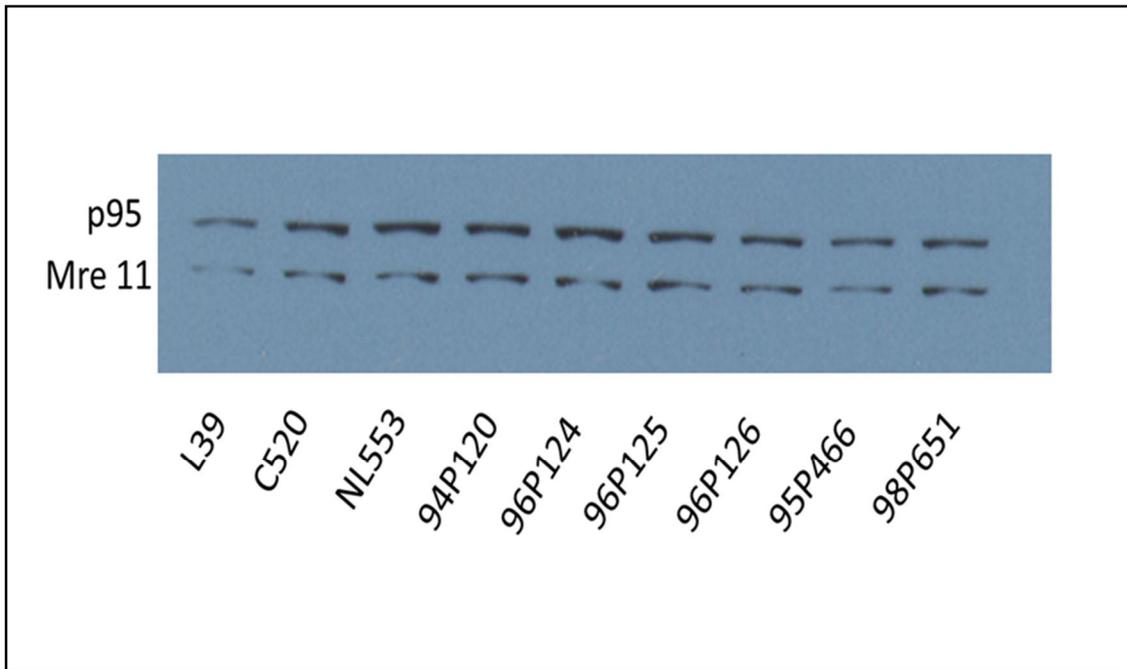
**Abbildung 18:** Darstellung der Nibrin-mRNA-Mengen in Zelllinien gesunder Individuen (blau) und NBS-Patientenzelllinien, eingeteilt in Gruppen mit wenig p70-Nibrin (hellrot) und viel p70-Nibrin (dunkelrot). Die mRNA-Mengen der Wildtypzelllinien umfassten 64%-130%, die Patientenzelllinie 25,8%-81,8% der Kontrollzelllinie C520.

Die Nibrin-mRNA-Mengen der Wildtypzelllinien schwankten innerhalb einer Spanne von 62%-130% der Kontrolle C520. Alle ermittelten mRNA-Werte und p95-Proteinwerte wurden relativ zum jeweiligen mRNA und p95-Proteinwert der Zelllinie C520 angegeben. Der durchschnittliche mRNA-Gehalt der Wildtypzelllinien betrug 0,94% der Kontrolle C520.

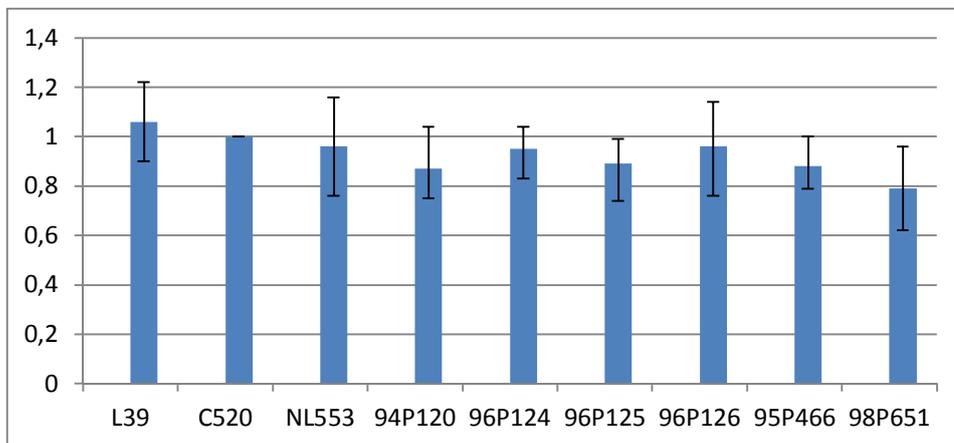
Die mRNA-Mengen der Patientenzelllinien variierten von 25,8% bis 81,8%. Der durchschnittliche mRNA-Gehalt betrug 59,2% der Kontrolle C520 (Abb. 18).

#### **4.4. Quantifizierung der p95-Nibrinwerte**

Für die p70-Nibrinwerte wurden die entsprechenden Daten von Krüger et al. 2007<sup>80</sup> herangezogen; die p95-Nibrinwerte der Kontrollzelllinien mussten ermittelt werden. Hierfür wurden die Wildtyp-Zelllinien dreimalig in exponentielles Wachstum versetzt. Der Nachweis der p95-Nibrinexpression wurde mittels Westernblot aus dem Gesamtlysat der LCL`s durchgeführt. Die präzipitierten Proteine wurden mittels Gelelektrophorese separiert und im Westernblot analysiert (Abb. 19). Die Bandenintensitätsunterschiede wurden nach dem Einscannen der belichteten Filme mit Hilfe des Programms ImageQuant bestimmt.

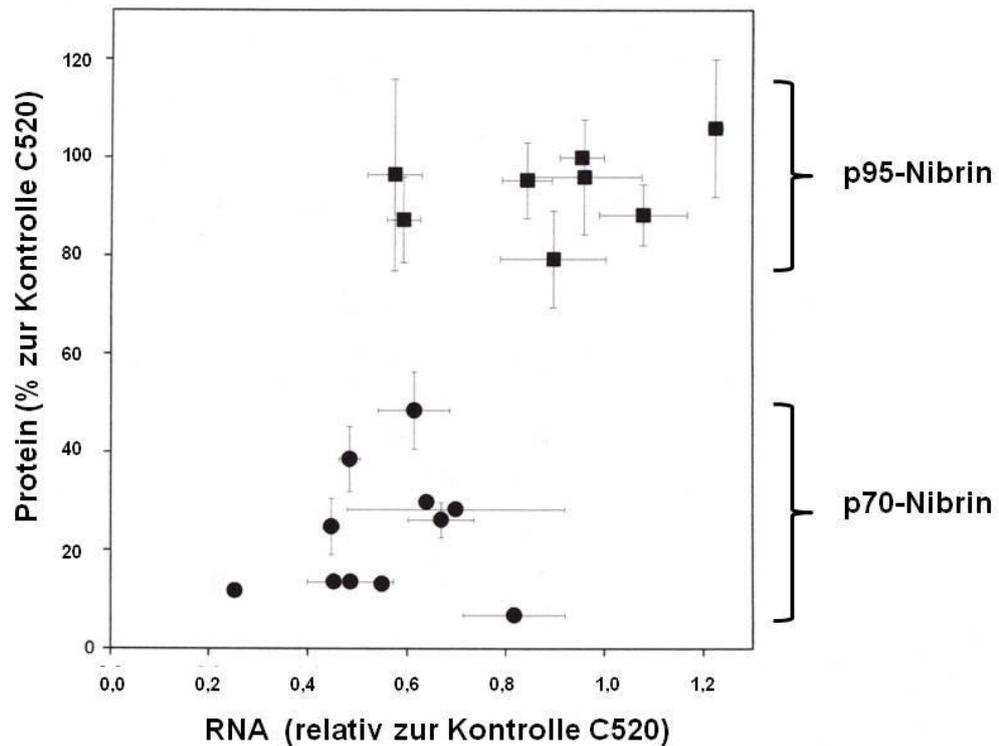


**Abbildung 19:** Abbildung des Western Blots zur Bestimmung der relativen p95-Nibrinmengen in den verschiedenen Wildtypzelllinien.



**Abbildung 20:** Darstellung der exprimierten p95-Nibrinmengen in Kontrollzellen. Von jeder Zelllinie wurden dreimalig Proteine extrahiert und mittels Westernblot separiert. Zur Quantifizierung der p95-Nibrinmengen wurde der belichtete Film digitalisiert und die Bandenstärke mit ImageQuant berechnet. Die Nibrinmengen der Wildtypzelllinien schwankten zwischen 0,79% und 106% der Proteinmenge von C520. Für eine bessere Vergleichbarkeit mit den Werten aus den Untersuchungen von Krüger et al. 2007<sup>80</sup> wurde ebenfalls 96P125 als 1 gesetzt.

Die dabei gewonnenen Werte konnten mit den Ergebnissen in Krüger et al. 2007<sup>80</sup> verglichen werden, da die dort ermittelten p70-Nibrinwerte der Patientenzelllinien relativ zu der Wildtypzelllinie 96P125 angegeben wurden. Diese Zelllinie wurde ebenfalls in die Untersuchung einbezogen.



**Abbildung 21:** Vergleich der mRNA-Mengen und der exprimierten p70-Nibrinmengen homozygoter NBS- Zelllinien mit den exprimierten p95-Nibrinmengen von Wildtypzelllinien. Die relative Menge von NBN-mRNA in elf NBS-Patientenzelllinien wurde mit den in Krüger et al. 2007<sup>80</sup> gewonnenen p70-Nibrinmengen verglichen. Zu Vergleichszwecken wurden bei neun Wildtypzelllinien auf gleiche Art p95-Nibrin- und mRNA-Mengen verglichen.

Die p95-Nibrinmengen der Wildtypzelllinien schwankten innerhalb einer Spanne von 0,79% und 106% der Protein-Menge von C520. Der durchschnittliche Nibringehalt der Wildtypzelllinien lag bei 105% von C520. Damit war die Variation der exprimierten p95-Nibrinmengen geringer als die der p70-Mengen der Patientenzelllinien<sup>80</sup>. Diese lagen zwischen 6,78% und 49,85% der p95-

Nibrinmenge von 96P125. Die durchschnittliche p70-Nibrinmenge aller Patientenzelllinien betrug 21,54% des p95-Nibrinwertes der Kontrollzelllinie<sup>80</sup>, während die NBN-mRNA-Mengen der Patientenzelllinien bei durchschnittlich 59% der mRNA-Mengen der Kontrollen C520 lagen (Abb. 20).

### **4.4.1. Vergleich der p70-Nibrin- und NBN-mRNA-Mengen**

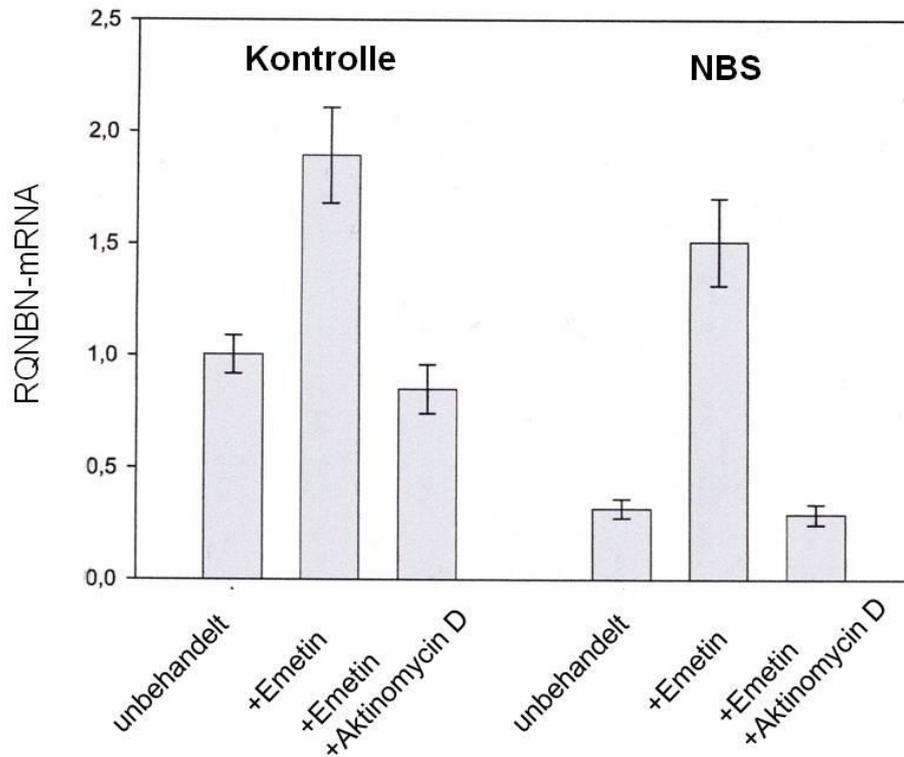
Als mögliche Ursache für die Varianz in den p70-Nibrinmengen der Patientenzelllinien wurden Unterschiede in deren mRNA-Mengen in Betracht gezogen. Die untersuchten Patientenzelllinien waren hierfür in Gruppen mit hohen und mit niedrigen p70-Nibrinwerten eingeteilt worden. In beiden Gruppen fanden sich sowohl Zelllinien mit hohen und niedrigen NBN-mRNA-Mengen. So fand sich in der Gruppe der niedrigen p70-Nibrinwerte mit 94P195 die Zelllinie mit der höchsten NBN-mRNA-Menge und mit JaCe die Zelllinie mit der niedrigsten NBN-mRNA-Menge. In der Gruppe der hohen p70-Nibrinwerte befanden sich mit 97P0082 und 95P548 ebenfalls Zelllinien mit hohen und niedrigen NBN-mRNA-Mengen. Somit konnten eine positive und eine negative Korrelation zwischen exprimierten NBN-Proteinmengen und NBN-mRNA-Mengen ausgeschlossen werden. Die Mengen der Patienten-mRNA schwankten stärker als die Mengen der Kontrollzelllinien.

### **4.4.2. Quantifizierung von NBN-mRNA in Abwesenheit des NMD**

Im Folgenden wurde untersucht, ob Nonsense-mediated-mRNA-decay für die NBN-mRNA-Mengenunterschiede verantwortlich ist. Hierfür wurde der NMD *in vitro* gehemmt. Für diesen Versuch wurden die Kontrollzelllinie C520, die Patientenzelllinien JaCe, mit geringer- und die Patientenzelllinie 94P548 mit hoher NBN-mRNA-Expression ausgewählt. Die LCL's wurden in exponentielles Wachstum versetzt und jeweils  $1,3 \times 10^6$  Zellen in 4 ml Kulturmedium für zwölf Stunden ausplattiert. Hierauf wurde von jeder Zelllinie jeweils ein Ansatz für fünf Stunden in 100 µg / ml Emetin behandelt, um die Proteinsynthese zu inhibieren. Durch diese Blockade werden die Mechanismen des NMD unterdrückt, da der NMD davon abhängt, dass Stopcodon entdeckt werden. Desweiteren wurde von jeder Zelllinie ein unbehandelter Ansatz in die Untersuchung einbezogen. Hierauf wurde die mRNA

extrahiert und das NBN-mRNA-Transkript mittels Real-Time-PCR quantifiziert. Als endogene Kontrolle wurde GAPDH verwendet. Die Quantifizierung erfolgte mittels  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode. Um die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auf die Ergebnisse von Noensi und Dietz 2001<sup>93</sup> beziehen zu können, wurde zur besseren Vergleichbarkeit ebenfalls GAPD als endogenes Kontrollgen benutzt.

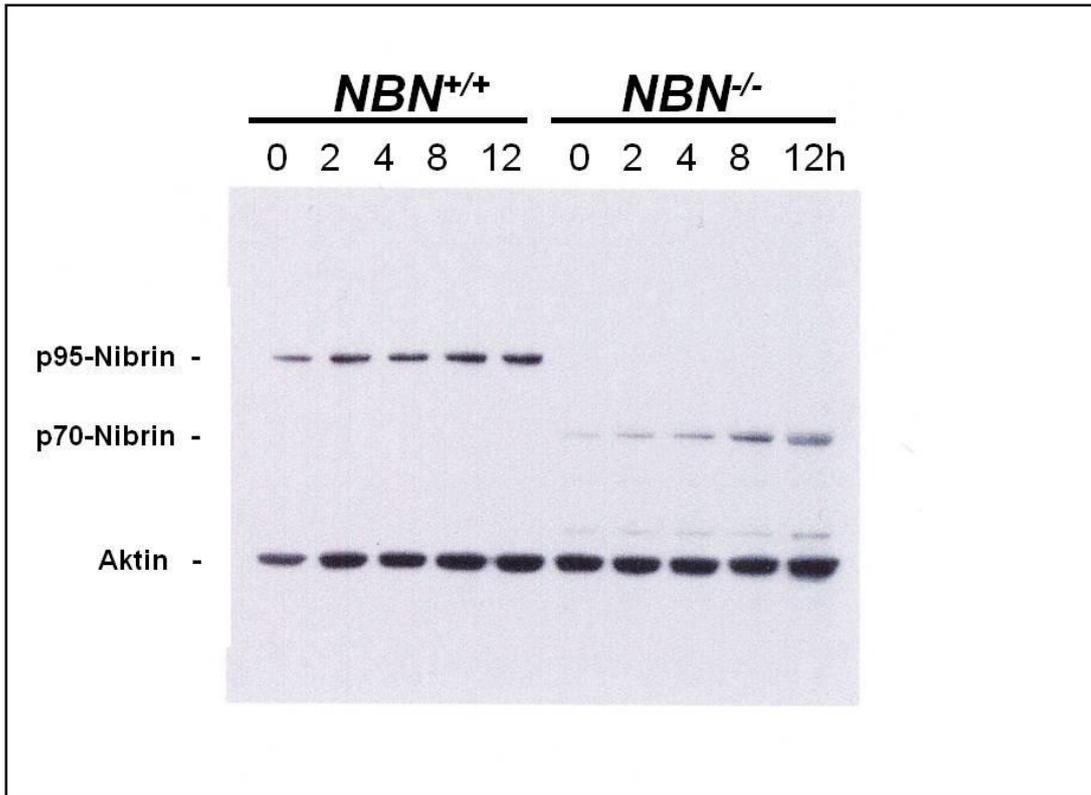
Hierbei kam es zu einem Anstieg der NBN-mRNA. Dieser Stimulationseffekt wurde vorher beschrieben und stellt vermutlich eine Stressantwort dar<sup>93/94</sup>. Im zweiten Teil des Versuchs wurden die Zellen zusätzlich mit Actinomycin behandelt, um *de novo* Transkription zu blockieren. Hierbei kam es weder bei Patienten- noch bei Kontrollzelllinien zu Veränderungen der NBN-mRNA-Mengen (Abb. 22). Um NMD auszuschließen, wurde der Nonsense-enrichment-index (NEI) ermittelt, indem die Veränderung der mRNA des 657 $\Delta$ 5-Allel mit der Veränderung der Wildtyp-mRNA verglichen wurde ( $\text{NEI} = [\text{Mutante+E+A/Mutante}] / [\text{Wildtyp+E+A/Wildtyp}]$ ). Hierfür wurde die mit GAPDH standardisierte Mengenänderung des 657 $\Delta$ 5-Transkripts durch die standardisierte Mengenänderung des Wildtyp-Transkripts dividiert. Der NEI für die NBN 657 $\Delta$ 5-mRNA beträgt 1.27.



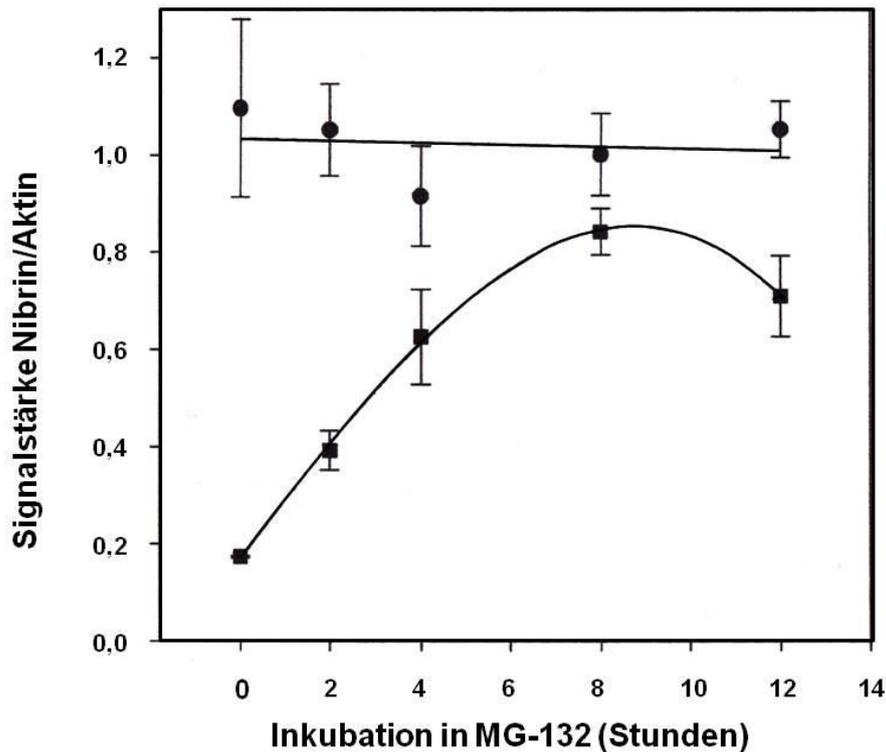
**Abbildung 22:** Das Balkendiagramm zeigt die Mengen des NBN-Transkripts in LCL's- Zellen nach Behandlung mit Emetin und Emetin + Aktinomycin.

#### 4.5. Nibrin-Proteinabbau nach Proteasom-Inhibition

Im folgenden Versuch sollte geklärt werden, ob p70-Nibrin durch das Proteasom abgebaut wird. Die Zellen wurden 0, 2, 4, 8 und 12 Stunden nach Behandlung lysiert, Proteine extrahiert und p70, p95 und  $\beta$ -Aktin mittels Westernblot gelelektrophoretisch separiert (Abb. 23). Der Versuch wurde dreimal wiederholt. Die Quantifizierung der Proteinmengen erfolgte mittels ImageQuant. Als endogener Standard diente  $\beta$ -Aktin. Der Vorgang wird unter 4.6.3. ausführlich beschrieben.



**Abbildung 23:** Westernblot mit p95-Nibrin, p70-Nibrin und -Aktin in NBN-Wildtyp- und NBN-Fibroblasten. Zellen wurden für 0, 2, 4, 8 und 12 Stunden mit MG-132 - Proteasomeninhibitor inkubiert und anschließend die Proteine isoliert. Nach Gelelektrophorese und Membrantransfer wurden Nibrin und -Aktin mittels monoklonaler Antikörper detektiert.



**Abbildung 24:** Inhibition von Proteasomen in NBN-Wildtyp und NBS-Fibroblasten. Das Proteinsignal wurde mittels ImageQuant quantifiziert und mit  $\beta$ -Aktin standardisiert. Während p95-Nibrin nach Proteasomeninhibition relativ unverändert bleibt, steigt die p70-Nibrinmenge schnell an.

Wie in Abb. 23 und 24 zu erkennen ist, bleiben die p95-Nibrinmengen nach Proteasomeninhibition relativ stabil. Die p70-Nibrinmenge steigt innerhalb von acht Stunden um das ca. Vierfache an und fällt danach wieder ab. Nach zwölf Stunden liegt die p70-Nibrinmenge bei dem ca. 3,5-fachen des Wertes vor Proteasomeninhibition.

#### 4.6. Quantifizierung von p70-Nibrin in heterozygoten Zellen

##### 4.6.1. Auswahl der Zelllinien

Für die Untersuchung der p70-Nibrinmengen standen 58 Zelllinien zur Verfügung, die heterozygot für das 657 $\Delta$ 5-Allel waren und Individuen aus acht Familienstammbäumen darstellten. Des Weiteren wurden fünf Zelllinien von

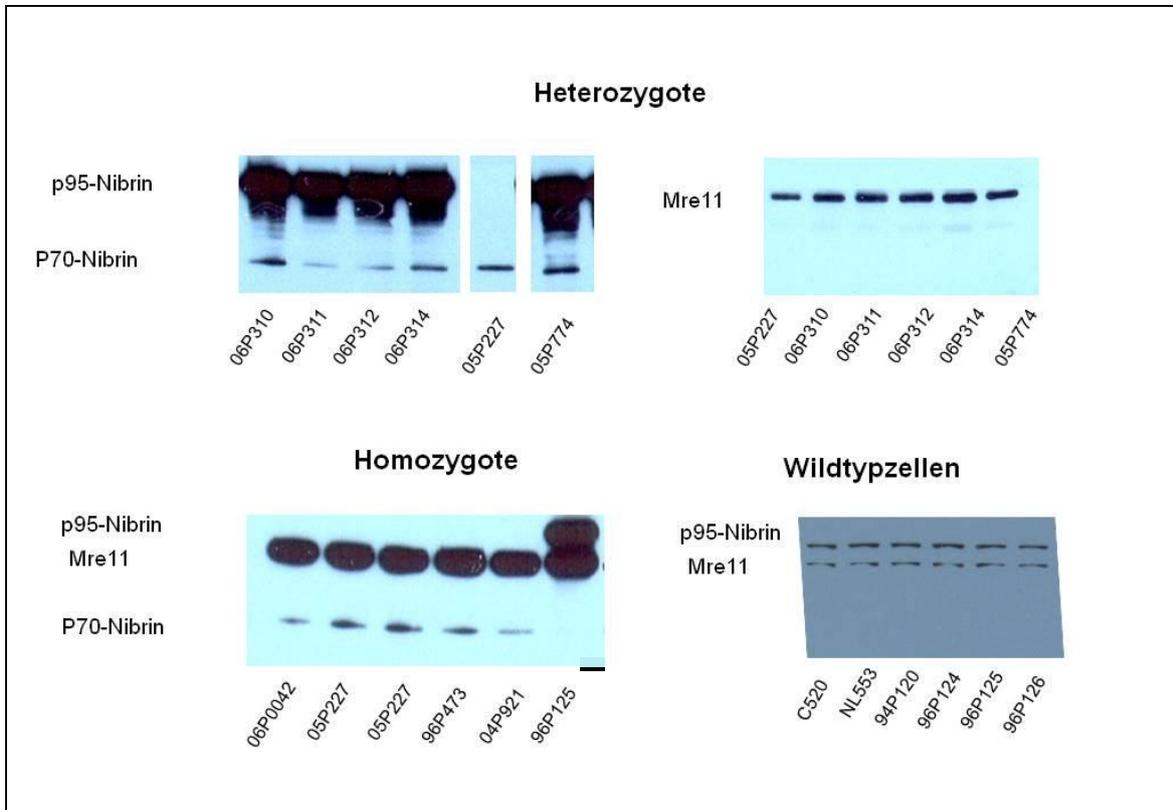
Patienten in die Untersuchung einbezogen, welche verwandtschaftliche Beziehungen zu den heterozygoten Individuen aufwiesen, und welche nicht in die von Krüger et al. 2007<sup>80</sup> durchgeführten Untersuchungen einbezogen wurden. Alle Blutproben, aus denen die untersuchten Zelllinien gewonnen wurden, wurden freundlicherweise von Frau Prof. Eva Seemanova vom Institut für klinische Genetik in Prag zu Verfügung gestellt. Die Immortalisierung mittels EBV erfolgte im Institut für Medizinische Genetik der Charité am Standort Virchow-Klinikum.

### **4.6.2. Nachweis der p70-Nibrin Expression in lymphoblastoiden NBS-Patientenzelllinien**

Der Zeitpunkt der maximalen Wachstumssteigung wurde für die heterozygoten Zelllinien ermittelt. Von jeder Zelllinie wurden dreimalig die exprimierten p70-Nibrinmengen gemessen. Der Nachweis der p70-Nibrinexpression wurde mittels Immunpräzipitation aus dem Gesamtlysat der LCL's durchgeführt. Die präzipitierten Proteine wurden mittels Gelelektrophorese separiert und im Westernblot quantifiziert. Die eigentlichen Bandenintensitätsunterschiede wurden nach dem Einscannen der belichteten Filme mit Hilfe des Programms ImageQuant bestimmt.

Die Variabilität der p70-Nibrinbandenstärke der einzelnen Trägerzelllinien ist in Abb. 25 deutlich erkennbar. Die erste Spur einer jeden Gelabbildung wird von der Kontrollzelllinie 96P125 besetzt und dient als Kontrolle. Bei dieser Zelllinie lassen sich nur p95-Nibrin und kein p70-Nibrin nachweisen. Die mittlere Spur wurde mit der homozygoten Zelllinie 05P227 besetzt und diente als Vergleichswert zwischen den Gelen. Bei dieser Referenzzelllinie lässt sich kein p95-Nibrin, sondern nur das trunkierte p70-Nibrin nachweisen. In den heterozygoten Trägerzelllinien hingegen lässt sich p95-Nibrin sowie das verkürzte Nibrinfragment p70-Nibrin nachweisen. Das p70-Nibrin zeigte erhebliche Variationen in der Intensität der Bandenstärke. Zur Standardisierung der aufgetragenen Proteinmengen verschiedener Gele diente Mre11 als interne Kontrolle. Da die untersuchten heterozygoten Zelllinien wesentlich höhere Mengen an Mre11 aufwiesen als an p70-Nibrin, war es unmöglich, Filme zu belichten, auf denen sowohl die Mre11-Banden als auch die p70-Banden für die Auswertung geeignete Intensität aufwiesen. Somit musste für diese jeder Blot

separat mit Antikörpern gegen p70-Nibrin und mit Antikörpern gegen Mre11 inkubiert werden, um hiernach jeweils separat Filme zu belichten.



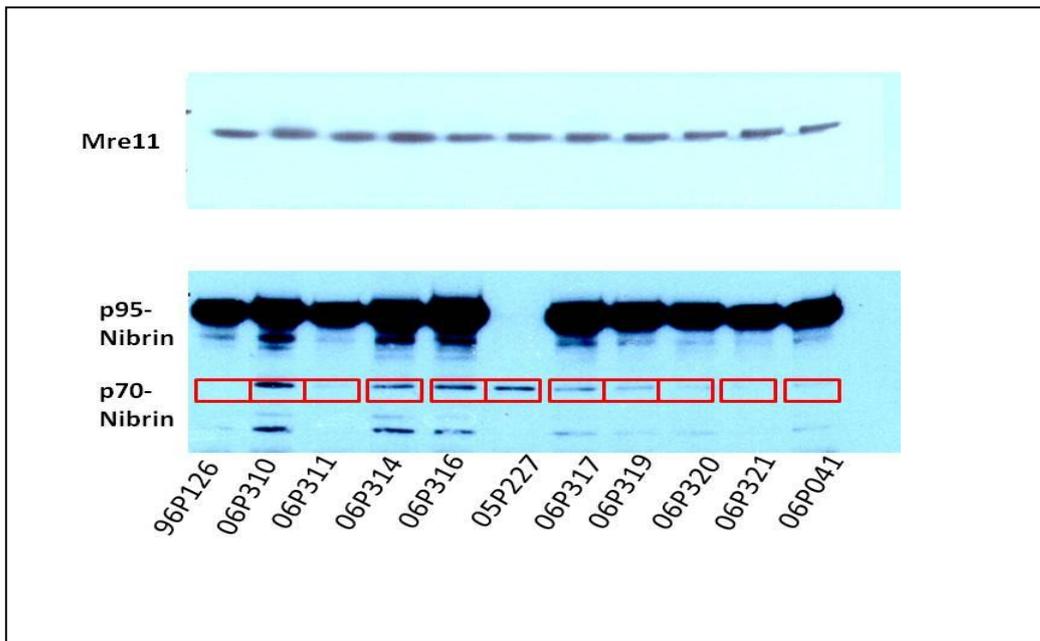
**Abbildung 25:** Repräsentativ ausgewählte Abbildungen der Western Blots zur Bestimmung der relativen p70-Nibrin- und p95-Nibrinmenge in den verschiedenen Patienten- und Kontrollzelllinien. Bei den Blots zur Bestimmung der p70-Nibrinmengen wurde jeweils 05P227 als interner Standard mitgeführt. Sie weist im Gegensatz zu den heterozygoten Zelllinien keine p95-Bande, sondern nur p70-Banden auf. Bei der Quantifizierung der p95-Wildtypzellen wurde 96P125 als endogener Standard mitgeführt. Die Kontrollzelllinie weist dabei das vollständige p95-Nibrin sowie das kopräzipitierte Mre11 auf. In den Patientenzelllinien hingegen lässt sich p95-Nibrin nicht nachweisen. Das verkürzte Nibrinfragment p70-Nibrin lässt sich in allen heterozygoten-LCL's nachweisen.

### 4.6.3. Quantifizierung der p70-Nibrinexpression in lymphoblastoiden Patientenzelllinien

Zur Quantifizierung der p70-Nibrin-Menge wurde um jede Bande ein identisches Rechteck gelegt (Abbildung 26), welches an seinen Rändern die Intensität des Hintergrundes definierte, der vom Messwert subtrahiert wurde.

Die Formel zur Berechnung der Bandenintensität lautet:

$$\text{p70-Nibrin (\%)} = \left[ \frac{(\text{p70}^{\text{Patient}})/(\text{Mre11}^{\text{Patient}})}{(\text{p70}^{\text{Kontrolle}})/(\text{Mre11}^{\text{Kontrolle}})} \right] \times 100$$



**Abbildung 26:** Zur Quantifizierung der p70-Nibrinmenge wurde der belichtete Film digitalisiert. ImageQuant berechnete den Hintergrund und die Intensität der Bande. Die Volumenwerte der p70-Nibrinbanden wurden in Bezug zu dem Wert der Mre11-Bande der gleichen Probe gesetzt. Alle p70-Nibrinwerte wurden ins Verhältnis der Volumenwerte der p70-Nibrin und Mre11-Bande der homozygoten Kontrollzelllinie 05P227 gesetzt, um einen Vergleichswert zwischen den einzelnen Gelen zu erhalten.

Mre11 diente somit als interne Auftragskontrolle und standardisierte den Volumenwert der p70-Nibrinbanden innerhalb der verschiedenen Experimente. Mre11 wurde als interner Standard gewählt, da die Menge des Rad50/Mre11-Komplex in NBS-Patientenzellen nicht beeinträchtigt ist<sup>72</sup>. Des Weiteren wurden alle p70-Nibrin/Mre11-Werte in Relation zum Verhältnis der Volumenwerte der p70-Nibrin und Mre11-Bande der homozygoten Kontrollzelllinie 95P227 gesetzt, um einen Vergleichswert zwischen den einzelnen Gelen zu erhalten (Abbildung 26).

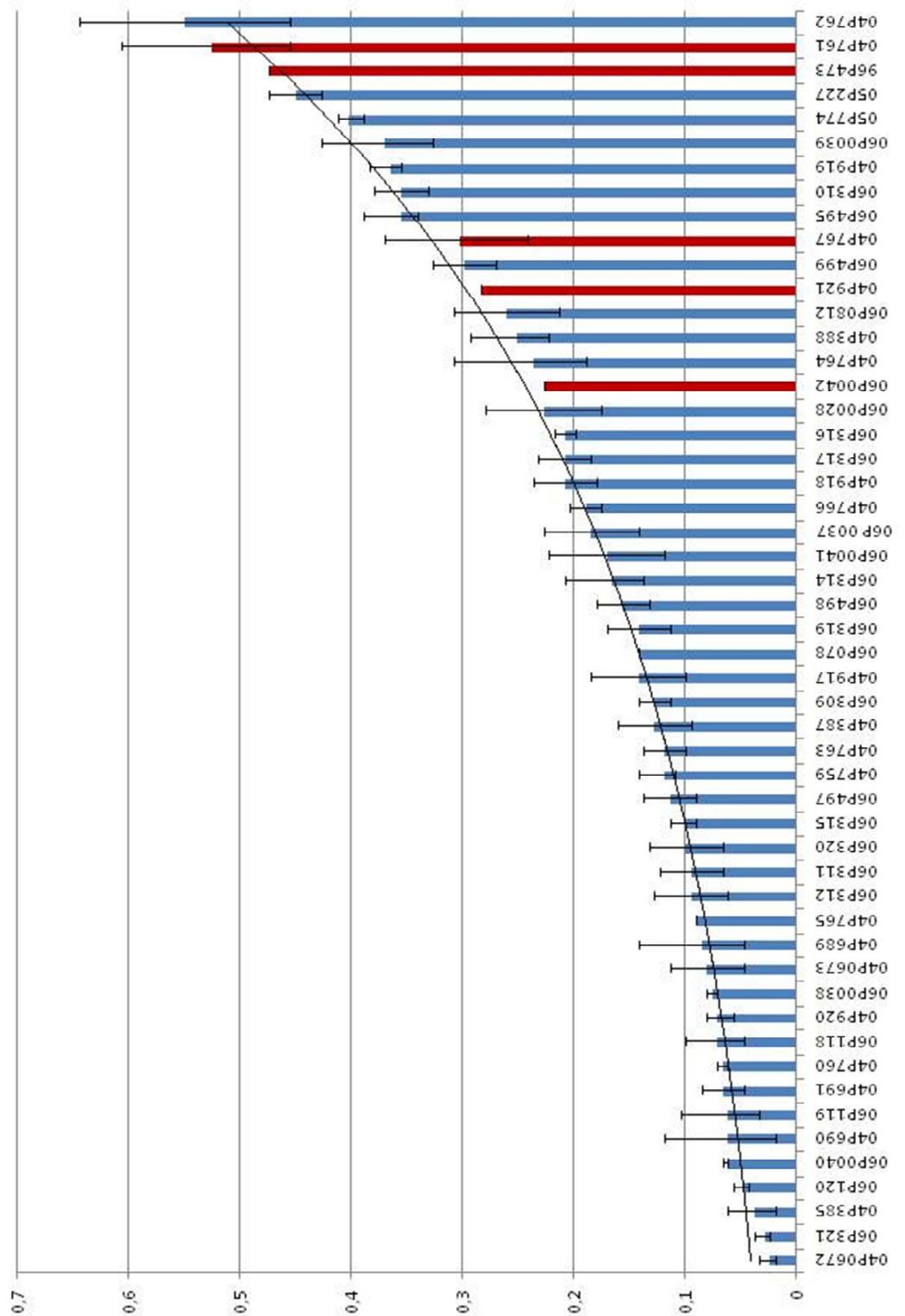
## Ergebnisse

	LCL	p70-Nibrin	Mre11	p70-Nibrin/Mre11	% p70 - Nibrin
<b>Referenz-Linie</b>	06P0227	35.403	43.178	0,82	<b>100%</b>
<b>Träger-Linien</b>	06P0037	21.555	45.350	0,47	58%
	06P0038	4.315	34.573	0,12	15%
	06P0039	33.668	44.855	0,75	92%
	06P0040	3.457	36.333	0,10	12%
	06P0049	21.409	52.115	0,41	50%
	06P0041	23.229	54.513	0,43	52%
<b>NBS-Linien</b>	06P0042	7.733	12.183	0,63	48%
	05P227	17.483	14.902	1,17	90%
	05P227	19.087	14.172	1,35	103%
	96P473	16.622	12.690	1,31	<b>100%</b>
	04P921	9.573	12.081	0,79	60%

**Tabelle 4:** Die bereinigten ImageQuant Bandendaten sind in den Spalten p70-Nibrin und Mre11 angegeben. Anschließend wurden alle p70-Nibrinwerte in Relation zum Verhältnis der Volumenwerte von der p70-Nibrin und Mre11-Bande der Referenzzelllinie 06P0227 gesetzt, um einen Vergleichswert zwischen den einzelnen Gelen zu erhalten.

Wie aus Abb. 26 sowie in Tabelle 4 erkennbar, variierte die p70-Nibrinmenge der verschiedenen Patientenzelllinien erheblich.

## Ergebnisse

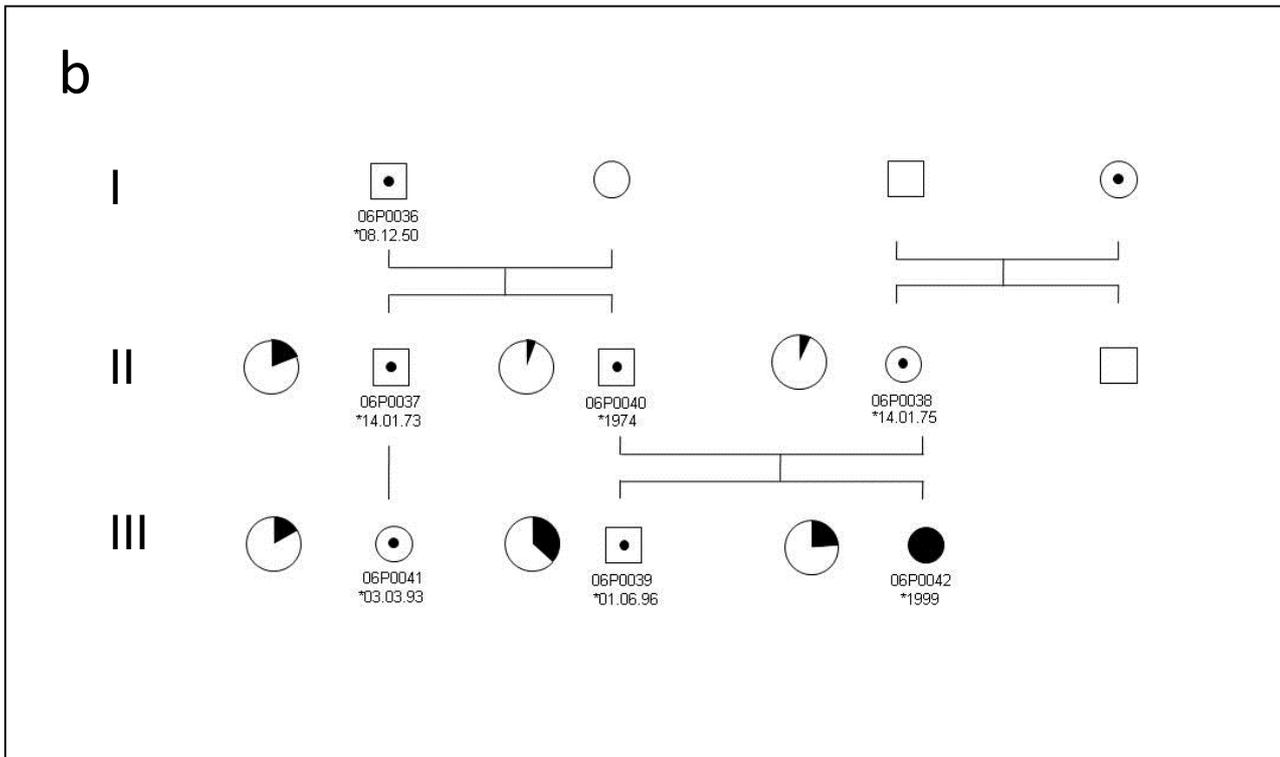
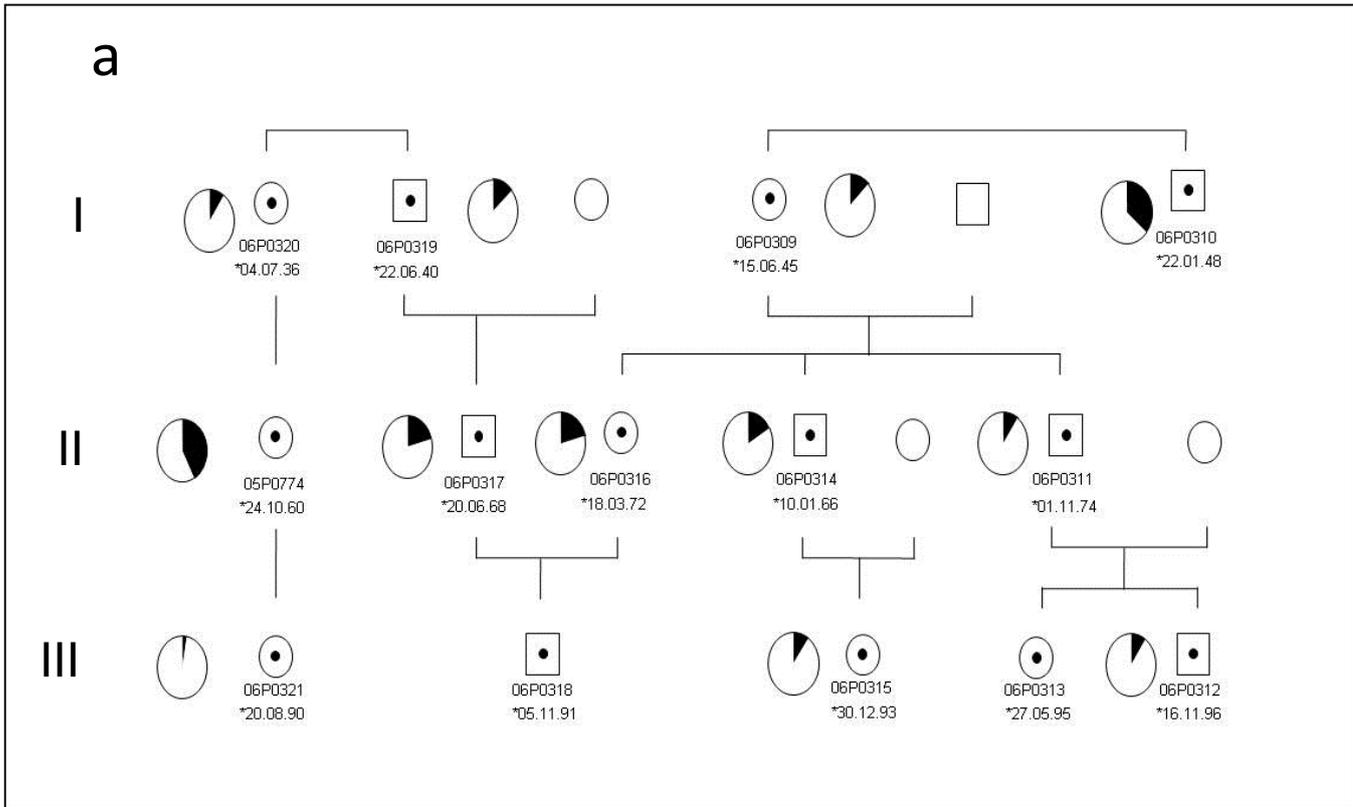


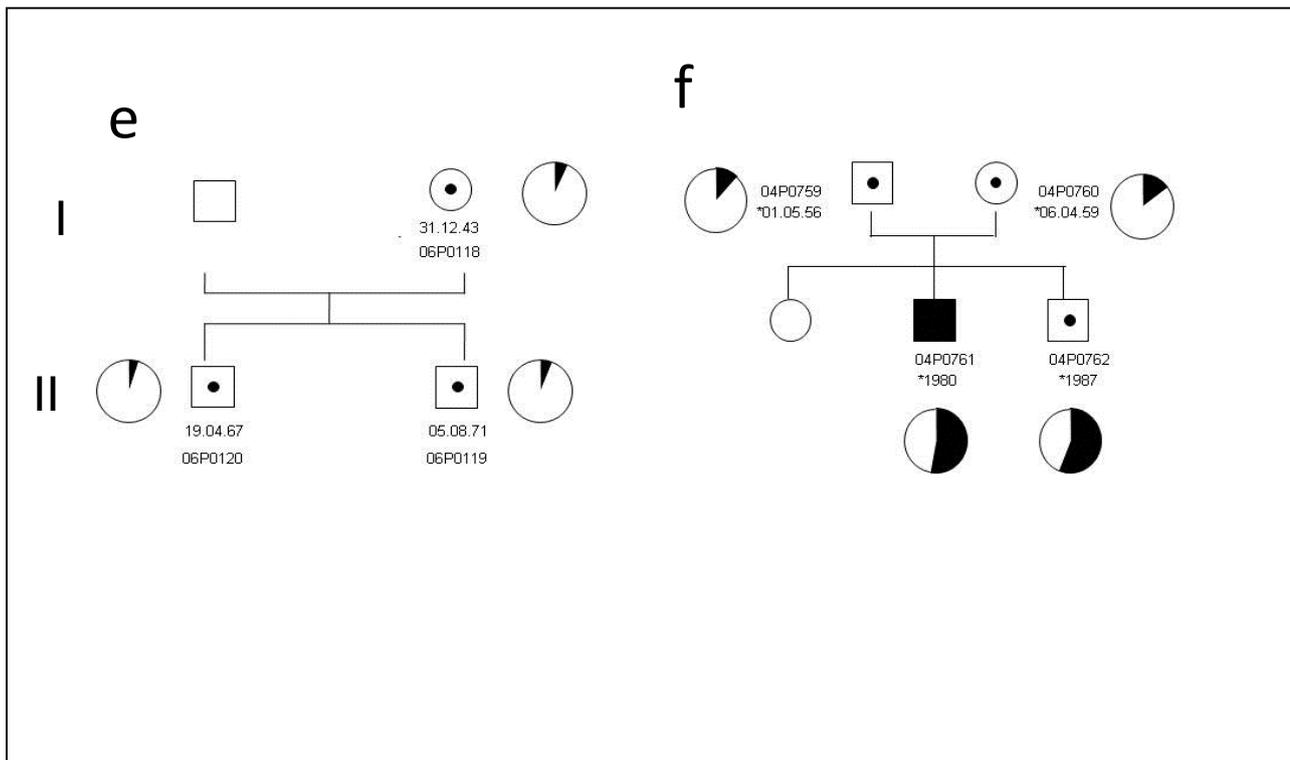
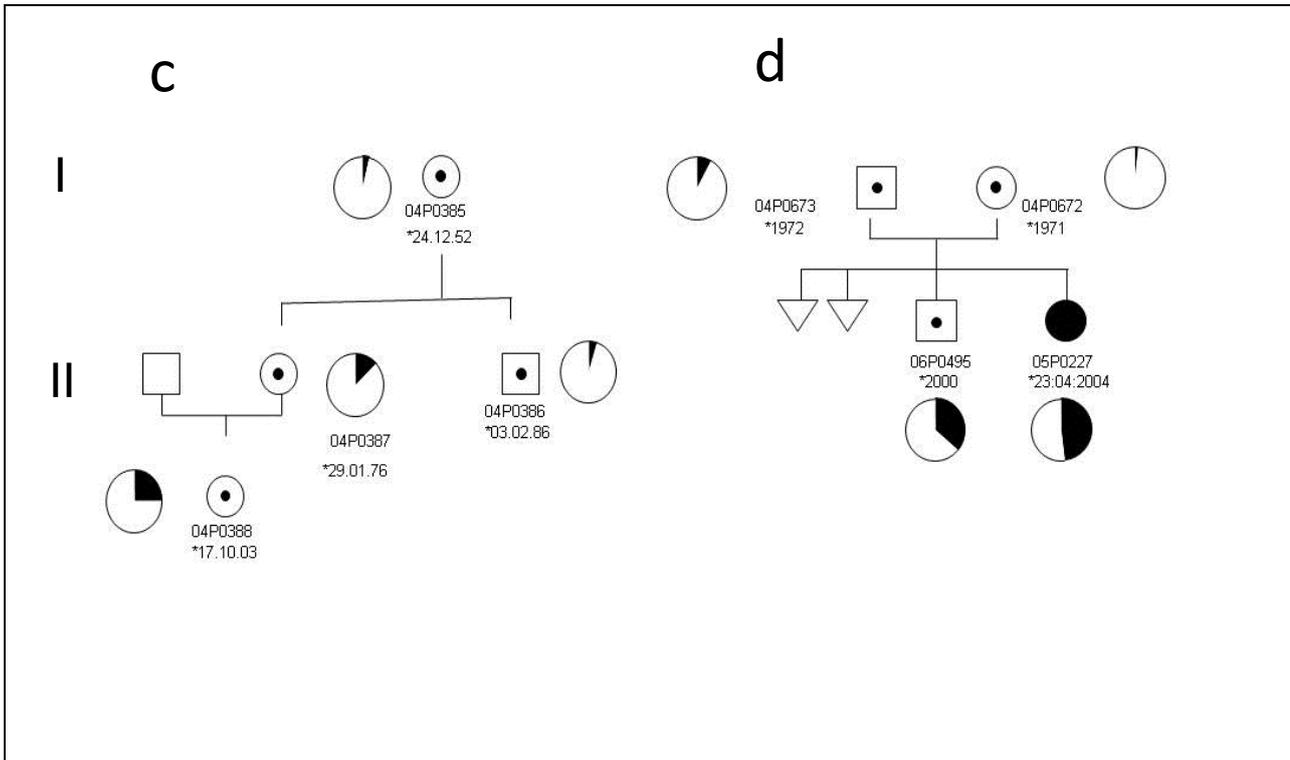
**Abbildung 27:** Mittelwerte der rel. p70-Nibrinmengen der heterozygoten Zelllinien (blau) in % bezogen auf p70-Nibrinmengen von 05P227. Rot dargestellt sind die p70-Nibrinmengen der einbezogenen homozygoten Patientenzelllinien.

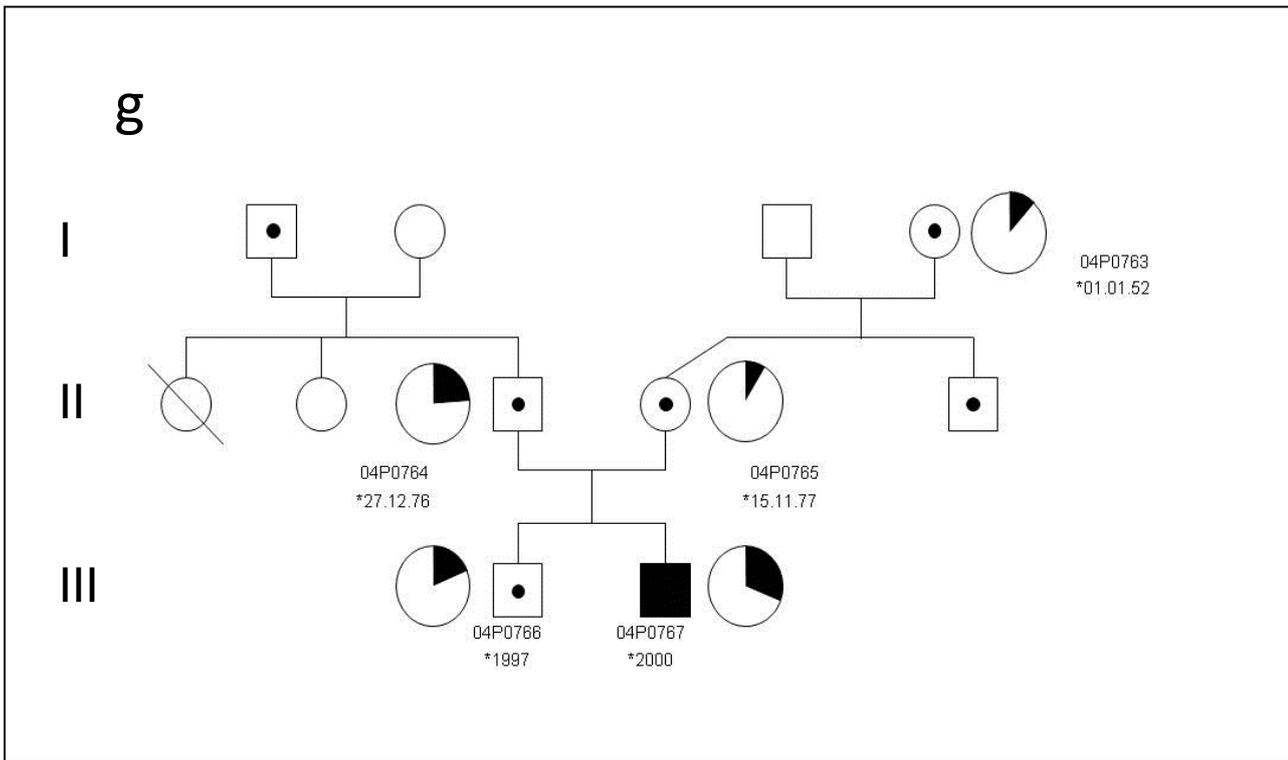
Die Mittelwerte der Immunpräzipitationen jeder Patientenzelllinie sind in Abb. 27 dargestellt. Die durchschnittliche p70-Nibrinmenge aller Patientenzelllinien betrug 34,14% der Referenzzelllinie 05P227. Die Nibrinmenge dieser Referenzzelllinie wurde ebenfalls mittels Immunpräzipitation mit der Nibrinmenge der Zelllinie 96P473 verglichen. Die Zelllinie 96P473 wies bei Krüger et al. 2007<sup>80</sup> mit 49,85% den höchsten p70-Nibrin Wert im Vergleich zum p95-Wert der Kontrollzelllinie 96P125 auf. Somit konnten die p70-Nibrinwerte der Heterozygoten mit denen der Homozygoten von Krüger et al. 2007<sup>80</sup> verglichen werden.

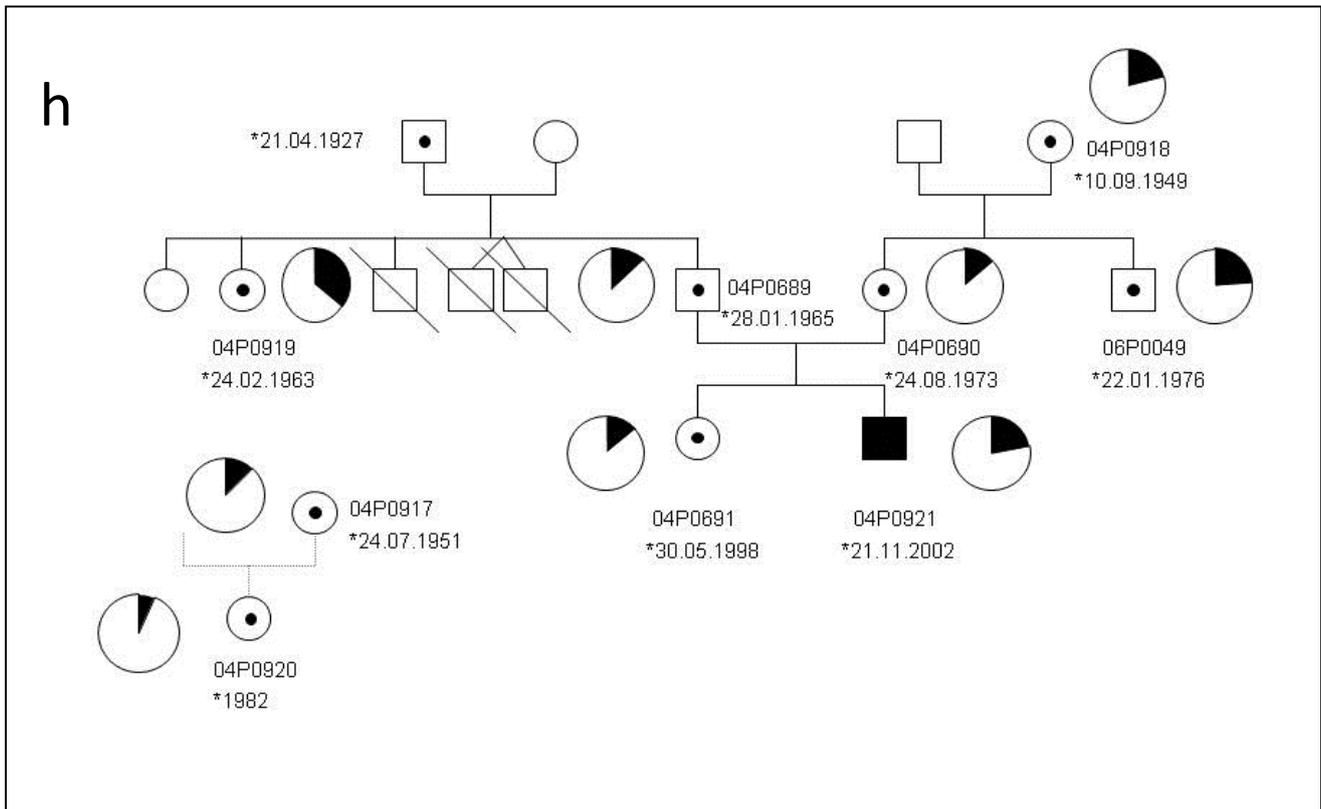
#### **4.6.4. Darstellung der p70-Nibrinmengen in Stammbäumen**

Viele der untersuchten heterozygoten Individuen waren mit den untersuchten NBS-Patienten verwandt. Somit war es möglich, die p70-Mengen verwandter Personen zu vergleichen und mögliche Abhängigkeiten oder monogene Erbgänge zu identifizieren.









**Abbildung 28:** Acht Stammbäume mit insgesamt 48 heterozygoten untersuchten (schwarzer Punkt) Individuen. Die Stammbäume umfassen Individuen aus drei bzw. aus zwei Generationen. In den Stammbäumen b, d, f, g und h befindet sich jeweils ein Patient, der homozygot (schwarzes Symbol) für die Mutation 657Δ5 ist. Zu jedem untersuchten Individuum ist in Form eines Kreisdiagramms die durch Immunpräzipitation ermittelte Menge an p70-Nibrin angegeben (relativ zu p95-Nibrin der Kontrollzelllinie 94P125).

Die 48 für die 657Δ5-Mutation heterozygoten Individuen entstammen zwölf Familien. Die verwandtschaftlichen Beziehungen wurden in neun Stammbäumen dargestellt (Abb. 28). Des Weiteren konnten fünf Patienten, die für die 657Δ5-Mutation homozygot waren, in die Darstellungen mit eingeschlossen werden. Die p70-Nibrinmengen wurden mittels Kreisdiagrammen dargestellt. Die Mengen sind relativ zum p95-Nibrin Gehalt der Kontrollzelllinie 96P125.

### **4.6.5. Schwankungen der p70-Nibrinmengen in heterozygoten Zellen**

Wie in Abb. 23 dargestellt, steigen die exprimierten Mengen ohne Sprünge vom Minimalwert von 3% bis zum Maximalwert von 45% an. Beim Vergleich der Nibrinwerte musste ein Toleranzbereich beachtet werden, da die Nibrinwerte innerhalb einer Zelllinie, bedingt durch methodische Ungenauigkeit, schwankten. Die Nibrinwerte zweier Zelllinien wurden als ähnlich betrachtet, sofern diese nicht mehr als 5% voneinander abwichen.

## 5. Diskussion

### 5.1. Transkriptionskontrolle

Niedrige Mengen von p70-Nibrin in Zelllinien, ebenso wie Über- bzw. Unter-Expression von p95-Wildtypnibrin begünstigen das Auftreten von malignen Tumoren<sup>95-97</sup>. Somit ist zu vermuten, dass die NBN-Mengen in Zellen durch Kontrollmechanismen streng reguliert werden. Hierfür kommen viele Schritte in Frage.

Der Weg von der DNA zum Protein kann in mehrere Schritte unterteilt werden. Alle diese Schritte werden reguliert. Somit kann die Genexpression kontrolliert werden. Diese Kontrolle erfolgt u.a. durch das Zusammenspiel von cis- und trans-aktiven Elementen. Cis-aktive Elemente sind kurze, regulatorische Abschnitte der DNA<sup>98</sup>, welche in unmittelbarer Umgebung des von ihnen regulierten Gens liegen. Sie können vor, nach oder direkt innerhalb des zu regulierenden Gens liegen<sup>99-101</sup>. Cis-aktive Elemente können die Transkription hemmen (Silencer) oder fördern (Enhancer). Trans-aktive Elemente sind Gene. Sie kodieren Proteine oder RNA-Moleküle, welche die cis-Sequenzen erkennen und an sie binden können, und die somit die Expression des dem cis-aktiven Element zugehörigen Gens regulieren. Trans-aktive Elemente weisen keine örtliche Nähe zum regulierten Gen auf. So können trans-aktive Elemente und das von ihnen regulierte Gen auf unterschiedliche Chromosomen liegen. Die Expressionskontrolle spezifischer Gene in Eukaryoten erfolgt durch ein koordiniertes Zusammenspiel dieser Regionen. So findet Genregulation auf dieser Ebene unter anderem durch transkriptionelle Interferenz statt. Hierbei befindet sich vor dem eigentlichen, die Gentranskription initiierenden Promoter ein zweiter Promoter<sup>102</sup>. Wird dieser aktiviert, synthetisiert die RNA-Polymerase eine nicht kodierende RNA, sodass der eigentliche Promoter für die RNA-Polymerase nicht zugänglich ist<sup>102</sup>. Bei Eukaryoten können Kontrollsequenzen bis zu ca. 85 000 Basenpaare entfernt liegen<sup>102/103</sup>. Des Weiteren können eukaryotische Genregulatorproteine selbst dann die Transkription regulieren, wenn sie in großer Entfernung vom Gen selbst an die DNA gebunden sind. Somit können die die Expression eines Gens kontrollierenden DNA-Sequenzen oft über große Strecken der DNA entfernt sein. Mutationen in diesen Kontrollbereichen können zu

Variationen in der Genexpression führen <sup>104/105</sup>. Unterschiedliche Transkriptionseffizienz kann zu unterschiedlichen exprimierten Proteinmengen führen. Somit kommen Mutationen in Genkontrollgenen prinzipiell als Ursache für die Variationen der p70-Nibrinmengen in Betracht. Da die untersuchten Zelllinien homoallelisch für einen circa 300kb großen, das NBN-Gen flankierenden Bereich waren, wurden trans-aktive Faktoren als wahrscheinlichste Ursache für die Varianz des p70-Nibrin in homozygoten NBS-Zelllinien in Betracht gezogen, bzw. sind nahe cis-aktive Elemente als Ursache nicht wahrscheinlich.

### 5.2. Posttranskriptionelle Kontrollmechanismen

Die Präkursor-mRNA kann durch mehrere Mechanismen verändert werden. Zu diesen gehören das 5'-capping, 3'-Polyadenylierung, Spleißen, der Nonsense-mediated-mRNA-decay und der Nonstop-decay. Diese Mechanismen werden posttranskriptionelle Modifikation genannt. Neben dieser Art der Kontrolle gibt es zahlreiche posttranskriptionelle Mechanismen, wie alternatives Spleißen, Regulation der Stabilität der mRNA, Regulation der Translation, Modifikation von Proteinen, mikro-RNAs, die direkt mit der mRNA agieren und Regulation des Proteinabbaus bzw. der Stabilität von Proteinen <sup>106/107</sup>.

Die Proteinmenge in Zellen kann reguliert werden, indem die Anzahl der transkribierten RNA-Kopien des Genes beeinflusst wird <sup>108/109</sup>. Die Stabilität der mRNA beeinflusst ebenfalls die exprimierten Proteinmengen. Je mehr mRNA-Moleküle bereitstehen bzw. je länger die mRNA intakt bleibt, desto häufiger kann sie translatiert werden. Die Halbwertszeiten von mRNA können sehr verschieden sein und zwischen Minuten und Stunden liegen. So beträgt die Halbwertszeit z.B. von  $\beta$ -Globin-mRNA zehn Stunden. In einigen Fällen wird die Stabilität der mRNA durch Hormone, Wachstumsfaktoren oder andere Einflüsse moduliert. Zum Beispiel erhöht die Anwesenheit von Prolactin die Halbwertszeit von Casein-mRNA um das circa 17-25fache <sup>110</sup>. Falls solche, für die NBN-mRNA bisher nicht bekannte Faktoren die mRNA-Mengen beeinflussen, könnten dadurch die p70-Nibrinmengenschwankungen erklärt werden. Als weitere Erklärung für die Variationen in den mRNA-Mengen wurde daher eine unterschiedliche mRNA-Produktions- oder Abbaugeschwindigkeit in den Zelllinien in Betracht gezogen.

### 5.2.1. Kontrolle des mRNA-Abbaus

Anhand von Untersuchungen an Säugtierzellen konnten zwei mRNA-Abbauwege identifiziert werden <sup>111/112</sup>. Der mRNA-Abbau beginnt normalerweise mit dem Kürzen der 3'-Enden der mRNA-Moleküle (Deadenylation) durch die mRNA-Deadenylasen <sup>113</sup>. Anschließend kann die mRNA in 5'-3'-Richtung von Exonucleasen abgebaut werden. Ebenso kann mRNA in 3'-5'-Richtung durch Exosomen abgebaut werden <sup>114-117</sup>. Diese Prozesse werden reguliert <sup>118-120</sup>. Des Weiteren beeinflussen Proteine, die in Sekretion, den Zytoskelettaufbau und die Translation involviert sind, den mRNA-Abbau in bisher unverstandener Weise <sup>121/122</sup>. Eukaryote Zelle verfügen weiterhin über einen besonderen Abbauweg für abnormale oder beschädigte mRNA-Moleküle. Durch die von der 657Δ5-Deletion im NBN-Gen verursachte Leserasterverschiebung rückt ein vorzeitiges Stopcodon in den Leseraster. Eukaryote Zellen können mRNA-Moleküle, welche ein vorzeitiges Stopcodon enthalten, erkennen und mittels NMD abbauen, da die Proteinprodukte dieser mRNA-Moleküle potentiell schädliche Effekte auf die Zelle haben können. Nicht alle mRNA-Moleküle, die ein vorzeitiges Stopcodon enthalten, werden jedoch vom NMD erkannt und abgebaut.

Es wurde bereits eine Reihe von Krankheiten wie z.B. Ataxia telangiectasia <sup>123</sup> und das Retinoblastom <sup>124</sup> identifiziert, bei denen der NMD den klinischen Verlauf beeinflusst. Bei einigen Krankheiten wurde ein positiver Effekt des NMD auf das klinische Outcome beschrieben. So führt z.B. eine Nonsense-Mutation im SOX10-Gen zu einem trunkierten Protein, welches einen dominanten, negativen Effekt auf Zellen hat. Diese Mutation führt zu einer peripheren demyelinisierenden Polyneuropathie, Zentralen Leukodystrophie, Waardenburg-Syndrom und Morbus Hirschprung. Eine andere Nonsense-Mutation im SOX-Gen bedingt dagegen eine mildere Ausprägungsform der Erkrankung. Beide Mutationen führen zu einem vorzeitigen Stopcodon. Bei der schweren Form liegt das Stopcodon im letzten Exon des SOX10-Gens. Hierdurch wird es vom NMD nicht als vorzeitig erkannt und folglich nicht bevorzugt abgebaut. Bei der milderen Form wird das vorzeitige Stopcodon erkannt und die mRNA abgebaut. Dadurch wird nur das Wildtyp-Allel exprimiert. Der mildere Phänotyp wird daher durch Haploinsuffizienz bedingt. In seltenen Fällen kann der NMD zu einem schweren Ausprägungsgrad der Erkrankung führen. Beim Tay-Sachs-Syndrom wird das Protein Hexosaminidase A nur unvollständig

exprimiert. Acht Mutationen sind im HEXA-Gen bekannt, die zu einem vorzeitigen Stopcodon führen. Hier wird durch NMD die mRNA des betroffenen Gens abgebaut. Bei seltenen Missense-Mutationen im HEXA-Gen, die zu keinem vorzeitigen Stopcodon führen, kommt es zu einem wesentlich leichteren Ausprägungsgrad des Tay-Sachs-Syndroms. Man nimmt an, dass der NMD Abbau für den besonders schweren Ausprägungsgrad der Krankheit verantwortlich ist <sup>125</sup>. Es wird vermutet, dass bei der leichteren Form des Tay-Sachs-Syndroms durch die Missense-Mutation ein trunkiertes Protein gebildet wird, welches eine residuelle Funktion aufweist und somit zu einem mildereren Ausprägungsgrad der Erkrankung führt. Bei der schwereren Form wird hingegen kein Protein produziert, da die mRNA auf Grund des enthaltenen vorzeitigen Stopcodons durch den NMD vollständig abgebaut wird.

Da beim NMD nicht alle fehlerhaften Transkripte abgebaut werden und auch die Abbaueffizienz zu variieren scheint, kann der NMD indirekt für die p70-Variabilität verantwortlich sein.

### **5.2.2. Kein Nonsense-mediated-decay der NBN-mRNA**

Die oben genannten Erklärungen lassen erwarten, dass die NBN-mRNA-Mengen mit den Proteinmengen korrelieren. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Durchschnitt der NBN-mRNA der p70-nibrinarmen Zelllinien mit 0,54% vergleichbar mit dem Durchschnitt der NBN-mRNA der p70-nibrinreichen Zelllinien mit 0,6% ist. Die durchschnittliche Menge des p70-Nibrin der nibrinreichen Zelllinien betrug etwa das Dreifache der p70-Nibrinmengen der nibrinarmen Zelllinien. Somit konnte gezeigt werden, dass p70-Nibrinmengen unabhängig von der Menge der mRNA des 657 $\Delta$ 5-Allels sind. Dennoch sind die NBN-mRNA-Mengen der Patientenzelllinien mit durchschnittlich 59% der mRNA-Mengen der Kontrollzelllinien signifikant geringer. Das Ergebnis deutet auf einen schnelleren Abbau oder auf eine höhere Instabilität der mRNA des 657 $\Delta$ 5-Allels hin. Diese Mengenunterschiede scheinen jedoch nicht, zumindest nicht allein, für die Mengenunterschiede von Nibrin in Patienten- und Kontrollzelllinien verantwortlich zu sein, da die p70-Nibrinmengen der Patientenzelllinien ca. 22% der Menge des p95-Nibrin der Kontrollzelllinien betragen. Die ermittelten Mengenunterschiede zwischen mutanter- und Wildtyp-

mRNA sprechen nicht für das Wirken von NMD-Prozessen. Das mutante mRNA-Transkript wies in den Untersuchungen durchschnittlich 59% des Wildtyp-mRNA-Transkripts auf, während mRNA-Transkripte, die dem NMD unterliegen, wesentlich stärker abgebaut werden<sup>126</sup>. Allein anhand der ermittelten Daten konnte jedoch keine weiteren Aussagen zu den Ursachen getroffen werden.

### 5.3. Nonsense-enrichment-Index (NEI)

Um NMD auszuschließen, wurde der Nonsense-enrichment-Index (NEI) ermittelt. Diese Methode wurde von Noensi und Dietz 2001<sup>126</sup> beschrieben. Für dieses Folgeexperiment wurden die NBS lymphoblastoiden Zellen ausgesucht, welche in den vorherigen Experimenten die geringsten NBN-mRNA-Mengen exprimierten. Die Zellen wurden gemeinsam mit einer Kontrollzelllinie fünf Stunden mit Emetin behandelt, um die Proteinsynthese zu blockieren<sup>127</sup> und somit den NMD zu unterbinden.

Hierbei kam es zu einem unerwarteten Anstieg der NBN-mRNA auch in den Kontrollzellen. Dieser Stimulationseffekt wurde vorher beschrieben und stellt vermutlich eine Stressantwort dar<sup>126/127</sup>. Daher ist keine Aussage über den NMD in den Patientenzellen möglich.

Im folgenden Teil des Versuchs wurden die Zellen zusätzlich mit Actinomycin behandelt, um *de novo* Transkription zu blockieren. Hierbei kam es weder bei Patienten- noch bei Kontrollzelllinien zu Veränderungen der NBN-mRNA-Mengen. Die Inhibierung der Translation führte also nicht zu einer erhöhten NBN-657 5-mRNA. Der Nonsense-enrichment-index (NEI) wurde ermittelt, indem die Veränderung der mRNA des 675 $\Delta$ 5-Allel mit der Veränderung der Wildtyp-mRNA verglichen wurde. Der NEI für die NBN-657 $\Delta$ 5-mRNA beträgt 1.27. Bei mutierten mRNA-Transkripten, die durch den NMD abgebaut werden, ist der NEI wesentlich größer. So beträgt er für GTBP 7,7 und für TP53 54,9<sup>126</sup>. Somit konnte der Abbau der NBN-657 $\Delta$ 5-mRNA durch NMD trotz eines in der mRNA enthaltenen vorzeitigen Stopcodon ausgeschlossen werden.

#### 5.4. Translationseffizienz

Eine weitere Erklärung der Unterschiede in den exprimierten Proteinmengen wären Variationen in der Translations-Initiation. Die Translation beginnt bei der NBN-657 $\Delta$ 5-mRNA an Position 602 oder 627, welche sich 55 bzw. 30 bp upstream von der 5bp-Deletion befindet. Dieses stellt einen einzigartigen Vorgang dar. In gesunden Zellen ist die Auswahl des richtigen Initiationscodons wichtig für die Produktion eines funktionellen Proteins<sup>128</sup>. In eukaryoten Zellen bewegt sich der Preinitiationskomplex vom 5'-Ende entlang der mRNA in Richtung 3'-Ende, bis er auf ein Startcodon trifft, welches den Anfangspunkt des proteinkodierenden Bereiches darstellt. Generell wird das erste 5'AUG-Codon als Startcodon genutzt<sup>129/130</sup>.

In NBS-Zellen passiert der Preinitiationskomplex das erste und mehrere folgende Startcodons, bevor er die Translation an einem der oben beschriebenen kryptischen Startcodons initiiert. So konnte *in vitro* gezeigt werden, dass in NBS-Zellen die Translation an beiden alternativen Startcodons eintreten kann<sup>44</sup>.

Warum der Preinitiationskomplex mehrere Startcodons passiert, ist bisher nicht geklärt. Möglicherweise handelt es sich um einen Selektionseffekt. Nur Zellen, die an der Position 602 oder 627 translatieren, überleben, während alle anderen möglicherweise absterben. Da es sich hierbei jedoch um ein nicht regelhaftes Startcodon handelt, lässt sich vermuten, dass dieses anfällig für Variationen ist. Regelmäßige Startcondons weisen in ihrer unmittelbaren Umgebung eine charakteristische Basensequenz auf. Diese wird "Kozak-Sequenz" genannt und weist ein Purin an Position -3 vom A des AUG-Condons sowie ein G an der Position +4 auf<sup>131</sup>. In keinem alternativen Startcondon ist die Kozak-Sequenz vorhanden. So könnte der Preinitiationskomplex auf dieses Startcodon weniger sensitiv reagieren und es möglicherweise mit unterschiedlicher Häufigkeit ebenfalls passieren.

#### 5.5. Proteolyse

Die Unabhängigkeit von NBN-mRNA-Mengen und Nibrinexpression weist auf andere Faktoren hin, die für die Variation der Nibrinmengen verantwortlich sind. Nicht nur die genaue Transkription und Translation ist für die Regulation und Aufrechterhaltung von Proteinen in Zellen von entscheidender Bedeutung. Proteine, die in einer nicht-

nativen dreidimensionalen Struktur gebildet werden oder diese im Laufe ihres Bestehens annehmen, können den regelrechten Ablauf der Zellfunktionen stören oder letale Folgen haben. Daher wird die regelrechte Faltung von Proteinen in Zellen von Kontrollsystemen überwacht. Diese Systeme können bei fehlgefalteten Proteinen eine Rückfaltung induzieren oder die Proteine dem Abbau zuführen. Fehlgefaltete Proteine entstehen in Zellen durch verschiedene Mechanismen. So können defekte Proteine durch Mutationen im Genom entstehen. Das mRNA-Transkript dieser mutierten Gene führt bei der Translation zur Synthese veränderter Proteinen<sup>132/133</sup>. Die Genregulation mittels der Beeinflussung von Protein-Abbauraten ist einer der effektivsten Kontrollmechanismen. Das bekannteste Beispiel für Genregulation über Abbauraten wurde beim Tumor-Suppressor-Protein TP53 beschrieben<sup>134</sup>. p70-Nibrin ist hypomorph. Daher ist anzunehmen, dass das p70-Nibrin von diesen Kontrollmechanismen erkannt und einem vorzeitigen Abbau zugeführt wird. Eine alternative Erklärung wären somit Unterschiede in den Abbauraten des p70-Nibrin durch Kontrollmechanismen.

Nicht-funktionelle Proteine werden in eukaryoten Zellen entweder unspezifisch in den Lysosomen abgebaut oder spezifisch im Zytoplasma individuell reguliert<sup>135/136</sup>. Beim spezifischen Abbauweg werden die Proteine mit dem Protein Ubiquitin markiert und über mehrere Zwischenschritte dem Abbau zugeführt. Die markierten Proteine werden durch das 26S-Proteasom unter ATP-Verbrauch abgebaut<sup>137</sup>.

Des Weiteren spielen molekulare Chaperone bei der Regulation auf Proteinebene eine wichtige Rolle. Sie können fehlgefaltete Proteine erkennen und dem Proteinabbau zuführen<sup>138</sup>.

Ein derart komplex regulierter Prozess könnte durch unterschiedliche Interaktionseffizienz mit dem hypomorphen p70-Nibrin für Unterschiede der exprimierten Mengen verantwortlich sein.

### **5.5.1. p70-Nibrinsensitivität für proteasomalen Abbau**

Um zu untersuchen, ob das p70-Nibrin bevorzugt und schneller abgebaut wird und somit tatsächlich eine von mRNA-Mengen unabhängige Ursache für die geringeren p70-Nibrinmengen existiert, wurde der proteasomale Proteinabbau inhibiert. Hierfür wurde der spezifische Inhibitor MG-132 verwendet. p70-Nibrin, p95-Nibrin und -Aktin wurden aus den mit dem Inhibitor MG-132 behandelten Zellen extrahiert und mittels Westernblot quantifiziert. Während p95-Nibrinmengen von der Proteasomeninhibition nicht beeinflusst wurden, nahmen die p70-Nibrinmengen signifikant zu. Sie stiegen innerhalb von acht Stunden nach Proteasomeninhibition um das ca. Vierfache an. Nach zwölf Stunden lag die p70-Nibrinmenge beim ca. 3,5-fachen des Wertes vor Proteasomeninhibition. Dies lässt vermuten, dass p70-Nibrin besonders anfällig für proteasomale Abbauprozesse ist. Somit könnte der proteasomale Abbau ein Mechanismus sein, der die p70-Nibrinmengen moduliert.

Diese Ergebnisse stimmen mit den vorherigen Resultaten der vorliegenden Arbeit überein und bestätigen die Aussagen über die Mengenunterschiede zwischen NBN-657 $\Delta$ 5-mRNA und Wildtyp-mRNA. Die Mengenunterschiede des p70-Nibrin scheinen nicht durch variierende mRNA-Mengen hervorgerufen zu sein, sondern sie scheinen auf Eigenschaften des p70-Nibrinmoleküls selbst rückführbar. Eine dieser Eigenschaften ist die bereits beschriebene erhöhte Anfälligkeit für proteasomale Abbauprozesse.

### **5.6. EBV-transformierte Zellen als mRNA- und Protein-Quelle**

In der Arbeit wurde eine große Anzahl lymphoblastoider Zelllinien hinsichtlich ihrer NBN-mRNA-Mengen untersucht. Des Weiteren wurden die exprimierten p70-Nibrinmengen von heterozygoten und homozygoten Individuen untersucht. Alle untersuchten LCL-Patientenzellen wiesen ausschließlich die 657 $\Delta$ 5-Mutationen auf. Die Untersuchungen wurden an mit Epstein Barr Virus (EBV) transformierten lymphoblastoiden Zelllinien durchgeführt. Vorteile transformierter Zellen sind stabiles Wachstum und die unbegrenzte Verfügbarkeit. Daher wurden die meisten der bis

jetzt publizierten Ergebnisse zum zellulären Phänotyp mit EBV-transformierten LCL-Zellen durchgeführt.

Im Folgenden sollte hinterfragt werden, in welchem Maße sich Einflüsse aus der viralen Transformation ergeben, die das Wachstumsverhalten und die erreichte Zelldichte beeinflussen. EBV-transformierte Zellen sind diploid, dadurch wird der Zellstoffwechsel weniger beeinträchtigt als bei Zellen, die einen instabilen Chromosomensatz aufweisen<sup>139</sup>. Dennoch kann die Expression bestimmter Gene durch eingebrachtes virales Genom beeinflusst werden<sup>139</sup>.

Nibrin ist in die Zellzykluskontrolle involviert. Somit ist davon auszugehen, dass die Nibrinkonzentration in Zellen zum Zeitpunkt der Zellteilung hochreguliert ist. Daher musste sichergestellt werden, dass die Untersuchungen zum Zeitpunkt der maximalen Wachstumsgeschwindigkeit durchgeführt werden, um die maximalen p70-Nibrin-Expressionswerte der Zelllinien zu vergleichen.

In den durchgeführten Experimenten traten erhebliche Unterschiede sowohl in der Wachstumsgeschwindigkeit als auch in der maximal erreichten Zelldichte auf. Die Kontrollzelllinien wiesen im Vergleich zu den Patientenzelllinien einen um ca. 24 Stunden früheren Beginn der exponentiellen Wachstumsphase auf. Interessanterweise erreichten die homozygoten Zelllinien im Durchschnitt die höchste Zellzahl, während die Kontrollzelllinien geringere Zellzahlen erreichten. Die Werte der heterozygoten Zellen lagen dazwischen. Diese Unterschiede sind im t-Test mit  $p = 0,003$  hoch signifikant, und sie spiegeln wahrscheinlich eine fehlerhafte Zellzyklusarretierung in NBN-Zellen auf Grund der gestörten Zellzyklus-Checkpoints wider. Alle Zellen wiesen vergleichbare maximale Wachstumsgeschwindigkeiten auf, dennoch waren die durchschnittlichen Wachstumsraten der homozygoten am größten. Aber auch innerhalb der einzelnen Gruppen traten große Unterschiede auf. So wuchsen zwei Zelllinien der homozygoten Gruppe deutlich langsamer als die restlichen Zelllinien dieser Gruppe.

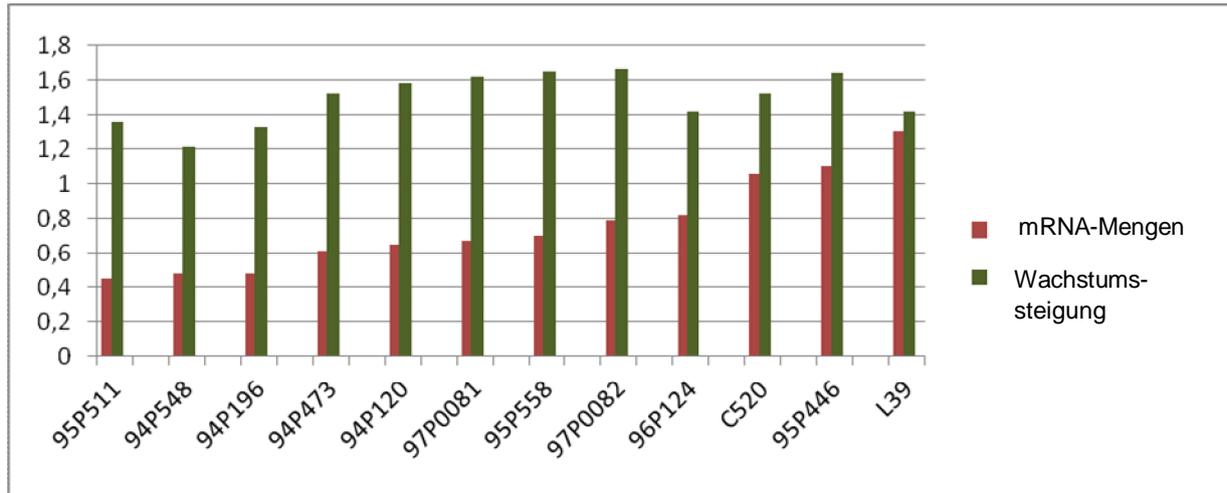
Bei NBS-Zellen wurden verminderte Wachstumsgeschwindigkeiten im Vergleich zu Kontrollzellen festgestellt<sup>33/78</sup>. Es wurden ebenfalls variable Wachstumsraten

beobachtet <sup>140/141</sup>. Es zeigte sich, dass Störungen der Zellzykluskontrolle neben den bereits beschriebenen verminderten Wachstumsgeschwindigkeiten ebenfalls zu gesteigerten Wachstumsgeschwindigkeiten führen <sup>9</sup>.

NBS-Zellen weisen Störungen in der Zellzykluskontrolle auf <sup>41/78</sup>. So wurden nach Röntgenbestrahlung eine verzögerte p53-Akkumulation <sup>9</sup> und eine folgende Reduktion von p21 festgestellt <sup>142/143</sup>. Die sich daraus ergebende Beeinträchtigung im G1/S-Kontrollpunkt wurde zwar in lymphoblastoiden NBS-B-Zellen beobachtet <sup>40</sup>, sie konnte aber in weiteren Beobachtungen an NBS-Lymphoblasten nicht bestätigt werden <sup>121</sup>. Ebenso lassen sich Defizienzen der Zellzykluskontrolle während der S-Phase und beim G2/M-Kontrollpunkt beobachten. Diese Beobachtungen lassen ein verlangsamtes Wachstum in NBS-Zellen erwarten. Kontrovers dazu wurde in EBV-transformierten NBS-Patientenlymphozyten sowie in primären NBS-Patientenfibroblasten ein regelrechter G2/M-Übergang gefunden <sup>122</sup>.

Insgesamt konnte keine Erklärung für das unterschiedliche Wachstumsverhalten der untersuchten Zellen gefunden werden. Es wurde darauf geachtet, dass die Zelllinien jeweils zum Zeitpunkt des maximalen Wachstums untersucht wurden.

Die Wachstumsgeschwindigkeiten zum Untersuchungszeitpunkt waren bei allen Zelllinien vergleichbar. Des Weiteren waren die Unabhängigkeit der von Krüger et al. 2007 <sup>80</sup> ermittelten Nibrinwerte sowohl vom Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Untersuchung als auch vom Alter der Zelllinien und von der Wachstumsgeschwindigkeit festgestellt worden. Ebenso wurden in dieser Arbeit erneut das Wachstumsverhalten der von Krüger et al. 2007 <sup>80</sup> ermittelten p70-Nibrinwerten mit den in dieser Arbeit ermittelten mRNA-Werte verglichen und eine Korrelation ausgeschlossen (Abb. 29).



**Abbildung 29:** Wachstumssteigerung (grüne Balken) der Patientenzelllinien und des Kontrollzellpools in Beziehung zu den NBN-mRNA-Mengen (rote Balken).

### 5.7. Validität der ausgewählten Housekeeping-Gene in der Real-Time PCR

Die mRNA-Mengen wurden mittels relativer Real-Time PCR ermittelt. Es wurden also keine absoluten Mengen miteinander verglichen, sondern die Mengenverhältnisse der mRNA vom NBN-Zielgen und dem Housekeeping-Gen HPRT. Die Validität der Ergebnisse beruht auf der Annahme, dass HPRT in allen untersuchten Zelllinien unabhängig von Zellstadium und äußeren Einflüssen mit konstanter Kopiezahl exprimiert wird. Als "Housekeeper" werden häufig Gene gewählt, die mit dem Grundstoffwechsel der Zelle zusammenhängen. Untersuchungen zur Validität von Housekeeping-Genen haben jedoch gezeigt, dass viele von ihnen hohen Schwankungen unterliegen. HPRT wurde als Housekeeping-Gen mit geringer Expressionsschwankung beschrieben. In PBMC-Kulturen schwankten die exprimierten HPRT-mRNA-Mengen durchschnittlich um weniger als das Zweifache<sup>126</sup>. Daher lassen sich geringere Mengenunterschiede der mRNA vom Zielgen zwischen verschiedenen Zelllinien nicht sicher nachweisen. Die in die Untersuchung einbezogenen Zellen wiesen teilweise so geringe Unterschiede in den p70-Nibrinmengen auf, dass eine mögliche Korrelation auf mRNA-Ebene mittels Real-Time-PCR auf Grund der oben beschriebene Ungenauigkeit nicht hätte identifiziert werden können. Es musste also sichergestellt werden, dass die Expressionsvarianz

der Proteinmengen des Zielgens höher als das Zweifache, also höher als die Expressionvarianz der mRNA von HPRT war. Um diese Rückschlüsse über die NBN-mRNA aus den NBN-Proteinmengen ziehen zu können, wurde davon ausgegangen, dass das Mengenverhältnis der Nibrin-mRNA in den Zellen konstant zu dem der Nibrinkonzentration in den Zellen ist, d.h. dass eine konstante Translationseffizienz vorliegt. Würden sich beispielsweise die Proteinmengen des Zielgens in zwei zu vergleichenden Zelllinien nur um den Faktor 0,5 unterscheiden, wäre HPRT als Housekeeping-Gen ungeeignet. Bei An- bzw. Abwesenheit einer Korrelation von mRNA-Mengen und Proteinmengen des Zielgens könnte nicht unterschieden werden, ob diese Korrelation tatsächlich vorliegt oder auf unterschiedliche Mengen der HPRT-mRNA zurückzuführen ist. Wenn wir annehmen, dass sich die Proteinmengen des Zielgens in zwei zu vergleichenden Zelllinien um das Fünffache unterscheiden, so wäre eine Aussage möglich.

Daher wurden die untersuchten Zelllinien in eine erste Gruppe mit niedrigen und eine zweite mit hohen p70-Werten eingeteilt und die mRNA-Mengen dieser zwei Gruppen miteinander verglichen. Die durchschnittliche Menge von p70-Nibrin in den Zelllinien der ersten Gruppe betrug 10,42% der Kontrollzelllinie. Die durchschnittliche Menge von p70-Nibrin in den Zelllinien der zweiten Gruppe betrug 33,43% (siehe Krüger et al. 2007<sup>80</sup>). Somit schwankten die Proteinmengen des Zielgens NBN zwischen den beiden zu vergleichenden Zelllinien-Gruppen durchschnittlich um den Faktor 3. Damit lag die Mengendifferenz von p70 im Durchschnitt über der Schwankungsbreite der HPRT-mRNA-Expression in PBMC<sup>93</sup>. Somit sind die Aussagen der Arbeit auch unter Berücksichtigung der Expressionvarianz der mRNA des Housekeeping-Gens HPRT zulässig.

### **5.8. Vererbung von p70-Nibrinmengen**

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurden die exprimierten p70-Nibrinmengen in heterozygoten NBS-Zellen untersucht. Ebenso wie die Patientenzelllinien wiesen die heterozygoten Zelllinien neben der Wildtypmutation ausschließlich die 657 $\Delta$ 5-Mutation auf. Des Weiteren wurden Wildtypzellen in die Untersuchung einbezogen. Es konnte gezeigt werden, dass die Nibrinmengen durch modulierende Prozesse auf der Ebene des Proteinabbaus beeinflusst werden. Die genauen Ursachen für die

Mengenvariationen sind jedoch weiterhin unbekannt. Um genetische Ursachen dieser Variationen zu identifizieren, wurde die Verteilung der p70-Nibrinmengen in mehreren Familien auf mögliche Vererbungsmuster hin untersucht.

In der Arbeit von Krüger et al. 2007<sup>80</sup> wurden 26 homozygote NBS-Zelllinien auf ihre p70-Nibrinmengen untersucht. Hierbei zeigte sich ein Häufungsplateau der Nibrinwerte zwischen 15% und 25%, während sich die Zelllinien mit den höchsten bzw. niedrigsten p70-Nibrinwerten deutlicher in ihren p70-Nibrinmengen unterschieden. So weist die nibrinreichste Zelllinie 96P473 mit 49,85% etwa 30% mehr p70-Nibrin auf, als die Zelllinie 94P196. Diese exprimierte mit 34,2% den zweithöchsten Nibrinwert. Ebenso finden sich unter nibrinarmen Zelllinien auffallend große Sprünge in den p70-Nibrinwerten.

Aufgrund der geringen Zahl an untersuchten Zelllinien, da keine Verwandtschaftsbeziehungen unter den Betroffenen bestanden und des Weiteren die p70-Nibrinwerte von heterozygoten Verwandten nicht bekannt waren, ließen sich keine weiterreichenden Schlussfolgerungen ziehen.

### **5.8.1. Modifizierende Einflüsse auf p70-Nibrin in homozygoten und heterozygoten NBS-Zelllinien**

Die p70-Nibrinwerte der heterozygoten Zellen schwanken ebenso stark wie die p70-Nibrinmengen der homozygoten Zelllinien. Damit scheint das p70-Nibrinmolekül in homozygoten wie in heterozygoten Zellen den gleichen modifizierenden Einflüssen zu unterliegen. Es scheint sich hierbei um ein für das p70-Nibrinmolekül spezifisches Phänomen zu handeln, da das p95-Nibrin bei den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit in den Kontrollzelllinien geringere Schwankungen aufwies.

### **5.8.2. Erheblicher Einfluss des sonstigen genetischen Hintergrunds**

Im Stammbaum b exprimieren die Geschwister 06P0037 und 06P0040 mit 18,48% und 6,15% erheblich unterschiedliche Werte an p70-Nibrin. Im Stammbaum d exprimieren die heterozygoten Individuen 04P0673 und 04P0672 mit 5% und 17% relativ geringe Mengen an p70-Nibrin, während ihr gemeinsamer heterozygoter Nachkomme 06P0495 mit 75% p70-Nibrin einen der höchsten Werte aller heterozygoten Individuen exprimiert. Während Individuen mit ihren Eltern 50% der Allele teilen, haben Geschwister durchschnittlich nur etwa 25% ihrer Allele gemeinsam. Somit teilen Eltern und Nachkommen also 50% derjenigen Allele, welche die Menge des p70-Nibrin beeinflussen. Anhand der beschriebenen erheblichen Schwankungen im Stammbaum b und im Stammbaum d lässt sich der Einfluss anderer Gene auf die Mengenmodulation von p70-Nibrin erkennen.

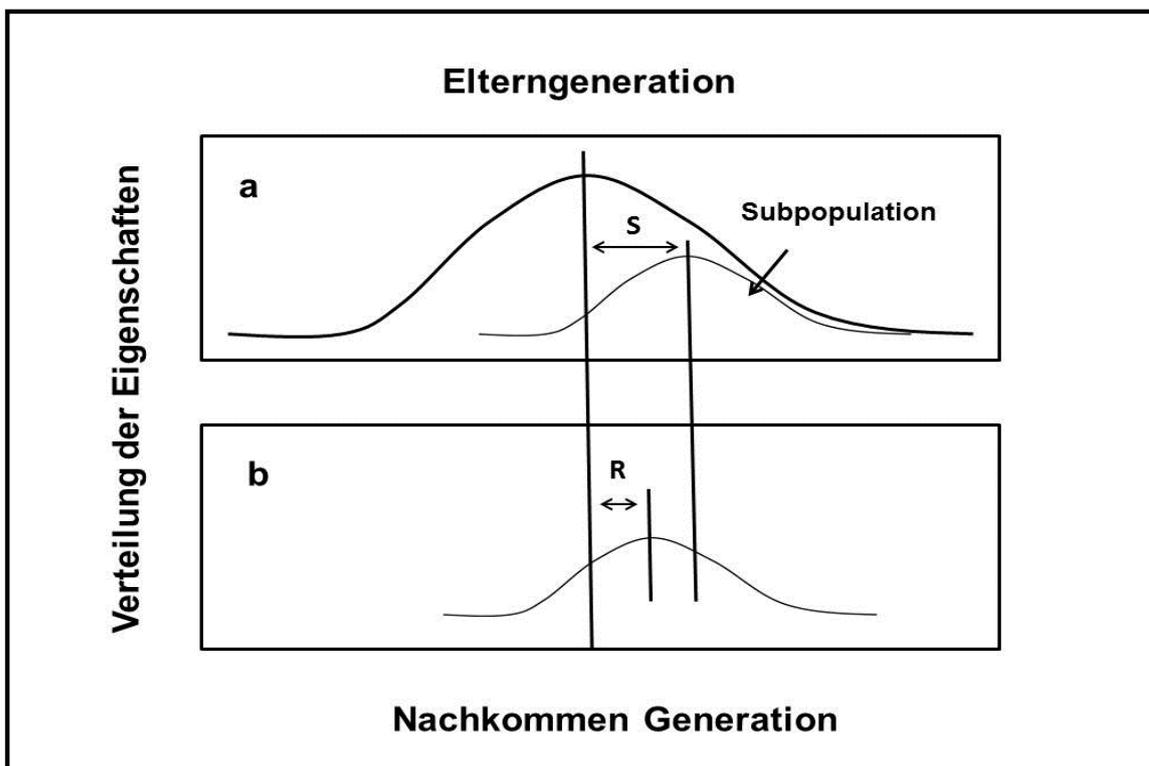
### **5.8.3. p70-Mengenzustände in heterozygoten NBS-Zelllinien**

Das Verteilungsmuster der heterozygoten weist kein Plateau und keine großen p70-Nibrinwertsprünge an den Rändern auf, wie sie sich bei den exprimierten p70-Nibrinmengen der homozygoten 26 Zelllinien angedeutet haben. Somit ist davon auszugehen, dass das Verteilungsmuster der p70-Nibrinmengen in homozygoten Zelllinien nur aufgrund der geringen Zahl an untersuchten Zellen jene Sprünge in den p70-Nibrinwerten aufweist.

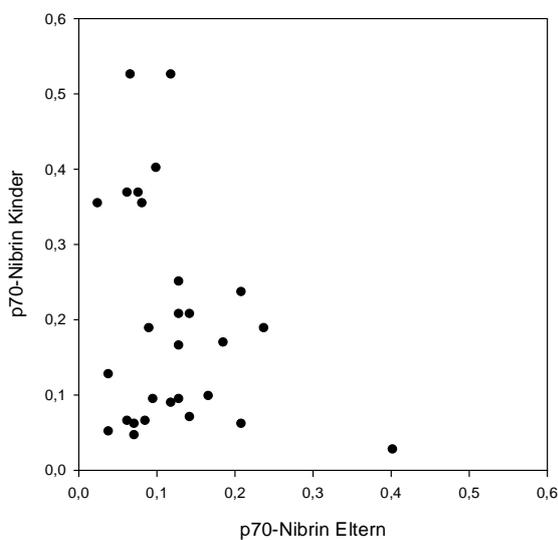
### **5.8.4. Geringe Heritabilität bei der Vererbung der p70-Nibrinmengen**

Heritabilität ist ein Maß für die Erbllichkeit von Eigenschaften, bei deren phänotypischer Ausbildung sowohl Gene als auch Umwelteinflüsse eine Rolle spielen. Wenn eine Eigenschaft eine hohe Heritabilität aufweist, so können die variierenden Ausprägungsgrade dieser Eigenschaft innerhalb von Individuen einer Population durch genetische Einflüsse erklärt werden. Bei der Berechnung der Heritabilität geht man davon aus, dass komplexe Eigenschaften innerhalb einer Population normal verteilt sind und dass somit ein Mittelwert existiert. Durch Selektion kann man nun innerhalb der Population eine Subpopulation auswählen,

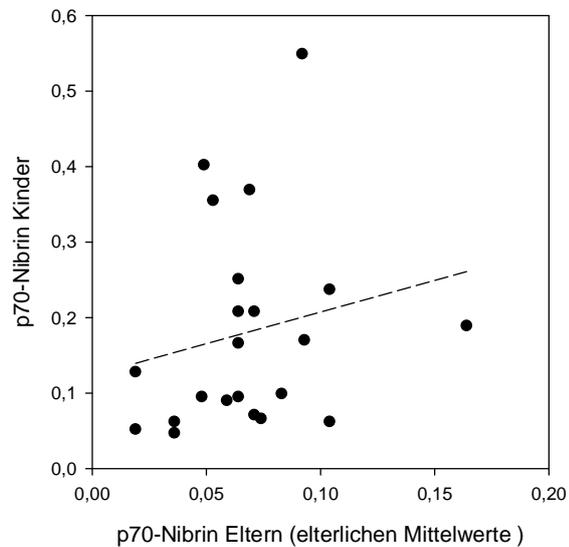
deren Mittelwert vom Mittelwert der Ausgangspopulation verschieden ist. Diese Differenz der Mittelwerte ist die Selektionsdifferenz (S). In der Population der Nachkommen dieser Subpopulation wird sich wiederum ein Mittelwert der betrachteten Eigenschaft ergeben. Die Differenz zwischen diesem Mittelwert und dem Mittelwert der Ausgangspopulation ist der Selektionserfolg (R). Aufgrund der sog. Regression zur Mitte wird der Mittelwert der Eigenschaft der Nachkommen näher am Mittelwert der Ursprungspopulation liegen, als der Mittelwert ihrer Elterngeneration (Abb. 30). Der Quotient aus Selektionserfolg und Selektionsdifferenz definiert die Heritabilität der entsprechenden Eigenschaft. Er schwankt zwischen 0 und 1, kann aber auch in Prozent angegeben werden. Trägt man die Mittelwerte der Eigenschaft beider Generationen in ein Diagramm ein, so erhält man eine Regressionsgerade. Aus der Steigung dieser Gerade lässt sich die Heritabilität ablesen. Ist die Steigung 1, so ist die Ausprägung der Eigenschaft vollständig auf genetische Einflüsse zurückzuführen, liegt sie bei 0, sind ausschließlich Umwelteinflüsse für den Ausprägungsgrad verantwortlich.



**Abbildung 30 a:** Verteilungskurven einer Eigenschaft mit einer Normalverteilung und einem Maximum. Eine Subpopulation wird am rechten Ende der Verteilungskurve gebildet. Die Differenz zwischen Mittelwert der Subpopulation und Mittelwert der Ausgangspopulation ist die Selektionsdifferenz (S) **b:** Unter Nachkommen der Subpopulation aus a bildet die betrachtete Eigenschaft wieder eine Normalverteilung mit Maximum. Dieses Maximum liegt aufgrund der Regression zur Mitte näher am Maximum der Ursprungspopulation. Die Differenz zwischen diesem Mittelwert und dem Mittelwert der Ausgangspopulation ist der Selektionserfolg (R).



**Abbildung 31**



**Abbildung 32**

**Abbildung 31:** Es wurden p70-Nibrinwerte der Kinder (y-Achse) gegen die Werte der Eltern (x-Achse) aufgetragen. Es besteht keine Korrelation zwischen p70-Nibrinwerten der Eltern und der Kinder. Die Kinder exprimieren im Durchschnitt mehr p70-Nibrin als ihre Eltern ( $0,20 \pm 0,15$  vs.  $0,12 \pm 0,08$ ;  $p = 0,04$ ). **Abbildung 32:** Es wurden nur Familien betrachtet, bei denen beide Eltern heterozygot waren. Von den p70-Nibrinwerten beider Eltern wurde der Mittelwert gebildet (x-Achse) und gegen den p70-Nibrinwert der Kinder aufgetragen (y-Achse). Die Regressionsgrade weist einen positiven Anstieg von 0,84 auf.

Wie in Abbildung 31 zu sehen ist, besteht keine Korrelation zwischen den p70-Nibrinwerten der heterozygoten Kinder und denen der heterozygoten Eltern. Dies liegt nicht zuletzt an der bereits beschriebenen, außerordentlichen Streuung der p70-Nibrinwerte. Die Kinder haben im Durchschnitt anscheinend etwas mehr p70-Nibrin als ihre Eltern ( $0,20 \pm 0,15$  vs.  $0,12 \pm 0,08$ ;  $p = 0,04$ ).

Als Folge der sog. Regression zur Mitte bei quantitativen Merkmalen korrelieren die elterlichen Mittelwerte mit denen ihrer Kinder grundsätzlich positiv. Bei den hier untersuchten Familien ist häufig nur ein Elternteil heterozygot. Es wurden isoliert Familien betrachtet, bei denen beide Eltern heterozygot sind. Hier besteht bei geringer Korrelation ( $p=0,04$ ) ein positiver Korrelationskoeffizient von 0,84. Die Regressionsgrade weist somit einen positiven Anstieg von 0,84 auf (Abb. 32). Der Korrelationskoeffizient von 0,84 würde auf eine hohe Heritabilität der p70-Nibrinmengen hinweisen. Korrelationskoeffizient und Korrelation deuteten letztendlich auf einen polygenen Ursprung der p70-Nibrin Variation hin. Bei der geringen Korrelation der Werte von  $p=0,04$  bleibt jedoch unklar, in welchem Maße der Korrelationskoeffizient die Heritabilität widerspiegelt.

### **5.9. Ausblick**

Patienten mit Nijmegen Breakage Syndrom weisen eine erhöhte Krebsinzidenz auf. Von Krüger et al. 2007<sup>80</sup> konnte gezeigt werden, dass die Häufigkeit und der Schweregrad dieser Erkrankung mit den in den Patientenzellen produzierten Mengen des trunkierten p70-Nibrin korrelieren. Es konnte gezeigt werden, dass p70-Nibrin bevorzugt von Proteasomen abgebaut wird; somit konnten proteasomale Abbauprozesse als mögliche Ursache für die p70-Nibrinmengenunterschiede identifiziert werden. Der spezifische p70-Nibrin Anstieg nach der *in vitro* Hemmung der proteasomalen Aktivität deutet klar auf eine bedeutende Rolle der Proteasomen in der p70-Modulation hin. Weitere Untersuchungen werden zeigen, inwieweit diese Abbauprozesse die p70-Nibrinmengenvariationen der untersuchten Zellen erklären. Hierfür könnte in homozygoten NBS-Zellen mit niedrigen und mit hohen p70-Nibrinmengen der proteasomale Abbau gehemmt werden. Würden sich hierauf die p70-Nibrinmengen angleichen, würde dies diese Annahme bestärken.

#### **5.9.1. Proteasomeninhibitoren als möglicher Therapieansatz neoplastischer Erkrankungen bei NBS-Patienten**

Durch spezifische Inhibition des Proteasoms wurde gezeigt, dass dem Proteasom der Abbau von etwa 90% der zellulären Proteine obliegt. Die Anwendung verschiedener spezifischer Inhibitoren des Proteasoms hat in den letzten Jahren

auch Einzug in die therapeutische Anwendung gefunden. Velcade® (Bortezomib) ist z.B. für die 3rd line Therapie des therapierefraktären multiplen Myeloms in Deutschland bereits zugelassen und befindet sich parallel dazu in verschiedenen Phase II Studien in der Therapie diverser solider Tumoren und hämatologischer Erkrankungen<sup>144</sup>.

Proteasomeninhibitoren haben ebenso vielversprechende Ergebnisse bei der Behandlung von B-Zelltumoren<sup>145/146</sup>.

B-Zelllymphome sind die am häufigsten auftretenden Malignome bei NBS-Patienten. Inwieweit proteasomale Aktivität die p70-Expression beeinflusst, ist weiterhin Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen. Es konnte gezeigt werden, dass p70-Nibrin anfälliger für proteasomale Abbauprozesse ist als das p95-Nibrin. Ob diese allein für die Variationen der exprimierten p70-Mengen in NBS-Zellen verantwortlich sind, muss weiter untersucht werden.

Des Weiteren ist bisher unverstanden, warum die letztendlich für diese Variationen verantwortlichen Mechanismen das p70-Nibrin mit unterschiedlicher Effizienz abbauen, obwohl in allen untersuchten NBS-Patienten ein identisches Proteinmolekül exprimiert wird.

Trotz dieser offenen Fragen können auf Grund des erreichten Wissenstands erste mögliche therapeutische Ansätze formuliert werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Hemmung der Proteasomen die zellulär exprimierten p70-Nibrinmengen erhöhen. Hohe zelluläre p70-Mengen schützen Patienten zumindest teilweise vor dem frühen Auftreten aggressiver Malignomen. Somit könnten Proteasomen-Hemmer, die bereits ihre Wirksamkeit bei der Therapie von B-Zelllymphomen bewiesen haben, ebenfalls schützende Effekte für NBS-Patienten haben.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurden die Mengen von p-70-Nibrin in heterozygoten Individuen untersucht. Wie bereits erwähnt, sind Krebsinzidenz und Schweregrad neoplastischer Erkrankungen von den in Patientenzellen produzierten Mengen des trunkierten p70-Nibrin abhängig. Ebenso wiesen heterozygote Träger der 657Δ5-Mutation eine erhöhte Krebsinzidenz auf<sup>43</sup>. Während bei homozygoten

Erkrankten die Neoplasien bereits gehäuft im Jugend- und frühen Adoleszenzalter auftreten, steigt bei Heterozygoten die Krebsinzidenz erst im Erwachsenenalter.

Bisher gibt es keine Untersuchungen zu der Frage, ob dieses Phänomen ebenfalls auf unterschiedliche Nibrinmengen zurückzuführen ist. Da in heterozygoten Zellen ein Wildtyp-Allel exprimiert werden kann, ist zu erwarten, dass heterozygote Zellen weniger p95-Nibrinmengen exprimieren und somit genauso wie Patientenzellen einen dosisabhängigen Ausprägungsgrad der NBS-Symptomatik aufweisen.

Da auch p95-Nibrin von Proteasomen abgebaut wird, könnten durch Abbaueffizienzunterschiede, wie sie bei p70-Nibrin auftreten, ebenfalls gravierende Mengenunterschiede im p95-Nibrin auftreten.

Dagegen spricht, dass die Kontrollzelllinien in Versuchen im Rahmen dieser Arbeit eine geringere Expressionsvariabilität des p95-Nibrin aufweisen als die heterozygoten und homozygoten Zelllinien, welche jeweils höhere p70-Expressionvariabilität aufweisen. Des Weiteren zeigte sich p95-Nibrin in den durchgeführten Versuchen wesentlich weniger anfällig für den proteasomalen Abbau als p70-Nibrin. Somit scheint das p95-Nibrin weniger anfällig für die Mengen modulierenden Faktoren zu sein als das p70-Nibrin. Da p95-Nibrinmengen von nur neun Kontrollzelllinien untersucht wurden, muss dieser Befund durch Untersuchungen weiterer Kontrollzelllinien bestätigt werden. Sollte sich jedoch die geringe Variabilität der exprimierten p95-Mengen in heterozygoten Zelllinien bestätigen, so müsste weiter nach Ursachen für die unterschiedliche Malignominzidenz in heterozygoten Individuen gesucht werden.

Da die meisten untersuchten heterozygoten Individuen jünger als 50 Jahre alt waren, lassen sich bis dato mögliche Korrelationen von p70-Nibrinmengen in Heterozygoten und Häufigkeit von Neoplasien nicht untersuchen.

### 6. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Ursachen für Variationen der exprimierten p70-Nibrinmengen in Zellen von Patienten mit Nijmegen Breakage Syndrom zu identifizieren. Die Aufgabenstellung basiert auf den Forschungsergebnissen von Krüger et al. 2007, wonach Patienten, deren Zellen wenig p70-Nibrin exprimieren, signifikant häufiger und früher an malignen Neoplasien erkrankten, als Patienten, deren Zellen hohen Mengen an p70-Nibrin exprimieren. Als Ursache wurde initial das Wirken des Nonsense-mediated-mRNA-decay vermutet, da durch die das NBS verursachende 657 $\Delta$ 5-Mutation ein vorzeitiges Stopcodon in den Leserahmen geschoben wird. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden mittels Real-Time PCR die NBN-mRNA von Patientenzellen quantifiziert, die hohe oder niedrige Mengen an p70-Nibrin exprimierten. Hierbei konnte keine Korrelation zwischen p70-Nibrin und NBN-mRNA festgestellt werden. Der Nonsense-enrichment-Index lag bei 1,27 und sprach somit gegen das Wirken des Nonsense-mediated-mRNA-decay.

Des Weiteren wurden NBN-mRNA-Mengen von gesunden Individuen und deren p95-Nibrinwerte quantifiziert. Die Patientenzellen wiesen durchschnittlich sechzig Prozent der NBN-mRNA der Kontrollzelllinien auf, während ihre p70-Mengen etwa zwanzig Prozent der p95-Mengen der Kontrollzelllinien betrug. Es konnte keine Korrelation zwischen p70-Nibrin und p70-mRNA festgestellt werden. Somit konnten die ersten beiden Hypothesen widerlegt werden. Die Ursache der Variationen der exprimierten p70-Nibrinmengen ist nicht auf mRNA-Ebene zu finden.

In weiteren Untersuchungen wurde der proteasomale Abbau in NBN-Wildtyp- und NBS-Fibroblasten gehemmt und anschließend die Veränderung der p70-Nibrinmengen bzw. der p95-Nibrinmengen gemessen. Während die Nibrinmengen der Wildtypzellen konstant blieben, stiegen die Nibrinmengen in den NBS-Fibroblasten auf das 3,5 fache des Ausgangswertes an. Die Mengenunterschiede von Nibrin scheinen somit nicht durch variierende mRNA-Mengen hervorgerufen, sondern sie scheinen auf variierende Abbauraten des Nibrinmoleküls in verschiedenen Zellen rückführbar zu sein.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden die p70-Nibrinwerte von 48 heterozygoten und von fünf homozygoten Individuen bestimmt, um die Heritabilität der p70-Nibrinmengen zu ermitteln. Die Individuen konnten Familien in acht Stammbäumen zugeordnet werden. Die Auswertung zeigte bei geringer Korrelation einen Anstieg der Regressionsgrade. Dieser Anstieg spräche grundsätzlich für eine Heritabilität. Die Werte sprechen für eine polygene Vererbung der p70-Nibrinmengen.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

ATM	Ataxia Telangiectasia smutated%
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3 related
bp	Basenpaare
BRCT	breast cancer carboxy-terminal-Domäne
CBC	cap-binding-complex
cDNA	komplementäre DNA
Cdk	Cyclin-abhängige Kinasen
Ct	Cycle-Threshold
ddH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
dNTP 2'-	Desoxy-ribonucleosid-5'-triphosphat
ds	double strand
DSB	Doppelstrangbruch
DTT	Dithiothreitol
EBV	Epstein Barr Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EJC	exon-junction-complex
EtBr	Ethidiumbromid
FAM	6-carboxyfluorescein
FET	Fluoreszenz-Energietransfer
FHA	fork head-associated-Domäne
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FKS	fötales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
Gy	Gray
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
HR	homologous recombination

## Abkürzung

---

HRP	Meerrettich-Peroxidase-konjugierten Antikörpern
kb	Kilobasen
kD	Kilo-Dalton
LCL	Lymphoblastoiden B-Zelllinie
M	Molar
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mM	Millimolar
MRN	Mre11/Rad50/Nibrin
mRNA	messenger RNA
n	Nano
NaCl	Natriumchlorid
NBN	Nibrin
NBS	Nijmegen Breakage Syndrom
NHEJ	non homologous end joining
NHL	Non-Hodgkin Lymphome
NMD	nonsense-mediated-decay
ng	Nanogramm
NTPs	Nukleosidtriphosphate
OD	Optische Dichte
PCR	polymerase chain reaction
Rn	Reporter-Signal
RNA	Ribonucleinsäure
ROX	6-carboxy-X-rhodamine
rpm	Umdrehungen / Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec	Sekunde
TAMRA	6-carboxytetramethyl-rhodamine
U	Units

## 8. Literaturverzeichnis

1. Cooper, G.M. *The Cell: A Molecular Approach*. 4th ed.: Sinauer Associates Incorporated. (2007).
2. Morgan, D. *The Cell Cycle: Principles of Control*. Oxford University Press, New York, (2007).
3. Alberts, B. *Molecular Biology of the Cell*. 5th revised Edition, Taylor & Francis, New York. (2008).
4. Tse, AN. Carvajal, R. Schwartz, GK. Targeting checkpoint kinase 1 in cancer therapeutics. *Clin Cancer Res* 13, 1955-60. (2007).
5. Ashwell, S. Zabludoff, S. DNA damage detection and repair pathways recent advances with inhibitors of checkpoint kinases in cancer therapy. *Clin Cancer Res* 14, 4032-7. (2008).
6. Reed, S. I. Ratchets and clocks: the cell cycle, ubiquitylation and protein turnover. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 855-864. (2003).
7. Bloom, J. Cross, F. R. Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 149-160. (2007).
8. Murray, A.W. Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell* 116, 221-234. (2004).
9. Antocchia, 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* 75, 583-91. (1999).
10. Massague, J. G1 cell-cycle control and cancer. *Nature* 432, 298-306. (2004).
11. Weizman, N. Shiloh, Y. Barzilai, A. Contribution of the ATM protein to maintaining cellular homeostasis evidenced by continuous activation of the AP-1 pathway in ATM-deficient brains. *J Biol Chem* 278, 6741-7. (2003).
12. Falck, J. Petrini, J.H. Williams, B.R. Lukas, J. et al. The DNA damage-dependent intra-S phase checkpoint is regulated by parallel pathways. *Nat Genet* 30, 290-4. (2002).
13. Jazayeri, A. Falck, J. Lukas, C. et al. ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks. *Nat Cell Biol* 8, 37-45. (2006).
14. Choi, J.H, Lindsey-Boltz, L.A. Sancar, A. Reconstitution of a human ATR-mediated checkpoint response to damaged DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 13301-6. (2007).
15. Gottifredi, V. Prives, C. The S phase checkpoint: when the crowd meets at the fork. *Semin Cell Dev Biol* 16, 355-68. (2005).
16. Chou, D.M. Elledge, S.J. Tipin and Timeless form a mutually protective complex required for genotoxic stress resistance and checkpoint function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 18143-7. (2006).

17. Yoshizawa-Sugata, N. Masai, H. Human Tim/Timeless-interacting protein, Tipin, is required for efficient progression of S phase and DNA replication checkpoint. *J Biol Chem* 282, 2729-40. (2007).
18. Tapia-Alveal, C. Calonge, T.M. O'Connell, M.J. Regulation of chk1. *Cell Div* 4, 8. (2009).
19. Niida, H. Katsuno, Y. Banerjee, B. et al. M. Specific role of Chk1 phosphorylations in cell survival and checkpoint activation. *Mol Cell Biol* 27, 2572-81. (2007).
20. Baumann, P. Benson, F.E. West, S.C. Human Rad51 protein promotes ATP-dependent homologous pairing and strand transfer reactions in vitro. *Cell* 87, 757-66. (1996).
21. Kanaar, R. Hoeijmakers, J.H. van Gent, D.C. Molecular mechanisms of DNA double strand break repair. *Trends Cell Biol* 8, 483-9. (1998).
22. Bliss, T.M. Lane, D.P. Ku selectively transfers between DNA molecules with homologous ends. *J Biol Chem* 272, 5765-73. (1997).
23. van Gent, D.C. and M, van der Burg, Non-homologous end-joining, a sticky affair. *Oncogene* 26, 7731-40. (2007).
24. Weemaes, C.M. Hustinx, T.W. Scheres, J.M. et al. A new chromosomal instability disorder: the Nijmegen breakage syndrome. *Acta Paediatr Scand* 70, 557-64. (1981).
25. The International Nijmegen Breakage Syndrome Study Group. Nijmegen breakage syndrome. *Arch Dis Child* 82, 400-6. (2000).
26. Green, A. J. et al. Severe microcephaly with normal intellectual development: the Nijmegen breakage syndrome. *Arch Dis Child* 73, 431-4. (1995).
27. 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* 238, 321-4. (1990)
28. Seidemann, K. et al. Non-Hodgkin's lymphoma in pediatric patients with chromosomal breakage syndromes (AT and NBS): experience from the BFM trials. *Ann Oncol* 11, 141-5. (2000).
29. Yeo, T.C. et al. V(D)J rearrangement in Nijmegen breakage syndrome. *Mol Immunol* 37, 1131-9. (2000).
30. Neubauer, S. Arutyunyan, R. Stumm, M. et al. Radiosensitivity of ataxia telangiectasia and Nijmegen breakage syndrome homozygotes and heterozygotes as determined by three-color FISH chromosome painting. *Radiat. Res* 157, 312-321. (2002).
31. Stumm, M. Neubauer, S. Keindorff, S. 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* 92, 186-191. (2001).
32. Digweed, M. Sperling, K. Nijmegen breakage syndrome: clinical manifestation of defective response to DNA double-strand breaks. *DNA Repair* 3, 1207-1217. (2004).

33. Girard, P. M. et al. Radiosensitivity in Nijmegen Breakage Syndrome cells is attributable to a repair defect and not cell cycle checkpoint defects. *Cancer Res* 60, 4881-8. (2000).
34. Taalman, R. D. Jaspers, N. G. Scheres, J. M. et al. Hypersensitivity to ionizing radiation, in vitro, in a new chromosomal breakage disorder, the Nijmegen Breakage Syndrome. *Mutat Res* 112, 23-32. (1983).
35. 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* 60, 605-10. (1997).
36. Lim, DS. Kim, ST. Xu, B. et al. ATM phosphorylates p95/nbs1 in an S-phase checkpoint pathway. *Nature* 404, 613-7. (2000).
37. Kraakman-van der Zwet, M. Overkamp, WJ. Friedl, AA. et al. Immortalization and characterization of Nijmegen Breakage syndrome fibroblasts. *Mutat Res* 434, 1727. (1999).
38. Difilippantonio, S. et al. Role of Nbs1 in the activation of the Atm kinase revealed in humanized mouse models. *Nat Cell Biol* 7, 675-85. (2005).
39. Zhao, S. et al. Functional link between ataxia-telangiectasia and Nijmegen breakage syndrome gene products. *Nature* 405, 473-7. (2000).
40. Sullivan, K. E. Veksler, E. Lederman, H. et al. Cell cycle checkpoints and DNA repair in Nijmegen breakage syndrome. *Clin Immunol* 82, 43-8. (1997).
41. 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* 13, 2385-97. (2004).
42. Xu, B. Kim, S. & Kastan, M. B. Involvement of Brca1 in S-phase and G(2)-phase checkpoints after ionizing irradiation. *Mol Cell Biol* 21, 3445-50. (2001).
43. Dzikiewicz-Krawczyk, A. The importance of making ends meet: mutations in genes and altered expression of proteins of the MRN complex and cancer. *Mutat Res* 659, 262-73. (2008).
44. Maser, R. S. Zinkel, R. & Petrini, J. H. An alternative mode of translation permits production of a variant NBS1 protein from the common Nijmegen breakage syndrome allele. *Nat Genet* 27, 417-21. (2001).
45. Matsuura, S. et al. Genetic mapping using microcell-mediated chromosome transfer suggests a locus for Nijmegen breakage syndrome at chromosome 8q21-24. *Am J Hum Genet* 60, 1487-94. (1997).
46. Varon, R. et al. Nibrin, a novel DNA double-strand break repair protein, is mutated in Nijmegen breakage syndrome. *Cell* 93, 467-76. (1998).
47. Matsuura, K. et al. Radiation induction of p53 in cells from Nijmegen breakage syndrome is defective but not similar to ataxia-telangiectasia. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 242, 602-607. (1998).
48. Matsuura, S. et al. Positional cloning of the gene for Nijmegen breakage syndrome. *Nat Genet* 19, 19179-81. (1998).

49. 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* 93, 477-86. (1998).
50. Kobayashi, J. et al. NBS1 localizes to gamma-H2AX foci through interaction with the FHA/BRCT domain. *Curr Biol* 12, 1846-51. (2002).
51. Seemanova, E. et al. Cancer risk of heterozygotes with the NBN founder mutation. *J Natl Cancer Inst* 99, 1875-80. (2007).
52. 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* 8, 900-2. (2000).
53. Demuth, I. Digweed, M. The clinical manifestation of a defective response to DNA double-strand breaks as exemplified by Nijmegen breakage syndrome. *Oncogene* 26, 7792-7798. (2007).
54. Steffen, J. et al. Increased cancer risk of heterozygotes with NBS1 germline mutations in Poland. *Int J Cancer* 111, 67-71. (2004).
55. Cybulski, C Gorski, B. Debniak, T. et al. NBS1 is a prostate cancer susceptibility gene. *Cancer Res* 64, 1269-1274. (2004).
56. Mosor, M. et al., Association of the heterozygous germline I171V mutation of the NBS1 gene with childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 20, 1454-6. (2006).
57. Varon, R. et al. Mutations in the Nijmegen Breakage Syndrome gene (NBS1) in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Cancer Res* 61, 3570-2. (2001).
58. Knudson A. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68, 820. 3. (1971).
59. Santarosa, M. Haploinsufficiency for tumour suppressor genes: when you do not need to go all the way. *Biochim Biophys Acta* 1654, 105-122. (2004).
60. Tauchi, H. et al. The forkhead-associated domain of NBS1 is essential for nuclear foci formation after irradiation but not essential for RAD50/MRE11/NBS1 complex DNA repair activity. *J Biol Chem* 276, 12-5. (2001).
61. Wu, X. et al. ATM phosphorylation of Nijmegen breakage syndrome protein is required in a DNA damage response. *Nature* 405, 477-82. (2000).
62. Gatei, M. et al. ATM-dependent phosphorylation of nibrin in response to radiation exposure. *Nat Genet* 25, 115-9. (2000).
63. Paull, T. T. Lee, J. H. The Mre11/Rad50/Nbs1 complex and its role as a DNA double-strand break sensor for ATM. *Cell Cycle* 4, 737-40. (2005).
64. Bressan, D. A. Baxter, B. K. Petrini, J. H. The Mre11-Rad50-Xrs2 protein complex facilitates homologous recombination-based double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 19, 7681-7. (1999).

65. Rattray, A. J. & Symington, L. S. Multiple pathways for homologous recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 139, 45-56. (1995).
66. Petrini, J. H. et al. Isolation and characterization of the human MRE11 homologue. *Genomics* 29, 80-6. (1995).
67. Anderson, D. E., Trujillo, K. M., Sung, P. et al. Structure of the Rad50 x Mre11 DNA repair complex from *Saccharomyces cerevisiae* by electron microscopy. *J Biol Chem* 276, 37027-33. (2001).
68. de Jager, M. et al. Human Rad50/Mre11 is a flexible complex that can tether DNA ends. *Mol Cell* 8, 1129-35. (2001).
69. D'Amours, D. Jackson, S. P. The Mre11 complex: at the crossroads of dna repair and checkpoint signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 317-27. (2002).
70. Paull TT, Gellert M. Nbs1 potentiates ATP-driven DNA unwinding and endonuclease cleavage by the Mre11/Rad50 complex. *Genes Dev* 13, 1276-88. (1999).
71. Weaver, D.T., What to do at an end: DNA double-strand-break repair. *Trends Genet* 11, 388-92. (1995).
72. Hendrickson, E.A., Cell-cycle regulation of mammalian DNA double-strand-break repair. *Am J Hum Genet*, 61, 795-800. (1997).
73. Paull, T.T. Rogakou, E.P. Yamazaki, V., A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Current Biology* 10, 886. 895. (2000).
74. Desai-Mehta, A. Cerosaletti, K. M. Concannon, P. Distinct functional domains of nibrin mediate Mre11 binding, focus formation, and nuclear localization. *Mol Cell Biol* 21, 2184-91. (2001).
75. Lee, J. H. Paull, T. T. ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science* 308, 551-4. (2005).
76. Dumon-Jones, V. et al. Nbn heterozygosity renders mice susceptible to tumor formation and ionizing radiation-induced tumorigenesis. *Cancer Res* 63, 7263-9. (2003).
77. Zhu, J. Petersen, S. Tessarollo, L. Nussenzweig, A. Targeted disruption of the Nijmegen breakage syndrome gene NBS1 leads to early embryonic lethality in mice. *Curr Biol* 11, 105-9. (2001).
78. Kang, J., Bronson, R. T. & Xu, Y. Targeted disruption of NBS1 reveals its roles in mouse development and DNA repair. *Embo J* 21, 1447-55. (2002).
79. Williams, B. R. et al. A murine model of Nijmegen breakage syndrome. *Curr Biol* 12, 648-53. (2002).
80. Kruger, L. Demuth, I. Neitzel, H. et al. Cancer incidence in Nijmegen breakage syndrome is modulated by the amount of a variant NBS protein. *Carcinogenesis* 28, 107-11. (2007).

81. Cui, Y. Hagan, K. W. Zhang, S. et al. Identification and characterization of genes that are required for the accelerated degradation of mRNAs containing a premature translational termination codon. *Genes Dev* 9, 423-36. (1995).
82. Lejeune, F. Maquat, L. E. Mechanistic links between nonsense-mediated mRNA decay and pre-mRNA splicing in mammalian cells. *Curr Opin Cell Biol* 17, 309-15. (2005).
83. Mendell, J. T. Sharifi, N. A. Meyers, J. L. et al. Nonsense surveillance regulates expression of diverse classes of mammalian transcripts and mutes genomic noise. *Nat Genet* 36, 1073-8. (2004).
84. Carter, M. S. Li, S. Wilkinson, M. F. A splicing-dependent regulatory mechanism that detects translation signals. *Embo J* 15, 5965-75. (1996).
85. Nagy, E. Maquat, L. E. A rule for termination-codon position within introncontaining genes: when nonsense affects RNA abundance. *Trends Biochem Sci* 23, 198-9. (1998).
86. Le Hir, H. Izaurralde, E. Maquat, L. E. et al. The spliceosome deposits multiple proteins 20-24 nucleotides upstream of mRNA exon-exon junctions. *Embo J* 19, 6860-9. (2000).
87. Le Hir, H. Moore, M. J. Maquat, L. E. Pre-mRNA splicing alters mRNP composition: evidence for stable association of proteins at exon-exon junctions. *Genes Dev* 14, 1098-108. (2000).
88. Förster, T. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz *Ann. Phy* 55-75. (1948).
89. Holland, P.M. Abramson, R.D. Watson, R. et al. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5q3q exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci* 88, 357-362. (1991).
90. Heid, A.C. Stevens, J. Livak, K.J. Williams, P.M. Real Time Quantitative PCR. *Genome Research* 6, 986-994. (1996).
91. Lie, Y.S. Petropoulos, C.J. Advances in quantitative PCR technology: 5' nuclease assays. *Current Opinions in Biotechnology* 9, 43. 48. (1998).
92. Bustin, S. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* 25,169-193. (2000).
93. Dheda, K. Bustin, S. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *BioTechniques* 37, 112-119. (2004).
94. Ionov, Y. Nowak, N. Perucho, M. et al. Manipulation of nonsense mediated decay identifies gene mutations in colon cancer Cells with microsatellite instability. *Oncogene* 23, 639-645. (2004).
95. Angele, S. Treilleux, I. Bremond, A. et al. Altered expression of DNA doublestrand break detection and repair proteins in breast carcinomas. *Histopathology* 43, 347-53. (2003).
96. Chen, Y.C. Su, Y.N. Chou, P.C. et al. Overexpression of NBS1 contributes to transformation through the activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt. *J Biol Chem* 280, 32505-11. (2005).

97. Yang, M.H. Chiang, W.C. Chou, et al. Increased NBS1 expression is a marker of aggressive head and neck cancer and overexpression of NBS1 contributes to transformation. *Clin. Cancer Res* 12, 507-15. (2006).
98. Levine, M. Davidson, E. H. Gene regulatory networks for development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 4936-42. (2005).
99. Kleinjan, D. A. van Heyningen, V. Long-range control of gene expression: emerging mechanisms and disruption in disease. *Am J Hum Genet* 76, 8-32. (2005).
100. Queen, C. Baltimore, D. Immunoglobulin gene transcription is activated by downstream sequence elements. *Cell* 33, 741-8. (1983).
101. Long, X. Miano, J. M. Remote control of gene expression. *J Biol Chem* 282, 15941-5. (2007).
102. Conte et al. Promoter competition as a mechanism of transcriptional interference mediated by retrotransposons. *EMBO Journal* 21, 3908. 3916. (2002).
103. Blackwood, E.M. Kadonaga, J.T. Going the distance: a current view of enhancer action. *Science* 281, 61. 63. (1998).
104. Veitia, R.A. Nijhout, H.F. The robustness of the transcriptional response to alterations in morphogenetic gradients. *Bioessays* 28, 282-9. (2006).
105. Tomilin, N.V. Regulation of mammalian gene expression by retroelements and non-coding tandem repeats. *Bioessays* 30, 338-48. (2008).
106. David S. Latchman; Eukaryotic transcription factors. *Biochem J* 270, 281-289. (1990).
107. Ashkenas, J. Byers, P.H. The Final Stage of Gene Expression: Chaperones and the Regulation of Protein Fate. *Am J Hum Genet* 61, 267-272. (1997).
108. Fraser, P. Grosveldt, F. Locus control regions, chromatin activation and transcription. *Current Opinion in Cell Biology* 10, 361-365. (1998).
109. Jackson, D.A. Pombo A, Iborra F. The balance sheet for transcription: an analysis of nuclear RNA metabolism in mammalian cells. *FASEB J* 14, 242. 54. (2000).
110. William, A. Guyette, Robert, J. Matusik and Jeffrey M. Rosen Prolactin-mediated transcriptional and post-transcriptional control of casein gene expression. *Cell* 17,1013-1023. (1979).
111. Tucker, M. Parker, R. Mechanisms and control of mRNA decapping in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Biochem* 69, 571. 595, (2000).
112. Mitchell, P. Tollervey, D. mRNA turnover. *Curr. Opin. Cell Biol* 13, 320. 325. (2001).
113. Parker, R. Song, H. The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nat Struct Mol Biol* 11, 121. 127. (2004).
114. Anderson, J.S.J. Parker, R. The 3' to 5' degradation of yeast mRNAs is a general mechanism for mRNA turnover that requires the SKI2 DEVH box protein and 3' to 5' exonucleases of the exosome complex. *EMBO J* 17, 1497. 1506. (1998).

115. Wang, Z. Kiledjian, M. Functional link between the mammalian exosome and mRNA decapping. *Cell* 107, 751. 762. (2001).
116. Chen, C.Y. et al. AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs. *Cell* 107, 451. 464. (2001).
117. Mukherjee, D. et al. The mammalian exosome mediates the efficient degradation of mRNAs that contain AU-rich elements. *EMBO J* 21, 165. 174. (2002).
118. Gavin, A.C. et al. Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* 415, 141. 147. (2002).
119. Fromont-Racine, M. et al. Genome-wide protein interaction screens reveal functional networks involving Sm-like proteins. *Yeast* 17, 95. 110. (2000).
120. Uetz, P. et al. A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 403, 623. 627. (2000).
121. Yamazaki, V. Wegner, R. D. & Kirchgessner, C. U. Characterization of cell cycle checkpoint responses after ionizing radiation in Nijmegen breakage syndrome cells. *Cancer Res* 58, 2316-22. (1998).
122. Girard, P. M. Riballo, E. Begg, A. C. et al. Nbs1 promotes ATM dependent phosphorylation events including those required for G1/S arrest. *Oncogene* 21, 4191-9. (2002).
123. Li, A. Swift, M. Mutations at the ataxia-telangiectasia locus and clinical phenotypes of A-T patients. *Am J Med Genet* 92, 170-7. (2000)
124. Alonso, J. Garcia-Miguel, P. Abelairas, et al. Spectrum of germline RB1 gene mutations in Spanish retinoblastoma patients. Phenotypic and molecular epidemiological implications. *Hum. Mutat.* 17, 412-22. (2001).
125. Myerowitz, R. Tay-Sachs disease-causing mutations and neutral polymorphisms in the Hex A gene. *Hum Mutat* 9, 195-208. (1997).
126. Noensie, E. N. Dietz, H. C. A strategy for disease gene identification through nonsense mediated mRNA decay inhibition. *Nat Biotechnol* 19, 434-439. (2001).
127. Bloethner, S. Mould, A. Stark, M. et al.. Identification of ARHGEF17, DENND2D, FGFR3, and RB1 Mutations in Melanoma by Inhibition of Nonsense-Mediated mRNA Decay. *Genes Chromosomes Cancer* 47, 1076. 1085. (2008).
128. Maag, D. Algire, M. A. & Lorsch, J. R. Communication between eukaryotic translation initiation factors 5 and 1A within the ribosomal pre-initiation complex plays a role in start site selection. *J Mol Biol* 356, 724-37. (2006).
129. Pestova, T. V. & Kolupaeva, V. G. The roles of individual eukaryotic translation initiation factors in ribosomal scanning and initiation codon selection. *Genes Dev* 16, 2906-22. (2002).
130. Kozak, M. Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation. *Gene* 299,1-34. (2002).

131. Algire, M. A. & Lorsch, J. R. Where to begin? The mechanism of translation initiation codon selection in eukaryotes. *Curr Opin Chem Biol* 10, 480-6. (2006).
132. Betting, J. and Seufert, W. "A yeast Ubc9 mutant protein with temperature-sensitive in vivo function is subject to conditional proteolysis by a ubiquitin- and proteasome- dependent pathway." *J Biol Chem* 271, 25790-6. (1996).
133. Platt, T. Miller, J. H. and Weber, K. "In vivo degradation of mutant lac repressor." *Nature* 228, 1154-6. (1970).
134. Yang, Y. Li, C.C. Weissman, A.M.,. Regulating the p53 system through ubiquitination. *Oncogene* 23, 2096-106. (2004).
135. Ciechanover, A. & Brundin P. The ubiquitin proteasome system in neurodegenerative diseases sometimes the chicken, sometimes the egg. *Neuron* 40, 427-46. (2003).Glickman,
136. M. H. & Ciechanover, A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* 82, 373-428-. (2002).
137. Hochstrasser, M. Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu Rev Genet* 30, 405-39. (1996).
138. Hartl, F. U. & Hayer-Hartl, M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 295, 1852-8. (2002).
139. Tahara, H. Tokutake, Y. Maeda, S. et al. M. Abnormal telomere dynamics of B-lymphoblastoid cell strains from Werner's syndrome patients transformed by Epstein-Barr virus. *Oncogene* 16, 1911-20. (1997).
140. Siwicki, J. K., Degerman, S., Chrzanowska, et al. Telomere maintenance and cell cycle regulation in spontaneously immortalized T-cell lines from Nijmegen breakage syndrome patients. *Exp Cell Res* 287, 178-89. (2003).
141. Ranganathan, V. Heine, W. F. Ciccone, et al. Rescue of a telomere length defect of Nijmegen breakage syndrome cells requires NBS and telomerase catalytic subunit. *Curr Biol* 12, 962-6. (2001).
142. el-Deiry, W. S. Tokino, T. Velculescu, V. E. et al. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75, 817-25. (1993).
143. Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N. et al. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75, 805-16. (1993).
144. Richardson et al. A phase 2 Study of Bortezomib in relapsed, refractory myeloma. *NEJM* 348, 2609-2617. (2003).
145. Schenkein, D. Proteasome inhibitors in the treatment of B-cell malignancies. *Clin Lymphoma* 3, 49-55. (2002)
146. Dunleavy, K. Pittaluga, S. Czuczman, M. S. et al. Differential efficacy of bortezomib plus chemotherapy within molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 113, 6069-6076. (2009).

## 9. Anhang

**Tabelle 5:** Aufgeführt sind die drei mittels Immunpräzipitation oder Westernblot ermittelten Werte der p70-Nibrinmengen aller heterozygoten-, homozygoten- und wildtyp-Zelllinien. Die Werte wurden relativ zum p70-Nibrinwert von 05P 227 angegeben. 05P 227 wurde als interner Standard bei jedem Versuch mitgeführt.

Heterozygote	Durchschnitt	erster Wert	zweiter Wert	dritter Wert
	relativ zu 05 P227			
04P385	0,08	0,08	0,02	0,15
04P386	0,11	0,11	0,13	0,1
04P387	0,27	0,27	0,2	0,34
04P388	0,53	0,5	0,46	0,64
04P0672	0,05	0,05	0,1	0,01
04P0673	0,17	0,1	0,24	0,19
04P689	0,18	0,3	0,1	0,15
04P690	0,13	0,3	0,05	0,04
04P691	0,14	0,18	0,13	0,1
04P759	0,25	0,23	0,3	0,23
04P760	0,31	0,14	0,13	0,65
04P762	1,16	1,17	1,43	0,9
04P763	0,25	0,27	0,21	0,28
04P764	0,5	0,35	0,54	0,6
04P765	0,19	0,19	0,11	
04P766	0,4	0,43	0,37	0,41
04P917	0,3	0,3		
04P918	0,44	0,42	0,51	0,38
04P919	0,77	0,75	0,75	0,81
04P920	0,15	0,17	0,12	0,17
05P774	0,85	0,87	0,82	
06P0028	0,49	0,62	0,35	
06P 0037	0,39	0,31	0,28	0,58
06P0038	0,16	0,17	0,16	0,15
06P0039	0,78	0,71	0,72	0,92
06P0040	0,13	0,14	0,12	0,12
06P0041	0,36	0,18	0,39	0,52
06P078	0,3	0,23	0,16	0,5
06P118	0,15	0,15	0,1	0,21
06P119	0,13	0,11	0,07	0,22

## Anhang

Heterozygote	Durchschnitt	erster Wert	zweiter Wert	dritter Wert
	relativ zu 05 P227			
06P120	0,1	0,1	0,09	
06P309	0,27	0,3	0,25	
06P310	0,75	0,7	0,8	0,76
06P311	0,2	0,11	0,25	0,26
06P314	0,35	0,33	0,29	0,45
06P312	0,2	0,06	0,23	0,3
06P315	0,21	0,25	0,2	0,19
06P316	0,44	0,45	0,43	0,47
06P317	0,44	0,35	0,49	0,48
06P319	0,3	0,24	0,4	0,27
06P320	0,21	0,12	0,23	0,28
06P321	0,06	0,08	0,06	0,05
06P495	0,75	0,72	0,82	0,71
06P497	0,24	0,15	0,36	0,21
06P498	0,33	0,3	0,45	0,25
06P499	0,63	0,67		0,53
06P0812	0,55	0,66	0,52	0,46
Wildtyp	Durchschnitt			
	relativ zu C520			
L39	1,06	1,2	0,92	
C520	1	1	1	1
NL553	0,96		1,16	0,77
94P120	0,87	0,75	0,83	1,04
94P197	1,4	1,4		
95P466	0,88	0,86	1	0,79
96P124	0,95	1,02	1,04	0,8
96P125	0,89		0,8	0,98
96P126	0,96	1,14	0,74	1
98P651	0,79	0,96	0,62	0,8

## Anhang

---

Homozygote	Durchschnitt		erster Wert	zweiter Wert	dritter Wert
	relativ zu 05 P227				
96P473	1		1		
04P761	1,11		1,28	0,95	1,09
04P767	0,64		0,51	0,64	0,79
04P921	0,6		0,6		
06P0042	0,48		0,48		

---

## 10. Danksagung

Zuallererst bedanke ich mich besonders herzlich bei Herrn Professor Martin Digweed. Er hat mich während der langen Zeit stets mit ergebnisorientierten und ermutigenden Gesprächen unterstützt. Sein Vertrauen und sein unermüdliches Engagement waren Grundlage für den Erfolg meiner Arbeit.

Ebenso danke ich Janina Radszewski, Gabriele Hildebrandt und Bastian Salewsky, die mir geduldig Methoden und Wissen vermittelten und mir jahrelang bei all meinen Fragen und Problemen hilfsbereit zur Seite standen. Die Zusammenarbeit mit ihnen in einer freundschaftlichen Atmosphäre hat mir immer sehr viel Spaß gemacht.

Mein besonderer Dank gilt Susanne Rothe, die mich bei der Zellkultur und bei der Immunpräzipitation unterstützte. Ihre Hilfsbereitschaft, ihr Engagement und ihre Erfahrung waren für meine Arbeit von unschätzbarem Wert.

Mein Dank gilt ebenfalls Veronique Dutrannoy-Tönsing für ihre Hilfe bei der Durchführung und Auswertung der Real-Time PCR.

Herzlich möchte ich mich weiterhin bei Prof. Seemanova vom Universitätsklinikum in Prag für die gute Zusammenarbeit bedanken. Ihre durch langjährige Arbeit erhobenen Daten zu den Familien der NBS-Patienten waren Grundlage meiner Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern und meiner Frau Alexa, die mich während all der Zeit liebevoll unterstützten und somit zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

---

## 11. Erklärung

Ich, Stephan Lins, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *sklinische Variabilität und Expression des mutierten 657 5-Allels beim Nijmegen Breakage Syndrom* 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

## **Lebenslauf**

Der Lebenslauf erscheint hier aus datenschutzrechtlichen Gründen nicht.



---

**Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:**

**Zeitschriftenartikel:**

**Lins, S.** Kim, R. Krüger, L. Chrzanowska, KH. Seemanova, E. Digweed, M.  
"*Clinical variability and expression of the NBN c.657del5 allele in Nijmegen  
Breakage Syndrome*" "Gene" Band 447 Seite 12-17 (2009).