

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

DISSERTATION

Untersuchungen zur klinischen Variabilität der genetisch bedingten Krankheit
Nijmegen Breakage Syndrom

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Lars - Arne Krüger
aus Crimmitschau

Gutachter: 1. Prof. Dr. M. Digweed
 2. Prof. Dr. med. W. Vogel
 3. Priv.-Doz. Dr. med. Dr. rer. nat. K. Seeger

Datum der Promotion: 26. Juni 2009

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Nijmegen Breakage Syndrom	1
1.2. Klinisches Bild	1
1.2.1. Phänotyp	1
1.2.1.1. Infektionen und Immundefizienz	3
1.2.1.2. Krebsrisiko, Chromosomenbrüchigkeit und Radiosensitivität	3
1.2.1.3. Neurologische Befunde	4
1.2.2. NBS-Populationsgenetik	4
1.3. NBS1-Gen	5
1.3.1. Aufbau des NBS1-Gens	5
1.3.2. Mutationen im NBS1-Gen	6
1.4. Nibrin	7
1.4.1. Aufbau des p95-Nibrin	7
1.4.2. Funktion des Mre11/Rad50/Nibrin-Komplex	8
1.4.2.1. Aufbau des Mre11/Rad50/Nibrin-Komplex	8
1.4.2.2. Doppelstrangbruchreparatur und der Mre11/Rad50/Nibrin-Komplex	9
1.4.2.3. Die Rolle Nibrins bei der Zellzykluskontrolle	11
1.4.3. Trunkierte Proteinfragmente der 657Δ5-Mutation	12
2. Aufgabenstellung	14
3. Material	16
3.1. Chemikalien und Verbrauchsmittel	16
3.1.1. Zellkultur	16
3.1.2. Immunpräzipitation und Western Blot	16
3.1.3. Primer	17
3.1.4. PCR, RT PCR, Sequenzierung und real time quantitative PCR	18
3.1.5. Sonstiges	19

3.1.6. Antikörper	19
3.1.6.1. Primäre Antikörper	19
3.1.6.2. Sekundäre Antikörper	20
3.2. Lymphoblastoide Zelllinien und Fibroblasten	20
3.3. Verwendete Kits	21
3.4. Geräte	21
3.4.1. Inkubationssysteme	21
3.4.2. Elektrophorese- und Blotsysteme	21
3.4.3. Zentrifugen	21
3.4.4. Sonstige Geräte und Software	21
4. Methoden	23
4.1. Mutationsanalyse	23
4.1.1. DNA-Extraktion und PCR	23
4.1.2. Reinigung der PCR-Produkte und Sequenzreaktion	24
4.2. Analyse der Wachstumseigenschaften von NBS-Patientenzellen	24
4.3. Charakterisierung der Strahlensensivität der NBS-Patientenzelllinien	25
4.4. Genexpression	25
4.4.1. RNA-Isolierung	25
4.4.2. cDNA-Synthese	26
4.4.3. microarray-Hybridisierung	26
4.5. Verifizierung der microarray-Ergebnisse mittels real-time PCR	27
4.5.1. Gesamt-RNA-Isolierung, Gelelektrophorese und DNase-Behandlung	27
4.5.2. Reverse Transkription (RT)	27
4.5.3. GAPDH-Amplifikation aus der cDNA	28
4.5.4. Real-time quantitative PCR	28

4.6.	Stimulation von Lymphozyten aus Blutproben	29
4.6.1.	Proteinextraktion aus Blutkulturen	29
4.6.1.1.	Metaphasechromosomen Präparation	29
4.6.2.	Quantifizierung der p70-Nibrinexpression in NBS-Patientenzellen mittels Immunpräzipitation	30
4.6.3.	Proteinisolation	30
4.6.4.	Immunpräzipitation	31
4.6.5.	Elektrophorese und Membranentwicklung	32
4.6.6.	Transferrnachweis	33
4.6.7.	Quantifizierung der p70-Nibrin Bandenstärken	33
4.7.	Klinische Parameter und zelluläre Variabilität	33
5.	Ergebnisse	34
5.1.	Mutationsanalyse	34
5.2.	Untersuchung des Wachstums verschiedener NBS-Patientenzelllinien	35
5.3.	Strahlensensivität von NBS-Patientenzelllinien	37
5.4.	Genexpression	39
5.5.	Verifizierung der microarray-Ergebnisse mittels real-time PCR	41
5.6.	Nachweis und Quantifizierung der p70-Nibrin Expression	44
5.6.1.	Quantifizierung der p70-Nibrin Expression aus lymphoblastoiden NBS-Patientenzelllinien	44
5.6.1.1.	Nachweis der p70-Nibrin Expression in lymphoblastoiden NBS-Patientenzelllinien	44
5.6.1.2.	Quantifizierung der p70-Nibrin Expression in lymphoblastoiden Patientenzelllinien	45
5.6.2.	Nachweis der p70-Nibrin Expression in peripheren Lymphozyten aus Blutproben mit hetero- und homozygoten Mutationen im NBS1-Gen	48
5.6.2.1.	Stimulation von peripheren Lymphozyten	48
5.6.2.2.	Nachweis der p70-Nibrin Expression in nativen Lymphozyten	50
5.6.3.	Nachweis der p70-Nibrin Expression bei Zellen mit der NBS1-Mutation insGG	52

5.7.	Zusammenhang zwischen den experimentellen Ergebnissen und den klinischen Daten	54
5.7.1.	Keine Korrelation von Wachstum mit weiteren Eigenschaften der Patientenzelllinien	54
5.7.1.1.	Wachstum und p70-Nibrin Expression	54
5.7.1.2.	Keine Korrelation des Wachstums mit dem Alter der LCL`s und dem Patientenalter zum Zeitpunkt der LCL-Etablierung	55
5.7.2.	Keine Korrelation der p70-Nibrin Menge mit dem Alter der LCL`s und dem Patientenalter zum Zeitpunkt der LCL-Etablierung	56
5.7.3.	Keine Korrelation der p70-Nibrin Menge mit dem Ig-Status	57
5.7.3.1.	Keine Korrelation der p70-Nibrin Menge mit dem IgA-Status	58
5.7.3.2.	Keine Korrelation der p70-Nibrin Menge mit dem IgG-Status	60
5.7.4.	Keine Korrelation von Ig-Status mit Krebs	62
5.7.5.	Signifikante Korrelation zwischen zellulärer p70-Nibrin Menge und Krebserkrankungen der Patienten	63
5.7.6.	Keine Korrelation der p70-Nibrin Menge mit den Ergebnissen der real-time PCR	67
6.	Diskussion	68
6.1.	EBV-Transformation	68
6.2.	Genexpression in LCL`s	69
6.2.1.	In NBS-Patientenzelllinien überexprimierte Gene	70
6.2.2.	In NBS-Patientenzelllinien unterexprimierte Gene	72
6.3.	Beziehung von p70-Nibrin Menge und den experimentellen und klinischen Ergebnissen	74
6.3.1.	Beziehung von p70-Nibrin Menge und den experimentellen Ergebnissen	74
6.3.2.	p70-Nibrin Menge und klinische Patientendaten	76

6.4.	Ursprung der Variationen in p70-Nibrin Mengen	78
6.4.1.	RNA-Level Variationen in p70-Nibrin Mengen	78
6.4.1.1.	Transkriptionsregulation	79
6.4.1.2.	Post-Transkriptionsregulation	80
6.4.2.	Protein Level Variationen in p70-Nibrin Mengen	82
6.4.2.1.	Translationseffizienz	82
6.4.2.2.	Post-translationelle Modifikation	83
6.4.2.3.	Proteolyse	84
6.5.	Alternative Spleißprodukte und Variabilität	85
6.5.1.	Alternative Spleißprodukte in LCL`s	85
6.5.2.	p75-Nibrin aus primären Lymphozyten	87
7.	Zusammenfassung	89
8.	Danksagung	90
9.	Abkürzungsverzeichnis	91
10.	Literaturverzeichnis	93
11.	Anhang	110

Vorbemerkung

Teile dieser Arbeit wurden bereits im Journal *Human Molecular Genetics* und in *Carcinogenesis* publiziert.

Kruger, L., I. Demuth, H. Neitzel, R. Varon, K. Sperling, K. H. Chrzanowska, E. Seemanova and M. Digweed (2007). "Cancer incidence in Nijmegen breakage syndrome is modulated by the amount of a variant NBS protein." *Carcinogenesis* 28(1): 107-11.

Varon, R., V. Dutranno, G. Weikert, C. Tanzarella, A. Antoccia, L. Stockl, E. Spadoni, L. A. Kruger, A. Masi, K. Sperling, M. Digweed and P. Maraschio (2006). "Mild Nijmegen breakage syndrome phenotype due to alternative splicing." *Hum Mol Genet* 15(5): 679-89.

1. Einleitung

1.1. Nijmegen Breakage Syndrom

Das Nijmegen Breakage Syndrom (NBS; MIM 251.260), erstmals 1981 in niederländischen Patienten beschrieben, ist eine seltene, genetisch bedingte autosomal-rezessive Erkrankung mit vollständiger Penetranz. Es ist zusammen mit dem Bloom-Syndrom, der Fanconi-Anämie und der Ataxia-Telangiectasia (AT) den Chromosom-Instabilitäts-Syndromen zuzuordnen, bei denen die Körperzellen eine gesteigerte Mutationsrate aufweisen. NBS zeigt sich in charakteristischen Gesichtszügen, Mikrozephalie und weiteren Symptomen wie Empfindlichkeit gegenüber ionisierenden Strahlen in Verbindung mit erhöhter Chromosomenbrüchigkeit, Immundefizienz, Infertilität, Minderwuchs und einer Prädisposition für Malignome des lymphoretikulären Systems. Über 200 Familien sind weltweit bekannt, wobei die überwiegende Zahl in Polen, der Ukraine und der Tschechischen Republik lebt. Die beobachtete Heterozygoten-Frequenz beträgt 1:177, allerdings werden derzeit weit weniger als die demnach zu erwartenden 1:95.000 homozygoten NBS-Patienten tatsächlich erfasst ¹.

1.2. Klinisches Bild

1.2.1. Phänotyp

Trotz der variablen phänotypischen Ausprägung des Nijmegen Breakage Syndroms weisen NBS-Patienten sehr häufig charakteristische Gesichtszüge mit flacher Stirn, großer gerader Nase mit flacher Nasenwurzel, Retrognathie, tiefsitzenden Ohrmuscheln und dünnem Haar auf (Abbildung 1). Die Mikrozephalie ist bei 75 % der NBS-Patienten von Geburt an vorhanden und wird bei den verbleibenden Patienten nach einigen Monaten offensichtlich, nur zwei Patienten mit normalem Kopfumfang sind bekannt.

Das kraniale *magnetic resonance imaging* (MRI) von zehn NBS-Patienten weißt verkleinerte Frontallappen und eine Einengung des Frontal-Horns der lateralen Ventrikel auf ^{2, 3}. Herabgesetztes Gehirnwachstum ohne zerebelläre Degeneration ist die wahrscheinlichste Ursache der Mikrozephalie bei NBS-Patienten, obwohl auch die vorzeitige Fusion der Schädelknochen beschrieben wurde.



Abbildung 1: Charakteristische Gesichtszüge der klinischen Manifestation des Nijmegen Breakage Syndroms bei zwei Brüdern, 1 und 7 Jahre alt. (Fotografie von Prof. E. Seemanova, Prag)

Eines der Hauptmerkmale von NBS ist die Entwicklungsverzögerung und der Minderwuchs. Geburtsgröße und -gewicht liegen bis zum zweiten Lebensjahr innerhalb normalen Grenzen, danach fällt die Körpergröße im Laufe der Entwicklung unter die 10. Perzentile und es manifestiert sich der Kleinwuchs (Abbildung 2). Der Minderwuchs von NBS-Patienten wird hierbei auf eine Verkürzung des Rumpfes zurückgeführt, wobei das Körpergewicht proportional zur Körperlänge ist ⁴.

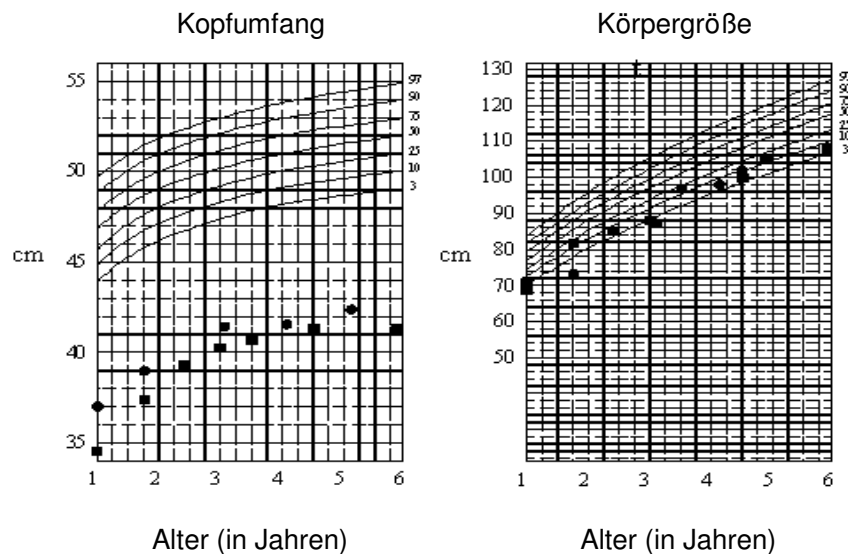


Abbildung 2: Kurven des Kopfumfangs und der Körpergröße in Abhängigkeit des Alters bei zwei männlichen NBS-Patienten. (Prof. E. Seemanova, Prag)

Der Minderwuchs könnte im Zusammenhang mit der eingeschränkten Proliferationsrate von Patientenzellen stehen. Kang *et al.* konnte zeigen dass Mäuse mit hypomorphen Mutationen im Nbn-Gen Minderwuchs aufweisen und deren Fibroblasten eine zwei- bis fünffach geringere Proliferationsrate zeigen als Kontrollzellen ⁵.

Darüber hinaus führte die gezielte Mutation des orthologen Gens in DT40-Hühnerzellen zu eingeschränktem Zellwachstum ⁶.

1.2.1.1. Infektionen und Immundefizienz

Immundefizienzen sowohl des humoralen als auch des zellulären Immunsystems führen bei der Mehrheit der Patienten zu wiederholten Infektionen der Atemwege sowie zu Harnwegs- und gastrointestinalen Infektionen. Ebenso wurde bei vielen Patienten Dys- oder Agammaglobulinämie festgestellt. Defizienzen von IgA und/oder IgG4 sind häufig ⁷ und nur 10 % der Patienten sind im Immunglobulinstatus unauffällig ⁸. Die zelluläre Immunität ist bei mehr als 90 % der Patienten durch reduzierte Mengen an CD3+ und CD4+ T-Zellen eingeschränkt. Da CD8+ T-Zellen in der Regel nicht betroffen sind, ist das CD4+ / CD8+ Verhältnis reduziert. Ebenso ist die Proliferation der T-Lymphozyten nach Behandlung mit Mitogenen bei der Mehrzahl der Patienten eingeschränkt ⁹.

1.2.1.2. Krebsrisiko, Chromosomenbrüchigkeit und Radiosensitivität

NBS-Patienten besitzen ein hohes Krebsrisiko, wobei ca. 40 % bis zum 20. Lebensjahr eine Neoplasie entwickeln ¹⁰.

Von 48 registrierten polnischen Patienten erkrankten schon vor Erreichen des 15. Lebensjahres 18 an einem malignen Lymphom, dies entspricht einem Erkrankungsrisiko dass gegenüber der Normalbevölkerung um das 1.000-fache erhöht ist. Kinder mit NBS weisen zudem Malignitäten auf die sich üblicherweise erst im Erwachsenenalter manifestieren. Lebensbegrenzend sind die meist schon im Jugendalter auftretenden malignen Tumore, angeführt von der Gruppe der Non-Hodgkin Lymphome (NHL), hier insbesondere dem *diffuse large B-cell lymphoma* (DLBL) ¹¹. Auch das periphere T-Zell Lymphom (AILD) tritt gehäuft unter NBS-Patienten auf, wobei das durchschnittliche Erkrankungsalter in der Bevölkerung hierfür bei 61 Jahren liegt. Nur vier NBS-Patienten erkrankten bisher an kindestypischen Neoplasien, der akuten lymphoblastischen Leukämie (ALL) und dem Medulloblastom.

Ebenfalls charakteristisch für NBS ist eine erhöhte spontane Chromosomeninstabilität.

Dabei werden häufig Chromatidbrüche und Chromosomen-Reunions-Figuren in somatischen Zellen beobachtet. Zugleich treten Translokationen in den Loci der Immunglobulin- und T-Zell-Rezeptor-Gene zwischen den Chromosomen 7 und 14 in T-Lymphozyten auf^{4, 12}. Aufgrund dieser Chromosomentranslokationen können die Promotoren dieser Gene in die Nähe von Protoonkogenen gelangen und dadurch die Teilungsaktivität der Zellen beeinflussen. Dies kann zur Entstehung von aberranten Lymphozyten führen, welche expandieren, transformieren und so zu Lymphomen führen.

Ebenso findet sich in NBS-Fibroblastenkulturen eine erhöhte Chromatidbrüchigkeit an unspezifischen Loci^{13, 14} und es treten vermehrt Telomerfusionen auf, die in dizentrischen Chromosomen resultieren.

Die Behandlung von NBS-Zellen mit ionisierender Strahlung (IR) oder Radiomimetika wie z.B. Bleomycin führt, im Vergleich zu Kontrollzellen zu einer erhöhten induzierten Chromatidbrüchigkeit^{13, 15} und weist damit auf die DNA-Reparaturdefizienz bei NBS hin. Diese Radiosensitivität manifestiert sich auch in einer erhöhten Zelltodrate sowohl bei primären als auch immortalisierten NBS-Zellen¹².

1.2.1.3. Neurologische Befunde

In der frühen Kindheit verläuft die geistige Entwicklung bei NBS-Patienten normal, eine progressive geistige Retardierung zeichnet sich jedoch später ab. Schwere geistige Retardierungen werden hingegen nicht beobachtet und NBS-Patienten mit normalem Intelligenzquotienten (IQ) sind nicht selten¹⁶. Die geistige Entwicklung ist in 35 % der NBS-Patienten normal, bei 45 % zeigt sich ein IQ im unteren Normbereich und bei weiteren 20 % eine mäßige Retardierung.

1.2.2. NBS-Populationsgenetik

In über 90 % aller NBS-Patienten slawischer Herkunft liegt die Gründermutation 657Δ5 vor. Daraus ist zu schließen, dass sich die ursprüngliche Mutation vor der Ausbreitung der slawischen Völker vor ca. 1.500 Jahren über ihre ursprüngliche Heimat, die Pripet-Sümpfe, hinaus, etabliert hatte.

Unter den Neugeborenen von fünf verschiedenen slawischen Populationen wurde eine sehr hohe 657Δ5 Heterozygotenfrequenz festgestellt: Tschechische Republik (8/1.234),

Polen (18/3.569), Ukraine (5/908), Bulgarien (9/1.002) und Sorben (8/326) ¹. Im Vergleich hierzu liegt die Frequenz in Berlin bei 1/900.

Diese Unterschiede lassen sich durch eine erhöhte Reproduktionsrate der Träger erklären, wobei angenommen wird dass Mütter, bei denen die NBS-Mutation heterozygot vorliegt aufgrund einer geringeren Abortrate eine höhere Fertilität aufweisen. Da die Aneuploidie für 50 % aller Spontanaborte verantwortlich ist, impliziert dies dass NBS-Heterozygote eine geringere *non-disjunction* Rate vorweisen als normale homozygote Frauen (Seemanova, persönliche Mitteilung).

Aufgrund der Anzahl heterozygoter Träger der NBS-Mutation ergibt sich eine berechnete NBS-Homozygotenfrequenz von 1/95.000. Diagnostiziert wurde allerdings nur eine Frequenz von 1/238.000. Diese wesentlich geringere Rate lässt sich wohl hauptsächlich auf die Schwierigkeiten in der Diagnose zurückführen, da diese bei den untersuchten Patientengruppen zu einem relativ späten Zeitpunkt stattfand (durchschnittlich 7,1 Jahre). Zu diesem Zeitpunkt hatten bereits zwischen 14 und 37 % der Patienten einen Tumor entwickelt ¹. Späte Diagnose und das frühe Auftreten von Malignomen resultierten oftmals in Chemo- und Radiotherapien welche aufgrund der erheblichen Radiosensitivität der Patienten zum Tod führten.

1.3. NBS1-Gen

1.3.1. Aufbau des NBS1-Gens

Das NBS1-Gen konnte durch Kopplungsanalysen in betroffenen Patientenfamilien auf dem Chromosom 8q21 kartiert werden ¹⁷. Gleichzeitig wurde dies von Matsuura *et al.* durch funktionelle Komplementation der Radiosensitivität von Patientenzellen nach Chromosomentransfer bestätigt ¹⁸. Die nachfolgende Analyse von, in diesem Bereich ebenfalls kartierenden, ESTs machte die Identifikation des mutierten Gens durch *positional cloning* möglich und ergab, dass das NBS1-Gen eine Größe von ca. 50 kb mit 16 Exons hat ^{19, 20}. Durch alternative Polyadenylierung entstehen mRNAs von 2.4 kb bzw. 4.4 kb Länge, die ubiquitär exprimiert werden. Lediglich in Testes und Ovarien wird die 2.4 kb mRNA vermehrt exprimiert, was auf eine Rolle in der Meiose hindeuten könnte ¹⁹⁻²¹.

Hiervon unabhängig wurde das Gen auf der Suche nach den humanen Homologen von Hefe DNA-Reparaturgenen gefunden ²¹.

1.3.2. Mutationen im NBS1-Gen

Über 90% aller analysierten NBS-Patienten weisen die gleiche 5bp Deletion, 657Δ5 im NBS1-Gen auf ^{19, 22}.

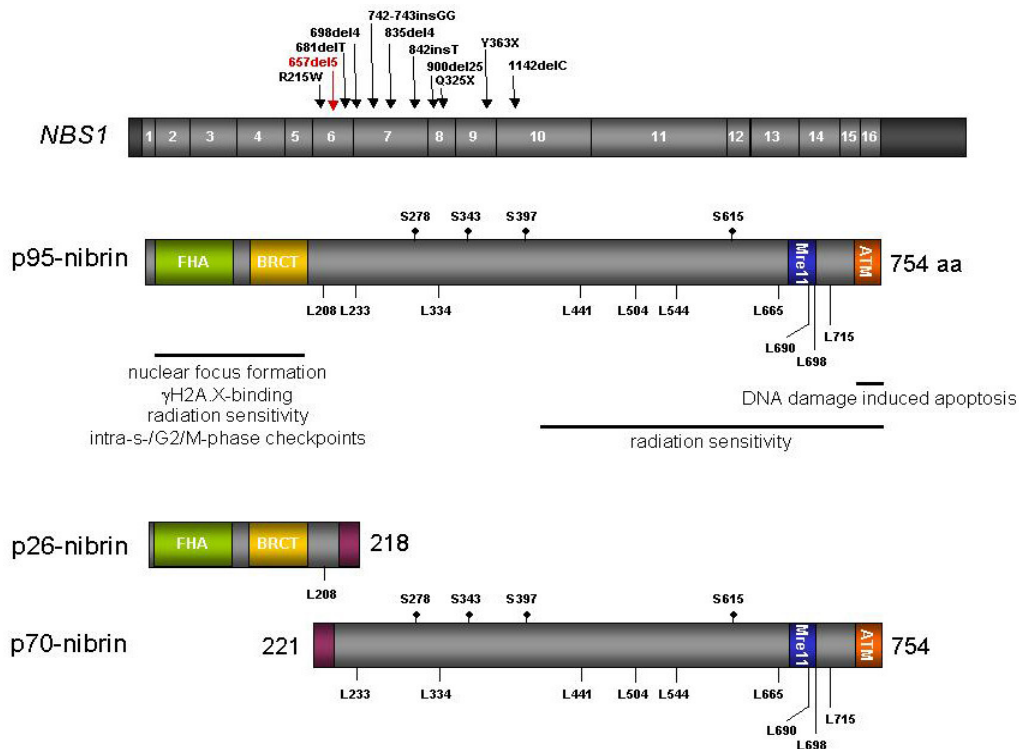


Abbildung 3: NBS1-Gen und das Proteinprodukt p95-Nibrin. In NBS-Patienten identifizierte Mutationen des NBS1-Gens sind über den einzelnen Exons (1-16) dargestellt. Das Proteinprodukt p95-Nibrin mit den funktionellen Domänen und Serin-Phosphorylierungsstellen für ATM und Acetylierungsstellen, welche durch SIRT1 deacetyliert werden ist darunter abgebildet. Die Domänen für die FHA, BRCT, Mre11 und ATM-Interaktion, sowie weitere funktionelle Abschnitte (Linien) sind angegeben. Aufgrund der 657Δ5 Deletion entstehen die nachfolgenden trunkeierten Nibrinfragmente p26-Nibrin und p70-Nibrin mit ihren alternativen Aminosäuren (rote Abschnitte). Nach Demuth und Digweed ²³.

Neben dieser Gründermutation konnten zehn weitere trunkierende Mutationen in Patienten mit verschiedenem ethischen Hintergrund ^{19, 24-28} nachgewiesen werden (Abbildung 3).

Auch diese führen, wie die 657Δ5 Mutation, zu einem vorzeitigen Abbruch der Translation nach den amino-terminalen *breast cancer carboxy-terminal* (BRCT) und *fork head associated* (FHA) Domänen ²⁹.

Diese seltenen Mutationen liegen alle zwischen den Nukleotiden 657 und 1142 und führen ebenso wie 657 Δ 5 zu einem trunkierten Proteinfragment. Keine der gefundenen Mutationen betrifft die BRCT- und FHA-Domänen.

1.4. Nibrin

1.4.1. Aufbau des p95-Nibrin

Das NBS-Genprodukt p95-Nibrin besteht aus 754 Aminosäuren und besitzt im aminoterminalen Bereich eine *breast cancer carboxy-terminal* Domäne (BRCT) sowie eine *fork head associated* Domäne (FHA) (Abbildung 3). Beide Domänen sind aus anderen Proteinen bekannt, und dort für Protein-Protein-Wechselwirkungen notwendig.

Experimentell konnte gezeigt werden, dass diese Bereiche die Zellzykluskontrolle und DNA-Reparatur beeinflussen und für die Phosphorylierung mehrerer Nibrin-Serine durch ATM notwendig sind. Nibrin wird an wenigstens vier verschiedenen Stellen durch die Kinase-Aktivität von ATM phosphoryliert^{30, 31}. Kann Nibrin aufgrund eingefügter Mutationen an Position 343 nicht phosphoryliert werden, arretiert nach Bestrahlung die DNA-Synthese nicht und es bilden sich keine diskreten nukleäre Foci (IRIF, *ionizing radiation induced foci*). Ebenso sind die entsprechenden Zellen strahlensensitiv^{32, 33}. Die Phosphorylierung von Nibrin durch ATM bringt den Mre11/Rad50/Nibrin-Komplex (MRN) mit dem ATM-Reaktionsweg in Verbindung und erklärt möglicherweise andere Übereinstimmungen zwischen Zellen, bei denen beide Kopien des ATM-Gens mutiert sind (Ataxia-Telangiectasia Zellen) und NBS-Zellen. So konnte gezeigt werden dass Nibrin auch eine Rolle bei der Aktivierung der Autophosphorylierung von ATM nach DNA-Schädigung spielt^{34, 35}.

Die FHA- und BRCT-Regionen sind entscheidend für die Wechselwirkung Nibrins mit dem Histon H2AX, welches essentiell für die Reparatur von Doppelstrangbrüchen (DSBs) ist³⁶. Am carboxy-terminalen Ende Nibrins liegt die Mre11-Bindungsdomäne^{37, 38}, wobei Nibrin-Mutanten, die diese Domäne nicht enthalten, Mre11 und Rad50 nicht zu nukleären Foci transportieren können. Weiterhin reguliert die Deacetylase SIRT1 die IR-induzierte Phosphorylierung (siehe auch Abbildung 3) indem sie Nibrin in einem, für die Phosphorylierung notwendigen, hypoacetylierten Zustand hält³⁹.

1.4.2. Funktion des Mre11/Rad50/Nibrin-Komplex

1.4.2.1. Aufbau des Mre11/Rad50/Nibrin-Komplex

Auf der Suche nach den humanen Homologen von DNA-Reparaturgenen der Hefe konnte das XRS2-Protein als Teil eines trimeren Komplexes isoliert werden ²¹, dessen andere Bindungspartner den menschlichen Homologen der Hefe Mre11 und Rad50 entsprachen. Der humane Mre11/Rad50/Nibrin-Komplex (MRN) entsprach dem Mre11/Rad50/Xrs2-Komplex der Hefe, wo er sowohl an der homologen Rekombination (HR) mittels Schwesterchromatid-Templates ohne Informationsverlust ^{40, 41} als auch am *non homologous end joining* (NHEJ) mit oftmals gekürzten DNA-Bereichen und daraus resultierenden potentiellen Mutationen von DNA-Doppelstrangbrüchen beteiligt ist ⁴².

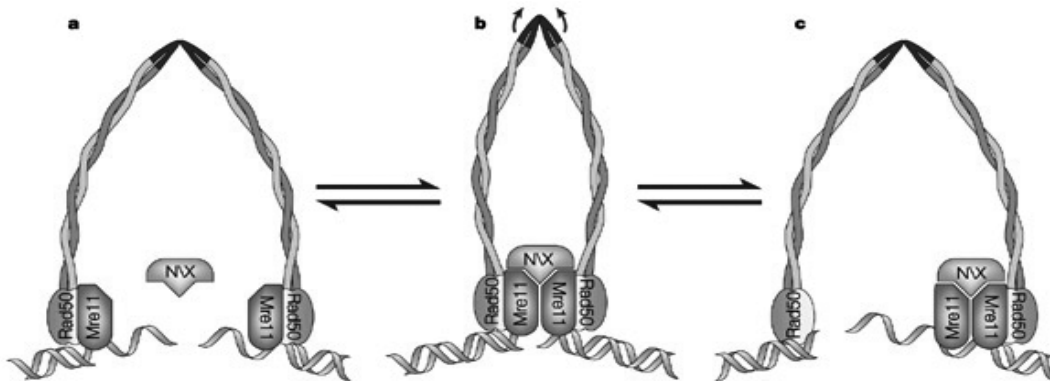


Abbildung 4: Der Mre11/Rad50/Nibrin-Komplex (MRN) besteht aus jeweils einem Rad50- und Mre11-Dimer und ist mit einem Nibrin bzw. Xrs2 assoziiert. Es ist anzunehmen dass das flexible Rad50-Dimer in a und c in geöffneter Konformation vorliegt. In b ist die *structural maintenance of chromosome proteins* Struktur (SMC) geschlossen ⁴³.

Elektronenmikroskopische und kristallographische Untersuchungen ⁴⁴⁻⁴⁶ ergaben eine brückenähnliche Struktur (Abbildung 4), wobei Mre11 das Kernelement des MRN-Komplexes bildet.

Experimente zur Rolle des Komplexes bei der DSB-Reparatur deckten eine Akkumulation von Doppelstrangbrüchen nach Entfernung von Mre11 an zellfreien Extrakten aus *Xenopus*-Oozyten auf ⁴⁷. Des Weiteren führte die Zerstörung des Mre11-Gens zu erhöhter Strahlensensitivität, Chromosomenbrüchen und Zelltod in Hühnerzellen ⁴⁸.

Das 80 kDa große, multifunktionelle Protein interagiert unabhängig mit Nibrin und Rad50, bildet Dimere bzw. Multimere ^{21, 38, 49, 50} und fungiert als ein DNA-Enden binden-

des Protein, wobei diese Aktivität wiederum von den Bindungspartnern Nibrin und Rad50 stimuliert wird⁵¹. Mre11 und Rad50 werden ebenfalls nach DNA-Beschädigung phosphoryliert, wobei die Phosphorylierung von Mre11 Nibrin-abhängig ist⁵². Die enzymatischen Funktionen von Mre11 umfassen eine Einzelstrang-Endonuklease und eine 3'-5' ds-Exonuklease^{51, 53}.

Das 150 kDa große Protein Rad50 gehört zur Klasse der *structural maintenance of chromosome proteins* (SMC). Es enthält jeweils ein Walker- und ein Nukleotid-Bindungsmotiv am N- und C-terminalen Ende⁵⁴. Diese werden über zwei *coiled-coil*-Strukturen verbunden in deren Mitte sich ein CXXC-Motiv befindet^{54, 55}.

Wie aus Abbildung 4 ersichtlich, existiert das SMC-Proteindimer Rad50 wahrscheinlich in einer geschlossenen sowie einer geöffneten Konformation. Dabei ist je ein Mre11-Monomer mit den Walker-Motiven des Rad50 assoziiert. In der offenen Konformation könnte das Mre11-Dimer entweder destabilisiert in zwei Monomeren vorliegen (Abbildung 4, a) oder als Dimer, allerdings nur verbunden mit einem Rad50-Molekül, vorliegen (Abbildung 4, c). Dies konnte mit Hilfe elektronenmikroskopischen Untersuchungen bestätigt werden⁴⁴.

Nibrin bindet das Mre11-Dimer unabhängig von Rad50^{50, 51}, wobei jedoch die genaue Position innerhalb des Komplexes nicht bekannt ist. Wahrscheinlich ist allerdings die Dimerisation von Mre11 für die Bindung Nibrins notwendig, so dass eine offene Struktur (Abbildung 4, a) zur Zerstörung der Nibrin-Bindungsstelle und somit zur Herunterregulierung der Nukleaseaktivität von Mre11 führt. Allgemein dient der trimere Komplex zur Doppelhelix-Entwindung, die bei der DNA-Reparatur von Bedeutung sein könnte. Der Nachweis dieser Aktivitäten *in vivo* wurde jedoch noch nicht erbracht.

1.4.2.2. Doppelstrangbruchreparatur und der Mre11/Rad50/Nibrin-Komplex

Die Rolle der Hefeproteine Mre11, Rad50 und Xrs2 bei der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) war bereits bekannt, allerdings stellte das p95-Nibrin Protein²¹ nicht das Homolog von Xrs2 dar sondern das funktionelle Ortholog. Petrini *et al.* zeigte dass der Mre11/Rad50/Nibrin-Komplex an der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen in menschlichen Zellen involviert war. Hierbei wurden bestrahlte Zellen mit Antikörpern gegen humanes Rad50, Mre11 oder Nibrin in der Immunfluoreszenz untersucht, wobei sich diskrete nukleäre Foci (IRIF, *ionizing radiation induced foci*) zeigten, die in unbestrahlten Zellen nicht vorkamen⁵⁵⁻⁵⁸. In NBS-Patientenzellen, die kein intaktes

Nibrin besitzen, konnten diese IRIFs nicht nachgewiesen werden. Die Beteiligung von Nibrin an der nukleären Translokation des MRN-Komplexes lässt eine funktionelle Äquivalenz von Nibrin und Xrs2 vermuten.

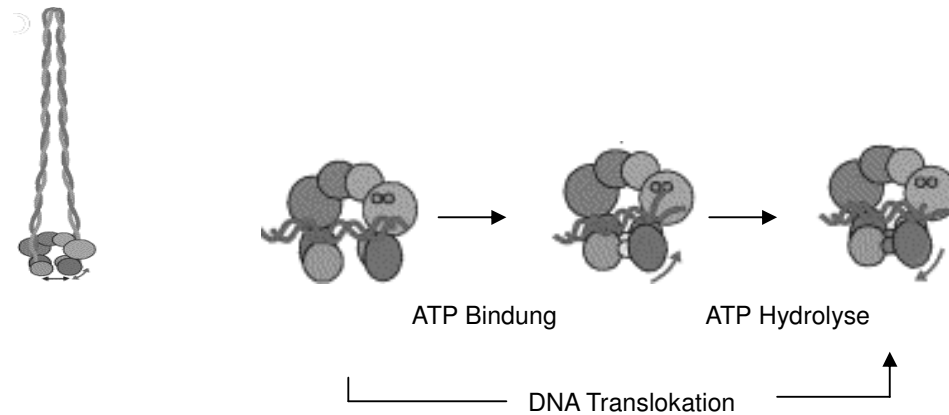


Abbildung 5: Beim Auftreten eines Doppelstrangbruches (DSB) binden zwei phosphorylierte Mre11-Moleküle an den Rad50-ATPase-Walker Domänen und formen einen heterotetrameren DNA-Prozessierungskopf am Ende der *coiled-coil*-Struktur M_2R_2 . Dieser Komplex führt zur dsDNA-Repositionierung und teilweisen Entwindung um die Spaltung durch Mre11 zu ermöglichen. Die Anwesenheit entwundener DNA und des MRN-Komplexes führt zur Phosphorylierung von ATM welches die Phosphorylierung von Mre11 und Nibrin induziert. Nach der Prozessierung des DSB am aktiven Zentrum des Mre11-Dimers induziert die ATP-Hydrolyse von Rad50 eine Konformationsänderung die die Entlassung des DNA-Moleküls ermöglicht

Ebenso scheint Nibrin für die intranukleäre Lokalisation des Komplexes verantwortlich zu sein während Rad50 und Mre11 enzymatische Aktivitäten besitzen.

Beim Auftreten eines DNA-Doppelstrangbruchs binden zwei Mre11-Moleküle an den Rad50-ATPase-Walker-Domänen und formen einen einzelnen heterotetrameren DNA-Prozessierungskopf am Ende der *coiled-coil*-Struktur M_2R_2 (Abbildung 5).

Dieser Komplex führt wiederum ATP-abhängig zu einer teilweisen dsDNA-Entwindung wobei die Mre11-3'-5'-Exonucleaseaktivität ebenfalls von ATP und Rad50 (allein oder in Kombination mit Nibrin) kontrolliert wird.

Ferner wurde gezeigt dass der MRN-Komplex für die Aktivierung von ATM-Dimeren sowie für seine eigene Phosphorylierung benötigt wird^{35, 59-62}. Hierzu assoziiert der MRN-Komplex die ATM-Dimere und die ssDNA⁶³. Die Phosphorylierung von ATM resultiert dann in der Phosphorylierung von Nibrin und Mre11 durch ATM, wobei die Phosphorylierung von Mre11 Nibrin-abhängig ist. Uziel et al. konnte hierzu nachweisen das ATM nach Induktion von DSBs in NBS-Zelllinien wesentlich geringer mit Chromatin assoziiert ist als dies bei Wildtyp MRN-Komplexen der Fall war³⁴.

Nibrin ist gleichfalls für die intranukleäre Lokalisation des MRN-Komplexes verantwortlich und erhält erst nach Dimerisation von Mre11 eine funktionelle Bindungsstelle. Nach der Prozessierung des DSB am aktiven Zentrum des Mre11-Dimers induziert die ATP-Hydrolyse von Rad50 eine Konformationsänderung die die Entlassung des DNA-Moleküls ermöglicht (Abbildung 5).

1.4.2.3. Die Rolle Nibrins bei der Zellzykluskontrolle

Bei DNA-Schädigungen ist es für das Überleben der Zelle essentiell den Zellzyklus vorübergehend zu stoppen, um eine Reparatur der betroffenen DNA-Abschnitte durchzuführen. Störungen des Zellzykluses wurden in NBS-Patientenzellen vielfach beobachtet. Die Bedeutung von Nibrin im G1/S-Kontrollpunkt ist kontrovers, obwohl in NBS-Zellen mehrfach eine verminderte bzw. verzögerte p53-Akkumulation nach Röntgenbestrahlung beobachtet wurde^{13, 20, 64}. Dies führt nachfolgend zu einer Reduktion von p21, welches als Inhibitor zyklinabhängiger Kinasen für den G1/S-Übergang von Bedeutung ist⁶⁵. Die daraus resultierende Defizienz im G1/S-Kontrollpunkt wurde in lymphoblastoiden NBS-B-Zellen beschrieben^{13, 66}, konnte jedoch in NBS-Fibroblasten nicht bestätigt werden⁶⁷. Ebenso widersprüchliche Ergebnisse ergaben die Untersuchungen an Mausfibroblasten mit hypomorpher Mutation am Nbn-Gen.

Einerseits zeigte die p21-Akkumulation in bestrahlten Zellen keine Veränderung gegenüber den Kontrollzelllinien⁶⁸, andererseits zeigte sich in unbestrahlten Mauszellen eine höhere Expression von p21 und, somit einen, verglichen mit Kontrollzelllinien, stärkeren Arrest beim G1/S-Übergang⁵. Ebenso wiesen primäre NBS-Fibroblasten fehlerhafte G1/S-Kontrollpunkte bei niedrigen, jedoch nicht bei höheren Bestrahlungsdosen auf⁶⁹. Die Zellzykluskontrolle in NBS-Zellen ist ebenfalls während der S-Phase beeinträchtigt, da die regulierte Unterdrückung der DNA-Synthese nach einer mutagenen Belastung nicht stattfindet. Dieses Regulationversagen tritt in NBS- und AT-Zellen auf und wird als radioresistente DNA-Synthese (RDS) bezeichnet. Normalerweise inaktiviert Chk2 die Phosphatase Cdc25A, welche ihrerseits für die Aktivierung von Cdk2 und Cyclin E notwendig ist und somit einen Stopp der DNA-Synthese bewirkt. Der MRN-Komplex ist hierbei nicht involviert^{70, 71}. Bei NBS-Patientenzellen kann ATM wahrscheinlich aufgrund der fehlenden BRCT- und FHA-Domänen die Nibrin-Serinreste nicht phosphorylieren^{30-32, 72} was zu einer Inaktivierung des Signaltransduktionsweges führt. Zellen, die mit DNA-Schäden in die G2-Phase eintreten werden vor dem Eintritt in die Mitose am

G2/M-Kontrollpunkt arretiert bis die Reparatur abgeschlossen ist. Ein auf DNA-Schädigung folgender Arrest des Zellzykluses in der G2-Phase deutet auf einen intakten G2-Kontrollpunkt hin, während ein übermäßig langes Verweilen in der G2-Phase jedoch als Ausdruck nicht reparierter Schäden gewertet wird. Treten geschädigte Zellen aus der G2-Phase direkt in die Mitose ein, indiziert dies einen defekten G2/M-Kontrollpunkt. Ähnlich kontrovers wie beim G1/S-Kontrollpunkt ist die experimentelle Datenlage beim G2/M-Kontrollpunkt von NBS-Zellen. Untersuchungen an Mausfibroblasten mit hypomorpher Nbn-Mutation nach IR zeigen, dass es einerseits zu einem unregelmäßigen Übertritt von der G2 in die Mitosephase kommt⁶⁸ und andererseits in einer Akkumulation von Zellen in der G2-Phase resultiert⁵. Dagegen wurde in EBV-transformierten NBS-Patientenlymphozyten ebenso ein normaler G2/M-Übergang⁷³ gefunden wie in primären NBS-Patientenfibroblasten⁶⁹. Nur in SV40-transformierten NBS-Patientenfibroblasten fand Ito *et al.* eine Akkumulation von Zellen in der G2-Phase und interpretierte dies als Folge der gestörten DNA-Reparatur⁷⁴. Später konnte Demuth *et al.* anhand einer NBS1-Nullmutante zeigen, dass Nibrin für die Aufrechterhaltung des G2/M-Checkpointes notwendig ist⁷⁵. Trotz der teilweise widersprüchlichen Ergebnisse zur Kontrolle des Zellzyklus gilt RDS als eines der Hauptmerkmale des zellulären NBS-Phänotyps.

1.4.3. Trunkierte Proteinfragmente der 657 Δ 5-Mutation

Obwohl vollständiges, intaktes Nibrin in NBS-Zellen erwartungsgemäß nicht vorkommt, kann sowohl in Patientenzelllinien als auch in Zelllinien mit NBS1-Mutationen auf nur einem Allel (Heterozygoten) ein 26 kDa amino-terminales Nibrinfragment (p26-Nibrin) nachgewiesen werden (Abbildung 3). Aufgrund der 657 Δ 5-Mutation kommt es zu einer Leserasterverschiebung, wobei die korrespondierende mRNA ein 26 kDa-Nibrin mit 15 carboxy-terminalen Nibrinfremden Aminosäuren kodiert⁷⁶.

In EBV-transformierten B-Zelllinien wurde in geringeren Quantitäten ein 70 kDa C-terminales Fragment (p70-Nibrin) nach Immunpräzipitation gefunden (Abbildung 3). Hier findet die Translationsinitiation an zwei Startcodons vor der Deletion statt (Abbildung 6, ATG Codons an Position 602, Met1 und 627, Met2), die erst durch die Verschiebung in das Nibrin-Raster gebracht werden⁷⁶. Die an diesen Codons initiierte Translation führt zu einem Protein mit 555 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 63 kDa, das jedoch mit einer Größe von 70 kDa im SDS-Gel läuft. Weitere trunkierte Proteine

wurden auch in Zellen mit anderen NBS1-Mutationen, wie den Deletionen 835 Δ 4 und 900 Δ 25^{28, 76} sowie der Insertion 742insGG²⁷, gefunden.

```

          *****
wt NBS1  TGATGAACCATCTATTGGAAGTAAAAATGTTGATCTGTCTCAGGACGGCAGGAAGAAAACAAATCTTCAAAGGGAAAAACATTTATATTTTGAATGCCAAAC
          D E P S I G S K N V D L S G R Q E R K Q I F K G K T F I F L N A K

657del5  TGATGAACCATCTATTGGAAGTAAAAATGTTGATCTGTCTCAGGACGGCAGGAAGAAA-----TCTTCAAAGGGAAAAACATTTATATTTTGAATGCCAAAC
NBS1     M N H L L E V K M L I C Q D G R K E I F K G K T F I F L N A K

```

Abbildung 6: Wildtyp NBS1 und 657 Δ 5 NBS1-Sequenz. Die ATG-Startcodons sind unterstrichen, die deletierten Basen ACAA sind mit Sternchen gekennzeichnet. Die Translationsinitiation in EBV-transformierten B-Zelllinien findet an den zwei ATG-Startcodons an Position 602, Met1 und 627, Met2 vor der Deletion statt, die erst durch die Verschiebung in das Nibrin-Raster gebracht werden, d.h. durch Translation von einem der unterstrichenen alternativen Startcodons aus wird der ursprüngliche Leserahmen wieder hergestellt⁷⁶. Die Translationsinitiation an diesen Codons führt zu einem Protein mit 555 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 63 kDa das jedoch mit einer Größe von 70 kDa im SDS-Gel läuft.

Die Expression dieser Proteinfragmente könnte erklären, warum Nibrin-Mutationen beim Menschen mit dem Leben vereinbar sind, während sie sich in *knock-out* Mäusen, die kein trunkiertes p70-Nibrin aufweisen, in der frühen embryonalen Phase letal auswirken^{77, 78}. Letalität tritt bei Mäusen ebenso bei der Inaktivierung von Mre11⁷⁹ und Rad50⁸⁰ auf. Im Gegensatz hierzu waren *knock-out* Mäuse die das trunkierte NBS-Proteinfragment produzierten lebensfähig^{5, 68}, wiesen aber einige typische Symptome humanen NBS auf.

Trotz der Restfunktion des p70-Nibrin zeigen Patienten wie *knock-out* Mäuse Sensitivität gegenüber ionisierender Strahlung (IR)^{5, 68}. Dies ist möglicherweise auf die fehlende Phosphorylierung von p70-Nibrin durch ATM zurückzuführen^{30, 31}. Die Kinase ATM, die in Patienten mit dem Chromosom-Instabilitäts-Syndrom Ataxia Telangiectasia (AT) nicht vorkommt, benötigt zur Phosphorylierung des Nibrin-Serins 343 die FHA- und BRCT-Domänen⁸¹ die vollständig auf dem p26-Nibrin-Fragment liegen (Abbildung 3).

Die FHA- und BRCT-Domänen sind weiterhin für die Wechselwirkung Nibrins mit dem Histon H2AX notwendig, welches unmittelbar nach dem Einfluss von IR an den Orten der DSBs phosphoryliert wird³⁶. Somit scheint das Fehlen der FHA- und BRCT-Region bei p70-Nibrin dessen Assoziation mit H2AX zu unterbinden, welche die Voraussetzung für die Phosphorylierung durch ATM sowie die Akkumulation des MRN-Komplexes darstellt. Auf zellulärer Ebene zeigten Demuth *et al.* die essentielle Funktion von Nibrin für die Lebensfähigkeit und in diesem Zusammenhang noch wichtiger, die Fähigkeit von p70-Nibrin, Nbn-Nullmutanten Mausfibroblasten das Überleben zu ermöglichen⁷⁵.

2. Aufgabenstellung

Das Nijmegen Breakage Syndrom (NBS) zählt zu einer Gruppe monogener Krankheiten, deren zugrundeliegenden Gene in die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) einbezogen sind. Die entsprechenden Genprodukte bilden im Zellkern einen Komplex aus Mre11, Rad50 und Nibrin, dem NBS1-Genprodukt. Die Kennzeichen der autosomal-rezessiven NBS-Erkrankung sind eine Überempfindlichkeit gegenüber ionisierenden Strahlen, Chromosomeninstabilität sowie eine Prädisposition für lymphoretikuläre Malignome. Zusätzlich zeichnet sich die Erkrankungen durch eine Immundefizienz aus, ein Hinweis darauf, dass das NBS1-Gen auch in die Differenzierung der immunkompetenten Zellen einbezogen ist.

Mehr als 90 % aller NBS-Patienten sind homozygot für die hypomorphe 5bp-Deletion 657Δ5 die zu einem verkürzten Protein von ca. 70 kDa (p70-Nibrin) in Patientenzelllinien führt. Die klinische Variabilität ist beträchtlich und kann nicht auf Unterschieden im NBS1-Gen beruhen. Somit stellt die Analyse der NBS-Funktion einen wichtigen Beitrag zum Verständnis klinischer Variabilität dar und ist ein ideales Modell, um Einsicht in modifizierende Faktoren zu gewinnen.

Die Nibrinfragmente haben eine teilweise erhaltene Restfunktion, so dass Unterschiede in der Quantität des p70-Nibrins für die Variabilität verantwortlich sein könnten. Dies könnte erklären weshalb NBS-Mutationen des Menschen mit dem Leben vereinbar sind während *knock-out* Mäuse, die in dem entsprechenden Gen Null-Mutationen besitzen, bereits im Embryonalstadium absterben⁷⁸.

Dementsprechend bestand ein wesentliches Ziel der Arbeit in der Quantifizierung des verkürzten NBS-Proteins, p70-Nibrin, an allen zur Verfügung stehenden Patientenzelllinien mit der homozygoten 657Δ5 Mutation.

Da die Expressionsstärke des p70-Nibrinproteins einen signifikanten Effekt auf den zellulären sowie auch den klinischen Phänotyp haben könnte wurden die vorhandenen lymphoblastoiden Zelllinien auf die Expressionsvarianz dieses Fragments hin untersucht. Die Quantifizierung des trunkierten p70-Nibrins wurde mit Hilfe der Immunpräzipitation durchgeführt.

Des Weiteren konnte bisher der Nachweis des p70-Nibrinfragments in nativen homo- und heterozygoten Lymphozyten von Patienten bzw. Trägern mit der Gründermutation

nicht erbracht werden. Daher wurde die Analyse heterozygoter Lymphozyten aus Blutproben angestrebt.

Um weitere mögliche Faktoren und deren Stoffwechselwege zu identifizieren, die zu der erheblichen klinischen Variabilität der homozygoten NBS-Patienten führen wurden Unterschiede in der Genexpression zwischen Kontroll- und Patientenzelllinien unter Verwendung von *cDNA-microarrays* ermittelt und mittels *real-time* PCR verifiziert.

Die Analyse der Radiosensitivität der NBS-Zelllinien sollte weitere Differenzen zwischen den einzelnen Patientenzelllinien aufzeigen, da unterschiedliche Mengen an p70-Nibrin eine differentielle Strahlensensitivität der Patientenzelllinien bedingen könnten.

Abschließend sollten die klinischen Charakteristika der homozygoten NBS-Patienten sowie der großen Anzahl nicht betroffener Kontrollen (Familienmitglieder) und die experimentellen Ergebnisse die an den lymphoblastoiden Patientenzelllinien gewonnen wurden hinsichtlich möglicher Korrelationen untersucht werden.

3. Material

3.1. Chemikalien und Verbrauchsmittel

3.1.1. Zellkultur

Bleomycin	Medac GmbH
Colcemid	Gibco
Penicillin/Streptomycin	PAA
Coulter Glenz Cleaning Agent	Beckman
DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium)	PAA
FKS (fetales Kälberserum)	PAA
Isotonische Lösung: Isoton [®] II	Beckman
Natrium-Pyruvat-Lösung	Sigma
Phytohemagglutinin (PHA-L)	Biochrom AG
RPMI-1640 mit L-Glutamin	PAA
Trypsin-EDTA	PAA
Gewebskulturflaschen	Falcon

3.1.2. Immunpräzipitation und Western Blot

2-Mercaptoethanol	Sigma
Blockierungsreagenz, Roti-Block	Roth
DTT (Dithiothreitol)	Fermentas
Dynabeads Protein A	Dynal
Complete Mini	Roche
Dynabeads Protein G	Dynal
ECL [™] -Western Blot Detektionssystem Lsg. 1 und 2	Amersham
EDTA (Ethylendiaminotetraessigsäure)	Merck
Gel-Blotting-Papier	Schleicher & Schuell
Glycerophosphat	Aldrich
Hybond ECL [™] , Nitrocellulose Membran	Amersham
Immobilon-P, PVDF Membran	Millipore
Magnetic Particle Concentrator	Dynal
NaPi	Aldrich

Natriumfluorid, NaF	Aldrich
NuPage 4-12 % Bis-Tris Gradienten Gel	Invitrogen
NuPage Antioxidant	Invitrogen
NuPage LDS Sample Puffer	Invitrogen
NuPage MOPS SDS Running Buffer	Invitrogen
NuPage Sample Reducing Agent	Invitrogen
NuPage Transfer Buffer	Invitrogen
PMSF	Sigma
Ponceau S-Lösung	AppliChem
Protease Inhibitor, Complete Mini Tablets	Roche
Protein Ladder, prestained	Fermentas
Protein Molecular Weight Marker, BlueRanger	Pierce
Protein Molecular Weight Marker, Rainbow™	Amersham
Proteinauftragspuffer, Roti-Load, reduzierend	Roth
Scientific Imaging Film, X - OMAT™	Kodak
Sepharose, GammaBind Plus	Amersham
Triton-X-100	Roche
Entwicklerlösung G138i	Agfa
Fixierkonzentrat Adefofix	Adefo Chemie
Bradford Färbelösung	USB

3.1.3. Primer

Real-time PCR:

Surv_realtime2f	5`-cca ctg aga acg agc cag ac- 3`
Surv_realtime2r	5`-gcg caa ccg gac gaa tgc tt- 3`
Tcf3_realtimf	5`-gag aag ccc cag acc aaa ct- 3`
Tcf3_realtimer	5`-agg ctg ctt tgg gat tca gg- 3`
Ziz_realtimf	5`-acc agc tcg agt atc agg aa- 3`
Ziz_realtimer	5`-aag acg ctc gtc ttc tcc tc- 3`
Surv_realtime2f	5`-cca ctg aga acg agc cag ac- 3`
Surv_realtime2r	5`-gcg caa ccg gac gaa tgc tt- 3`
Tcf3_realtimf	5`-gag aag ccc cag acc aaa ct- 3`

Tcf3_realtimer	5`-agg ctg ctt tgg gat tca gg- 3`
Ziz_realtiméf	5`-acc agc tcg agt atc agg aa- 3`
Ziz_realtimer	5`-aag acg ctc gtc ttc tcc tc- 3`
Nalp2_realtiméf	5`-ctc ttc gag gtc aca aga ct- 3`
Nalp2_realtimer	5`-ccg aga tat cgc agg tta ca- 3`
Ndrg1_realtiméf	5`-gtt gag atc cag tgg cag ttg- 3`
Ndrg1_realtimer	5`-cag gtt cag cta cta ctg agt tc- 3`
Eif_1a_realtiméf	5`-tct gta gcc agc ctc ttc- 3`
Eif_1a_realtimer	5`-gat gac agc ctc gtg aga c- 3`
Tnfaip2_realtiméf	5`-gga aga cag aac tgg aag ag- 3`
Tnfaip2_realtimer	5`-cctg gat gtg acg tct aat g- 3`
Hprt_realtiméf	5`-gag gat ttg gaa agg gtg ttt att c- 3`
Hprt_realtimer	5`-aca atg tga tgg cct ccc a- 3`
GAPDH_F	5`-tac cag gaa atg agc ttg ac- 3`
GAPDH_R	5`-cat gtt tgt cat ggg tgt ga- 3`

Sequenzierung:

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

3.1.4. PCR, RT PCR, Sequenzierung und real time quantitative PCR

Reaktionspuffer	Invitrogen
MgCl	Invitrogen
dNTPs	Rapidozym
Cy3-dUTP	Amersham
Taq	Solis Biodyne
Reverse Transkriptase M-MLV Enzym	Invitrogen
Radom Hexamer Primer	Invitrogen
Big Dye	Perkin Elmer
SYBR® Green PCR Master Mix	Applied Biosystems

3.1.5. Sonstiges

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

3.1.6. Antikörper

3.1.6.1. Primäre Antikörper

Anti-Mre11 12D7, Monoklonal	GeneTex
Anti-p95-Nibrin/NBS1 1D7, Monoklonal	GeneTex
Goat-anti-Nibrin, C19, Polyklonal, sc 8580	Santa Cruz
Goat-anti-Nibrin, H300, Polyklonal, sc 11431	Santa Cruz
Goat-anti-Nibrin, N19, Polyklonal, sc 8579	Santa Cruz
Rabbit-anti-p95-Nibrin Mre11, Polyklonal	Novus

Rabbit-anti-p95-Nibrin/NBS1, Polyklonal	Novus
Rabbit-anti-Rad50, Polyklonal	Novus

3.1.6.2. Sekundäre Antikörper

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

3.2. Lymphoblastoide Zelllinien und Fibroblasten

LCL	Genotyp	Blut	Genotyp	Kontrollen	Fibroblasten	Genotyp
94P195	del5/del5	04P0673	+/del5	94P120	2345	insGG/insGG
94P118	del5/del5	04P0585	+/del5	96P125	1773	+/insGG
JaCe	del5/del5	04P0586	+/del5	95P466	1774	+/insGG
95P558	del5/del5	04P0587	+/del5	94P197		
RoZd	del5/del5	04P0689	+/del5	98P651		
95P511	del5/del5	04P0690	+/del5	1092		
95P463	del5/del5	04P0691	+/del5			
96P476	del5/del5	04P0313	+/del5			
95P182	del5/del5	04P0014	+/del5			
97P614	del5/del5	04P0015	+/del5			
94P112	del5/del5	03P0786	+/del5			
97P610	del5/del5	03P0787	del5/del5			
94P496	del5/del5	03P0784	+/del5			
94P248	del5/del5	00P0795	+/del5			
94P307	del5/del5	04P0918	+/del5			
94P251	del5/del5	04P0919	+/del5			
89P319	del5/del5	04P0921	del5/del5			
94P126	del5/del5	04P0917	+/del5			
95P185	del5/del5	04P0920	+/del5			
98P055	del5/del5					
94P247	del5/del5					
97P081	del5/del5					
97P082	del5/del5					
94P548	del5/del5					
94P196	del5/del5					
96P473	del5/del5					

3.3. Verwendete Kits

Big Dye Terminator Kit	Applied Biosystems
Plasmid Midi Kit	Qiagen
Qiaquick PCR Purification Kit	Qiagen
DyeEx™ Spin Kit	Qiagen
Microcon®-PCR Centifugal Filter Devices	Millipore

3.4. Geräte

3.4.1. Inkubationssysteme

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

3.4.2. Elektrophorese- und Blotsysteme

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

3.4.3. Zentrifugen

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

3.4.4. Sonstige Geräte und Software

I-Cyclers	BioRad
Mikroskop Telaval 31	Zeiss
GeneQuant II	Pharmacia Biotech

Mikroskop Axiophot	Zeiss
ScanMaker 9800XL TMA1600	Microtek
Roller, RM5	Assistent
VortexGenie2	Scientific Industries
pH-Meter MP 220	Mettler Toledo
Thermo-Cycler PTC-220	MJ Research
Sequenzierer 3100 Genetic Analyzer	AB/Hitachi
Feinwaage BP 3100 S	Sartorius
Feinwaage M2P	Sartorius
Machlett OEG-60 Röntgenröhre	Machlett Inc.
UV/VIS Spectrophotometer Lambda 2	Perkin Elmer
Sterilbank LaminAir HBB 2448	Heraeus
Fireboy Plus	Integra Bioscience
Pipetboy Plus	Integra Bioscience
Coulter Z2 Particle Count & Size Analyzer	Beckman
Magnetic Particle Concentrator	Dynal
7500 Real Time PCR Systems	Applied Biosystems
SilverFast Ai Scan Software	LaserSoft Imaging
Endnote 6.0	Thomson Res. Soft
Sigma Plot 8.0	SPSS
SPSS 12.0	SPSS
Sequencing Analysis 3.7 Software	Applied Biosystems
Image Quant 5.2	Molecular Dynamics
Photoshop 6.0	Adobe
Office Pack	Microsoft
7500 System SDS Software	Applied Biosystems

Alle Chemikalien wurden in der Qualität „reinst“ oder *analytic grade* bezogen. Das verwendete Wasser entstammte einer Reinstwasseranlage der Firma MILLIPORE (Milli Q).

4. Methoden

4.1. Mutationsanalyse

4.1.1. DNA-Extraktion und PCR

Parallel zur Untersuchung der zellulären Variabilität der 28 homozygoten lymphoblastoiden Zelllinien wurden diese auf die 657 Δ 5 Mutation hin untersucht.

Pro Zelllinie wurde je 1 ml Zellsuspension (\sim Zellzahl $6-9 \times 10^5$ / ml), in Eppendorfgefäße überführt und für 2 min bei 2.000 rpm und nachfolgend für 30 sec bei 14.000 rpm zentrifugiert (Tischzentrifuge, Eppendorf). Der Überstand wurde verworfen, dem Pellet 2,5 μ l Proteinase K zugegeben und die Zellen in 30-50 μ l Lysepuffer resuspendiert und für 1 h bei 37 °C und nachfolgend für 10 min bei 85 °C inkubiert. Die anschließende Zentrifugation erfolgte für 10 min bei 14.000 rpm. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und bei -20 °C eingefroren.

10-fach Lysepuffer

5 M NaCl
0,1 M Tris
0,1 M HCl
0,5 M EDTA (pH 8,0)
20 % NP-40

Vor der Verwendung des Lysats wurde dieses auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert um die Ausfällung eventueller SDS-Rückstände zu ermöglichen. Für die PCR-Reaktion wurden ca. 2,0 μ l des Überstandes verwendet.

PCR Zyklus

5'	95 °C	34 x
30"	95 °C	
30"	53 °C	
40"	72 °C	
10'	72 °C	
∞	4 °C	

PCR-Ansatz

2,0 μ l	DNA
2,5 μ l	PCR 10x Reaktionspuffer
0,75 μ l	MgCl ₂ 50 mM
2,0 μ l	dNTPs 10 mM
0,5 μ l	Primer F (10 μ M)
0,5 μ l	Primer R (10 μ M)
0,2 μ l	Taq Pol (50 U/ μ l)
16,55 μ l	ddH ₂ O
<hr/>	
25,0 μ l	Reaktionsvolumen

Ein 1,5 % Agarosegel wurde für die Auftrennung der PCR-Produkte verwendet. Der Gellauf fand bei 120 V für ca. 30 min statt (Gelkammer: Renner GmbH, Darmstadt).

4.1.2. Reinigung der PCR-Produkte und Sequenzreaktion

Zur Entfernung von Primern und ungebundenen dNTPs wurde das PCR-Produkt in das Probenreservoir der Millipore-Säule (Microcon®-PCR Centifugal Filter Devices) gegeben und auf 500 µl mit ddH₂O aufgefüllt, die Säule auf die Milliporegefäße gesetzt und für 15 min bei 5.000 rpm zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen und die Millipore-Säule umgedreht auf ein neues Eppendorfgefäß gesetzt, 40 µl ddH₂O dazupipetiert und 2 min bei 400 rpm zentrifugiert um die DNA aus der Membran zu lösen. Die Säule wurde verworfen und das gereinigte PCR-Produkt für den Sequenzierungsansatz verwendet.

Sequenzierungs-Zyklus

10"	96 °C	25 x
10"	96 °C	
5"	50 °C	
4'	60 °C	
∞	12 °C	

Sequenzreaktionsansatz

2,0 µl	Big Dye™ (Perkin Elmer)
4,0 µl	2,5 x Puffer
2,0 µl	Primer
3,0 µl	gereinigtes PCR-Produkt
10,0 µl	ddH ₂ O
<hr/>	
20,0 µl	Reaktionsvolumen

Zur Entfernung der ungebundenen Big Dye-Terminatoren der Sequenzreaktion wurden die Säulen des DyeEx™ Spin Kit kurz gevortext, der untere Flügel abgebrochen und die Säulen in Eppendorfgefäßen für 3 min bei 3.000 rpm zentrifugiert. Das Sequenzreaktionsprodukt wurde auf die schräge Geloberfläche der Säulen getropft und diese wiederum für 3 min bei 3.000 rpm zentrifugiert.

Die auf Sanger beruhende Kettenabbruchmethode⁸² wurde mit dem Kapillarsequenziergerät 3100 (Applied Biosystems) und dem *Big-dye™ Terminator Kit* (Applied Biosystems) durchgeführt. Dabei werden neben den unmarkierten Nukleotiden auch fluoreszenzmarkierte ddNTP's (2', 3'-Dideoxy-ribonucleosid-5'-triphosphat) in den Nukleotidstrang eingebaut. Der statistische Einbau der mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierten Nukleotide bewirkt durch das Fehlen der 3'-OH-Gruppe einen Kettenabbruch während der Sequenzreaktion.

Die Auswertung der Ergebnisse wurde mittels der Sequencing Analysis 3.7 Software (Applied Biosystems) vorgenommen.

4.2. Analyse der Wachstumseigenschaften von NBS-Patientenzellen

Zur Analyse der Wachstumseigenschaften der LCL's wurden Kulturen mit einer Dichte von $0,5 \times 10^5$ Zellen / ml in RPMI 1640 (PAA) Medium mit 10 % fötalem Kälberserum

(PAA) und 1.000 U / L Penicillin / 1 mg / L Streptomycin (PAA) in einem Gesamtvolumen von 40 ml in Gewebekulturflaschen (Falcon) angesetzt. Die Zellzahl wurde 2-tägig über 18 Tage im Coulter Counter (Beckman) gemessen. Dabei wurden 200 µl der resuspendierten Zellsuspension in 10 ml isotonische Lösung (Isoton II, Beckman) überführt woraus sich eine Verdünnung von 1:50 ergab. Die ermittelte Zellzahl wurde mit 100 multipliziert, da das Messvolumen lediglich 0,5 ml betrug. Jede Zelllinie wurde insgesamt dreimal gemessen.

4.3. Charakterisierung der Strahlensensivität der NBS-Patientenzelllinien

Zur Analyse der Radiosensitivität der NBS-Zelllinien wurden die Messungen an logarithmisch wachsenden Zellen nach dem *colony survival assay* (CSA)^{83, 84} durchgeführt. Die Bestrahlung der NBS-Patientenzelllinien wurde an einer Machlett OEG-60 Röntgenröhre im Zentrum für biomedizinische Nanotechnologie an der Klinik für Strahlenheilkunde der Charité mit 100 kV, 10 mA und einer Dosisleistung von 2,07 Gy / min durchgeführt.

Hierzu wurden 1,5 ml ($1,0 \times 10^5$ Zellen / ml) einer logarithmisch wachsenden Zellkultur in Gewebekulturflaschen bestrahlt. Es wurden je zwei Ansätze pro Probe (0 Gy je vier Ansätze) mit 0 Gy, 0,5 Gy, 1,0 Gy, 1,5 Gy, 2,0 Gy, 3,0 Gy und 4,0 Gy bestrahlt und die Zellen unmittelbar danach mit dem Coulter Counter gezählt. Von diesen Zellzahlen ausgehend wurden jeweils 400 Zellen in Mikrotiterplatten überführt und bei 37 °C inkubiert. In den nachfolgenden Tagen wurden die Kolonien quantifiziert.

4.4. Genexpression

4.4.1. RNA-Isolierung

Zur Analyse der Genexpression wurden 50 ml einer exponentiell wachsenden LCL-Kultur (ca. $5-10 \times 10^7$ Zellen) pelletiert und mit 10 ml Trizol-Reagenz per Vortex resuspendiert. Nach 5-minütiger Inkubation erfolgte die Zugabe von 2 ml Chloroform. Das Lysat wurde für 2-5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und anschließend für 20 min bei 5.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die RNA-enhaltende, transparente, obere Phase wurde transferiert und zur Präzipitation der RNA mit 5 ml Isopropanol gemischt. Die Lösung wurde für 5-10 min bei RT inkubiert und für 10 min bei 10.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 70 %igem Ethanol

gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das RNA-Pellet luftgetrocknet und in 500 µl DEPC (Diethylpyrocarbonat) behandeltem Wasser aufgenommen.

Zur Aufhebung der Sekundärstrukturen wurde die isolierte RNA für 2 min auf Eis, und anschließend für 5 min bei 65 °C inkubiert. Die Konzentration wurde bei 260 nm und 280 nm aus einer 1:100 Verdünnung photometrisch bestimmt (GeneQuant II, Pharmacia Biotech), wobei 1 OD_{260 nm} 40 µg RNA / ml entspricht. Der Reinheitsgrad wurde aus dem Quotienten OD_{260 nm} / OD_{280 nm} ermittelt und lag zwischen 1,7 und 2,0. Die isolierte RNA wurde vor der DNase-Behandlung zur qualitativen Überprüfung in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt.

4.4.2. cDNA-Synthese

Die cDNA wurde durch direkte Inkorporation fluoreszenter Nukleotidanaloga während der reversen Transkription (vgl. 4.5.2) generiert. Es wurden jeweils drei Patienten-mRNAs mit drei Kontroll-mRNAs gleichen Geschlechts gepoolt um die Effekte individueller Variationen in den mRNA-Expressionen zu reduzieren die unabhängig von der NBS-Mutation auftreten. Pro Probe wurden 25 µg Gesamt-RNA unter Einsatz von *random hexamer primer* sowie 100 µM Cy3-dUTP (Amersham), 200 µM dTTP und 500 µM dATP, dCTP, dGTP (Roche) markiert. Abschließend wurde die markierte cDNA mittels Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen) gereinigt.

4.4.3. *microarray*-Hybridisierung

Die markierten cDNAs wurden nachfolgend in einer Hybridisierungslösung re-suspendiert. Die Reaktionslösung wurde für 3 min bei 95 °C denaturiert und auf Eis gelagert. Die Hybridisierung auf dem DNA-Lymphozytengen-Chip mit 17.000 cDNAs aus lymphatischen Geweben fand bei 42 °C für 16 h statt. Nicht hybridisiertes Material wurde mit 0,2 x SSC und 0,01% SDS sowie zweimal mit 0,2 x SSC für jeweils 5 min entfernt.

Hybridisierungslösung

50 %	Formamid
0,5 %	SDS
6 x	SSC
5 x	Denhardts Lösung
1 µl	poly(dA) 1 µg / µl
1 µl	human Cot-I DNA 1,25 µg / µl

SSC

150 mM	NaCl
15 mM	Natriumcitrat (pH 7,0)

4.5. Verifizierung der *microarray*-Ergebnisse mittels *real-time* PCR

4.5.1. Gesamt-RNA-Isolierung, Gelelektrophorese und DNase-Behandlung

Die Gesamt-RNA-Isolierung wurde mit Trizol-Reagenz durchgeführt (vgl. 4.4.1), die RNA in DEPC-behandeltem Wasser aufgenommen und bei -80 °C gelagert.

Die Konzentration wurde photometrisch bestimmt und $1\text{ }\mu\text{g}$ RNA zur qualitativen Überprüfung in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt. Um mögliche DNA-Reste vollständig aus der isolierten RNA zu entfernen, wurden diese einer DNase-Behandlung, entsprechend dem Invitrogen-Protokoll, unterzogen. Der Ansatz wurde für 15 min bei 25 °C inkubiert. Anschließend wurde zur Inaktivierung der DNase I $1\text{ }\mu\text{l}$ EDTA (25 mM) zugegeben und der Ansatz für weitere 10 min bei 65 °C inkubiert. Um von jeweils gleichen RNA-Konzentrationen für die anschließende Umschreibung ausgehen zu können, wurden bereits zur DNase-Behandlung jeweils $2\text{ }\mu\text{g}$ RNA eingesetzt. Von allen Proben wurden zwei Ansätze hergestellt.

4.5.2. Reverse Transkription (RT)

Bei der reversen Transkription wird die Eigenschaft des Enzyms Reverse Transkriptase M-MLV genutzt, das mittels einer RNA-Vorlage und der verwendeten *radom hexamer primer* (zufällige Sequenz) die komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert. Durch den Einsatz von *random hexamer primer* wird die Gesamt-RNA in ihrer gesamten Länge umgeschrieben. Für alle Proben wurde je ein Ansatz ohne Reverse Transkriptase als Leerwertkontrolle zur Überprüfung auf DNA-Kontaminationen angesetzt. Zur Eliminierung von RNA-Sekundärstrukturen wurden die Proben für 5 min bei 56 °C inkubiert und anschließend sofort wieder auf Eis gestellt.

RT-Bedingungen:

10'	20 °C
40'	42 °C
8'	99 °C
∞	4 °C

Reaktionsansatz:

4,0 μl	RNA
1,0 μl	M-MLV 200 U/ml
2,0 μl	PCR Reaktionspuffer (10x)
4,0 μl	MgCl ₂ (25 mM)
8,0 μl	dNTPs (10 mM)
1,0 μl	Random Primer (3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
<hr/>	
20,0 μl	Reaktionsvolumen

Bei einem RT-Ansatz von insgesamt $20\text{ }\mu\text{l}$ entsprach dies einer umgeschriebenen cDNA-Konzentration aus $100\text{ ng}/\mu\text{l}$ Gesamt-RNA.

4.5.3. GAPDH-Amplifikation aus der cDNA

Das GAPDH-Gen, welches für die Glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase kodiert, zählt zur Gruppe der *house keeping genes* welche in praktisch allen Zellen exprimiert werden. Zur Überprüfung der erfolgreichen Umschreibung der RNA in cDNA wurde eine Amplifikation des GAPDH-Abschnitts durchgeführt, wobei jeweils die umgeschriebenen cDNAs und die dazugehörigen Leerwertkontrollen für die Amplifikation als Template dienten. Die Amplifikation wurde mit 35 Zyklen bei 96 °C für 15 sec, 54 °C bei 20 sec und 72 °C bei 30 sec durchgeführt. Ein 1,5 % Agarosegel wurde für die Auftrennung der PCR-Produkte verwendet. Der Gellauf fand bei 120 V für ca. 30 min statt (Gelkammer: Renner GmbH).

4.5.4. Real-time quantitative PCR

Die *real-time quantitative* PCR stellt eine Weiterentwicklung der Mitte der achtziger Jahre von Mullis entwickelten Polymerase Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) dar ⁸⁵. Die Grundlagen der heute angewandten *real-time quantitative* PCR wurden 1992 durch hinzufügen von Ethidiumbromid (EtBr) zur PCR Reaktion gelegt ⁸⁶. Die messbare Fluoreszenz, des in dsDNA interkalierenden, angeregten EtBr, kann zur Bestimmung der Konzentration der Ziel-DNA benutzt werden ⁸⁷. Ebenso lagert sich der signalstärkere SYBR[®] Green-Fluoreszenzfarbstoff unspezifisch in dsDNA ein und erreicht mit fortschreitender PCR-Reaktion einem Fluoreszenzanstieg. Nicht eingebautes SYBR[®] Green weist in gelöster Form eine geringe Leuchtkraft auf, welche sich aber in gebundener Form drastisch erhöht.

Zyklus:

15"	95 °C	45 x
1'	60 °C	

Reaktionsansatz:

12,5 µl	SYBR [®] Green PCR Master Mix
9,5 µl	ddH ₂ O
1,0 µl	Primer F (10 µM)
1,0 µl	Primer R (10 µM)
1,0 µl	cDNA
<hr/>	
25,0 µl	Reaktionsvolumen

Die Veränderung der Fluoreszenz wurde mit Hilfe des TaqMan 7500 (Applied Biosystems) im geschlossenen Reaktionsgefäß für jeden Zyklus erfasst und dokumentiert.

4.6. Stimulation von Lymphozyten aus Blutproben

4.6.1. Proteinextraktion aus Blutkulturen

Um das trunkierte p70-Nibrin auch in nativen homozygoten Patientenlymphozyten, sowie den heterozygoten Lymphozyten der Familienmitglieder nachzuweisen, wurden die Blutproben für drei Tage in Blutkulturmedium mit PHA-L bzw. PWM stimuliert.

Hierbei wurden je 0,5 ml des Heparin-Blutes in 5 ml Blutkulturmedium in 20 ml Gewebekulturflaschen (Falcon) resuspendiert und für 3 Tage bei 37 °C inkubiert.

PHA-L Blutkulturmedium (17µl/ml)

40 ml	RPMI 1640 Pen/Strep
5 ml	FKS
4,2 ml	PHA-L

PWM Blutkulturmedium

42,5 ml	RPMI 1640 Pen/Strep
2,5 ml	FKS
225 µl	PWM

Die Ansätze wurden anschließend zusammengeführt, mit 50 % Erythrozyten-Lysepuffer aufgefüllt, gevortext und für 30 min auf Eis gelagert um die Erythrozyten zu entfernen. Es folgte die Pelletierung der Lymphozyten für 20 min bei 1.000 rpm und 4 °C, der Überstand wurde verworfen. Dieser Schritt wurde ein- bis zweimal wiederholt.

Lyse-Puffer

(nach Desai-Mehta *et al.* ³⁸)

50 mM	NaPi (pH 7,5)
25 mM	NaF
25 mM	Glycerophosphat
2 mM	EDTA
2 mM	DTT
1 fach	Complete Mini
0,5 %	Triton X-100

Erythrozyten Lyse-Puffer

155 mM	NH ₄ Cl
10 mM	KHCO ₃

Abschließend wurde das Pellet in 10 ml PBS-Puffer gewaschen und in ein Eppendorfgefäß überführt. Auf Eis (Proteaseinhibition) wurde das Zellpellet in lediglich 0,2 ml Lyse-Puffer ³⁸ resuspendiert um das spätere Präzipitationsvolumen gering zu halten. Zum Aufschließen der Zellen wurden diese für 20 min bei 4 °C geschüttelt und anschließend für 20 min bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert.

4.6.1.1. Metaphasechromosomen Präparation

Zum Nachweis der Stimulation wurden 5-10 ml des Blut-Kulturmedium-Ansatzes für eine Chromosomenpräparation verwendet. Hierbei wurde der Ansatz für 2 h bei 37 °C mit 2-3 Tropfen des Spindelfasergifts Colcemid versetzt um die stimulierten Lymphozyten in der Mitose zu arretieren. Anschließend wurde die Suspension in ein Reagenz-

glas überführt und für 12 min bei 1.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf 1 ml abgenommen und verworfen. Die Zellen wurden resuspendiert, 5 ml 0,4 % vorgewärmte KCl-Lösung zugegeben und die Lösung für 15 min bei 37 °C inkubiert (hypotone Behandlung). Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 1.000 rpm für 20 min ohne Bremse und die anschließende Abnahme des Überstandes bis auf 1 ml. Die nachfolgende Fixierung (3:1, Methanol:100 % Eisessig) der Zellen wurde dreimal durchgeführt. Es wurden bei jedem Schritt vorsichtig 4 ml Fixativ zur Suspension getropft, die Zellen abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach dem letzten Fixierungsschritt wurden jeweils zwei Tropfen der resuspendierten Zellsuspension auf gewaschene und gekühlte Objektträger aufgetropft. Die Objektträger wurden getrocknet und danach in 10 %iger Giemsalösung für 5-8 min gefärbt.

KCl-Lösung (0.075 M)

0.4 g	KCl
100 ml	ddH ₂ O

10 %ige Giemsalösung

10 ml	gefilterte Giemsalösung
10 ml	Giemsa Puffer
80 ml	H ₂ O

Die Objektträger wurden unter fließendem Wasser gespült, getrocknet und unter dem Mikroskop ausgewertet. Die Auswertung der Metaphasen ergab Aufschluss über den Erfolg der Stimulation.

4.6.2. Quantifizierung der p70-Nibrinexpression in NBS-Patientenzellen mittels Immunpräzipitation

4.6.3. Proteinisolation

Um eine ausreichende Menge an Gesamtlysat zu erhalten waren ca. 20 ml einer exponentiell wachsenden LCL-Kultur notwendig. Die Zellzahl der Suspension wurde mit Hilfe des Beckman Coulters Z2 quantifiziert (~ Zellzahl $6-9 \times 10^5$ / ml), die Zellen für 10 min bei 1.000 rpm abzentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen. Das Pellet wurde in 20 ml PBS-Puffer vorsichtig resuspendiert und wiederum für 10 min bei 1.000 rpm zentrifugiert. Nachfolgend wurde das Pellet in 1 ml PBS-Puffer resuspendiert, in ein Eppendorfgefäß überführt, zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 0,2 ml Lyse-Puffer resuspendiert. Die Lyse wurde für 20 min bei 4° C durchgeführt und der Überstand der folgenden Zentrifugation bei –80 °C gelagert (vgl. 4.6.1).

4.6.4. Immunpräzipitation

Zur Immunpräzipitation standen mehrere, kommerziell erhältliche, Antikörper zur Verfügung, wobei die Präzipitation mit polyklonalen Antikörpern durchgeführt wurde (anti-p95-Nibrin, *rabbit polyclonal*, Novus und anti-Mre11, *rabbit polyclonal*, Immunnogen: gesamte Länge, Novus). Der Antikörper anti-p95-Nibrin bindet dabei am C-terminalen Ende des Nibrinproteins (Immunnogen: Aminosäuren 395-742) und ermöglicht somit auch die Präzipitation des p70-Nibrinfragmentes (Abbildung 3). Beide Antikörper wurden in identischen Verhältnissen zu je 0,9 µl mit 12 µl in PBS gewaschenen Dynabeads Protein-G (Dyna) für 1,5 h bei 4 °C inkubiert, dabei binden die konstanten Fc-Regionen der Antikörper hydrophob an den Protein-G beschichteten Magnetpartikeln. Die bei -80 °C gelagerten Proteinlysate wurden währenddessen photometrisch mittels Bradford-Färbelösung (USB) quantifiziert um Mengenvariationen zwischen den einzelnen Proben und Experimenten zu vermeiden.

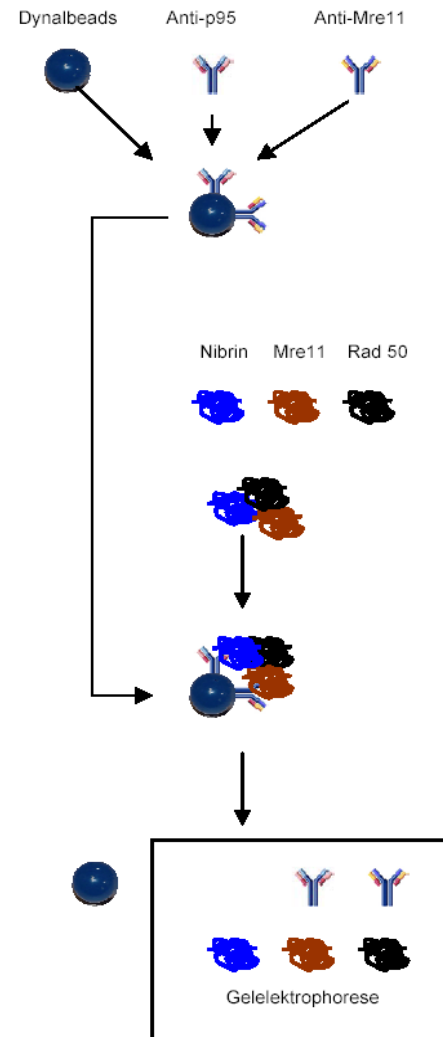


Abbildung 7: schematische Darstellung der Immunpräzipitation

Nachdem dieser Beads-Antikörper-Komplex etabliert war, wurde das entsprechende Volumen von 880 µg Protein zugegeben und ebenfalls bei 4 °C für 1,5 h geschüttelt. Während der nachfolgenden Inkubation binden die F(ab)-Bereiche der anti-p95-Nibrin und anti-Mre11 Antikörper die spezifischen Epitope des p95-Nibrin bzw. p70-Nibrin sowie des Mre11-Proteins. Durch die anschließende magnetische Separation des Beads-Antikörper-Protein-Komplexes vom Gesamtlisat wurden sämtliche unspezifi-

schen Proteine entfernt und die spezifisch gebundenen d.h. p95-Nibrin, p70-Nibrin und Mre11 um ein vielfaches konzentriert. Die Lösung wurde anschließend kurz zentrifugiert und der Überstand mit Hilfe des *magnetic particle concentrator* (Dyna) verworfen und die Beads zweimal mit PBS gewaschen. Der Komplex wurde hiernach durch Inkubation bei 100 °C für 5 min im Wasserbad in Gelladepuffer getrennt, die Magnetpartikel wurden magnetisch aus der Suspension entfernt und die spezifischen Proteine sowie die präzipitierenden Antikörper gelelektrophoretisch separiert.

4.6.5. Elektrophorese und Membranentwicklung

Die präzipitierten Proteine sowie die hierzu verwendeten Antikörper wurden mittels Gelelektrophorese (NuPage Gel System) auf einem vorproduzierten Bis-Tris Gel bei 150 V für 1,5 h separiert. Zum Transfer wurden *sponge pads* (Invitrogen) und *blotting*-Papier (Schleicher & Schuell) kurz in MOPS-SDS-Transferpuffer (Invitrogen) geschwenkt. Die Nitrocellulose-Membran für Western Blots Hybond ECL (Amersham) wurde mit Wasser benetzt und anschließend ebenfalls in MOPS-SDS-Transferpuffer geschwenkt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde die Gelkassette aufgebrochen und das Gel im Transfermodul mit den anderen Komponenten zusammengesetzt. Der Elektroblot wurde für 1,5 h bei 30 V durchgeführt.

Nach Beendigung des Transfers wurde die Membran zur vorläufigen Auftragskontrolle mehrmals mit ddH₂O gespült und nachfolgend für 5-10 min mit Ponceau S-Lösung (AppliChem GmbH) gefärbt und kontrolliert. Nachfolgend wurde die Membran mit RotiBlock (Roth) über Nacht abgesättigt um eine unspezifische Bindung der zum Nachweis benutzten Antikörper zu vermeiden. Im Folgenden wurde die Membran mit den primären Antikörpern Mre11-12D7 (*mouse monoclonal*, GeneTex) und p95-Nibrin/Nbs1-1D7 (*mouse monoclonal*, GeneTex) in einer Verdünnung von 1:1.000 in RotiBlock für 1 h bei RT gerollert. Nach mehrmaligen Waschschritten mit TBS-T-Puffer erfolgte die Inkubation für 1 h bei RT mit dem sekundären Antikörper *anti-mouse*^{HRP} IgG (Amersham Pharmacia Biotech) in einer Verdünnung von 1:1.000 in RotiBlock.

TBS -T

20 mM	Tris-HCl (pH 7,5)
137 mM	NaCl
0,1 %	Tween 20

Die Membran wurde danach nochmals mit TBS-T-Puffer gespült und mit jeweils 1-2 ml ECL Western Blot Detektionslösungen 1 und 2 (Amersham Pharmacia Biotech) für

1 min inkubiert. Die Zugabe der Western Blot Detektionslösungen führt zur Oxidation angeregten Luminols unter Lichtemission. Die emittierten Signale wurden auf Kodak Scientific Imaging Film, X-OMAT™ belichtet und dieser anschließend entwickelt und fixiert.

4.6.6. Transfernachweis

Zur Überprüfung des Proteintransfers vom Gel auf die Nitrocellulose-Membran wurde eine Färbung des Gels durchgeführt um sicherzustellen dass die Proteine vollständig transferiert wurden. Das Gel wurde dabei für 1 h in Coomassie-Färbelösung geschwenkt wobei die Coomassie-Lösung unspezifisch alle Proteine anfärbt.

Färbelösung für Proteingele

0,25 %	Coomassie
50 %	Methanol
9,2 %	Essigsäure

Entfärbelösung für Proteingele

30 %	Methanol
7 %	Essigsäure

4.6.7. Quantifizierung der p70-Nibrin Bandenstärken

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

4.7. Klinische Parameter und zelluläre Variabilität

Zum Abschluss wurden schließlich die gewonnenen Daten zu zellulären Parametern, einschließlich der p70-Nibrinexpression mit den klinischen Daten der Patienten korreliert. Hierbei wurden die Analysefunktionen von Excel, SPSS 12.0 und Sigma Plot 8.0 benutzt.

5. Ergebnisse

5.1. Mutationsanalyse

Erstes Ziel war der Nachweis der 657 Δ 5 Mutation in allen verwendeten NBS-Patientenzelllinien.

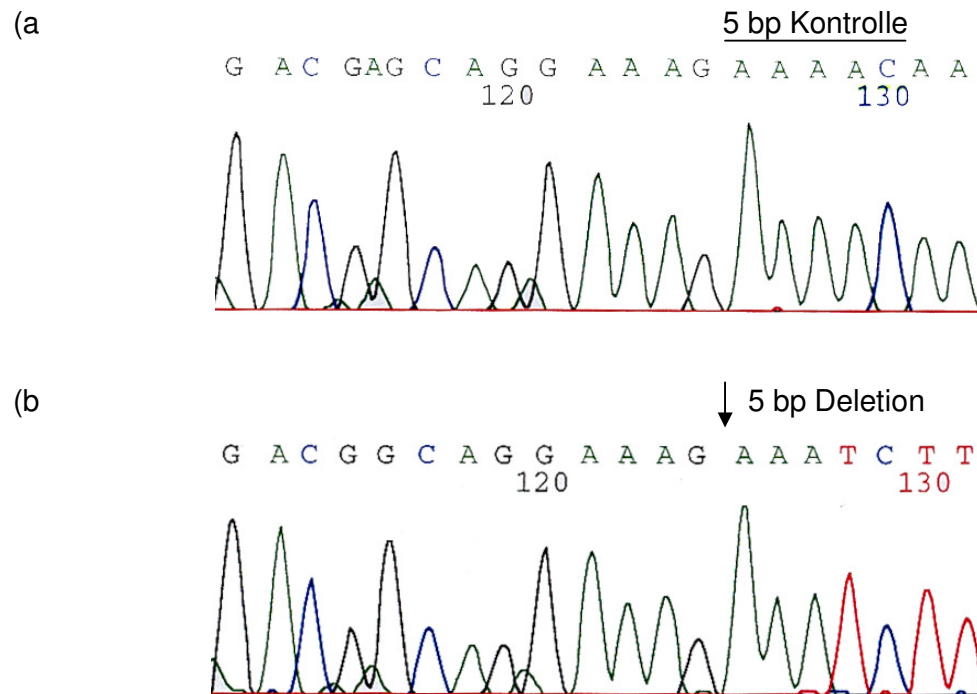


Abbildung 8: Nachweis der 657 Δ 5 Mutation in Exon 6 des NBS1-Gens der NBS-Zelllinie 94P548 (b). Vergleich der Kontrollzelllinie (a).

Die Kontrollzellen wiesen auf Chromosom 8q21 an Position 657 des NBS1-Gens die Basenabfolge AAAAC auf (Abbildung 8). Diese fünf Basen fehlten jedoch bei allen 28 untersuchten lymphoblastoiden Patientenzelllinien als auch den untersuchten peripheren Lymphozyten, so dass die Gründermutation 657 Δ 5 in diesen Zellen homozygot vorliegt.

5.2. Untersuchung des Wachstums verschiedener NBS-Patientenzelllinien

Insgesamt wurde die Wachstumsvariabilität von zehn verschiedenen NBS-Patientenzelllinien untersucht, die alle die Mutation 657 Δ 5 homozygot aufwiesen. Des Weiteren wurden sieben Kontrollzelllinien auf Variationen in den Wachstumseigenschaften untersucht.

Die Zellzahl wurde 2-tägig über 18 Tage mittels Verdünnungen im Coulter Counter gemessen, wobei jede Zelllinie dabei insgesamt dreimal gemessen wurde. Die Verdopplungszeit in der logarithmischen Phase und die Zellzahl am Plateau wurden zum Vergleich zwischen den einzelnen lymphoblastoiden Zelllinien herangezogen. Diese Daten bildeten gleichsam die Grundlage für die Etablierung der Standardbedingungen für nachfolgende Experimente, da die Wachstums- und Proliferationseigenschaften entscheidenden Einfluss auf die Reproduzierbarkeit weiterer Versuche hatten.

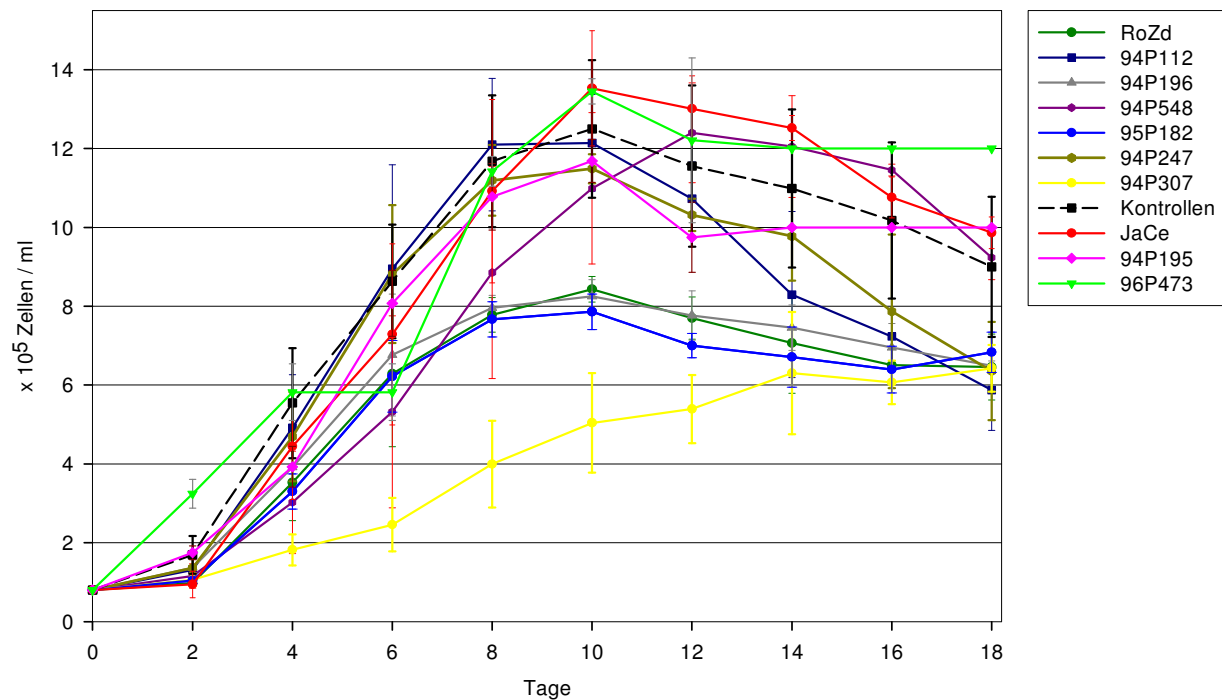


Abbildung 9: 18-tägiges Wachstum von zehn NBS-Patientenzelllinien (LCL's) mit der 657 Δ 5 Mutation. Die sieben Kontrollzelllinien sind zusammengefasst dargestellt. Die Ausgangszellichte betrug $0,5 \times 10^5$ Zellen / ml in 40 ml RPMI 1640 Gesamtvolumen. Die Fehlerbalken zeigen die intraexperimentellen Variationen (Dreifachwerte).

Das Wachstumsverhalten der verschiedenen Zelllinien ist in Abbildung 9 dargestellt wobei deutliche Unterschiede erkennbar sind. Insbesondere die Linie 94P307 fällt durch eine geringe Verdoppelungszeit der Zellzahl als auch durch ein sehr niedriges Plateau der stationären Phase auf. Die maximale Zellzahl von $6,3 \times 10^5$ Zellen / ml erreicht sie zudem erst nach 14 Tagen wobei der Mittelwert für die übrigen Patientenzelllinien bei 9,8 Tagen liegt. Ebenfalls unterhalb des Durchschnitts der sieben Kontrollzelllinien liegen die LCL`s 95P182, RoZd und 94P196. Die übrigen NBS-Patientenzelllinien lassen sich dagegen von den zusammengefassten Kontrollzelllinien weder in Bezug auf die Verdoppelungszeit der Zellzahl noch in der Höhe des Plateaus der stationären Phase unterscheiden. Dennoch ist der dramatische Abfall der Linien 94P112 und 94P247 nach Erreichen der stationären Phase auffällig. Ab Tag 16 weisen diese LCL`s ähnliche Zellzahlen auf wie die LCL`s 95P182, RoZd, 94P196 und 94P307. In Tabelle 1 sind die Werte für die einzelnen Zelllinien zusammengefasst.

Tabelle 1: Wachstumsparameter der Patientenzelllinien (Quotient aus Zellzahl und Anzahl an Tagen entlang einer Regressionsgraden) und der zusammengefassten Kontrollzelllinien. Wert in Klammern entspricht der Standardabweichung. (Abbildung 9).

LCL`s	max. Zellzahl x 10^5 / ml	max. Zellzahl x 10^5 / ml nach Tagen	Wachstumsteigung
Kontrollen	12,50 (1,75)	10	1,31
94P195	11,68	10	1,22
JaCe	13,53	10	1,38
RoZd	8,43	10	0,88
96p182	7,86	10	0,83
94P112	12,10	8	1,51
94P307	6,30	14	0,42
94p247	11,49	10	1,24
94P548	12,40	12	1,08
94P196	8,25	8	0,86
96P473	13,45	10	1,30

Tabelle 1 stellt die Wachstumsparameter für die einzelnen Patientenzelllinien bzw. den Kontrollpool dar. Hieraus ist ersichtlich dass die Linien 94P112 und JaCe höhere Wachstumsparameter aufweisen als die Kontrollzellen. Abbildung 10 stellt die Wachstumssteigung (Quotient aus Zellzahl und Anzahl an Tagen entlang einer Regressionsgraden) grafisch dar wobei nach männlichen und weiblichen Patientenzelllinien unterschieden wird.

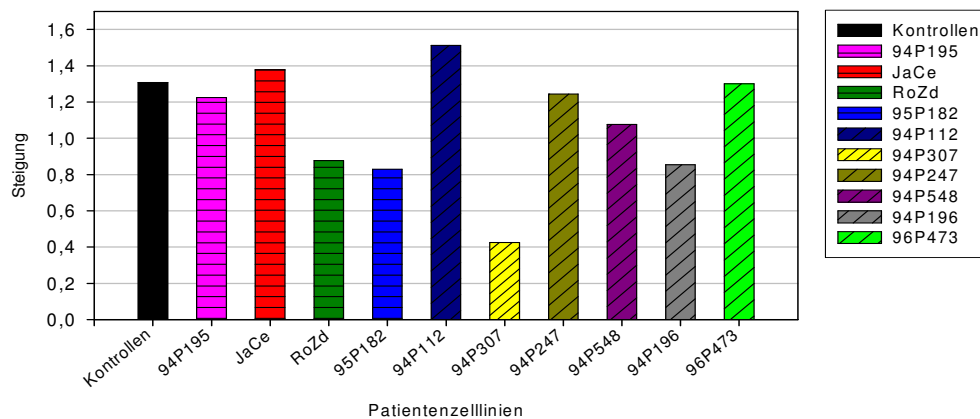


Abbildung 10: Wachstumssteigung (Quotient aus Zellzahl und Anzahl an Tagen entlang einer Regressionsgeraden) der in Tabelle 1 dargestellten Patientenzelllinien und des Kontrollzellpools. Horizontale Schraffur bezeichnet weibliche Zelllinien, diagonale männliche Zelllinien.

Signifikante Unterschiede zwischen den Geschlechtern bestehen nicht, da die Mittelwerte der Normalverteilung für die männlichen LCL`s 1,069 und für die weiblichen 1,077 betragen.

Vor dem Hintergrund der klinischen Variabilität des Krankheitsbildes werden die Variationen im Wachstumsverhalten der Zellen im Abschnitt 5.7.1 mit den klinischen Daten der Patienten sowie dem Alter der LCL`s (entspricht dem Zeitraum der Zelllinie in Kultur) und dem Alter der Patienten zum Zeitpunkt der LCL-Etablierung korreliert.

5.3. Strahlensensitivität von NBS-Patientenzelllinien

Zur Analyse der Radiosensitivität der NBS-Zelllinien und der Kontrollzelllinien wurden die Messungen an logarithmisch wachsenden Zellen nach dem *colony survival assay* (CSA) ^{83, 84} durchgeführt.

Die Überlebensraten, d.h. die Anzahl der sich gebildeten Kolonien im Vergleich zu den nicht bestrahlten Kontrollansätzen der gleichen Zelllinie sind in Abbildung 11 dargestellt, wobei deutliche Unterschiede erkennbar sind. Hierbei fallen insbesondere die Linien RoZd und 94P548 durch eine geringe Überlebensrate als auch durch eine sehr eingeschränkte Anzahl von gebildeten Kolonien bereits bei einer Dosis von einem Gray (Gy) auf.

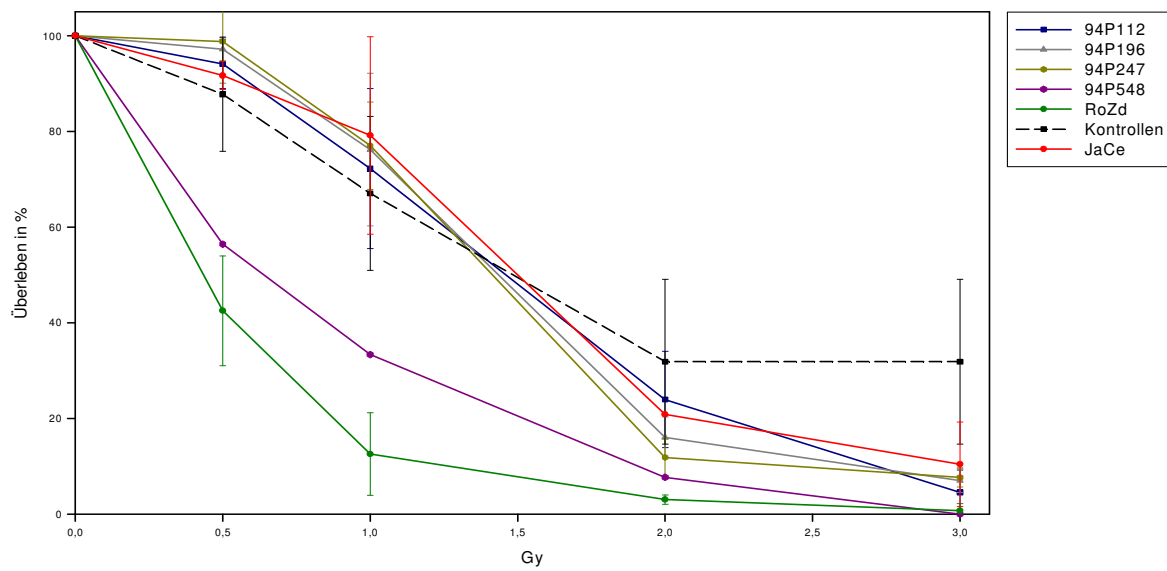


Abbildung 11: Überlebensraten von NBS- und Kontrollzelllinien nach Röntgenbestrahlung. Die Werte der Kontrolle setzen sich aus dem Mittelwert von fünf Kontrollzelllinien zusammen.

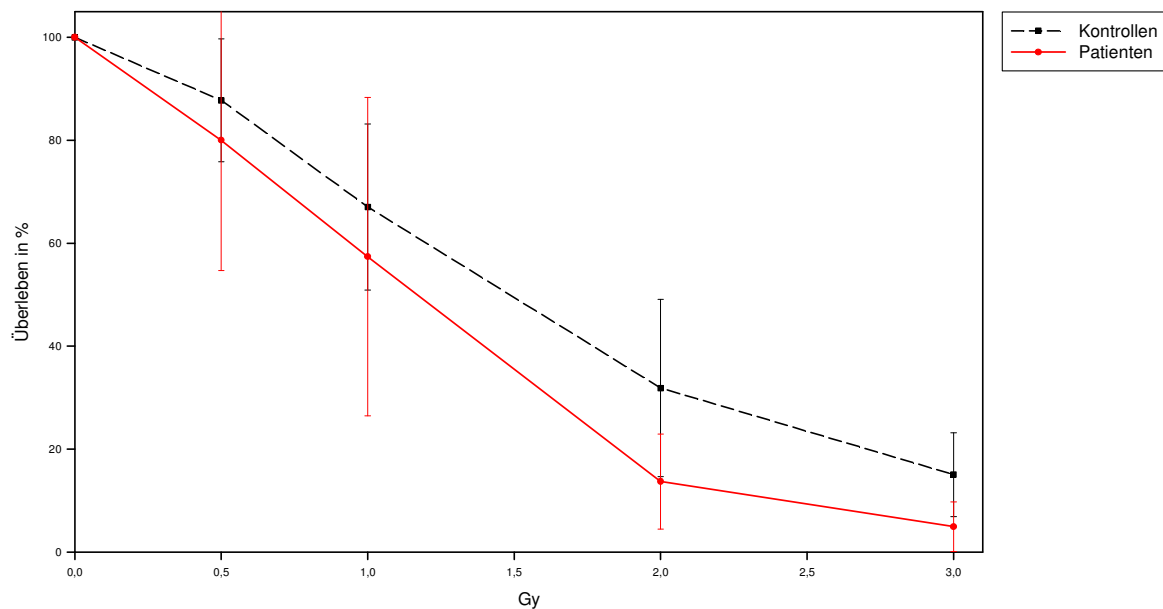


Abbildung 12: Mittelwerte der Überlebensraten von NBS- und Kontrollzelllinien nach Röntgenbestrahlung. Die Werte der Kontroll- und Patientenzelllinien setzen sich aus dem Mittelwert der Kontroll- und Patientenzelllinien zusammen.

Wie in Abbildung 12 zu erkennen ist führt die Zusammenfassung aller sechs Patientenzelllinien zu einer Kurve die nicht signifikant unterschiedlich von den fünf Werten der Kontrollzelllinien ist.

Dennoch ist festzustellen, dass die gepoolten Patientenzelllinien wesentlich unter den Werten der Kontrollzelllinien liegen und somit, aufgrund der begrenzten Datenmenge, eine erhöhte Strahlensensitivität mit der, in der Literatur beschriebenen Strahlensensitivität kompatibel ist.

5.4. Genexpression

Die Analyse der Genexpression ausgewählter Zelllinien mittels *cDNA-microarrays* wurde im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 577 in Zusammenarbeit mit dem MPI für Molekulare Genetik durchgeführt. Hierbei interessierten besonders die Identifizierung neuer Stoffwechselwege, in die Nibrin einbezogen sein könnte, sowie die weitere Charakterisierung der Nibrinfunktionen wie z.B. der Doppelstrangbruch-Reparatur. Im Mittelpunkt der Untersuchung stand weiterhin die Identifizierung modifizierender Faktoren, die die klinische Variabilität der NBS-Patienten hinsichtlich der Chromosomeninstabilität und der Immundefizienz erklären kann.

Es wurden jeweils drei Patienten-mRNAs mit drei Kontroll-mRNAs gleichen Geschlechts gepoolt um die Effekte individueller Variationen in der mRNA-Expression zu vermeiden, die unabhängig von der NBS-Mutation auftreten. Der männliche Patientenzelllinienpool bestand aus 94P112, 94P196 und 94P247 und wurde mit dem männlichen Kontrollpool der LCL`s 94P120, 96P125 und 1092 verglichen. Der weibliche Patientenzelllinienpool beinhaltete die LCL`s JaCe, 95P182 und RoZd und wurde mit dem weiblichen Kontroll-LCL-Pool 95P466, 94P197 und 98P651 verglichen. Diese gepoolten Proben wurden dann auf einem DNA-Lymphozytengen-Chip mit 17.000 Oligonukleotiden von Genen, die in lymphatischen Geweben exprimiert werden, hybridisiert.

Die Analyse der Genexpression der männlichen Zelllinien ergab eine Hybridisierung von 16.987 Genen auf dem Lymphozytengen-Chip, wobei im Vergleich zu dem männlichen Kontrollpool, oberhalb des Signifikanzbereichs, 113 Gene über- und 148 unterexprimiert waren (vgl. Anhang Tabelle 12 und Tabelle 13). Bei den weiblichen Zelllinien hybridisierten 16.989 Gene, wobei im Vergleich zum weiblichen Kontrollpool nur 92 Gene über- bzw. unterexprimiert waren (vgl. Anhang Tabelle 14 und Tabelle 15).

Des Weiteren traten bei der Expression der männlichen und weiblichen Pools im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollpools erhebliche Unterschiede auf (Abbildung 13).

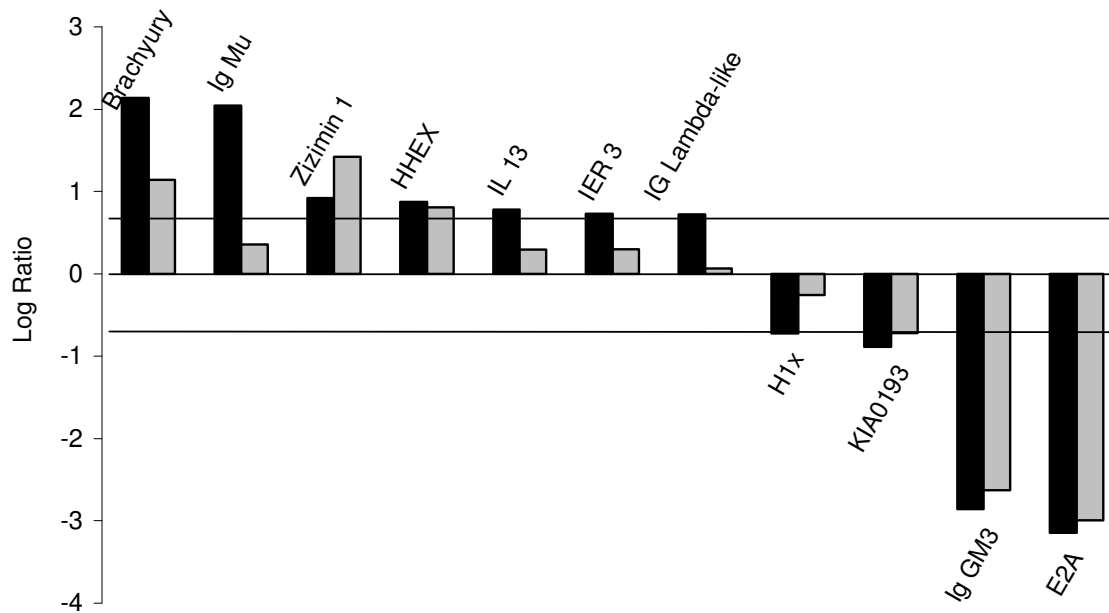


Abbildung 13: Unterschiede in der Expression ausgewählter Gene des männlichen (schwarze Balken) und weiblichen (graue Balken) Patientenzellenpools. Jeweils drei Patientenzellen-mRNAs wurden mit drei Kontrollzellen-mRNAs gleichen Geschlechts gepoolt. Der männliche Patientenzelllinienpool (94P112, 94P196, 94P247) wurde mit dem Kontrollpool (94P120, 96P125, 1092) verglichen. Der weibliche Patientenzelllinienpool (JaCe, 95P182, RoZd) wurde mit 95P466, 94P197 und 98P651 verglichen. Der DNA-Lymphozytengen-Chip enthielt 17.000 Oligonukleotide aus lymphatischen Geweben. Der Signifikanzbereich des logarithmischen Verhältnisses (Log Ratio) liegt bei 0,7 (schwarze Linie).

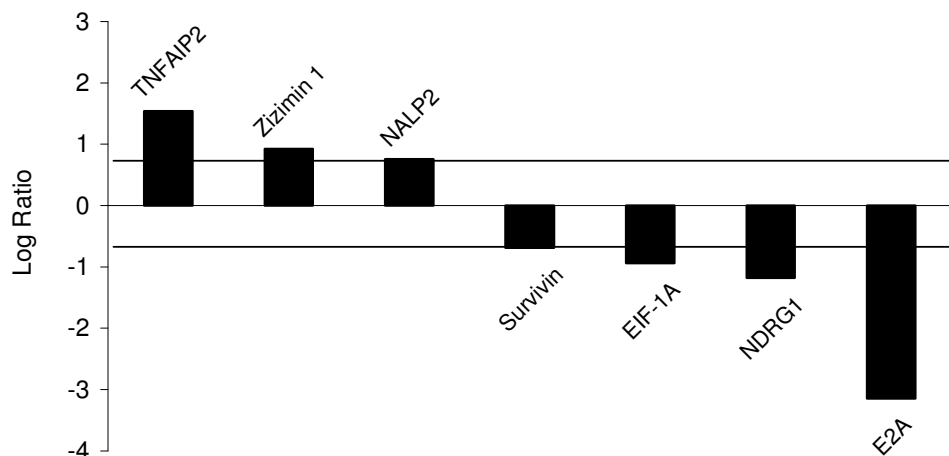


Abbildung 14: Expression ausgewählter Gene des männlichen Patientenzelllinienpools der Zelllinien 94P112, 94P196 und 94P247. Der Signifikanzbereich des logarithmischen Verhältnisses (Log Ratio) liegt bei 0,7 (schwarze Linie).

Aufgrund der erheblichen Differenzen der *microarray*-Werte bei den weiblichen und männlichen Patientenzelllinienpools wurden für die weitere Analyse nur die in Abbildung 14 ausgewählten Genexpressionen des männlichen Patientenzelllinienpools verwendet. Die in Abbildung 14 dargestellten Gene der gepoolten männlichen Patientenzelllinien 94P112, 94P196 und 94P247 ebenso wie alle weiteren vorhandenen Patientenzelllinien wurden für eine *real-time* PCR Verifizierung ausgewählt da sie relevante Funktionen bezüglich der Stoffwechselwege, in die Nibrin einbezogen ist, der Doppelstrangbruch-Reparatur sowie den Umbauten der Immunoglobulingene aufweisen könnten.

5.5. Verifizierung der *microarray*-Ergebnisse mittels *real-time* PCR

Die Verifizierung sämtlicher Genexpressionsdaten wurde mittels der *real-time* PCR durchgeführt. Die Berechnung der Expressionsunterschiede der verschiedenen Gene wurde mittels der $\Delta\Delta CP$ Methode durchgeführt.

Tabelle 2: *Real-time* PCR-Expressionsunterschiede aller untersuchten Patientenzelllinien und deren Mittelwert (MW). Unterexpression (negative Werte), Überexpression (positive Werte)

LCL	TNFAIP2	Zizimin	NALP2	Survivin	EiF1a	NDRG1	TCF3
94P195	0,2158	0,0681	0,3999	0,0621	-1,9030	-1,1837	-0,2821
94P118	0,0870	-0,5929	0,2658	-0,3130	-3,5144	-1,2809	-0,4877
JaCe	0,5144	0,5728	-0,0821	0,3556	0,8032	0,4542	0,2213
RoZd	0,0524	-0,3286	0,9582	-0,2437	-1,3287	0,4917	0,5528
95P511	0,1833	0,5862	0,0090	0,3138	-3,2486	-0,8297	0,0132
95P463	0,5548	1,1002	0,4368	0,2754	-3,0178	-1,0406	0,0960
96P476	-0,1192	0,2927	-1,4333	0,3168	0,5051	-1,0553	-0,0018
95P182	-0,8045	-0,2754	-0,8429	0,2367	-3,6433	-0,9894	0,2997
97P614	0,7014	0,5029	0,0652	0,1407	1,0240	-0,3476	-0,0522
94P112	-0,1639	-0,3659	-0,0686	-0,3495	-3,6704	-1,4620	-0,4819
94P248	0,4872	-0,3059	-0,8236	-0,0976	0,7478	-0,8083	0,0465
94P307	0,5530	0,4893	0,1341	-0,5692	0,9436	0,0583	-0,0315
94P251	-0,4927	0,4504	0,1073	-0,1336	1,0443	-0,6590	-0,0400
89P319	-0,4565	-1,2477	-1,6642	0,2867	-3,8071	-1,6578	0,0811
94P126	0,2109	0,6069	-0,4366	-0,0357	-1,5259	-0,6973	0,0194
98P055	-0,4011	0,6654	0,3693	0,2488	-3,3294	-1,0902	-0,1783
94P247	-0,1665	0,4010	-0,0380	-0,3876	-3,3544	-0,8510	-0,5403
97P081	-0,4455	0,0068	-0,3243	0,1096	-2,9357	-0,9038	-0,1151
97P082	0,3567	0,5275	-0,0154	-0,3214	-3,3860	-0,8172	-0,3040
94P548	0,5320	0,7616	-0,2975	0,1702	0,9540	0,6185	0,3874
94P196	0,8079	-0,1168	-1,8085	-0,0198	0,6641	-0,5733	-0,1434
96P473	0,2353	-0,9237	-1,4328	0,3549	0,5681	-1,3304	-0,0542
MW	0,1110	0,1307	-0,2965	0,0182	-1,4277	-0,7252	-0,0452

Die in Tabelle 2 und Abbildung 15 aufgeführten Werte wurden hierbei auf die *real-time* PCR-Ergebnisse der Kontrollen 94P120, 94P197, 95P466, 96P125, 98P651 und 1092 bezogen.

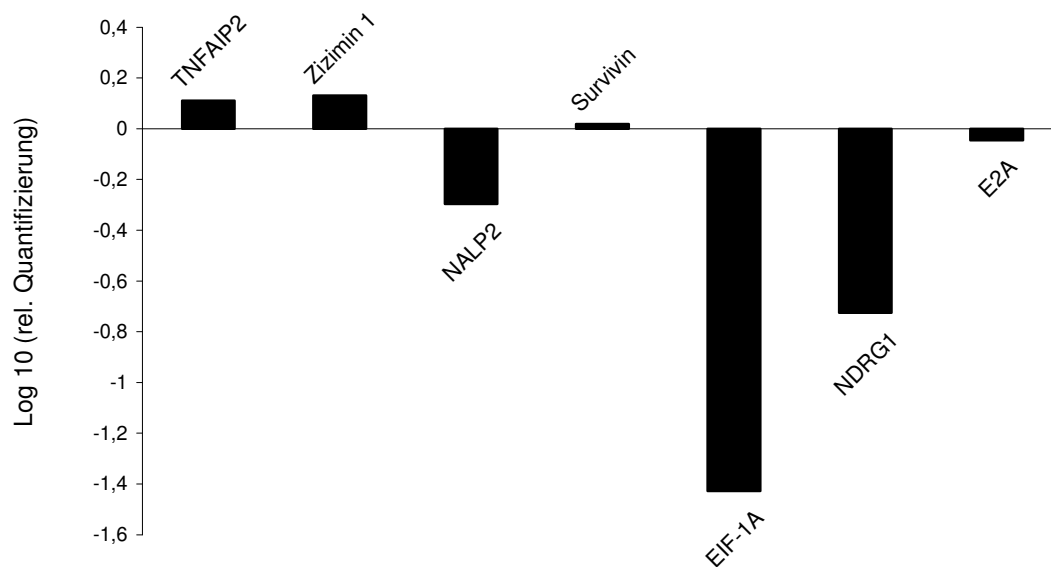


Abbildung 15: Mittelwert der *real-time* PCR-Werte aller in Tabelle 2 aufgeführten Patientenzelllinien bezogen auf die Kontrollen 94P120, 94P197, 95P466, 96P125, 98P651 und 1092.

Da während der *microarray*-Experimente bei der Expression der männlichen und weiblichen Pools im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollpools erhebliche Unterschiede auftraten (Abbildung 13) und diese Divergenzen auch bei der *real-time* PCR sichtbar wurden (Abbildung 16), werden im folgenden nur noch die Ergebnisse der männlichen Patientenzelllinien betrachtet um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten.

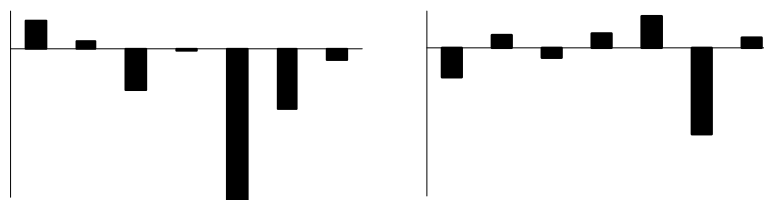


Abbildung 16: Unterschiedliche *real-time* PCR Mittelwerte aller in Tabelle 2 aufgeführten männlichen (linke Abbildung) und weiblichen (rechte Abbildung) Patientenzelllinien. Die Reihenfolge der Gene entspricht der Reihenfolge in Abbildung 15.

Vergleicht man die *microarray*-Ergebnisse der in Abbildung 14 dargestellten Gene der gepoolten männlichen Patientenzelllinien 94P112, 94P196 und 94P247 mit den männlichen Mittelwerten der *real-time* PCR kann lediglich das Gen NALP2 nicht verifiziert werden (Abbildung 17).

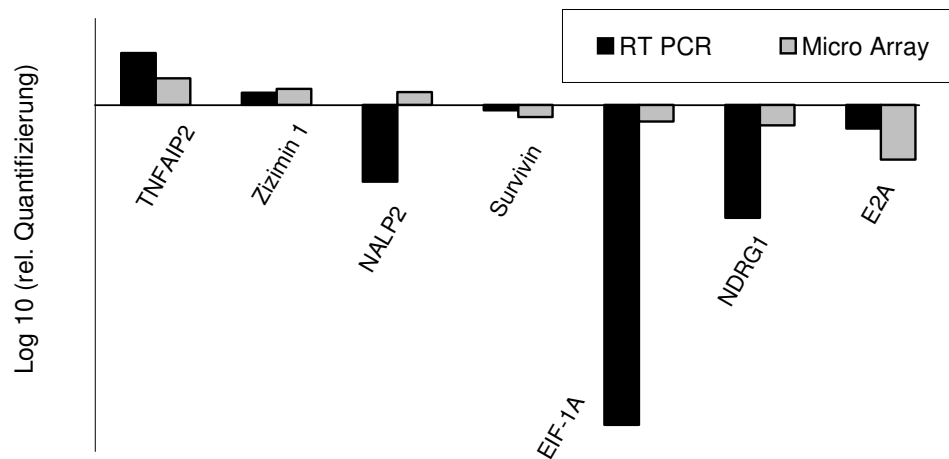


Abbildung 17: *Microarray*-Ergebnisse der gepoolten männlichen Patientenzelllinien und der Mittelwert der *real-time* PCR aller in Tabelle 2 aufgeführten, männlichen Patientenzelllinien.

Abschließend wurden die *microarray*-Ergebnisse der gepoolten männlichen Patientenzelllinien 94P112, 94P196 und 94P247 (Abbildung 14) mit dem Mittelwert der *real-time* PCR der gleichen Zelllinien verglichen (Abbildung 18).

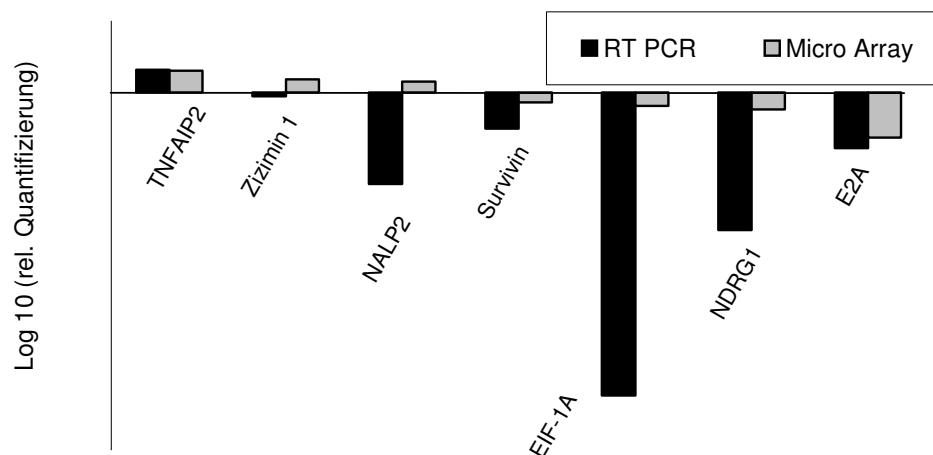


Abbildung 18: *Microarray*-Ergebnisse der gepoolten männlichen Patientenzelllinien und der Mittelwert der *real-time* PCR der Zelllinien 94P112, 94P196 und 94P247.

Im Vergleich zu den *microarray*-Ergebnissen der gepoolten männlichen Patientenzelllinien und dem Mittelwert der *real-time* PCR aller in Tabelle 2 aufgeführten, männlichen Patientenzelllinien in Abbildung 17 in der lediglich das Gen NALP2 nicht verifiziert werden konnte lässt sich bei der Verifizierung der identischen Zelllinien auch das Gen Zizimin1 nicht bestätigen (Abbildung 18).

5.6. Nachweis und Quantifizierung der p70-Nibrin Expression

5.6.1. Quantifizierung der p70-Nibrin Expression aus lymphoblastoiden NBS-Patientenzelllinien

5.6.1.1. Nachweis der p70-Nibrin Expression in lymphoblastoiden NBS-Patientenzelllinien

Der Nachweis der p70-Nibrin Expression wurde mittels Immunpräzipitation aus dem Gesamtlisat der LCL`s durchgeführt. Die verwendeten Antikörper binden dabei am C-terminalen Ende des Nibrin-Proteins und ermöglichten somit auch die Präzipitation des p70-Nibrinfragments (Abbildung 3). Die präzipitierten Proteine wurden mittels Gelelektrophorese separiert und im Western Blot analysiert. Die eigentlichen Bandenintensitätsunterschiede wurden nach dem Einscannen der belichteten Filme mit Hilfe des Programms ImageQuant bestimmt.

Die Intensitätsvariationen der p70-Nibrinbanden der einzelnen Patientenzelllinien sind in Abbildung 19 deutlich zu erkennen. Die erste Spur einer jeden Gelabbildung wird von der Kontrollzelllinie 96P125 besetzt und dient zum Vergleich der verschiedenen Gele (vgl. 5.6.1.2). Bei der Kontrollzelllinie lässt sich p95-Nibrin sowie das ko-präzipitierte Mre11 nachweisen. In den Patientenzelllinien hingegen lässt sich p95-Nibrin nicht nachweisen, sondern nur das verkürzte Nibrinfragment p70-Nibrin, welches in allen 28 Patienten-LCL`s nachgewiesen wurde und erhebliche Variationen in der Intensität der Bandenstärke, d.h. der p70-Nibrin Menge aufzeigte⁸⁸.

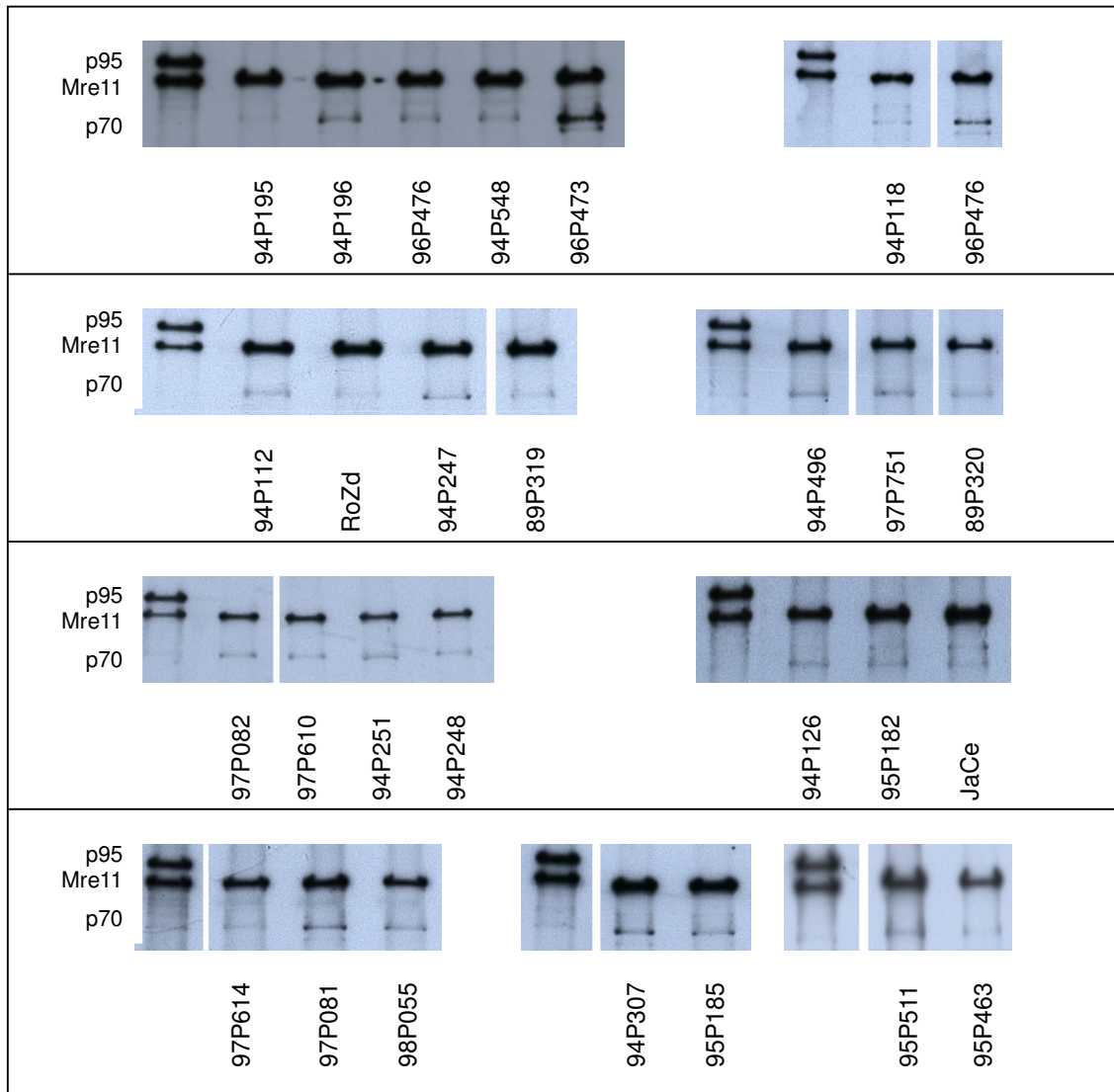


Abbildung 19: Repräsentativ ausgewählte Abbildungen der Western Blots zur Bestimmung der relativen p70-Nibrin Menge in den verschiedenen Patientenzelllinien. Bei der ersten Spur einer jeden Gelabbildung handelt es sich um die Kontrollzelllinie 96P125, die bei jedem Gellauf als interner Marker eingesetzt wurde. Die Kontrollzelllinie weist dabei das vollständige p95-Nibrin sowie das ko-präzipitierte Mre11 auf. In den Patientenzelllinien hingegen lässt sich p95-Nibrin nicht nachweisen. Allerdings lässt sich das verkürzte Nibrinfragment p70-Nibrin in allen 28 Patienten-LCL's nachweisen.

5.6.1.2. Quantifizierung der p70-Nibrin Expression in lymphoblastoiden Patientenzelllinien

Zur Quantifizierung der p70-Nibrin Menge wurde um jede Bande ein identisches Rechteck gelegt (Abbildung 20 b) welches an seinen Rändern die Intensität des Hintergrundes definierte der vom Messwert subtrahiert wurde.

Die benutzte Formel zur Berechnung der Bandenintensität lautet:

$$\text{p70-Nibrin (\%)} = \left[\frac{(\text{p70}^{\text{Patient}})/(\text{Mre11}^{\text{Patient}})}{[(\text{p95}^{\text{Kontrolle}})/(\text{Mre11}^{\text{Kontrolle}})]} \right] \times 100$$

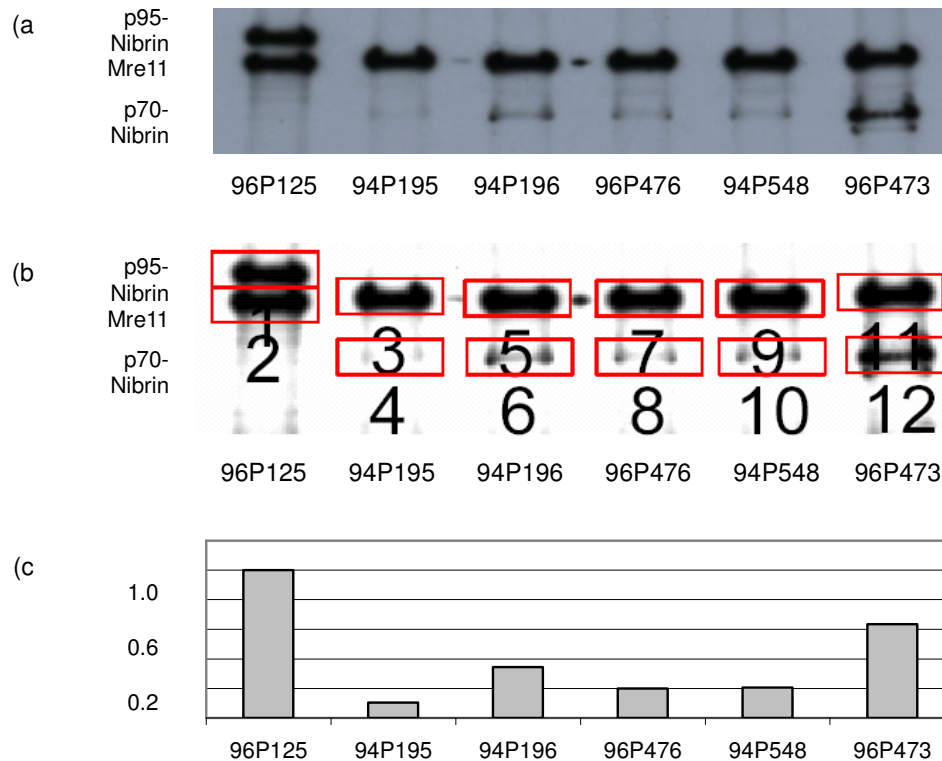


Abbildung 20: Zur Quantifizierung der p70-Nibrin Menge wurde der belichtete Film digitalisiert (a). ImageQuant berechnete den Hintergrund und die eigentliche Intensität der Bande (b). Die einzelnen Volumenwerte der p70-Nibrinbanden wurden in Bezug zu dem Wert der Mre11 Bande der gleichen Probe gesetzt, womit Mre11 als interne Auftragskontrolle diente und somit den Volumenwert der p70-Nibrinbanden innerhalb der verschiedenen Experimente standardisierte. Alle p70-Nibrin Werte wurden ins Verhältnis der Volumenwerte der p95-Nibrin und Mre11-Bande der Kontrollzelllinie 96P125 gesetzt um einen Vergleichswert zwischen den einzelnen Gelen zu erhalten (c, Tabelle 3).

Mre11 diente damit als interne Auftragskontrolle und standardisierte den Volumenwert der p70-Nibrinbanden innerhalb der verschiedenen Experimente. Mre11 konnte als interner Standard gewählt werden, da der Rad50/Mre11-Komplex in NBS-Patientenzellen in seiner Menge nicht beeinträchtigt ist^{21, 37, 89}. Des Weiteren wurden alle p70-Nibrin/Mre11-Werte in Relation zum Verhältnis der Volumenwerte von der p95-Nibrin und Mre11-Bande der Kontrollzelllinie 96P125 gesetzt um einen Vergleichswert zwischen den einzelnen Gelen zu erhalten (Abbildung 20 c, Tabelle 3). In Tabelle 3 sind die prozentualen p70-Nibrin Werte aus Abbildung 20 c dargestellt.

Tabelle 3: Die bereinigten ImageQuant Bandendaten sind in den Spalten NBS und Mre11 angegeben (der NBS-Wert von 96P125 entspricht p95-Nibrin, die folgenden Reihen entsprechen p70-Nibrin). Anschließend wurden alle p70-Nibrin Werte in Relation zum Verhältnis der Volumenwerte von der p95-Nibrin und Mre11-Bande der Kontrollzelllinie 96P125 gesetzt um einen Vergleichswert zwischen den einzelnen Gelen zu erhalten.

	LCL	NBS	Mre11	NBS / Mre11	%
Kontrolle	96P125	36.553	39.142	0,9338562	100,00
	94P195	4.812	49.330	0,0975471	10,45
NBS-Linien	94P196	15.608	48.673	0,3206706	34,34
	96P476	9.190	49.334	0,1862813	19,95
	94P548	9.808	51.053	0,1921141	20,57
	96P473	28.220	47.550	0,5934805	63,55

Wie aus Abbildung 20 a und c, sowie Tabelle 3 zu erkennen ist variiert die p70-Nibrin Menge der verschiedenen Patientenzelllinien erheblich. Jede Patientenzelllinie wurde jeweils mindestens viermal in der exponentiellen Wachstumsphase lysiert und das Immunpräzipitat jeweils auf unterschiedlichen Spuren der Gele separiert um evtl. Variationen beim Lauf aufgrund der Lage im Gel auszuschließen.

Tabelle 4: Mittelwerte der p70-Nibrin Menge von mindestens vier Immunpräzipitationen jeder Patientenzelllinie (Mittelwert der Standardabweichung 5,806)

LCL	94P195	94P118	JaCe	95P558	RoZd	95P511	95P463
p70	6,78	10,07	11,77	13,14	13,59	13,60	14,32
LCL	96P476	95P182	97P614	94P112	97P610	94P496	94P248
p70	14,45	15,24	16,68	17,95	20,07	21,11	21,21
LCL	94P307	94P251	89P319	94P126	95P185	98P055	97P751
p70	22,58	23,16	23,33	24,37	24,60	25,34	25,51
LCL	94P247	97P081	97P082	94P548	89P320	94P196	96P473
p70	26,46	26,64	27,84	28,71	30,81	34,17	49,85

Die Mittelwerte von mindestens vier Immunpräzipitationen jeder Patientenzelllinie sind in Tabelle 4 und Abbildung 21 dargestellt.

Die durchschnittliche p70-Nibrin Menge aller Patientenzelllinien beträgt 21,54% (mittlere Standardabweichung 5,8) des p95-Nibrin Wertes der Kontrollzelllinie. Interessanter-

weise zeigt sich eine große Variation innerhalb der Patientenzelllinien, die sich zwischen 7 und 50 % der Werte für die Kontrollzellen bewegt (Tabelle 4, Abbildung 21).

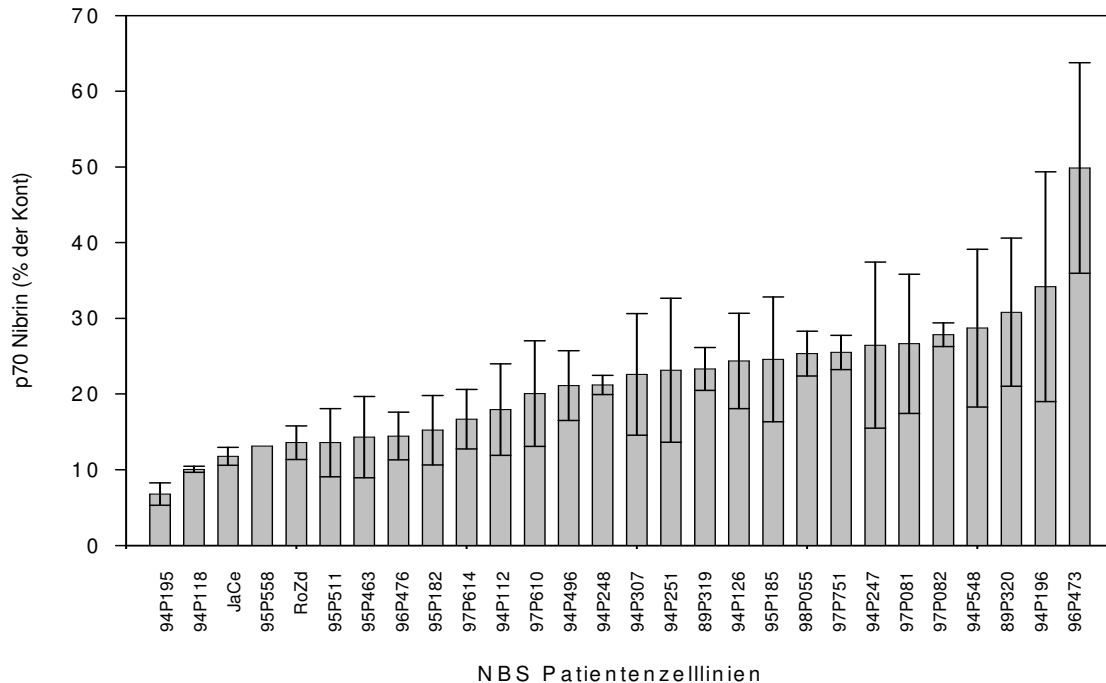


Abbildung 21: Mittelwerte der p70-Nibrin Menge von mindestens vier Immunpräzipitationen jeder Patientenzelllinie (Mittelwert der Standardabweichung 5,806).

Die durchschnittliche p70-Nibrin Menge der weiblichen Patientenzelllinien beträgt 17,03% (mittlere Standardabweichung 4,33), die der männlichen 24,46% (mittlere Standardabweichung 6,67) des p95-Nibrin Wertes der Kontrollzelllinie, ein Unterschied der mit $p = 0.4539$ nicht signifikant ist ⁸⁸.

5.6.2. Nachweis der p70-Nibrin Expression in peripheren Lymphozyten aus Blutproben mit hetero- und homozygoten Mutationen im NBS1-Gen

5.6.2.1. Stimulation von peripheren Lymphozyten

Um das trunkierte p70-Nibrinfragment auch in nativen homozygoten Patienten-Lymphozyten, sowie den heterozygoten Lymphozyten der Familienmitglieder nachzuweisen wurde zunächst untersucht, inwieweit ausreichende Proteinmengen in den ruhenden, naiven Lymphozyten von gesunden Kontrollblutproben vorhanden waren (Abbildung 22). Hierbei wurde die p95-Nibrin Quantifizierung in nativen Lymphozyten

und lymphoblastoiden Zelllinien mittels Immunpräzipitation und Western Blot durchgeführt.

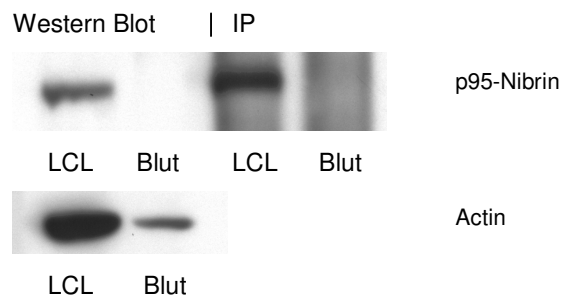


Abbildung 22: p95-Nibrin Quantifizierung in nativen Lymphozyten und LCL`s mittels Immunpräzipitation und Western Blot. Ein Nachweis von p95-Nibrin ist bei nativen Lymphozyten nicht darstellbar. Ebenso zeigt die geringe Actinmenge in den nativen Lymphozyten das eine Mitose-stimulierende Behandlung der Lymphozyten erforderlich war.

Wie aus Abbildung 22 erkennbar, ließ sich p95-Nibrin, selbst nach Proteinanreicherung durch Immunpräzipitation, nur bei LCL`s nachweisen. Die geringe Menge, des als Ladekontrolle beim Western Blot, nachgewiesenen Actins ließ weiterhin darauf schließen, dass die Gesamtproteinmenge in den peripheren, ruhenden Lymphozyten gering ist, und möglicherweise eine zur Teilung stimulierende Behandlung der Lymphozyten erforderlich war. Um auch das trunkierte p70-Nibrinfragment in nativen Lymphozyten der Familienmitglieder nachzuweisen wurden die Lymphozyten von einer, bezüglich der 657 Δ 5-Mutation heterozygoten Patientenblutprobe (04P0673) in Kulturmedium mit PHA-L (Phytohämagglutinin-L) bzw. PWM (Pokeweed) stimuliert (Abbildung 23).

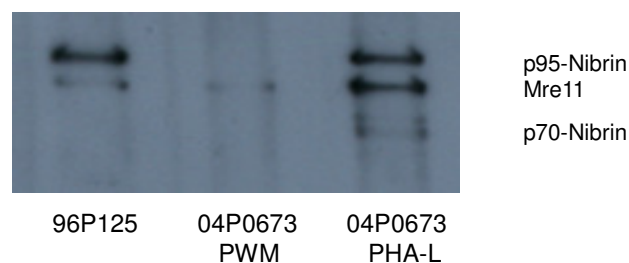


Abbildung 23: p95-Nibrin und p70-Nibrin Nachweis der nativen Lymphozyten der obligat-heterozygoten 04P0673. Die erste Spur zeigt die Kontrollzelllinie 96P125, gefolgt von den PWM- und PHA-L-stimulierten Lymphozyten von 04P0673.

Aufgrund dieser Ergebnisse ließ sich zeigen, dass das die Zellteilung induzierende Mitogen Phytohämagglutinin (PHA-L) der Phaseolus-Bohne (*Phaseolus vulgaris*) im

Vergleich zu dem Stimulanz Pokeweed (PWM) der amerikanischen Kermesbeere (*Phytolacca americana*) bessere Stimulationseigenschaften aufwies. Hierbei wirkt das Mitogen Phytohämagglutinin überwiegend auf T-Zellen und Pokeweed stimuliert die B-Zellen.

5.6.2.2. Nachweis der p70-Nibrin Expression in nativen Lymphozyten

Um das trunkierte p70-Nibrinfragment auch in nativen Patientenlymphozyten, sowie den Lymphozyten obligat heterozygoter Familienmitglieder nachzuweisen wurden die Lymphozyten der entsprechenden Blutproben aufgrund der Ergebnisse unter 5.6.2.1 mit PHA-L stimuliert.

Die Immunpräzipitation wurde drei Tage nach der Stimulation mit PHA-L mit dem *rabbit-polyclonal* Antikörper anti-p95-Nibrin durchgeführt und die präzipitierten Proteine mit den *mouse-monoclonal* Antikörpern p95-Nibrin/Nbs1-1D7 und Mre11-12D7 nachgewiesen (Abbildung 24).

Hierbei ist bei den PHA-L stimulierten nativen heterozygoten Lymphozyten ein Proteinfragment von ca. 75 kDa zu beobachten welches bei den immortalisierten LCL's nicht nachweisbar war. Bei den lymphoblastoiden Zelllinien tritt, das bereits nachgewiesene, ca. 70 kDa große p70-Nibrin auf.

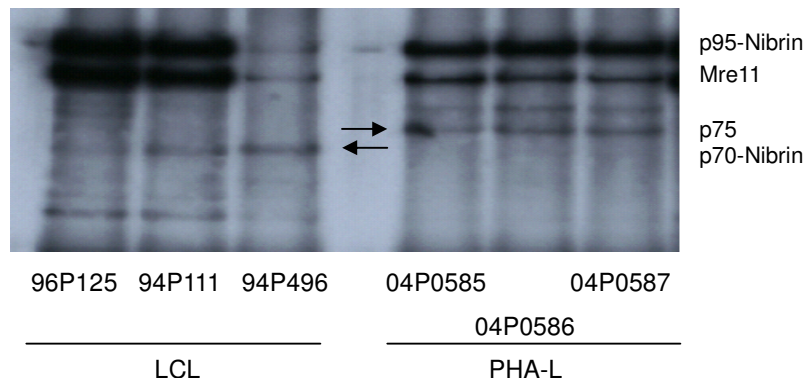


Abbildung 24: Immunpräzipitation mit *rabbit-polyclonal* anti-p95-Nibrin, Nachweis mit *mouse-monoclonal* p95-Nibrin/Nbs1-1D7 und Mre11-12D7. Bei den PHA-L stimulierten nativen heterozygoten Lymphozyten tritt ein Proteinfragment von ca. 75 kDa auf, wobei bei den immortalisierten LCL's nur das bereits beschriebene 70 kDa große p70-Nibrin auftritt. Weiterhin ist eine nicht näher charakterisierte Bande über den ca. 75 kDa großen Proteinfragmenten zu beobachten.

In Abbildung 25 sind die Ergebnisse für ein entsprechendes Immunpräzipitationsexperiment mit PHA-L stimulierten nativen Lymphozyten der Familienmitglieder gezeigt,

bei denen ebenfalls nur ein Proteinfragment von ca. 75 kDa zu beobachten war, während die immortalisierten LCL`s wieder das typische p70-Nibrinfragment zeigten.

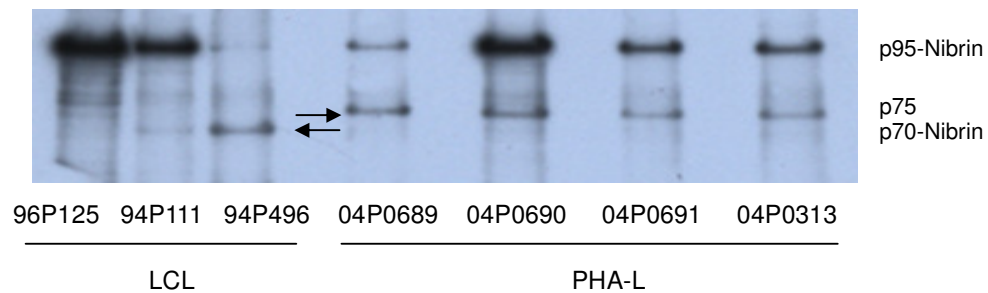


Abbildung 25: Immunpräzipitation mit *rabbit-polyclonal* anti-p95-Nibrin, Nachweis mit *mouse-monoclonal* p95-Nibrin/Nbs1-1D7. Bei den PHA-L stimulierten nativen heterozygoten Lymphozyten tritt ein Proteinfragment von ca. 75 kDa auf, wobei bei den immortalisierten LCL`s nur das 70 kDa große p70-Nibrin auftritt. Weiterhin ist auch hier eine schwache, nicht näher charakterisierte Bande über den ca. 75 kDa großen Proteinfragmenten als auch in den LCL-Spuren zu beobachten.

Um die nativen Lymphozyten mit heterozygoter Mutation aus Abbildung 25 direkt mit den lymphoblastoiden Zelllinien der entsprechenden Familienmitglieder der Patienten zu vergleichen wurden ein Teil der Lymphozyten aus den Blutproben mit PHA-L stimuliert und nachfolgend bei -80°C eingefroren. Der andere Teil der Lymphozyten der gleichen Probe wurde durch Infektion mit Epstein Barr Virus immortalisiert⁹⁰.

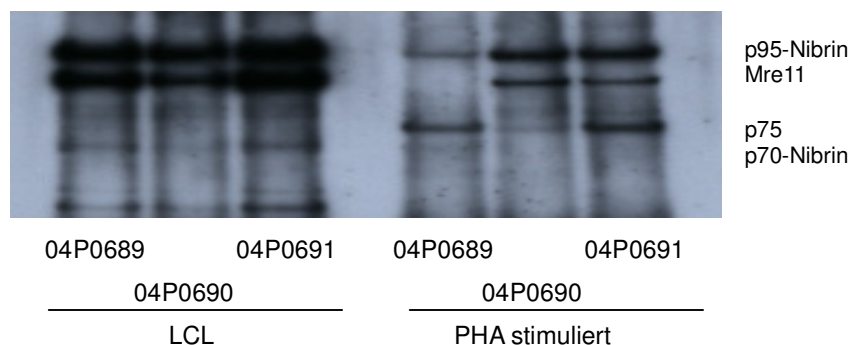


Abbildung 26: Immunpräzipitation mit *rabbit-polyclonal* anti-p95-Nibrin, Nachweis mit *mouse-monoclonal* p95-Nibrin/Nbs1-1D7 und Mre11-12D7. Die Lymphozyten der heterozygoten Blutproben 04P0689, 04P0690 und 04P0691 aus Abbildung 25 wurden einerseits mit PHA-L stimuliert und eingefroren sowie andererseits durch die Infektion mit dem Epstein Barr Virus immortalisiert. Bei den PHA-L stimulierten Lymphozyten tritt ein Proteinfragment von ca. 75 kDa auf, bei den immortalisierten Lymphozyten nur das ca. 70 kDa große p70-Nibrin. Ebenso ist auch hier eine schwache, nicht näher charakterisierte Bande über den ca. 75 kDa großen Proteinfragmenten zu beobachten.

Die Immunpräzipitation der PHA-L stimulierten und eingefrorenen nativen Lymphozyten sowie die der LCL's der gleichen Familienmitglieder wurde mit dem *rabbit-polyclonal* Antikörper anti-p95-Nibrin durchgeführt und die präzipitierten Proteine wiederum mit den *mouse-monoclonal* Antikörpern p95-Nibrin/Nbs1-1D7 und Mre11-12D7 nachgewiesen (Abbildung 26 und Abbildung 27).

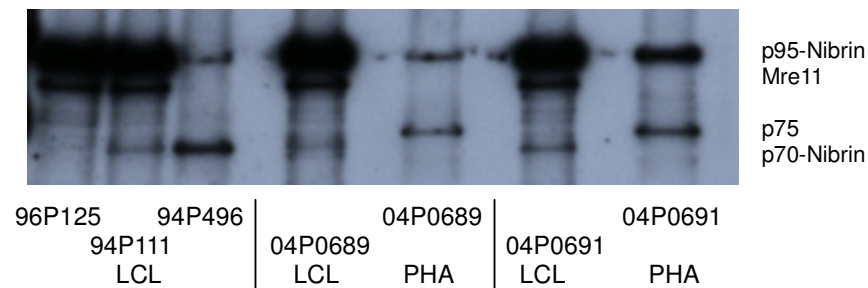


Abbildung 27: Immunpräzipitation mit *rabbit-polyclonal* anti-p95-Nibrin, Nachweis mit *mouse-monoclonal* p95-Nibrin/Nbs1-1D7 und Mre11-12D7. Auftrag der Lymphozyten der heterozygoten Blutproben 04P0689 und 04P0691 aus Abbildung 26. Bei den PHA-L stimulierten Lymphozyten tritt ein Proteinfragment von ca. 75 kDa auf, bei den immortalisierten Lymphozyten nur das ca. 70 kDa große p70-Nibrin.

5.6.3. Nachweis der p70-Nibrin Expression bei Zellen mit der NBS1-Mutation insGG

Obwohl über 90% aller analysierten NBS-Patienten die gleiche 5bp Deletion, 657 Δ 5 aufweisen^{1, 19}, konnten neben dieser Gründermutation weitere zehn trunkierende Mutationen in Patienten mit verschiedenen ethnischen Hintergrund^{19, 24-26} nachgewiesen werden.

Diese führen, ebenso wie die 657 Δ 5-Mutation zu einem vorzeitigen Abbruch der Translation nach den amino-terminalen *breast cancer carboxy-terminal* (BRCT) und *fork head associated* Domänen (FHA)²⁹. In Fibroblasten von einer 53-jährigen italienischen Patientin (2345) mit homozygoter 743insGG trunkierender Mutation in Exon 7 konnte nach dem Mutationsnachweis mittels *real-time* PCR und der Entstehungserklärung über alternatives Spleißen auch noch die Expression eines ca. 70 kDa großen Nibrinfragmentes mittels Immunpräzipitation erbracht werden²⁷. Die Mutation führt zu einem vorzeitigen Stop-Codon fünf Aminosäuren *downstream*.

Wie Abbildung 28 zeigt ließ sich bei der Patientin 2345 erwartungsgemäß kein p95-Nibrin nachweisen. Jedoch konnte bei der vorliegenden homozygoten als auch bei der heterozygoten 743insGG Mutation der Eltern (1773, 1774) ein ca. 70 kDa Nibrin-

fragment nachgewiesen werden, dessen „Laufgröße“ dem p70-Nibrinfragment aus Zellen mit der Mutation 657 Δ 5 ähnelt, jedoch durch ein NBS1-Transkript mit fehlendem Exon 6 und 7 kodiert wird²⁷. Die heterozygoten 743insGG Eltern wiesen auch das vollständige p95-Nibrin auf.

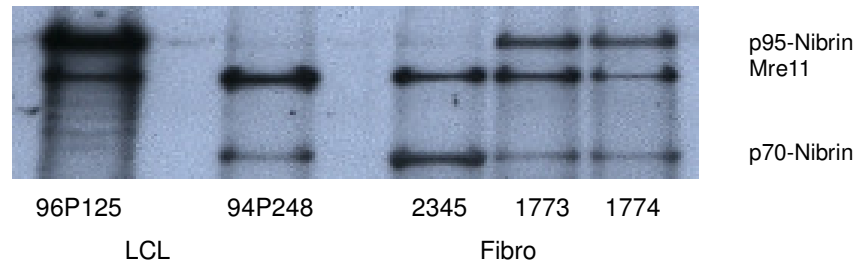


Abbildung 28: Immunpräzipitation mit *rabbit-polyclonal* anti-p95-Nibrin, Nachweis mit *mouse-monoclonal* p95-Nibrin/Nbs1-1D7 und Mre11-12D7. Bei der Patientin 2345 ließ sich kein 95 kDa Nibrin nachweisen. Bei der homozygoten als auch bei den heterozygoten 743insGG Mutation wurde ein ca. 70 kDa großes Nibrinfragment nachgewiesen. Die heterozygoten 743insGG Eltern (1773, 1774) wiesen erwartungsgemäß das vollständige p95-Nibrin auf.

5.7. Zusammenhang zwischen den experimentellen Ergebnissen und den klinischen Daten

Die beträchtliche Anzahl klinisch gut charakterisierter NBS-Patienten und lymphoblastoider Patientenzelllinien sowie die große Anzahl nicht betroffener Kontrollen (Familienmitglieder) ermöglichte es die experimentellen Ergebnisse mit den klinischen Charakteristika zu korrelieren.

5.7.1. Keine Korrelation von Wachstum mit weiteren Eigenschaften der Patientenzelllinien

5.7.1.1. Wachstum und p70-Nibrin Expression

Um zu untersuchen ob die p70-Nibrin Quantität mit den Ergebnissen der Wachstumsvariabilität (Abbildung 9) der zehn homozygoten lymphoblastoiden Zelllinien mit der 657 Δ 5 Mutation (vgl. 5.2) korreliert, wurden die Daten der jeweiligen Patientenzelllinien aus Tabelle 1 (Wachstumssteigung - Quotient aus Zellzahl und Anzahl an Tagen entlang einer Regressionsgeraden) und Tabelle 4 (p70-Nibrin) miteinander verglichen.

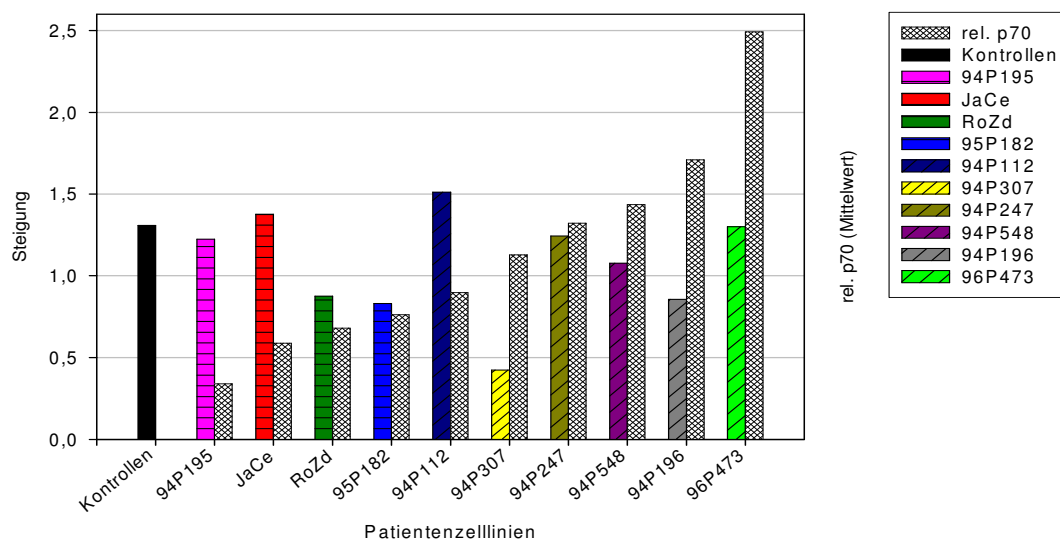


Abbildung 29: Wachstumssteigung (farbige Balken) der Patientenzelllinien und des Kontrollzellpools (horizontale Schraffur bezeichnet weibliche Zelllinien, diagonale männliche) in Beziehung zum rel. p70-Nibrin.

Die Korrelation der Wachstumssteigung und der p70-Nibrin Menge in Abbildung 29 zeigt für alle aufgeführten Patientenzelllinien einen geringen, nicht signifikanten ($p=0.8382$) Korrelationskoeffizient von 0,00541, d.h. die Beziehung der beiden

Datensätze ist gering. Dies trifft ebenso bei dem Korrelationskoeffizienten der männlichen Patientenzelllinien von 0,11627 ($p = -2.004e+04$) zu. Die weiblichen Patientenzelllinien weisen hingegen einen relativ hohen negativen Korrelationskoeffizienten von -0,66736 auf, d.h. je höher die Wachstumssteigung der LCL's desto geringer die p70-Nibrin Menge. Obwohl nur vier weibliche Patientenzelllinien gezeigt werden ist aus Abbildung 29 eindeutig zu erkennen dass alle weiblichen Zelllinien eine, im Vergleich zur relativ niedrigen p70-Nibrin Menge, hohe Wachstumssteigung aufweisen. Allerdings sind die Ergebnisse nicht signifikant.

5.7.1.2. Keine Korrelation des Wachstums mit dem Alter der LCL's und dem Patientenalter zum Zeitpunkt der LCL-Etablierung

Um zu ermitteln ob die Wachstumsvariabilität (Abbildung 9) der zehn Patientenzelllinien mit dem Alter der LCL's (entspricht dem Zeitraum der Zelllinie in Kultur) bzw. dem Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Etablierung der lymphoblastoiden Zelllinie in Zusammenhang steht, wurden die Daten aus Tabelle 1 (Wachstumssteigung) mit den Patienten- und LCL-Daten abgeglichen.

Das durchschnittliche Alter der relevanten LCL's lag hierbei bei 11 Jahren und das durchschnittliche Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Etablierung der lymphoblastoiden Zelllinie bei 8 Jahren.

Hierbei ergab sich bei der Korrelation zwischen Wachstum und dem Alter der lymphoblastoiden Zelllinien ein Korrelationskoeffizient von -0,3785, d.h. dass ein zunehmendes Alter der LCL's zu einer geringeren Wachstumssteigung der Zelllinien führt.

Die Korrelation zwischen Wachstum und dem Alter der Patienten während der Etablierung der lymphoblastoiden Zelllinien wies einen Korrelationskoeffizient von 0,1540 auf. Da der positive als auch der negative Korrelationskoeffizient nahe 0 liegen, eine Beziehungen zwischen den Datensätzen also gering ist und sowohl der Korrelationskoeffizient zwischen Wachstum und dem Alter der LCL's ($p = 0.1865$) noch der Koeffizient zwischen Wachstum und dem Alter der Patienten während der Etablierung der LCL's ($p=0.3316$) signifikante Werte zeigte, ist auch hier eine Korrelation auszuschließen.

5.7.2. Keine Korrelation der p70-Nibrin Menge mit dem Alter der LCL`s und dem Patientenalter zum Zeitpunkt der LCL-Etablierung

Um zu klären ob die p70-Nibrin Quantitätsvariabilität (Abbildung 21) der 26 untersuchten Patientenzelllinien, für die alle klinischen Daten vorlagen, mit dem Alter der LCL`s (entspricht dem Zeitraum der Zelllinie in Kultur) bzw. dem Alter der Patienten während der Etablierung der lymphoblastoiden Zelllinie in Zusammenhang steht wurden die Daten der Patientenzelllinien aus Tabelle 4 (p70-Nibrin Menge) mit den Patienten- und LCL-Daten abgeglichen.

LCL	p70 Menge	AltLCL	PatAltLCL
94P195	6,78	11	7
94P118	10,07	11	12
JaCe	11,77	6	23
95P558	13,14	10	7
RoZd	13,59	16	1
95P511	13,60	10	3
95P463	14,32	10	9
96P476	14,45	9	1
95P182	15,24	10	2
97P614	16,68	8	12
94P112	17,95	11	5
97P610	20,07	8	1
94P496	21,11	11	9
94P248	21,21	11	13
94P307	22,58	11	14
94P251	23,16	11	8
89P319	23,33	16	7
94P126	24,37	11	12
95P185	24,60	10	2
98P055	25,34	7	7
97P751		keine Daten	
94P247	26,46	11	17
97P081	26,64	8	9
97P082	27,84	8	7
94P548	28,71	11	5
89P320		keine Daten	
94P196	34,17	11	1
96P473	49,85	9	1
MW		10,2	7,5

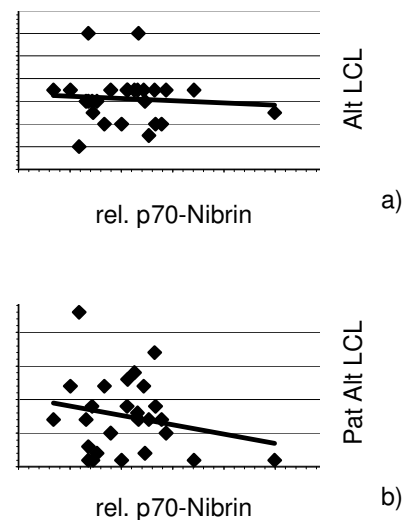


Abbildung 30: Korrelation der rel. p70-Nibrin Menge mit dem Alter der LCL`s (AltLCL) a) und dem Alter der Patienten während der Etablierung der LCL`s (PatAltLCL) b) bei 26 LCL`s. Hierbei weist a) einen negativen Korrelationskoeffizienten von $-0,0769$ auf. Bei b) besteht ein negativer Korrelationskoeffizient von $-0,2206$, d.h. das bei beiden Koeffizienten ein zunehmendes Alter der Patienten bzw. der LCL`s (y-Achse) zu einer geringeren p70-Nibrin Menge (x-Achse) der Zelllinien führt.

Das durchschnittliche Alter der LCL`s lag hierbei bei 10,2 Jahren und das durchschnittliche Alter der Patienten während der Etablierung der lymphoblastoiden Zelllinie bei 7,5 Jahren.

Die Korrelation zwischen der p70-Nibrin Menge und dem Alter der lymphoblastoiden Zelllinien ergab einen Korrelationskoeffizient von -0,0769, d.h. zunehmendes Alter der LCL`s führt zu einer geringeren p70-Nibrin Menge (Abbildung 30 a). Die Korrelation zwischen p70-Nibrin und dem Alter der Patienten während der Etablierung der lymphoblastoiden Zelllinien wies einen Korrelationskoeffizient von -0,2206 auf (Abbildung 30 b), d.h. das ein zunehmendes Alter der Patienten während der Etablierung der LCL`s zu einer geringeren p70-Nibrin Menge führt.

Beide Korrelationskoeffizienten sind jedoch nicht signifikant und liegen zudem nahe 0, d.h. die Beziehungen zwischen den Datensätzen p70-Nibrin und Alter der LCL`s als auch p70-Nibrin und Alter der Patienten während der Etablierung der LCL`s ist Null bzw. gering.

5.7.3. Keine Korrelation der p70-Nibrin Menge mit dem Ig-Status

Da NBS-Patienten eine hohe Variabilität in zellulärer und humoraler Immundefizienz aufweisen und Nibrin am Immunglobin-Klassenwechsel beteiligt ist ⁹¹ wurden niedrige IgA- und IgG-Dosen und normale IgM-Werte erwartet ^{10, 22}.

Da p70-Nibrin einige Funktionen von p95-Nibrin aufrechterhält ⁷⁵ wurden die in Tabelle 6 und Tabelle 7 dargestellten IgA- bzw. IgG-Referenzbereichslisten (mg/dl) (ILP) den klinischen Daten der Patienten in Tabelle 5 gegenübergestellt. Die relativen p70-Nibrin Mengen (Tabelle 4) wurden dann mit den klinischen Daten von Patienten mit normalen Immunglobinwerten (IgA, IgG und IgA/IgG), d.h. den innerhalb der Referenzbereichliste liegenden, und den Werten von Patienten unterhalb des Referenzbereichs liegenden IgA, IgG und kombinierten IgA/IgG verglichen ⁸⁸.

Tabelle 5: Die Referenzbereichslisten in Tabelle 6 und Tabelle 7 wurden mit den klinischen Daten der Patienten ■-innerhalb bzw. ▼-unterhalb der Referenzbereichliste gruppiert. Der Mittelwert der Immunpräzipitationswerte (Tabelle 4) der jeweiligen innerhalb bzw. unterhalb der Referenzbereichliste gruppierten Patienten sind den klinischen IgA- und IgG-Werten gegenübergestellt. Re. p70-Nibrin als % von p95-Nibrin.

		IgA	IgG	IgA/IgG
innerhalb. Ref.-Werte (Patienten M & F) rel. p70-Nibrin	■	6 15,87	5 21,11	3 15,35
innerhalb. Ref.-Werte (M) rel. p70-Nibrin (M)	■	4 18,71	4 24,69	2 19,63
innerhalb. Ref.-Werte (F) rel. p70-Nibrin (F)	■	2 10,20	1 6,78	1 6,78
außerhalb. Ref.-Werte (Patienten M & F) rel. p70-Nibrin	▼	15 24,30	15 21,46	11 23,47
unterhalb. Ref.-Werte (M) rel. p70-Nibrin (M)	▼	10 26,15	10 23,76	8 25,25
unterhalb. Ref.-Werte (F) rel. p70-Nibrin (F)	▼	5 20,59	5 16,87	3 18,74

5.7.3.1. Keine Korrelation der p70-Nibrin Menge mit dem IgA-Status

Für die Korrelation der p70-Nibrin Menge und des IgA-Status wurden die IgA-Menge (mg/dl) der klinischen Daten der Patienten mit den durchschnittlichen IgA-Referenzwerten (Mittelwert der Referenzbereichliste in mg/dl) verglichen. Die in Tabelle 6 dargestellte IgA-Referenzbereichsliste zeigt den IgA-Referenzbereich für die verschiedenen Altersgruppen.

Tabelle 6: Immunglobulin A-Referenzbereichsliste in mg/dl abhängig vom Alter und die korrespondierenden Mittelwerte

Alter in Jahren	1	2	4	8	12	18
Min. IgA (mg/dl)	14	21	30	30	52	63
Max. IgA (mg/dl)	91	145	188	251	291	321
Mittelwert (mg/dl)	52,5	83	109	140,5	171,5	192

Die Quantität (mg/dl) der klinischen IgA Daten der Patienten bezogen auf die durchschnittlichen Immunglobulin A-Referenzwerte (Mittelwert der Referenzbereichliste in

Tabelle 6) liegt zwischen 1,33 bis 164,50 mg/dl niedriger als der Mittelwert der IgA-Referenzwerte (Abbildung 31). Nur der Patient 97P614 liegt mit 10,50 mg/dl über den durchschnittlichen Referenzwerten.

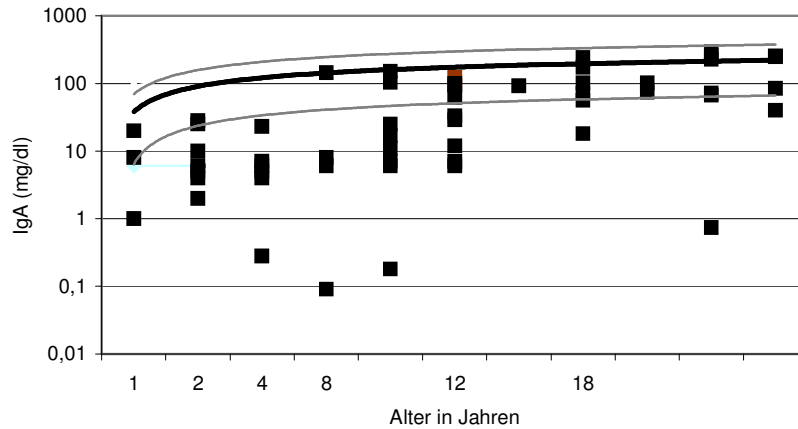


Abbildung 31: Graphische Darstellung der IgA-Referenzbereichsliste (Tabelle 6) mit min. und max. Referenzwerten (graue Linien), den durchschnittlichen Referenzwerten (schwarze Linie) und der IgA-Menge (mg/dl) der klinischen Daten der Patienten (schwarze Kästchen) in Abhängigkeit vom Patientenalter.

In Abbildung 32 sind die p70-Nibrin Mengen aus Tabelle 4 und Abbildung 21 für jede Patientenzelllinie als graue Balken dargestellt. Die entsprechende IgA-Menge (mg/dl) der Patienten ist in Form schwarzer Kästchen abgebildet.

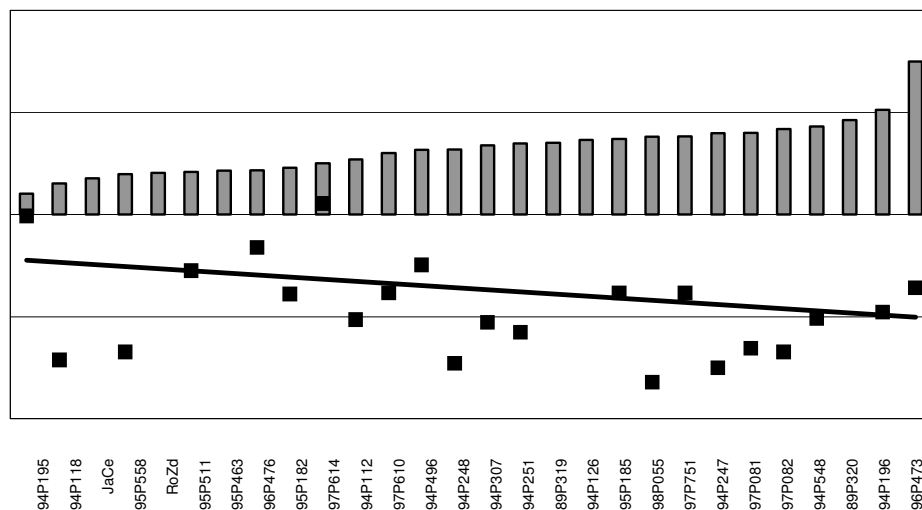


Abbildung 32: Mittelwerte von p70-Nibrin von mindestens vier Immunpräzipitationen jeder Patientenzelllinie (graue Balken) und die entsprechende IgA-Menge (mg/dl) der klinischen Daten der Patienten (schwarze Kästchen) sowie die daraus resultierende Trendlinie.

Die daraus resultierende Trendlinie weist eindeutig eine Abnahme der IgA-Menge (mg/dl) bei gleichzeitiger Zunahme der p70-Nibrin Menge auf. Auch hier ist ersichtlich das nur Patient 97P614 mit 10,50 mg/dl über den durchschnittlichen Referenzwerten (Basislinie) liegt.

Die Korrelation zwischen der p70-Nibrin Menge (Tabelle 4) und den Werten der klinischen IgA-Mengen der Patienten liegt bei $-0,2509$ ($p=0.2507$), und ist damit ebenso wie die Korrelation der männlichen LCL's mit $-0,0457$ ($p=0.8482$) und weiblichen Zelllinien von $-0,7502$ nicht signifikant.

5.7.3.2. Keine Korrelation der p70-Nibrin Menge mit dem IgG-Status

Für die Korrelation wurde die IgG-Menge (mg/dl) der klinischen Daten der Patienten mit den durchschnittlichen IgG-Referenzwerten, d.h. des Mittelwertes der Referenzbereichliste in Tabelle 7 verwendet.

Die IgG-Menge (mg/dl) der Patienten in Bezug zu den durchschnittlichen Immunglobulin G-Referenzwerten liegt zwischen 101 bis 1005 mg/dl geringer als bei den durchschnittlichen IgG Referenzwerten (Tabelle 7).

Tabelle 7: Immunglobulin G-Referenzbereichsliste (ILP) in mg/dl in Abhängigkeit vom Alter und die korrespondierenden Mittelwerte

Alter in Jahren	1	2	4	8	12	18					
Min. IgG (mg/dl)	350	470	540	590	630	675	700	700	700	700	700
Max. IgG (mg/dl)	950	1250	1340	1430	1530	1540	1550	1550	1575	1575	1600
Mittelwert (mg/dl)	650	860	940	1010	1080	1107	1125	1125	1138	1138	1150

In Abbildung 34 sind die p70-Nibrin Mengen aus Tabelle 4 und Abbildung 21 jeder Patientenzelllinie als graue Balken dargestellt. Die entsprechende IgG-Menge (mg/dl) der jeweiligen Patienten in Bezug zu dem IgG-Referenzbereich ist in Form schwarzer Kästchen abgebildet. Die daraus resultierende Trendlinie weist eine geringe Zunahme der IgG-Menge der Patienten in Bezug zu dem IgG-Referenzbereich bei gleichzeitiger Zunahme der p70-Nibrin Menge auf. Auch hier ist ersichtlich dass nur zwei Patientenzelllinien mit 10 mg/dl (94P196) bzw. 390 mg/dl (98P055) über den durchschnittlichen Referenzwerten (Basislinie) liegen.

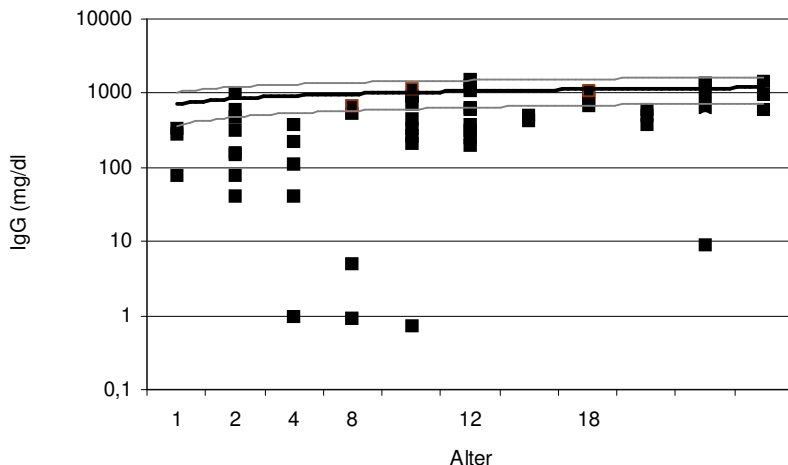


Abbildung 33: Graphische Darstellung der IgG-Referenzbereichsliste (Tabelle 7) mit min. und max. Referenzwerten (graue Linien), den durchschnittlichen Referenzwerten (schwarze Linie) und der IgG-Menge (mg/dl) der Patienten (schwarze Kästchen) in Abhängigkeit vom Patientenalter.

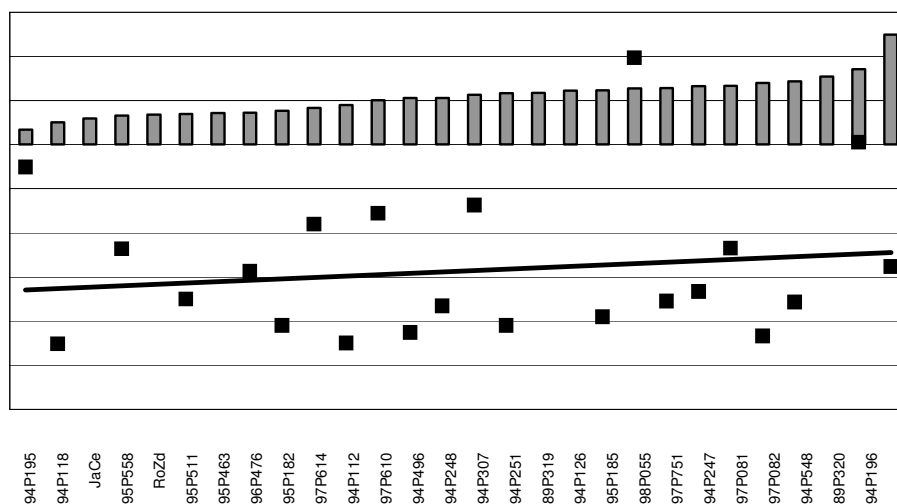


Abbildung 34: Mittelwerte des p70-Nibrin von mindestens vier Immunpräzipitationen jeder Patientenzelllinie (graue Balken) und die entsprechende IgG-Menge (mg/dl) der klinischen Daten der Patienten (schwarze Kästchen) sowie die daraus resultierende Trendlinie.

Eine signifikante Korrelation zwischen der IgG- und p70-Nibrin Menge konnte nicht festgestellt werden.

Die Korrelation zwischen p70-Nibrin (Tabelle 4) und der IgG-Menge der jeweiligen Patienten in Bezug zu den durchschnittlichen IgG-Referenzwerten (mg/dl) liegt bei 0,0059 ($p=0.5168$). Der Koeffizient der männlichen LCL's weist eine Beziehung von 0,2716 ($p=0.2507$) auf. Weiterhin ist eine ausgeprägtere, aber nicht signifikante,

negative Korrelation der weiblichen Zelllinien von $-0,4044$ ($p=0.4746$) festzustellen, d.h. je geringer die IgG-Menge der jeweiligen Patienten desto höher die p70-Nibrin Menge.

5.7.4. Keine Korrelation von Ig-Status mit Krebs

Für die Korrelation des Ig-Status und dem Auftreten von Krebserkrankungen bzw. Krebstodesfällen wurden die klinischen Ig-Daten der Patienten, je nachdem ob sie inner- bzw. unterhalb der Ig-Referenzbereichliste lagen, klassifiziert (Tabelle 8).

Tabelle 8: Klassifizierung der Ig-Daten der Patienten (■-innerhalb, ▼-unterhalb der jeweiligen Ig-Referenzwerte) und das Auftreten von Krebserkrankungen und Krebstodesfällen.

Sex	LCL	IgA	IgG	IgA/IgG	Krebserkrankungen	Todesursache
F	94P195	■	■	■		
M	94P118	▼	▼	▼	TLBL/ALL	Krebs
F	JaCe		keine Daten		NHL	Krebs
F	95P558	▼	▼	▼	B-NHL	Krebs
F	RoZd		keine Daten		Menigeoma	
F	95P511	■	▼		B-NHL	Krebs
F	95P463		▼		B-NHL	Krebs
M	96P476	■	▼			
F	95P182	▼	▼	▼	B-NHL	Krebs
M	97P614	■	■	■	B-NHL	Krebs
M	94P112	▼	▼	▼		Resp Insuff
F	97P610	▼			B-NHL	
M	94P496	■	▼		Thyroid Carcinom	
M	94P248	▼	▼	▼		
M	94P307	■	■	■	B-NHL	
M	94P251	▼	▼	▼	HL	Krebs
F	89P319		keine Daten		B-NHL	Krebs
F	94P126		keine Daten			
M	95P185	▼	▼	▼		
F	98P055	▼	■			
M	94P247	▼	▼	▼	T-NHL	Sepsis
F	97P081	▼				
F	97P082	▼	▼	▼		Resp Insuff
M	94P548	▼	▼	▼		Resp Insuff
M	94P196	▼	■			
M	96P473	▼	▼	▼		

Hierbei zeigte sich das bei den zehn Patienten mit Krebserkrankungen, für die IgA-Werte vorlagen, sechs Patienten Werte unterhalb der Referenzbereichliste aufwiesen und für die zehn Patienten mit Krebserkrankungen, für die IgG-Werte vorlagen, acht

Patientenwerte unterhalb des Referenzbereichs lagen. Lediglich zwei Krebserkrankungen sind aufgeführt in denen die Patienten IgA- und IgG-Werte innerhalb des Referenzbereichs aufwiesen. Ebenso zeigt sich das von sieben Krebstoten, von denen Ig-Werte vorlagen, vier IgA-Werte unterhalb der Ig-Referenzbereichliste lagen, sechs reduzierte IgG-Werte besitzen und vier verringerte IgA/IgG-Werte aufwiesen.

5.7.5. Signifikante Korrelation zwischen zellulärer p70-Nibrin Menge und Krebserkrankungen der Patienten

Der Vergleich der Daten aus Tabelle 4 und Abbildung 21 zwischen p70-Menge und den klinischen Patientendaten zu Krebserkrankungen und -todesfällen der 26 Patientenzelllinien ergab eindeutig das mehrheitlich Patienten mit niedrigen p70-Nibrin Mengen in den korrespondierenden Zelllinien, Krebs entwickelten (Abbildung 35).

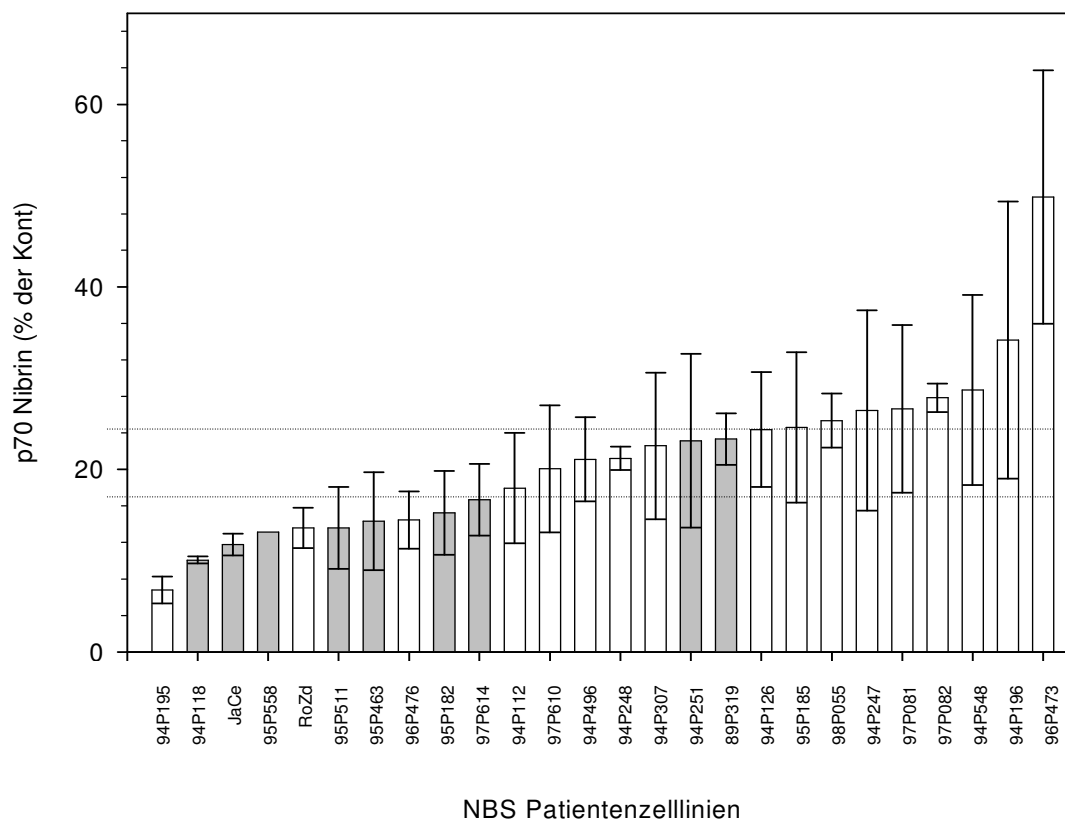


Abbildung 35: Mittelwerte der rel. p70-Nibrin Mengen in % bezogen auf p95-Nibrin Kontrollen von 26 Patientenzelllinien für die klinische Daten vorlagen. Es wurden mindestens vier Immunpräzipitationen jeder Patientenzelllinie durchgeführt. (graue Balken bezeichnen Krebstote). (Mittelwert der Standardabweichung 5,79).

Hierfür wurde das 95%ige Konfidenzintervall (17,5 % und 24,6 %) des Mittelwertes (21,0) aller p70-Nibrin Werte ermittelt und die Patientenzelllinien in 3 Gruppen, unterhalb, innerhalb und oberhalb des 95 %igen Konfidenzintervals, unterteilt (Linien in Abbildung 35).

Wie aus Tabelle 9 zu entnehmen ist verstarben neun Patienten an Krebs, zwei männliche und sieben weibliche (2 M, 7 F). Die Krebserkrankungen traten bei einem durchschnittlichen Alter von 12,6 Jahren, die Todesfälle bei durchschnittlich 14,3 Jahren auf. Deutlich ist zu erkennen dass die meisten Krebserkrankungen und -todesfälle unterhalb von 17,5 % des Mittelwertes (21,0) aller p70-Nibrin Werte auftraten. Unterhalb des 95 %igen Konfidenzintervals erkrankten von zehn Patienten (3 M, 7 F), acht (1 M, 7 F) und sieben verstarben (1 M, 6 F). Die Krebserkrankungen traten bei einem durchschnittlichen Alter von 12,1 Jahren, die Todesfälle bei durchschnittlich 15,4 Jahren auf.

Tabelle 9: Krebserkrankungen und –todesfälle der gesamten, sowie der männlichen (M) und weiblichen (F) Patientenzelllinien und die jeweiligen Altersmittelwerte bei Erkrankung (~E Alter) und Tod (~T Alter) der NBS-Patienten innerhalb der drei Gruppen des 95%igen Konfidenzintervals. Die Standardabweichungen sind in Klammern angegeben.

p70-Nibrin-Nibrin	n	Erkrankungen	~ E Alter	Todesfälle	~ T Alter
	26	14	12,6 (7,20)	9	14,3 (7,00)
Gesamt	F 13	F 9	10,75 (7,72)	F 7	12,73 (7,49)
	M 13	M 5	15,00 (6,26)	M 2	16,65 (6,78)
< 17,5%	10	8	12,1 (7,53)	7	15,4 (7,45)
	F 7	F 7	12,33 (8,43)	F 6	13,92 (8,61)
	M 3	M 1	11,50 (6,36)	M 1	18,95 (0,78)
~	8	5	11,0 (5,79)	2	10,5 (4,95)
	F 3	F 2	6,00 (1,41)	F 1	7,00
	M 5	M 3	14,33 (4,93)	M 1	14,00
> 24,6%	8	1	24,0		
	F 3	F 0			
	M 5	M 1	24,0		

Innerhalb des 17,5 % und 24,6 % Intervalls erkrankten von acht Patienten (6 M, 3 F), fünf (3 M, 2 F) und zwei verstarben (1 M, 1 F). Die Krebserkrankungen traten bei einem durchschnittlichen Alter von 11,0 Jahren, die Todesfälle bei durchschnittlich 10,5 Jahren auf.

Oberhalb des 95 %igen Konfidenzintervalls erkrankten von acht Patienten (4 M, 3 F), nur noch ein männlicher Patient im Alter von 24 Jahren an Krebs der bis zum Abschluss der vorliegenden dieser Arbeit immer noch am Leben war.

Tabelle 10: Krebserkrankungen und –todesfälle der Patienten geordnet nach drei Gruppen der p70-Nibrin Mengen der korrespondierenden Zelllinien in % bezogen auf p95-Nibrin. Die drei Gruppen des 95 %igen Konfidenzintervalls sind durch lineare Abtrennungen gekennzeichnet. Das projizierte Alter der Patienten (Alt Proj), das Krebsdiagnosealter (Alt Mal), das Todesalter (Alt Tod), die Krebsdiagnose und die Todesursache sind in den weiteren Spalten dargestellt.

Sex	LCL	p70-Nibrin	Alt Proj	Alt Mal	Alt Tod	Krebsdiagnose	Todesurs.
F	94P195	6,785	17,7				
M	94P118	10,070	22,7	16	18,4	TLBL/ALL	Krebs
F	JaCe	11,774	30,3	29	29,0	NHL	Krebs
F	95P558	13,144	16,6	12	12,3	B-NHL	Krebs
F	RoZd	13,594	25,5	11		Menigeoma	
F	95P511	13,602	12,4	7	7,5	B-NHL	Krebs
F	95P463	14,324	19,1	7	10,0	B-NHL	Krebs
M	96P476	14,453	9,4				
F	95P182	15,242	12,2	8	10,8	B-NHL	Krebs
M	97P614	16,679	20,3	7	19,5	B-NHL	Krebs
M	94P112	17,946	16,0		13,1		Resp Insuff
F	97P610	20,067	9,0	5		B-NHL	
M	94P496	21,113	20,1	20		Thyroid Carcinom	
M	94P248	21,210	24,4				
M	94P307	22,585	24,7	11		B-NHL	
M	94P251	23,155	18,8	12	14,0	HL	Krebs
F	89P319	23,326	22,6	7	7,0	B-NHL	Krebs
F	94P126	24,372	23,1				
M	95P185	24,602	12,4				
F	98P055	25,344	14,3				
M	94P247	26,462	28,0	24	27,4	T-NHL	Sepsis
F	97P081	26,637	17,3				
F	97P082	27,841	15,4		12,5		Resp Insuff
M	94P548	28,709	15,7		7,5		Resp Insuff
M	94P196	34,170	12,4				
M	96P473	49,848	9,9				

Signifikant sind hierbei besonders die hohen Krebserkrankungsraten ($p=0,0152$ Fischer Test) und Todesfälle ($p=0,004$ Fischer Test) unterhalb des 17,5 % Intervalls im Vergleich zu den Patientenzelllinien mit hohem p70-Nibrin Mengen⁸⁸.

In Tabelle 10 sind die einzelnen Patientenzelllinien entsprechend den drei Gruppen der p70-Nibrin Mengen dargestellt. Weiterhin wird für jede LCL das projizierte Alter, das Krebsdiagnosealter, das Todesalter, die Krebsdiagnose und die Todesursache aufgezeigt. Abgesehen von den neun Krebsstoten sind drei weitere Todesfälle an respiratorischer Insuffizienz aufgetreten, ein Patient verstarb an Sepsis.

Tabelle 11: Mittelwerte der gesamten, sowie der männlichen (M) und weiblichen (F) p70-Nibrin Mengen, Alter der LCL's, Alter der Patienten während der Etablierung der LCL's (Pat Alter LCL) und projiziertes Alter (Alt Proj) für die Gesamtheit der 26 Patientenzelllinien sowie für die drei Gruppen des 95 %igen Konfidenzintervalls der p70-Nibrin Mengen in Prozent bezogen auf p95-Nibrin.

	n	p70-Nibrin	~ Alter LCL	~ Pat Alter bei LCL	Alt Proj
Gesamt	26	21,04 (8,85)	10,23 (2,23)	7,50 (5,57)	18,09 (5,85)
	F 13	18,16 (6,75)	10,08 (3,04)	7,31 (5,78)	18,12 (5,95)
	M 13	23,92 (9,98)	10,38 (1,04)	7,69 (5,59)	18,06 (5,98)
< 17,5%	10	12,97 (2,83)	10,10 (2,56)	7,70 (6,82)	18,62 (6,44)
	F 7	12,64 (2,79)	10,43 (2,94)	7,43 (7,48)	19,11 (6,67)
	M 3	13,73 (3,36)	9,33 (1,53)	8,33 (6,35)	17,47 (7,09)
~	8	21,72 (2,07)	11,25 (2,18)	8,62 (4,37)	19,83 (5,29)
	F 3	22,58 (2,24)	11,67 (4,04)	6,67 (5,51)	18,23 (8,00)
	M 5	21,20 (2,02)	11,00 (0,00)	9,80 (3,70)	20,80 (3,73)
> 24,6%	8	30,45 (8,37)	9,37 (1,59)	6,12 (5,33)	15,67 (5,49)
	F 3	26,61 (1,25)	7,67 (0,58)	7,67 (1,15)	15,67 (1,52)
	M 5	32,75 (10,20)	10,40 (0,89)	5,20 (6,18)	15,68 (7,18)

Tabelle 11 fasst die Ergebnisse von Tabelle 10 zusammen und stellt Mittelwerte für die drei Gruppen des 95 %igen Konfidenzintervalls der p70-Nibrin Mengen dar. Hierbei ist deutlich zu erkennen dass es weder bezüglich des Geschlechtes noch beim Alter der LCL's, dem Alter der Patienten während der Etablierung der LCL's und dem projizierten Alter signifikante Unterschiede gibt.

5.7.6. Keine Korrelation der p70-Nibrin Menge mit den Ergebnissen der *real-time* PCR

Ein Vergleich der für die verschiedenen Patientenzelllinien ermittelten rel. p70-Nibrin Mengen (Tabelle 4 und Abbildung 21) und dem in der *real-time* PCR (vgl. 5.5) ermittelten Expressionsniveau für die Gene TNFAIP2, Zizimin, NALP2, Survivin, Eif1a, NDRG1, und TCF3 ergab keine signifikanten Koeffizienten so dass eine Beziehung ausgeschlossen werden kann (Abbildung 36).

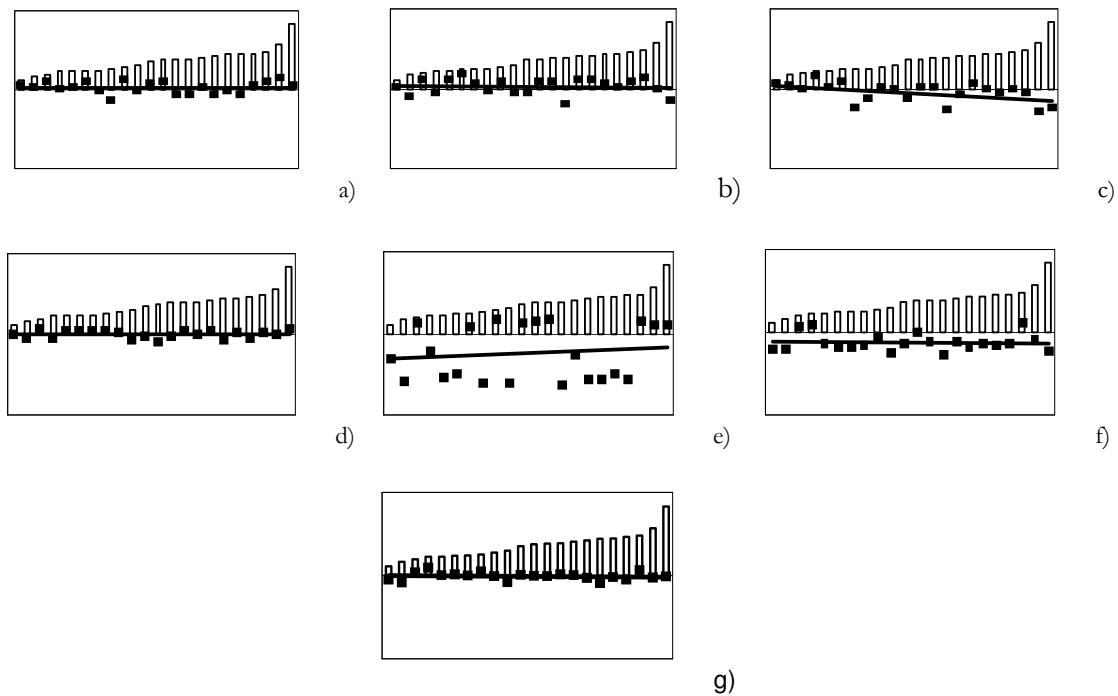


Abbildung 36: p70-Nibrin-Menge und Expressionsniveau einzelner Gene. Die Balken stellen die p70-Nibrin Menge aller in Tabelle 2 aufgeführten Patientenzelllinien dar. Die schwarzen Quadrate symbolisieren a) TNFAIP2 mit einem Korrelationskoeffizient von 0,0723 b) Zizimin, Korrelationskoeffizient: -0,2045 c) NALP2, Korrelationskoeffizient: 0,5098 d) Survivin, Korrelationskoeffizient: 0,0326 e) Eif1a, Korrelationskoeffizient: 0,2386 f) NDRG1, Korrelationskoeffizient: -0,0790 g) TCF3, Korrelationskoeffizient: -0,0747. Zusätzlich sind die Trendlinien in jeder Abb. aufgeführt.

6. Diskussion

Die klinische Variabilität von NBS-Patienten ist beträchtlich. Besonders interessant ist dies vor dem Hintergrund, dass 90 % der Patienten Träger der gleichen Mutation sind. Diese exprimieren zwei Nibrin-Proteinfragmente, denen eine Restfunktion zugeschrieben wird.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine große Anzahl lymphoblastoider Zelllinien von klinisch gut charakterisierten NBS-Patienten hinsichtlich der p70-Nibrin-Expression (Proteinmenge) untersucht⁸⁸.

Alle analysierten NBS-Patienten LCL's, mit Ausnahme der Patientenzelllinie mit der 742insGG Mutation, wiesen die gleiche 5bp Deletion, 657 Δ 5 auf^{1, 19}, die durch alternative Translation zu einem C-terminalen p70-Nibrinfragment führt (Abbildung 3).

Diese Mutation ist hypomorph, d.h. einige Funktionen des Wildtyp-Proteins, wie z.B. die Bindung an Mre11 und Rad50 und die Aktivierung von ATM^{35, 37, 92, 93} werden aufrecht erhalten. Es ist wahrscheinlich dass das p70-Nibrin für das Überleben von NBS-Patienten verantwortlich ist. Experimente mit NBS-Null Mutationen zeigten, dass solche Mäuse frühzeitig in der Embryonalentwicklung versterben^{77, 78} aber bei Expression eines trunkierten Proteinfragmentes, ähnlich dem p70-Nibrin, durchaus lebensfähig sind^{5, 68}. Demuth *et.al.* konnten zeigen dass Null-Mutante Murinzellen nach dem Transfer von humaner cDNA mit der 657 Δ 5 Mutation und der Expression von p70-Nibrin deutlich besser überleben als ohne diese cDNA^{75, 93}.

Angesichts dieser Bedeutung des p70-Nibrin stellte sich die Frage, inwieweit die Variationen der p70-Nibrin Expression für die klinische Variabilität verantwortlich sind und in wie fern weitere mögliche Faktoren und deren Stoffwechselwege involviert sein könnten.

6.1. EBV-Transformation

Da primäre Lymphozyten und Fibroblasten aufgrund ihres langsamen Wachstums nur eingeschränkt zu kultivieren sind, wurden alle beschriebenen Experimente, ausschließlich der Untersuchungen an primären Lymphozyten und Simian-Virus (SV) 40 transformierten Fibroblasten^{94, 95} mit Epstein Barr Virus (EBV) transformierten lymphoblastoiden Zelllinien durchgeführt^{30, 96-98}. EBV infiziert vor allem eine Untergruppe der weißen Blutkörperchen, die B-Lymphozyten und induziert deren Zellteilung. Der EBV-Transformationserfolg bei B-Lymphozyten wurde zwischen 10 und 100% beschrieben

⁹⁹⁻¹⁰³ wobei Sugimoto *et al.* zeigte das immortalisierte LCL`s von einer einzelnen Zelle stammen die zufällig eine starke Telomeraseaktivität entwickelte ¹⁰⁴. EBV-transformierte Zelllinien zeichnen sich durch ein stabiles Wachstum und einen diploiden Chromosomensatz aus ¹⁰⁵. Im Vergleich zu primären Zellen weisen sie aber Veränderungen auf die sich aus der viralen Transformation ergeben und kritisch zu betrachten ist. So zeigte die genetische Analyse von EBV-transformierten B-Lymphozyten das virale EBNA-1,2,3,5,6 und LMP-1-Proteine exprimiert werden und notwendig für den Transformationserfolg sind ¹⁰⁶⁻¹⁰⁹. Diese EBV-kodierten Proteine regulieren in einem komplexen System sich selbst sowie auch zelluläre Gene. So reguliert z.B. das als erstes exprimierte virale Protein EBNA-2 die Expression der zellulären Gene CD21 und CD23 sowie die viralen Gene EBNA-1 und LMP-1 ^{110, 111}.

In allen durchgeführten Experimenten traten z.T. erhebliche Unterschiede der zellulären Charakteristika zwischen Kontroll- und Patientenzellen auf, obwohl alle Zelllinien auf die gleiche Art mit EBV immortalisiert wurden ⁹⁰. Demzufolge ist anzunehmen dass die beobachteten Variationen tatsächlich Ausdruck der verschiedenen NBS-Patientenzelllinien sind und somit nicht unmittelbar auf den EBV-Transformationsprozess zurückgeführt werden können. Ebenso zeigten Untersuchungen mit heterozygoten NBS-LCL`s das eine erhebliche Anzahl von Genen in ihrer Expression signifikant variierte, wobei deutliche Unterschiede zwischen NBS1-Mutationsträgern und Kontrollen auftraten ¹¹².

Obwohl Zelllinienmodelle nur in begrenztem Umfang die Komplexität eines Organismus und insbesondere die klinische Situation der NBS-Patienten widerspiegeln können stellen sie dennoch ein gutes Modell dar, da mit (transformierten) B-Lymphozyten, Zellen verwendet wurden, die bei NBS-Patienten unmittelbar am Krankheitsgeschehen beteiligt sind.

6.2. Genexpression in LCL`s

Um weitere mögliche Faktoren und deren Stoffwechselwege zu identifizieren, die zu der erheblichen klinische Variabilität der homozygoten NBS-Patienten führen wurden Unterschiede in der Genexpression zwischen Kontroll- und Patientenzelllinien durchgeführt. Hierbei interessierte besonders die Identifizierung neuer Stoffwechselwege, in die Nibrin einbezogen sein könnte, sowie die weitere Charakterisierung der Nibrinfunktionen (z.B. Doppelstrangbruch-Reparatur). Im Mittelpunkt der Untersuchung stand weiterhin die

Identifizierung modifizierender Faktoren, die die klinische Variabilität der NBS-Patienten hinsichtlich der Chromosomeninstabilität und der Immundefizienz erklären könnte.

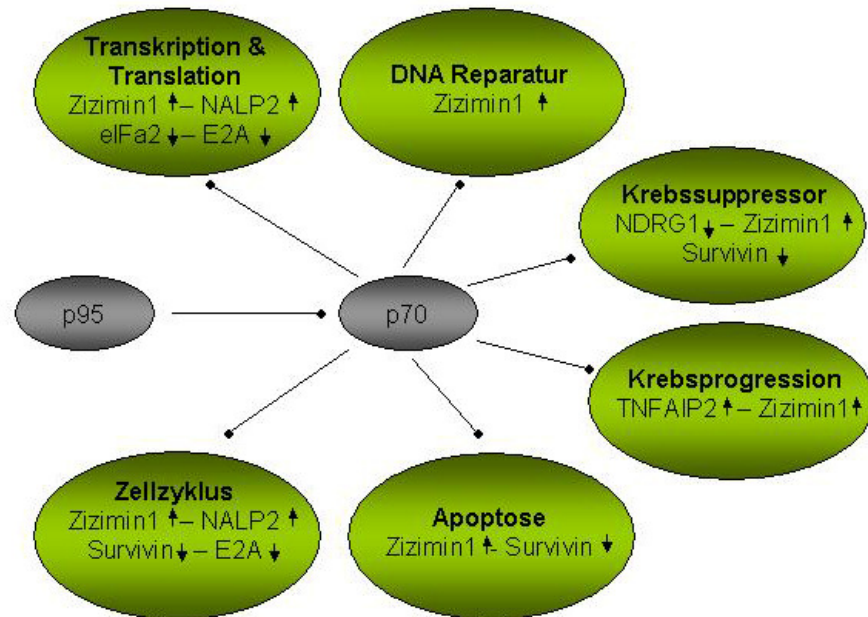


Abbildung 37: Gruppierung der untersuchten Gene und deren Wechselwirkungen (Pfeile zeigen Unter- oder Überexpression an).

Die hier vorgestellte Analyse der Genexpression wurde mittels *cDNA-microarrays* (Abbildung 14) durchgeführt und nachfolgend einer *real-time* PCR Verifizierung unterzogen (Abbildung 15). Es wurden mRNAs von jeweils drei weiblichen und drei männlichen Patienten mit mRNAs von entsprechenden Kontrollpersonen gepoolt um die Effekte individueller Variationen in den mRNA Expressionen zu vermeiden, die unabhängig von der NBS-Mutation auftreten. Diese gepoolten Proben wurden dann auf einem DNA-Lymphozytengen-Chip mit 17.000 cDNAs aus lymphatischen Geweben hybridisiert, um über- bzw. unterexprimierte Gene zu identifizieren.

6.2.1. In NBS-Patientenzelllinien überexprimierte Gene

Die überexprimierten Gene TNFAIP2 und Zizimin1 der *microarrays* konnten auch in der *real-time* PCR bestätigt werden. Allerdings konnte die Überexpression in den *microarray* Ergebnissen von Zizimin1 nicht mit den RT-PCR Werten der gleichen Zelllinien

verifiziert werden. Dies könnte u.a. mit den wenigen Messwerten und der generell schwachen Überexpression von Zizimin1 in Zusammenhang stehen.

Das am stärksten überexprimierte, Zytokine-induzierte *proinflammatory TNF- α -inducible protein 2* Gen TNFAIP2, wird vor allem in hämatopoetischen und lymphatischen Geweben exprimiert¹¹³ und wird bei Inflammationsreaktionen, z.B. ausgelöst durch Lipopolysaccharide (LPS) exprimierende Gram-negative Bakterien, zusammen mit anderen Genen exprimiert^{114, 115}. Ebenso konnte TNFAIP2 mRNA in hohen Konzentrationen im Knochenmark von Patienten mit myeloischer Leukämie nachgewiesen werden¹¹⁶ wobei in *Oligonukleotide arrays* von *acute promyelocytic leukemia* (APL) Patienten TNFAIP2 unterexprimiert war¹¹⁷. Weiterhin konnte gezeigt werden das Oncogene die Expression von TNFAIP2 induzieren und das Gen als Angiogenesefaktor in Erscheinung tritt¹¹⁸ und Inaktivierung durch virale Integration die Progression von Krebs unterstützte¹¹⁹. Die Überexpression von TNFAIP2 fügt sich hierbei gut in das NBS-Krankheitsbild mit signifikant erhöhten Krebsraten ein was mit dem Fehlen des vollständigen p95-Nibrin in Zusammenhang stehen könnte.

Meller *et al.* identifizierten Zizimin1 als GEF (*guanine nucleotide exchange factor*), das in dimerisierter Form bevorzugt die GTPase Cdc42 über die CHZ2-Domain aktiviert¹²⁰⁻¹²². Cdc42, als Teil der Rho-GTPasen, ist unter anderem notwendig für die Regulierung des Actin-Zytoskelettes, der Zellmigration, dem Zellwachstum und -zyklus, der Apoptose und Tumorprogression sowie der Genexpression und Transkription¹²³⁻¹²⁷.

Weiterhin aktiviert Cdc42 den Transkriptionsfaktor E2F¹²⁸ und interagiert somit, ebenso wie Nibrin, mit dem Zellzyklus indem es mit Genen des G1/S-Überganges wechselwirkt. Eine erhöhte Expression von Zizimin1 (Abbildung 14) könnte somit zu einer verstärkten Aktivierung von E2F führen. Die Komplexität der E2F-Genfamilie, die als Transkriptionsfaktoren u.a. Zellzyklus, Apoptose und DNA-Reparatur kontrollieren, erschwert hier allerdings eine genaue Funktionsbeschreibung der einzelnen E2F's. So konnte z.B. gezeigt werden das E2F's entweder als Oncogene oder Tumor-Suppressorgene in Erscheinung treten können oder die Zellzyklusprogression und Apoptose vorantreiben oder inhibieren^{129, 130}.

NALP2 wird in vielen verschiedenen, auch hämatopoetischen Zelltypen und Geweben exprimiert^{131, 132} und zeigte in den *microarray*-Experimenten eine Überexpression die allerdings in der *real-time* PCR nicht bestätigt werden konnte. Auch bei NALP2, ebenso wie TNFAIP2, wird durch LPS bzw. andere inflammatorische Zytokine die Expression induziert und es inhibiert durch Assoziation mit dem IKK-Komplex die Aktivierung von

NF- κ B^{131, 133, 134} das u.a. in die Regulation des Immun- und Inflammationsstoffwechsels sowie über die Induktion von Wachstums- und Transkriptionsfaktoren (z.B. p53) in Aspekte des Zellwachstums, sowie der Zelldifferenzierung und Proliferation involviert ist. Weiterhin induziert NALP2 zusammen mit ASC, wahrscheinlich unter Bildung von Inflammasomen, als positiver Regulator via Caspase-1 Aktivierung die IL-1 β Produktion¹³⁵, einem Protein, dass u.a. in die Aktivierung der B- und T-Zellen involviert ist.

6.2.2. In NBS-Patientenzelllinien unterexprimierte Gene

Die unterexprimierten Gene Survivin, eIF1a, NDRG1 und E2A/TCF3 aus den *microarray*-Untersuchungen konnten ebenfalls in der *real-time* PCR bestätigt werden.

Survivin gehört zu den *inhibitor of apoptosis* (IAP) Genen und wird mit Ausnahme weniger Gewebe¹³⁶⁻¹³⁸ normalerweise nur in embryonalem Gewebe exprimiert^{139, 140}. Allerdings scheint eine Verbindung zwischen Zellproliferation und der Survivinexpression zu bestehen, da Survivin auch in einigen stark proliferierenden Geweben nachweisbar ist^{141, 142}.

Weiterhin ist eine, bis auf das 14-fache erhöhte¹⁴³, Überexpression in fast allen Humantumoren zu beobachten^{144, 145}, die von einem aggressivem Krankheitsverlauf, einer hohen Wiederkehrtrate und einer niedrigen Überlebensrate der Krebspatienten gekennzeichnet ist¹⁴⁶⁻¹⁴⁸. Survivin inhibiert hierbei die Auslösung der Apoptose-Caspase-Kaskade¹⁴⁹⁻¹⁵² und ermöglicht der Tumorzelle somit einen *tumor escape*-Mechanismus. Ebenso konnte gezeigt werden, dass das Zellzyklusregulator- und Tumorsuppressorgen p53, das in der Hälfte aller Tumore mutiert ist und normalerweise in geschädigten Zellen den Zellzyklus unterbindet und die Zellen in die Apoptose treibt, die Genexpression von Survivin unterdrückt¹⁵³⁻¹⁵⁵. Survivin initiiert ebenso den Eintritt in den Zellzyklus und überführt die Zelle aus dem G1-Arrest in die S-Phase¹⁵². Weiterhin assoziiert Survivin während der Zellteilung mit der Mitosespindel¹⁵⁶ und ist damit für den Ablauf der Mitose, die Chromosomenkondensation und -trennung, sowie für die anschließende Zytokinese¹⁵⁷⁻¹⁵⁹ bedeutsam.

Der hoch konservierte eukaryotische *translation initiation factor* eIF1a ist essentiell für die Bindung der Initiator-tRNA zur Formation des Präinitiationskomplexes 43S¹⁶⁰⁻¹⁶², wobei es, assoziiert mit der A-Stelle, die Met-tRNA zur P-Stelle dirigiert¹⁶³⁻¹⁶⁵. Der 43S-Komplex bindet dabei das 5' Ende der mRNA, scannt diese für das Initiations-AUG und bildet anschließend den 48S-Komplex mit der mRNA^{160, 166}. Elektronenmikroskopische

Untersuchungen zeigten hierbei dass die Faktoren eIF1 und eIF1a zu einer Konformationsänderung im 40S-Komplex führen der wesentlich für den Beginn des Scanvorganges ist ^{165, 167}.

Der eIF1a-Initiationsfaktor, der sowohl in den *microarray*-Untersuchungen (vgl. 5.4) als auch der RT-PCR (vgl. 5.5) unterexprimiert war stimuliert die Formation des 43S-Prä-initiationskomplex und ist am Scanning und der Erkennung der AUG-Sequenz beteiligt. Die geringe Menge an eIF1a könnte, vielleicht im Zusammenspiel mit weiteren Faktoren eine Translationsinitiation am eigentlichen p95-Nibrin Startcodon beeinträchtigen und zur Translationsinitiation am p70-Nibrin Startcodon führen.

Das Gen *N-myc down regulated gene 1* (NDRG1) wurde als Prostata und Brustkrebs-suppressorgen beschrieben ¹⁶⁸⁻¹⁷⁰. Es ist in vielen Organismen konserviert ^{171, 172} und als Rab4a-Effektorprotein am Recycling des Zelladhäsionsproteins E-cadherin beteiligt ¹⁷³, dessen Unterexpression bei der Metastasierung von Krebszellen eine Rolle spielt ¹⁷⁴. Die Funktion von NDRG1 als Metastasen-Suppressor-Protein und dessen vorgefundene Unterexpression könnte somit zu erhöhten Krebsraten führen.

Die Genprodukte von E2A, E12 und E47 ¹⁷⁵⁻¹⁷⁷, werden in verschiedenen Zellen exprimiert, sind aber besonders in sich entwickelnden Lymphozyten und generell während der Zellproliferation hoch exprimiert ¹⁷⁸. Sie scheinen dabei vorrangig in der Regulation von Transkriptionsfaktoren für die B-Zellentwicklung zu fungieren da sie an den Promotern und Enhancern vieler Gene binden die wesentlich für die B-Zellentwicklung sind ¹⁷⁶. So ist E2A für die Entwicklung von *common lymphoid progenitors* (CLPs) notwendig ^{179, 180}, induziert zusammen mit PU.1 das Gen EBF, welches essentiell für den Übergang von Pro-B-Zellen, die sich von pluripotenten Stammzellen herleiten, zu Prä-B-Zellen ist ¹⁸¹ und reguliert sowohl die Rekombination der IgH- und IgL-Ketten ¹⁸² als auch den Klassenwechsel in aktiven B-Lymphozyten ^{183, 184}. Die Regulation des Klassenwechsels wird wahrscheinlich, zumindest zum Teil, durch eine transkriptionelle Regulierung der Rekombinase-aktivierenden Gene von E2A gesteuert ¹⁸⁵⁻¹⁸⁷.

Die essentielle Rolle von E2A bei der Lymphozytenentwicklung und dessen differentielle Expression spiegelt vermutlich auch hier die allgemeine Störung der Zellen wieder in denen kein vollständiges Nibrin vorliegt. Da E2A-Proteine auch mehreren posttranslationalen Modifizierungen unterliegen, welche die Stabilität oder Aktivität verändern können ¹⁸⁸⁻¹⁹⁰ wären weitere Untersuchungen aufschlussreich.

Abschließend lässt sich feststellen dass alle untersuchten Gene in Stoffwechselwege einbezogen sind die das Krankheitsbild von NBS beeinflussen könnten. Dies betrifft so-

wohl funktionelle Aspekte bei apoptotischen und inflammatorischen Reaktionen die eine Rolle bei der Krebsentstehung spielen als auch Funktionen in der B-Zellentwicklung, dem Zellzyklus, der DNA-Reparatur, der Translationsinitiation und Metastasierung. Die vorliegenden experimentellen Ergebnisse und klinischen Daten und die vielseitigen Wechselwirkungen bzw. die Über- oder Unterexpressionen der untersuchten Gene machen allerdings weitergehende Untersuchungen notwendig um deren exakten Einfluss auf Immundefizienzen und Krebs zu klären.

6.3. Beziehung von p70-Nibrin Menge und den experimentellen und klinischen Ergebnissen

6.3.1. Beziehung von p70-Nibrin Menge und den experimentellen Ergebnissen

Für 26 der 28 untersuchten lymphoblastoiden 657Δ5 Patientenzelllinien lagen zum Ende der Arbeit aktualisierte klinische Daten der korrespondierenden Patienten vor. Hierzu gehörte der immunologische Status, zytogenetische Charakteristika sowie soziodemographische, familiengeschichtliche, gynäkologische, geburtsbezogene, und allgemeine medizinische Daten. Die Zelllinien 97P751 und 89P320, für die keine aktuellen Daten zu erhalten waren, wurden in die weitere Analyse nicht einbezogen.

Das Wachstumsverhalten der in dieser Arbeit untersuchten NBS-Zelllinien variierte erheblich (vgl. 5.2). Vier Zelllinien zeichneten sich durch eine geringere Verdoppelungszeit als die der Kontrollzelllinien aus, wobei insbesondere die Linie 94P307 durch ein besonders geringes Wachstum auffiel. Die restlichen sechs LCL's ließen sich hingegen vom Wachstum der zusammengefassten Kontrollzelllinien nicht unterscheiden, wobei die Linien 94P112 und JaCe sogar höhere Wachstumsparameter aufwiesen als die Kontrollzellen (Abbildung 9, Tabelle 1). Dies deckt sich mit den Ergebnissen variabler Wachstumsraten in NBS-Fibroblasten¹⁹¹ und immortalisierten T-Zelllinien¹⁹², obwohl andere Autoren für untransformierte Fibroblasten¹⁴, NBS1^{m/m} *mouse embryonic fibroblasts* (MEFs)⁵ und einer im NBS1-Gen mutierten DT40-Hühnchenzelllinie⁶ im Vergleich zu Kontrollzellen ein reduziertes Wachstum nachweisen konnten. Eine Korrelation zwischen den Wachstumseigenschaften und den p70-Nibrin Mengen (Abbildung 29) war generell nicht nachzuweisen (vgl. 5.7.1.1).

Die Analyse der Radiosensitivität der NBS-Zelllinien wies ebenfalls ein heterogenes, nicht signifikantes, Ergebnis innerhalb der untersuchten Zelllinien auf (vgl. 5.3). Auch wenn eine erhöhte Sensitivität gegenüber ionisierender Strahlung (IR) dem klinischen

Krankheitsbild entspricht zeigen andere Untersuchungen in primären und immortalisierten NBS-Zellen erhöhte Radiosensitivität mit einer mindestens 2-fachen Zelltodrate¹² und NBS-Zelllinien mit korrigiertem Wildtyp-Nibrin wiesen einen korrigierten Phänotypen auf^{74, 193}. Auch hier ließ sich aufgrund der wenigen Messwerte keine statistisch relevante Aussage treffen, da lediglich zwei von sechs LCL`s eine geringere Überlebensrate als die Kontrollzelllinien aufwiesen.

Aufgrund der fehlenden Korrelation der, in der Literatur gut beschriebenen, zellulären Parameter Wachstum und Radiosensitivität war es wichtig auszuschließen dass das Alter der LCL`s (entspricht dem Zeitraum der Zelllinie in Kultur) bzw. das Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Etablierung der lymphoblastoiden Zelllinie zu einer Beeinflussung der experimentellen Ergebnisse führte. Hierzu wurden beide Werte mit der Wachstumsvariabilität verglichen.

Alle Zelllinien wurden zwischen 1989 und 1998 etabliert, das durchschnittliche Alter der Zelllinien lag hierbei bei elf Jahren und das durchschnittliche Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Etablierung der lymphoblastoiden Zelllinie lag bei acht Jahren. Weder der Korrelationskoeffizient zwischen Wachstum und dem Alter der LCL`s ($p = 0.1865$) noch der Koeffizient zwischen Wachstum und dem Alter der Patienten während der Etablierung der LCL`s ($p = 0.3316$) zeigten signifikante Werte und schließen eine Korrelation zwischen Wachstumssteigerung und Alter der LCL`s als auch der Wachstumssteigerung und dem Alter der Patienten während der Etablierung der LCL`s aus (vgl. 5.7.1.2).

Des Weiteren wurden beide Alterswerte mit der p70-Nibrin Variabilität der homozygoten lymphoblastoiden Zelllinien in Beziehung gesetzt. Hierbei lagen das durchschnittliche Alter der LCL`s bei 10,2 Jahren und das durchschnittliche Alter der Patienten während der Etablierung der lymphoblastoiden Zelllinie bei 7,5 Jahren. Auch hier ergab sich weder zwischen der p70-Nibrin Menge und dem Alter der LCL`s ($p = 0.7263$) noch für die Korrelation zwischen p70-Nibrin Menge und dem Alter der Patienten zum Zeitpunkt der LCL-Etablierung ($p = 0.274$) eine signifikante Beziehungen zwischen den Datensätzen (vgl. 5.7.1.2).

Zusammenfassend lässt sich demzufolge feststellen, dass die fehlende Korrelation der zellulären Parameter Wachstum und Radiosensitivität einerseits auf die geringe Anzahl von Daten zurückzuführen ist, andererseits traten auch in anderen Arbeiten variable Wachstumsraten auf^{191, 192}. Die fehlende Korrelation weder mit dem Alter der LCL`s noch mit dem Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Etablierung der LCL`s zeigte jedoch

das hier kein Zusammenhang bestand, bzw. dieser mit den verwendeten Methoden nicht messbar war.

6.3.2. p70-Nibrin Menge und klinische Patientendaten

NBS-Patienten zeigen eine hohe Variabilität in zellulärer und humoraler Immundefizienz, Nibrin ist am Immunglobulin-Klassenwechsel beteiligt⁹¹ und niedrige IgA- und IgG-Werte wurden in Patienten bereits beschrieben^{10, 22}. Verringerte IgA- und IgG-Werte wurden auch für die in dieser Arbeit untersuchten Patienten gefunden (vgl. 5.7.3). Die IgA- und IgG-Werte der Patientenzelllinien wurden mit den klinischen Referenzbereichen altersabhängig verglichen wobei nur Patient 97P614 IgA-Mengen über den durchschnittlichen Referenzwerten aufwies (vgl. Abbildung 32) und nur zwei Patienten (98P055 und 94P196) lagen über den durchschnittlichen IgG-Referenzwerten (vgl. Abbildung 34). Innerhalb des Referenzbereiches lagen immerhin noch 40% der IgA-, 33% der IgG- und 27% der kombinierten IgA/IgG-Werte (vgl. Tabelle 5), wobei überdurchschnittlich viele im unteren Bereich angesiedelt sind (vgl. Abbildung 31 und Abbildung 33).

Die Korrelation der p70-Nibrin Mengen mit den Immunglobulinwerten (IgA, IgG und IgA/IgG) der Patienten ergab keine signifikanten Ergebnisse (vgl. 5.7.3.1 und 5.7.3.2). So zeigte die Beziehung zwischen den p70-Nibrin Mengen und der IgA-Menge einen Koeffizienten von -0.2624 ($p = 0.2507$). Betrachtet man nur die weiblichen Patienten so ergibt sich eine negative Korrelation von -0,7639 wobei die Zunahme der p70-Nibrin Menge mit einer abnehmenden IgA-Menge der Patientinnen, d.h. weniger mg Immunglobulin A pro dl korrelieren könnte. Allerdings ist die statistische Signifikanz nicht gegeben. Eine signifikante Korrelation der gesamten p70-Nibrin Menge und der IgG-Menge, auch der männlichen und weiblichen LCL`s konnte ebenfalls nicht festgestellt werden.

Die p70-Nibrin Mengen der Zelllinien mit den Immunglobulinwerten unterhalb des jeweiligen Ig-Referenzbereiches ergab für IgA einen p70-Nibrin Mittelwert von 24,3% der p95-Nibrin Werte, für IgG 21,4% und für IgA/IgG 23,5%. Für die LCL`s innerhalb des jeweiligen Ig-Referenzbereiches zeigte IgA 15,9%, IgG 21,1% und IgA/IgG 15,4% der p95-Nibrin Werte. Auch bei dem Vergleich von Ig-Status und p70-Nibrin Menge können demzufolge keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden, so dass auch hier nicht von einer Korrelation ausgegangen werden kann.

Des Weiteren ergab der Vergleich von p70-Nibrin und den *real-time* PCR Ergebnissen (vgl. 5.7.6) für die Gene TNFAIP2, Zizimin, NALP2, Survivin, Eif1a, NDRG1, und TCF3 keine signifikanten Koeffizienten so dass eine Beziehung ausgeschlossen werden kann. Wie aus Abbildung 35 deutlich zu erkennen ist konnte jedoch eindeutig gezeigt werden das mehrheitlich Patienten deren Zelllinien niedrige p70-Nibrin Mengen aufweisen Krebs entwickelten und auch daran verstarben.

Krebsraten bei Patienten mit geringeren p70-Nibrin-Mengen in deren Zelllinien sind signifikant erhöht im Vergleich zu Patienten mit hohem p70-Nibrin-Mengen ($p = 0,0152$ Fischer Test). In der Gruppe oberhalb des 95%igen Konfidenzintervalls traten im Vergleich zur Gruppe unterhalb des Konfidenzintervalls mit sieben Todesfällen keine Krebstoten auf ($P = 0,0040$ Fischer Test). Ebenso ist das Alter bei Diagnose der Krebserkrankung auffällig. Die einzige Krebserkrankung in der oberen Gruppe wurde bei einem 24-jährigen Patienten diagnostiziert wobei der Durchschnittswert bei der mittleren Gruppe bei 12,6 Jahren lag und in der unteren Gruppe bei 12,1 Jahren. Obwohl dieser Einzelwert nicht testbar ist untermauert er doch die statistisch signifikanten Ergebnisse. Keine signifikanten Unterschiede traten bei dem Alter der Patienten bzw. dem der Zelllinien zwischen den einzelnen Gruppen und der Gesamtheit der untersuchten Patienten und deren Zelllinien auf (vgl. Tabelle 9 und Tabelle 11).

Mithilfe der klinischen Daten und aufgrund der hier vorgestellten Ergebnisse ließe sich demzufolge eine Krebswahrscheinlichkeit bei NBS-Patienten⁸⁸ als auch den heterozygoten Trägern und nicht betroffener Kontrollen¹⁹⁴ darstellen (Abbildung 38).

Weiterführende Untersuchungen mit Mäusen und den klinisch ebenfalls gut charakterisierten heterozygoten Familienmitgliedern sollten hier wichtige weitere Erkenntnisse bzw. Bestätigungen dieser Ergebnisse produzieren.

Zusammenfassend lässt sich feststellen dass eine signifikante Korrelation zwischen p70-Nibrin Menge und den Krebsraten abzuleiten ist. Ausgehend von kumulativen Effekten die sich *in vitro* nicht manifestieren ist die Korrelation von p70-Nibrin und den Krebstodesraten darstellbar, indem der mehrstufige Krebsentwicklungsprozess nach einer Latenzzeit von Jahren bis Jahrzehnten zu einer initialen Transformation der Zelle führt. Kumulative Effekte wurden sowohl für Brustkrebs¹⁹⁵ als auch multiple karzinogene Substanzen^{196, 197} beschrieben.

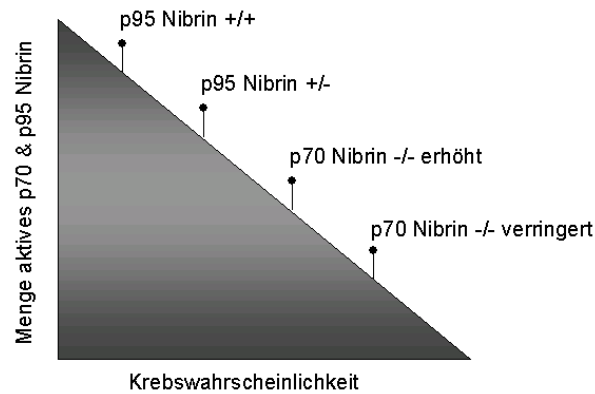


Abbildung 38: Krebswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit der Menge funktionellen p70- und p95-Nibrin. Seemanova *et al.* untersuchte hierbei die Krebswahrscheinlichkeit bei heterozygoten Trägern und nicht betroffener Kontrollen ¹⁹⁴.

Die klinischen Daten der immundefizienten NBS-Patienten wiesen fast ausschließlich eine geringere Serumkonzentration an IgG und IgA, verglichen mit einer gesunden Kontrollgruppe auf, wobei die IgM-Konzentration nicht verändert war ²². Hierbei ist allerdings besonders die Patientin 94P195 mit der geringsten p70-Nibrin Menge zu betrachten, die bis zum Ende der Studie und einem Alter von 18 Jahren noch keine Krebsdiagnose erhalten hatte und eine der wenigen Patienten mit einem normalen Ig-Status war. Ein funktionierendes Immunsystem könnte hier zum Ausbleiben der Krebsentstehung und einer Kompensation der geringen p70-Nibrin Mengen geführt haben.

6.4. Ursprung der Variationen in p70-Nibrin Mengen

Die p70-Nibrin Mengen, die trotz der gleichen 657Δ5 Mutation zu signifikanten Mengenvariationen des trunkierten Proteins von 7% bis 50% der Menge von p95-Nibrin führen weisen auf weitere Mechanismen hin die entweder auf die Transkription oder Translation des Fragmentes wirken oder den Abbau der mRNA oder des Proteins bedingen.

6.4.1. RNA-Level Variationen in p70-Nibrin Mengen

Ein Gen enthält auf sequenzieller und struktureller Ebene Informationen zur Transkriptionsregulation ¹⁹⁸, dem Spleißen ¹⁹⁹, der zellulären Lokalisation ²⁰⁰ sowie dem Aufbau des Translationskomplexes ²⁰¹. Um Mengenvariationen in der p70-Nibrin mRNA bei verschiedenen Patientenzelllinien zu erhalten müssten Unterschiede in der Steuerung der

Transkription, d.h. an den regulatorischen DNA-Sequenzen bzw. *cis*-Elementen, oder den aktivierenden bzw. reprimierenden Transkriptionsfaktoren oder *trans*-Elementen auftreten. Die Gesamtheit dieser *cis-trans*-Variationen könnte schließlich die Regulationsintensität der Transkription bzw. post-transkriptionellen Modifikation beeinflussen und zu verschiedenen Mengen an p70-Nibrin mRNA führen.

6.4.1.1. Transkriptionsregulation

Als *cis*-Regulationselemente werden die einem Gen zugehörigen Bindungsstellen für ein, oder mehrere Transkriptionsfaktoren, bezeichnet, die die Expression dieses Gens steuern²⁰². Diese können in der *enhancer*- und *promotor*-Region (*upstream activating sequences*), vor dem eigentlichen Gen, in Introns oder in der 3' UTR-Region (*untranslated region*) nach dem zu regulierendem Gen²⁰³ oder auch als *cis regulatory modules* (CRMs)²⁰⁴ in den nicht kodierenden Bereichen des Genoms liegen²⁰⁵ und als *silencer* zur Hemmung oder als *enhancer* zur Verstärkung der Transkription führen. *Cis*-Variationen sind bei den untersuchten NBS-Patienten nahezu ausgeschlossen da aufgrund der Homoallelie für die Gründermutation die Sequenzen zu über 290 kb identisch sind. An diesen regulatorischen *cis*-Sequenzen binden Proteine oder RNA's, die als *trans*-Regulationselemente bezeichnet werden.

Ebenso spielen DNA-Methylierungen, die intra- und intermolekulare Wechselwirkungen modifizieren und damit Zellprozesse wie Transkription und Translation, RNA-Prozessierung und zelluläre Signalkaskaden beeinflussen²⁰⁶ eine wesentliche Rolle indem der Methylierungsgrad und damit die selektive Lesehäufigkeit des NBS-Gens beeinflusst wird. Einen ebenso großen Einfluss auf die Translationseffizienz und –selektivität haben die generellen N- oder C-Methylierungsmodifikationen bei vielen Proteinen, die insbesondere auch an Transkriptionsfaktoren, Translationsproteinen und ribosomalen Proteinen stattfinden^{207, 208}.

Die schier unendlichen Interaktionsmöglichkeiten von DNA-Methylierungen, hunderten *trans*-Regulationselementen und tausenden *cis*-Elementen, verstreut über weite Teile des Genoms²⁰⁹ führen zu einer komplexen Regulationsmultiplizität der Transkription²¹⁰. Untersuchungen auf RNA-Niveau sind aufgrund der hier vorliegenden Ergebnisse notwendig um Transkriptionsvariationen zwischen Patienten- und Kontrollzelllinien aufzuzeigen. Dem sollten weiterhin Untersuchungen und Analysen bezüglich potentieller Signalkaskaden bzw. anderer Wechselwirkungen folgen.

6.4.1.2. Post-Transkriptionsregulation

Unter post-transkriptionaler Modifizierung werden alle Modifikationen des primären Transkripts wie 5'-*capping*, 3'-Polyadenylierung, Spleißen bei dem RNA-bindende Proteine und mikro-RNA's direkt mit der mRNA agieren sowie des *nonsense-mediated* (NMD) und *nonstop* (NSD) *decay* während der *pioneer round* der Translation zusammengefasst.

Beim *capping* wird am 5'-Ende der prä-mRNA ko-transkriptionell 7-Methyl-Guanosin synthetisiert und so die RNA-Stabilität, der Transport vom Kern zum Zytoplasma, der Abbau durch 5' Exonukleasen und die nachfolgende Translation beeinflusst da die 5'-Cap-Struktur durch den eIF4F-Komplex gebunden wird der die Anlagerung der mRNA an das Ribosom bei der Translationsinitiation ermöglicht²¹¹.

Nach der Transkription werden die nicht kodierenden Intronbereiche der prä-mRNA durch Spleißosomen, welche aus fünf kleinen nuklearen RNA's und einigen hundert Proteinen bestehen²¹², die die Spleißstellen anhand konservierter Erkennungssequenzen erkennen, entfernt^{213, 214}. Hierbei wird eine funktionelle und regulatorische mRNA-Diversität erzeugt, die nicht direkt in der mRNA-Sequenzinformation kodiert ist²¹⁰ und somit können durch alternatives Spleißen aus derselben prä-mRNA verschiedene mRNA-Isoformen entstehen^{213, 215, 216}. So wurden *nonsense codons* mit Veränderungen der Spleißeffizienz durch *nonsense-associated altered splicing* (NAS) in Verbindung gebracht, indem *cis*-Spleißeffektoren wie *exonic splicing enhancer* (ESE) und *silencers* (ESS) zu einem veränderten Spleißverhalten führen²¹⁷⁻²²⁰. Die resultierenden trunktierten Proteine sind dann häufig für einen milderen Phänotyp verantwortlich^{221, 222}, was auch bei NBS nachgewiesen werden konnte²⁷.

Da angenommen wird das bis zu 15% aller Krankheitsauslösenden Mutationen das Spleißverhalten beeinflussen²²³ setzt die Aufklärung eines möglichen Einflusses der NBS-Mutation weitergehende Experimente voraus die sich mit den potentiellen Interaktionen und regulatorischen Faktoren und Veränderungen, insbesondere unter Einbeziehung der verschiedenen p70-Nibrin Mengen, auseinandersetzen. Interessant wäre hierbei besonders inwieweit unterschiedliche Spleißvarianten zu unterschiedlichen Proteinmengen führen könnten.

Ebenso ist die Stabilität der mRNA vom Poly(A)-Schwanz abhängig der zur Bindung von fünf verschiedenen *poly(A)-binding proteins* (PABPs) Regulationsfaktoren notwendig ist, wobei Kernstämmige PABPs u.a. für die Synthese des Poly(A)-Schwanz selbst als auch für dessen Länge, die den mRNA-Abbau als auch deren Halbwertszeit beeinflusst, als

auch die mRNA-Reifung notwendig ist. Im Zytoplasma sind PABPs an der Aktivierung der Translationsinitiation beteiligt indem sie zusammen mit eIF3 die Anlagerung der mRNA an das Ribosom arrangieren²²⁴. Der Poly(A)-Schwanz und die PABPs kontrollieren somit von der Transkriptionsinitiation bis zur mRNA-Translation entscheidende funktionale Aspekte und treten dabei, ebenso wie die für das *capping* und den Nucleusexport zuständigen Faktoren, in einem dynamischen Prozess mit einer Vielzahl weiterer essentieller Faktoren in Interaktion deren mögliche Veränderungen in NBS-Zellen zu untersuchen bleibt.

Nach der Transkription und der mRNA-Prozessierung wird diese durch Bindungsproteine aus dem Nucleus transportiert²²⁵, wobei die mRNA-Exportfaktoren hohe Spezifität für die Transkripte aufweisen²²⁶, und diese nachfolgend im Zytoplasma zu subzellulären Kompartimenten dirigiert werden²²⁷.

Ein weiterer post-transkriptionaler *trans*-Effekt, der zur Regulation und zum Abbau bestimmter Transkripte führt²²⁸⁻²³⁰ ist der *nonsense-mediated mRNA decay* (NMD). Hierbei werden *premature termination codons* (PTC), die vor einem *splicing*-generierten *exon-junction complex* (EJC) liegen^{231, 232} von normalen Stopcodons im letzten Exon der mRNA von den Ribosomen unterschieden, so das ein NMD-Abbau nur bei Transkripten stattfindet in denen ein Stopcodon nicht von einem Intron, welches einen EJC-Splicemarker im Transkript hinterließ, gefolgt wird^{233, 234}. Die Aktivierung des NMD wird dabei durch die Formation eines *surveillance complexes*^{231, 235} während der *pioneer round* der Translation²³⁶ aktiviert.

Abweichend hiervon wurde allerdings auch NMD bei PTCs im letzten Exon nachgewiesen²³⁷ und pathologische Transkripte nicht abgebaut²³⁸⁻²⁴⁰. Auch der Abbau alternativer Spleißvarianten, von denen bereits zehn für NBS beschrieben wurden²⁷, wobei allerdings bei den meisten der Leserahmen nicht erhalten bleibt oder vorzeitige Stopcodons entstehen, ist nicht immer gegeben^{241, 242}. Weiterhin scheint die NMD-Effizienz sowohl gewebspezifischen²⁴³ als auch individuellen²⁴⁴ Einflüssen zu unterliegen.

Es konnte bereits gezeigt werden das *nonsense* und *frameshift* Mutationen, die in vielen genetischen Krankheitsbildern vorkommen^{245, 246}, eine NMD-Reaktion hervorrufen und dies demzufolge auch zum Abbau der 657Δ5 mRNA führen könnte. Da jedoch beim NMD weder alle fehlerhaften Transkripte destruiert werden und auch die Abbaueffizienz zu variieren scheint, ist es nicht auszuschließen das NMD auf die individuellen Abweichungen der p70-Nibrin Mengen einen Einfluss haben kann. Auch hier sind weitere Untersuchungen notwendig, um zu klären warum es bei einer identischen Mutation zu

unterschiedlichen Abbauhäufigkeiten kommen könnte, welche anderen am NMD beteiligten Proteine variieren oder inwiefern bzw. welche Mechanismen in den NMD-Prozess eingreifen.

Abschließend wäre eine Untersuchung aller Patientenzelllinien auf RNA-Ebene wünschenswert um zu klären, inwieweit transkriptionelle und post-transkriptionelle sowie RNA-bedingte Variationen zu unterschiedlichen Mengen an p70-Nibrin und somit zu erhöhten Krebsraten führen.

6.4.2. Protein Level Variationen in p70-Nibrin Mengen

Die Initiation der Translation wird durch die Assoziation, des aus verschiedenen regulatorischen Proteinen und RNA's bestehenden, Präinitiationskomplex gebildet, der mit der kleinen Untereinheit des Ribosoms interagiert und die Translationsstartstelle, auch in Abhängigkeit von post-transkriptionellen Modifikationen erkennt. Die Möglichkeiten der Regulation auf Proteinebene sind wiederum sehr vielfältig und reichen von spezifischen Initiationfaktoren über die generelle Abschaltung der Initiation sowie alternativen Translationsmechanismen bis zum Proteinabbau.

6.4.2.1. Translationseffizienz

Die Auswahl des korrekten Initiationscodons, an dem ca. die Hälfte aller Initiationsfaktoren beteiligt sind ²⁴⁷, ist essentiell für die Produktion funktioneller Proteine. Hierbei bindet der 43S-Komplex das 5' Ende der mRNA und scannt diese für die Initiations-AUG ¹⁶⁶. Generell wird das erste 5' AUG-Codon als Startcodon gewählt, obwohl Maser *et al. in vitro* zeigen konnte das im Falle von NBS das *internal ribosome entry* an beiden alternativen Startcodons eintritt ⁷⁶ ist die Bedeutung solcher *internal ribosome entry site* (IRES) Sequenzen *in vivo* umstritten ²⁴⁸⁻²⁵⁰. Dennoch würde der Translationsbeginn an IRES-Sequenzen für die Initiation des p70-Nibrin an einem späteren Startcodon sprechen, wobei das Fehlen einer so genannten „Kozak-Sequenz“ sowie die stromabwärts Position des Startcodons zur geringeren Effizienz der Translationsinitiation beitragen könnte. Die Kozak-Sequenz ist charakterisiert durch das Vorhandensein eines Purins an der Position -3 vom A des AUG-Codons und eines G an der Position +4 ²⁵¹ und beide alternativen Startcodons weisen diese nicht auf. Allerdings wären hier andere, die Initiation begünstigende lokale Sequenzkontexte denkbar die zu dieser alternativen mRNA-Translation führen könnten.

6.4.2.2. Post-translationelle Modifikation

Wie auch bei der post-transkriptionellen Modifikation bestehen auch die posttranslationellen Modifikationen aus einer großen Vielfalt chemischer Proteinmodifikationen sowie umfangreichen Kombinationsmöglichkeiten und determinieren so die funktionelle Proteinstruktur, Lokalisation und Interaktionen mit anderen Proteinen.

Proteinphosphorylierung und -dephosphorylierung sind in die reversible Aktivierung und Inaktivierung von Enzymaktivitäten und Signalkaskaden eingebunden und haben somit regulatorische Funktionen²⁵². Aufgrund der polaren Ladung der Phosphatgruppe führt die Phosphorylierung oft zu einer Konformationsänderung des Proteins, so dass zwei verschiedene Formen des Proteins auftreten. Diese zwei Formen können, je nach Einzelfall, aktivierte oder inaktivierte Formen eines Proteins darstellen. Viele Transkriptionsfaktoren werden auf diesem Weg über Signaltransduktionskaskaden aktiviert, obwohl der phosphorylierte Proteinanteil *in vivo* sehr klein (< 0,1%) und die Phosphorylierungsmodifikationen sehr schnell umgesetzt werden²⁵³.

Neben der Phosphorylierung konnte bei einer steigenden Anzahl von Proteinen auch post-translationelle Acetylierung festgestellt werden²⁵⁴ welche mit der Phosphorylierung rivalisiert²⁵⁵.

Acetylasen modifizieren hierbei neben Histonen²⁵⁶ eine Vielzahl von Proteinen, unter anderem auch Transkriptionsfaktoren und regulieren damit Funktionen wie DNA-Erkennung sowie Proteininteraktionen und –stabilität²⁵⁷. Ebenso konnte eine konservierte Struktur, die Bromodomain ermittelt werden, die acetylierte Reste erkennt und als Signaldomain fungiert²⁵⁸.

Weitere post-translationelle Modifikationen werden durch Ubiquitinierung, Nitration, Deaminierung, Glycosylierung, Acetylierung und Cys-Oxidation erreicht.

Generell sind weitere Experimente notwendig um andere potentielle Mechanismen und Interaktionen die einen Einfluss auf die Translationsregulation haben könnten aufzuklären. So konnte in LCL's gezeigt werden das die Acetylierung von Nibrin zu einer verringerten Phosphorylierung und einem geringeren Zellüberleben und erhöhter RDS führte³⁹. Ebenso sind besonders die vielfältigen Wechselwirkungen der Initiationsfaktoren, die z.T. auch in der Zellzyklusregulation²⁵⁹ und Oncogenese²⁶⁰⁻²⁶² funktionell in Erscheinung treten ein viel versprechender Ansatzpunkt. Inwieweit alternative post-translationelle Modifikationen jedoch die p70-Nibrin Menge beeinflussen bleibt zu untersuchen.

6.4.2.3. Proteolyse

Neben der Modifikation auf transkriptioneller und translationeller Ebene stellt der Proteinabbau einen weiteren wichtigen Mechanismus der Regulation dar. Hierbei werden intrazelluläre, nicht-funktionelle Proteine entweder unspezifisch in den Lysosomen abgebaut oder im Zytoplasma durch den ATP-abhängigen Abbauweg des Ubiquitin-Proteasom-Systems individuell reguliert^{263, 264}.

Für den spezifischen Abbauweg werden Zellproteine mit dem, aus 76 Aminosäuren bestehenden Protein Ubiquitin markiert. Dabei aktiviert das Enzym E1 Ubiquitin durch Kopplung an ATP und verschiedene E2 Enzyme (Ubiquitin-Trägerproteine / Ubiquitin-Konjugationsproteine) leiten Ubiquitin zum Substrat, das an verschiedene E3 Proteine (Ubiquitin-Protein-Ligasen) gebunden ist. An das erste proteingebundene Ubiquitin werden generell weitere Ubiquitineinheiten angefügt, so dass eine Polyubiquitinkette entsteht. Das so markierte Protein wird dann durch den proteolytisch wirkenden Proteinkomplex 26S-Proteasom erkannt und unter Verbrauch von ATP abgebaut^{265, 266}.

Die verschiedenen E2 und E3 Enzyme sind höchstwahrscheinlich für die spezifische Erkennung von Proteinen verantwortlich obwohl die hohe Spezifität des nicht-lysosomalen Abbauweges sowie darüber hinaus involvierte Faktoren noch nicht bis ins Detail geklärt sind.

Weiterhin sind für die Regulation auf Proteinebene molekulare Chaperone bedeutsam da sie neu synthetisierte und fehlgefaltete Proteine anhand von hydrophoben Domänen erkennen und somit einerseits deren Aggregation verhindern und zum anderen helfen das Proteine ihre Konformation nicht verlieren, denaturierte Proteine wieder in ihre physiologische Tertiärstruktur zurückgefaltet oder dem Proteinabbaumechanismus der Zelle zugeführt werden^{267, 268}.

Eine Interaktion des Proteolyseapparates mit den Nibrinfragmenten wäre somit nicht auszuschließen. Um jedoch zu klären inwieweit der Proteinabbaumechanismus mit den variablen p70-Nibrinmengen in Zusammenhang steht sind weitere Untersuchungen nötig.

6.5. Alternative Spleißprodukte und Variabilität

6.5.1. Alternative Spleißprodukte in LCL`s

Alternative Translationsprodukte konnten bis jetzt für die NBS-Mutationen 657 Δ 5⁷⁶, 835 Δ 4^{28, 76}, 900 Δ 25²⁸ und 742insGG²⁷ nachgewiesen werden.

Die 835 Δ 4 Deletion führt hierbei zu einer *frame shift* Mutation an Position 835^{19, 269} und produziert zumindest in LCL`s ein 60 kDa großes, mit MRE11 assoziiertes Proteinfragment⁷⁶ welches ebenfalls in mehreren heterozygoten Zelllinien nachgewiesen wurde²⁸. Die weiterhin gegebene Interaktion mit MRE11 ermöglicht wohl auch hier eine partielle Lokalisation im Nucleus und garantiert somit die Vitalität des Patienten³⁷. Höchstwahrscheinlich ist jedoch dieses Protein das Resultat eines internen stromabwärts-Ribosomenansatzes an der NBS-mRNA.

Bei der 25 bp Deletion der Mutation 900 Δ 25 in Exon 8 konnte ein alternatives 55 kDa Proteinfragment nachgewiesen werden, was zudem in einem heterozygoten Familienmitglied zusätzlich zum p95-Nibrin bestätigt wurde. Auch hier wird von einer alternativen Translation ausgegangen, wobei diese hier an einem *downstream* Startcodon ansetzt²⁸.

Bei der Patientin mit der 742insGG Mutation und auch deren Eltern lies sich eine erhöhte Expression des Δ 6 Δ 7-Transkripts (Exon 6 und 7 deletiert) nachweisen, wobei es bei der Patientin jedoch in 100-fach höheren Mengen als bei den Kontrollen oder Patientenzellen mit der 657 Δ 5 Mutation vorlag. Das vollständige NBS-Transkript war bei der Patientin in 10-fach geringer Konzentration als bei Kontrollen. Die höhere Expression des Transkripts Δ 6 Δ 7 bei der Patientin könnte hierbei mit der Insertion zwei weiterer Guaninnukleotide zu den vier bereits existierenden in Zusammenhang stehen, da Poly-Guanin-Sequenzen die Aktivität eines möglichen *exonic splicing enhancer* (ESE) inhibieren²⁷⁰.

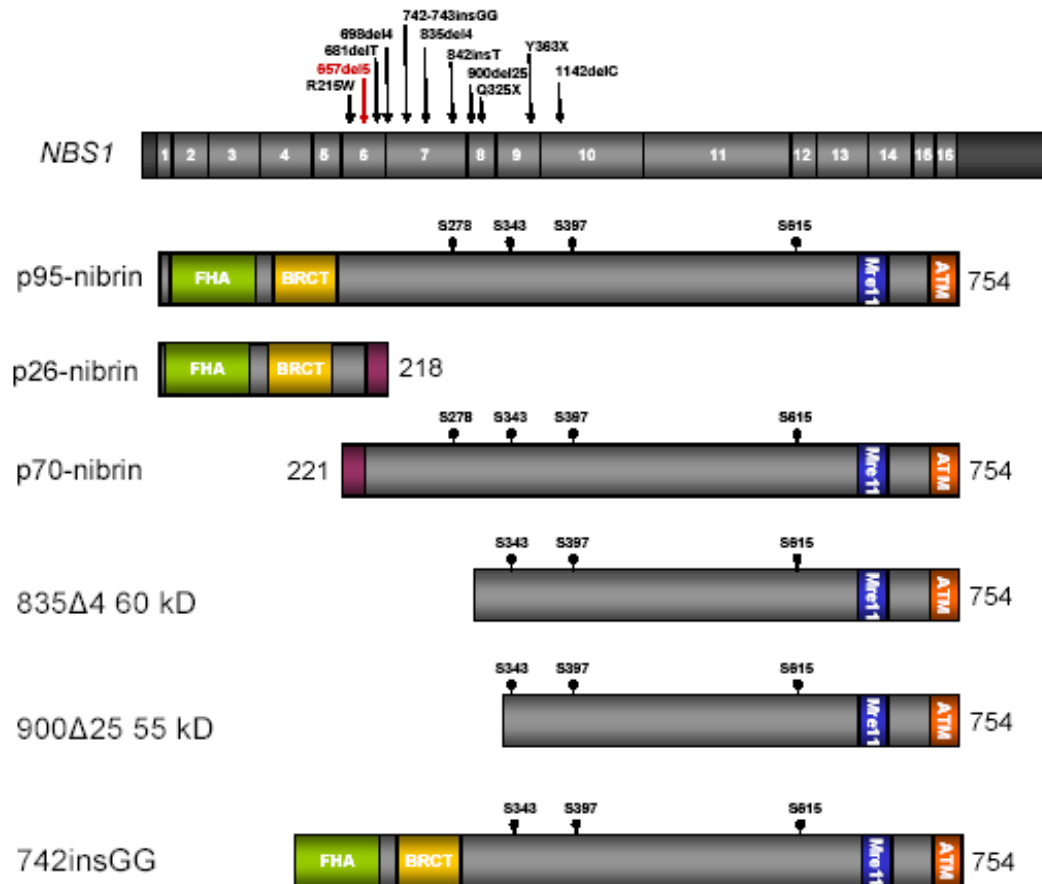


Abbildung 39: Darstellung der 657Δ5, 835Δ4, 900Δ25 und 742insGG Nibrin-Proteinfragmente

Dies würde die geringe Konzentration des $\Delta 6\Delta 7$ -Transkripts bei den Kontrollen, mit vier Guanin, und die hohe Transkriptkonzentration bei der Patientin, mit sechs Guanin erklären. Das Transkript der Mutation 742insGG konnte interessanterweise auch in sehr geringen Mengen bei Patienten mit der slawischen Mutation und Kontrollen nachgewiesen werden, so dass von einer konstitutiv exprimierten alternativen Spleißvariante ausgegangen werden kann. Ruzzi et al. beschrieb ähnliche Erkenntnisse für das COL17A1-Gen²⁷¹. Die trunkierende Mutation 742insGG (NBS1 $\Delta 6\Delta 7$ *in frame*) in Exon 7 führt zu einem vorzeitigen Stopcodon was zu einem verkürzten Protein führt²⁷ wobei das Serin an Position 278 in Exon 7 fehlt und an dieser Position keine Phosphorylierung durch ATM durchgeführt werden kann. Es wäre jedoch möglich, dass dies durch die drei weiteren Serine (Ser343, Ser397 und Ser615) ausgeglichen wird. Durch das Herausspleißen von Exon 6 und 7 kommt es nicht nur zum Verlust vom Ser278, sondern auch die Mutation der Patientin 742insGG ist bei diesem Transkript

nicht mehr vorhanden. Die Translation des alternativen Transkripts $\Delta 6\Delta 7$ würde zu einem 75 kDa großen Nibrin-Proteinfragment führen (Abbildung 28) welches tatsächlich mittels Immunpräzipitation nachgewiesen werden konnte²⁷. Hierbei ist jedoch darauf hinzuweisen das die „Laufgrößen“ der Proteine im Gel nicht unbedingt identisch mit der berechneten Größe sind. So zeigt p95-Nibrin im Gel eine Größe von 95 kDa, obwohl der berechnete Wert bei 85 kDa liegt und p70-Nibrins berechneter Wert liegt bei 63 kDa. Es ist also zu betonen dass sich das Proteinfragment der Mutation 742insGG eindeutig von dem der Mutation 657 Δ 5 unterscheidet und lediglich die scheinbaren Größen im SDS-Gel korrespondieren.

Durch das Vorhandensein des hochexprimierten alternativen Transkripts $\Delta 6\Delta 7$ welches aber noch die MRE11-Bindungsstelle^{37, 38} und die BRCT- und FHA-Domänen⁸¹ aufweist, entsteht somit ein Nibrinfragment mit signifikanter funktionaler Kapazität was für den milden klinischen Phänotyp der mit 53 Jahren, ältesten bekannten NBS-Patientin verantwortlich sein könnte. Abgesehen von einer Mikrozephalie und Amenorrhoe ist sie in guter gesundheitlicher Verfassung und weist keinen Krebs auf.

Auch bei anderen Erkrankungen wurde das Phänomen des Exonskipping beschrieben, das zum Herausschneiden des mutationsenthaltenen Exons und zu einem so genannten *phenotype rescue* führt^{272, 273}. Das Protein mit dem fehlenden Exon weist dann zwar keine 100 %ige Funktion auf, scheint aber über eine Restfunktionalität zu verfügen, die zu einer milderen Form der Erkrankung führt. Das Herausspleißen von Exon 6 und Exon 7, was zum Verlust der Deletion 657 Δ 5 in Exon 6 führen würde, ist bei Patienten mit der slawischen Mutation, wie auch in Kontrollen nachgewiesen wurden, wenn auch nicht in vergleichbaren Quantitäten wie bei der 742insGG-Patientin. Weitere Untersuchungen zum alternativen Spleißen des Transkripts $\Delta 6\Delta 7$ könnten hierbei Wege aufzeigen die zu einer Erhöhung dieser alternativen Spleißvariante führen und somit eine positive Auswirkung auf den klinischen Verlauf von über 90 % der NBS-Patienten haben könnten.

6.5.2. p75-Nibrin aus primären Lymphozyten

Der Nachweis des p70-Nibrinfragments konnte bisher in nativen homo- und heterozygoten Lymphozyten von Patienten bzw. Trägern mit der Gründermutation nicht erbracht werden. In der vorliegenden Arbeit wird erstmals ein p75-Nibrin in peripheren PHA-L stimulierten heterozygoten Lymphozyten (vgl. 5.6.2.2) nachgewiesen. Es wurde

der direkte Nachweis erbracht das durch Infektion mit EBV⁹⁰ immortalisierte heterozygote Lymphozyten p70-Nibrin aufweisen (vgl. Abbildung 26 und Abbildung 27).

Das auftreten des p75-Nibrinfragments könnte sehr wahrscheinlich als Translation eines alternativen Spleißproduktes zu erklären sein. Als potentielle alternative Spleißvariante würde ein Transkript mit herausgespleißten Exon 2 bis 5 möglich sein, da damit ein ca. 66 kDa großes Proteinfoagment entstehen würde was einer entsprechenden „Laufgröße“ von 75 kDa im SDS-Gel entspräche. Das Exonskipping würde bei dieser möglichen Spleißvariante dazu führen das die Translationsinitiation wie bei dem vollständigen Protein durchgeführt werden würde da Exon 1 erhalten bleibt.

Vorteilhaft gegenüber p70-Nibrin wäre ebenso dass das Proteinprodukt im Exon 1 im richtigen Leserahmen wäre. Ab Exon 6 würde dann bis zur 657Δ5 Deletion ein aberanter Leserahmen verwendet werden der hiernach wieder in den richtigen Leserahmen rückt. Sämtliche Serine für die Phosphorylierung durch ATM würden erhalten bleiben und ebenso wie auch bei p70-Nibrin würde der Wegfall der BRCT und FHA Domänen nur zu einem Nibrinfragment mit eingeschränkter funktionaler Kapazität führen.

Eine mögliche Ursache für das Auftreten eines alternativen Spleißproduktes ließe sich durch unterschiedliche Spleißprozesse in nativen Blutzellen und transformierten Zelllinien erklären, wobei auch hier umfangreiche weitere Untersuchungen nötig sind.

7. Zusammenfassung

Mehr als 90% der Patienten mit Nijmegen Breakage Syndrom, einem erblichen Krebs-syndrom, sind für eine hypomorphe Mutation im NBS-Gen homozygot, die zu einem carboxyterminalen Proteinfragment, p70-Nibrin, führt. Auch NBS-Heterozygote haben hierbei ein erhöhtes Krebsrisiko, was auf eine Haploinsuffizienz hindeutet, und nahe legt, dass die Proteinmenge von großer Krankheitsrelevanz sein könnte.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine große Anzahl lymphoblastoider Zelllinien von klinisch gut charakterisierten NBS-Patienten hinsichtlich ihres p70-Nibrin Expressionsniveaus untersucht und dieses mit den klinischen Daten der Patienten verglichen. Dabei konnte gezeigt werden, dass mehrheitlich Patienten deren Zelllinien niedrige p70-Nibrin Mengen aufweisen Krebs entwickelten und auch daran verstarben. Somit wird erstmalig ein Faktor der zu der erheblichen klinischen Variabilität im Nijmegen Breakage Syndrom beiträgt beschrieben.

Neben dem bereits beschriebenen p70-Nibrin konnte ebenso erstmals ein p75-Nibrin-fragment in peripheren Lymphozyten nachgewiesen werden. Dieses spezifische Protein entsteht möglicherweise durch alternatives Spleißen des primären NBS-Transkriptes.

Diese Erklärung ist mit Sicherheit auch für ein weiteres trunkiertes Nibrinfragment zutreffend, p80-Nibrin. Durch Exonskipping entsteht eine mRNA mit Verlust der Sequenzen von Exon 6 und Exon 7. Das Leserraster ist nach dieser internen Deletion nicht unterbrochen, sodass ein größeres Nibrinfragment mit signifikanter funktionaler Kapazität kodiert wird. Ein mutiertes Proteinfragment mit erhöhter Aktivität könnte den außergewöhnlich milden klinischen Phänotyp der mit 53 Jahren ältesten bekannten NBS-Patientin möglicherweise erklären.

8. Danksagung

Mein erster und besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Martin Digweed. Sein außerordentliches Vertrauen und großes Interesse, sowie sein Engagement und seine Geduld waren von unschätzbarem Wert und machten die Fertigstellung der vorliegenden Dissertation erst möglich. Für das mir entgegengebrachte Vertrauen bin ich ihm zu großem Dank verpflichtet.

Mein weiterer besonderer Dank gilt Herrn Dr. Ilja Demuth und Herrn Dr. Lars Stöckl für die zahlreichen Anregungen und ständige Diskussionsbereitschaft. Mit ihrer Expertise und kontinuierlichen Unterstützung und Förderung trugen sie wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Herzlich möchte ich mich weiterhin bei Prof. Seemanova vom Universitätsklinikum Motol in Prag für die kontinuierliche Lieferung der Blutproben von Patienten und deren Familienangehörigen bedanken was den Nachweis des trunkierten p70-Nibrin in nativen heterozygoten Lymphozyten erst ermöglichte.

Für die Bestrahlungen zur Analyse der Radiosensitivität von NBS-Patientenzelllinien gilt Herrn Dr. Jordan und Frau Scholz vom Zentrum für biomedizinische Nanotechnologie an der Klinik für Strahlenheilkunde der Charité mein ausdrücklicher Dank.

Frau Dr. Nuber vom Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik möchte ich für die Durchführung der *microarray*-Hybridisierung sehr herzlich danken.

Außergewöhnlicher Dank für ihre jahrelange geduldige fachliche Unterstützung bei vielen Experimenten und Zellkulturarbeiten gilt Susanne Rothe, Gabi Hildebrand und Janina Radszewski. Ihre große Hilfsbereitschaft und das ausgezeichnete Arbeitsklima waren der Garant für den Erfolg der experimentellen Arbeiten.

Mein besonderer Dank gilt ebenso Frau Veronique Dutrannoy für die großartige Kooperationsbereitschaft bei der Durchführung der *real-time* PCR und die gewissenhafte Auswertung der Ergebnisse.

Bei Herrn Prof. Dr. Karl Sperling möchte ich mich recht herzlich für das kontinuierliche Interesse am Fortgang der Experimente und die Bereitstellung ausgezeichneter Arbeitsbedingungen zur Durchführung der experimentellen Arbeiten bedanken.

Mein abschließender herzlicher Dank gilt meiner Mutter, meinem Bruder, sowie meinen Freunden und Bekannten, die nicht zuletzt durch ihre moralische Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

9. Abkürzungsverzeichnis

AILD	peripheres T-Zell Lymphom
ALL	akute lymphoblastische Leukämie
ATM	Ataxia Telangiectasia „ <i>mutated</i> “
bp	Basenpaare
BRCT	<i>breast cancer carboxy-terminal domain</i>
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
CNS	<i>central nervous system</i>
CSA	<i>colony survival assay</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
ddH ₂ O	destilliertes Wasser
DLBL	<i>diffuse large B-cell lymphoma</i>
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
dNTP	2'-Desoxy-ribonucleosid-5'-triphosphat
ds	<i>double strand</i>
DSB	Doppelstrangbruch
DTT	Dithiothreitol
EBV	Epstein Barr Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESTs	<i>expressed sequence tags</i>
et al.	<i>et alii</i> (und andere)
EtBr	Ethidiumbromid
FHA	<i>fork head associated domain</i>
FKS	fötales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
Gy	Gray
HR	<i>homologous recombination</i>
IR	<i>ionizing radiation</i>
IRIF	<i>ionizing radiation induced foci</i>

IQ	Intelligenzquotient
kb	Kilobasen
kDa	Kilo-Dalton
LCL	Lymphoblastoiden B-Zelllinie
M	Molar
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MRN	Mre11/Rad50/Nibrin Komplex
mRNA	<i>messenger RNA</i>
Nbn	Nibrin
NBS	Nijmegen Breakage Syndrom
NHEJ	<i>non homologous end joining</i>
NHL	Non-Hodgkin Lymphome
NTPs	Nukleosidtriphosphate
OD	Optische Dichte
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
RDS	radioresistente DNA Synthese
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	Umdrehungen / Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SMC	<i>structural maintenance of chromosome proteins</i>
SV40	Simianes Virus 40
U	Units
V	Volt

10. Literaturverzeichnis

1. Varon, R. et al. Clinical ascertainment of Nijmegen breakage syndrome (NBS) and prevalence of the major mutation, 657del5, in three Slav populations. *Eur J Hum Genet* 8, 900-2 (2000).
2. Bekiesinska-Figatowska, M. et al. Cranial MRI in the Nijmegen breakage syndrome. *Neuroradiology* 42, 43-7 (2000).
3. Van de Kaa, C. A. et al. Postmortem findings in the Nijmegen breakage syndrome. *Pediatr Pathol* 14, 787-96 (1994).
4. Chrzanowska, K. H. et al. Eleven Polish patients with microcephaly, immunodeficiency, and chromosomal instability: the Nijmegen breakage syndrome. *Am J Med Genet* 57, 462-71 (1995).
5. Kang, J., Bronson, R. T. & Xu, Y. Targeted disruption of NBS1 reveals its roles in mouse development and DNA repair. *Embo J* 21, 1447-55 (2002).
6. Tauchi, H. et al. Nbs1 is essential for DNA repair by homologous recombination in higher vertebrate cells. *Nature* 420, 93-8 (2002).
7. van Engelen, B. G. et al. Decreased immunoglobulin class switching in Nijmegen Breakage syndrome due to the DNA repair defect. *Hum Immunol* 62, 1324-7 (2001).
8. Gregorek, H., Chrzanowska, K. H., Michalkiewicz, J., Syczewska, M. & Madalinski, K. Heterogeneity of humoral immune abnormalities in children with Nijmegen breakage syndrome: an 8-year follow-up study in a single centre. *Clin Exp Immunol* 130, 319-24 (2002).
9. Weemaes, C. M., Smeets, D. F. & van der Burgt, C. J. Nijmegen Breakage syndrome: a progress report. *Int J Radiat Biol* 66, S185-8 (1994).
10. Seemanova, E. et al. Familial microcephaly with normal intelligence, immunodeficiency, and risk for lymphoreticular malignancies: a new autosomal recessive disorder. *Am J Med Genet* 20, 639-48 (1985).
11. Seidemann, K. et al. Non-Hodgkin's lymphoma in pediatric patients with chromosomal breakage syndromes (AT and NBS): experience from the BFM trials. *Ann Oncol* 11 Suppl 1, 141-5 (2000).
12. van der Burgt, I., Chrzanowska, K. H., Smeets, D. & Weemaes, C. Nijmegen breakage syndrome. *J Med Genet* 33, 153-6 (1996).
13. Antoccia, A. et al. Impaired p53-mediated DNA damage response, cell-cycle disturbance and chromosome aberrations in Nijmegen breakage syndrome lymphoblastoid cell lines. *Int J Radiat Biol* 75, 583-91 (1999).
14. Girard, P. M. et al. Radiosensitivity in Nijmegen Breakage Syndrome cells is attributable to a repair defect and not cell cycle checkpoint defects. *Cancer Res* 60, 4881-8 (2000).
15. Taalman, R. D., Jaspers, N. G., Scheres, J. M., de Wit, J. & Hustinx, T. W. Hypersensitivity to ionizing radiation, in vitro, in a new chromosomal breakage disorder, the Nijmegen Breakage Syndrome. *Mutat Res* 112, 23-32 (1983).

16. Green, A. J. et al. Severe microcephaly with normal intellectual development: the Nijmegen breakage syndrome. *Arch Dis Child* 73, 431-4 (1995).
17. Saar, K. et al. The gene for the ataxia-telangiectasia variant, Nijmegen breakage syndrome, maps to a 1-cM interval on chromosome 8q21. *Am J Hum Genet* 60, 605-10 (1997).
18. Matsuura, S. et al. Genetic mapping using microcell-mediated chromosome transfer suggests a locus for Nijmegen breakage syndrome at chromosome 8q21-24. *Am J Hum Genet* 60, 1487-94 (1997).
19. Varon, R. et al. Nibrin, a novel DNA double-strand break repair protein, is mutated in Nijmegen breakage syndrome. *Cell* 93, 467-76 (1998).
20. Matsuura, K. et al. Radiation induction of p53 in cells from Nijmegen breakage syndrome is defective but not similar to ataxia-telangiectasia. *Biochem Biophys Res Commun* 242, 602-7 (1998).
21. Carney, J. P. et al. The hMre11/hRad50 protein complex and Nijmegen breakage syndrome: linkage of double-strand break repair to the cellular DNA damage response. *Cell* 93, 477-86 (1998).
22. Nijmegen breakage syndrome. The International Nijmegen Breakage Syndrome Study Group. *Arch Dis Child* 82, 400-6 (The International Nijmegen Breakage Syndrome Study Group, 2000).
23. Demuth, I. & Digweed, M. The clinical manifestation of a defective response to DNA double-strand breaks as exemplified by Nijmegen breakage syndrome. *Oncogene* 26, 7792-8 (2007).
24. Maraschio, P. et al. A novel mutation and novel features in Nijmegen breakage syndrome. *J Med Genet* 38, 113-7 (2001).
25. Resnick, I. B. et al. Nijmegen breakage syndrome: clinical characteristics and mutation analysis in eight unrelated Russian families. *J Pediatr* 140, 355-61 (2002).
26. New, H. V. et al. Nijmegen breakage syndrome diagnosed as Fanconi anaemia. *Pediatr Blood Cancer* 44, 494-9 (2005).
27. Varon, R. et al. Mild Nijmegen breakage syndrome phenotype due to alternative splicing. *Hum Mol Genet* 15, 679-89 (2006).
28. Tanzanella, C. et al. Chromosome instability and nibrin protein variants in NBS heterozygotes. *Eur J Hum Genet* 11, 297-303 (2003).
29. Digweed, M., Reis, A. & Sperling, K. Nijmegen breakage syndrome: consequences of defective DNA double strand break repair. *Bioessays* 21, 649-56 (1999).
30. Gatei, M. et al. ATM-dependent phosphorylation of nibrin in response to radiation exposure. *Nat Genet* 25, 115-9 (2000).
31. Wu, X. et al. ATM phosphorylation of Nijmegen breakage syndrome protein is required in a DNA damage response. *Nature* 405, 477-82 (2000).
32. Lim, D. S. et al. ATM phosphorylates p95/nbs1 in an S-phase checkpoint pathway. *Nature* 404, 613-7 (2000).
33. Zhao, S. et al. Functional link between ataxia-telangiectasia and Nijmegen breakage syndrome gene products. *Nature* 405, 473-7 (2000).

34. Uziel, T. et al. Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. *Embo J* 22, 5612-21 (2003).
35. Lee, J. H. & Paull, T. T. ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science* 308, 551-4 (2005).
36. Kobayashi, J. et al. NBS1 localizes to gamma-H2AX foci through interaction with the FHA/BRCT domain. *Curr Biol* 12, 1846-51 (2002).
37. Tauchi, H. et al. The forkhead-associated domain of NBS1 is essential for nuclear foci formation after irradiation but not essential for hRAD50[hMRE11]NBS1 complex DNA repair activity. *J Biol Chem* 276, 12-5 (2001).
38. Desai-Mehta, A., Cerosaletti, K. M. & Concannon, P. Distinct functional domains of nibrin mediate Mre11 binding, focus formation, and nuclear localization. *Mol Cell Biol* 21, 2184-91 (2001).
39. Yuan, Z., Zhang, X., Sengupta, N., Lane, W. S. & Seto, E. SIRT1 regulates the function of the Nijmegen breakage syndrome protein. *Mol Cell* 27, 149-62 (2007).
40. Rattray, A. J. & Symington, L. S. Multiple pathways for homologous recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 139, 45-56 (1995).
41. Bressan, D. A., Baxter, B. K. & Petrini, J. H. The Mre11-Rad50-Xrs2 protein complex facilitates homologous recombination-based double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 19, 7681-7 (1999).
42. Schiestl, R. H., Zhu, J. & Petes, T. D. Effect of mutations in genes affecting homologous recombination on restriction enzyme-mediated and illegitimate recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 14, 4493-500 (1994).
43. D'Amours, D. & Jackson, S. P. The Mre11 complex: at the crossroads of dna repair and checkpoint signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 317-27 (2002).
44. Anderson, D. E., Trujillo, K. M., Sung, P. & Erickson, H. P. Structure of the Rad50 x Mre11 DNA repair complex from *Saccharomyces cerevisiae* by electron microscopy. *J Biol Chem* 276, 37027-33 (2001).
45. Hopfner, K. P. et al. Structural biochemistry and interaction architecture of the DNA double-strand break repair Mre11 nuclease and Rad50-ATPase. *Cell* 105, 473-85 (2001).
46. de Jager, M. et al. Human Rad50/Mre11 is a flexible complex that can tether DNA ends. *Mol Cell* 8, 1129-35 (2001).
47. Costanzo, V. et al. Mre11 protein complex prevents double-strand break accumulation during chromosomal DNA replication. *Mol Cell* 8, 137-47 (2001).
48. Yamaguchi-Iwai, Y. et al. Mre11 is essential for the maintenance of chromosomal DNA in vertebrate cells. *Embo J* 18, 6619-29 (1999).
49. Johzuka, K. & Ogawa, H. Interaction of Mre11 and Rad50: two proteins required for DNA repair and meiosis-specific double-strand break formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 139, 1521-32 (1995).
50. Usui, T. et al. Complex formation and functional versatility of Mre11 of budding yeast in recombination. *Cell* 95, 705-16 (1998).

51. Paull, T. T. & Gellert, M. Nbs1 potentiates ATP-driven DNA unwinding and endonuclease cleavage by the Mre11/Rad50 complex. *Genes Dev* 13, 1276-88 (1999).
52. Dong, Z., Zhong, Q. & Chen, P. L. The Nijmegen breakage syndrome protein is essential for Mre11 phosphorylation upon DNA damage. *J Biol Chem* 274, 19513-6 (1999).
53. Trujillo, K. M., Yuan, S. S., Lee, E. Y. & Sung, P. Nuclease activities in a complex of human recombination and DNA repair factors Rad50, Mre11, and p95. *J Biol Chem* 273, 21447-50 (1998).
54. Alani, E., Subbiah, S. & Kleckner, N. The yeast RAD50 gene encodes a predicted 153-kD protein containing a purine nucleotide-binding domain and two large heptad-repeat regions. *Genetics* 122, 47-57 (1989).
55. Dolganov, G. M. et al. Human Rad50 is physically associated with human Mre11: identification of a conserved multiprotein complex implicated in recombinational DNA repair. *Mol Cell Biol* 16, 4832-41 (1996).
56. Petrini, J. H. et al. Isolation and characterization of the human MRE11 homologue. *Genomics* 29, 80-6 (1995).
57. Maser, R. S., Monsen, K. J., Nelms, B. E. & Petrini, J. H. hMre11 and hRad50 nuclear foci are induced during the normal cellular response to DNA double-strand breaks. *Mol Cell Biol* 17, 6087-96 (1997).
58. Nelms, B. E., Maser, R. S., MacKay, J. F., Lagally, M. G. & Petrini, J. H. In situ visualization of DNA double-strand break repair in human fibroblasts. *Science* 280, 590-2 (1998).
59. Bakkenist, C. J. & Kastan, M. B. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 421, 499-506 (2003).
60. Buscemi, G. et al. Activation of ATM and Chk2 kinases in relation to the amount of DNA strand breaks. *Oncogene* 23, 7691-700 (2004).
61. Unsal-Kacmaz, K. & Sancar, A. Quaternary structure of ATR and effects of ATRIP and replication protein A on its DNA binding and kinase activities. *Mol Cell Biol* 24, 1292-300 (2004).
62. Goodarzi, A. A. & Lees-Miller, S. P. Biochemical characterization of the ataxia-telangiectasia mutated (ATM) protein from human cells. *DNA Repair (Amst)* 3, 753-67 (2004).
63. Paull, T. T. & Lee, J. H. The Mre11/Rad50/Nbs1 complex and its role as a DNA double-strand break sensor for ATM. *Cell Cycle* 4, 737-40 (2005).
64. Jongmans, W. et al. Nijmegen breakage syndrome cells fail to induce the p53-mediated DNA damage response following exposure to ionizing radiation. *Mol Cell Biol* 17, 5016-22 (1997).
65. Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K. & Elledge, S. J. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75, 805-16 (1993).
66. Sullivan, K. E., Veksler, E., Lederman, H. & Lees-Miller, S. P. Cell cycle checkpoints and DNA repair in Nijmegen breakage syndrome. *Clin Immunol Immunopathol* 82, 43-8 (1997).

67. Yamazaki, V., Wegner, R. D. & Kirchgessner, C. U. Characterization of cell cycle checkpoint responses after ionizing radiation in Nijmegen breakage syndrome cells. *Cancer Res* 58, 2316-22 (1998).
68. Williams, B. R. et al. A murine model of Nijmegen breakage syndrome. *Curr Biol* 12, 648-53 (2002).
69. Girard, P. M., Riballo, E., Begg, A. C., Waugh, A. & Jeggo, P. A. Nbs1 promotes ATM dependent phosphorylation events including those required for G1/S arrest. *Oncogene* 21, 4191-9 (2002).
70. Kraakman-van der Zwet, M. et al. Immortalization and characterization of Nijmegen Breakage syndrome fibroblasts. *Mutat Res* 434, 17-27 (1999).
71. Yazdi, P. T. et al. SMC1 is a downstream effector in the ATM/NBS1 branch of the human S-phase checkpoint. *Genes Dev* 16, 571-82 (2002).
72. Zhao, R. et al. Analysis of p53-regulated gene expression patterns using Oligonukleotide arrays. *Genes Dev* 14, 981-93 (2000).
73. Xu, B., Kim, S. & Kastan, M. B. Involvement of Brca1 in S-phase and G(2)-phase checkpoints after ionizing irradiation. *Mol Cell Biol* 21, 3445-50 (2001).
74. Ito, A. et al. Expression of full-length NBS1 protein restores normal radiation responses in cells from Nijmegen breakage syndrome patients. *Biochem Biophys Res Commun* 265, 716-21 (1999).
75. Demuth, I. et al. An inducible null mutant murine model of Nijmegen breakage syndrome proves the essential function of NBS1 in chromosomal stability and cell viability. *Hum Mol Genet* 13, 2385-97 (2004).
76. Maser, R. S., Zinkel, R. & Petrini, J. H. An alternative mode of translation permits production of a variant NBS1 protein from the common Nijmegen breakage syndrome allele. *Nat Genet* 27, 417-21 (2001).
77. Dumon-Jones, V. et al. Nbn heterozygosity renders mice susceptible to tumor formation and ionizing radiation-induced tumorigenesis. *Cancer Res* 63, 7263-9 (2003).
78. Zhu, J., Petersen, S., Tessarollo, L. & Nussenzweig, A. Targeted disruption of the Nijmegen breakage syndrome gene NBS1 leads to early embryonic lethality in mice. *Curr Biol* 11, 105-9 (2001).
79. Xiao, Y. & Weaver, D. T. Conditional gene targeted deletion by Cre recombinase demonstrates the requirement for the double-strand break repair Mre11 protein in murine embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res* 25, 2985-91 (1997).
80. Luo, G. et al. Disruption of mRad50 causes embryonic stem cell lethality, abnormal embryonic development, and sensitivity to ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 7376-81 (1999).
81. Cerosaletti, K. M. & Concannon, P. Nibrin forkhead-associated domain and breast cancer C-terminal domain are both required for nuclear focus formation and phosphorylation. *J Biol Chem* 278, 21944-51 (2003).
82. Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-7 (1977).

83. Denizot, F. & Lang, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods* 89, 271-7 (1986).
84. Huo, Y. K. et al. Radiosensitivity of ataxia-telangiectasia, X-linked agammaglobulinemia, and related syndromes using a modified colony survival assay. *Cancer Res* 54, 2544-7 (1994).
85. Mullis, K. B. & Faloona, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155, 335-50 (1987).
86. Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S. & Griffith, R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)* 10, 413-7 (1992).
87. Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. & Watson, R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* 11, 1026-30 (1993).
88. Kruger, L. et al. Cancer incidence in Nijmegen breakage syndrome is modulated by the amount of a variant NBS protein. *Carcinogenesis* 28, 107-11 (2007).
89. Lee, J. H. et al. Regulation of Mre11/Rad50 by Nbs1: effects on nucleotide-dependent DNA binding and association with ataxia-telangiectasia-like disorder mutant complexes. *J Biol Chem* 278, 45171-81 (2003).
90. Neitzel, H. A routine method for the establishment of permanent growing lymphoblastoid cell lines. *Hum Genet* 73, 320-6 (1986).
91. Kracker, S. et al. Nibrin functions in Ig class-switch recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 1584-9 (2005).
92. Lee, J. H. & Paull, T. T. Direct activation of the ATM protein kinase by the Mre11/Rad50/Nbs1 complex. *Science* 304, 93-6 (2004).
93. Difilippantonio, S. et al. Role of Nbs1 in the activation of the Atm kinase revealed in humanized mouse models. *Nat Cell Biol* 7, 675-85 (2005).
94. Duchaud, E. et al. Deregulated apoptosis in ataxia telangiectasia: association with clinical stigmata and radiosensitivity. *Cancer Res* 56, 1400-4 (1996).
95. Meyn, M. S., Strasfeld, L. & Allen, C. Testing the role of p53 in the expression of genetic instability and apoptosis in ataxia-telangiectasia. *Int J Radiat Biol* 66, S141-9 (1994).
96. Bebb, D. G. et al. Radiation induced apoptosis in ataxia telangiectasia homozygote, heterozygote and normal cells. *Mutat Res* 476, 13-20 (2001).
97. Meijer, A. E., Zhivotovsky, B. & Lewensohn, R. Epstein-Barr virus-transformed lymphoblastoid cell lines of ataxia telangiectasia patients are defective in X-ray-induced apoptosis. *Int J Radiat Biol* 75, 709-16 (1999).
98. Shi, Y. Q. et al. High levels of delayed radiation-induced apoptosis observed in lymphoblastoid cell lines from ataxia-telangiectasia patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 49, 555-9 (2001).
99. Henle, W., Diehl, V., Kohn, G., Zur Hausen, H. & Henle, G. Herpes-type virus and chromosome marker in normal leukocytes after growth with irradiated Burkitt cells. *Science* 157, 1064-5 (1967).

100. Miller, G., Enders, J. F., Lisco, H. & Kohn, H. I. Establishment of lines from normal human blood leukocytes by co-cultivation with a leukocyte line derived from a leukemic child. *Proc Soc Exp Biol Med* 132, 247-52 (1969).
101. Gerber, P., Lucas, S., Nonoyama, M., Perlin, E. & Goldstein, L. I. Oral excretion of Epstein-Barr virus by healthy subjects and patients with infectious mononucleosis. *Lancet* 2, 988-9 (1972).
102. Aman, P., Ehlin-Henriksson, B. & Klein, G. Epstein-Barr virus susceptibility of normal human B lymphocyte populations. *J Exp Med* 159, 208-20 (1984).
103. Miller, G. & Lipman, M. Release of infectious Epstein-Barr virus by transformed marmoset leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70, 190-4 (1973).
104. Sugimoto, M., Tahara, H., Ide, T. & Furuichi, Y. Steps involved in immortalization and tumorigenesis in human B-lymphoblastoid cell lines transformed by Epstein-Barr virus. *Cancer Res* 64, 3361-4 (2004).
105. Nilsson, K. Human B-lymphoid cell lines. *Hum Cell* 5, 25-41 (1992).
106. Middleton, T., Gahn, T. A., Martin, J. M. & Sugden, B. Immortalizing genes of Epstein-Barr virus. *Adv Virus Res* 40, 19-55 (1991).
107. Kaye, K. M., Izumi, K. M. & Kieff, E. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is essential for B-lymphocyte growth transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 9150-4 (1993).
108. Tomkinson, B., Robertson, E. & Kieff, E. Epstein-Barr virus nuclear proteins EBNA-3A and EBNA-3C are essential for B-lymphocyte growth transformation. *J Virol* 67, 2014-25 (1993).
109. Kilger, E., Kieser, A., Baumann, M. & Hammerschmidt, W. Epstein-Barr virus-mediated B-cell proliferation is dependent upon latent membrane protein 1, which simulates an activated CD40 receptor. *Embo J* 17, 1700-9 (1998).
110. Cohen, J. I., Wang, F. & Kieff, E. Epstein-Barr virus nuclear protein 2 mutations define essential domains for transformation and transactivation. *J Virol* 65, 2545-54 (1991).
111. Klein, E., Teramoto, N., Gogolak, P., Nagy, N. & Bjorkholm, M. LMP-1, the Epstein-Barr virus-encoded oncogene with a B cell activating mechanism similar to CD40. *Immunol Lett* 68, 147-54 (1999).
112. Cheung, V. G. & Ewens, W. J. Heterozygous carriers of Nijmegen Breakage Syndrome have a distinct gene expression phenotype. *Genome Res* 16, 973-9 (2006).
113. Wolf, F. W. et al. B94, a primary response gene inducible by tumor necrosis factor-alpha, is expressed in developing hematopoietic tissues and the sperm acrosome. *J Biol Chem* 269, 3633-40 (1994).
114. Mookherjee, N. et al. Modulation of the TLR-mediated inflammatory response by the endogenous human host defense peptide LL-37. *J Immunol* 176, 2455-64 (2006).
115. Saban, R. et al. Regulatory network of inflammation downstream of proteinase-activated receptors. *BMC Physiol* 7, 3 (2007).

116. Rusiniak, M. E., Yu, M., Ross, D. T., Tolhurst, E. C. & Slack, J. L. Identification of B94 (TNFAIP2) as a potential retinoic acid target gene in acute promyelocytic leukemia. *Cancer Res* 60, 1824-9 (2000).
117. Park, D. J., Vuong, P. T., de Vos, S., Douer, D. & Koeffler, H. P. Comparative analysis of genes regulated by PML/RAR alpha and PLZF/RAR alpha in response to retinoic acid using Oligonukleotide arrays. *Blood* 102, 3727-36 (2003).
118. Beckers, J. et al. Identification and validation of novel ERBB2 (HER2, NEU) targets including genes involved in angiogenesis. *Int J Cancer* 114, 590-7 (2005).
119. Einstein, M. H. et al. Utilization of the human genome sequence localizes human papillomavirus type 16 DNA integrated into the TNFAIP2 gene in a fatal cervical cancer from a 39-year-old woman. *Clin Cancer Res* 8, 549-54 (2002).
120. Meller, N., Irani-Tehrani, M., Kiosses, W. B., Del Pozo, M. A. & Schwartz, M. A. Zizimin1, a novel Cdc42 activator, reveals a new GEF domain for Rho proteins. *Nat Cell Biol* 4, 639-47 (2002).
121. Wu, Y. C. & Horvitz, H. R. C. elegans phagocytosis and cell-migration protein CED-5 is similar to human DOCK180. *Nature* 392, 501-4 (1998).
122. Meller, N., Irani-Tehrani, M., Ratnikov, B. I., Paschal, B. M. & Schwartz, M. A. The novel Cdc42 guanine nucleotide exchange factor, zizimin1, dimerizes via the Cdc42-binding CZH2 domain. *J Biol Chem* 279, 37470-6 (2004).
123. Bishop, A. L. & Hall, A. Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* 348 Pt 2, 241-55 (2000).
124. Aspenstrom, P. Effectors for the Rho GTPases. *Curr Opin Cell Biol* 11, 95-102 (1999).
125. Aznar, S., Fernandez-Valeron, P., Espina, C. & Lacal, J. C. Rho GTPases: potential candidates for anticancer therapy. *Cancer Lett* 206, 181-91 (2004).
126. Etienne-Manneville, S. & Hall, A. Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420, 629-35 (2002).
127. Erickson, J. W. & Cerione, R. A. Structural elements, mechanism, and evolutionary convergence of Rho protein-guanine nucleotide exchange factor complexes. *Biochemistry* 43, 837-42 (2004).
128. Gjoerup, O., Lukas, J., Bartek, J. & Willumsen, B. M. Rac and Cdc42 are potent stimulators of E2F-dependent transcription capable of promoting retinoblastoma susceptibility gene product hyperphosphorylation. *J Biol Chem* 273, 18812-8 (1998).
129. DeGregori, J. & Johnson, D. G. Distinct and Overlapping Roles for E2F Family Members in Transcription, Proliferation and Apoptosis. *Curr Mol Med* 6, 739-48 (2006).
130. Johnson, D. G. & Degregori, J. Putting the Oncogenic and Tumor Suppressive Activities of E2F into Context. *Curr Mol Med* 6, 731-8 (2006).
131. Bruey, J. M. et al. PAN1/NALP2/PYPAF2, an inducible inflammatory mediator that regulates NF-kappaB and caspase-1 activation in macrophages. *J Biol Chem* 279, 51897-907 (2004).

132. Kinoshita, T., Wang, Y., Hasegawa, M., Imamura, R. & Suda, T. PYPAF3, a PYRIN-containing APAF-1-like protein, is a feedback regulator of caspase-1-dependent interleukin-1beta secretion. *J Biol Chem* 280, 21720-5 (2005).
133. Stehlik, C. et al. The PAAD/PYRIN-only protein POP1/ASC2 is a modulator of ASC-mediated nuclear-factor-kappa B and pro-caspase-1 regulation. *Biochem J* 373, 101-13 (2003).
134. Fiorentino, L. et al. A novel PAAD-containing protein that modulates NF-kappa B induction by cytokines tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta. *J Biol Chem* 277, 35333-40 (2002).
135. Agostini, L. et al. NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. *Immunity* 20, 319-25 (2004).
136. Ambrosini, G., Adida, C. & Altieri, D. C. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 3, 917-21 (1997).
137. Carter, B. Z., Milella, M., Altieri, D. C. & Andreeff, M. Cytokine-regulated expression of survivin in myeloid leukemia. *Blood* 97, 2784-90 (2001).
138. Fukuda, S. & Pelus, L. M. Elevation of Survivin levels by hematopoietic growth factors occurs in quiescent CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells before cell cycle entry. *Cell Cycle* 1, 322-6 (2002).
139. Adida, C. et al. Developmentally regulated expression of the novel cancer anti-apoptosis gene survivin in human and mouse differentiation. *Am J Pathol* 152, 43-9 (1998).
140. Kobayashi, Y. et al. Developmentally regulated expression of survivin in the human thymus. *Hum Immunol* 63, 101-7 (2002).
141. Gianani, R. et al. Expression of survivin in normal, hyperplastic, and neoplastic colonic mucosa. *Hum Pathol* 32, 119-25 (2001).
142. Konno, R. et al. Expression of survivin and Bcl-2 in the normal human endometrium. *Mol Hum Reprod* 6, 529-34 (2000).
143. Velculescu, V. E. et al. Analysis of human transcriptomes. *Nat Genet* 23, 387-8 (1999).
144. Altieri, D. C. Blocking survivin to kill cancer cells. *Methods Mol Biol* 223, 533-42 (2003).
145. Li, F. Survivin study: what is the next wave? *J Cell Physiol* 197, 8-29 (2003).
146. Monzo, M. et al. A novel anti-apoptosis gene: Re-expression of survivin messenger RNA as a prognosis marker in non-small-cell lung cancers. *J Clin Oncol* 17, 2100-4 (1999).
147. Adida, C. et al. Prognostic significance of survivin expression in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood* 96, 1921-5 (2000).
148. Kuwabara, Y. et al. Gastroesophagostomy after proximal gastrectomy using a double stapling technique. *J Am Coll Surg* 192, 795-7 (2001).
149. Kasof, G. M. & Gomes, B. C. Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member. *J Biol Chem* 276, 3238-46 (2001).

150. Kobayashi, K., Hatano, M., Otaki, M., Ogasawara, T. & Tokuhsa, T. Expression of a murine homologue of the inhibitor of apoptosis protein is related to cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1457-62 (1999).
151. Tamm, I. et al. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res* 58, 5315-20 (1998).
152. Suzuki, A. et al. Survivin initiates procaspase 3/p21 complex formation as a result of interaction with Cdk4 to resist Fas-mediated cell death. *Oncogene* 19, 1346-53 (2000).
153. Hoffman, W. H., Biade, S., Zilfou, J. T., Chen, J. & Murphy, M. Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53. *J Biol Chem* 277, 3247-57 (2002).
154. Mirza, A. et al. Human survivin is negatively regulated by wild-type p53 and participates in p53-dependent apoptotic pathway. *Oncogene* 21, 2613-22 (2002).
155. Zhou, M. et al. DNA damage induces a novel p53-survivin signaling pathway regulating cell cycle and apoptosis in acute lymphoblastic leukemia cells. *J Pharmacol Exp Ther* 303, 124-31 (2002).
156. Li, F. et al. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature* 396, 580-4 (1998).
157. Li, F. & Altieri, D. C. Transcriptional analysis of human survivin gene expression. *Biochem J* 344 Pt 2, 305-11 (1999).
158. Adams, R. R., Carmena, M. & Earnshaw, W. C. Chromosomal passengers and the (aurora) ABCs of mitosis. *Trends Cell Biol* 11, 49-54 (2001).
159. Wheatley, S. P., Carvalho, A., Vagnarelli, P. & Earnshaw, W. C. INCENP is required for proper targeting of Survivin to the centromeres and the anaphase spindle during mitosis. *Curr Biol* 11, 886-90 (2001).
160. Pestova, T. V., Borukhov, S. I. & Hellen, C. U. Eukaryotic ribosomes require initiation factors 1 and 1A to locate initiation codons. *Nature* 394, 854-9 (1998).
161. Majumdar, R., Bandyopadhyay, A. & Maitra, U. Mammalian translation initiation factor eIF1 functions with eIF1A and eIF3 in the formation of a stable 40 S preinitiation complex. *J Biol Chem* 278, 6580-7 (2003).
162. Maag, D. & Lorsch, J. R. Communication between eukaryotic translation initiation factors 1 and 1A on the yeast small ribosomal subunit. *J Mol Biol* 330, 917-24 (2003).
163. Carter, A. P. et al. Crystal structure of an initiation factor bound to the 30S ribosomal subunit. *Science* 291, 498-501 (2001).
164. Fekete, C. A. et al. The eIF1A C-terminal domain promotes initiation complex assembly, scanning and AUG selection in vivo. *Embo J* 24, 3588-601 (2005).
165. Passmore, L. A. et al. The eukaryotic translation initiation factors eIF1 and eIF1A induce an open conformation of the 40S ribosome. *Mol Cell* 26, 41-50 (2007).
166. Pestova, T. V. & Kolupaeva, V. G. The roles of individual eukaryotic translation initiation factors in ribosomal scanning and initiation codon selection. *Genes Dev* 16, 2906-22 (2002).

167. Gilbert, R. J. et al. Reconfiguration of yeast 40S ribosomal subunit domains by the translation initiation multifactor complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 5788-93 (2007).
168. Bandyopadhyay, S. et al. Role of the putative tumor metastasis suppressor gene Drg-1 in breast cancer progression. *Oncogene* 23, 5675-81 (2004).
169. Bandyopadhyay, S. et al. The Drg-1 gene suppresses tumor metastasis in prostate cancer. *Cancer Res* 63, 1731-6 (2003).
170. Lachat, P. et al. Expression of NDRG1, a differentiation-related gene, in human tissues. *Histochem Cell Biol* 118, 399-408 (2002).
171. Kyuno, J., Fukui, A., Michiue, T. & Asashima, M. Identification and characterization of *Xenopus* NDRG1. *Biochem Biophys Res Commun* 309, 52-7 (2003).
172. Lazarescu, E., Friedt, W., Horn, R. & Steinmetz, A. Expression analysis of the sunflower SF21 gene family reveals multiple alternative and organ-specific splicing of transcripts. *Gene* 374, 77-86 (2006).
173. Kachhap, S. K. et al. The N-Myc down regulated Gene1 (NDRG1) Is a Rab4a effector involved in vesicular recycling of E-cadherin. *PLoS ONE* 2, e844 (2007).
174. Christofori, G. New signals from the invasive front. *Nature* 441, 444-50 (2006).
175. Murre, C. et al. Structure and function of helix-loop-helix proteins. *Biochim Biophys Acta* 1218, 129-35 (1994).
176. Murre, C., McCaw, P. S. & Baltimore, D. A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. *Cell* 56, 777-83 (1989).
177. Sun, X. H. & Baltimore, D. An inhibitory domain of E12 transcription factor prevents DNA binding in E12 homodimers but not in E12 heterodimers. *Cell* 64, 459-70 (1991).
178. Greenbaum, S. & Zhuang, Y. Regulation of early lymphocyte development by E2A family proteins. *Semin Immunol* 14, 405-14 (2002).
179. Bain, G. et al. Both E12 and E47 allow commitment to the B cell lineage. *Immunity* 6, 145-54 (1997).
180. Borghesi, L. et al. E47 is required for V(D)J recombinase activity in common lymphoid progenitors. *J Exp Med* 202, 1669-77 (2005).
181. Singh, H. & Pongubala, J. M. Gene regulatory networks and the determination of lymphoid cell fates. *Curr Opin Immunol* 18, 116-20 (2006).
182. Ernst, P. & Smale, S. T. Combinatorial regulation of transcription II: The immunoglobulin mu heavy chain gene. *Immunity* 2, 427-38 (1995).
183. Quong, M. W., Harris, D. P., Swain, S. L. & Murre, C. E2A activity is induced during B-cell activation to promote immunoglobulin class switch recombination. *Embo J* 18, 6307-18 (1999).
184. Goldfarb, A. N., Flores, J. P. & Lewandowska, K. Involvement of the E2A basic helix-loop-helix protein in immunoglobulin heavy chain class switching. *Mol Immunol* 33, 947-56 (1996).

185. Kee, B. L. & Murre, C. Induction of early B cell factor (EBF) and multiple B lineage genes by the basic helix-loop-helix transcription factor E12. *J Exp Med* 188, 699-713 (1998).
186. Bain, G., Romanow, W. J., Albers, K., Havran, W. L. & Murre, C. Positive and negative regulation of V(D)J recombination by the E2A proteins. *J Exp Med* 189, 289-300 (1999).
187. Blom, B. et al. Disruption of alpha beta but not of gamma delta T cell development by overexpression of the helix-loop-helix protein Id3 in committed T cell progenitors. *Embo J* 18, 2793-802 (1999).
188. Benezra, R. An intermolecular disulfide bond stabilizes E2A homodimers and is required for DNA binding at physiological temperatures. *Cell* 79, 1057-67 (1994).
189. Sloan, S. R., Shen, C. P., McCarrick-Walmsley, R. & Kadesch, T. Phosphorylation of E47 as a potential determinant of B-cell-specific activity. *Mol Cell Biol* 16, 6900-8 (1996).
190. Markus, M. & Benezra, R. Two isoforms of protein disulfide isomerase alter the dimerization status of E2A proteins by a redox mechanism. *J Biol Chem* 274, 1040-9 (1999).
191. Ranganathan, V. et al. Rescue of a telomere length defect of Nijmegen breakage syndrome cells requires NBS and telomerase catalytic subunit. *Curr Biol* 11, 962-6 (2001).
192. Siwicki, J. K., Degerman, S., Chrzanowska, K. H. & Roos, G. Telomere maintenance and cell cycle regulation in spontaneously immortalized T-cell lines from Nijmegen breakage syndrome patients. *Exp Cell Res* 287, 178-89 (2003).
193. Cerosaletti, K. M. et al. Retroviral expression of the NBS1 gene in cultured Nijmegen breakage syndrome cells restores normal radiation sensitivity and nuclear focus formation. *Mutagenesis* 15, 281-6 (2000).
194. Seemanova, E. et al. Cancer risk of heterozygotes with the NBN founder mutation. *J Natl Cancer Inst* 99, 1875-80 (2007).
195. Coyle, Y. M. The effect of environment on breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat* 84, 273-88 (2004).
196. Vainio, H. & Cardis, E. Estimating human cancer risk from the results of animal experiments: relationship between mechanism and dose-rate and dose. *Am J Ind Med* 21, 5-14 (1992).
197. Lyman, G. H. Risk factors for cancer. *Prim Care* 19, 465-79 (1992).
198. Moore, M. J. From birth to death: the complex lives of eukaryotic mRNAs. *Science* 309, 1514-8 (2005).
199. Pozzoli, U. & Sironi, M. Silencers regulate both constitutive and alternative splicing events in mammals. *Cell Mol Life Sci* 62, 1579-604 (2005).
200. St Johnston, D. Moving messages: the intracellular localization of mRNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 363-75 (2005).
201. Pisarev, A. V., Shirokikh, N. E. & Hellen, C. U. Translation initiation by factor-independent binding of eukaryotic ribosomes to internal ribosomal entry sites. *C R Biol* 328, 589-605 (2005).

202. Levine, M. & Davidson, E. H. Gene regulatory networks for development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 4936-42 (2005).
203. Kleinjan, D. A. & van Heyningen, V. Long-range control of gene expression: emerging mechanisms and disruption in disease. *Am J Hum Genet* 76, 8-32 (2005).
204. Queen, C. & Baltimore, D. Immunoglobulin gene transcription is activated by downstream sequence elements. *Cell* 33, 741-8 (1983).
205. Long, X. & Miano, J. M. Remote control of gene expression. *J Biol Chem* 282, 15941-5 (2007).
206. Polevoda, B. & Sherman, F. Methylation of proteins involved in translation. *Mol Microbiol* 65, 590-606 (2007).
207. Clarke, S. Protein methylation. *Curr Opin Cell Biol* 5, 977-83 (1993).
208. Gary, J. D. & Clarke, S. RNA and protein interactions modulated by protein arginine methylation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 61, 65-131 (1998).
209. Blanchette, M. et al. Genome-wide computational prediction of transcriptional regulatory modules reveals new insights into human gene expression. *Genome Res* 16, 656-68 (2006).
210. Hieronymus, H. & Silver, P. A. A systems view of mRNP biology. *Genes Dev* 18, 2845-60 (2004).
211. Fechter, P. & Brownlee, G. G. Recognition of mRNA cap structures by viral and cellular proteins. *J Gen Virol* 86, 1239-49 (2005).
212. Will, C. L. & Luhrmann, R. Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function. *Curr Opin Cell Biol* 13, 290-301 (2001).
213. Black, D. L. Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu Rev Biochem* 72, 291-336 (2003).
214. Berget, S. M., Moore, C. & Sharp, P. A. Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 3171-5 (1977).
215. Faustino, N. A. & Cooper, T. A. Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes Dev* 17, 419-37 (2003).
216. Disset, A. et al. A T3 allele in the CFTR gene exacerbates exon 9 skipping in vas deferens and epididymal cell lines and is associated with Congenital Bilateral Absence of Vas Deferens (CBAVD). *Hum Mutat* 25, 72-81 (2005).
217. Caputi, M., Kendzior, R. J., Jr. & Beemon, K. L. A nonsense mutation in the fibrillin-1 gene of a Marfan syndrome patient induces NMD and disrupts an exonic splicing enhancer. *Genes Dev* 16, 1754-9 (2002).
218. Cartegni, L. & Krainer, A. R. Disruption of an SF2/ASF-dependent exonic splicing enhancer in SMN2 causes spinal muscular atrophy in the absence of SMN1. *Nat Genet* 30, 377-84 (2002).
219. Liu, H. X., Cartegni, L., Zhang, M. Q. & Krainer, A. R. A mechanism for exon skipping caused by nonsense or missense mutations in BRCA1 and other genes. *Nat Genet* 27, 55-8 (2001).
220. Wang, Z. et al. Systematic identification and analysis of exonic splicing silencers. *Cell* 119, 831-45 (2004).

221. Vuoristo, M. M., Pappas, J. G., Jansen, V. & Ala-Kokko, L. A stop codon mutation in COL11A2 induces exon skipping and leads to non-ocular Stickler syndrome. *Am J Med Genet A* 130, 160-4 (2004).
222. McGrath, J. A. et al. Moderation of phenotypic severity in dystrophic and junctional forms of epidermolysis bullosa through in-frame skipping of exons containing non-sense or frameshift mutations. *J Invest Dermatol* 113, 314-21 (1999).
223. Krawczak, M., Reiss, J. & Cooper, D. N. The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. *Hum Genet* 90, 41-54 (1992).
224. Mangus, D. A., Evans, M. C. & Jacobson, A. Poly(A)-binding proteins: multifunctional scaffolds for the post-transcriptional control of gene expression. *Genome Biol* 4, 223 (2003).
225. Stutz, F. & Izaurralde, E. The interplay of nuclear mRNP assembly, mRNA surveillance and export. *Trends Cell Biol* 13, 319-27 (2003).
226. Herold, A., Teixeira, L. & Izaurralde, E. Genome-wide analysis of nuclear mRNA export pathways in *Drosophila*. *Embo J* 22, 2472-83 (2003).
227. Tekotte, H. & Davis, I. Intracellular mRNA localization: motors move messages. *Trends Genet* 18, 636-42 (2002).
228. Cui, Y., Hagan, K. W., Zhang, S. & Peltz, S. W. Identification and characterization of genes that are required for the accelerated degradation of mRNAs containing a premature translational termination codon. *Genes Dev* 9, 423-36 (1995).
229. Lejeune, F. & Maquat, L. E. Mechanistic links between nonsense-mediated mRNA decay and pre-mRNA splicing in mammalian cells. *Curr Opin Cell Biol* 17, 309-15 (2005).
230. Mendell, J. T., Sharifi, N. A., Meyers, J. L., Martinez-Murillo, F. & Dietz, H. C. Nonsense surveillance regulates expression of diverse classes of mammalian transcripts and mutes genomic noise. *Nat Genet* 36, 1073-8 (2004).
231. Le Hir, H., Izaurralde, E., Maquat, L. E. & Moore, M. J. The spliceosome deposits multiple proteins 20-24 nucleotides upstream of mRNA exon-exon junctions. *Embo J* 19, 6860-9 (2000).
232. Le Hir, H., Moore, M. J. & Maquat, L. E. Pre-mRNA splicing alters mRNP composition: evidence for stable association of proteins at exon-exon junctions. *Genes Dev* 14, 1098-108 (2000).
233. Carter, M. S., Li, S. & Wilkinson, M. F. A splicing-dependent regulatory mechanism that detects translation signals. *Embo J* 15, 5965-75 (1996).
234. Nagy, E. & Maquat, L. E. A rule for termination-codon position within intron-containing genes: when nonsense affects RNA abundance. *Trends Biochem Sci* 23, 198-9 (1998).
235. Lykke-Andersen, J., Shu, M. D. & Steitz, J. A. Human Upf proteins target an mRNA for nonsense-mediated decay when bound downstream of a termination codon. *Cell* 103, 1121-31 (2000).

236. Ishigaki, Y., Li, X., Serin, G. & Maquat, L. E. Evidence for a pioneer round of mRNA translation: mRNAs subject to nonsense-mediated decay in mammalian cells are bound by CBP80 and CBP20. *Cell* 106, 607-17 (2001).
237. Chan, D., Weng, Y. M., Graham, H. K., Silience, D. O. & Bateman, J. F. A nonsense mutation in the carboxyl-terminal domain of type X collagen causes haploinsufficiency in schmid metaphyseal chondrodysplasia. *J Clin Invest* 101, 1490-9 (1998).
238. Asselta, R. et al. Congenital afibrinogenemia: mutations leading to premature termination codons in fibrinogen A alpha-chain gene are not associated with the decay of the mutant mRNAs. *Blood* 98, 3685-92 (2001).
239. Danckwardt, S. et al. Abnormally spliced beta-globin mRNAs: a single point mutation generates transcripts sensitive and insensitive to nonsense-mediated mRNA decay. *Blood* 99, 1811-6 (2002).
240. Romao, L. et al. Nonsense mutations in the human beta-globin gene lead to unexpected levels of cytoplasmic mRNA accumulation. *Blood* 96, 2895-901 (2000).
241. Mango, S. E. Stop making nonSense: the *C. elegans* smg genes. *Trends Genet* 17, 646-53 (2001).
242. Bamber, B. A., Beg, A. A., Twyman, R. E. & Jorgensen, E. M. The *Caenorhabditis elegans* unc-49 locus encodes multiple subunits of a heteromultimeric GABA receptor. *J Neurosci* 19, 5348-59 (1999).
243. Bateman, J. F., Freddi, S., Natrass, G. & Savarirayan, R. Tissue-specific RNA surveillance? Nonsense-mediated mRNA decay causes collagen X haploinsufficiency in Schmid metaphyseal chondrodysplasia cartilage. *Hum Mol Genet* 12, 217-25 (2003).
244. Kerr, T. P., Sewry, C. A., Robb, S. A. & Roberts, R. G. Long mutant dystrophins and variable phenotypes: evasion of nonsense-mediated decay? *Hum Genet* 109, 402-7 (2001).
245. Frischmeyer, P. A. & Dietz, H. C. Nonsense-mediated mRNA decay in health and disease. *Hum Mol Genet* 8, 1893-900 (1999).
246. Mendell, J. T. & Dietz, H. C. When the message goes awry: disease-producing mutations that influence mRNA content and performance. *Cell* 107, 411-4 (2001).
247. Maag, D., Algire, M. A. & Lorsch, J. R. Communication between eukaryotic translation initiation factors 5 and 1A within the ribosomal pre-initiation complex plays a role in start site selection. *J Mol Biol* 356, 724-37 (2006).
248. Kozak, M. Alternative ways to think about mRNA sequences and proteins that appear to promote internal initiation of translation. *Gene* 318, 1-23 (2003).
249. Kozak, M. A second look at cellular mRNA sequences said to function as internal ribosome entry sites. *Nucleic Acids Res* 33, 6593-602 (2005).
250. Kozak, M. Rethinking some mechanisms invoked to explain translational regulation in eukaryotes. *Gene* 382, 1-11 (2006).
251. Algire, M. A. & Lorsch, J. R. Where to begin? The mechanism of translation initiation codon selection in eukaryotes. *Curr Opin Chem Biol* 10, 480-6 (2006).

252. Pawson, T. Regulation and targets of receptor tyrosine kinases. *Eur J Cancer* 38 Suppl 5, S3-10 (2002).
253. Seo, J. & Lee, K. J. Post-translational modifications and their biological functions: proteomic analysis and systematic approaches. *J Biochem Mol Biol* 37, 35-44 (2004).
254. Glozak, M. A., Sengupta, N., Zhang, X. & Seto, E. Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene* 363, 15-23 (2005).
255. Kouzarides, T. Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation? *Embo J* 19, 1176-9 (2000).
256. Roth, S. Y., Denu, J. M. & Allis, C. D. Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem* 70, 81-120 (2001).
257. Sterner, D. E. & Berger, S. L. Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 435-59 (2000).
258. Yang, X. J. Lysine acetylation and the bromodomain: a new partnership for signaling. *Bioessays* 26, 1076-87 (2004).
259. Dong, Z. & Zhang, J. T. Initiation factor eIF3 and regulation of mRNA translation, cell growth, and cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 59, 169-80 (2006).
260. Lazaris-Karatzas, A., Montine, K. S. & Sonenberg, N. Malignant transformation by a eukaryotic initiation factor subunit that binds to mRNA 5' cap. *Nature* 345, 544-7 (1990).
261. Donze, O., Jagus, R., Koromilas, A. E., Hershey, J. W. & Sonenberg, N. Abrogation of translation initiation factor eIF-2 phosphorylation causes malignant transformation of NIH 3T3 cells. *Embo J* 14, 3828-34 (1995).
262. Fukuchi-Shimogori, T. et al. Malignant transformation by overproduction of translation initiation factor eIF4G. *Cancer Res* 57, 5041-4 (1997).
263. Glickman, M. H. & Ciechanover, A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* 82, 373-428 (2002).
264. Ciechanover, A. & Brundin, P. The ubiquitin proteasome system in neurodegenerative diseases: sometimes the chicken, sometimes the egg. *Neuron* 40, 427-46 (2003).
265. Hendil, K. B., Khan, S. & Tanaka, K. Simultaneous binding of PA28 and PA700 activators to 20 S proteasomes. *Biochem J* 332 (Pt 3), 749-54 (1998).
266. Hochstrasser, M. Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu Rev Genet* 30, 405-39 (1996).
267. Feder, M. E. & Hofmann, G. E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu Rev Physiol* 61, 243-82 (1999).
268. Hartl, F. U. & Hayer-Hartl, M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 295, 1852-8 (2002).
269. Tupler, R. et al. A variant of the Nijmegen breakage syndrome with unusual cytogenetic features and intermediate cellular radiosensitivity. *J Med Genet* 34, 196-202 (1997).

270. Tanaka, K., Watakabe, A. & Shimura, Y. Polypurine sequences within a downstream exon function as a splicing enhancer. *Mol Cell Biol* 14, 1347-54 (1994).
271. Ruzzi, L. et al. A homozygous nonsense mutation in type XVII collagen gene (COL17A1) uncovers an alternatively spliced mRNA accounting for an unusually mild form of non-Herlitz junctional epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol* 116, 182-7 (2001).
272. Morisaki, H., Morisaki, T., Newby, L. K. & Holmes, E. W. Alternative splicing: a mechanism for phenotypic rescue of a common inherited defect. *J Clin Invest* 91, 2275-80 (1993).
273. Pegoraro, E., Fanin, M., Trevisan, C. P., Angelini, C. & Hoffman, E. P. A novel laminin alpha2 isoform in severe laminin alpha2 deficient congenital muscular dystrophy. *Neurology* 55, 1128-34 (2000).

11. Anhang

Tabelle 12: Überexprimierte Gene des männlichen Patientenzelllinienpool

Gen	Image ID
1 .	140011
2 Human profilin II mRNA, complete cds	32232
3 H.sapiens mRNA homologous to the p64 bovine chloride channel peptide	1647042
4 Homo sapiens DNA sequence from PAC 79C4 on chromosome 1q24. Contains the PMX1 gene, coding for two alternative forms of the Paired Mesoderm Homeobox protein 1 (PMX-1, PHOX-1). Contains ESTs, STS:	364554
5 Homo sapiens mRNA for Brachyury (T) protein	1610164
6 .	358620
7 Human rearranged immunoglobulin mRNA for mu heavy chain enhancer and constant region	246681
8 .	.
9 .	277541
10 Homo sapiens FYN binding protein mRNA, complete cds	293325
11 Homo sapiens mRNA for KIAA0666 protein, partial cds	122281
12 H.sapiens mRNA for five-lipoxygenase activating protein (FLAP)	151201
13 Homo sapiens Chromosome 16 BAC clone CIT987SK-A-575C2	114124
14 Homo sapiens B94 protein mRNA, complete cds	278847
15 Human zinc-finger DNA binding protein (MAZ) mRNA, partial cds	501815
16 Human apolipoprotein AI regulatory protein (ARP-1) mRNA, complete cds	758467
17 Homo sapiens Sprouty 2 (SPRY2) mRNA, complete cds	784022
18 .	712368
19 .	2242695
20 .	785465
21 Homo sapiens mRNA for KIAA0610 protein, partial cds	159097
22 Human mRNA for cannabinoid receptor	26295
23 H.sapiens soluble guanylate cyclase small subunit mRNA	344347
24 Human factor XIII subunit a mRNA, 3' end	229942
25 Human insulin-like growth factor binding protein-4 (IGFBP4) gene, promoter and complete cds	154494
26 Homo sapiens gene for ryudocan core protein, exon1-5, complete cds	347186
27 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp586B0220 (from clone DKFZp586B0220)	356746
28 .	268981
29 Homo sapiens mRNA capping enzyme (HCE) mRNA, complete cds	234135
30 .	40833
31 .	824162
32 .	35402
33 .	361094
34 .	343916
35 .	127752
36 Homo sapiens SOX9 mRNA	300419
37 .	42872
38 .	773433
39 .	121231
40 Homo sapiens putative tumor suppressor gene 26 protein alpha 2 delta calcium channel subunit mRNA, complete cds	24593
41 Human orphan G protein-coupled receptor (RDC1) mRNA, partial cds	35630
42 .	141672
43 .	366108
44 Homo sapiens putative mitochondrial outer membrane protein import receptor (hTOM) mRNA, nuclear gene encoding mitochondrial protein, complete cds	49173
45 .	417728
46 .	.
47 .	767270
48 Human collagenase type IV (CLG4) gene	323656
49 .	.
50 Human mRNA encoding phosphoglycerate kinase	29508

51	.	825305
52	.	48303
53	Human gene for nuclear factor NF-IL6	742711
54	Human orphan homeobox protein (PRH) mRNA, complete cds	501817
55	Human CLL-27 transcript of unrearranged immunoglobulin V(H)5 pseudogene	825648
56	.	
57	Human white homolog (white) mRNA, complete cds	30063
58	.	149698
59	Human DNA sequence from clone 753P9 on chromosome Xq25-26.1. Contains the gene coding for Aminopeptidase P (EC 3.4.11.9, XAA-Pro/X-Pro/Proline/Aminoacylproline Aminopeptidase) and a novel gene.	469797
60	Human two P-domain K+ channel TWIK-1 mRNA, complete cds	22468
61	.	2393600
62	Human ionotropic ATP receptor P2X5a mRNA, complete cds	24793
63	Homo sapiens mRNA for KIAA0914 protein, complete cds	150779
64	Human amyloid precursor-like protein 2 (APLP2) mRNA, complete cds	248618
65	.	124720
66	.	200774
67	.	2326187
68	Human SPARC/osteonectin mRNA, complete cds	26280
69	.	191659
70	Homo sapiens properdin (PFC) gene, complete cds	235934
71	.	213834
72	uman interleukin-13 receptor mRNA, complete cds	297055
73	Homo sapiens mRNA for KIAA0878 protein, complete cds	46114
74	.	121300
75	brain-expressed HHCPA78 homolog [human, HL-60 acute promyelocytic leukemia cells, mRNA, 2704 nt]	140034
76	.	1307632
77	.	
78	.	826266
79	.	
80	Human ORF mRNA, complete cds	359443
81	.	42693
82	.	325001
83	.	1338209
84	Human mRNA for type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, complete cds	43783
85	Homo sapiens HRIHFB2017 mRNA, partial cds	202633
86	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp564B176 (from clone DKFZp564B176)	1188610
87	Homo sapiens mRNA for KIAA0903 protein, partial cds	115192
88	Homo sapiens mRNA, chromosome 1 specific transcript KIAA0500	296537
89	Human DNA sequence from PAC 257A7 on chromosome 6p24. Contains two unknown genes and ESTs, STSs and a GSS	249322
90	.	1680958
91	.	1184242
92	Homo sapiens phosphatidylserine-specific phospholipase A1 beta (PS-PLA1) mRNA, complete cds	120969
93	Human ret proto-oncogene mRNA for tyrosine kinase	258079
94	.	704983
95	.	814057
96	.	111750
97	Homo sapiens apoptosis inhibitor (IEX-1L) gene, complete cds	259649
98	H.sapiens MAL gene exon 1 (and joined CDS)	31154
99	.	1925441
100	Homo sapiens iduronate-2-sulfatase (IDS) gene	45590
101	.	341211
102	Human clone 191B7 placenta expressed mRNA from chromosome X	302342
103	.	279105
104	.	358782
105	Human ribonuclease k6 precursor gene, complete cds	294204
106	H.sapiens SCA1 mRNA for ataxin	490968

107	.	44445
108	H.sapiens mRNA for tafazzins protein	29647
109	.	1186281
110	.	1625842
111	Human mRNA for KIAA0350 gene, partial cds	34084
112	.	279321
113	Homo sapiens clone 23938 mRNA sequence	39083

Tabelle 13: Unterexprimierte Gene des männlichen Patientenzelllinienpool

Gen	Image ID	
1	Human mRNA for KIAA0101 gene, complete cds	136876
2	.	277946
3	.	49413
4	Human glutathione S-transferase (GSTM5) mRNA, complete cds	42641
5	.	814453
6	.	162262
7	Human cell cycle control gene CDC2	742884
8	Homo sapiens apoptosis inhibitor survivin gene, complete cds	796694
9	.	827284
10	.	245381
11	.	.
12	Human p53-associated mRNA, complete cds	239951
13	.	782446
14	.	292241
15	.	.
16	Human mRNA for KIAA0008 gene, complete cds	357373
17	H.sapiens mki67a mRNA (long type) for antigen of monoclonal antibody Ki-67	108718
18	Human clone 23907 mRNA sequence	42263
19	.	1371967
20	.	773863
21	.	282779
22	Homo sapiens mRNA for xeroderma pigmentosum complementation group E protein	377028
23	.	.
24	Human mRNA for histone H1x, complete cds	757506
25	Human Hpast (HPAST) mRNA, complete cds	501680
26	.	.
27	H.sapiens mRNA for glycogenin	271993
28	.	486856
29	.	1519170
30	.	345935
31	Human glutathione transferase M3 (GSTM3) mRNA, complete cds	137940
32	Human mRNA for KIAA0059 gene, complete cds	220294
33	Human mRNA for B-myb gene	377537
34	.	823792
35	.	48466
36	.	111758
37	.	713424
38	.	814236
39	Human mRNA for KIAA0074 gene, partial cds	193222
40	H.sapiens p27 mRNA	502969
41	Homo sapiens lysosphingolipid receptor Edg5 mRNA, complete cds	1844972
42	Human mRNA for Arg-Serpin (plasminogen activator-inhibitor 2, PAI-2)	248847
43	Human mRNA for KIAA0057 gene, complete cds	358181
44	.	416226
45	.	1268656

46	.	1187477
47	Homo sapiens protein tyrosine phosphatase (CIP2)mRNA, complete cds	293274
48	.	194621
49	Homo sapiens C-terminal binding protein 2 mRNA, complete cds	32743
50	H.sapiens erm gene, exon 2,3,4,5 (and joined CDS)	48538
51	.	26816
52	.	242683
53	.	49259
54	.	753807
55	Human pro-alpha-1 (V) collagen mRNA, complete cds	756065
56	Homo sapiens Jagged1 (JAG1) mRNA, complete cds	897491
57	.	2338605
58	Human low-Mr GTP-binding protein Rab32 (RAB32) mRNA, complete cds	264376
59	Homo sapiens LIM protein SLIMMER mRNA, complete cds	502412
60	Homo sapiens mRNA for KIAA0544 protein, partial cds	267780
61	Human lipoxygenase mRNA, complete cds	179890
62	.	471083
63	.	322799
64	Homo sapiens alpha-catenin-like protein (CTNNAL1) mRNA, complete cds	36498
65	H.sapiens mRNA for Tcell leukemia/lymphoma 1	200018
66	Human cyclin B mRNA, 3 end	725736
67	.	297178
68	.	487287
69	Homo sapiens monocyte/neutrophil elastase inhibitor gene, complete cds	814870
70	.	811919
71	.	310098
72	.	826721
73	.	109616
74	.	1170278
75	.	1288745
76	Human ornithine aminotransferase mRNA, complete cds	24120
77	Homo sapiens Coch-5B2 mRNA, complete cds	42627
78	Human mRNA for KIAA0193 gene, complete cds	324101
79	Homo sapiens lamin B1 gene	1691637
80	Human zinc-finger domain-containing protein mRNA, partial cds smooth muscle myosin heavy chain isoform SMemb [human, umbilical cord, fetal aorta, mRNA Partial, 971	51582
81	nt]	22062
82	Human activation (Act-2) mRNA, complete cds	205633
83	.	754019
84	H.sapiens RR2 mRNA for small subunit ribonucleotide reductase	417504
85	.	
86	Human NK4 mRNA, complete cds	302394
87	Homo sapiens eIF-1A, Y isoform (EIF1AY) mRNA, complete cds	380394
88	Homo sapiens clone 23837 mRNA sequence	40233
89	.	731255
90	.	146797
91	Homo sapiens SNC73 protein (SNC73) mRNA, complete cds	154441
92	Homo sapiens mRNA for KIAA0785 protein, complete cds	291782
93	.	136075
94	Human dual specific protein phosphatase mRNA, complete cds	252443
95	Human mRNA for protein gene product (PGP) 9.5	32319
96	.	1934615
97	.	268726
98	H.sapiens N-sam mRNA for fibroblast growth factor receptor	774452
99	.	1708731
100	Homo sapiens sgk gene	194514
101	H.sapiens mRNA for 3 UTR of unknown protein	27716
102	.	110959
103	Human serine/threonine kinase mRNA, partial cds	770837

104	H.sapiens mRNA for NEFA protein	815794
105	Human FEZ1 mRNA, complete cds	46305
106	.	115623
107	.	485766
108	Human hemopoietic cell protein-tyrosine kinase (HCK) gene, complete cds, clone lambda-a2/1a	471715
109	Homo sapiens mRNA for nel-related protein 2, complete cds	23626
110	Homo sapiens IGSF4 gene	784149
111	.	471640
112	.	.
113	Human SMCY (H-Y) mRNA, complete cds	173559
114	.	2389063
115	Human mRNA for RTP, complete cds	249745
116	.	1841288
117	Human RasGAP-related protein (IQGAP2) mRNA, complete cds	321386
118	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp564K143 (from clone DKFZp564K143)	2249247
119	Human beta 1 integrin isoform B (ITGB1) gene, partial cds	309944
120	.	49817
121	.	.
122	.	.
123	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp586J231 (from clone DKFZp586J231)	29022
124	.	940262
125	Homo sapiens mRNA for acetylglucosaminyltransferase-like protein	197558
126	H.sapiens mRNA for gamma subunit of sodium potassium ATPase	125222
127	.	.
128	Human TTG-2 mRNA for a cysteine rich protein with LIM motif	767309
129	H.sapiens CD2 gene exons 1 and 2 (and joined CDS)	1709513
130	Homo sapiens SRF accessory protein 1B (SAP-1) mRNA, complete cds	236155
131	.	177818
132	Human dioxin-inducible cytochrome P450 (CYP1B1) mRNA, complete cds	268878
133	Homo sapiens mRNA for KIAA0808 protein, complete cds	758298
134	.	109045
135	.	739945
136	.	123293
137	.	469964
138	.	113907
139	Human Ca2-activated neutral protease large subunit (CANP) mRNA, complete cds	23643
140	.	2091244
141	.	1371900
142	.	725475
143	Human MEST mRNA, complete cds	245851
144	Human Ig rearranged gamma chain mRNA, V-J-C region and complete cds	128434
145	Homo sapiens immunoglobulin heavy chain variable region (VH4) mRNA, VH4-59 allele, partial cds	188112
146	Homo sapiens mRNA for immunoglobulin lambda heavy chain	756423
147	Human transcription factor (E2A) mRNA, complete cds	236259
148	.	1369566

Tabelle 14: Überexprimierte Gene des weiblichen Patientenzelllinienpool

	Gen	Image ID
1	Human mRNA for KIAA0343 gene, complete cds	47247
2	Human T-plastin polypeptide mRNA, complete cds, clone p4	505595
3	.	504179
4	Human DNA sequence from PAC 66H14 on chromosome 6q21-22. Contains FYN (P59-FYN, SYN, SLK) gene coding for two isoforms. Contains ESTs and STSs	28442
5	.	767181
6	.	.
7	.	2107862
8	.	.
9	.	289004
10	.	417728
11	.	.
12	Human sepiapterin reductase mRNA, complete cds	366379
13	Homo sapiens heart (R)-3-hydroxybutyrate dehydrogenase mRNA, 3' end	306899
14	Human I kappa B epsilon (IkBe) mRNA, complete cds	36215
15	Homo sapiens mRNA for Brachyury (T) protein	1610164
16	.	1873847
17	H.sapiens mRNA for cathepsin C	149370
18	.	2109206
19	.	147050
20	.	2109684
21	Human low-Mr GTP-binding protein (RAB31) mRNA, complete cds	43164
22	.	123293
23	Human mRNA for steroid hormone receptor hERR1	360026
24	Homo sapiens liprin-beta2 mRNA, partial cds	320553
25	.	235176
26	Human desmocollin-2 mRNA, 3' UTR	132014
27	Homo sapiens clone 23565 unknown mRNA, partial cds	714104
28	.	115623
29	.	366108
30	Homo sapiens putative IL-16 protein precursor, mRNA, complete cds	204381
31	.	323467
32	Human dioxin-inducible cytochrome P450 (CYP1B1) mRNA, complete cds	268878
33	Homo sapiens sgk gene	194514
34	Human hemopoietic cell protein-tyrosine kinase (HCK) gene, complete cds, clone lambda-a2/1a	471715
35	.	136169
36	.	940262
37	.	113632
38	H.sapiens erm gene, exon 2,3,4,5 (and joined CDS)	48538
39	Human chitinase (HUMTCHIT) mRNA, exon 1b form, partial cds	815214
40	Human orphan homeobox protein (PRH) mRNA, complete cds	501817
41	Homo sapiens CUSP mRNA, complete cds	357801
42	Homo sapiens clone 24674 mRNA sequence	501929
43	.	2355123
44	Human mRNA for KIAA0101 gene, complete cds	136876
45	Human focal adhesion kinase (FAK) mRNA, complete cds	724892
46	.	489794
47	.	471737
48	Human mRNA for KIAA0049 gene, complete cds	50091
49	.	195662
50	.	811860
51	.	293745
52	.	753704
53	.	108658
54	.	725475

Tabelle 15: Unterexprimierte Gene des weiblichen Patientenzelllinienpool

Gen	Image ID
1 .	34720
2 .	210784
3 .	713271
4 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp564F053 (from clone DKFZp564F053)	152305
5 Human mRNA for KIAA0193 gene, complete cds	324101
6 .	200774
7 Human hepatitis delta antigen interacting protein A (dipA) mRNA, complete cds	490175
8 Human heat-shock protein HSP70-NIBRINB gene	33800
9 .	51987
10 Homo sapiens Chromosome 16 BAC clone CIT987SK-A-575C2	114124
11 Homo sapiens 3-phosphoglycerate dehydrogenase mRNA, complete cds	45942
12 Homo sapiens flow-induced endothelial G protein-coupled receptor (FEG-1) mRNA, complete cds	199684
13 .	785457
14 .	.
15 .	469964
16 .	2338337
17 .	2107608
18 Human factor XIII subunit a mRNA, 3 end	229942
19 Homo sapiens clone 23727 mRNA sequence	142898
20 Homo sapiens MT1L gene	240883
21 .	67048
22 .	143767
23 .	.
24 Homo sapiens mRNA for DnaJ protein homologue	127810
25 Human profilin II mRNA, complete cds	32232
26 Human ionotropic ATP receptor P2X5a mRNA, complete cds	24793
27 Homo sapiens clone 23631 mRNA sequence	41593
28 .	.
29 .	.
30 .	1061333
31 .	292545
32 .	.
33 .	.
34 Homo sapiens putative tumor suppressor gene 26 protein alpha 2 delta calcium channel subunit mRNA, complete cds	24593
35 Homo sapiens immunoglobulin heavy chain variable region (VH4) mRNA, VH4-59 allele, partial cds	188112
36 Homo sapiens mRNA for immunoglobulin lambda heavy chain	756423
37 .	1369566
38 Human transcription factor (E2A) mRNA, complete cds	236259

Erklärung

„Ich, Lars-Arne Krüger, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Untersuchungen zur klinischen Variabilität der genetisch bedingten Krankheit Nijmegen Breakage Syndrom“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Lebenslauf

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