

Aus dem CharitéCentrum 17
für Frauen-, Kinder- und Jugendmedizin mit Perinatalzentrum und Humangenetik
Institut für Humangenetik
Direktor: Professor Dr. rer. nat. Karl Sperling

Habilitationsschrift

NBN, hSNM1B/Apollo und NHEJ1/XLF im Netzwerk der zellulären DNA-Schadensantwort

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Humangenetik

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. rer. nat. Ilja Demuth
geboren am 12.07.1967 in Berlin

Eingereicht: Mai 2010
Dekanin: Prof. Dr. med. Annette Grüters-Kieslich
1. Gutachter: Prof. Dr. med. Bernd Kaina
2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Markus Löbrich

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	3
1	Einleitung	4
1.1	Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen	4
1.2	DNA-Doppelstrangbruch-Reparaturdefizienz beim Menschen	6
1.3	Nijmegen Breakage Syndrom (NBS)	7
1.4	Mutationen im <i>NBN</i> -Gen bilden den Basisdefekt des Nijmegen Breakage Syndroms	9
1.5	Rolle des <i>NBN</i> -Gens bei der DNA-Reparatur	11
1.6	NHEJ1/XLF-Defizienz	11
1.3	Die SNM1-Proteinfamilie	12
2	Eigene Arbeiten	14
2.1	Untersuchungen zur Nibrin-Funktion am Mausmodell	14
2.1.1	Ein induzierbares Mausmodell für das Nijmegen-Breakage-Syndrom beweist die essentielle Funktion des <i>NBN</i> -Gens	14
2.1.2	Essentielle <i>NBN</i> -Funktion beim Schutz vor Ataxie und cerebellaren Defekten	28
2.1.3	Krebs-Inzidenz beim Nijmegen Breakage Syndrom wird durch die Menge eines varianten NBS-Proteins moduliert	36
2.1.4	Eine systematische Proteom-Studie bestrahlter DNA-reparaturdefizienter <i>Nbn</i> -Mäuse	42
2.2	Klinische Variabilität und neue Mutationen im NHEJ1-Gen bei Patienten mit einem Nijmegen Breakage Syndrom-ähnlichem Phänotyp	52
2.3	Identifizierung des <i>hSNM1B/Apollo</i> -Gens und Aufklärung seiner Funktion in der frühen Antwort auf DNA-Schäden	65
2.3.1	<i>hSNM1B/Apollo</i> wird für die reguläre zelluläre Antwort auf DNA interstrangvernetzende Agenzien und ionisierende Strahlung benötigt	65
2.3.2	Endogenes <i>hSNM1B/Apollo</i> interagiert mit TRF2 und stimuliert ATM als Antwort auf ionisierende Strahlung	74
2.3.3	Hinweise für eine <i>hSNM1B/Apollo</i> -Funktion in der HSP70-vermittelten DNA-Schadensantwort	85
3	Diskussion	94
3.1	Untersuchungen zur Nibrin-Funktion am Mausmodell	94
3.2	NHEJ1/XLF-Defizienz: Klinische Variabilität und neue Mutationen	97
3.3	Untersuchungen zur <i>hSNM1B/Apollo</i> -Funktion	99
4	Zusammenfassung	102
5	Literaturverzeichnis	104

Danksagung

Erklärung

Abkürzungsverzeichnis

AT	Ataxia Telangiectasia
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
DSB	DNA-Doppelstrangbruch
HR	Homologe Rekombination
LCL	Lymphoblastoide B-Zelllinie
M/R/N-Komplex	MRE11/RAD50/Nibrin-Komplex
NBS	Nijmegen Breakage Syndrom
NHEJ	Non Homologous End Joining
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
XCIND-Syndrome	durch Röntgenstrahlensensitivität (X-ray sensitivity), Krebsprädisposition (cancer susceptibility), Immunodefizienz, neurologische Auffälligkeiten und Defekte in der DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur gekennzeichnete Syndrome

1 Einleitung

1.1 Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen

Der DNA-Doppelstrangbruch (DSB) wird hinsichtlich der Zytotoxizität als der schwerwiegendste DNA-Schadenstyp angesehen (Jackson, 2009). DSBs entstehen endogen, z.B. durch die Wirkung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und als Folge von Replikationsfehlern. Außerdem treten DSBs als Intermediate physiologischer DNA-Rearrangements während der Entwicklung und Reifung des adaptiven Immunsystems (V(D)J-Rekombination und Immunglobulin-Klassenwechsel) auf. Exogen werden DSBs durch ionisierende Strahlung, Radiomimetika und verschiedene andere Agenzien verursacht.

Im Verlauf der Evolution haben sich zwei grundlegend verschiedene Reparaturwege entwickelt, die beim Säuger für die Reparatur von DSBs verantwortlich sind: das nicht-homologe Verknüpfen von DNA-Enden (Non Homologous End Joining, NHEJ) und die Rekombinationsreparatur unter Verwendung eines homologen DNA-Moleküls (Homologe Rekombination, HR).

Non Homologous End Joining (NHEJ)

Die Reparatur von DSBs durch das nicht-homologe Verknüpfen von DNA-Enden, NHEJ, wird durch die Proteine Ku70 und Ku80 eingeleitet. Als Heterodimer binden diese Proteine mit hoher Affinität an freie DNA-Enden (de Vries, et al., 1989). Neben einer frühen Rolle bei der Schadenserkenkung werden dem Ku70/Ku80-Heterodimer folgende Funktionen zugeschrieben: Schutz der DNA-Enden vor nukleolytischer Degradation (Liang and Jasin, 1996), für die Reparatur geeignete Positionierung der DNA-Enden (Bliss and Lane, 1997), Stimulierung von DNA-Ligasen (Ramsden and Gellert, 1998) und Rekrutierung der DNA-Proteinkinase (DNA-PK). Die DNA-abhängige Assoziation von Ku70/Ku80 und DNA-PK führt zur Bildung des funktionellen DNA-PK-Holoenzym, DNA-PK_{CS}, und zur Rekrutierung der Nuklease ARTEMIS. Eine mögliche Funktion der DNA-PK_{CS} könnte die Induktion einer Strukturveränderung des Chromatins sein. Diese erfolgt nach einem Modell von Kanaar et al. nach der Phosphorylierung der an den DNA-Enden lokalisierten DNA-PK, durch das jeweils gegenüberliegende DNA-PK_{CS}-Molekül (Kanaar, et al., 1998). Darüber hinaus gibt es Hinweise für eine Funktion der DNA-PK_{CS} bei der Synapsis der beiden freien DNA-Enden (DeFazio, et al., 2002). Der Komplex aus den Proteinen XRCC4 und DNA-Ligase IV katalysiert die eigentliche Verknüpfung der DNA-Enden, ein Prozess, der durch das Protein NHEJ1 (Cernunnos, XLF) stimuliert wird (Hentges, et al., 2006). Der beschriebene Reparaturweg ist ungenau, es kommt vor allem zu kleineren Deletionen. Die Reparatur von

DSBs erfolgt beim Säuger überwiegend durch NHEJ und kann in jeder Phase des Zellzyklus stattfinden (Khanna and Jackson, 2001).

Homologe Rekombination (HR)

Die prinzipiellen Schritte der Reparatur durch homologe Rekombination: Der Schadenserkennung folgt die exonukleolytische Prozessierung der Doppelstränge, so dass überhängende 3'-Enden entstehen. Das Schlüsselenzym der homologen Rekombination, Rad51, bindet an die einzelsträngigen Bereiche und formt so ein Nukleoprotein-Filament, das in der Lage ist, homologe Sequenzen in einem homologen DNA-Molekül (Schwesterchromatid oder homologes Chromosom) zu finden. Durch einen Strangaustausch, der ebenfalls durch Rad51 vermittelt wird, entsteht eine Verknüpfung zwischen den beiden DNA-Molekülen (Baumann, et al., 1996). Die Neusynthese der fehlenden Stücke erfolgt komplementär zu den intakten Einzelstrangbereichen. Nach einem Ligationsschritt wird die Überkreuz-Struktur (Holliday-Struktur) durch eine Resolvase aufgelöst, so dass die beiden intakten Moleküle wieder getrennt vorliegen (Kanaar, et al., 1998; Szostak, et al., 1983). Die Reparatur durch HR ist sehr komplex und erfolgt, neben den bereits genannten, unter Beteiligung einer Vielzahl weiterer Proteine. Vor allem während der S- und G2-Phase des Zellzyklus kann durch die nahezu fehlerfreie HR repariert werden, da hier das Schwesterchromatid als Reparatur-Template genutzt werden kann.

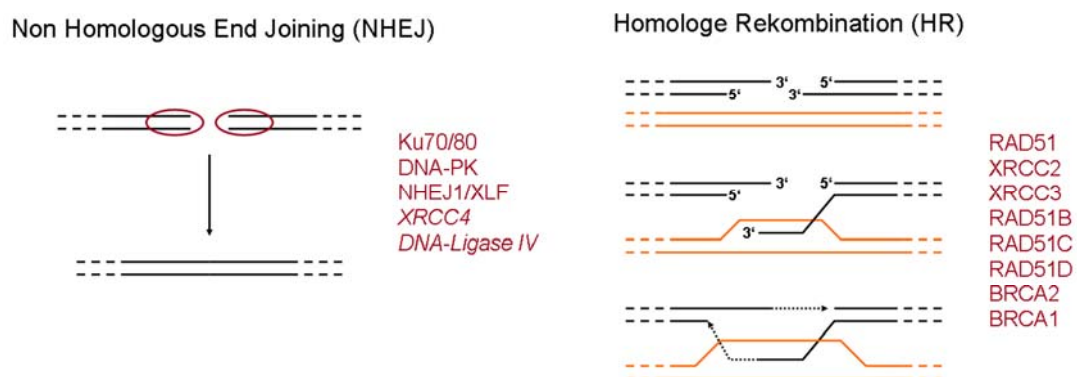


Abbildung 1: DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur. Die Abbildung zeigt schematisch die beiden Hauptwege zur Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen: Non Homologous End Joining und Homologe Rekombination. Die wichtigsten beteiligten Proteine sind jeweils angegeben. Das Reparatur-Template (in der Regel das Schwesterchromatid) ist in orange dargestellt. Erklärung im Text.

1.2 DNA-Doppelstrangbruch-Reparaturdefizienz beim Menschen

Man kennt heute eine ganze Reihe von autosomal-rezessiv vererbten Krankheiten des Menschen, bei denen als Ursache ein Defekt in der DNA-Reparatur nachgewiesen ist bzw. vermutet wird. Bei einigen dieser Syndrome wurden bislang ausschließlich hypomorphe Mutationen gefunden. Dies legt die Vermutung nahe, dass Nullmutationen in diesen Genen nicht mit dem Leben vereinbar sind und unterstreicht die Bedeutung der Reparatur von DNA-Schäden für den Organismus. In der Tabelle 1 sind menschliche Krankheiten mit einem Defekt in der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen aufgeführt. Aufgrund von starken Überschneidungen im Phänotyp werden diese Krankheiten den 'XCIND-Syndromen' zugeordnet, die durch Röntgenstrahlensensitivität (X-ray sensitivity), Krebsprädisposition (cancer susceptibility), Immunodefizienz, neurologische Auffälligkeiten und Defekte in der DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur gekennzeichnet sind (Gatti, et al., 2007).

Tabelle 1: DNA-Doppelstrangbruch-Reparaturdefizienzen beim Menschen

Erkrankung	Mutiertes Gen/Protein	Betroffener DNA-Doppelstrangbruch-Reparaturweg
Ataxia Telangiectasia	<i>ATM/ATM</i>	HR/NHEJ
DNA-PK _{CS} -Defizienz	<i>DNA-PK/DNA-PK</i>	NHEJ
Ligase IV-Defizienz	<i>Ligase IV/Ligase IV</i>	NHEJ
Mre11-Defizienz, AT-like Disorder	<i>MRE11/MRE11</i>	HR/NHEJ
Nijmegen Breakage Syndrome	<i>NBN/Nibrin, p95</i>	HR/NHEJ
RAD50-Defizienz	<i>RAD50/RAD50</i>	HR/NHEJ
RS-SCID-Artemis	<i>ARTEMIS, hSNM1C/Artemis</i>	NHEJ
SCID-NHEJ1/XLF	<i>NHEJ1/NHEJ1, XLF, Cernunnos</i>	NHEJ

1.3 Nijmegen Breakage Syndrom (NBS)

Das Nijmegen Breakage Syndrom (NBS) wurde erstmals 1981 bei holländischen Patienten beschrieben (Weemaes, et al., 1981), die Mehrheit der Patienten lebt jedoch in Osteuropa (Übersicht in Digweed and Sperling, 2004). NBS-Patienten zeigen eine charakteristische Gesichtsmorphologie, die durch ein fliehendes Kinn, eine flache Stirn und ein prominent wirkendes Mittelgesicht gekennzeichnet ist. Hinzu kommen eine ausgeprägte Mikrozephalie und Minderwuchs (Abbildung 1). Darüber hinaus ist ein stark erhöhtes Risiko für Krebs charakteristisch. Nach einer von uns kürzlich durchgeführten Untersuchung hatten 14 von 26 Patienten Krebs. Mehrheitlich handelte es sich dabei um Lymphome, mit einem medianen Manifestationsalter von 11 Jahren (Kruger, et al., 2007). Das NBS ist eine autosomal-rezessive Krankheit, das verantwortliche Gen, *NBN*, wurde 1998 identifiziert (Carney, et al., 1998; Varon, et al., 1998).

Chromosomenbrüchigkeit und Radiosensitivität

Auf zellulärer Ebene ist das NBS durch eine erhöhte spontane und induzierbare Chromosomenbrüchigkeit gekennzeichnet und lässt sich daher zur Gruppe der Chromosomenbruchsyndrome zuordnen. NBS-Patienten und deren Zellen sind besonders empfindlich gegenüber Röntgenstrahlung und der Behandlung mit anderen Agenzien, die direkt oder indirekt DNA-Doppelstrangbrüche verursachen. Die Chromosomenbrüche und zu beobachtenden Reunionsfiguren unter Beteiligung zweier oder sogar mehrerer Chromosomen lassen sich als Ausdruck einer fehlerhaften DNA-Reparatur deuten. In stimulierten T-Lymphozyten findet sich über die spontane Chromosomenbrüchigkeit hinaus eine Häufung von spezifischen Translokationen unter Beteiligung der Chromosomen 7 und 14 zwischen den Loci der Immunglobulin- und T-Zellrezeptor-Genen (Weemaes, et al., 1981).

Immundefizienz bei NBS-Patienten

NBS-Patienten zeigen Defizienzen sowohl in der humoralen, als auch in der zellulären Immunantwort. Hieraus resultiert eine erhöhte Anfälligkeit für Infektionen, wobei besonders die Atemwege betroffen sind. Die Immundefizienz lässt sich darauf zurückführen, dass auch physiologisch auftretende DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs) nicht effizient "repariert" werden können. So konnten wir und andere zeigen, dass das *Nbn*-Genprodukt, Nibrin, bei der Maus am Klassenwechsel der Immunglobuline beteiligt ist (Kracker, et al., 2005; Reina-San-Martin, et al., 2005).

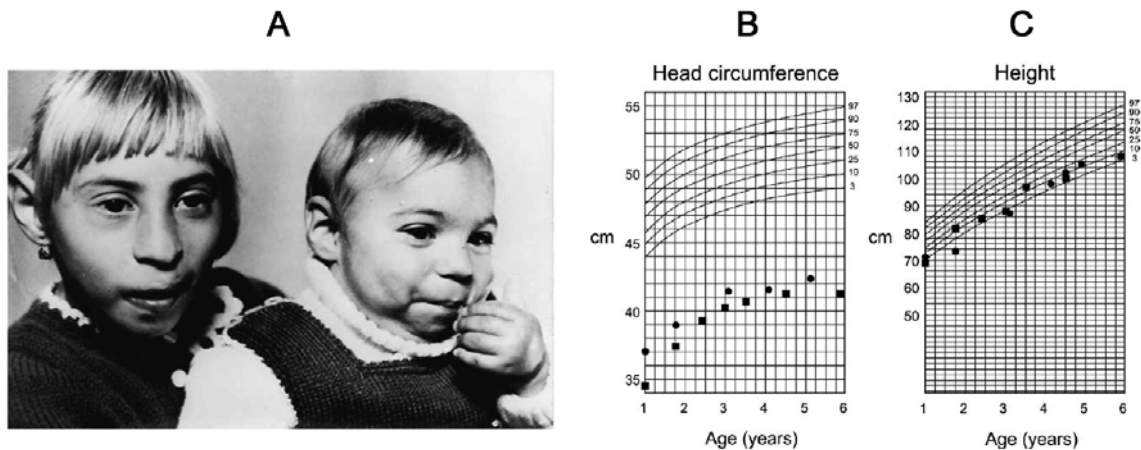


Abbildung 2: Klinische Manifestation des Nijmegen Breakage Syndroms. A: Zwei Brüder (1 und 7 Jahre) mit typischer Gesichtsmorphologie; B und C: Kopfumfang und Körperlänge für zwei weitere männliche NBS-Patienten, aus: Digweed and Sperling, 2004.

Zellzyklus und Apoptose bei NBS-Patientenzellen

NBS-Patientenzellen reagieren auf Röntgenstrahlung nicht mit einer reduzierten DNA-Syntheserate (radioresistant DNA-Synthesis, RDS). Dieser Befund wird einem gestörten Zellzyklus-Kontrollpunkt innerhalb der S-Phase des Zellzyklus zugeschrieben (Chrzanowska, et al., 1995; Kraakman-van der Zwet, et al., 1999; Saar, et al., 1997). Weitere gestörte Kontrollpunkte sind für den Übergang von G1- zur S-Phase (G1/S-Phase Checkpoint) und den Eintritt von der G2-Phase in die Mitose beschrieben (G2/M-Checkpoint) (Lim, et al., 2000; Zhao, et al., 2000). In der Literatur finden sich bezüglich der Zellzykluskontrolle in NBS-Zellen allerdings widersprüchliche Ergebnisse, die durch die Verwendung verschiedener Zelllinien von Mensch und Maus mit unterschiedlichen Mutationen erklärbar sind. Hinzu kommt die generelle Schwierigkeit bei der Untersuchung der Nibrin-Funktion an kultivierten Zellen von NBS-Patienten, da diese ein Nibrin-Fragment mit Restfunktion exprimieren (s.u.). Dieses Problem kann teilweise durch die in jüngerer Zeit generierten induzierbaren NBS-Mausmodelle umgangen werden, da diese die Untersuchung von Zellen und Geweben in Abwesenheit von Nibrin erlauben. So konnten wir zeigen, dass nullmutante Mausfibroblasten nach Behandlung mit Bleomycin einen defekten G2/M-Checkpoint aufweisen (Demuth, et al., 2004). In einer weiteren Analyse von nullmutanten Mauszellen wurde zusätzlich zum gestörten G2/M-Checkpoint ein defekter intra-S-Phase Checkpoint gefunden (Difilippantonio, et al., 2005).

Das Genprodukt des *ATM*-Gens, die ATM-Kinase, ist ein übergeordnetes Protein der DNA-Schadensantwort, das als Reaktion auf die Induktion von DSBs eine Vielzahl von Zielproteinen phosphoryliert und damit in ihrer Aktivität moduliert (Review in Shiloh, 2006). Interessanter Weise zeigen NBS-Patientenzellen eine Störung in der regulären Aktivierung der ATM-Kinase, einem Phänotyp, der besonders deutlich in Nbn-Nullmutanten Mauszellen zu beobachten ist. Letztere zeigen praktisch keine Autophosphorylierung des ATM-Proteins (Serin-1981), sowie keine Phosphorylierung der ATM-Zielproteine Smc1, Chk2 und Brca1 (Difilippantonio, et al., 2005). Die Rolle Nibrins bei der Autophosphorylierung und Aktivierung der ATM-Kinase erklärt die beschriebenen Defizienzen in den Zellzyklus-Checkpoints.

Zur Rolle Nibrins in der Apoptose finden sich in der Literatur ebenfalls kontroverse Angaben und auch hier kann dies auf Verwendung unterschiedlichen Untersuchungsmaterials zurückgeführt werden. Die ATM-Kinase ist in durch Röntgenstrahlung induzierte Apoptose-Pathways involviert. Dies ist der p53-abhängige Weg, der zur transkriptionellen Aktivierung von proapoptotischen Genen führt, oder p53-unabhängig, über die Phosphorylierung von CHK2 und E2F1 (Powers, et al., 2004; Urist, et al., 2004). Im Kontext der Rolle Nibrins bei der Aktivierung von ATM erscheint es angemessen, eine Nibrin-Funktion bei der Apoptose anzunehmen, eine Vermutung die durch jüngere Studien an Mausmodellen bestätigt wurde (Difilippantonio, et al., 2007).

1.4 Mutationen im *NBN*-Gen bilden den Basisdefekt des Nijmegen Breakage Syndroms

Das von zwei Gruppen unabhängig identifizierte *NBN*-Gen kodiert die 754 Aminosäuren des Proteins Nibrin (Carney, et al., 1998; Varon, et al., 1998). Über 90% der bislang analysierten NBS-Patienten sind homozygot für eine 5bp-Deletion, 657del5, die zu einem vorzeitigen Abbruch der Nibrinsynthese führt (Abbildung 2). In Zelllinien von homozygoten und heterozygoten Trägern dieser Mutation konnten zwei mutierte Nibrin-Proteinversionen nachgewiesen werden, das aminoternale 26kD-Fragment (p26-Nibrin) und ein 70kD-Fragment (p70-Nibrin), das den carboxyterminalen Bereich des Wildtyp-Proteins repräsentiert und durch alternative Initiation der Translation, ausgehend von einem kryptischen, stromaufwärts gelegenen, Startkodons gebildet wird. Die Existenz ähnlicher Proteinfragmente ist für zwei weitere *NBN*-Mutationen nachgewiesen, 835del4 und 900del25 (Maser, et al., 2001; Tanzanella, et al., 2003), und wird für die anderen seltenen *NBN*-Mutationen angenommen (Abbildung 2). Diese Daten, zusammen mit Befunden aus Knockout-Mäusen, lassen vermuten, dass Nullmutationen im *NBN*-Gen nicht mit dem Leben vereinbar sind. Zusammen mit den Proteinen Mre11 und Rad50 ist Nibrin Teil eines trimeren

Komplexes (M/R/N-Komplex), der zwischen Hefe und Säugern konserviert ist. Als Antwort auf DNA-Doppelstrangbrüche wird Nibrin an verschiedenen Stellen durch die ATM-Kinase phosphoryliert (Gatei, et al., 2000; Lim, et al., 2000). Nibrin hat daher dem ATM-Protein gegenüber sowohl eine übergeordnete, aktivierende Funktion, als auch untergeordnete Funktion. Diese gegenseitige Abhängigkeit von Nibrin und ATM reflektiert die phänotypische Ähnlichkeit von NBS-Patienten und Patienten mit Ataxia Telangiectasie, einer durch Mutationen im *ATM*-Gen bedingten Krankheit. Die Röntgenstrahlen-induzierte Phosphorylierung Nibrins wird weiterhin durch eine Deacetylase reguliert, SIRT1, die Nibrin in einem hypoacetylierten Status hält, der für eine effiziente Phosphorylierung notwendig ist (Abbildung 2) (Yuan, et al., 2007).

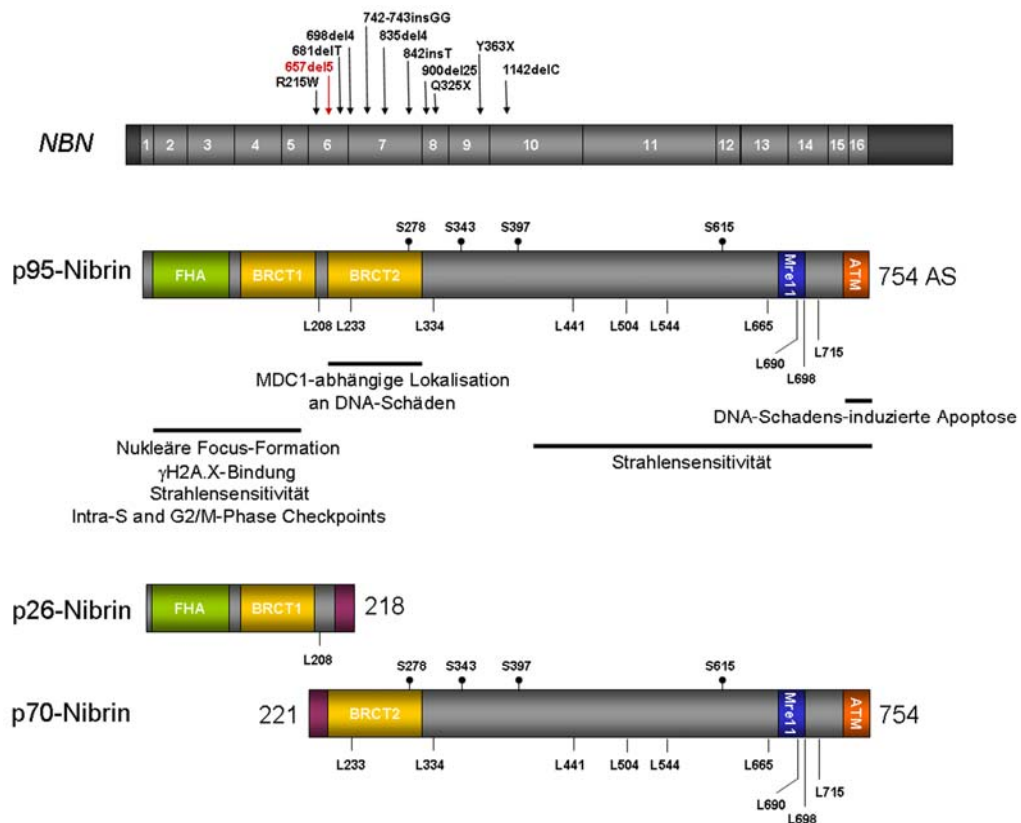


Abbildung 3: Das *NBN*-Gen und sein Produkt, das Nibrin-Protein. Die Exonstruktur des *NBN*-Gens sowie die bislang bei NBS-Patienten gefundenen Mutationen sind angegeben, die häufigste Mutation, 657del5, in rot. Das vollständige Nibrin-Protein mit einem Molekulargewicht von 95kDa in SDS-Gelen und die beiden Proteinfragmente, p26 und p70, die durch die 657del5-Mutation entstehen, sind abgebildet. Die Positionen der Serinreste, die durch ATM phosphoryliert werden und der Lysinreste, die durch die SIRT deacetyliert werden, sind angegeben. Die relativen Positionen verschiedener funktioneller- und Proteininteraktions-Domänen sind eingezeichnet. Die Fragmente p26 und p70 enthalten alternative C-terminale bzw. A-terminale Aminosäuren, deren Position in violett markiert ist. Nach: Demuth and Digweed, 2007.

1.5 Rolle des *NBN*-Gens bei der DNA-Reparatur

Neben der bereits erwähnten Rolle Nibrins bei der Aktivierung der ATM-Kinase im Rahmen der zellulären Antwort auf DNA-Doppelstrangbrüche hat Nibrin zusätzlich Funktionen, die mit der tatsächlichen Reparatur der DNA-Schäden im Zusammenhang stehen. Die Histonvariante H2A.X wird nach DNA-Schädigung durch die ATM-Kinase phosphoryliert. Nibrin bindet spezifisch über seine FHA/BRCT-Domäne an die phosphorylierte Histonvariante, γ H2A.X, und gelangt so in die unmittelbare Umgebung der Schadensstelle. Zusätzlich werden auf diese Weise die beiden anderen Proteine des M/R/N-Komplexes rekrutiert. Nach Untersuchungen von Paull und Gellert bindet ein RAD50-Dimer an die DNA und hält die durch den Doppelstrangbruch entstandenen DNA-Enden zusammen. Das mit RAD50 assoziierte MRE11 kann so seine, durch RAD50 und Nibrin modulierte, Nuklease-Aktivität entfalten (Paull and Gellert, 1999). In welchen der beiden vorherrschenden Doppelstrangbruch-Reparaturwege, Non Homologous End Joining (NHEJ) oder Homologe Rekombination (HR), die so prozessierten DNA-Enden dann eingeschleust werden oder ob beide Wege involviert sind, ist kontrovers (Übersicht in: Zhang, et al., 2006).

1.6 NHEJ1/XLF-Defizienz

Wie bereits weiter oben beschrieben, zeigen Patienten mit Mutationen in unterschiedlichen DNA-Doppelstrangbruch-Reparaturgenen deutliche Überschneidungen im Phänotyp. So präsentieren sich Patienten mit Mutationen im *NHEJ1/XLF/Cernunnos*-Gen mit Wachstumsretardierung, Mikrozephalie, Immunodefizienz und einer erhöhten Sensitivität gegenüber ionisierender Strahlung und damit einer Symptomkombination, die sich auch bei Patienten mit Nijmegen Breakage Syndrom und Ligase IV-Syndrom findet.

Das *NHEJ1/XLF/Cernunnos*-Gen wurde von zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander identifiziert. Buck et al. wählten eine Komplementationsstrategie, bei der sie cDNAs (aus menschlichem Thymusgewebe generiert) in kultivierte Patientenzellen mit NHEJ-Defekt einbrachten. Eine Beteiligung der bislang bekannten NHEJ-Gene am Krankheitsgeschehen wurde zuvor ausgeschlossen. Anschließend wurden Zellen isoliert, die die typische Radiosensitivität verloren hatten (funktionelle Komplementation). Die weitere Analyse ergab, dass die Patientenzellen tatsächlich Mutationen in dem Gen aufwiesen, dass die korrigierende cDNA kodiert, dem *NHEJ1/XLF/Cernunnos*-Gen (Buck, et al., 2006).

Der zweite Weg zur *NHEJ1/XLF/Cernunnos*-Identifizierung führte über die Suche nach Interaktoren des XRCC4-Proteins, einer Kernkomponente des NHEJ-Reparaturweges. Im Yeast-Two-Hybrid-System positive Klone enthielten die *NHEJ1/XLF/Cernunnos*-cDNA. Die Analyse einer Patientenprobe bildete den Nachweis dafür, dass Mutationen im

NHEJ1/XLF/Cernunnos-Gen tatsächlich den Basisdefekt dieser Krankheit bilden (Ahnesorg, et al., 2006).

Bislang sind nur 6 verschiedene Mutationen im *NHEJ1/XLF/Cernunnos*-Gen beschrieben (Abbildung 5), so dass an der Identifizierung weiterer Mutationen in diesem Gen und deren Charakterisierung ein erhebliches wissenschaftliches Interesse besteht.

1.3 Die SNM1-Proteinfamilie

Die Erforschung von DNA-Reparaturprozessen am Bakterium *Escherichia coli* und an der Bäckerhefe *Sacharomyces cerevisiae* hat in der Vergangenheit auch das Verständnis entsprechender Prozesse in Säugerzellen verbessert. Häufig geschah dies durch die Identifizierung von menschlichen Genen mit Sequenzähnlichkeit zu Genen mit bekannter Funktion der genannten Modellorganismen.

Zum besseren Verständnis der Reparatur von DNA-Läsionen vom Typ der DNA-Interstrangvernetzung, wie sie zum Beispiel durch die Behandlung mit einer Kombination aus Psoralen und UV-A-Bestrahlung induziert werden, wurden verschiedene Hefemutanten auf der Grundlage ihrer Überempfindlichkeit gegenüber diesem Mutagen isoliert (Magana-Schwencke, et al., 1982). *pso2*, eine dieser Mutanten, zeigte eine spezifische Überempfindlichkeit gegenüber verschiedenen DNA-Interstrangvernetzenden Agenzien. Das mutierte Gen, *PSO2*, ist vermutlich in einen späten Schritt der Reparatur von DNA-Interstrangvernetzungen involviert, da die Mutanten Hefezellen bezüglich der initialen Inzision der DNA neben der Interstrangvernetzung profizient sind. Die Zellen sind allerdings nicht in der Lage, die nachfolgenden Reparaturschritte zu Wiederherstellung hochmolekularer DNA zu bewerkstelligen (Magana-Schwencke, et al., 1982; Wilborn and Brendel, 1989). Das *PSO2*-Gen kodiert ein 76kDa-Protein mit putativem Zinkfinger-Motiv und einem Kernlokalisierungssignal, was eine Interaktion mit der Kern-DNA nahe legt (Richter, et al., 1992). Das Pso2-Protein gehört zur SNM1-Familie von Proteinen, deren gemeinsames Merkmal zwei Domänen, eine Metallo- β -Lactamase-Region und die β -CASP-Domäne sind. Beim Menschen sind drei Mitglieder dieser Proteinfamilie beschrieben, hSNM1A/KIAA0086, hSNM1C/Artemis und hSNM1B/Apollo.

Das *hSNM1A/KIAA0086*-Gen war das erste beschriebene menschliche Protein mit Sequenzähnlichkeit zum Hefe-Pso2 (Demuth and Digweed, 1998; Nagase, et al., 1995). Embryonale Stammzellen der Maus mit zerstörtem *mSnm1A* zeigen eine zweifach erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Mitomycin C, nicht jedoch gegenüber anderen DNA-Interstrangvernetzenden Agenzien. In indirekten Immunfluoreszenzanalysen zeigte hSNM1A

drei verschiedene nukleäre Lokalisationsmuster. hSNM1A war entweder diffus, in größeren „bodies“ oder in kleineren Foci organisiert, wobei Röntgenbestrahlung oder Mitomycin C-Behandlung den Anteil von Kernen mit Foci deutlich erhöhte. Die Beteiligung von hSNM1 an der zellulären Reaktion auf DNA-Schäden ist darüber hinaus durch Studien an menschlichen Fibroblasten nach siRNA-vermittelter hSNM1A-Depletion belegt, bei denen die Zellen eine erhöhte Sensitivität gegenüber Mitomycin C zeigten (Hemphill, et al., 2008). Nach Untersuchungen von Hazrati und Kollegen handelt es sich bei hSNM1A am ehesten um das funktionelle Homolog des Hefe-Pso2 (Hazrati, et al., 2008).

hSNM1C/Artemis ist das am besten untersuchte Mitglied der SNM1-Familie beim Menschen. Das Artemis-Protein hat Funktionen bei der Prozessierung von DNA-Überhängen und beim Öffnen von DNA-Haarnadelstrukturen wie sie bei der DNA-Reparatur durch NHEJ und bei der V(D)J-Rekombination entstehen (Ma, et al., 2002). In einigen Fällen konnten Mutationen im Artemis-Gen als Ursache für eine schwere kombinierte Immundefizienz in Assoziation mit Radiosensitivität (RS-SCID) identifiziert werden (Moshous, et al., 2001; O'Driscoll, et al., 2004).

Eine Teilsequenz des dritten Mitglieds der SNM1-Familie beim Menschen, hSNM1B/Apollo wurde aufgrund der Ähnlichkeit mit dem Hefe-*PSO2* und dem menschlichen *KIAA0086/hSNM1* beschrieben (Dronkert, et al., 2000). Die Identifizierung des vollständigen *hSNM1B/Apollo*-Gens und dessen funktionelle Charakterisierung ist Teil der vorliegenden Arbeit.

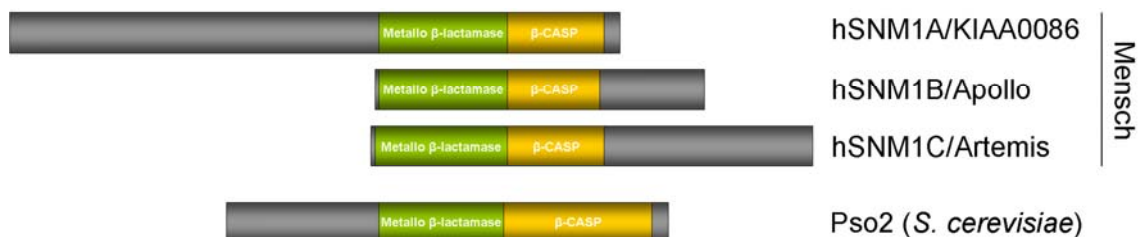


Abbildung 4: Die SNM1-Proteinfamilie. Die relativen Größenverhältnisse sowie die relative Lage der gemeinsamen Domänen Metallo-β-Lactamase und β-CASP sind für die drei menschlichen Proteine hSNM1A/KIAA0086, hSNM1B/Apollo und hSNM1C/Artemis angegeben (nach Hazrati et al., 2008).

2 Eigene Arbeiten

2.1 Untersuchungen zur Nibrin-Funktion am Mausmodell

2.1.1 Ein induzierbares Mausmodell für das Nijmegen-Breakage-Syndrom beweist die essentielle Funktion des *NBN*-Gens

Ilja Demuth, Pierre-Olivier Frappart, Gabriele Hildebrand, Anna Melchers, Stephan Lobitz, Lars Stöckl, Raymonda Varon, Zdenko Herceg, Karl Sperling, Zhao-Qi Wang und Martin Digweed

Hum Mol Genet. 2004 Oct 15;13(20):2385-97

Die hier vorgestellten Arbeiten betreffen die Herstellung und Analyse des ersten induzierbaren Maus-Modells für das Nijmegen Breakage Syndrom (NBS). Die „Knockout“-Maus wurde auf Basis der Lox/Cre-Technologie generiert und erlaubt die Induktion einer homozygoten Mutation im *Nbn*-Gen im lebenden Tier. Dieses Mausmodell ermöglicht die Untersuchung der zellulären DNA-Schadensantwort in Abwesenheit des *Nbn*-Genproduktes, Nibrin.

Die Induktion der homozygoten *Nbn*-Mutation in Interferon-sensitiven Geweben nach poly(I):poly(A)-Injektion war im Knochenmark, im Thymus, in Milz und Leber sehr effizient (>80%). Bei den proliferativen Geweben zeigte sich mit der Zeit eine Reduktion des Anteils von Zellen mit der homozygoten Mutation. So waren z.B. nach 15 Tagen nur noch weniger als 20% der Thymus-Zellen homozygot für die *Nbn*-Mutation, ein klares Indiz für einen Wachstumsnachteil der homozygot mutierten Zellen, von dem die nicht proliferativen Leberzellen nicht bzw. nur wenig betroffen waren. Von der Knockout-Maus abgeleitete Fibroblastenkulturen zeigten ein ähnliches Phänomen. Einen Tag nach Cre-Rekombinase-Behandlung wurde in etwa 75% der Zellen die *Nbn*-Nullmutation induziert, 40 Tage später war der Anteil der homozygoten Zellen auf unter 10% reduziert. Dieser Effekt konnte durch Einbringen einer Wildtyp-*NBN*-cDNA praktisch aufgehoben und durch Einbringen der cDNA mit der häufigsten Patientenmutation, 657del5, stark reduziert werden. Diese Ergebnisse bestätigen die essentielle Rolle Nibrins und zeigen erstmals, dass die Expression des verkürzten Nbn-Proteins ausreicht, um vitale zelluläre Funktionen, zumindest teilweise, wiederherzustellen.

2.1.2 Essentielle *NBN*-Funktion beim Schutz vor Ataxie und cerebellaren Defekten

Frappart PO, Tong WM, Demuth I, Radovanovic I, Herceg Z, Aguzzi A, Digweed M, Wang ZQ

Nature Medicine 2005; 11(5):538-44

Homozygote Nullmutationen im *Nbn*-Gen der Maus sind nicht mit dem Leben vereinbar. Zur Untersuchung der Rolle des *Nbn*-Genproduktes, Nibrin, im zentralen Nervensystem haben wir daher ein Mausmodell generiert (Lox/Cre-System), dass Homozygotie für eine *Nbn*-Nullmutation spezifisch in neuronalen Zellen des zentralen Nervensystems induziert.

Tatsächlich war die Induktion dieser gewebsspezifischen Nullmutation mit dem Leben vereinbar und die Tiere (*Nbn*-CNS-del) zeigten sich zum Zeitpunkt der Geburt ununterscheidbar von den entsprechenden Kontrolltieren (*Nbn*-CNS-ctr). Deutliche Unterschiede zeigten sich jedoch einige Tage später: An Tag 7 nach der Geburt präsentierten sich die *Nbn*-CNS-del-Tiere mit dramatischer Wachstumsretardierung, Fehlsteuerung der Balance, Tremor, verändertem Gang, repetitiven Bewegungen und Bewegungsarmut. Diese und weitere Befunde deuteten auf eine cerebellare Ataxie hin.

Bei makroskopischer Untersuchung der Gehirne von *Nbn*-CNS-del-Mäusen (7-12 Tage nach der Geburt) zeigte sich tatsächlich eine starke Reduktion in der Größe des Cerebellums mit fehlender Foliation. Darüber hinaus war auch das Gesamtgewicht der untersuchten Gehirne signifikant reduziert. Die Untersuchung des proliferativen Potentials von neuronalen Vorläuferzellen ergab, dass die Teilungsrate der Zellen der äußeren externen Granulaschicht zu allen untersuchten Zeitpunkten der Mausentwicklung reduziert war. Postmitotische Neuronen der inneren externen Granulaschicht zeigten deutliche Merkmale apoptotischer Zellen. Die Untersuchung von Neurosphären bestätigte die Befunde bezüglich Proliferation und Apoptose und zeigte zusätzlich, dass diese mutierten Zellen eine, verglichen mit den Kontrollzellen, deutlich erhöhte Chromosomenbrüchigkeit aufwiesen.

Neurosphären die aus 13,5 Tage alten Embryonen gezüchtet wurden zeigten eine ATM-abhängige Aktivierung der Proteine p53 und p21, sehr wahrscheinlich als Reaktion auf die beobachteten Chromosomenschäden. Interessanterweise führte das Einkreuzen homozygoter Mutationen im p53-Gen zu einem Ausbleiben des cerebellaren Phänotyps bei *Nbn*-CNS-del-Tieren, ein weiteres Indiz für die Rolle eines p53-abhängigen Pathways beim Entstehen des beobachteten neurologischen Phänotyps.

2.1.3 Krebs-Inzidenz beim Nijmegen Breakage Syndrom wird durch die Menge eines varianten NBS-Proteins moduliert

Krüger L, Demuth I, Neitzel H, Varon R, Sperling K, Chrzanowska KH, Seemanova E, Digweed M

Carcinogenesis 2007; 28(1):107-11

Die Mehrheit der NBS-Patienten sind homozygot für die Gründermutation 657del5. Die resultierende Proteinvariante, p70-Nibrin, hat, bezogen auf das Wildtyp-Protein, p95-Nibrin, eine überlebenswichtige Restfunktion. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit haben wir die Expression von p70-Nibrin in lymphoblastoiden Zelllinien (LCLs), die von NBS-Patienten etabliert wurden, untersucht. Anschließend wurde nach Zusammenhängen zwischen p70-Expressionsniveau und klinischem Verlauf, der trotz identischer Mutation eine beachtliche Heterogenität zeigt, gesucht.

LCLs von insgesamt 26 verschiedenen Patienten mit homozygoter Gründermutation im *NBN*-Gen wurden in semi-quantitativen Immunopräzipitationen hinsichtlich der relativen p70-Nibrinmenge untersucht. Hierfür wurden spezifisch gegen die Proteine Nibrin und Mre11 (interner Standard) gerichtete Antikörper im jeweils gleichen Ansatz verwendet. Nach Western-Blot wurde die relative p70-Nibrin-Menge densitometrisch und unter Berücksichtigung des internen Standards ermittelt. Nach dieser Untersuchung zeigten sich zum Teil erhebliche Unterschiede in der p70-Nibrin-Menge zwischen den untersuchten LCLs, die von verschiedenen Patienten stammten.

Für alle 26 Patienten existieren umfangreiche klinische Daten, die für einen Abgleich mit den Befunden der relativen p70-Nibrinmenge herangezogen wurden. Interessanterweise stammte die Mehrzahl der untersuchten LCLs mit unterdurchschnittlicher p70-Nibrinmenge von Patienten, die bereits eine maligne Erkrankung entwickelt hatten, während die LCLs mit überdurchschnittlicher p70-Nibrinmenge von kreisfreien Patienten etabliert wurden. Diese Beziehung zwischen dem Auftreten von Krebs bei den NBS-Patienten und der p70-Nibrinmenge in den aus ihrem Blut etablierten LCLs ist statistisch signifikant. Krebs trat signifikant häufiger bei Patienten auf, deren LCLs eine niedrigere p70-Nibrinmenge hatten, wenn dies mit den Patienten mit höherer p70-Nibrinmenge in den LCLs verglichen wurde ($p=0,0152$).

2.1.4 Eine systematische Proteom-Studie bestrahlter DNA-reparaturdefizienter *Nbn*-Mäuse

Anna Melchers, Lars Stöckl, Janina Radszewski, Marco Anders, Harald Krenzlin, Candy Kalischke, Regina Scholz, Andreas Jordan, Grit Nebrich, Joachim Klose, Karl Sperling, Martin Digweed, Ilja Demuth

PLoS ONE 2009; 4(5): e5423

Das zuvor von uns beschriebene konditional nullmutante Mausmodell für das Nijmegen Breakage Syndrom haben wir hier in einer Proteomanalyse untersucht, um Proteine mit modifizierter Expression nach einer Röntgenbestrahlung (4Gy) in Abwesenheit des *Nbn*-Genproduktes, Nibrin, zu identifizieren. Hierfür wurden Proteinextrakte der Leber in zwei Dimensionen elektrophoretisch aufgetrennt, Expressionsunterschiede nach Silberfärbung visuell identifiziert und densitometrisch quantifiziert. Die Identität der differentiell exprimierten Proteine wurde anschließend massenspektroskopisch ermittelt. Insgesamt konnten wir, bei einer Auflösung von etwa 8.000 Proteinen aus den Mauslebern, 209 Proteine identifizieren, die im Vergleich zu entsprechenden Kontrolltieren differentiell exprimiert waren.

Diese Untersuchungen zeigten eine signifikante Veränderung in der Expression von Proteinen die in oxidativen Stress und Aufrechterhaltung der zellulären Redox-Homöostase involviert sind. Gestützt wurden diese Befunde durch die Tatsache, dass wir in *Nbn*-Nullmutanten Mausfibroblasten eine erhöhte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies nach Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen beobachten konnten. Die Veränderungen in der Proteinexpression zeigten auch zeitlich unterschiedliche Verläufe: Während bei den Lebern aus den Kontrolltieren zwei Stunden nach der Bestrahlung das Maximum veränderter Proteinexpression zu verzeichnen war, zeigte sich der entsprechende Höchstwert bei den Tieren nach Induktion der Nullmutation erst zum folgenden Untersuchungszeitpunkt, 24 Stunden nach der Bestrahlung.

Die klinische Variabilität beim Nijmegen Breakage Syndrom ist beachtlich. So konnten wir kürzlich zeigen, dass die Menge an exprimiertem p70-Nibrin mit der Krebshäufigkeit korreliert. Die hier dargestellten Ergebnisse legen nahe, dass Variationen in Genen mit Funktion bei der zellulären Antwort auf oxidativen Stress eine ganz ähnliche Bedeutung auf den Krankheitsverlauf haben könnten. Diese Hypothese kann jetzt, auf der Grundlage unserer Befunde, epidemiologisch an Patientengruppen und tierexperimentell geprüft werden.

2.2 Klinische Variabilität und neue Mutationen im NHEJ1-Gen bei Patienten mit einem Nijmegen Breakage Syndrom-ähnlichem Phänotyp

Véronique Dutrannoy, Ilja Demuth Ulrich Baumann, Detlev Schindler, Kateryna Konrat, Heidemarie Neitzel, Gabriele Gillessen-Kaesbach, Janina Radszewski, Susanne Rothe, Mario Schellenberger, Gudrun Nürnberg, Peter Nürnberg, Keng Wee Teik, Revathy Nallusamy, André Reis, Karl Sperling, Martin Digweed, Raymonda Varon

Human Mutation 2010;in press

Mutationen in Genen mit Beteiligung an der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen führen zu Syndromen mit Ähnlichkeiten im Phänotyp. Konsequenter Weise fanden wir nur bei einem Teil der untersuchten Patienten mit Nijmegen Breakage Syndrom-ähnlichem Phänotyp Mutationen im *NBN*-Gen bzw. in den Genen bereits bekannter DSB-Reparatur-Gene.

Homozygoty mapping und Feinkartierung ermöglichten uns die Lokalisation eines weiteren Genlocus, der mit dem NBS-ähnlichen Phänotyp in Verbindung stand, auf Chromosom 2q35 (Lod score: 2,05) in der Region zwischen den Markern D2S164 und D2S439. Insgesamt sechs Gene innerhalb dieser Region wurden sequenziert und für die in der Kartierung untersuchte Familie als krankheitsverursachend ausgeschlossen.

Kürzlich wurde ein neues Gen, *Cernunnos/XLF/NHEJ1* mit Lokalisation auf Chromosom 2q35 und Funktion bei der DNA-Reparatur identifiziert. Dies veranlasste uns insgesamt 121 Proben von Patienten NBS-ähnlichem Phänotyp, jedoch ohne Mutation in den Genen *NBN* und *LIGIV*, auf Mutationen im *NHEJ1*-Gen zu untersuchen. Die Sequenzanalyse führte bei dem Patienten aus der spanischen Familie, die die beschriebene Kartierung auf Chromosom 2q35 ermöglichte, und einem türkischen Patienten zur Identifizierung homozygoter, bereits beschriebener, Mutationen in Exon 2 (pArg57Gly) bzw. in Exon 5 (p.Arg178X).

Bei je einem deutschen und einem malaysischen Patienten wurde auf einem Allel eine vom jeweiligen Vater vererbte Mutation gefunden, die zum vorzeitigen Kettenabbruch während der Proteinsynthese führt (p.Asp166Argfs20 und p.Arg176X, beide in Exon 4). SNP-Haplotypen-Analyse, quantitative genomische PCR und RT-PCR führten zur Identifizierung der jeweils zweiten Mutation, Deletionen von 1,9kb bzw. 6,9kb. Ein Bruder des deutschen Patienten mit compound heterozygoten *NHEJ1*-Mutationen zeigt im Gegensatz zu seinem Bruder weder Mikrozephalie noch Immundefizienz. Dies ist der bislang erste Hinweis auf klinische Variabilität bei Patienten mit *NHEJ1/XLF*-Defizienz.

2.3 Identifizierung des *hSNM1B/Apollo*-Gens und Aufklärung seiner Funktion in der frühen Antwort auf DNA-Schäden

2.3.1 *hSNM1B/Apollo* wird für die reguläre zelluläre Antwort auf DNA interstrangvernetzende Agenzien und ionisierende Strahlung benötigt

Ilja Demuth, Martin Digweed and Patrick Concannon

Oncogene. 2004 Nov 11;23(53):8611-8

Intensive DNA-Datenbanksuchen und DNA-Sequenzvergleiche ermöglichten uns die Identifizierung von cDNAs des menschlichen *hSNM1B*-Gens, von denen einige ein vollständiges offenes Leseraster für 532 Aminosäuren enthielten. Diese Recherchen basierten auf der Verwendung eines bereits publizierten Teilstücks des *hSNM1B*-Gens, das eine deutliche Sequenzähnlichkeit mit dem *PSO2*-Gen der Bäckerhefe (*Sacharomyces cerevisiae*) zeigte (Dronkert et al., 2000). Nach unseren Untersuchungen wird das *hSNM1B*-Protein durch vier Exons kodiert, die auf genomischer Ebene eine Region von etwa 7kb umfassen und auf Chromosom 1p13.1-13.3 lokalisiert sind. Die Ähnlichkeit zwischen dem *Pso2*-Protein (Hefe), dessen wichtige Rolle bei der DNA-Reparatur bereits bekannt war und dem *hSNM1B/Apollo*-Protein beschränkt sich auf eine aminoterminalen *hSNM1B*-Domäne von 200 Aminosäuren.

Für eine initiale Untersuchung zur Rolle des *hSNM1B/Apollo*-Gens in der zellulären Antwort auf DNA-Schäden wurden transformierte menschliche Fibroblasten (HeLa) mit Hilfe der RNA-Interferenz-Technik (siRNA) für das *hSNM1B/Apollo*-Protein depletiert und anschließend im Hinblick auf ihre Empfindlichkeit gegenüber der Behandlung mit verschiedenen DNA-schädigenden Agenzien getestet. Hierbei zeigte sich eine Überempfindlichkeit gegenüber den DNA-Interstrangvernetzenden Substanzen Mitomycin C (MMC) und Cisplatin, sowie gegenüber ionisierender Strahlung. Darüber hinaus hatten die untersuchten Zellen eine erhöhte Chromosomenbrüchigkeit nach MMC-Behandlung. Damit wies der Phänotyp *hSNM1B/Apollo*-depletierter Zellen Ähnlichkeit mit Zellen von Patienten mit der erblich bedingten Krankheit Fanconi Anämie auf. Die Hypothese einer funktionellen Konservierung zwischen *Pso2* und *hSNM1B/Apollo* konnte, zumindest in Teilaspekten, bestätigt werden.

2.3.2 Endogenes hSNM1B/Apollo interagiert mit TRF2 und stimuliert ATM als Antwort auf ionisierende Strahlung

Ilja Demuth, Paul S. Bradshaw, Anika Lindner, Marco Anders, Stefanie Heinrich, Julia Kallenbach, Karin Schmelz, Martin Digweed, M. Stephen Meyn and Patrick Concannon

DNA Repair (Amst). 2008 Aug 2;7(8):1192-201

Mit dem Ziel, neue Bindungspartner des hSNM1B/Apollo-Proteins zu identifizieren, haben wir verschiedene cDNA-Bibliotheken im Yeast-Two-Hybrid-System durchgemustert. Hierdurch gelang es uns das TRF2-Protein als potentiellen Interaktor des hSNM1B/Apollo-Proteins zu bestimmen. Diese Interaktion konnten wir durch den Einsatz weiterer unabhängiger Methoden (Ko-Immunopräzipitation, indirekte Immunfluoreszenz) bestätigen. TRF2 spielt einige wichtige Rolle beim Aufbau und Schutz der Chromosomenenden (Telomere), eine Funktion, an der hSNM1B/Apollo ebenfalls beteiligt zu sein scheint. Darüber hinaus ist für TRF2 eine Rolle bei der frühen Antwort auf DNA-Schäden belegt, so dass im Kontext unserer vorangegangenen Untersuchungen zur hSNM1B/Apollo-Funktion die weitere Analyse der TRF2-hSNM1B/Apollo-Interaktion im Zusammenhang mit der zellulären DNA-Schadensantwort stand.

Erstmals gelang der Nachweis von endogenen nukleären hSNMB/Apollo-Foci. Diese Foci kolokalisierten in transformierten menschlichen Fibroblasten mit dem TRF2-Protein an den Telomeren. Nach Röntgenbestrahlung bildeten sich zusätzliche, nicht Telomer-lokalisierte, hSNM1B/Apollo-Foci. In Untersuchungen an Fibroblasten mit photoinduzierten DNA-Schäden gelang uns der Nachweis der Anhäufung von hSNM1B/Apollo an den DNA-Schadensorten. In entsprechenden Experimenten an lebenden Zellen war diese Anreicherung schon 10s nach Schadensinduktion nachweisbar und damit eine hSNM1B/Apollo-Funktion in der frühen Antwort auf DNA-Schäden belegt. Die sich hieraus ergebenden Experimente zeigten einen stimulierenden Einfluss von hSNM1B/Apollo auf die Autophosphorylierung und Aktivierung von ATM nach DNA-Schädigung, dem zentralen Protein der zellulären Antwort auf DNA-Schäden vom Typ des Doppelstrangbruchs.

2.3.3 Hinweise für eine hSNM1B/Apollo-Funktion in der HSP70-vermittelten DNA-Schadensantwort

Marco Anders, Jens Mattow, Martin Digweed and Ilja Demuth

Cell Cycle. 2009; 8(11) 1725-32

Das hSNM1B/Apollo-Protein ist sowohl in die zelluläre Antwort auf DNA-Schäden als auch in die Aufrechterhaltung der Chromosomenenden (Telomere) während der S-Phase des Zellzyklus involviert. Hier haben wir eine Technik, die Tandem Affinity Purification (TAP), verwendet, um das hSNM1B/Apollo-Protein mit seinen assoziierten Bindungspartnern aufzureinigen. Die Identifizierung der Bindungspartner erfolgte nach elektrophoretischer Auftrennung und Coomassie-Färbung mittels massenspektroskopischer Analyse. Dieses Vorgehen erlaubte die Identifizierung von HSC70, HSP72, HSP60 und β -Tubulin als neue hSNM1B/Apollo-Interaktoren.

Wir konnten die Interaktion der HSP70-Proteine mit hSNM1B/Apollo in Ko-Immunopräzipitationen bestätigen und zeigen, dass hSNM1B/Apollo mit einem C-terminalen Fragment von HSP72, das der Substratbindungs-Domäne entspricht, interagiert. Die siRNA-vermittelte Depletion des HSP72-Proteins in transformierten menschlichen Fibroblasten resultierte in einer signifikanten Reduktion von hSNM1B/Apollo-Foci, die in indirekten Immunfluoreszenz-Analysen nachweisbaren Anhäufungen des Proteins an den Telomeren entsprechen. Dieser Befund ist ein weiteres starkes Indiz für die physiologische Relevanz der neu beschriebenen hSNM1B/Apollo-HSP70-Proteininteraktion.

Zusätzliche Untersuchungen ergaben, dass hSNM1B/Apollo über seine wichtige Rolle bei der zellulären Antwort auf DNA-Doppelstrangbrüche hinaus auch an der Antwort auf UV-C-Licht-induzierte DNA-Schäden beteiligt ist. Dies wurde in Experimenten an hSNM1B/Apollo-depletierten Zellen deutlich, die eine signifikant reduzierte Phosphorylierung des Zellzyklus-Kontrollpunkt-Proteins CHK1 an Serin 317 nach UV-C-Bestrahlung zeigten. Dieser Befund muss als deutlicher Hinweis dafür gewertet werden, dass hSNM1B/Apollo nicht nur an der regulären Aktivierung von ATM, sondern auch an der Aktivierung von ATR, der zweiten übergeordneten Kinase der DNA-Schadensantwort, beteiligt ist.

3 Diskussion

3.1 Untersuchungen zur Nibrin-Funktion am Mausmodell

Herstellung des induzierbaren Nijmegen Breakage Syndrom-Mausmodells

Die Expression eines C-terminalen Fragmentes des Wildtyp-p95-Nibrins (z.B. p70-Nibrin) ist für NBS-Patienten mit der Gründermutation 657del5 und zweier weiterer Mutationen nachgewiesen und wird für die wenigen Patienten mit anderen Mutationen angenommen. Patienten mit Nullmutationen im *NBN*-Gen sind bislang nicht diagnostiziert worden. Dieser Befund, zusammen mit der Tatsache, dass Nullmutationen im *Nbn*-Gen der Maus nicht mit dem Leben vereinbar sind, führten zu der Hypothese einer Restfunktion der C-terminalen Nibrinfragmente. Vor diesem Hintergrund haben wir ein induzierbares NBS-Mausmodell generiert. Dieses Mausmodell erlaubte erstmals die Untersuchung der Nibrin-Funktion in Abwesenheit von Wildtyp-Nibrin und Nibrin-Fragmenten mit möglicher Restfunktion, sowohl am lebenden Tier als auch *in vitro*.

Essentielle Funktion des NBN-Gens für proliferatives Gewebe

Das verwendete System zur Induktion der *Nbn*-Nullmutation, mit Cre-Rekombinase unter Kontrolle des *Mx1*-Promoters, ermöglicht die Nibrin-Depletion in verschiedenen Geweben mit unterschiedlicher Effizienz nach Injektion von poly(I):poly(C). Ein klarer Befund unserer Untersuchungen ist die essentielle Rolle Nibrins für proliferatives Gewebe wie Knochenmark und Thymus, während das nicht teilungsaktive Lebergewebe, zumindest vorübergehend, ohne Nibrin überlebt. Diese essentielle Nibrin-Funktion zeigte sich auch *in vitro*: nach Induktion der homozygoten *Nbn*-Nullmutation in etwa 75% der Zellen einer Mausfibroblasten-Kultur. Hier erhöhte sich der Anteil der verbliebenen heterozygoten Zellen innerhalb von 40 Tagen auf etwa 95%. Dieser Proliferationsnachteil der nullmutanten Zellen konnte erwartungsgemäß durch den Transfer einer Wildtyp-*NBN*-cDNA vollständig korrigiert werden. Das Übertragen einer *NBN*-cDNA mit der Gründermutation 657del5 führte dagegen zur partiellen Korrektur des Proliferationsnachteils – ein Befund der die Annahme einer Restfunktion für das Proteinfragment p70-Nibrin erstmals belegt. Die Beobachtung, dass der Transfer des menschlichen *NBN*-Gens mit der Gründermutation 657del5 zur Umgehung der Letalität bei homozygot vorliegender *Nbn*-Nullmutation führt (Difilippantonio, et al., 2005) kann als weiterer Beleg für diese Annahme gewertet werden. Ausschließlich hypomorphe

Mutationen finden sich ebenfalls bei Patienten mit Mutationen in den Genen, die für die beiden anderen Proteine des M/R/N-Komplexes kodieren, *Mre11A* und *Rad50* (Delia, et al., 2004; Fernet, et al., 2005; Pitts, et al., 2001; Stewart, et al., 1999; Waltes, et al., 2009). Eine außerordentliche Beeinträchtigung der Zellproliferation haben wir auch nach Induktion der *Nbn*-Nullmutation in neuronalen Zellen des ZNS beobachten können. Insgesamt ist als Ursache für die gestörte Teilungsaktivität folgendes Szenario wahrscheinlich: Spontan auftretende DNA-Doppelstrangbrüche können aufgrund des fehlenden Nibrins nicht repariert werden. Dies führt zur permanenten Aktivierung und Stabilisierung des Tumorsuppressors p53, dessen Wirkung zur Aktivierung von Zellzyklus-Kontrollpunkten (Checkpoints) und damit zur Einstellung der Teilungsaktivität führt. Für alle Teile dieser Abfolge von Ereignissen gibt es experimentelle Belege. Erhöhte spontane Chromosomenbrüchigkeit findet sich in stimulierten T-Lymphozyten von Patienten und auch in unserem und anderen NBS-Mausmodellen (Demuth, et al., 2004; Difilippantonio, et al., 2005; Frappart, et al., 2005; Weemaes, et al., 1981). Die permanente Aktivierung und Stabilisierung von p53 haben wir in *Nbn*-nullmutanten Zellen des ZNS nachgewiesen, ein Befund, der sich auch nach Untersuchung von *Nbn*-nullmutanten B-Zellen ergab (Difilippantonio, et al., 2005). Auch das Zellzyklus-Kontrollprotein p21-Expressionsniveau ist in *Nbn*-nullmutanten ZNS-Zellen erhöht, so dass diese Befunde zusammengenommen als Aktivierung des p53-vermittelten Zellzyklusarrestes interpretiert werden können. Hierfür spricht auch die Beobachtung, dass Mäuse mit Nullmutationen im *Nbn*-Gen (ZNS-spezifisch) und im p53-Gen eine weitgehend normale ZNS-Entwicklung zeigen. Etwas anders stellt sich die Situation nach der Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen in *Nbn*-nullmutanten Zellen dar, da sich hier Störungen in den wichtigen Zellzyklus-Kontrollpunkten der S-Phase und am G2/M-Übergang zeigen (Difilippantonio et al., 2005; Demuth et al., 2004). In kultivierten NBS-Patientenzellen lassen sich entsprechende Beeinträchtigungen dieser Kontrollpunkte nicht eindeutig nachweisen (Antocchia, et al., 1997; Xu, et al., 2002), was vermutlich auf die p70-Nibrin-Restfunktion zurückgeht.

In den letzten Jahren hat sich gezeigt, dass Nibrin eine wichtige Rolle bei der Autophosphorylierung und Aktivierung eines der wichtigsten Moleküle der zellulären Antwort auf DNA-Schäden vom Typ des DSBs, ATM, spielt (Cerosaletti, et al., 2006; Horejsi, et al., 2004; Kitagawa, et al., 2004; Lee and Paull, 2005; Uziel, et al., 2003). Die beschriebenen Defizienzen in der Zellzyklusregulation lassen sich durch diesen Aspekt der Nibrin-Funktion erklären. In umgekehrter Hierarchie wird Nibrin nach DNA-Schädigung durch ATM phosphoryliert. Biallelische Mutationen im *ATM*-Gen führen beim Menschen zur Ataxia Teleangiectasia (AT), einer Krankheit mit deutlichen phänotypischen Ähnlichkeiten zum Nijmegen Breakage Syndrom, beide Krankheiten können den XCIND-Syndromen

zugeordnet werden. In Abgrenzung zum NBS entwickeln AT-Patienten die namensgebende cerebellare Ataxie, ein Phänotyp, den wir interessanterweise bei unserem Mausmodell mit ZNS-spezifischen Nullmutationen im *Nbn*-Gen beobachtet haben und der bei den NBS-Patienten offenbar durch die Restfunktion des p70-Nibrin-Fragmentes verhindert wird.

Grundlage des erhöhten Tumorrisikos bei NBS-Patienten

Das Nijmegen Breakage Syndrom ist mit einem außerordentlich hohen Risiko, eine Krebserkrankung zu entwickeln, verknüpft (Group, 2000; Seemanova, et al., 1985). Dies ist sicher auf die beeinträchtigte Nibrin-Funktion bei DNA-Reparatur und Zellzyklusregulation in den Patientenzellen zurückzuführen. In der Literatur gibt es Hinweise für eine Abhängigkeit der Krebs-Inzidenz von der exprimierten Nibrinmenge. So entwickeln Mäuse mit einer *Nbn*-Nullmutation auf einem Allel mehr Tumore und sterben früher als die entsprechenden Wildtyp-Kontrollmäuse, eine Beobachtung die einem Haploinsuffizienz-Effekt zugeschrieben wird (Dumon-Jones, et al., 2003). Menschen mit der 657del5-Gründermutation im *NBN*-Gen in nur einem Allel (Heterozygote) zeigen ein ähnlich erhöhtes Tumorrisiko (Seemanova, et al., 2007). Darüber hinaus wurden *NBN*-Mutationen bei Patienten mit verschiedenen Tumoren gefunden (Heikkinen, et al., 2006; Varon, et al., 2001). Vor diesem Hintergrund haben wir die Variation in der Expression von p70-Nibrin in Zelllinien (LCLs), die von NBS-Patienten angelegt wurden, untersucht und zum Teil erhebliche Unterschiede festgestellt. Ein Abgleich mit den klinischen Daten der Patienten ergab einen signifikanten Zusammenhang zwischen relativer p70-Nibrin-Menge und dem Risiko ein Lymphom zu entwickeln. Hierbei haben Patienten mit höherem p70-Nibrin-Expressionsniveau ein geringeres Risiko eine maligne Erkrankung zu entwickeln, als Patienten mit geringer Expression dieses Proteinfragmentes. Damit reihen sich diese Ergebnisse in die oben erwähnten Befunde zur *Nbn*-Haploinsuffizienz ein. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist die Grundlage für die Expression unterschiedlicher p70-Nibrin-Mengen in den untersuchten Zelllinien nicht geklärt. In einer Folgeuntersuchung konnten Unterschiede in der *NBN*-mRNA-Menge und im "Nonsense-mediated mRNA decay" als Ursache ausgeschlossen werden, so dass die Modifikation vermutlich auf der Proteinebene (z.B. Translation, Protein-turnover) stattfindet (Lins, et al., 2009).

In unserer systematischen Proteomstudie haben wir Proteine identifiziert, die signifikante Veränderungen in der Expression als Reaktion auf die Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen zeigen. Im Vergleich zu den Kontrollen zeigten sich im untersuchten *Nbn*-nullmutanten Lebergewebe überdurchschnittlich viele Proteine mit Funktion in der zellulären Reaktion auf oxidativen Stress und der Aufrechterhaltung der Redoxhomöostase

in ihrer Expression verändert. Tatsächlich konnten wir in einer unabhängigen Untersuchung an Maus-Fibroblasten eine deutlich erhöhte Menge reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in Nbn-nullmutanten Zellen nach DSB-Induktion messen. Diese erhöhte ROS-Menge geht sicher auf den DNA-Reparaturdefekt in den Nbn-nullmutanten Zellen zurück. Folgeuntersuchungen müssen jetzt klären, ob sich diese Befunde für die NBS-Patientenzellen, vor dem Hintergrund der p70-Nibrin-Restfunktion, bestätigen. Eine Rolle von oxidativem Stress bei der Entstehung verschiedener Krebsarten ist beschrieben (Übersicht in Loft and Poulsen, 1996). Insgesamt weisen unsere Ergebnisse daher auf einen möglichen Zusammenhang zwischen erhöhtem oxidativen Stress und dem außerordentlich hohen Krebsrisiko beim Nijmegen Breakage Syndrom hin. Weitere Untersuchungen werden zeigen, ob Unterschiede in Genen, die die individuelle Antwort auf oxidativen Stress mitbestimmen, einen ähnlichen Einfluss auf den Krankheitsverlauf haben, wie die beschriebenen Unterschiede in der p70-Nibrin-Menge. Für die verwandte Erkrankung Ataxia Telangiectasia ist eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber oxidativem Stress (Yi, et al., 1990) und eine reduzierte Antioxidanz-Aktivität bereits beschrieben. Eine bessere Kontrolle der ROS-Level als Teil der Therapie von AT-Patienten wird daher empfohlen (Reichenbach, et al., 2002) und sollte möglicherweise auch für NBS-Patienten in Erwägung gezogen werden.

3.2 NHEJ1/XLF-Defizienz: Klinische Variabilität und neue Mutationen

Die Mutationsanalyse an Proben von insgesamt 121 Patienten mit NBS-ähnlichem Phänotyp und ohne Mutation in den Genen *NBN* und *LIGIV* führte zur Identifizierung von sechs *NHEJ1*-Mutationen in 4 Familien. Von diesen Mutationen waren vier bislang noch nicht beschrieben, so dass sich die Anzahl der bekannten *NHEJ1*-Genmutationen auf zehn erhöht (Abbildung 5). Größere genomische Deletionen, wie wir sie bei zwei Patienten fanden, waren für Patienten mit *NHEJ1*-Defizienz noch unbekannt. An den Bruchpunkten konnten wir bei beiden Patienten kurze repetitive Elemente identifizieren, die im Zusammenhang mit der Entstehung von Deletionen beschrieben sind (Chen, et al., 2005; Efstratiadis, et al., 1980; Magnani, et al., 1996).

Die beiden compound heterozygoten Brüder der betroffenen deutschen Familie zeigen einen ganz unterschiedlichen Krankheitsverlauf. Während der ältere Bruder zum Zeitpunkt der Diagnose mit Immundefizienz und Mikrozephalie klassische Merkmale einer DNA-Doppelstrangbruch-Reparaturdefizienz aufweist, war der jüngere Bruder, abgesehen von einer leichten Lymphopenie während einer Episode aufeinander folgender Infektionen kurz nach der Geburt, klinisch gesund. Allerdings zeigen beide auf zellulärer Ebene eine

ausgeprägte Strahlensensitivität. Es handelt sich, wohl auch wegen der wenigen bislang bekannten Patienten, um die erste Beschreibung klinischer Heterogenität bei NHEJ1/XLF-Defizienz überhaupt, die hier sogar intrafamiliär beobachtet wurde. In der Literatur gibt es eine ganze Reihe von Beispielen, bei denen klinische Heterogenität bei Trägern der gleichen Mutationen auftrat. Intrafamiliäre klinische Heterogenität haben wir auch bei der Fanconi Anämie, einem anderen Syndrom mit DNA-Reparaturdefizienz, beobachtet (Demuth, et al., 2000).

Untersuchungen zur NHEJ1-Proteinexpression ergaben keine Hinweise auf die Existenz von NHEJ1-Fragmenten in Zelllinien, die von Patienten angelegt wurden. Allerdings existieren mögliche Startpunkte alternativer Translation der mRNA, so dass die Expression von NHEJ1-Proteinvarianten mit Restfunktion nicht ausgeschlossen werden kann. Sollte es tatsächlich gelingen, solche Fragmente nachzuweisen, kämen, ähnlich wie beim Nijmegen Breakage Syndrom, Unterschiede in der Proteinmenge dieser verkürzten NHEJ1-Variante(n) als Erklärung für die beobachtete klinische Heterogenität infrage. Darüber hinaus müssen auch andere (genetisch bedingte) modifizierende Faktoren in Betracht gezogen werden.

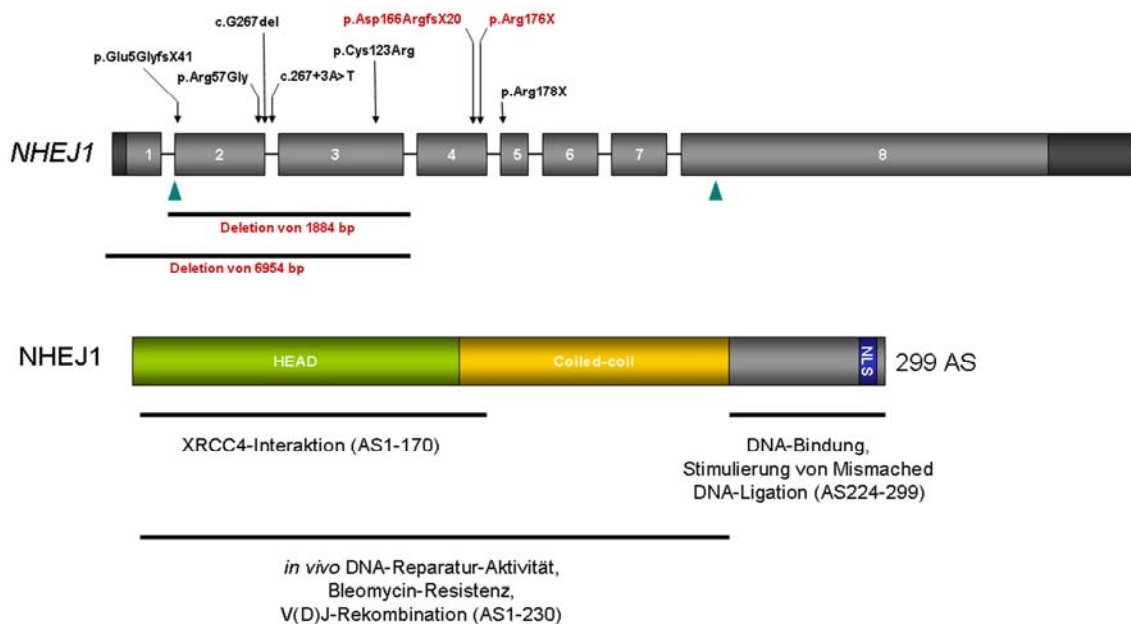


Abbildung 5: Die Exonstruktur des *NHEJ1*-Gens sowie die bislang bei Patienten mit NHEJ1/XLF-Defizienz gefundenen Mutationen sind angegeben. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit identifizierte neuen Mutationen sind rot hervorgehoben. Darunter ist das NHEJ1-Protein mit den relativen Positionen verschiedener funktioneller- und Proteininteraktions-Domänen dargestellt. Die grünen Dreiecke markieren die Position von Start- und Stopkodon für die reguläre Translation der *NHEJ1*-mRNA. NLS, Kernlokalisierungssignal.

3.3 Untersuchungen zur hSNM1B/Apollo-Funktion

Eine Kombination aus Datenbankanalysen und molekularbiologischen Untersuchungen erlaubte uns die Identifizierung einer vollständigen hSNM1B/Apollo-cDNA, sowie einer verkürzten Spleißvariante, auf der Grundlage von Ähnlichkeiten zum *PSO2*-Gen der Hefe (*S. cerevisiae*). Damit ist hSNM1B/Apollo eines von mindestens drei Mitgliedern der SNM1-Proteinfamilie beim Menschen. Unsere Befunde zur Sensitivität von hSNM1B/Apollo-depletierten Zellen (siRNA) gegenüber ionisierender Strahlung, Mitomycin C und Cisplatin bestätigten unsere Hypothese einer im Verlauf der Evolution konservierten Funktion in der zellulären Antwort auf DNA-Schäden.

Identifizierung der hSNM1B/Apollo-Bindungspartnern TRF2 und HSP70

Mit dem Ziel die Position des hSNM1B/Apollo-Proteins im Netzwerk der zellulären DNA-Schadensantwort genauer zu bestimmen, haben wir das Yeast-Two-Hybrid-System und die Tandem-Affinity-Purification als Screeningverfahren zur Identifizierung von direkten hSNM1B/Apollo-Interaktoren eingesetzt. Aus der Gruppe der so bestimmten potentiellen Bindungspartner wurden TRF2 und die HSP70-Proteine mit unabhängigen Methoden als hSNM1B/Apollo-Interaktoren bestätigt.

TRF2 ist eines von insgesamt sechs Core-Proteinen die den Shelterin-Komplex zum Schutz der Chromosomenenden, der Telomere, bilden (Übersicht in de Lange, 2005). Inzwischen konnten verschiedene Gruppen zeigen, dass hSNM1B/Apollo als Shelterin-akzessorischer Faktor eine Rolle beim Schutz der Telomere während der Replikation spielt. Die Exonuklease-Aktivität von hSNM1B/Apollo könnte hierbei eine wichtige Funktion haben. Darüber hinaus hilft hSNM1B/Apollo dabei, die Telomere vor Erkennung als DSB zu schützen und entsprechend prozessiert zu werden (Lenain, et al., 2006; van Overbeek and de Lange, 2006).

Aufgrund unserer vorhergehenden Befunde zur Empfindlichkeit von hSNM1B/Apollo-depletierten Zellen gegenüber verschiedenen Mutagenen und der Tatsache, dass für TRF2 auch eine Rolle in der DNA-Schadensabwehr beschrieben ist (Bradshaw, et al., 2005), haben wir die hSNM1B/Apollo-Funktion in der zellulären Antwort auf DNA-Schäden intensiv untersucht. Tatsächlich zeigte sich, dass hSNM1B/Apollo, ähnlich wie TRF2, sehr früh an den DNA-Schadensorten akkumuliert. Dass dies ATM-unabhängig geschieht, passt zu dem Befund einer stimulierenden hSNM1B/Apollo-Rolle bei der Autophosphorylierung und Aktivierung von ATM, des übergeordneten Moleküls der zellulären Antwort auf DNA-Doppelstrangbrüche. Auch hier gibt es Parallelen zur TRF2-Funktion, die allerdings einen

hemmenden Einfluss auf die ATM-Aktivität zeigt (Karlseder, et al., 2004). Wie diese ATM-stimulierenden- und hemmenden Aktivitäten genau erfolgen, ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch unbekannt. Einen Hinweis darauf, dass hSNM1B auch eine Rolle bei der Aktivierung von ATR, dem zentralen Kontrollmolekül der zellulären Antwort auf Blockierung der Replikation durch DNA-Schäden (z.B. UV-Schäden und DNA-Interstrang-Crosslinks), spielt, ergab sich mit unseren Befunden zur reduzierten CHK1-Phosphorylierung nach UV-C-Bestrahlung. Damit könnte hSNM1B/Apollo in die Aktivierung beider zentraler und übergeordneter Moleküle der DNA-Schadensabwehr, ATM und ATR, involviert sein. Eine weitere Untersuchung dieses Aspektes der hSNM1B/Apollo-Funktion scheint geboten, auch weil sich hier möglicherweise klinisch relevante Perspektiven im Hinblick auf eine neue Strategie in der Krebsbehandlung ergeben könnten.

In diesem Zusammenhang ist auch die Identifikation der HSP70-Proteine als hSNM1B/Apollo-Interaktoren hochinteressant. Zu den beobachteten Phänotypen nach HSP70-knockout in Mauszellen bzw. siRNA-vermittelter Depletion in menschlichen Zellkulturzellen gehört: Überempfindlichkeit gegenüber ionisierender Strahlung, erhöhte Frequenz von Telomerefusionen, reduzierte Phosphorylierung der Histonvariante H2A.X nach ionisierender Strahlung und ein Defekt in der Phosphorylierung und Aktivierung der Proteinkinase CHK1 (Gabai, et al., 2008; Hunt, et al., 2004; Hunt, et al., 2007). Unsere Befunde legen die Vermutung nahe, dass diese Merkmale HSP70-defizienter Zellen auf nicht ausreichend zur Verfügung stehendes funktionelles hSNM1B/Apollo zurückgeht, an dessen Bereitstellung die HSP70-Proteine maßgeblich beteiligt sind. Hitzeschockproteine sind in verschiedensten Aspekten von Krebs, wie Resistenz gegenüber Chemotherapeutika, Invasivität und Krankheitsprognose, involviert. So sind einige der HSP70-Proteine in Tumoren überexprimiert, mit Folgen für das Zellüberleben. In Prostatakarzinomzellen verleiht die erhöhte HSP72-Expression beispielsweise Resistenz gegenüber verschiedenen, in der Tumorthapie eingesetzten, Agenzien (z.B. Cisplatin, Vinblastin und Taxol) sowie ionisierender Strahlung (Gabai, et al., 2005). Konsequenterweise sind die Hitzeschockproteine Ziel vieler versprechender Antikrebs-Strategien (Rohde, et al., 2005). Bezogen auf die HSP70-Proteine stellt sich allerdings eine besondere Herausforderung, da in *in vitro*-Experimenten eine HSP70-Depletion mit massivem Zellsterben einherging (Rohde, et al., 2005). Diese Toxizität ist wohl im Zusammenhang mit der generellen Chaperon-Funktion der HSP70-Proteine zu sehen. Die Evaluation von hSNM1B/Apollo als Angriffspunkt in der Krebstherapie könnte hier eine Alternative aufzeigen.

Bislang ist keine Krankheit mit Mutationen im *hSNM1B/Apollo*-Gen verknüpft. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit beschriebenen hSNM1B/Apollo-Funktionen bei der zellulären Reaktion auf DNA-Schäden machen *hSNM1B/Apollo* jedoch zu einem Kandidatengen für Krankheiten mit Ähnlichkeiten zum Nijmegen Breakage Syndrom und zur

Fanconi Anämie. Die umfangreiche Suche nach hSNM1B/Apollo-Mutationen bei entsprechenden Patienten ohne Mutation in den bislang mit diesen Krankheiten verknüpften Genen verlief ergebnislos, schließt jedoch die Identifizierung solcher Mutationen für die Zukunft nicht aus.

4 Zusammenfassung

Alle lebenden Organismen verfügen über ein Netzwerk von Proteinen, das eine effiziente Erkennung und Reparatur von DNA-Schäden gewährleistet. Mutationen in den zugrunde liegenden Genen sind mit schwerwiegenden Krankheiten des Menschen verknüpft. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten genetisch bedingten Krankheiten Nijmegen Breakage Syndrom (NBS) und NHEJ1/XLF-Defizienz gehen auf Defekte in der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen zurück.

Über 90% der NBS-Patienten sind homozygote Träger der Gründermutation 657del5 im *NBN*-Gen, die zur Expression eines varianten Genproduktes, p70-Nibrin, führt. Das von uns generierte NBS-Mausmodell erlaubte erstmals *in vivo* Untersuchungen in Abwesenheit von Nibrin und ermöglichte uns den Nachweis einer Restfunktion von p70-Nibrin, die bislang nur vermutet wurde. Zwei wichtige Befunde unserer Untersuchungen sind im Zusammenhang mit dem erhöhten Tumorrisiko von NBS-Patienten und auch von heterozygoten Trägern einer *NBN*-Mutation zu sehen: Die p70-Nibrinmenge in Zelllinien (LCLs), die von NBS-Patienten angelegt wurden, steht in signifikantem Zusammenhang mit der Inzidenz von Lymphomen. Eine umfassende Proteomstudie, wiederum an unserem NBS-Mausmodell, zeigte eine überdurchschnittliche häufige Veränderung der Expression von Proteinen mit Funktion in der Redoxhomöostase in Abwesenheit von Nibrin als Reaktion auf ionisierende Bestrahlung. Entsprechende Untersuchungen an bestrahlten Zellkulturzellen bestätigten erhöhte Mengen von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) als Folge fehlenden Nibrins. Auf die mögliche klinische Relevanz dieses Befundes bezüglich einer besseren Kontrolle des ROS-Levels bei Patienten wird hingewiesen.

Eine Mutationsanalyse an Proben von insgesamt 121 Patienten mit NBS-ähnlichem Phänotyp führte zur Identifizierung von vier bislang nicht beschriebenen Mutationen im *NHEJ1*-Gen. Von zwei compound heterozygote Brüdern mit NHEJ1/XLF-Defizienz zeigte einer einen schweren Krankheitsverlauf, während der andere klinisch nahezu unauffällig war. In ersten Untersuchungen zur NHEJ1-Expression in Patientenzellen konnten keine Hinweise auf die Ursache dieser, für die NHEJ1/XLF-Defizienz erstmals beschriebene klinische Heterogenität, die hier sogar intrafamiliär vorliegt, gefunden werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das *hSNM1B/Apollo*-Gen, basierend auf seiner strukturellen Ähnlichkeit mit dem *PSO2*-Gen der Hefe (*S. cerevisiae*), identifiziert und nachfolgend in seiner Funktion charakterisiert. Mutationen in diesem Gen sind bislang nicht mit einer Krankheit beim Menschen verknüpft. Eine umfassende Analyse des Phänotyps

verschiedener Zelllinien nach hSNM1B/Apollo-Depletion (siRNA), zusammen mit der Identifizierung von TRF2 und den HSP70-Proteinen als direkte hSNM1B/Apollo-Interaktoren, resultierte in der Etablierung von hSNM1B/Apollo als Molekül der frühen Antwort auf DNA-Schäden. hSNM1B/Apollo stimuliert die Autophosphorylierung und Aktivierung des zentralen Moleküls der zellulären Reaktionen auf DNA-Doppelstrangbrüche, ATM, und möglicherweise des entsprechenden Aktivators der zellulären Antwort auf eine Blockierung der Replikation durch DNA-Schäden, ATR.

5 Literaturverzeichnis

- Ahnesorg P, Smith P, Jackson SP. 2006. XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining. *Cell* 124(2):301-13.
- Antoccia A, Ricordy R, Maraschio P, Prudente S, Tanzarella C. 1997. Chromosomal sensitivity to clastogenic agents and cell cycle perturbations in Nijmegen breakage syndrome lymphoblastoid cell lines. *Int J Radiat Biol* 71(1):41-9.
- Baumann P, Benson FE, West SC. 1996. Human Rad51 protein promotes ATP-dependent homologous pairing and strand transfer reactions in vitro. *Cell* 87(4):757-66.
- Bliss TM, Lane DP. 1997. Ku selectively transfers between DNA molecules with homologous ends. *J Biol Chem* 272(9):5765-73.
- Bradshaw PS, Stavropoulos DJ, Meyn MS. 2005. Human telomeric protein TRF2 associates with genomic double-strand breaks as an early response to DNA damage. *Nat Genet* 37(2):193-7.
- Buck D, Malivert L, de Chasseval R, Barraud A, Fondaneche MC, Sanal O, Plebani A, Stephan JL, Hufnagel M, le Deist F and others. 2006. Cernunnos, a novel nonhomologous end-joining factor, is mutated in human immunodeficiency with microcephaly. *Cell* 124(2):287-99.
- Carney JP, Maser RS, Olivares H, Davis EM, Le Beau M, Yates JR, 3rd, Hays L, Morgan WF, Petrini JH. 1998. The hMre11/hRad50 protein complex and Nijmegen breakage syndrome: linkage of double-strand break repair to the cellular DNA damage response. *Cell* 93(3):477-86.
- Cerosaletti K, Wright J, Concannon P. 2006. Active role for nibrin in the kinetics of atm activation. *Mol Cell Biol* 26(5):1691-9.
- Chen JM, Chuzhanova N, Stenson PD, Ferec C, Cooper DN. 2005. Complex gene rearrangements caused by serial replication slippage. *Hum Mutat* 26(2):125-34.
- Chrzanowska KH, Kleijer WJ, Krajewska-Walasek M, Bialecka M, Gutkowska A, Goryluk-Kozakiewicz B, Michalkiewicz J, Stachowski J, Gregorek H, Lyson-Wojciechowska G and others. 1995. Eleven Polish patients with microcephaly, immunodeficiency, and chromosomal instability: the Nijmegen breakage syndrome. *Am J Med Genet* 57(3):462-71.
- de Lange T. 2005. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev* 19(18):2100-10.
- de Vries E, van Driel W, Bergsma WG, Arnberg AC, van der Vliet PC. 1989. HeLa nuclear protein recognizing DNA termini and translocating on DNA forming a regular DNA-multimeric protein complex. *J Mol Biol* 208(1):65-78.
- DeFazio LG, Stansel RM, Griffith JD, Chu G. 2002. Synapsis of DNA ends by DNA-dependent protein kinase. *Embo J* 21(12):3192-200.
- Delia D, Piane M, Buscemi G, Savio C, Palmeri S, Lulli P, Carlessi L, Fontanella E, Chessa L. 2004. MRE11 mutations and impaired ATM-dependent responses in an Italian family with ataxia-telangiectasia-like disorder. *Hum Mol Genet* 13(18):2155-63.
- Demuth I, Digweed M. 1998. Genomic organization of a potential human DNA-crosslink repair gene, KIAA0086. *Mutat Res* 409(1):11-6.

- Demuth I, Frappart PO, Hildebrand G, Melchers A, Lobitz S, Stockl L, Varon R, Herceg Z, Sperling K, Wang ZQ and others. 2004. 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(20):2385-97.
- Demuth I, Wlodarski M, Tipping AJ, Morgan NV, de Winter JP, Thiel M, Grasl S, Schindler D, D'Andrea AD, Altay C and others. 2000. Spectrum of mutations in the Fanconi anaemia group G gene, FANCG/XRCC9. *Eur J Hum Genet* 8(11):861-8.
- Difilippantonio S, Celeste A, Fernandez-Capetillo O, Chen HT, Reina San Martin B, Van Laethem F, Yang YP, Petukhova GV, Eckhaus M, Feigenbaum L and others. 2005. Role of Nbs1 in the activation of the Atm kinase revealed in humanized mouse models. *Nat Cell Biol* 7(7):675-85.
- Difilippantonio S, Celeste A, Kruhlak MJ, Lee Y, Difilippantonio MJ, Feigenbaum L, Jackson SP, McKinnon PJ, Nussenzweig A. 2007. Distinct domains in Nbs1 regulate irradiation-induced checkpoints and apoptosis. *J Exp Med* 204(5):1003-11.
- Digweed M, Sperling K. 2004. Nijmegen breakage syndrome: clinical manifestation of defective response to DNA double-strand breaks. *DNA Repair (Amst)* 3(8-9):1207-17.
- Dronkert ML, de Wit J, Boeve M, Vasconcelos ML, van Steeg H, Tan TL, Hoesjmakers JH, Kanaar R. 2000. Disruption of mouse SNM1 causes increased sensitivity to the DNA interstrand cross-linking agent mitomycin C. *Mol Cell Biol* 20(13):4553-61.
- Dumon-Jones V, Frappart PO, Tong WM, Sajithlal G, Hulla W, Schmid G, Herceg Z, Digweed M, Wang ZQ. 2003. Nbn heterozygosity renders mice susceptible to tumor formation and ionizing radiation-induced tumorigenesis. *Cancer Res* 63(21):7263-9.
- Efstratiadis A, Posakony JW, Maniatis T, Lawn RM, O'Connell C, Spritz RA, DeRiel JK, Forget BG, Weissman SM, Slightom JL and others. 1980. The structure and evolution of the human beta-globin gene family. *Cell* 21(3):653-68.
- Fernet M, Gribaa M, Salih MA, Seidahmed MZ, Hall J, Koenig M. 2005. Identification and functional consequences of a novel MRE11 mutation affecting 10 Saudi Arabian patients with the ataxia telangiectasia-like disorder. *Hum Mol Genet* 14(2):307-18.
- Frappart PO, Tong WM, Demuth I, Radovanovic I, Herceg Z, Aguzzi A, Digweed M, Wang ZQ. 2005. An essential function for NBS1 in the prevention of ataxia and cerebellar defects. *Nat Med* 11(5):538-44.
- Gabai VL, Budagova KR, Sherman MY. 2005. Increased expression of the major heat shock protein Hsp72 in human prostate carcinoma cells is dispensable for their viability but confers resistance to a variety of anticancer agents. *Oncogene* 24(20):3328-38.
- Gabai VL, O'Callaghan-Sunol C, Meng L, Sherman MY, Yaglom J. 2008. Triggering senescence programs suppresses Chk1 kinase and sensitizes cells to genotoxic stresses. *Cancer Res* 68(6):1834-42.
- Gatei M, Young D, Cerosaletti KM, Desai-Mehta A, Spring K, Kozlov S, Lavin MF, Gatti RA, Concannon P, Khanna K. 2000. ATM-dependent phosphorylation of nibrin in response to radiation exposure. *Nat Genet* 25(1):115-9.
- Gatti RA, Boder E, Good RA. 2007. Immunodeficiency, radiosensitivity, and the XCIND syndrome. *Immunol Res* 38(1-3):87-101.
- Group TINBSS. 2000. Nijmegen breakage syndrome. The International Nijmegen Breakage Syndrome Study Group. *Arch Dis Child* 82(5):400-6.
- Hazrati A, Ramis-Castellort M, Sarkar S, Barber LJ, Schofield CJ, Hartley JA, McHugh PJ. 2008. Human SNM1A suppresses the DNA repair defects of yeast pso2 mutants. *DNA Repair (Amst)* 7(2):230-8.

- Heikkinen K, Rapakko K, Karppinen SM, Erkkö H, Knuutila S, Lundan T, Mannermaa A, Borresen-Dale AL, Borg A, Barkardottir RB and others. 2006. RAD50 and NBS1 are breast cancer susceptibility genes associated with genomic instability. *Carcinogenesis* 27(8):1593-9.
- Hemphill AW, Bruun D, Thrun L, Akkari Y, Torimaru Y, Hejna K, Jakobs PM, Hejna J, Jones S, Olson SB and others. 2008. Mammalian SNM1 is required for genome stability. *Mol Genet Metab* 94(1):38-45.
- Hentges P, Ahnesorg P, Pitcher RS, Bruce CK, Kysela B, Green AJ, Bianchi J, Wilson TE, Jackson SP, Doherty AJ. 2006. Evolutionary and functional conservation of the DNA non-homologous end-joining protein, XLF/Cernunnos. *J Biol Chem* 281(49):37517-26.
- Horejsi Z, Falck J, Bakkenist CJ, Kastan MB, Lukas J, Bartek J. 2004. Distinct functional domains of Nbs1 modulate the timing and magnitude of ATM activation after low doses of ionizing radiation. *Oncogene* 23(17):3122-7.
- Hunt CR, Dix DJ, Sharma GG, Pandita RK, Gupta A, Funk M, Pandita TK. 2004. Genomic instability and enhanced radiosensitivity in Hsp70.1- and Hsp70.3-deficient mice. *Mol Cell Biol* 24(2):899-911.
- Hunt CR, Pandita RK, Laszlo A, Higashikubo R, Agarwal M, Kitamura T, Gupta A, Rief N, Horikoshi N, Baskaran R and others. 2007. Hyperthermia activates a subset of ataxia-telangiectasia mutated effectors independent of DNA strand breaks and heat shock protein 70 status. *Cancer Res* 67(7):3010-7.
- Jackson SP. 2009. The DNA-damage response: new molecular insights and new approaches to cancer therapy. *Biochem Soc Trans* 37(Pt 3):483-94.
- Kanaar R, Hoeijmakers JH, van Gent DC. 1998. Molecular mechanisms of DNA double strand break repair. *Trends Cell Biol* 8(12):483-9.
- Karlseder J, Hoke K, Mirzoeva OK, Bakkenist C, Kastan MB, Petrini JH, de Lange T. 2004. The telomeric protein TRF2 binds the ATM kinase and can inhibit the ATM-dependent DNA damage response. *PLoS Biol* 2(8):E240.
- Khanna KK, Jackson SP. 2001. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet* 27(3):247-54.
- Kitagawa R, Bakkenist CJ, McKinnon PJ, Kastan MB. 2004. Phosphorylation of SMC1 is a critical downstream event in the ATM-NBS1-BRCA1 pathway. *Genes Dev* 18(12):1423-38.
- Kraakman-van der Zwet M, Overkamp WJ, Friedl AA, Klein B, Verhaegh GW, Jaspers NG, Midro AT, Eckardt-Schupp F, Lohman PH, Zdzienicka MZ. 1999. immortalization and characterization of Nijmegen Breakage syndrome fibroblasts. *Mutat Res* 434(1):17-27.
- Kracker S, Bergmann Y, Demuth I, Frappart PO, Hildebrand G, Christine R, Wang ZQ, Sperling K, Digweed M, Radbruch A. 2005. Nibrin functions in Ig class-switch recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(5):1584-9.
- Kruger L, Demuth I, Neitzel H, Varon R, Sperling K, Chrzanowska KH, Seemanova E, Digweed M. 2007. Cancer incidence in Nijmegen breakage syndrome is modulated by the amount of a variant NBS protein. *Carcinogenesis* 28(1):107-11.
- Lee JH, Paull TT. 2005. ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science* 308(5721):551-4.
- Lenain C, Bauwens S, Amiard S, Brunori M, Giraud-Panis MJ, Gilson E. 2006. The Apollo 5' exonuclease functions together with TRF2 to protect telomeres from DNA repair. *Curr Biol* 16(13):1303-10.

- Liang F, Jasin M. 1996. Ku80-deficient cells exhibit excess degradation of extrachromosomal DNA. *J Biol Chem* 271(24):14405-11.
- Lim DS, Kim ST, Xu B, Maser RS, Lin J, Petrini JH, Kastan MB. 2000. ATM phosphorylates p95/nbs1 in an S-phase checkpoint pathway. *Nature* 404(6778):613-7.
- Lins S, Kim R, Kruger L, Chrzanowska KH, Seemanova E, Digweed M. 2009. Clinical variability and expression of the NBN c.657del5 allele in Nijmegen Breakage Syndrome. *Gene* 447(1):12-7.
- Loft S, Poulsen HE. 1996. Cancer risk and oxidative DNA damage in man. *J Mol Med* 74(6):297-312.
- Ma Y, Pannicke U, Schwarz K, Lieber MR. 2002. Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell* 108(6):781-94.
- Magana-Schwencke N, Henriques JA, Chanet R, Moustacchi E. 1982. The fate of 8-methoxypsoralen photoinduced crosslinks in nuclear and mitochondrial yeast DNA: comparison of wild-type and repair-deficient strains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79(6):1722-6.
- Magnani C, Cremonesi L, Giunta A, Magnaghi P, Taramelli R, Ferrari M. 1996. Short direct repeats at the breakpoints of a novel large deletion in the CFTR gene suggest a likely slipped mispairing mechanism. *Hum Genet* 98(1):102-8.
- Maser RS, Zinkel R, Petrini JH. 2001. An alternative mode of translation permits production of a variant NBS1 protein from the common Nijmegen breakage syndrome allele. *Nat Genet* 27(4):417-21.
- Moshous D, Callebaut I, de Chasseval R, Corneo B, Cavazzana-Calvo M, Le Deist F, Tezcan I, Sanal O, Bertrand Y, Philippe N and others. 2001. Artemis, a novel DNA double-strand break repair/V(D)J recombination protein, is mutated in human severe combined immune deficiency. *Cell* 105(2):177-86.
- Nagase T, Miyajima N, Tanaka A, Sazuka T, Seki N, Sato S, Tabata S, Ishikawa K, Kawarabayasi Y, Kotani H and others. 1995. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. III. The coding sequences of 40 new genes (KIAA0081-KIAA0120) deduced by analysis of cDNA clones from human cell line KG-1 (supplement). *DNA Res* 2(1):51-9.
- O'Driscoll M, Gennery AR, Seidel J, Concannon P, Jeggo PA. 2004. An overview of three new disorders associated with genetic instability: LIG4 syndrome, RS-SCID and ATR-Seckel syndrome. *DNA Repair (Amst)* 3(8-9):1227-35.
- Paull TT, Gellert M. 1999. Nbs1 potentiates ATP-driven DNA unwinding and endonuclease cleavage by the Mre11/Rad50 complex. *Genes Dev* 13(10):1276-88.
- Pitts SA, Kullar HS, Stankovic T, Stewart GS, Last JI, Bedenham T, Armstrong SJ, Piane M, Chessa L, Taylor AM and others. 2001. hMRE11: genomic structure and a null mutation identified in a transcript protected from nonsense-mediated mRNA decay. *Hum Mol Genet* 10(11):1155-62.
- Powers JT, Hong S, Mayhew CN, Rogers PM, Knudsen ES, Johnson DG. 2004. E2F1 uses the ATM signaling pathway to induce p53 and Chk2 phosphorylation and apoptosis. *Mol Cancer Res* 2(4):203-14.
- Ramsden DA, Gellert M. 1998. Ku protein stimulates DNA end joining by mammalian DNA ligases: a direct role for Ku in repair of DNA double-strand breaks. *Embo J* 17(2):609-14.
- Reichenbach J, Schubert R, Schindler D, Muller K, Bohles H, Zielen S. 2002. Elevated oxidative stress in patients with ataxia telangiectasia. *Antioxid Redox Signal* 4(3):465-9.

- Reina-San-Martin B, Nussenzweig MC, Nussenzweig A, Difilippantonio S. 2005. Genomic instability, endoreduplication, and diminished Ig class-switch recombination in B cells lacking Nbs1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(5):1590-5.
- Richter D, Niegemann E, Brendel M. 1992. Molecular structure of the DNA cross-link repair gene SNM1 (PSO2) of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 231(2):194-200.
- Rohde M, Daugaard M, Jensen MH, Helin K, Nylandsted J, Jaattela M. 2005. Members of the heat-shock protein 70 family promote cancer cell growth by distinct mechanisms. *Genes Dev* 19(5):570-82.
- Saar K, Chrzanowska KH, Stumm M, Jung M, Nurnberg G, Wienker TF, Seemanova E, Wegner RD, Reis A, Sperling K. 1997. The gene for the ataxia-telangiectasia variant, Nijmegen breakage syndrome, maps to a 1-cM interval on chromosome 8q21. *Am J Hum Genet* 60(3):605-10.
- Seemanova E, Jarolim P, Seeman P, Varon R, Digweed M, Swift M, Sperling K. 2007. Cancer risk of heterozygotes with the NBN founder mutation. *J Natl Cancer Inst* 99(24):1875-80.
- Seemanova E, Passarge E, Beneskova D, Houstek J, Kasal P, Sevcikova M. 1985. Familial microcephaly with normal intelligence, immunodeficiency, and risk for lymphoreticular malignancies: a new autosomal recessive disorder. *Am J Med Genet* 20(4):639-48.
- Shiloh Y. 2006. The ATM-mediated DNA-damage response: taking shape. *Trends Biochem Sci* 31(7):402-10.
- Stewart GS, Maser RS, Stankovic T, Bressan DA, Kaplan MI, Jaspers NG, Raams A, Byrd PJ, Petrini JH, Taylor AM. 1999. The DNA double-strand break repair gene hMRE11 is mutated in individuals with an ataxia-telangiectasia-like disorder. *Cell* 99(6):577-87.
- Szostak JW, Orr-Weaver TL, Rothstein RJ, Stahl FW. 1983. The double-strand-break repair model for recombination. *Cell* 33(1):25-35.
- Tanzanella C, Antoccia A, Spadoni E, di Masi A, Pecile V, Demori E, Varon R, Marseglia GL, Tiepolo L, Maraschio P. 2003. Chromosome instability and nibrin protein variants in NBS heterozygotes. *Eur J Hum Genet* 11(4):297-303.
- Urist M, Tanaka T, Poyurovsky MV, Prives C. 2004. p73 induction after DNA damage is regulated by checkpoint kinases Chk1 and Chk2. *Genes Dev* 18(24):3041-54.
- Uziel T, Lerenthal Y, Moyal L, Andegeko Y, Mittelman L, Shiloh Y. 2003. Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. *Embo J* 22(20):5612-21.
- van Overbeek M, de Lange T. 2006. Apollo, an Artemis-related nuclease, interacts with TRF2 and protects human telomeres in S phase. *Curr Biol* 16(13):1295-302.
- Varon R, Reis A, Henze G, von Einsiedel HG, Sperling K, Seeger K. 2001. Mutations in the Nijmegen Breakage Syndrome gene (NBS1) in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Cancer Res* 61(9):3570-2.
- Varon R, Vissinga C, Platzner M, Cerosaletti KM, Chrzanowska KH, Saar K, Beckmann G, Seemanova E, Cooper PR, Nowak NJ and others. 1998. Nibrin, a novel DNA double-strand break repair protein, is mutated in Nijmegen breakage syndrome. *Cell* 93(3):467-76.
- Waltes R, Kalb R, Gatei M, Kijas AW, Stumm M, Soback A, Wieland B, Varon R, Lerenthal Y, Lavin MF and others. 2009. Human RAD50 deficiency in a Nijmegen breakage syndrome-like disorder. *Am J Hum Genet* 84(5):605-16.
- Weemaes CM, Hustinx TW, Scheres JM, van Munster PJ, Bakkeren JA, Taalman RD. 1981. A new chromosomal instability disorder: the Nijmegen breakage syndrome. *Acta Paediatr Scand* 70(4):557-64.

-
- Wilborn F, Brendel M. 1989. Formation and stability of interstrand cross-links induced by cis- and trans-diamminedichloroplatinum (II) in the DNA of *Saccharomyces cerevisiae* strains differing in repair capacity. *Curr Genet* 16(5-6):331-8.
- Xu B, Kim ST, Lim DS, Kastan MB. 2002. Two molecularly distinct G(2)/M checkpoints are induced by ionizing irradiation. *Mol Cell Biol* 22(4):1049-59.
- Yi M, Rosin MP, Anderson CK. 1990. Response of fibroblast cultures from ataxia-telangiectasia patients to oxidative stress. *Cancer Lett* 54(1-2):43-50.
- Yuan Z, Zhang X, Sengupta N, Lane WS, Seto E. 2007. SIRT1 regulates the function of the Nijmegen breakage syndrome protein. *Mol Cell* 27(1):149-62.
- Zhang Y, Zhou J, Lim CU. 2006. The role of NBS1 in DNA double strand break repair, telomere stability, and cell cycle checkpoint control. *Cell Res* 16(1):45-54.
- Zhao S, Weng YC, Yuan SS, Lin YT, Hsu HC, Lin SC, Gerbino E, Song MH, Zdzienicka MZ, Gatti RA and others. 2000. Functional link between ataxia-telangiectasia and Nijmegen breakage syndrome gene products. *Nature* 405(6785):473-7.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Karl Sperling, für seine stetige Unterstützung und die ermutigenden Diskussionen in schwierigen Phasen dieser Arbeit. Ich danke Prof. Sperling für die Möglichkeit, mich an "seinem" Institut wissenschaftlich entwickeln und entfalten zu können.

Besonders herzlich bedanke ich mich bei Prof. Martin Digweed, in dessen Arbeitsgruppe ich wichtige Teile der vorliegenden Arbeit durchgeführt habe. Ich danke ihm für die großzügige und freundschaftliche Unterstützung. Hierzu gehörte auch die - für ihn selbstverständliche - Überlassung eines Laborraumes als Unterstützung zum Aufbau einer eigenen Arbeitsgruppe. Danke!

Sehr herzlich bedanke ich mich bei Dr. Raymonda Varon für die gute Zusammenarbeit und die wohlwollende Unterstützung, besonders auch in der Endphase meiner Habilitationsarbeit.

Danken möchte ich meinen Mitarbeitern, vor allem Dr. Marco Anders, Anika Lindner, Stefanie Heinrich und Julia Kallenbach. Allen Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik und im Besonderen der AG "DNA-Reparaturgene" gilt mein Dank für die gute Zusammenarbeit in angenehmer Arbeitsatmosphäre.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Patrick Concannon und seinen Mitarbeitern, in dessen Arbeitsgruppe am Benaroya Research Institute (Seattle, USA) ich wichtige proteinanalytische Methoden und vieles mehr gelernt habe.

Prof. Stephen Meyn, Dr. Paul Bradshaw, Prof. Zhao-Qi Wang und Dr. Karin Schmelz danke ich für die fruchtbare Kooperation.

Für die wissenschaftliche Zusammenarbeit bei der Identifizierung von Apollo-Interaktoren, und die vielen Diskussionen über die Wissenschaft und das Leben an sich, bedanke ich mich bei Dr. Jens Mattow

Herzlicher Dank gilt meiner Familie. Besonders dankbar bin ich meiner Frau, Marion Wühle-Demuth, die mich während aller Phasen dieser Arbeit in vielfältiger Weise unterstützt hat und unseren Kindern Friedrich und Sophie für ihre Liebe und die Kraft, die sie uns täglich schenken.

Allen Patienten und ihren Angehörigen, die Proben für wissenschaftliche Zwecke im Rahmen dieser Arbeit zur Verfügung gestellt haben, bin ich zu Dank verpflichtet.

Erklärung

§4 Abs. 3 (k) der HabMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wird bzw. wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Berlin, den 7. Mai 2010

Dr. rer. nat. Ilja Demuth