

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

DISSERTATION

Deficiency of the DNA repair protein nibrin increases the basal
but not the radiation induced mutation frequency *in vivo*

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicinalium (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Petra Wessendorf

aus Haselünne

Datum der Promotion: 30.05.2015

Inhaltsverzeichnis

Abstrakt.....	3
Abstract.....	4
Eidesstattliche Versicherung.....	5
Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation.....	6
Auszug aus der Journal Summary Liste	7
Publikation	8
Lebenslauf	14
Publikationsliste	17
Danksagung.....	19

Abstrakt

Einleitung: Nibrin (NBN) bildet zusammen mit MRE11 und RAD50 einen Komplex, der an der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB) und der Zellzyklusregulation beteiligt ist. Hypomorphe Mutationen von Komponenten des Komplexes führen beim Menschen zu Erkrankungen, die durch Radiosensitivität und eine stark erhöhte Tumorzinzidenz des lymphoretikulären Systems charakterisiert sind. Mutationen des *NBN*-Gens resultieren im autosomal rezessiven Nijmegen Breakage Syndrom (NBS). Über 95% der NBS Patienten tragen dieselbe Mutation, eine 5bp-Deletion, die zu alternativer Translation und der Produktion eines aberranten Protein Fragments führt. Dieses Protein Fragment übernimmt partiell die Funktionen des Wildtyp-Nibrins. Null-Mutationen in Mäusen sind aufgrund erhöhter Apoptose im Blastozysten-Entwicklungsstadium embryonal letal.

In der vorliegenden Arbeit haben wir den Zusammenhang von DNA- Schädigung, Mutationsrate und Mutationsspektrum *in vivo* und *in vitro* bei Mutationen von *NBN* untersucht. Zur *in vivo* Untersuchung wurden konditional null-mutante und humanisierte Mäuse mit der 5bp-Deletion verwendet. Diese Mäuse wurden mit einer transgenen Maus, die das bakterielle LacZ-Reporterplasmid trägt, gekreuzt. Es wurden sowohl homozygote als auch heterozygote Mäuse untersucht. Aus diesen Mäusen gewonnene Fibroblasten wurden verwendet, um den Zusammenhang von DNA- Schädigung, Mutationsrate und Mutationsspektrum *in vitro* zu untersuchen.

Ergebnisse: Es zeigte sich, dass Mutationen von *NBN* zu erhöhten spontanen DNA-Schädigungen *in vitro* führen. *In vivo* konnte im Vergleich zu Kontroll-Mäusen eine 2.5-fache Erhöhung der basalen Mutationsrate in den lymphatischen Organen der humanisierten Maus gezeigt werden. Im Gegensatz zu den nach defekter DSB-Reparatur erwarteten komplexen Mutationen wiesen die untersuchten Zellen und Mäuse ein von Einzelbasenpaar-Veränderungen dominiertes Mutationsspektrum auf.

Schlussfolgerung: Die Reparatur von spontanen Mutationen, möglicherweise entstanden durch fehlerhafte DNA-Replikation, spielt in Abwesenheit von Wildtyp-Nibrin eine große Rolle bei der Entstehung der erhöhten basalen Mutationsrate. Dies gilt auch für Zellen, die heterozygot für *NBN*-Nullmutationen sind. NBS Patienten-Zellen zeigen *in vitro* eine erhöhte Strahlensensitivität. Doch eine Erhöhung der Mutationsraten nach Bestrahlung ist *in vivo* nicht zu beobachten, was vermutlich auf eine intakte Apoptose in Abwesenheit von Wildtyp-Nibrin hindeutet.

Abstract

Introduction: Nibrin (NBN) is a member of a DNA repair complex together with MRE11 and RAD50. The complex is associated particularly with the repair of DNA double strand breaks and with the regulation of cell cycle check points. Hypomorphic mutation of components of the complex leads to human disorders, characterised by radiosensitivity and increased tumour occurrence, particularly of the lymphatic system. Mutations of the *NBN* gene result in the autosomal recessive Nijmegen Breakage Syndrome (NBS). Over 95% of NBS patients carry the major *NBN* mutation, a 5bp deletion, which leads to alternative translation and the production of a truncated protein fragment. This protein fragment maintains partial nibrin function. Null mutations in mice are embryonically lethal due to massive apoptosis at the blastocyst stage.

Little is actually known about the relationship between DNA damage, mutation frequency and mutation spectrum in the absence of wild type nibrin. We have utilised a conditional null mutant mouse and a humanized NBS mouse, which carries the 5bp deletion, to examine this relationship *in vivo*. Mice homozygous and heterozygous for nibrin mutations were examined. We have bred these mice with a transgenic mutagenesis mouse harbouring copies of the bacterial *lacZ* gene. Fibroblasts derived from the different mice were used to examine DNA damage, mutation frequency and spectrum *in vitro*.

Results: We find that *NBN* mutation leads to increased DNA damage *in vitro*, even in the absence of an external genotoxic treatment. *In vivo* we find the basal mutation frequency measured in lymphatic tissue of the humanized NBS mice is approximately 2.5-fold higher than in control mice. The characteristic mutation spectrum is dominated by single base transitions rather than the deletions and complex rearrangements expected after abortive repair of DNA double strand breaks.

Conclusion: We conclude that in the absence of wild type nibrin, the repair of spontaneous errors, presumably arising during DNA replication, make a major contribution to the basal mutation rate. This applies also to cells heterozygous for an *NBN* null mutation. Mutation frequencies after irradiation *in vivo* were not increased in mice with nibrin mutations as might have been expected considering the radiosensitivity of NBS patient cells *in vitro*. Evidently apoptosis is efficient, even in the absence of wild type nibrin.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Petra Wessendorf, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Nibrin deficiency increases the spontaneous but not the radiation induced mutation frequency *in vivo*“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Mein Anteil an der ausgewählten Publikation entspricht dem, der in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben ist.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation

Publikation:

Wessendorf P, Vijg J, Nussenzweig A, Digweed M (2014) Nibrin deficiency increases the spontaneous but not the radiation induced mutation frequency *in vivo*.

Mutat Res- Fund Mol M [2014 Nov; 769:11-6]

Impact Factor: 4.440

Beitrag im Einzelnen:

Petra Wessendorf hat murine Fibroblasten etabliert, kultiviert, mit Cre-Rekombinase behandelt und anschließend bestrahlt und mithilfe der Einzelzell-Gelelektrophorese (Comet Assay) die DNA-Schädigungen bestimmt (Abbildung 1 der Publikation). Die Fibroblasten hat Petra Wessendorf ebenfalls zur Bestimmung der Mutationsrate mittels des Reporter-Assays verwendet und die in *E.coli* transformierten Klone sequenziert (Abbildung 2A/B). Petra Wessendorf hat die Mäuse bestrahlt, die Organe entnommen, DNA extrahiert und die Mutationsraten vor und nach Bestrahlung bestimmt (Abbildung 3 und 5). Auch die Sequenzierung der *E.coli* transformierten Klone hat Petra Wessendorf durchgeführt (Abbildung 4). Petra Wessendorf hat alle Experimente selbstständig durchgeführt und das Manuskript zusammen mit Martin Digweed verfasst.

André Nussenzweig hat die humanisierte Maus ($Nbn^{-/-}NBN^{del5}$) und Jan Vijg die LacZ-Reporter Maus zur Verfügung gestellt.

Martin Digweed hat das Projekt konzipiert.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Auszug aus der Journal Summary Liste

Mutat Res-Fund Mol M: Impact Factor 4.440; Position 37 von 165 Zeitschriften „Genetics & Heredity“ (die ersten 30 % der nach Impact Factor sortierten Journale sind Positionen 1 bis 49); Eigenfaktor 0.01334, Journal Summary List 2013

2013 JCR Science Edition

[Journal Title Changes](#)

Page 2 of 9

[WELCOME](#)
[HELP](#)

Journal Citation Reports®
Journal Summary List
 Journals from: **subject categories GENETICS & HEREDITY** [VIEW CATEGORY SUMMARY LIST](#)
 Sorted by: [SORT AGAIN](#)

[MARK ALL](#)
[UPDATE MARKED LIST](#)

[1](#) [2](#) [3](#) [4](#) [5](#) [6](#) [7](#) [8](#) [9](#) [10](#)

Ranking is based on your journal and sort selections.

Mark	Rank	Abbreviated Journal Title <i>(linked to Journal Information)</i>	ISSN	JCR Data ⁱ				Eigenfactor® Metrics ⁱ			
				Total Cites	Impact Factor	5-Year Impact Factor	Immediacy Index	Articles	Cited Half-life	Eigenfactor® Score	Article Influence® Score
<input type="checkbox"/>	21	MOL AUTISM	2040-2392	335	5.486	6.080	0.644	45	2.4	0.00180	2.159
<input type="checkbox"/>	22	ADV GENEI	0065-2660	1225	5.410	4.345	1.583	12	5.9	0.00442	1.908
<input type="checkbox"/>	23	CIRC-CARDIOVASC.GENE	1942-3268	1959	5.337	5.867	0.868	68	3.1	0.01300	2.415
<input type="checkbox"/>	24	EPIGENOMICS-UK	1750-1911	866	5.215	5.164	0.280	50	2.8	0.00516	1.875
<input type="checkbox"/>	25	HUM MUTAI	1059-7794	11350	5.122	5.447	1.252	218	5.6	0.03782	2.136
<input type="checkbox"/>	26	EPIGENETICS-US	1559-2294	3113	5.108	5.121	0.759	141	2.8	0.01684	1.903
<input type="checkbox"/>	27	DNA RES	1340-2838	2062	4.975	5.000	0.878	49	6.7	0.00430	1.459
<input type="checkbox"/>	28	GENOME.MED	1756-994X	1211	4.942	3.950	1.182	88	3.0	0.00728	1.561
<input type="checkbox"/>	29	CURR.GENE.THER	1566-5232	1386	4.906	4.087	0.476	42	4.6	0.00393	1.133
<input type="checkbox"/>	30	GENETICS	1943-2631	42824	4.866	4.498	1.279	272	>10.0	0.06335	2.040
<input type="checkbox"/>	31	J.MOL.MED	0946-2716	6068	4.739	4.626	1.358	120	6.2	0.01538	1.549
<input type="checkbox"/>	32	EVOLUTION	0014-3820	31750	4.659	5.469	1.042	308	>10.0	0.05041	2.192
<input type="checkbox"/>	32	PLANT.GENOME-US	1940-3372	429	4.659	4.489	0.800	30	3.0	0.00193	1.290
<input type="checkbox"/>	34	GENOME.BIOL.EVOL	1759-6653	1842	4.532	4.780	0.743	202	2.5	0.01184	2.008
<input type="checkbox"/>	35	HUM.GENEI	0340-6717	8655	4.522	4.287	1.353	116	9.0	0.01844	1.657
<input type="checkbox"/>	36	EPIGENET.CHROMATIN	1756-8935	419	4.462	4.471	0.732	41	3.1	0.00331	2.282
<input type="checkbox"/>	37	MUTAT.RES-FUND.MOL.M	0027-5107	8248	4.440	3.521	0.426	61	8.7	0.01334	1.136
<input type="checkbox"/>	38	EUR.J.HUM.GENEI	1018-4813	7628	4.225	3.943	1.279	233	5.1	0.02487	1.459
<input type="checkbox"/>	39	GENE.THER	0969-7128	8482	4.196	3.670	1.110	136	8.2	0.01372	1.078
<input type="checkbox"/>	40	J.INHERIT.METAB.DIS	0141-8955	4400	4.138	3.614	1.104	106	6.3	0.01052	1.156

Publikation

Deficiency of the DNA repair protein nibrin increases the basal but not the radiation induced mutation frequency *in vivo*.

Wessendorf P, Vijg J, Nussenzweig A, Digweed M.

Abstract

Nibrin (NBN) is a member of a DNA repair complex together with MRE11 and RAD50. The complex is associated particularly with the repair of DNA double strand breaks and with the regulation of cell cycle check points. Hypomorphic mutation of components of the complex leads to human disorders characterised by radiosensitivity and increased tumour occurrence, particularly of the lymphatic system. We have examined here the relationship between DNA damage, mutation frequency and mutation spectrum *in vitro* and *in vivo* in mouse models carrying *NBN* mutations and a *lacZ* reporter plasmid. We find that NBN mutation leads to increased spontaneous DNA damage in fibroblasts *in vitro* and high basal mutation rates in lymphatic tissue of mice *in vivo*. The characteristic mutation spectrum is dominated by single base transitions rather than the deletions and complex rearrangements expected after abortive repair of DNA double strand breaks. We conclude that in the absence of wild type nibrin, the repair of spontaneous errors, presumably arising during DNA replication, makes a major contribution to the basal mutation rate. This applies also to cells heterozygous for an *NBN* null mutation. Mutation frequencies after irradiation *in vivo* were not increased in mice with nibrin mutations as might have been expected considering the radiosensitivity of NBS patient cells *in vitro*. Evidently apoptosis is efficient, even in the absence of wild type nibrin.

Mutat Res. 2014 Nov;769:11-6

Diese Publikation ist unter folgender URL einsehbar:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2014.07.001>.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

Originalarbeiten

- Wessendorf P**, Vijg J, Nussenzweig A, Digweed M (2014) "Nibrin deficiency increases the spontaneous but not the radiation induced mutation frequency *in vivo*." *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 2014 Nov;769:11-6
Impact Factor: 4.440
- Klein O, Rohwer N, de Molina KF, Mergler S, **Wessendorf P**, Herrmann M, Klose J, Cramer T (2013) "Application of two-dimensional gel-based mass spectrometry to functionally dissect resistance to targeted cancer therapy." *Proteomics Clin Appl*. 2013 Dec;7(11-12):813-24
Impact Factor: 2.925
- Salewsky B, **Wessendorf P**, Hirsch D, Krenzlin H, Digweed M (2013) "Nijmegen Breakage Syndrome: the elimination pathway for mutant nibrin protein is allele specific." *GENE* 2013 519: 217-221
Impact Factor: 2.341
- Krenzlin H, Demuth I, Salewsky B, **Wessendorf P**, Weidele K, Bürkle A, Digweed M (2012) "DNA damage in Nijmegen Breakage Syndrome cells leads to PARP hyperactivation and increased oxidative stress." *PLoS Genet* 2012 8(3): e1002557
Impact Factor: 8.694
- Picelli S, von Holst S, **Wessendorf P** (2009) "The continuing search for predisposing colorectal cancer variants" (review article) *Cancer Genomics Proteomics*. 2009 Nov-Dec;6(6):305-16
Impact Factor: pending

Vorträge und Kongressbeiträge

Wessendorf P, Radszweski J, Digweed M (2012) „Organ-specific mutation analysis in a mouse model of Nijmegen Breakage Syndrome“

Vortrag, 12th Biannual Meeting, DGDR (Deutsche Gesellschaft für DNA-Reparaturforschung), München, 17-20 Sept. 2012

Wessendorf P (2013) „Mutation analysis of a humanized mouse model of Nijmegen Breakage Syndrome“

Poster, deutsch-französischer DNA Reparatur Kongress, Strasbourg, 07.-10. Oktober 2013

Wessendorf P (2014) „What do we learn from whole genome analysis in colon cancer“, eingeladener Vortrag, Deutscher Krebskongress, Berlin, 19.-22. Februar 2014

Danksagung

Sehr großer Dank gebührt meinem Doktorvater Martin Digweed, der mich stets bei der Umsetzung meiner Vorschläge und Ideen unterstützte und mir durch sein Vertrauen dazu verhalf, eine selbstbewusste Doktorandin zu werden. Ich danke ihm dafür, dass er mir das spannende Thema der Dissertation zur Verfügung stellte und dass ich diese prägende Zeit in seiner tollen Arbeitsgruppe verbringen durfte.

Meinem langjährigen Sitz-und Labornachbarn Bastian Salewsky möchte ich für seine Hilfsbereitschaft, Diskussionen und aufbauenden Worte und vor allem für den unendlichen Spaß in- und außerhalb des Labors danken. Meinen Freunden und Weggefährten Harald Krenzlin, Claire Schlack und Janina Radszewski danke ich für ihre bedingungslose Unterstützung und die grandiose Zeit über die Mauern des Labors hinaus.

Herzlichen Dank richte ich an Susanne Rothe und Gabriele Hildebrand, ohne deren Hilfe und unerschöpfliches Wissen viele Probleme nicht gelöst worden wären. Dank gilt auch allen Mitarbeitern des Institutes für Medizinische Genetik und Humangenetik, die mir stets durch lebendige Diskussionen und kreative Vorschläge zur Seite standen.

Meinen Geschwistern Tanja, Linda und Julian, und meinen Freunden außerhalb des Labors, insbesondere Jannine Klatt, danke ich dafür, dass sie mich stets wieder aufbauten, wenn es nötig war und so viele erlebnisreiche Tage und Abende mit mir verbrachten. Mein tiefer Dank gilt Marcin Zielinski, der mit Liebe, Verständnis und Unterstützung in all den Jahren immer für mich da war.

Ohne die Unterstützung und das Vertrauen meiner Eltern, Rudolf und Ulla Wessendorf, wäre die Fertigstellung meiner Dissertation nicht möglich gewesen. Ich möchte mich von ganzem Herzen dafür bedanken und widme ihnen diese Doktorarbeit.

Dank gilt der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Nachwuchskommission der Charité, durch deren finanzielle Mittel die Dissertation vollendet werden konnte.