

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

DISSERTATION

**Zelluläre Charakterisierung eines neuen  
Chromosomeninstabilitätssyndroms und  
Ausschluss von Kandidatengeneten**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Martin Markovski  
aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. M. Digweed

2. Prof. Dr. M. Stuhmann-Spangenberg

3. Prof. Dr. F. Eckardt-Schupp

**Datum der Promotion: 26.11.2007**

**Für Ebru, Kian und Kiara**

## Abkürzungsverzeichnis

<b>A</b>	<b>Adenin</b>
<b>AS</b>	<b>Aminosäure</b>
<b>AT</b>	<b>Ataxia telangiectasia</b>
<b>ATM</b>	<b>Ataxia telangiectasia, „mutated“</b>
<b>BRCT</b>	<b>„breast-cancer-carboxy-terminal“ Domäne</b>
<b>BLAST</b>	<b>„Basic Local Alignment Search Tool“</b>
<b>bp</b>	<b>Basenpaare</b>
<b>BSA</b>	<b>Bovines Serumalbumin</b>
<b>C</b>	<b>Cytosin</b>
<b>ca.</b>	<b>circa</b>
<b>CDK2</b>	<b>„Cyclin-dependent kinase 2“</b>
<b>CDK4</b>	<b>„Cyclin-dependent kinase 4“</b>
<b>cDNA</b>	<b>„complementary Desoxyribonucleic acid“</b>
<b>CT</b>	<b>C-terminales Ende</b>
<b>CHK2</b>	<b>Checkpoint Kinase 2</b>
<b>cM</b>	<b>centi-Morgen</b>
<b>DDIT3</b>	<b>„DNA-damage-inducible transcript 3“</b>
<b>ddNTP</b>	<b>2', 3'-Dideoxy-ribonukleosid-5`-triphosphat</b>
<b>DDX23</b>	<b>„DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 23“</b>
<b>DNA</b>	<b>„Desoxyribonucleic acid“ (Desoxyribonukleinsäure)</b>
<b>dNTP</b>	<b>Desoxyribonukleosidtriphosphat</b>
<b>DSB</b>	<b>Doppelstrangbruch</b>
<b>EBV</b>	<b>Epstein-Barr-Virus</b>
<b>EDTA</b>	<b>Ethylendiamintetraessigsäure</b>
<b>EST</b>	<b>„Expressed sequence tag“</b>
<b>F</b>	<b>„Forward primer“ (Vorwärts Primer)</b>
<b>FA</b>	<b>Fanconi-Anämie</b>
<b>FAM</b>	<b>5'-Carboxy-Fluorescein</b>
<b>FHA</b>	<b>„fork-head-associated“ Domäne</b>
<b>FKS</b>	<b>fetales Kälberserum</b>
<b>G</b>	<b>Guanin</b>
<b>Gy</b>	<b>Gray - Maßeinheit der Energiedosis</b>
<b>HR</b>	<b>homologe Rekombination</b>
<b>HRP</b>	<b>„Horse Radish Peroxidase“</b>
<b>kb</b>	<b>Kilobasen</b>

<b>kDa</b>	<b>Kilodalton</b>
<b>KUB3</b>	<b>Ku70 binding protein</b>
<b>LCL</b>	<b>„Lymphoblastoide Cell Line“ (Lymphoblastoide Zelllinie)</b>
<b>LOD</b>	<b>„Logarithm of odds“</b>
<b>M</b>	<b>molar</b>
<b>min.</b>	<b>Minute</b>
<b>mM</b>	<b>millimolar</b>
<b>NBS</b>	<b>Nijmegen-Breakage-Syndrom</b>
<b>NCBI</b>	<b>„National Center of Biotechnology Information“</b>
<b>NHEJ</b>	<b>„Non homologous end-joining“</b>
<b>NT</b>	<b>N-terminales Ende</b>
<b>OMIM</b>	<b>„Online Mendelian Inheritance in Man (database)“</b>
<b>ORF</b>	<b>„Open reading frame“ (Offener Leserahmen)</b>
<b>PAA</b>	<b>Polyacrylamid</b>
<b>PA2G4</b>	<b>„Proliferation-associated 2G4“</b>
<b>PCR</b>	<b>„Polymerase chain reaction“ (Polymerasekettenreaktion)</b>
<b>PPM1H</b>	<b>„Protein phosphatase 1H“</b>
<b>R</b>	<b>„Reverse primer“ (Rückwärts Primer)</b>
<b>RBMS2</b>	<b>„RNA binding motif, single stranded interacting protein 2“</b>
<b>rpm</b>	<b>„rotation per minute“ (Umdrehungen pro Minute)</b>
<b>RNA</b>	<b>„Ribonucleic acid“ (Ribonukleinsäure)</b>
<b>RT</b>	<b>Reverse Transkription</b>
<b>SAP</b>	<b>„Shrimp Alkaline Phosphatase“</b>
<b>SDS</b>	<b>Sodiumdodecylsulfat</b>
<b>sek.</b>	<b>Sekunden</b>
<b>Ser</b>	<b>Serin</b>
<b>SMUG1</b>	<b>„Single-strand selective monofunctional uracil DNA glycosylase“</b>
<b>SNP</b>	<b>„Single nucleotid polymorphism“</b>
<b>SSA</b>	<b>„Single strand annealing“</b>
<b>T</b>	<b>Thymin</b>
<b>Taq</b>	<b><i>Thermus aquaticus</i></b>
<b>U</b>	<b>Unit</b>
<b>U/min</b>	<b>Umdrehungen pro Minute</b>
<b>V</b>	<b>Volt</b>

**Inhaltsverzeichnis**

<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Chromosomeninstabilitätssyndrome	1
1.2 Nijmegen-Breakage-Syndrom (NBS)	1
1.2.1 Klinisches Bild	2
1.2.2 Molekulare Grundlagen	3
1.3 DNA-Reparatursysteme	6
1.3.1 Non homologous end joining (NHEJ)	7
1.3.2 Homologe Rekombination (HR) / Single Strand Annealing (SSA)	8
1.4 Ein weiterer Gendefekt, der zum NBS-Phänotyp führt	10
1.5 Zielsetzung	11
1.5.1 Chromosomenbruchanalyse	11
1.5.2 Proteinbiochemische Analyse	11
1.5.3 Familienkopplungsanalyse	12
<b>2 Materialien und Methoden</b>	<b>13</b>
2.1 Materialien	13
2.1.1 Zelllinien	13
2.1.2 Zellkulturmedien	13
2.1.3 Patienten-DNA	13
2.1.4 Antikörper	14
2.1.4.1 Primäre Antikörper	14
2.1.4.2 Sekundäre Antikörper	14
2.1.5 Enzyme	14
2.1.6 Kits	15
2.1.7 Primer	15
2.1.7.1 Primer für Mikrosatelliten	15
2.1.7.2 Primer für cDNA-PCR	16
2.1.8 Lösungen und Puffer	17
2.1.9 Chemikalien und Reagenzien	18
2.1.10 Verbrauchsmaterialien	19
2.1.11 Programme und Datenbanken	19
2.1.12 Geräte und Zubehör	20
2.2 Methoden	21
2.2.1 Zellkultur	21
2.2.1.1 Allgemeine Bedingungen	21
2.2.1.2 Zellkultivierung	21

---

2.2.1.3 Zellzahlbestimmung _____	21
2.2.2 Zellbiologische Methoden _____	21
2.2.2.1 Induzierte Chromosomenschädigung _____	21
2.2.2.2 Chromosomenaufarbeitung _____	22
2.2.2.3 Chromosomenauswertung _____	23
2.2.3 Proteinbiochemische Methoden _____	23
2.2.3.1 Zellbestrahlung _____	23
2.2.3.2 Proteinextraktion _____	24
2.2.3.3 Phosphatase-Behandlung _____	24
2.2.3.4 Immunpräzipitation _____	25
2.2.3.5 Western Blot _____	26
2.2.3.6 Immundetektion _____	27
2.2.3.7 „Strippen“ von Membranen _____	28
2.2.4 Molekulargenetische Methoden _____	29
2.2.4.1 Globale DNA-Amplifizierung _____	29
2.2.4.2 Isolierung von RNA _____	29
2.2.4.3 Reverse Transkription _____	30
2.2.4.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) _____	31
2.2.4.5 Agarose-Gelelektrophorese _____	33
2.2.4.6 PCR-Aufreinigung _____	33
2.2.4.7 Gel Extraktion _____	34
2.2.4.8 Sequenzierung _____	34
2.2.4.9 Fällung _____	35
<b>3 Ergebnisse _____</b>	<b>36</b>
<b>3.1 Chromosomenbruchanalysen _____</b>	<b>36</b>
3.1.1 Auswertung der Chromosomenaberrationen des 1. Versuchsaufbaus _____	37
3.1.2 Auswertung der Chromosomenaberrationen des 2. Versuchsaufbaus _____	42
3.1.3 Dizentrische Chromosomen _____	46
3.1.4 Endoreduplikationen _____	47
<b>3.2 Proteinanalysen _____</b>	<b>48</b>
3.2.1 Immunpräzipitation _____	49
3.2.1.1 Nachweis von phospho-ATM (S1981) und ATM _____	49
3.2.2 Western Blot _____	50
3.2.2.1 Nachweis von Nibrin _____	50
3.2.2.2 Nachweis von SMC1 und phospho-SMC1 (Ser957) _____	51
3.2.2.3 Nachweis von p53 _____	52
3.2.2.4 Nachweis von phospho-p53 (Ser15) _____	53
3.2.2.5 Nachweis von p21 _____	54
3.2.2.6 Nachweis von CHK2 _____	55

---

3.2.2.7 Nachweis von FANCD2	56
<b>3.3 DNA-Analysen</b>	<b>57</b>
3.3.1 Homozygoty-Mapping	57
3.3.2 Feinkartierung	59
3.3.3 Kandidatengenscreening	60
3.3.4 RT-PCR-Kontrolle durch GAPDH-Amplifizierung	60
3.3.5 Auswertung der Kandidatengene	61
3.3.5.1 DDX23 („DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 23“)	62
3.3.5.2 SMUG1 („single-strand-selective monofunctional uracil-DNA glycosylase 1“)	63
3.3.5.3 CDK2 („cyclin-dependent kinase 2“)	63
3.3.5.4 PA2G4 („proliferation-associated 2G4“)	64
3.3.5.5 RBMS2 („RNA binding motif, single stranded interacting protein 2“)	65
3.3.5.6 DDIT3 („DNA-damage-inducible transcript 3“)	66
3.3.5.7 CDK4 („cyclin-dependent kinase 4“)	67
3.3.5.8 XRCC6BP1 (“X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 6 binding protein”) (KUB3)	68
<b>4 Diskussion</b>	<b>69</b>
4.1 Familie M: Autosomal rezessive Vererbung einer Krebs-disponierenden Genmutation	69
4.2 Dizentrische Chromosomen und Endoreduplikationen charakterisieren die Zellen von einer Betroffenen der Familie M	73
4.3 Der Basisdefekt in Betroffenen der Familie M	75
4.4 Dauerhafte Aktivierung der Zellzyklus-Checkpoints in Zellen von einer Betroffenen der Familie M	79
4.5 Genkartierung und Kandidatengenausschluss	83
4.6 Ausblick	87
<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>88</b>
<b>6 Literaturverzeichnis</b>	<b>90</b>
<b>7 Anhang</b>	<b>101</b>
<b>8 Erklärung an Eides Statt</b>	<b>109</b>
<b>9 Lebenslauf</b>	<b>110</b>
<b>10 Danksagung</b>	<b>111</b>

## **1 Einleitung**

### **1.1 Chromosomeninstabilitätssyndrome**

Die Chromosomeninstabilitätssyndrome sind eine Gruppe von Erkrankungen, in denen spontane und induzierte Chromosomenaberrationen vermehrt auftreten. Die Chromosomenaberrationen sind Ausdruck einer Störung in der Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität, in der Regel bedingt durch einen Defekt in der Reparatur von DNA-Läsionen. Die Folge einer derartigen Störung ist eine erhöhte Mutationsrate in somatischen Zellen und damit verbunden eine erhöhte Tumorzinzidenz. Zu den klassischen Chromosomeninstabilitätssyndromen gehören unter anderem die Ataxia telangiectasia (AT), die Fanconi-Anämie (FA), das Bloom- (BS) und Werner-Syndrom (WS), sowie das Nijmegen-Breakage-Syndrom (NBS). Die in dieser Dissertation vorgestellte Familie weist einen dem Nijmegen-Breakage-Syndrom ähnlichen Phänotyp auf, daher wird im Folgenden näher auf dieses Syndrom eingegangen.

### **1.2 Nijmegen-Breakage-Syndrom (NBS)**

Das Nijmegen-Breakage-Syndrom (NBS; MIM 251260) ist eine seltene Erkrankung. Die Vererbung ist autosomal rezessiv mit vollständiger Penetranz. Diese Patienten weisen eine gesteigerte Mutationsrate auf, welche durch die Rate der erhöhten Chromosomenaberrationen unter dem Lichtmikroskop zu erkennen ist (Taalman et al., 1983; Antoccia et al., 1997; Antoccia et al., 1999).

Der erste Fall eines NBS-Patienten wurde in Holland an der University of Nijmegen beschrieben (Weemaes et al., 1981). Weltweit sind etwa hundert Familien bekannt, wobei die überwiegende Mehrzahl dieser Familien aus Osteuropa kommt. Die beobachtete Heterozygoten-Frequenz in Polen, der Ukraine und der Tschechischen Republik beträgt 1:150 (Varon et al., 2000).

Bereits spontan werden dabei besonders oft Translokationen in T-Lymphozyten zwischen den Chromosomen 7 und 14 beobachtet (Chrzanowska et al., 1995; van der Burgt et al., 1996). Wie bei der AT, wird auch bei NBS (van der Burgt et al., 1996; Gatei et al., 2000) die Chromosomenbruchrate durch ionisierende Strahlen stark erhöht, gegenüber bifunktionellen Alkylantien, die bei der FA zu erhöhter Brüchigkeit führen,

sind NBS-Zellen weniger empfindlich. Dieses deutet auf eine Defizienz in der Reparatur der durch ionisierende Strahlen verursachten DNA-Schäden hin, allem voran der DNA-Doppelstrangbruch (DSB). Aufgrund der erhöhten Chromosomenbruchrate ist daher der therapeutische Einsatz von ionisierenden Strahlen bei NBS-Patienten zu überdenken, da dies einen fatalen Ausgang nehmen kann (Distel et al., 2003).

### 1.2.1 Klinisches Bild

Das klinische sowie phänotypische Erscheinungsbild des Nijmegen-Breakage-Syndroms weist eine hohe Variabilität auf (Hiel JA et al., 2000). NBS-Patienten haben ein stark erhöhtes Krebsrisiko (Seemanova et al., 1985), dabei entwickeln NBS-Patienten insbesondere Tumore des lymphatischen Systems. Etwa 40 % der NBS-Patienten entwickeln bis zum 20. Lebensjahr eine Neoplasie, insbesondere Lymphome. In der Regel handelt es sich um Non-Hodgkin-Lymphome (NHL). Nach dem polnischen NBS-Register haben 18 von 48 Patienten vor dem 15. Lebensjahr ein Lymphom. Das Risiko in dieser Altersgruppe für einen solchen Tumor ist somit 1000-fach erhöht.

NBS-Patienten leiden unter rezidivierenden Pneumonien. Dies wird durch Defizienzen sowohl in dem humoralen als auch in dem zellulären Immunsystem verursacht. Dys- oder Agammaglobulinämien werden ebenfalls in vielen Patienten festgestellt, nur 10 % aller Patienten sind im Immunglobulin-Status unauffällig.

Die meisten NBS-Patienten sind von Geburt an mikrozephal und haben einen Intelligenzquotienten, der im mittleren bis unteren Normbereich liegt. Einige Patienten weisen eine geringfügige geistige Retardierung auf. Bereits bei Geburt zeigen 75 % der Patienten eine Mikrozephalie, bei 25 % der Patienten manifestiert sich die Mikrozephalie jedoch erst mit einigen Lebensmonaten (Chrzanowska et al., 1995; Green et al., 1995). Als Ursache wird das reduzierte Gehirnwachstum sowie die vorzeitige Fusion der Schädelknochen diskutiert.

Ein weiteres Merkmal der NBS-Patienten ist der Minderwuchs. Geburtsgröße und Geburtsgewicht liegen innerhalb der ersten Lebensmonate oft in den normalen Grenzen. In der Regel wird eine Wachstumsretardierung ab dem zweiten Lebensjahr

manifest. Der Minderwuchs wird auf eine Verkürzung des Rumpfes zurückgeführt, das Körpergewicht ist der Körperlänge proportional (Chrzanowska et al., 1995).

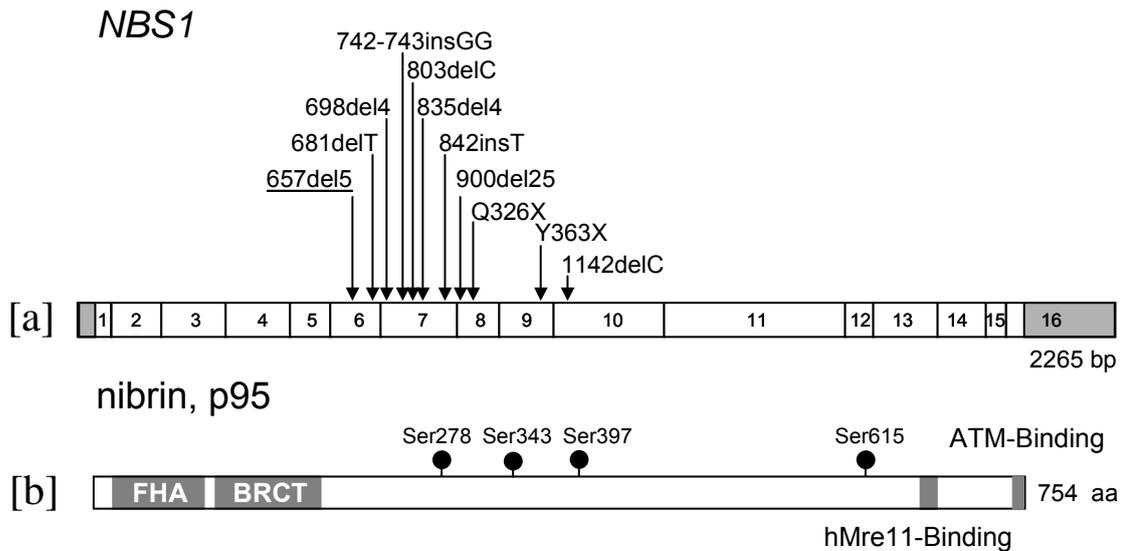
Phänotypisch weisen NBS-Patienten eine charakteristische kraniofaziale Dismorphie auf (Abb. 1). Sie ist oft gekennzeichnet durch ein Gesicht mit flacher Stirn, Retrognathie (rückverlagerter Unterkiefer), großer gerader Nase mit flacher Nasenwurzel und tiefsitzenden Ohrmuscheln.



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

### 1.2.2 Molekulare Grundlagen

Durch Kopplungsanalysen in betroffenen Familien konnte das zugrunde liegende *NBS1*-Gen zunächst auf dem Chromosom 8q21 kartiert werden (Saar et al., 1997). Durch die Analyse von „Expressed sequence tags“ (ESTs), die in diesem Bereich ebenfalls kartieren, konnte ein Gen identifiziert werden, das in den NBS-Patienten mutiert war (Matsuura et al., 1998; Varon et al., 1998; Tauchi, 2000). Das *NBS1*-Gen erstreckt sich über ungefähr 50 kb, weist 16 Exons auf und ergibt ein Protein bestehend aus 754 Aminosäuren (Varon et al., 1998) mit einer Größe von 85 kDa. Im SDS-PAA-Gel läuft das Protein jedoch bei einer Höhe von 95 kDa.



**Abb. 2: Das *NBS1*-Gen und das daraus gebildete Protein Nibrin/p95.** Die Exons (1 bis 16) vom *NBS1*-Gen [a] sind zusammen mit den bekannten Mutationen (zwischen Exons 6 und 10) eingezeichnet. Mutation 657del5 ist mit über 90 % die häufigste. Auf Proteinebene [b] sind die bekannten Domänen (FHA-Domäne und BRCT-Domäne), die Bindungsstellen für MRE11, ATM und die Serine (Ser278, Ser343, Ser397 und Ser615) die von ATM (Ataxia Telangiectasia „mutated“) phosphoryliert werden, eingezeichnet (Seemanova et al., 2005).

Im amino-terminalen Bereich wurden zwei funktionelle Domänen durch Sequenzvergleiche identifiziert: eine „fork-head-associated“ Domäne (FHA; AS 24-109) und eine „breast-cancer-carboxy-terminal“ Domäne (BRCT; AS 114-183), benannt nach der Genfamilie dieser Transkriptionsfaktoren. Beide Domänen wurden oft in eukaryontischen Nukleoproteinen gefunden, die im Zellzyklus-Checkpoint (Iijima et al., 2004) oder in der DNA-Reparatur involviert sind. Sie werden für Protein-Protein-Wechselwirkungen verantwortlich gemacht (Durocher et al., 2000). Eine weitere Domäne in der carboxy-terminalen Hälfte des Nibrins ist für die Bindung an dem Protein MRE11 verantwortlich (Desai-Mehta et al., 2001) (Abb. 2). Weiterhin wird Nibrin an wenigstens vier Stellen durch das Protein ATM (Ataxia telangiectasia „mutated“) phosphoryliert (Gatei et al., 2000; Wu et al., 2000).

Das *NBS1*-Gen wurde auch als Säugetierortholog des in der Hefe bekannten *XRS2*-Gens identifiziert (Carney et al., 1998). Das Produkt dieses Gens ist, zusammen mit RAD50 und MRE11, in einen Komplex eingebunden. Beim Menschen ist das Produkt des *NBS1*-Gens, Nibrin, ebenfalls in einem Komplex mit menschlichem RAD50 und MRE11 vorzufinden. Es wurde eine Beteiligung an der Reparatur von DSBs für den Komplex durch verschiedene Experimente impliziert (Paull and Gellert, 1998; Trujillo et al., 1998; Bressan et al., 1999). Dieses scheint beim Säugetier ebenfalls zuzutreffen,

wobei die Regulation des Zellzyklus eine ebenfalls wichtige Aufgabe des Komplexes zu sein scheint. Gegenstand der aktuellen Forschung ist es, die Rolle des Komplexes in der DNA-Reparatur und des Zellzyklus mit molekularbiologischen Methoden in Patientenzellen und Mausmodellen zu untersuchen (Demuth et al., 2004b; Kracker et al., 2005).

Die molekulare Analyse der NBS-Patienten zeigt, dass 90 % der Patienten homozygot die gleiche Deletion von fünf Basenpaaren (657del5) im Exon 6 aufweisen (Varon et al., 1998). Da die überwiegende Zahl der Patienten dieser Mutation slawischer Abstammung sind, wird diese auch als die sogenannte „Slawische Mutation“ bezeichnet. Daneben wurden zehn weitere Mutationen gefunden (Abb. 2), die alle, wie die 657del5 Mutation auch, zum vorzeitigen Abbruch der Translation nach den amino-terminalen FHA- und BRCT-Domänen führen (Digweed and Sperling, 2004).

Zunächst wurde bei der Slawischen Mutation (657del5) von einer Nullmutation ausgegangen (Varon et al., 1998). Dieses wäre jedoch nicht mit dem Leben vereinbar, wie Versuche mit Knock-out-Mäusen zeigen konnten, bei denen die Inaktivierung von Nibrin letal wirkte (Zhu et al., 2001; Dumon-Jones et al., 2003). Es konnten jedoch in immortalisierten lymphoblastoiden Zellen (LCLs) von NBS-Patienten mit der Slawischen Mutation (657del5) zwei Proteinfragmente durch Immunpräzipitation nachgewiesen werden: Ein 26 kDa großes amino-terminales Peptid, sowie ein 63 kDa großes carboxy-terminales-Fragment, welches im SDS-PAA-Gel mit 70 kDa läuft und meistens als p70-Nibrin bezeichnet wird. Bei zwei weiteren NBS1-Mutationen, 835del4 und 900del25, konnten ebenfalls ein carboxy-terminales Proteinfragment mit der Größe von 60 kDa bzw. 55 kDa isoliert werden (Maser et al., 2001; Tanzanella et al., 2003). Durch das Vorhandensein solcher Protein-Fragmente geht man von einer Restfunktion des Nibrins aus, was erklären kann, weshalb *NBS1*-Mutationen beim Menschen mit dem Leben vereinbar sind. Es handelt sich bei 657del5 also um eine hypomorphe Mutation. Tatsächlich kann in nullmutanten Mauszellen durch eine 657del5-NBS-cDNA die Letalität aufgehoben werden (Demuth et al., 2004b).

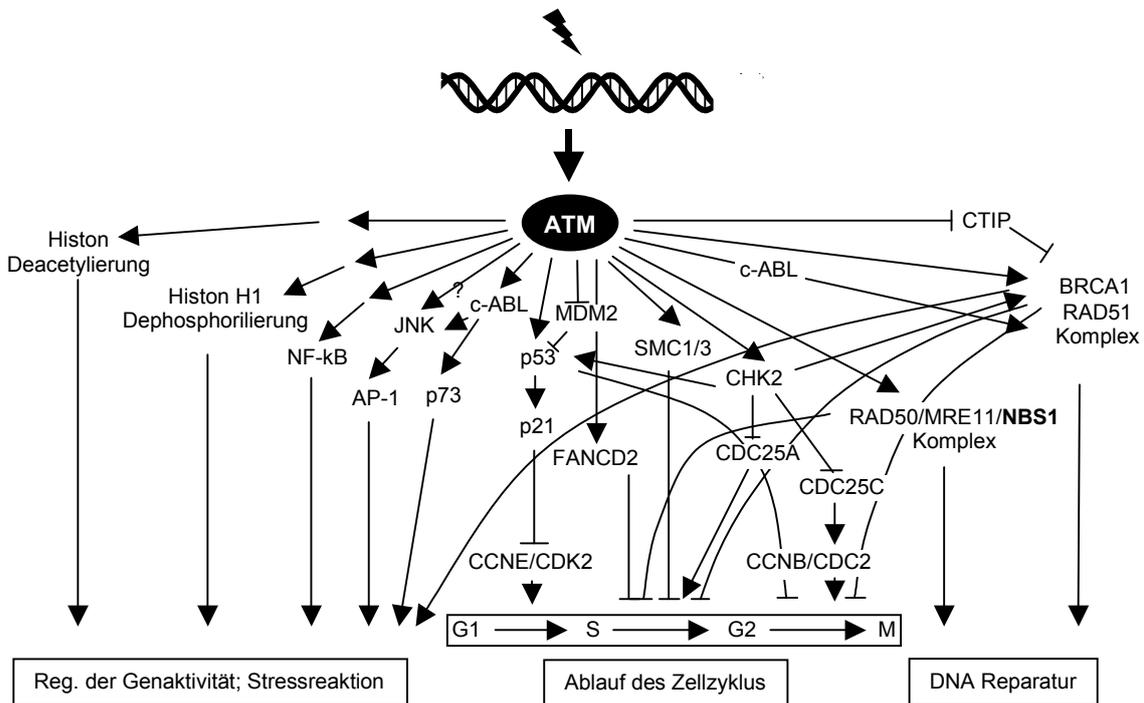
### 1.3 DNA-Reparatursysteme

DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) gehören zu den schwerst wiegenden Schäden der zellulären DNA (Lee et al., 2000), wobei bereits ein einziger unreparierter DSB zum Tod der Zelle führen kann (Blocher and Pohlitz, 1982). Die Ursache von DSB liegt nicht allein an der Schädigung durch exogene/endogene Noxen (z.B. ionisierende Strahlung, Zytostatika, Sauerstoffradikale, etc.), auch bei vielen physiologischen Vorgängen werden DSB als gewünschte Zwischenprodukte hervorgerufen. Zu diesen Vorgängen gehört unter anderem die DNA-Replikation und die genetische Rekombination während der Meiose (Haber, 2000), sowie die V(D)J-Rekombination der Immunglobulin- und T-Zell-Rezeptorgene während der B- und T-Zell-Reifung (Lumsden et al., 2004).

Eine genaue Abgrenzung der genomischen Instabilitätssyndrome gibt es nicht, jedoch zeigen sich Gemeinsamkeiten. Patienten, welche an einem DNA-Reparaturdefekt, wie z.B. Xeroderma pigmentosum oder am Li-Fraumeni-Syndrom, leiden, zeigen ein erhöhtes Krebsrisiko und eine gesteigerte Empfindlichkeit gegenüber spezifischen Mutagenen (z. B. UV-Licht, Ionisierende Strahlen). Diese Empfindlichkeit gegenüber ionisierenden Strahlen, welche die Doppelstrangbruchrate stark erhöht, gepaart mit einem erhöhten Krebsrisiko, findet sich auch bei den Chromosomeninstabilitätssyndromen, einer Untergruppe der genomischen Instabilitätssyndrome. Jedoch ist hierbei auffällig, dass die betroffenen Pathways direkte Beziehungen zu den Pathways haben, welche für die Immunaktivierung verantwortlich sind. Durch die Interaktionen der einzelnen Pathways lässt sich die erhöhte Radiosensitivität mit einer gesteigerten Immuninsuffizienz in Verbindung bringen.

Sind die an der Reparatur von Doppelstrangbrüchen beteiligten Proteine in ihrer Funktion eingeschränkt, wie z.B. das p70 bei NBS (Kanaar et al., 1998), ist die Zelle nicht mehr in der Lage, DSB korrekt zu reparieren. Dies führt in der Zelle zu genomischer Instabilität und chromosomalen Rearrangements, wobei diese Ereignisse Zellzyklus-Checkpoints aktivieren, die einen permanenten Wachstumsstopp oder den Tod der Zelle einleiten (Haber, 2000) können. Sind diese Checkpoints jedoch inaktiviert, kann dies zur Ansammlung von Mutationen und zur Krebsentstehung führen (Khanna and Jackson, 2001; Mills et al., 2003) (Abb. 3).

spontane und verursachte DNA-Schäden



**Abb. 3: Netzwerk der DNA-Reparatur und Zellzyklus-Checkpoint-Proteine.** Dargestellt ist eine Auswahl der wichtigsten Proteine, die an der Stressreaktion, der Regulierung des Zellzyklus und der DNA-Reparatur beteiligt sind.

Im Laufe der Evolution haben sich mehrere Wege der Reparatur von Doppelstrangbrüchen etabliert, die grob in drei Wege unterteilt werden können. Die drei Mechanismen, die der eukaryontischen Zelle zur Verfügung stehen, sind das non homologous end joining (NHEJ), welches den dominanten Reparaturweg bei Säugerzellen darstellt (Takata et al., 1998) und bei den Umbauten der Immunglobuline involviert ist (Rooney et al., 2004), die homologe Rekombination (HR), sowie das Single Strand Annealing (SSA) (Abb. 4).

**1.3.1 Non homologous end joining (NHEJ)**

Das non homologous end joining (NHEJ) benötigt keine oder nur sehr kurze Abschnitte mit DNA-Homologien (1 - 6 Bp) zum Abgleich bei der Reparatur des DSB. Das Prinzip des NHEJ beruht auf der einfachen Verknüpfung der durch den DSB entstandenen freien DNA-Enden. Dies hat zwar den großen Vorteil, dass die Reparatur zellzyklusunabhängig ablaufen kann, jedoch können vermehrt Fehlverknüpfungen oder kleineren Deletionen auftreten. Bei dem NHEJ erfolgt die Prozessierung zunächst durch das Binden von Heterodimeren (Ku70/Ku80) innerhalb von 5 - 30 min. nach einem DSB

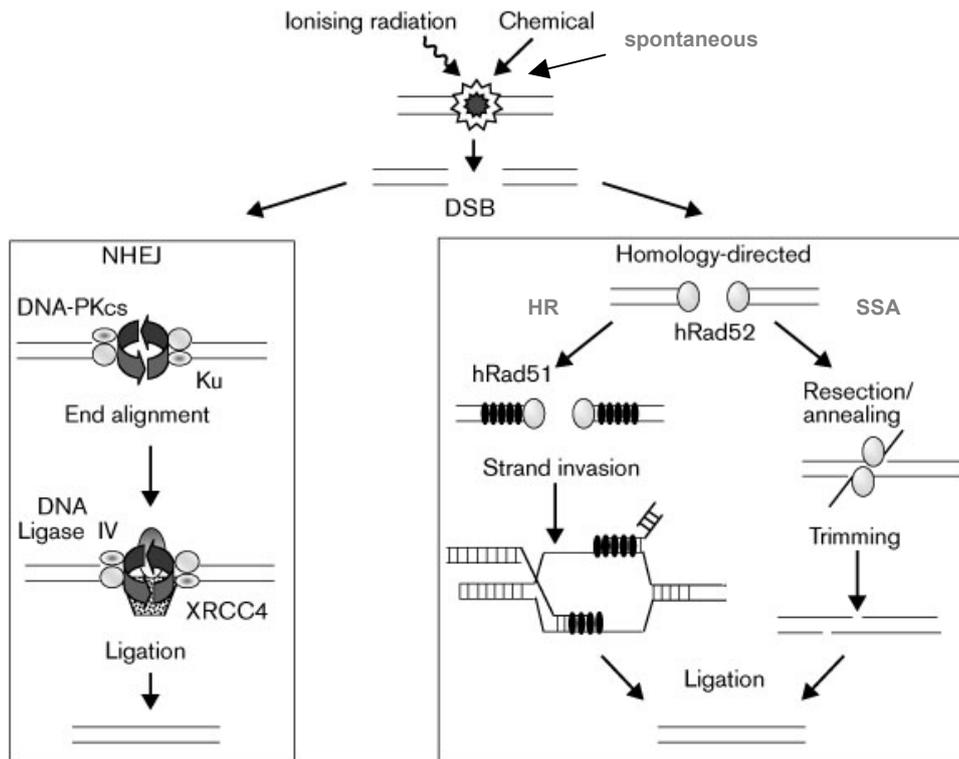
(Wang et al., 2001) an die DNA-Bruchenden. Dadurch wird die exonukleolytische Degradation der DNA-Enden verhindert (Liang and Jasin, 1996) und gleichzeitig die katalytische Untereinheit (DNA-PK<sub>cs</sub>) der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PK) rekrutiert. Die Ligation der Bruchenden erfolgt schließlich durch den XRCC4/DNA-Ligase IV-Komplex.

### **1.3.2 Homologe Rekombination (HR) / Single Strand Annealing (SSA)**

Im Gegensatz zum NHEJ ist bei der Reparatur durch die homologe Rekombination (HR) das Vorhandensein einer zum Bruchbereich homologen Sequenz, zumeist die des Schwesterchromatids, erforderlich. Daher findet die Reparatur hauptsächlich in der späten S- und G<sub>2</sub>-Phase des Zellzyklus statt, da hier die räumliche Nähe der Schwesterchromatide zueinander gegeben ist.

Zunächst bindet das Protein RAD52, um die Degradation der DNA-Enden zu verhindern. Es folgt eine nukleolytische Prozessierung der Enden des Doppelstrangbruchs zu Einzelsträngen mit 3'-Überhang. An die entstandenen 3'-Enden lagert sich der BRCA2/RAD51-Komplex an und ermöglicht dadurch die Stranginvasion in das homologe Schwesterchromatid. Durch die neuen Bindungsstellen kann nun eine DNA-Polymerase die fehlenden Bruchstücke resynthetisieren. Abschließend wird die Überkreuz-Struktur („Holliday-Junction“) durch eine Resolvase wieder aufgelöst.

Das Single Strand Annealing (SSA) kann als Untergruppe der HR gesehen werden, bei der keine homologen Chromatiden benötigt werden. Zunächst werden durch exonukleolytische Degradation überhängende einzelsträngige Enden erzeugt („Resection“), die sich bei Auftauchen kurzer komplementärer Sequenzbereiche aneinanderlagern („Annealing“). Die Reparatur wird durch Entfernen der überhängenden einzelsträngigen DNA-Enden („Trimming“) und Ligation abgeschlossen.



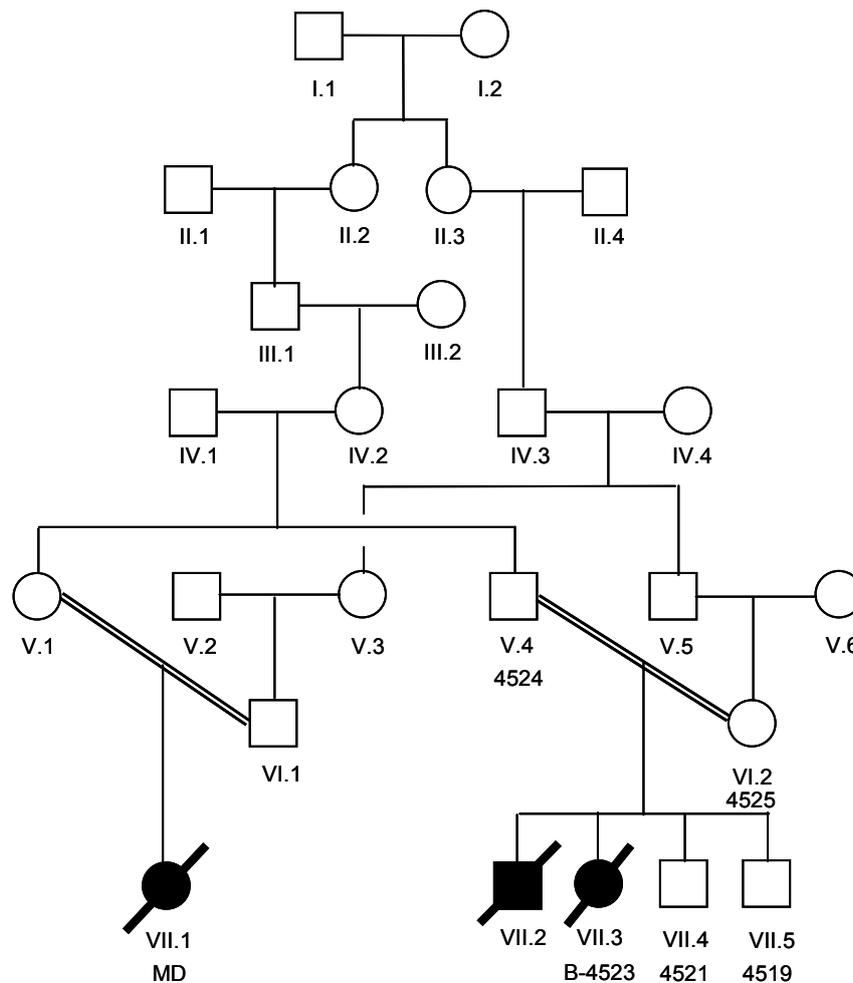
**Abb. 4: Vereinfachte schematische Darstellung der Wege der DSB-Reparatur in menschlichen Zellen (Karran, 2000).** Dargestellt sind die drei Hauptreparaturmechanismen, die einer eukaryontischen Zelle nach einem Doppelstrangbruch zur Verfügung stehen. Auf der linken Seite ist die Reparatur über das non homologous end joining (NHEJ) zu sehen, der dominante Weg bei Säugerzellen. Rechts ist die homologe Rekombination (HR), sowie das Single Strand Annealing (SSA) dargestellt.

Wie bei der NHEJ kann es auch bei der SSA zu Deletionen oder Fehlverknüpfungen im Reparaturprozess kommen. Dies wird jedoch toleriert, da der zu kodierende Bereich im Genom nur bei ca. 3 % liegt.

Bisher wurde vermutet, dass bei der DNA-Enden-Prozessierung auch der RAD50/MRE11/NBS1-Komplex mit seiner Exonuklease-Aktivität beteiligt ist, da der homologe Komplex aus *Saccharomyces cerevisiae* Rad50/Mre11/Xrs2 bei beiden Reparaturmechanismen nachgewiesen werden konnte (Bressan et al., 1999). Aus neueren Versuchen mit konditionalen Knock-out-Mauszellen geht hervor, dass NBS1 sowohl an der HR (Yang et al., 2006) als auch bei dem NHEJ beteiligt ist (Kracker, et al., 2005).

1.4 Ein weiterer Gendefekt, der zum NBS-Phänotyp führt

Das *NBS1*-Gen wird aus DNA von Patienten mit Verdacht auf NBS sequenziert. In manchen Fällen wird jedoch in dem *NBS1*-Gen keine Mutation gefunden, also handelt es sich in diesem Fall um die Mutation eines anderen noch unbekanntens Gens, „*NBS2*“, jedoch mit ähnlichen klinischen Folgen. Der Stammbaum in Abb. 5 zeigt eine solche Familie (M).



**Abb. 5: Stammbaum der Familie M mit der Patientin (B-4523) und ihrer Cousine MD.** Die prospektiv autosomal rezessive Erkrankung tritt höchstwahrscheinlich durch konsanguine Heirat in der 7. Generation auf.

Die Patientin (B-4523) wies viele Zeichen des Nijmegen-Breakage-Syndrom auf, sie hatte ein Geburtsgewicht von 3000 g, sowie eine Geburtsgröße von 48 cm. Im Verlauf ihrer Entwicklung kam es zur Mikrozephalie, Wachstumsretardierung und wiederholten respiratorischen Infektionen, die Menarche blieb aus, sie starb mit 22 Jahren an einem Lymphom. In derselben Familie starb ein älterer Bruder mit 6 Monaten. Er wies ebenfalls eine Mikrozephalie, Wachstumsretardierung, sowie Bronchopneumonien auf.

Des Weiteren war eine Cousine (MD) ebenfalls betroffen und wies ähnliche Symptome, wie die zuvor bei der beschriebenen Patientin (4523), auf. Da die Eltern und Großeltern untereinander verwandt sind, ist davon auszugehen, dass die betroffenen Kinder (4523, MD) einen identischen Chromosomenabschnitt, in dem das mutierte Gen vorkommt, von den Eltern bzw. den Großeltern geerbt haben.

### **1.5 Zielsetzung**

Das Ziel dieser Arbeit ist, das zelluläre Krankheitsbild dieser NBS-ähnlichen Erkrankung genauer zu definieren und möglicherweise die Ursachen für ein neues Chromosomeninstabilitätssyndrom zu finden.

#### **1.5.1 Chromosomenbruchanalyse**

Da von der Patientin (B-4523) durch Immortalisierung mit dem Epstein-Barr-Virus eine B-Zelllinie (LCL) etabliert worden ist, wird durch die Chromosomenanalyse versucht werden, eine möglicherweise erhöhte spontane und/oder induzierbare Chromosomenbrüchigkeit nachzuweisen. Für diesen Versuch werden Kontrollzelllinien von gesunden als auch von erkrankten Patienten, Fanconi- (FANCC), NBS- (657del5) und Ataxia telangiectasia-Patienten (ATM), mit den Patientenzellen (B-4523) in ihrer Brüchigkeit verglichen.

#### **1.5.2 Proteinbiochemische Analyse**

Ein weiteres Versuchsfeld beinhaltet die proteinbiochemische Analyse. Dabei werden die Patientenzellen (LCLs) auf mehrere End- bzw. Zwischenprodukte im Netzwerk der Proteine untersucht, die für die Aufrechterhaltung der genomischen Integrität und die der DNA-Reparatur von Bedeutung sind. Es werden spezifische Proteine aus diesem Netzwerk (siehe Abb. 3) im Western Blot auf ihr Vorhandensein bzw. ihre Funktion hin untersucht. Auch hier wird die Patientin (B-4523) gesunden bzw. erkrankten Kontrollen (ATM/FANCC) gegenübergestellt, um direkte Unterschiede deutlich zu machen.

Die Ergebnisse dieser Analysen fließen in die Auswahl der zu untersuchenden Kandidaten-Gene ein, dienen aber unabhängig von der Identifizierung des zugrunde liegenden Gens der molekularen Charakterisierung des zellulären Defektes in diesen Patienten (B-4523 und MD).

### **1.5.3 Familienkopplungsanalyse**

Am Max-Delbrück-Zentrum wurde bereits ein „Homozygosity-Mapping“ mittels sog. SNP's („Single Nucleotide Polymorphismen“) durchgeführt. Ein besonders viel versprechender chromosomaler Bereich für die Lokalisation des in der Familie mutierten Gens liegt auf Chromosom 12 vor.

Zunächst soll durch die Analyse von einigen weiteren Markern in dieser Familie versucht werden, den kritischen Bereich von ~ 22 cM, in welchem ca. 400 Gene liegen, weiter einzuengen. Hierzu werden Polymerase-Ketten-Reaktionen (PCR) mit entsprechenden Primern für Mikrosatelliten-Marker durchgeführt und die Produkte durch Sequenzierungen näher analysiert. Aufgrund der multiplen Allelie haben Mikrosatelliten eine höhere Informativität und es ist zu erwarten, dass die Grenzen des fraglichen Bereiches eingengt werden können.

Der neue kritische und verkleinerte Bereich wird anschließend auf sog. „Kandidatengene“ hin abgesucht. Mit dem Begriff „Kandidaten-Gene“ sind solche Gene gemeint, deren Funktionen mit dem Phänotyp der Betroffenen in Einklang zu bringen ist: Sämtliche Gene der DNA-Reparatur und Zellzyklus-Kontrolle im weitesten Sinne kommen hierfür in Frage.

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Zelllinien

**Tab. 1: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien und deren Transformationsort**

LCL-Linien <sup>†)</sup>	Ort der Transformation
B - 4523-Patientin	Institut für Humangenetik, Universität Würzburg
520-Kontrolle	Institut für Humangenetik, Charité Universitätsmedizin Berlin
1095-Kontrolle	Institut für Humangenetik, Charité Universitätsmedizin Berlin
L6-ATM	Tel Aviv University, Israel
95P558-NBS	Institut für Humangenetik, Charité Universitätsmedizin Berlin
HSC 72-FANCC	Hospital For Sick Children, Toronto
96P126-wt/657del	Institut für Humangenetik, Charité Universitätsmedizin Berlin

<sup>†)</sup> Epstein-Barr-Virus (EBV) transformierte B-Lymphozyten, sog. lymphoblastoide Zellen

#### 2.1.2 Zellkulturmedien

**Tab. 2: Übersicht über die verwendeten Zellkulturmedien, deren Zusätzen und Herstellern**

Medium/Zusatzstoff	Hersteller
RPMI 1640 (mit Glutamin)	PAA Laboratories GmbH
Penicillin/Streptomycin (100x) <sup>†)</sup>	PAA Laboratories GmbH
Fetales Kälberserum (FKS) <sup>**)</sup>	Gibco BRL GmbH

<sup>†)</sup> 5 ml (10.000 U/10mg/ml) auf 500 ml Zellkulturmedium

<sup>\*\*)</sup> 50ml auf 500ml Zellkulturmedium

#### 2.1.3 Patienten-DNA

**Tab. 3: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten DNAs und deren Verwandtschaftsverhältnisse zueinander**

DNA-Linie	Verwandtschaftsverhältnisse zur Patientin
B - 4519	Gesunder Bruder
B - 4521	Gesunder Bruder
B - 4523	Betroffene
B - 4524	Gesunder Vater
B - 4525	Gesunde Mutter
MD	Erkrankte Cousine der Betroffenen

## 2.1.4 Antikörper

### 2.1.4.1 Primäre Antikörper

Tab. 4: Übersicht über die primären Antikörper, Katalog-Nr., Hersteller, Klonalität und Epitop

Antikörper	Katalog Nr.	Hersteller	Klonalität	Epitop
Anti-p95	ab398	abcam	Rabbit polyclonal	As 395 – 742
Anti-ATM	ab78	Abcam	Mouse monoclonal	As 2577 - 3056
Anti-ATM	#100-678	Novus Biol.	Rabbit polyclonal	As 2550 - 2600
Anti-phospho-ATM	#200.301.400	Rockland	Mouse monoclonal	S1981
Anti-SMC1	ab9262	abcam	Rabbit polyclonal	letzten 100 As
Anti-phospho-SMC1	#4805	Cell Signaling	Mouse monoclonal	Ser 957
Anti-p53	sc-6243	Santa Cruz	Rabbit polyclonal	As 1 – 393
Anti-phospho-p53	#9284	Cell Signaling	Rabbit polyclonal	Ser 15
Anti-FANCD <sub>2</sub>	ab2187	abcam	Rabbit polyclonal	Fusionsprotein
Anti-beta Actin	ab8227	abcam	Rabbit polyclonal	As 1 – 100
Anti-alpha Tubulin	ab7291	abcam	Mouse monoclonal	As 426 – 450
Anti-CHK2, clone 7	05-649	upstate	Mouse monoclonal	As 1 – 223 (NT) As 217 – 543 (CT)
Anti-Cip1, clone CP74 (p21)	05-655	upstate	Mouse monoclonal	As 1 – 80

### 2.1.4.2 Sekundäre Antikörper

Tab. 5: Übersicht über die sekundären Antikörper, deren Katalog-Nr. und Hersteller

Antikörper	Katalog Nr.	Hersteller
Anti-mouse IgG <sup>HRP</sup>	NXA931	Amersham Biosciences
Anti-rabbit IgG <sup>HRP</sup>	NA934V	Amersham Biosciences

## 2.1.5 Enzyme

Tab. 6: Übersicht über die verwendeten Enzyme, Konzentration und Hersteller

Enzym	Konzentration	Hersteller
Exonuclease I	20 U/μl	New England BioLabs
Reverse Transcriptase M-MLV	200 U/μl	Invitrogen
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)	1 U/μl	Roche
Taq-DNA-Polymerase I	5 U/μl	FIREPol

### 2.1.6 Kits

Tab. 7: Übersicht über die verwendeten Kits und deren Hersteller

Kit	Hersteller
DyeEx Spin Kit	Qiagen
ECL Western Blotting Detection Kit	Amersham Biosciences
GenomiPhi Amplification Kit	Amersham Biosciences
Lambda Protein Phosphatase ( $\lambda$ -PPase)	New England BioLabs
Montage PCR (Reinigungskit)	Millipore Corp.
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen

### 2.1.7 Primer

#### 2.1.7.1 Primer für Mikrosatelliten

Tab. 8: Übersicht über die verwendeten Mikrosatelliten-Primer, deren Sequenz und der Annealing-Temperatur

Name	Sequenz	Ann.-Temp.
FAM.M13	5'-CGACGTTGTA AACGACGGCCAGT-3'	
D12S1663_M13_F	5'-CGACGTTGTA AACGACGGCCAGTGCCCATGATACTAAGTGAGAAATAC-3'	55°C
D12S1663_R	5'-GTAAACGTGAAACAATCCTAAGA-3'	55°C
D12S1701_M13_F	5'-CGACGTTGTA AACGACGGCCAGTTCAAGANCTCAATTCCATTA-3'	50°C
D12S1701_R	5'-CTTGGTTAAATGTATTCCCG-3'	50°C
D12S1620_M13_F	5'-CGACGTTGTA AACGACGGCCAGTCAGGAAGTCGAGGCTGTAGT-3'	55°C
D12S1620_R	5'-AGCTAAAATGTGATAAAAGTCTGTT-3'	55°C
D12S1661_M13_F	5'-CGACGTTGTA AACGACGGCCAGTATCCAAAGGTGCAGAGTG-3'	55°C
D12S1661_R	5'-CAGTTGGTCTTATTACAGTAACCAG-3'	55°C
D12S1635_M13_F	5'-CGACGTTGTA AACGACGGCCAGTGTTCTGGCCTACTTTTTGCT-3'	50°C
D12S1635_R	5'-TGTTGGTTAGGTGCAGGTAT-3'	50°C
D12S368_M13_F	5'-CGACGTTGTA AACGACGGCCAGTGCAACACCTTTGTGATGAAAAT-3'	50°C
D12S368_R	5'-AGTCTGCACAGCCTGTCC-3'	50°C
D12S1724_M13_F	5'-CGACGTTGTA AACGACGGCCAGTCTCTGGAGGCTGAGGTGG-3'	55°C
D12S1724_R	5'-ATCCGTGCTGGTTCTATCTGTGTA-3'	55°C
D12S83_M13_F	5'-CGACGTTGTA AACGACGGCCAGTTTTTTGGAAGTCTATCAATTTGA-3'	47°C
D12S83_R	5'-TAGCAGAGAAAGCCAATTCA-3'	47°C
D12S1610_M13_F	5'-CGACGTTGTA AACGACGGCCAGTTCCTGGGGGATAGAATGAG-3'	50°C
D12S1610_R	5'-GACACCTTGATTTGGGCTT-3'	50°C
D12S1686_M13_F	5'-CGACGTTGTA AACGACGGCCAGTGAATTGCTTGACCCCG-3'	55°C
D12S1686_R	5'-GCCACTATCCTGACGACTAA-3'	55°C

2.1.7.2 Primer für cDNA-PCR

Tab. 9: Übersicht über die verwendeten cDNA-PCR-Primer, deren Sequenz und der Annealing-Temperatur

Gen	Primer-Name	Primer-Sequenz <sup>*)</sup>	Ann.-Temp.
<b>KUB3</b>	KUB3_F1	5' TGAGCCAGGAGGAAGCAG 3'	50°C
	KUB3_R1	5' TCGACATGGGCACGACAA 3'	50°C
	KUB3_F2	5' CGAGCTTATTCATGCATT 3'	50°C
	KUB3_R2	5' CTTCATGATGATGGAAGC 3'	50°C
<b>CDK4</b>	CDK4_F1	5' GGCCGTAGGAACCGGCTC 3'	53°C
	CDK4_R1	5' GGCCAGGCCAAAGTCAGC 3'	53°C
	CDK4_F2	5' GATCTGAAGCCAGAGAAC 3'	50°C
	CDK4_R2	5' CTCCATAGCCTCAGAGAT 3'	50°C
<b>DDIT3</b>	DDIT3_F	5' TCAGAGCTGGAACCTGAG 3'	53°C
	DDIT3_R	5' TGGGAAAGGTGGGTAGTG 3'	53°C
<b>SMUG1</b>	SMUG1_F1	5' CTGCAGTGCCTGTCATGT 3'	50°C
	SMUG1_R1	5' GCAGCTCAGCAGGAGTAA 3'	50°C
	SMUG1_R2	5' ACAGCCTGAGGTCTTCTT 3'	53°C
	SMUG1_R2	5' GCAGGTTGGAAGACAGTT 3'	53°C
<b>CDK2</b>	CDK2_F1	5' GGTATACTGCGTTCCATCC 3'	50°C
	CDK2_R1	5' AAGCTCTGGCTAGTCCAA 3'	50°C
	CDK2_F2	5' GTCCTCCACCGAGACCTTA 3'	50°C
	CDK2_R2	5' AAGGCCAAGCCTGGTCAA 3'	50°C
<b>RBMS2</b>	RBMS2_F1	5' TCTCGCTCGTTCCTAA 3'	46°C
	RBMS2_R1	5' AAGTGGGTGATGATGGC 3'	46°C
	RBMS2_F2	5' TGGAGTCCACAGAGAAG 3'	55°C
	RBMS2_F2.2	5' CGTATCCTTCGAGATACC 3'	55°C
	RBMS2_R2	5' AATCTGGGAGCATGAGT 3'	55°C
<b>PA2G4</b>	PA2G4_F1	5' TGGGAAGGGAGACAGAG 3'	55°C
	PA2G4_R1	5' CAACTGGTGTGACAGCA 3'	55°C
	PA2G4_F2	5' TGCACGCCAATAGAAGG 3'	55°C
	PA2G4_R2	5' TTTGGTGGGAAGGGGAT 3'	55°C
<b>DDX23</b>	DDX23_F1	5' TGTTTCATCTCCGCGACCAGG 3'	55°C
	DDX23_R1	5' TTGGCCAGAAGCTCCTCCAG 3'	55°C
	DDX23_F2	5' ATCTCGGAAGGACAGAGACT 3'	55°C
	DDX23_R2	5' CCGGTCATTGAGATGTCTCG 3'	55°C
	DDX23_F3	5' GCGCCGAACGAGACATCTCA 3'	55°C
	DDX23_R3	5' CTGTCTTGCCACTGCCAGTC 3'	55°C
	DDX23_F4	5' TGTGGCTGAGACTGGCAGTG 3'	55°C
	DDX23_R4	5' TGGTGGCCGTGAACATGACT 3'	55°C
	DDX23_F5	5' TGAGAAGATGCTGGCCAAC 3'	55°C
	DDX23_R5	5' GCCAATGCGGTGGATGTAAT 3'	55°C
	DDX23_F6	5' AGATGTGGCTGGTCGTGGTA 3'	55°C
	DDX23_R6	5' GACAGCGTCGTCCTCTCCTT 3'	55°C

<sup>\*)</sup> Primer-Konstruktion anhand der Referenz mRNA des jeweiligen Gens

## 2.1.8 Lösungen und Puffer

Tab. 10: Übersicht über die verwendeten Lösungen und Puffer und deren Zusammensetzung

Lösung / Puffer	Zusammensetzung
Fixativ	75 % Methanol, 25 % Essigsäure
Giemsa-Färbelösung (5 %ig)	5 % Giemsa, 10 % 10x Giemsa-Puffer
Ladepuffer A	20 % Ficoll 400, 5 mM EDTA, 0,05 % Bromphenolblau
Laufpuffer für Bis-Tris-Gele	1/20 Volumen MOPS SDS Running Buffer (20x), 0,25 % Antioxidant
Laufpuffer für Tris-Acetat Gele	1/20 Volumen Novex Running Buffer (20x), 0,25 % Antioxidant
Lysepuffer	2 M Tris (pH 7,5) 5 M NaCl 0,5 M EDTA (pH 8,0) 10 % Triton X100 Proteasehemmer
PCR-Puffer (10x)	100 mM Tris (pH 8,5), 500 mM KCl, 30 mM MgCl <sub>2</sub>
Präzipitations-Mix	30 mM NaAc (pH 5,3), 8 µM EDTA, gelöst in EtOH abs.
Stripping Buffer	110 mM Mercaptoethanol, 2 % SDS, 62 mM Tris (pH 6,7)
TBE-Laufpuffer (10x)	900 mM Tris, 900 mM Borsäure, 40 mM EDTA
TBS-T Waschpuffer	20 mM Tris (pH 7,6), 137 mM NaCl, 0,1 % Tween 20
Transferpuffer	1/20 Volumen NuPage Transfer Buffer (20x), 10 % Methanol, 0,25 % Antioxidant

## 2.1.9 Chemikalien und Reagenzien

Tab. 11: Übersicht über die verwendeten Chemikalien und Reagenzien und deren Hersteller

Substanz	Hersteller
Agarose	SERVA Electrophoresis GmbH
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Colcemid	PAA Laboratories GmbH
Complete Mini	Roche Diagnostics GmbH
dNTPs	Rapidozym
Dynabeads Protein G	Dynal Biotech ASA/Invitrogen
EDTA	Merck
Entellan	Merck
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	SERVA Electrophoresis GmbH
HCl	Merck
Hexamere	Amersham Biosciences
Magermilchpulver Sucofin	TSI GmbH
Mercaptoethanol	Merck
Methanol	J. T. Baker
MgCl	Merck
Mitomycin C	Fluka
NuPAGE Antioxidant	Invitrogen
NuPAGE LDS Sample Buffer (4x)	Invitrogen
NuPAGE MOPS SDS Running Buffer (20x)	Invitrogen
NuPAGE Sample Reducing Agent (10x)	Invitrogen
NuPAGE Transfer Buffer (20x)	Invitrogen
NuPAGE Tris-Acetat SDS Running Buffer (20x)	Invitrogen
PBS	PAN Biotech GmbH
Ponceau S	Fluka
Rainbow-Marker RPN800	Amersham Biosciences
Roti®-Block	Carl Roth GmbH
Tris	Merck
Tween 20	Sigma Aldrich Chemie GmbH

## 2.1.10 Verbrauchsmaterialien

**Tab. 12: Übersicht über die verwendeten Verbrauchsmaterialien und deren Hersteller**

Material	Hersteller
BD Plastipak™ (1 ml 0,3x13 mm)	Becton Dickinson
Blue-Caps (15/50 ml)	Falcon
Deckgläser (60 x 24 mM)	Menzel-Gläser
FACS-Röhrchen (5 ml)	Falcon
Gel-Blotting-Filterpapier	Schleicher & Schuell
Gewebezuchtflaschen (50/250 ml)	Falcon
Hybond-ECL Nitrozellulose Membran	Amersham Biosciences
NuPAGE Novex Bis-Tris Gel; 4-12%; 1,0 mm x 10 well	Invitrogen
NuPAGE Novex Tris-Acetat Gel; 3-8%; 1,0 mm x 15 well	Invitrogen
NuPAGE Novex Tris-Acetat Gel; 7%; 1,0 mm x 10 well	Invitrogen
Objektträger (76 x 26 mM)	R. Langebenbrinck
PCR Tubes ( 0,2 ml)	Biozym
Pipettenspitzen	Sarstedt
PS-Röhrchen (14 ml)	Falcon
Reaktionsgefäße (0,5/1,5/2,0 ml)	Sarstedt
Sterilpipetten (5/10/25 ml)	Falcon
Transferpipetten (2,5 ml) steril/ unsteril	Sarstedt
Well Plate 96er	Applied Biosystems
X-OMAT UV-Filme/ Entwickler/ Fixierer	Kodak

## 2.1.11 Programme und Datenbanken

**Tab. 13: Übersicht über die verwendeten Programme und Datenbanken, deren Homepage oder Hersteller und der Verwendung**

Programm / Datenbank	Homepage / Hersteller	Verwendung
BLAST (NCBI)	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/</a>	Sequenzanalyse/-Vergleich
Clone Manager 6	Sci Ed Central	Primer Design
Gene Cards	<a href="http://www.genecards.org/">http://www.genecards.org/</a>	Kandidatengensuche
MapView	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/</a>	Kandidatengensuche
SeqMan™II	DNASTAR Inc.	Sequenzanalyse/-Vergleich
Sequenz-Analyse	Applied Bioscience	Sequenzauswertung

## 2.1.12 Geräte und Zubehör

Tab. 14: Übersicht über die verwendeten Geräte und Zubehör und deren Hersteller

Gerät / Zubehör	Hersteller
ABI Sequenzer 3100/3730	Applied Biosystems
Brutschrank	Heraeus
Feinwaage	Sartorius
Gelelektrophoresekammer	PEQLAB
Laminairflow-Werkbank	Heraeus
Magnetrührer	IKA Labortechnik
Magnetständer PL-MCS12	Varian
Mikropipetten	Gilson/Eppendorf
Mikroskop	Zeiss
Mixer Vortex Genie 2	Scientific Industries
Partikelzähler	Beckmann-Coulter
pH-Meter	Mettler Toledo
Pipettierhilfe	Integra Biosciences
Rotationsgerät RM5	CAT
Schüttler	IKA Labortechnik
Spannungsgeräte	Gibco
Thermocycler	Applied Biosystems
Thermomixer	Eppendorf
Wasserbad	Th. Karow GmbH
XCell II™ Blot Module	Invitrogen
XCell SureLock™ Mini-Cell	Invitrogen
Zentrifugen	Heraeus/Kendro

### 2.2 Methoden

#### 2.2.1 Zellkultur

##### 2.2.1.1 Allgemeine Bedingungen

Alle Schritte der Zellkultivierung wurden unter sterilen Bedingungen mit sterilen Medien, Lösungen und Materialien unter einer Laminairflow-Werkbank durchgeführt, um so eine Kontamination mit Pilzen und Bakterien zu vermeiden. Die Zellkulturen wurden in Gewebezuchtflaschen bei 37 °C mit 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert.

##### 2.2.1.2 Zellkultivierung

Die in Einfriermedium gelagerten Zellen wurden zunächst aus dem Stickstofftank (-180 °C) entnommen und aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen in 9 ml Kulturmedium überführt und für 10 min. bei 800 rpm (Fa. Heraeus Megafuge 2.0) sedimentiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 5 ml frischem Kulturmedium resuspendiert, in eine Gewebezuchtflasche (50 ml) überführt und im Brutschrank inkubiert. Je nach Wachstum der Zellen wurde das verbrauchte Kulturmedium, zu erkennen am Farbumschlag des Mediums durch einen pH-Indikator von rot nach gelb, abgenommen und durch neues Medium ersetzt.

##### 2.2.1.3 Zellzahlbestimmung

Für die Zellzahlbestimmung wurde 200 µl Zellsuspension in 10 ml Isoton-Lösung von Beckmann-Coulter gegeben. Die Konzentration der lymphoblastoiden Zellen wurde dann automatisch mit Hilfe des Partikelzählers der Firma Beckmann-Coulter bestimmt.

#### 2.2.2 Zellbiologische Methoden

##### 2.2.2.1 Induzierte Chromosomenschädigung

Es wurden zwei Arten von induzierten Chromosomenschädigungen an den lymphoblastoiden Zellen (LCL) durchgeführt. Vor der Behandlung der sechs Zelllinien wurden diese jeweils sechs Mal in je  $2 \times 10^5$  Zellen/ml auf 5 ml ( $1 \times 10^6$  Zellen) in Gewebezuchtflaschen (50 ml) ausplattiert.

Als erstes erfolgte die Behandlung mit dem Zytostatikum Mitomycin C (MMC). Hierfür wurden jeweils zwei der sechs Flaschen pro Zelllinie eingesetzt. Jeweils eine der Flaschen wurde mit 40 ng/ml bzw. 80 ng/ml Mitomycin C versetzt und 24 h bei 37 °C weiterkultiviert. Drei Stunden vor Ablauf der 24 h wurden drei der sechs Flaschen pro Zelllinie mit Röntgenstrahlung behandelt. Die LCLs wurden jeweils einer Strahlendosis von einem, zwei bzw. vier Gray (Gy) ausgesetzt. Nach Ablauf der 24 h wurden nun die 30 behandelten (MMC/Gy) und die restlichen sechs unbehandelten Flaschen aufgearbeitet.

### 2.2.2.2 Chromosomenaufarbeitung

Um die Zellen in der Metaphase zu arretieren, wurden jeweils 30 µl Colcemid (10 µg/ml) hinzugegeben und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Es folgte eine Überführung der Zellsuspension in ein Spitzbodenröhrchen mit anschließender Zentrifugation. Alle Zentrifugationsschritte in diesem Abschnitt wurden für 10 min. bei 1000 rpm (Fa. Heraeus Megafuge 2.0) durchgeführt. Der Überstand wurde bis auf 1 ml abgenommen, die Zellen in 8 ml vorgewärmten 0,4 %igen KCl resuspendiert und für 20 min. bei 37 °C inkubiert, was dem Aufquellen der Zellen diente. Nach erneuter Zentrifugation und Abnahme des Überstandes wurden die Zellen wiederum resuspendiert. Für die Fixierung der Chromosomen wurden die Röhrchen schräg gestellt, 5 ml des zuvor frisch hergestellten Fixativ (3:1 Methanol/Essigsäure) tropfenweise zugegeben und 5 min bei 4 °C stehen gelassen. Erneut wurden die Zellsuspensionen noch einmal fixiert und über Nacht im Gefrierschrank bei –20 °C stehen gelassen. Am folgenden Tag erfolgten zwei weitere Fixierungen mit Fixativ. Nach dem vierten Durchgang wurde wieder zentrifugiert, der Überstand bis auf ca. 0,5 ml abgenommen und die Zellen gut resuspendiert. Nun konnten ca. 2 - 3 Tropfen der Zellsuspension aus einiger Distanz auf einen Objektträger aufgetropft und mit einer Heizplatte, welche mit einem feuchtem Tuch bedeckt war, schnell getrocknet werden. Das feuchte Tuch wurde verwendet, um eine hohe Luftfeuchtigkeit zu erreichen. Für die Färbung wurden die Objektträger für 10 min. in Giemsa-Färbelösung getaucht und mit Wasser gründlich abgespült und luftgetrocknet. Abschließend wurde das Präparat mit einem Deckglas und etwas Eindeckmittel (Entellan®) versiegelt. Nach dem Trocknen des Eindeckmittels erfolgte eine Verschlüsselung der Präparate durch eine Mitarbeiterin des Labors. Anschließend konnten die Präparate unter einem Lichtmikroskop mit einem

100er Objektiv ausgewertet werden. Die Positionen der analysierten Metaphasen auf dem Objektträger wurden mit einem Mikropositionierer festgehalten.

### **2.2.2.3 Chromosomenauswertung**

Für die Chromosomenauswertung wurde der Anteil an aberranten Mitosen, sowie die Bruchrate pro Mitose errechnet. Dafür wurden je nach Versuch 2 x 25 bzw. 50 Metaphasen pro Objektträger ausgewertet. Dies erfolgte in einer blinden Auswertung an zuvor kodierten Präparaten.

Die Aufteilung der Metaphasechromosomen erfolgte in normale Metaphasen, d. h. Mitosen ohne Chromosomenveränderungen, sowie in geschädigte Metaphasen. Es wurden die folgenden Chromosomenschädigungen unterschieden: Chromatidbrüche, Translokationen, wozu tri- und quadriradiale Austauschfiguren zählen, Ringchromosomen, di- und azentrische Chromosomen.

## **2.2.3 Proteinbiochemische Methoden**

### **2.2.3.1 Zellbestrahlung**

Um das Verhalten der Zellen nach einer DNA-Schädigung beurteilen zu können, wurden diese mittels einer Röntgenröhre (50 KV Röntgenanlage, R. Seifert & Co, Hamburg) einer vorher festgesetzten Menge an Röntgenstrahlung (10 Gy bzw. 12 Gy) ausgesetzt. Durch die Bestrahlung wurden die Zellen bzw. deren DNA geschädigt, was eine Aktivierung der Zellreparaturproteine bedingte. Abhängig vom Beginn der Proteinextraktion hatten die Zellen mehr oder weniger Zeit, die entsprechenden Proteine zu exprimieren.

Zunächst wurden jeweils zwei Gewebezuchtflaschen (50 ml) mit  $4 \times 10^6$  Zellen (ad 8 ml mit Zellkulturmedium) pro Zelllinie ausplattiert. Bei der ersten Flasche handelte es sich um den späteren Null- bzw. Vergleichswert. Die zweite Flasche wurde wärmeisoliert in die Radiologie zum Bestrahlen transportiert. Nach der Bestrahlung inkubierte man die LCLs für eine Stunde bzw. für drei oder sechs Stunden im Brutschrank, bevor man zur Proteinextraktion übergehen konnte.

### 2.2.3.2 Proteinextraktion

Für die Proteinextraktion aus LCLs wurden zunächst  $1 \times 10^6$  Zellen geerntet, in ein 15 ml Blue Cap überführt und für 10 min. bei 1000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 5 ml PBS gewaschen (Zentrifugation 10 min./1000 rpm). Wieder wurde der Überstand abgenommen, das Pellet in 1 ml PBS resuspendiert und in ein Reaktionsgefäß überführt und 2 min. bei 6000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde gut abgenommen, das Pellet in 50  $\mu$ l PBS resuspendiert und 50  $\mu$ l 2-fach Sample Buffer (mit PBS verdünnter 4-fach LDS Sample Buffer der Firma Invitrogen) hinzu gegeben. Die Suspension wurde für 5 min. bei 100 °C im Wasserbad erhitzt und anschließend auf Eis gestellt. Um die hochmolekulare DNA zu scheren, wurde die Suspension mit einer feinen Kanüle (0,3 mm x 13 mm) ca. zehn Mal aufgesaugt und wieder herausgedrückt, bis eine homogene Lösung entstanden ist, welche dann für 90 sek. im Ultraschallbad mit Eis und Wasser sonifiziert wurde. Die Lagerung des fertigen Proteinlysats erfolgte bei – 80 °C.

### 2.2.3.3 Phosphatase-Behandlung

Ein Teil der bestrahlten Proteine wurde, bevor sie im Western Blot eingesetzt wurden, mit Hilfe einer Phosphatase behandelt. Dadurch wurden die Phosphatgruppen, welche sich durch die Bestrahlung ATM-abhängig an die Proteine gebunden haben, wieder entfernt. Durch dieses Verfahren konnte bestätigt werden, dass es sich dabei spezifisch um eine Phosphorylierung handelte.

Jeweils nur eine der zwei bestrahlten Proben wurde nach folgendem Ansatz pipetiert und für 2 h bei 30 °C inkubiert:

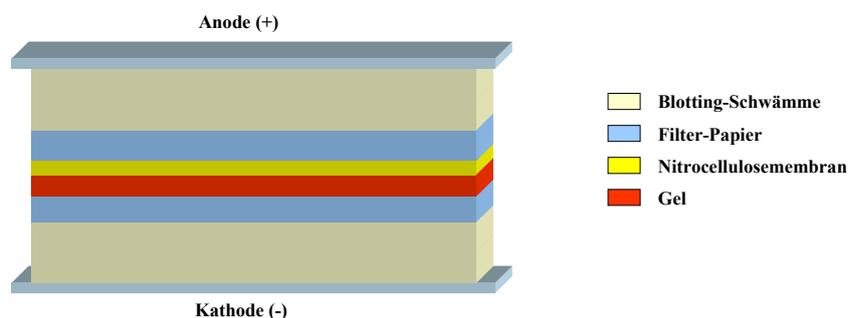
Ansatz	Menge
10-fach Phosphatase Puffer	1 $\mu$ l
10-fach $MnCl_2$	1 $\mu$ l
Lambda Protein Phosphatase	1 $\mu$ l
Proteinlysats	10 $\mu$ l

### 2.2.3.4 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation (IP) wird genutzt, um Proteine aus einem Proteinlysat mittels spezifischer Antikörper zu präzipitieren. Die eingesetzten Antikörper bilden mit den Antigenen sog. Immunkomplexe. Diese Komplexe können aus der Lösung z. B. durch den Zusatz von Protein G-gekoppelter Magnetbeads präzipitiert werden. Im Western Blot können dann die präzipitierten Proteine nachgewiesen werden. Für die IP wurden insgesamt vier Ansätze je Zelllinie (520, B-4523, 95P558) mit je  $1 \times 10^7$  Zellen pro Ansatz benötigt. Bei dem ersten Ansatz handelte es sich um den späteren Nullwert. Die übrigen drei Ansätze wurden einer Strahlendosis von 0,5 Gy, 1 Gy und 2 Gy ausgesetzt. Die Aufarbeitung der Zellen für die IP erfolgte nach einer Inkubation von 45 min. bei 37 °C. Hierfür wurden die Zellen geerntet, überführt und für 10 min. bei 1000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in je 1 ml PBS resuspendiert und in ein Reaktionsgefäß überführt. Es folgten zwei Waschschrirte mit je 1 ml PBS für 4 min. bei 6000 rpm. Nun konnte das Pellet mit 600 µl Lysepuffer resuspendiert und für 40 min. bei 4 °C auf dem Roller inkubiert werden. Nach erneuter Zentrifugation für 5 min. bei 13000 rpm erfolgte die Abtrennung der Zelltrümmer. Der proteinhaltigem Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe des Antikörpers (3 µl Anti-ATM, Fa. Novus Biologicals) erfolgte eine erneute Inkubation für 2 h 15 min. bei 4 °C. Nach dreimaligem waschen der Dynabeads mit je 1 ml PBS erfolgte die Zugabe von 25 µl Dynabeads zur Protein-Antikörper-Lösung. Der Ansatz wurde bei 4 °C über Nacht auf dem Roller inkubiert. Es folgten drei Waschschrirte mit je 800 µl Lysepuffer im Magnetständer. Im Anschluss erfolgte die Aufnahme der Dynabeads in 1 ml Lysepuffer und die Überführung in ein neues Reaktionsgefäß. Wieder wurde der Überstand im Magnetständer abgenommen und die Beads in 10 µl 1,1 fachen LDS-Ladepuffer vorsichtig vermischt. Die Trennung der Magnetbeads von den Proteinkomplexen erfolgte nach dem Kochen für 4 min. im Wasserbad und der anschließenden Überführung des Überstandes im Magnetständer in ein neues Reaktionsgefäß.

### 2.2.3.5 Western Blot

Bei dieser Methode werden die zuvor extrahierten Proteine durch eine Gelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt und nach einem Geltransfer auf einer Trägermembran aus Nitrocellulose selektiv durch Antigen-Antikörper-Reaktion nachgewiesen. Bei den hier durchgeführten Western Blots wurden die fertigen Gele und Puffer, sowie das Elektrophoresesystem mit dem Gel Blot Modul der Firma Invitrogen verwendet. Für die Gelelektrophorese wurden 10 µl Proteinlysate je Probe eingesetzt. Vorher jedoch erhielten sie einen Zusatz von 1,1 µl (bzw. 1,4 µl bei den mit Phosphatase behandelten Proteinen) Reducing Agent. Dadurch wurden die kovalenten Disulfidbrücken gespalten, was die Sekundärstruktur aufhebt. Die Proben wurden nun für 5 min. bei 70 °C im Heizblock denaturiert. Neben den Proben wurde auch ein Proteinstandard von 5 µl direkt pro Gel eingesetzt. Dieser Marker ermöglichte eine genauere Größenbestimmung der zu analysierenden Proteine. Der Proteintransfer erfolgte im Tank-Blot-Verfahren. Dafür konnte nun die Gelkammer aufgebaut, das Gel geladen und der Laufpuffer, je nach genutztem Gel, hinzu gegeben werden. Das Netzgerät wurde auf folgende Werte über eine Dauer von 90 - 240 min., je nach gewünschter Auftrennung, eingestellt: Spannung 110 V, Stromstärke 400 mA, Leistung 100 W. Währenddessen wurde die Nitrocellulosemembran, die Schwämme und das Blotting Papier im Transferpuffer getränkt. Nach ausreichender Auftrennung der Proteine wurde das Transfer-Modul wie folgt zwischen Anode und Kathode der Kammer aufgebaut: Zwei Schwämme, Filterpapier, Nitrocellulosemembran, Gel, Filterpapier und wieder zwei Schwämme (Abb. 6).



**Abb. 6:** Schematische Darstellung des Proteintransfers in der XCell SureLock™ Mini-Cell Kammer nach dem Tank-Blot-Verfahren.

Dabei war es wichtig, dass sich zwischen Membran und Gel keine Luftblasen befanden. Anschließend wurde die Kammer mit Transferpuffer aufgefüllt. Die Proteine wurden aus dem Gel mit den folgende Werten am Netzgerät für 90 min. auf die Nitrocellulosemembran übertragen: Spannung 30 V, Stromstärke 400 mA, Leistung 10 W. Nach Ablauf der Zeit konnten die Proteine auf der Nitrocellulosemembran mit Ponceau S reversibel angefärbt und überprüft werden. Nach dieser Kontrolle wurde die Membran mit einer Blocklösung (über Nacht bei 4 °C rollern) abgesättigt. Dies hatte zur Folge, dass unspezifische Antikörperbindungsstellen auf der Membran blockiert wurden. Je nach Primärantikörper wurden drei unterschiedliche Blocklösungen (10 %iges Magermilchpulver, 10 %iges BSA und 1-fach Roti-Block®), welche in TBS-T Waschpuffer angesetzt wurden, verwendet.

### 2.2.3.6 Immundetektion

Die Immundetektion wurde zum Nachweis von ausgewählten DNA-Reparatur-Proteinen benutzt. Hierfür wurde die über Nacht einwirkende Blocklösung durch einen Primärantikörper in der entsprechenden Verdünnung ersetzt. Es erfolgte die Inkubation über Nacht bei 4 °C bzw. bei Raumtemperatur für 1 - 2 Stunden (Tab. 15). Durch 3 x 10 min. waschen mit TBS-T Waschpuffer wurden nicht gebundene Reste des primären Antikörpers entfernt. Es folgte die Inkubation des Sekundärantikörpers (Anti-mouse<sup>HRP</sup> oder Anti-rabbit<sup>HRP</sup>), welche mit Meerrettich Peroxidase („Horseradish peroxidase“; HRP) konjugiert war, in einer Verdünnung von 1:1000 in der entsprechenden Blocklösung für eine Stunde bei Raumtemperatur. Diesmal wurde die Membran 5 x 10 min. mit dem Waschpuffer gewaschen bevor die Inkubation mit dem ECL Western Blotting Detection Kit für 1 min. erfolgte. Durch die Belichtung eines Röntgenfilms für einige Sekunden bis Minuten in einer Filmkassette konnte die Membran bzw. der belichtete Film ausgewertet werden.

**Tab. 15: Übersicht über die primären und sekundären Antikörper und deren Einsatzparameter**

Antikörper	Absättigungsreagenz	Verdünnung	Inkubationszeit
Anti-p95	1 fach Roti®Block	1 : 2000	1 h bei RT
Anti-ATM	5 % Magermilchpulver	1 : 1000	3 h bei RT
Anti-phospho-ATM	5 % Magermilchpulver	1 : 500	18 - 20 h bei 4°C
Anti-SMC1	1 fach Roti®Block	1 : 2000	1,5 h bei RT
Anti-phospho-SMC1	5 % BSA	1 : 800	18 - 20 h bei 4°C
Anti-p53	5 % BSA	1 : 500	18 - 20 h bei 4°C
Anti-phospho-p53	5 % Magermilchpulver	1 : 500	18 - 20 h bei 4°C
Anti-FANCD <sub>2</sub>	5 % Magermilchpulver	1 : 3000	18 - 20 h bei 4°C
Anti-beta Actin	5 %MMP oder 1 fach Roti®	1 : 10000	1 h bei RT
Anti-alpha Tubulin	5 % Magermilchpulver	1 : 5000	1 h bei RT
Anti-CHK2	5 % Magermilchpulver	1 : 1000	2 h bei RT
Anti-p21	1 fach Roti®-Block	1 : 500	18 - 20 h bei 4°C
Anti-mouse <sup>HRP</sup>	je nach primärem Antikörper	1 : 1000	1 h bei RT
Anti-rabbit <sup>HRP</sup>	je nach primärem Antikörper	1 : 1000	1 h bei RT

### 2.2.3.7 „Strippen“ von Membranen

Um eine Membran auf mehrere Proteine untersuchen zu können, wurden die Membranen mit einem Stripping-Puffer behandelt, wodurch die auf der Membran befindlichen Antikörper von ihren Bindungsstellen gelöst wurden. Die Membranen wurden dazu bei 60 – 70 °C für 30 min. in Stripping-Puffer unter leichtem Schütteln im Wasserbad inkubiert. Im Anschluss erfolgte ein zweimaliges Waschen für jeweils 10 min. mit H<sub>2</sub>O und in Folge ein einmaliges Waschen mit TBS-T für weitere 10 min. bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Membran wieder mit der gewünschten Blocklösung abgesättigt.

### 2.2.4 Molekulargenetische Methoden

#### 2.2.4.1 Globale DNA-Amplifizierung

Mit dem GenomiPhi-Kit der Firma Amersham war es möglich, eine globale DNA-Amplifizierung, d. h. eine Mengenvervielfältigung der eingesetzten DNA zu erzielen. Dabei wurden 9 µl Sample-Buffer, 9 µl Reaction-Buffer und 1 µl Enzym-Mix mit 1 µl Ursprungs-DNA in drei aufeinander folgenden Schritten (Denaturierung, Inkubation und Hitze-Inaktivierung) versetzt. Für die Denaturierung wurden zunächst 1 µl Ursprungs-DNA mit 9 µl Sample-Buffer für 3 min. auf 95 °C erhitzt und anschließend auf 4 °C abgekühlt. Vor der Inkubation bei 30 °C für 16 – 18 Stunden erfolgte die Zugabe von 9 µl Reaction-Buffer und 1 µl Enzym-Mix. Nach Beendigung der Inkubation erfolgte die Hitze-Inaktivierung der Proben bei 65 °C für 10 min. mit anschließender Abkühlung auf 4 °C.

Als Produkt erhält man 20 µl global amplifizierte Ursprungs-DNA. Durch Zugabe von 180 µl Wasser wurde die neue DNA 1:10 verdünnt.

#### 2.2.4.2 Isolierung von RNA

Die Extraktion der Gesamt-RNA aus LCLs begann nach dem Ernten von  $1 \times 10^7$  Zellen, welche sich im logarithmischen Wachstum befanden. Die Zellsuspension wurde in ein Zentrifugationsgefäß überführt und für 10 min. bei 1000 rpm (Fa. Heraeus Megafuge 2.0) zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen gewaschen. Hierfür wurde das Zellpellet in 1 ml PBS aufgenommen, in ein Reaktionsgefäß überführt und anschließend für 2 min. bei 6000 rpm (Fa. Heraeus Biofuge primo) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Aufbrechen der Zellen erfolgte durch Zugabe von 1 ml TRIZOL® Reagenz. Es kam zum vollständigen Lösen der Zellpellets. Anschließend erfolgte die Zugabe von 200 µl Chloroform. Nach mehrmaligen Schwenken (end over end) des Reaktionsgefäßes, wurden die Proben für 3 min. bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und gerollert. Im Anschluss daran wurden die Proben für 20 min. bei 4 °C und 5000 rpm (Fa. Heraeus Biofuge primo) abzentrifugiert. Es ergab sich eine deutliche Phasentrennung (farblose, klare wässrige Oberphase, weiße, flockige Interphase und eine rosafarben, trübe organische Unterphase). Die obere Phase enthielt die RNA und wurde vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Präzipitation der RNA erfolgte die Zugabe von 500 µl Isopropanol, kurzes Mischen

(ca. 10 sek.), 10 minütiges Ruhen bei Raumtemperatur und eine Zentrifugation für 10 min. bei 4 °C und 10000 rpm (Fa. Heraeus Biofuge primo). Der Überstand wurde vorsichtig entnommen und verworfen. Zum anschließenden Waschen des Zellpellets wurde dieses mit 70 %igem Ethanol versetzt, 10 sek. gemixt und erneut unter den zuvor genannten Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit geöffnetem Deckel bei Raumtemperatur getrocknet. Die gefällte Gesamt-RNA konnte nun in 35 µl TE, 9 µl H<sub>2</sub>O, 5 µl 10x Puffer 2 und 1 µl DNase (10 U/µl) aufgenommen und für 15 min. bei 37 °C inkubiert werden, um störende DNA zu verdauen. Im Anschluss folgte ein weiterer Aufreinigungsschritt, um die DNase zu entfernen. Die RNA wurde mit 50 µl H<sub>2</sub>O versetzt und zwei Mal mit je 100 µl PCA und ein Mal mit CHCl<sub>3</sub> extrahiert. Die Fällung der RNA erfolgte durch Zugabe von 250 µl Ethanol (abs.) und 10 µl 3 M NaAc (pH 6,0) über Nacht bei – 80 °C. Durch darauf folgendes Abzentrifugieren für 20 min. bei 11000 rpm und nach einmaligem Waschen in 80 %igem Ethanol konnte das trockene Pellet in 100 µl TE für die OD-Bestimmung gelöst werden. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bei 260 nm und 280 nm ermittelt. Die Berechnung der RNA-Konzentration ergab sich aus folgender Beziehung: 1 OD<sub>260 nm</sub> entspricht 40 µg RNA/ml.

### 2.2.4.3 Reverse Transkription

Zur weiteren Analyse wurde die RNA, mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in dem Prozess der reversen Transkription, in die komplementäre cDNA umgeschrieben. Zur Entfernung von Sekundärstrukturen der RNA wurden die Proben (1 µg RNA ad 40 µl H<sub>2</sub>O) zunächst für 5 min. bei 56 °C inkubiert und wieder auf Eis gestellt. Es erfolgte die Zugabe von folgendem Ansatz pro Probe:

Ansatz	Menge
10-fach Puffer	20 µl
MgCl 25 mM	40 µl
dNTPs	80 µl
Hexamere 50 mM	10 µl
Reverse Transcriptase	10 µl

Die Inkubation wurde anschließend mit diesem Temperaturprofil durchgeführt:

Dauer	Temp.
10 min.	20 °C
40 min.	42 °C
8 min.	99 °C
∞	4 °C

Nach Beendigung der reversen Transkription wurde die cDNA bei – 20 °C gelagert.

### 2.2.4.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Durch dieses Verfahren ist es möglich, von bestimmten Nucleotidsequenzen (DNA, cDNA) vielfache Kopien enzymatisch herzustellen. Voraussetzung ist die Kenntnis der Nucleotidsequenz, welche den gewünschten Bereich begrenzen. Die PCR verläuft in drei Schritten. Zunächst wird die doppelsträngige DNA bei 94 °C denaturiert. Im zweiten Schritt lagern sich, bei einer Temperatur zwischen 45 und 65 °C, die synthetisch hergestellten Oligonukleotide (Primer), welche dem komplementären Strang entsprechen, an die DNA (Annealing) an. Im letzten Schritt wird bei 72 °C mittels DNA-Taq-Polymerase vom 3'-Ende der Primer ausgehend der Gegenstrang mit dNTPs synthetisiert (Extension). Durch 25 - 35malige Wiederholung dieser Prozedur vermehrt sich das gewünschte Produkt exponentiell.

In der Regel wurde eine Touchdown-PCR angewendet. Bei der Touchdown-PCR wird die Annealingtemperatur der zu erwartenden Schmelztemperatur des Primers zyklusweise (5–10 Zyklen) angenähert und/oder über diese hinaus abgesenkt, wodurch die Spezifität der Primerbindung erhöht wird. Somit werden Primerdimere und Artefakte verringert, und es vermehrt sich vorzugsweise das gewünschte Amplikon. Im Folgenden ist das verwendete PCR-Profil, sowie die verwendeten PCR-Ansätze gezeigt. Abweichungen hiervon werden in den speziellen Abschnitten genauer erläutert.

## Standard PCR-Profil (Touchdown)

Zyklus		Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
	Initiale Denaturierung	94°C	5:00 min.	
1	Denaturierung Annealing Elongation	94°C 55°C 72°C	0:30 min. 0:30 min. 0:30 min.	1 x
2	Denaturierung Annealing Elongation	94°C 54°C 72°C	0:30 min. 0:30 min. 0:30 min.	1 x
3 - 5		...usw. bis zur gewünschten Annealing-Temperatur		
6 - 35	Denaturierung Annealing Elongation	94°C 50°C 72°C	0:30 min. 0:30 min. 0:30 min.	30 x
	Finale Elongation	72°C	7:00 min.	
		4°C	∞	

## Standard PCR-Ansatz

- Mikrosatelliten

Komponente	Konzentration	Menge
H <sub>2</sub> O		8,55 µl
PCR-Puffer	10-fach	2,50 µl
MgCl	50 mM	0,75 µl
dNTPs	10 mM	2,00 µl
Primer_FAM_M13_F		4,00 µl
Primer_F	5 µM	1,00 µl
Primer_R	5 µM	5,00 µl
Taq Polymerase	5 U/µl	0,20 µl
DNA		1,00 µl

- cDNA

Komponente	Konzentration	Menge
H <sub>2</sub> O		17,05 µl
PCR-Puffer	10-fach	2,50 µl
MgCl	50 mM	0,75 µl
dNTPs	10 mM	2,00 µl
Primer_F	5 µM	0,75 µl
Primer_R	5 µM	0,75 µl
Taq Polymerase	5 U/µl	0,20 µl
cDNA		1,00 µl

### 2.2.4.5 Agarose-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese können die durch die PCR gewonnenen Produkte ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Durch Anlegen eines Spannungsfeldes in der mit Elektrophoresepuffer (TBE-Laufpuffer) gefüllten Kammer, wandern die Amplikons, aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen, durch ein 1,5 %iges Agarosegel (1,5 g Agarose auf 100 ml TBE-Laufpuffer) zur positiv geladenen Anode. Hierbei durchlaufen kleinere Produkte das Gel schneller als größere. Mit Hilfe von Ethidiumbromid, welches in die DNA interkaliert, werden die Banden unter einem UV-Flächenstrahler sichtbar gemacht. Die Größe wurde durch den Vergleich mit einem selbst hergestellten Längenstandard (pSP65/Hinf I) ermittelt und fotografisch festgehalten.

### 2.2.4.6 PCR-Aufreinigung

Um in der Weiterverarbeitung der PCR-Produkte keine unerwünschten Einflüsse durch überschüssige Primer, dNTPs oder Salze zu erhalten, wurden die fertigen PCR-Produkte aufgereinigt. Je nach Anzahl der angefallenen Proben wurden zwei Arten der PCR-Aufreinigung genutzt. Bei kleineren Mengen wurde das Montage PCR-Reinigungskit der Firma Millipore eingesetzt, bei größeren Probenzahlen wurde die enzymatische Aufreinigung mit Hilfe der Shrimp-Alkaline-Phosphatase (SAP) und der Exonuclease I durchgeführt.

Durch das Montage PCR-Reinigungskit wurde das in Wasser gelöste Amplikon mit Hilfe einer Säule, welche einen Filter enthält, durch zwei Zentrifugationsschritte getrennt und gereinigt. Die enzymatische Aufreinigung erfolgte für 45 min. bei 37 °C mit folgendem Ansatz:

Komponente	Menge
PCR-Produkt	8,0 µl
H <sub>2</sub> O	3,5 µl
SAP 1 U/µl	0,4 µl
Exonuclease I 20 U/µl	0,09 µl

Anschließend erfolgte eine Enzyminaktivierung für 15 min. bei 80 °C.

### 2.2.4.7 Gel Extraktion

In Fällen, bei denen unsaubere PCR-Produkte vorlagen, wurden diese mit Hilfe des Gel Extraction Kit der Firma Qiagen extrahiert. Dabei wurde das gewünschte Amplikon aus einem 0,9 % Agarosegel herausgeschnitten und nach den Herstellerangaben für die Sequenzierung bearbeitet.

### 2.2.4.8 Sequenzierung

Für die Sequenzierung wurden die gereinigten PCR-Produkte und das Big Dye Terminator Kit verwendet, wobei die Sequenzierungsreaktion im Thermocycler erfolgte. Hierbei werden nicht nur dNTPs, sondern auch ddNTPs in der Sequenzreaktion eingebaut. Diese ddNTPs führen, aufgrund des fehlenden Sauerstoffs, zum Syntheseabbruch. Die dabei entstandenen unterschiedlich langen DNA-Fragmente wurden durch ein Kapillarsequenziergerät der Firma Applied Biosystems elektrophoretisch ihrer Größe nach aufgetrennt und anhand von Fluoreszenzfarbstoffen durch einen Laser analysiert.

Die Sequenzreaktion wurde mit dem folgendem Sequenzierungsansatz und -profil durchgeführt:

#### Standard Sequenzierungsansatz

Komponente	Menge
ger. PCR	3,0 µl
Sequenz.-Puffer	2,0 µl
Big Dye	0,5 µl
Primer F oder R (1,6 µM)	1,0 µl
H <sub>2</sub> O	3,5 µl

#### Sequenzierungsprofil

Temperatur	Dauer	Zyklen
96°C	0:10 min.	25 x
50°C	0:05 min.	
60°C	4:00 min.	
4°C	∞	---

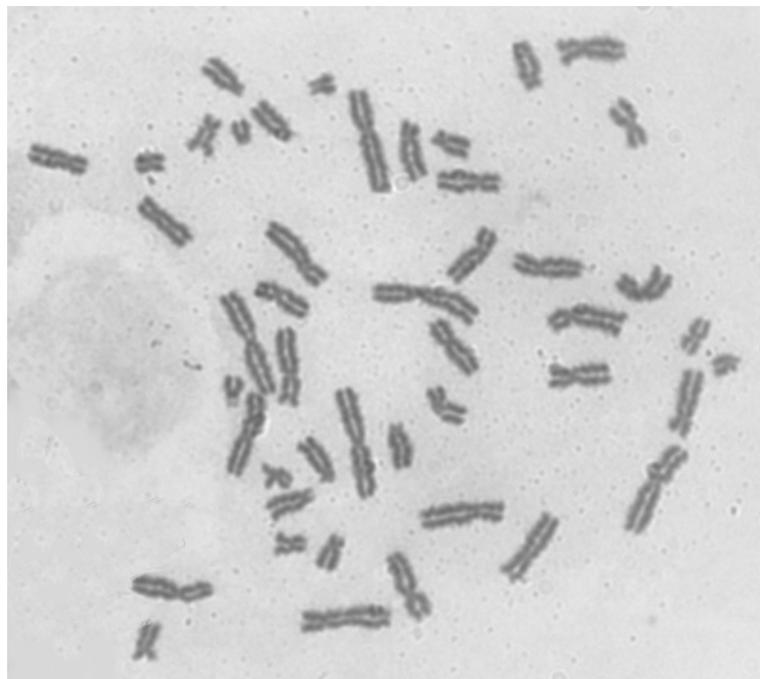
### 2.2.4.9 Fällung

Nach Ende der Sequenzreaktion erfolgte die Fällung der DNA-Fragmente durch Zugabe von 100 µl Präzipitationsmix und anschließender Zentrifugation für 30 min bei 3000 rpm, der Überstand wurde verworfen. Die Reinigung erfolgte durch Zugabe von 200 µl 70 %igen Ethanol und erneuter Zentrifugation von 8 min. bei 3000 rpm. Die Proben wurden anschließend im offenen Thermocycler für 3 min bei 95 °C getrocknet und in je 20 µl PCR-H<sub>2</sub>O gelöst. Kleine Probenmengen wurden nach den Vorgaben des DyeEx Spin Kit der Firma Qiagen aufgereinigt und in 20 µl H<sub>2</sub>O gelöst. Die gefällten Proben wurden anschließend in dem Kapillarsequenziergerät 3100 oder 3730 der Firma Applied Biosystems sequenziert. Die Auswertung der vierfarbigen Ergebnisse wurde mittels der Software „Sequencing Analysis 3.4.1“ vorgenommen und mit dem Programm „SeqMan™II“ von DNASTAR mit einer Referenz-mRNA verglichen.

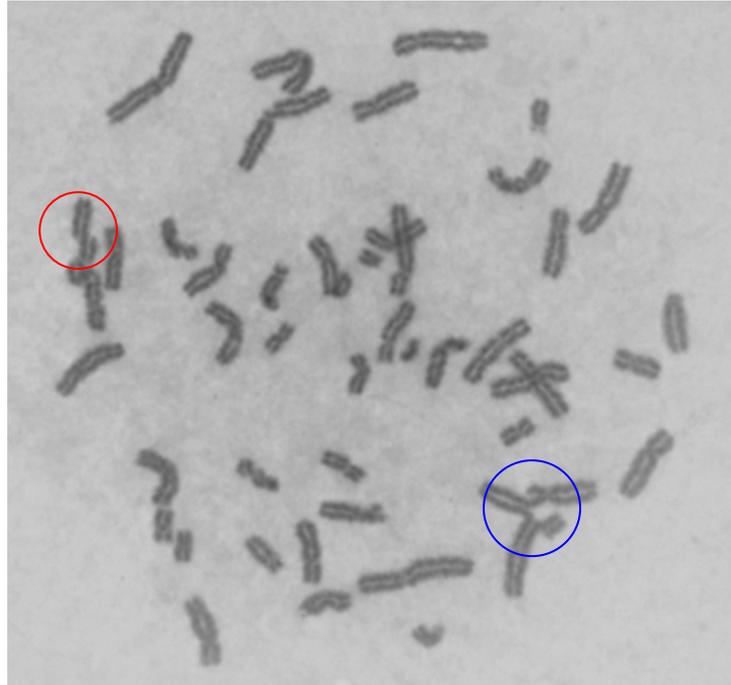
## 3 Ergebnisse

### 3.1 Chromosomenbruchanalysen

Zur Untersuchung der Metaphasechromosomen wurden zwei Versuchsreihen durchgeführt. Wobei die einzelnen Zelllinien jeweils mit einer bestimmten Konzentration von Mitomycin C für 24 Stunden behandelt wurden bzw. einer Röntgenstrahlung von einem, zwei oder vier Gray unterzogen wurden. Die Ergebnisse der mikroskopischen Auswertung sind zusammenfassend in den nachfolgenden Abschnitten (3.1.1 und 3.1.2) in Tabellenform aufgeführt. Nachfolgend sind zwei Abbildungen dargestellt. In der ersten Abbildung (Abb. 7) ist eine Metaphase zu sehen, die keine Chromosomenaberrationen aufweist. Man kann deutlich die 46 unbeschädigten Chromosomen erkennen. In der zweiten Abbildung (Abb. 8) ist eine Metaphase mit mehreren Chromosomenaberrationen dargestellt. Man kann deutlich einzelne Chromatidbrüche erkennen, aber auch einen Chromosomenbruch sowie Reunionen von zwei Chromosomen.



**Abb. 7: Unbeschädigte Metaphase.** Zu sehen ist eine Metaphase mit 46 intakten Chromosomen.



**Abb. 8: Metaphase mit Chromosomenaberrationen.** Zu sehen ist eine Metaphase, in welcher einzelne Chromatidbrüche (○) und Translokationen (○) zu erkennen sind.

### 3.1.1 Auswertung der Chromosomenaberrationen des 1. Versuchsaufbaus

Für die Untersuchung der Metaphasenchromosomen wurden in der ersten Versuchsanordnung fünf Zelllinien verwendet. Es handelte sich dabei um die Zelllinien einer Kontrolle (520), der Betroffenen (B-4523), einer Fanconi-Anämie-Zelllinie der Komplementationsgruppe C (FA-C) (HSC72), einer Ataxia telangiectasia-Zelllinie (L6) sowie um eine heterozygote (wt/657del) NBS-Zelllinie (96P126).

Es wurden je untersuchter Zelllinie unbehandelte Zellen, mit Mitomycin C (40 ng/ml und 80 ng/ml für 24 Stunden) behandelte Zellen sowie Zellen die einer Röntgenstrahlung von einem und zwei Gray ausgesetzt waren, miteinander verglichen.

Für die Auszählung der aberranten Zellen wurden einzelne Chromatidbrüche, Translokationen, Ringchromosomen, dizentrische Chromosomen und azentrische Fragmente unterschieden.

Es wurde für die Auswertung der prozentuale Anteil der aberranten Mitosen angegeben, wobei die Anzahl der aberranten Mitosen durch die Gesamtanzahl der untersuchten Mitosen je Präparat dividiert wurde. Des Weiteren erfolgte die Berechnung des Bruchindex, welcher sich aus der Gesamtanzahl der Brüche durch die Gesamtzahl der untersuchten Mitosen je Präparat zusammensetzte. Zu beachten war hierbei, dass eine

Miteinberechnung der dizentrischen Chromosomen nur geschehen konnte, wenn zugleich ein azentrisches Fragment vorlag, da diesem ein Bruchereignis vorausgegangen ist. Die Ergebnisse der mikroskopischen Auswertung für den ersten Versuchsaufbau sind zusammenfassend in der Tab. 16 dargestellt.

Tab. 16: Auswertungen der 1. Versuchsanordnung <sup>1)</sup>

Art der Behandlung	520 Kontrolle					B-4523 Patientin					HSC72 FANC C					L6 ATM					96P126 NBS1 (wt/657del)				
	unbehandelt	40 ng/ml MMC	80 ng/ml MMC	1 Gray	2 Gray	unbehandelt	40 ng/ml MMC	80 ng/ml MMC	1 Gray	2 Gray	unbehandelt	40 ng/ml MMC	80 ng/ml MMC	1 Gray	2 Gray	unbehandelt	40 ng/ml MMC	80 ng/ml MMC	1 Gray	2 Gray	unbehandelt	40 ng/ml MMC	80 ng/ml MMC	1 Gray	2 Gray
<b>Aberrante Mitosen (gesamt) in %</b>	0	0	4	8	8	2	12	26	26	6	20	80	78	56	52	4	10	10	70	56	2	4	2	18	10
<b>Bruchindex: Brüche/Mitose (gesamt)</b>	0	0	0,06	0,06	0,08	0,02	0,10	0,20	0,28	0,04	0,28	2,18	1,96	1,22	0,96	0,06	0,14	0,14	1,92	1,06	0,04	0,04	0,02	0,32	0,20
normale Metaphasen	50	50	48	46	46	49	44	37	37	47	40	10	11	22	24	48	45	45	15	22	49	48	49	41	45
geschädigte Metaphasen	0	0	2	4	4	1	6	13	13	3	10	40	39	28	26	2	5	5	35	28	1	2	1	9	5
Chromatidbrüche	0	0	1	3	4	1	1	4	11	2	12	81	95	54	45	3	5	2	76	48	2	2	1	16	10
Translokationen	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	10	1	1	3	0	0	1	8	5	0	0	0	0	0
Ringchromosom <sup>2)</sup>	0	0	1	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	1	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0
dizentrische Chr. <sup>3)</sup>	0	0	0	1	0	0	3	9	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
azentrische Chr. <sup>2)</sup>	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	1	9	1	2	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0
Bruchereignisse (gesamt)	0	0	3	3	4	1	5	10	14	2	14	109	98	61	48	3	7	7	96	53	2	2	1	16	10

<sup>1)</sup> es wurden jeweils 50 Metaphasen ausgezählt

<sup>2)</sup> zählt je zwei Brüche

<sup>3)</sup> dizentrisches Chromosomen zählen keine Brüche

Die nachfolgend beschriebenen Ergebnisse beziehen sich auf die Darstellungen in den Abb. 9 und Abb. 10.

Wie zu erkennen ist, traten bei der Kontrollzelllinie (520) keine aberranten Mitosen unter den unbehandelten Zellen auf. Es war eine leichte Steigerung der Chromosomenbruchraten unter der Mitomycin C (MMC)-Behandlung mit 80 ng/ml zu verzeichnen. Unter Bestrahlung stiegen die Werte im Vergleich zu denen der MMC-Behandlung nur geringfügig an. Die erhaltenden Werte an aberranten Mitosen und des Bruchindex zeigten für die Kontrolle (520) eine erwartungsgemäß geringe Reaktion auf eine steigende Konzentration an MMC, sowie unter einer erhöhten Strahlendosis.

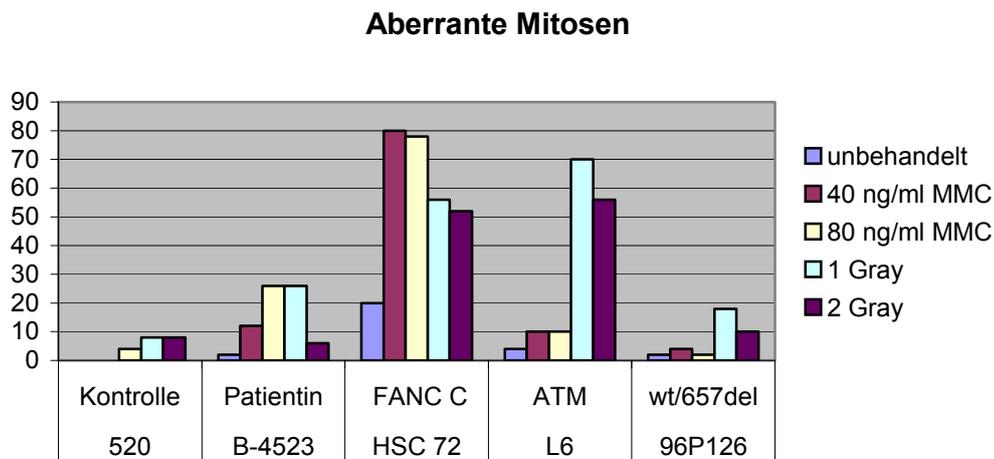
Die Patientenzelllinie (B-4523) wies eine leichte Erhöhung der Anzahl spontaner als auch induzierter aberranter Mitosen und des Bruchindex auf. Dabei stieg die Anzahl der Chromosomenaberrationen mit steigender Konzentration an Mitomycin C. Auch unter der Bestrahlung mit einem Gray zeigte sich eine deutliche Erhöhung der Werte im Vergleich zu denen der unbehandelten Zellen. Bei der Bestrahlung mit zwei Gray konnte wiederum ein deutliches Abfallen der Werte unter die Werte der Bestrahlung mit einem Gray beobachtet werden. Die Auswertung der Patientenzellen ergab, dass im Bezug zu den Vergleichszelllinien eine auffällig hohe Anzahl dizentrischer Chromosomen vorlag. Diese stieg mit steigender MMC-Konzentration und unter der Bestrahlung mit einem Gray an. Für die Berechnung des Bruchindex konnten in diesem Fall die dizentrischen Chromosomen nur in Verbindung mit einem azentrischen Fragment berücksichtigt werden.

Das Bruchprofil der Fanconi-Anämie-Zellen (HSC72) zeigte einen zu erwartenden Verlauf für diese Erkrankung. Hier war bereits unter den unbehandelten Zellen eine deutliche Steigerung des Bruchindex und eine vermehrte Anzahl aberranter Mitosen im Vergleich mit der Kontrolle (520) zu erkennen. Die Rate der Chromosomenaberrationen stieg wie erwartet unter der MMC-Behandlung, sowie unter der Bestrahlung, stark an, wobei jedoch die Werte der Bestrahlung geringer ausfielen als für die MMC-Behandlung.

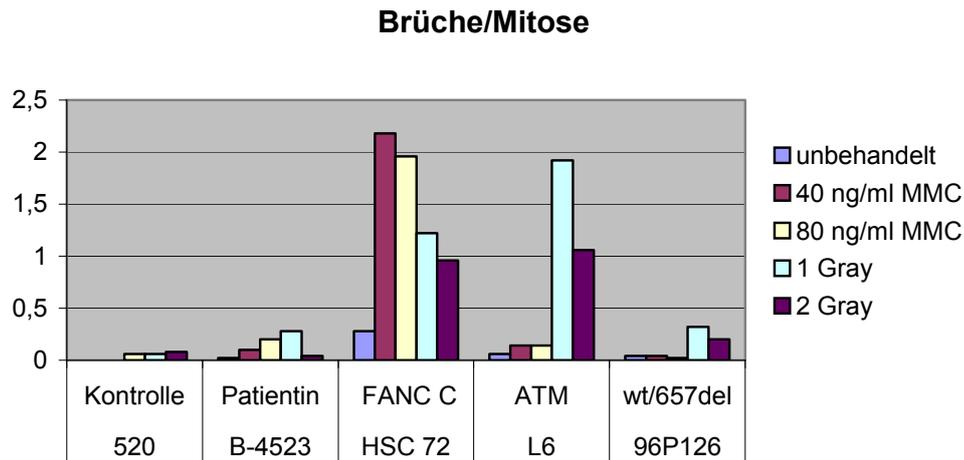
Wie bereits bei der FANC C-Linie zeigten auch die Ergebnisse der ATM-Linie (L6) ein typisches und erwartetes Bruchprofil für diese Erkrankung. Es gab dabei nur einen

geringen Anstieg der aberranten Mitosen und des Bruchindex bei den unbehandelten Zellen als auch unter der MMC-Behandlung. Die Werte entsprachen etwa denen der Kontrolllinie (520). Unter der Bestrahlung mit einem Gray stieg die Anzahl der Chromosomenaberration im Vergleich zu denen der unbehandelten Zellen stark an. Unter der Bestrahlung mit zwei Gray hingegen verringerte sich die Anzahl an Chromosomenaberrationen wieder.

Die Auswertung der heterozygoten NBS-Linie (96P126) zeigte keine signifikante Erhöhung der Anzahl an Chromosomenaberrationen bei den unbehandelten Zellen, als auch bei den Zellen, welche mit MMC behandelt wurden. Im Vergleich dazu gab es einen kleinen Anstieg an Chromosomenaberrationen unter der Bestrahlung mit einem Gray. Die Anzahl fiel im Vergleich zu der Bestrahlung mit einem Gray bei den Zellen mit der zwei Gray-Bestrahlung wieder leicht ab.



**Abb. 9: Zusammenfassung der aberranten Mitosen aus dem 1. Versuchsaufbau.** Auf der X-Achse sind die fünf verwendeten Zelllinien zu sehen. Die farbigen Balken geben die Art der fünf unterschiedlichen Behandlungen an. Die Y-Achse gibt den Anteil der aberranten Mitosen in Prozent wieder. Es wurden dabei auch die Mitosen mit dizentrischen Chromosomen als aberrante Mitose berücksichtigt.



**Abb. 10: Zusammenfassung der Chromosomenbruchrate aus dem 1. Versuchsaufbau.** Auf der X-Achse sind die fünf verwendeten Zelllinien zu sehen. Die farbigen Balken geben die Art der fünf unterschiedlichen Behandlungen an. Die Y-Achse gibt die Chromosomenbruchrate wieder. Die dizentrischen Chromosomen ohne dazugehörige azentrische Fragmente wurden dabei nicht berücksichtigt.

### 3.1.2 Auswertung der Chromosomenaberrationen des 2. Versuchsaufbaus

Für die Untersuchung der Metaphasenchromosomen wurden in der zweiten Versuchsanordnung vier Zelllinien verwendet. Es handelte sich um zwei Kontrollzelllinien (520 und 1095), um die betroffene Patientin (B-4523) sowie um eine Nijmegen-Breakage-Syndrom (NBS) Linie (95P558).

Es wurden je untersuchter Zelllinie unbehandelte Zellen, mit Mitomycin C (40 ng/ml und 80 ng/ml für 24 Stunden) behandelte Zellen, sowie Zellen die einer Röntgenstrahlung von einem und vier Gray ausgesetzt waren, miteinander verglichen. Auch hier wurden wieder, wie bereits unter 3.1.1, für die Auszählung der aberranten Zellen einzelne Chromatidbrüche, Translokationen, Ringchromosomen, dizentrische Chromosomen und azentrische Fragmente, resultierend aus einem Chromosomenbruch, unterschieden.

Auch hier war zu beachten, dass eine Miteinberechnung der dizentrischen Chromosomen nur geschehen konnte, wenn zugleich ein azentrisches Fragment vorlag. Die Ergebnisse der mikroskopischen Auswertung für den zweiten Versuchsaufbau sind zusammenfassend in der Tab. 17 dargestellt.

Tab. 17: Auswertungen der 2. Versuchsanordnung <sup>1)</sup>

Art der Behandlung	520 Kontrolle					1095 Kontrolle					B-4523 Patientin					95F558 NBS				
	unbehandelt	40 ng/ml MMC	80 ng/ml MMC	1 Gray	4 Gray	unbehandelt	40 ng/ml MMC	80 ng/ml MMC	1 Gray	4 Gray	unbehandelt	40 ng/ml MMC	80 ng/ml MMC	1 Gray	4 Gray	unbehandelt	40 ng/ml MMC	80 ng/ml MMC	1 Gray	4 Gray
	0	0	2	10	X	4	4	0	6	X	4	16	20	34	28	X	14	24	44	78
Bruchindex: Brüche/Mitose (gesamt)	0	0	0,02	0,10	X	0,04	0,04	0	0,06	X	0,10	0,20	0,22	0,38	X	0,20	0,38	0,76	1,74	3,94
normale Metaphasen	50	50	49	45	X	48	48	50	47	X	42	40	33	36	X	43	38	28	11	4
geschädigte Metaphasen	0	0	1	5	X	2	2	0	3	X	8	10	17	14	X	7	12	22	39	46
Chromatidbrüche	0	0	1	5	X	2	2	0	4	X	5	6	10	12	X	8	18	28	85	183
Translokationen	0	0	0	0	X	0	0	0	0	X	0	0	0	1	X	0	1	4	2	10
Ringchromosom <sup>2)</sup>	0	0	0	0	X	0	0	0	0	X	0	0	0	0	X	0	0	0	0	0
dizentrische Chr. <sup>3)</sup>	0	0	0	0	X	0	0	0	0	X	5	9	10	4	X	1	0	0	0	0
azentrische Chr. <sup>2)</sup>	0	0	0	0	X	0	0	0	0	X	0	2	1	3	X	1	0	3	0	2
Bruchereignisse (gesamt)	0	0	1	5	X	2	2	0	4	X	5	10	11	19	X	10	19	38	87	197

<sup>1)</sup> es wurden jeweils 2x25 Metaphasen ausgezählt

<sup>2)</sup> zählt je zwei Brüche

<sup>3)</sup> ein dizentrisches Chromosomen zählt keine Brüche

x) Präparate nicht bewertbar, viele Zellen keine/kaum Mitosen

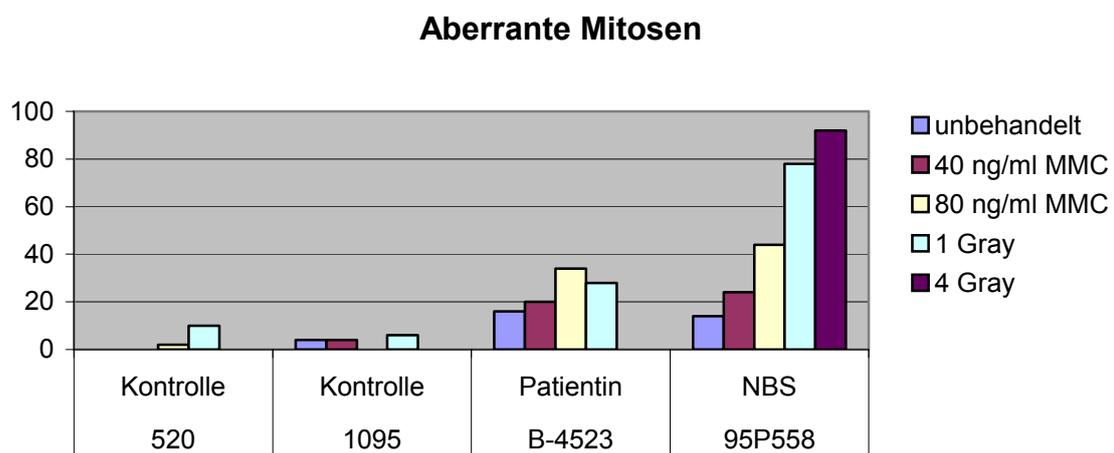
Die im Folgenden beschriebenen Ergebnisse beziehen sich auf die Darstellungen in der Abb. 11 und Abb. 12.

Wie zu erkennen ist, gab es bei den zwei Kontrollzelllinien (520 und 1095) keine signifikanten Erhöhungen innerhalb der Versuchsauswertung. Es konnte keine vermehrte Rate an Chromosomenaberrationen für die unbehandelten wie für die mit MMC bzw. Röntgenstrahlung behandelten Zellen beobachtet werden. Eine Auswertung der mit vier Gray bestrahlten Zellen konnte nicht vorgenommen werden, da zwar eine hohe Zellzahl vorlag, jedoch aber die Anzahl erforderlicher Mitosen stark reduziert war. Dies lässt vermuten, dass die hohe Dosis an Röntgenstrahlen zu einem Stopp im Zellzyklus geführt hat, wodurch die Zellen nicht in die Mitose eintreten konnten. Die erhaltenen Werte (Tab. 17) und die daraus resultierenden Bruchprofile, wie auch die erwartete Arretierung der Zellen unter Bestrahlung mit vier Gray, stellten sich erwartungsgemäß in den Kontrollen dar.

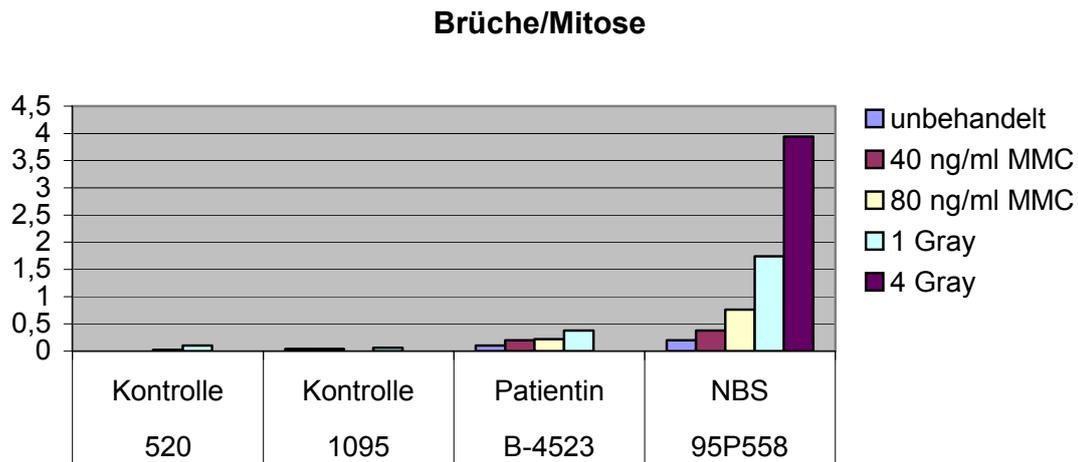
Die Patientenzelllinie (B-4523) zeigte eine spontane als auch induzierte Erhöhung der aberranten Mitosen und des Bruchindex in den Proben im Vergleich zu den Kontrollen. Es konnte beobachtet werden, dass die Anzahl der Chromosomenaberrationen mit steigender Konzentration an Mitomycin C leicht anstieg. Auch unter der Bestrahlung mit einem Gray konnte eine erhöhte Rate an Chromosomenaberrationen beobachtet werden, welche im Bereich der bereits beobachteten Werte unter der Mitomycin C Behandlungen lagen. Unter der Bestrahlung mit vier Gray konnte keine Auswertung erfolgen, da die Präparate, wie bereits zuvor die der Kontrollzelllinien, zwar sehr viele Zellen enthielten, jedoch unzureichende Mitosen aufwiesen. Auch hier wird vermutet, dass eine Arretierung des Zellzyklus erfolgte. Wie bereits in der ersten Versuchsanordnung, konnte auch in dieser Auswertung eine hohe Anzahl an dizentrischen Chromosomen bei den unbehandelten auch den behandelten Zellen (MMC und Bestrahlung) beobachtet werden. Auch hier wurden die dizentrischen Chromosomen nur in Kombination mit einem azentrischen Fragment für die Berechnung des Bruchindex berücksichtigt.

Bei der Auswertung der NBS-Zelllinie (95P558) zeigte sich ein Bruchprofil, welches für diese Erkrankung erwartet wurde. Bereits bei den unbehandelten Zellen konnte eine leichte Steigerung im Vergleich zu den Kontrollen beobachtet werden. Unter der

Behandlung mit Mitomycin C stiegen die Werte für die aberranten Mitosen sowie der Bruchindex mit steigender MMC-Konzentration an. Unter der Bestrahlung mit einem Gray konnte eine deutliche Steigerung dieser Werte beobachtet werden. So lag die Rate an aberranten Mitosen und des Bruchindex bereits um das Zweifache höher als die Werte unter der MMC-Behandlung mit 80 ng/ml. Die Rate an aberranten Mitosen stieg unter der Bestrahlung mit vier Gray nochmals etwas an, jedoch zeigte sich eine enorme Zunahme des Bruchindex im Vergleich zu den Werten unter der Bestrahlung mit einem Gray, welche durch eine starke Erhöhung an Chromatidbrüchen erklärt werden konnte. Wie erwartet wurde, gab es keine Arretierung im Zellzyklus und somit gelangten die durch die hohe Dosis an Röntgenstrahlung geschädigten Zellen erneut in die Zellteilung.



**Abb. 11: Zusammenfassung der Chromosomenaberrationen aus dem 2. Versuchsaufbau.** Auf der X-Achse sind die vier verwendeten Zelllinien zu sehen. Die farbigen Balken geben die Art der fünf unterschiedlichen Behandlungen an. Die Y-Achse gibt den Anteil der aberranten Mitosen in Prozent wieder. Es wurden dabei auch die Mitosen mit dizentrischen Chromosomen als aberrante Mitose berücksichtigt.

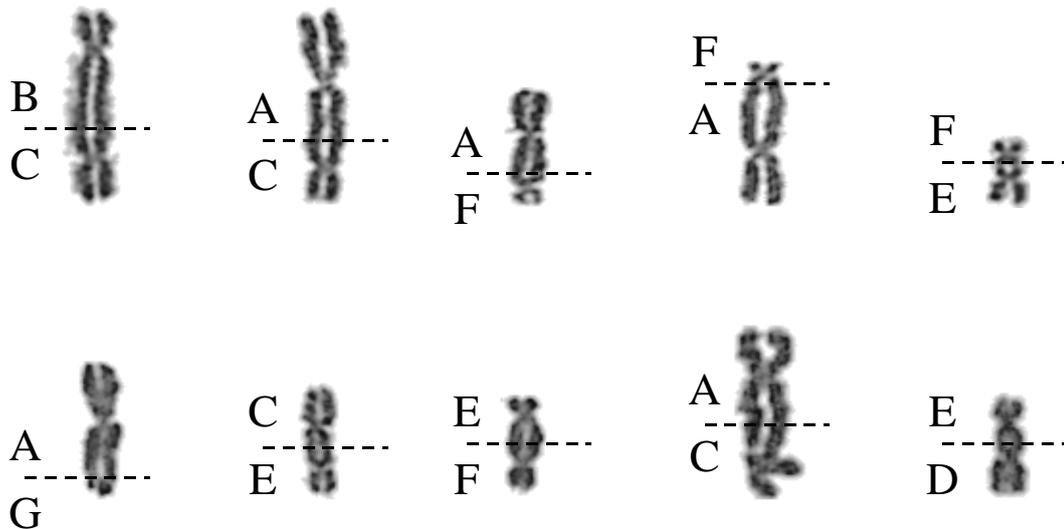


**Abb. 12: Zusammenfassung der Chromosomenbruchrate aus dem 2. Versuchsaufbau.** Auf der X-Achse sind die fünf verwendeten Zelllinien zu sehen. Die farbigen Balken geben die Art der fünf unterschiedlichen Behandlungen an. Die Y-Achse gibt die Chromosomenbruchrate wieder. Die dizentrischen Chromosomen ohne dazugehörige azentrische Fragmente wurden dabei nicht berücksichtigt.

### 3.1.3 Dizentrische Chromosomen

Wie bereits bei den Auswertungen der Mitosen der ersten und zweiten Versuchsanordnung erwähnt wurde, zeigte sich eine signifikante Häufung an dizentrischen Chromosomen bei der Patientin (B-4523). Hierbei fiel auf, dass das Vorkommen nicht auf eine bestimmte Behandlungsart begrenzt war. Die dizentrischen Chromosomen traten nicht nur bei den unbehandelten, sondern auch bei den behandelten Zellen auf, unabhängig davon, ob eine Mitomycin C-Behandlung oder eine Bestrahlung mit ionisierender Strahlung stattgefunden hat. Bei genauerer Betrachtung stellte sich jedoch heraus, dass es zu einem vermehrten Auftreten an dizentrischen Chromosomen unter der MMC-Behandlung gekommen ist. Für die Berechnung des Bruchindex konnten nur soviel dizentrische Chromosomen miteinbezogen werden wie azentrische Fragmente vorlagen. Bei den übrigen dizentrischen Fragmenten ist man von Telomerfusionen ausgegangen, bei denen für die Bildung keine Bruchereignisse mit anschließender Translokation stattgefunden haben.

In der folgenden Abbildung (Abb. 13) sind einige dizentrische Chromosomen in die Gruppen A bis G eingeteilt, nachdem sie zuvor im Karyogramm sortiert wurden. Deutlich zu erkennen ist, dass verschiedene Chromosomen-Gruppen miteinander an der Bildung von dizentrischen Chromosomen beteiligt sind.

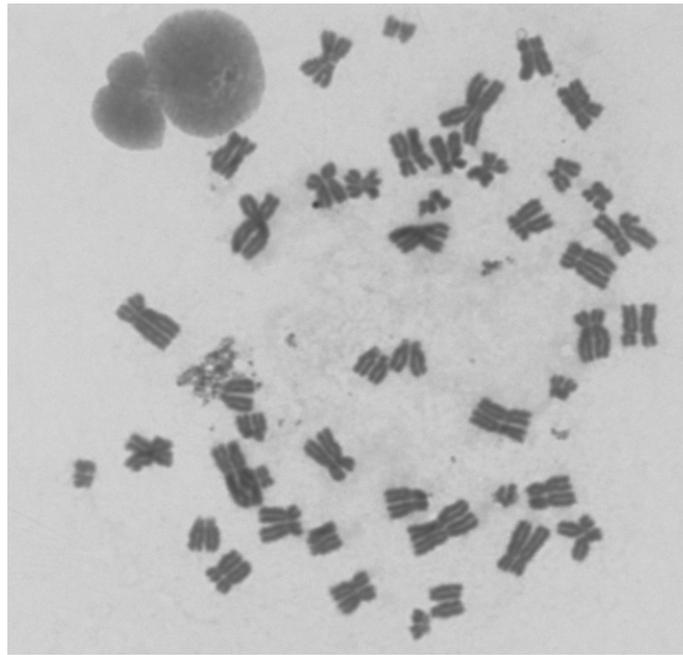


- Gruppe A große metazentrische Chromosomen (1 – 3)  
 Gruppe B große submetazentrische Chromosomen (4 – 5)  
 Gruppe C mittelgroße metazentrische und submetazentrische Chromosomen (6 – 12, X)  
 Gruppe D mittelgroße akrozentrische Chromosomen (13 – 15)  
 Gruppe E relativ kurze metazentrische und submetazentrische Chromosomen (16 – 18)  
 Gruppe F kurze metazentrische Chromosomen (19 – 20)  
 Gruppe G kurze akrozentrische Chromosomen (21 – 22, Y)

**Abb. 13:** Dargestellt ist eine Auswahl an verschiedenen dizentrischen Chromosomen der Patientin (B-4523). Die einzelnen Chromosomen, welche an der Bildung der dizentrischen Chromosomen beteiligt sind, wurden in die entsprechenden Gruppen A-G eingeteilt, nachdem sie zuvor im Karyogramm sortiert wurden. Deutlich ist keine Häufung an bestimmten Paarungen zu erkennen. Die Größenvarianz der Chromosomen hängt vom Grad der Kondensation zum Zeitpunkt der Chromosomenaufarbeitung ab.

### 3.1.4 Endoreduplikationen

Eine weitere Besonderheit der Patientenzellen (B-4523) war eine signifikant erhöhte Rate an Endoreduplikationen. Es wurden unter allen ausgewerteten Mitosen insgesamt zehn Endoreduplikationen entdeckt. Zwei dieser Endoreduplikationen wurden bei einer der Kontrolllinien (520) unter der Mitomycin C-Behandlung mit 80 ng/ml gefunden. Die übrigen acht Endoreduplikationen fanden sich bei der Patientin sowohl in den unbehandelten Zellen als auch den behandelten Zellen (MMC, Bestrahlung) wieder. Daraus ergibt sich ein Gesamtverhältnis an Endoreduplikationen von 1:375 bei den Kontrollen sowie ein Verhältnis von 1:62,5 bei der Patientin. Damit ist das Auftreten von Endoreduplikationen bei der Patientin um ein Sechsfaches erhöht.



**Abb. 14: Endoreduplikation.** Die Abbildung zeigt eine Endoreduplikation der Patientin (B-4523). Diese Zellen wurden einer Bestrahlungsdosis von einem Gray ausgesetzt. Deutlich ist die Verdopplung (tetraploid) eines normalen Chromosomensatzes (diploid) zu erkennen.

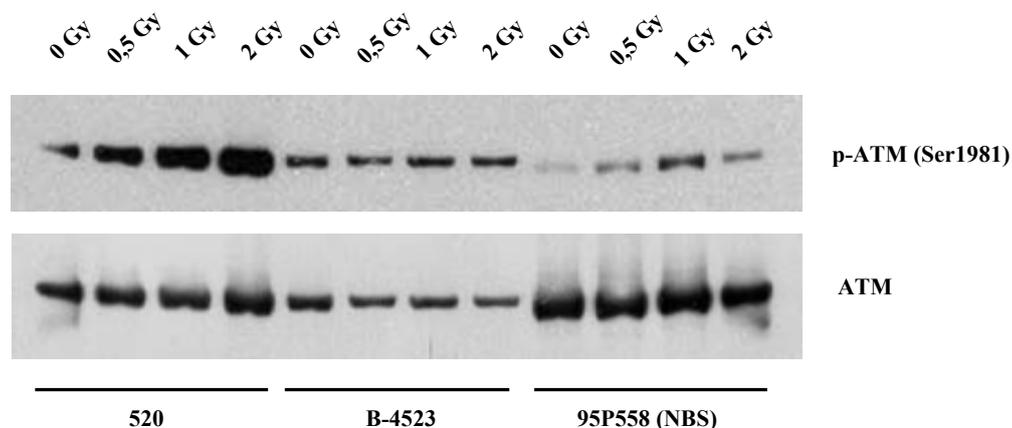
### 3.2 Proteinanalysen

Für die Proteinanalyse wurden Proteinlysate aus LCLs hergestellt, welche anschließend in der Immunpräzipitation und/oder im Western Blot analysiert wurden. Es wurden neben der Patientenzelllinie (B-4523) weitere Zelllinien als Positiv- bzw. Negativkontrollen verwendet. Hierzu zählten die Zelllinien 520 (gesund), L6 (ATM), HSC72 (FA) sowie 95P558 (NBS). Die Proteine der einzelnen Zelllinien wurden je nach Versuchsaufbau unbehandelt bzw. mit ionisierender Strahlung unterschiedlicher Intensität behandelt. Darüber hinaus wurde in einigen Fällen eine Ladekontrolle verwendet, um zu überprüfen ob äquivalente Proteinmengen aufgetragen wurden. Details werden in den jeweiligen Abschnitten genauer erläutert.

### 3.2.1 Immunpräzipitation

#### 3.2.1.1 Nachweis von phospho-ATM (S1981) und ATM

In der folgenden Immunpräzipitation (Abb. 15) wurden drei Zelllinien eingesetzt. Pro Zelllinie wurden vier Proben aufgetragen, wobei die Probenaufarbeitung 45 min. nach der Behandlung mit unterschiedlicher Strahlendosis erfolgte. Phospho-ATM wird am Serin-Rest 1981 phosphoryliert. Wie zu erkennen ist, wurde ATM bei der Kontrolle (520) mit zunehmender Bestrahlung stärker phosphoryliert. Das Bandenprofil der Kontrolle (520) fand sich auch bei der NBS-Zelllinie (95P558) in abgeschwächter Form wieder, da NBS-Zellen ATM erwartungsgemäß nicht effizient phosphorylieren können. Bei den Proben der NBS-Zelllinie war ein geringer Intensitätsrückgang der 2 Gy- gegenüber der 1 Gy-Bande zu verzeichnen. Die zuvor bei der Kontrolle beobachtete Zunahme der Phosphorylierung wurde jedoch nicht bei den Proben der Patientin (B-4523) sichtbar. Hier wiesen die vier Banden eine nahezu identische Intensität trotz zunehmender Bestrahlung auf. Als interne Ladekontrolle diente die nicht-phosphorylierte Form von ATM. Wie der Abb. 15 weiterhin zu entnehmen ist, konnten eindeutige Signale in annähernd gleicher Stärke je Zelllinie für ATM nachgewiesen werden. Im Vergleich der Zelllinien untereinander wurde jedoch eine geringere Proteinmenge bei den Patientenproben (B-4523) sichtbar. Die vorliegenden Ergebnisse der Immunpräzipitation deuten darauf, dass der vorliegende Basisdefekt der Patientenzelle (B-4523) scheinbar bereits in der unbehandelten Probe eine Autophosphorylierung von ATM verursacht.

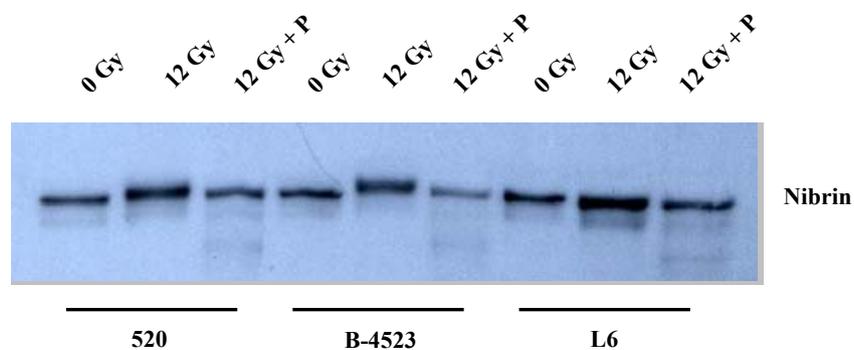


**Abb. 15: Immunpräzipitation zum Nachweis von phospho-ATM sowie ATM als Ladekontrolle für die Patientenzellen (B-4523) im Vergleich zu einer Kontrolle (520) und einer NBS-Zelllinie (95P558).** Die LCLs der drei Zelllinien wurden 45 min. nach der Behandlung mit ionisierender Strahlung in den angegebenen Dosen (Gy) aufgearbeitet.

### 3.2.2 Western Blot

#### 3.2.2.1 Nachweis von Nibrin

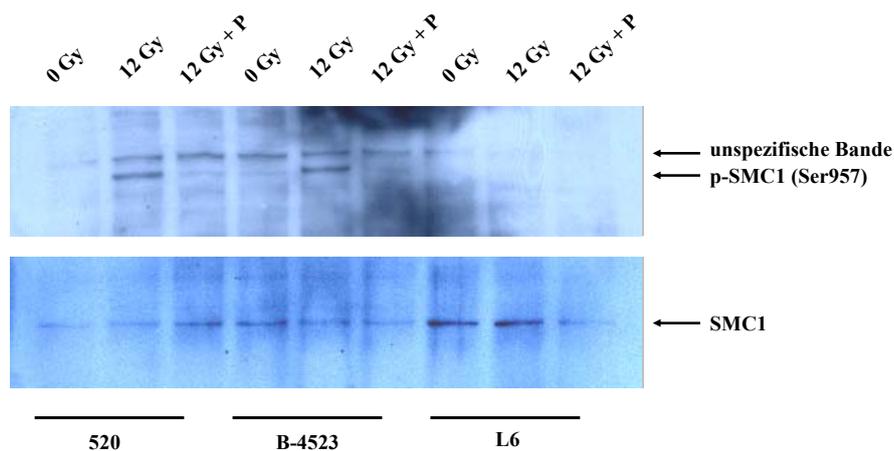
In der Abb. 16 wurden drei Zelllinien eingesetzt. Je Zelllinie wurden drei Proben aufgetragen, wobei die Aufarbeitung 60 min. nach der Behandlung mit ionisierender Strahlung in einer Dosis von 12 Gy erfolgte. Durch Bestrahlung wird Nibrin durch ATM phosphoryliert. Die Phosphorylierung erhöht das Molekulargewicht des Proteins, wodurch es zu einer Massenvergrößerung kommt, welche bei ausreichender Auftrennung der Proteine in einer Mobilitätsverzögerung sichtbar wird. Die Phosphatasebehandlung (hier:  $\lambda$ -Phosphatase) erlaubt durch Dephosphorylierung die Überprüfung der zuvor durch Bestrahlung abgelaufenen Phosphorylierung der Proteine. Wie zu erkennen ist, kommt es bei der Patientin (B-4523) als auch bei der Positivkontrolle (520) jeweils zu einer Mobilitätsverschiebung unter der 12 Gy Bestrahlung, welche durch die Phosphatasebehandlung wieder aufgehoben wird. Bei der verwendeten Negativkontrolle (L6) bleibt diese Mobilitätsverschiebung aus, da in dieser Zelllinie ein Defekt von ATM vorliegt und dies zu keiner Phosphorylierung von Nibrin führt. Offensichtlich erfolgte die Phosphorylierung des Nibrins durch ATM in den Patientenzellen (B-4523) normal.



**Abb. 16: Western Blot zum Nachweis von Nibrin für die Patientenzellen (B-4523) im Vergleich zu einer Positiv-(520) und einer Negativkontrolle (L6).** Die LCLs der drei Zelllinien wurden 60 min. nach der Behandlung mit ionisierender Strahlung in der angegebenen Dosis (Gy) aufgearbeitet. Darüber hinaus erfolgte eine Phosphatasebehandlung (P) je einer bestrahlten Probe pro Zelllinie.

## 3.2.2.2 Nachweis von SMC1 und phospho-SMC1 (Ser957)

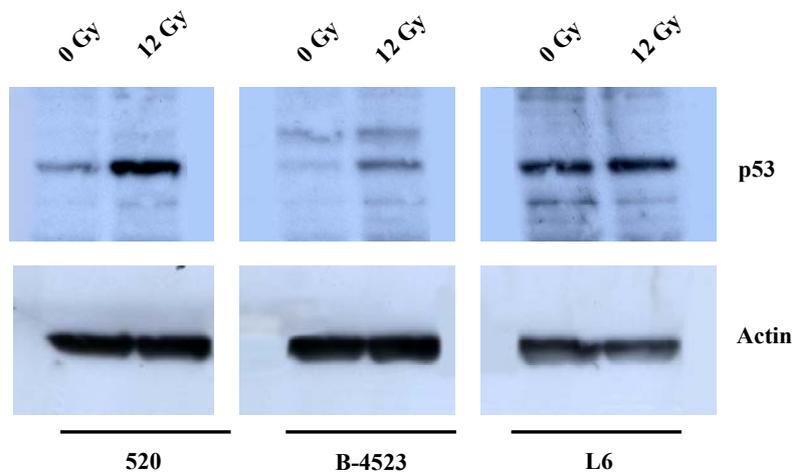
Der Versuchsaufbau wurde in der Abb. 17 mit drei Proben je Zelllinie beibehalten. Die Aufarbeitung erfolgte wie zuvor 60 min. nach der Bestrahlung mit einer Strahlendosis von 12 Gy. Wie bereits bei Nibrin erfolgt auch bei SMC1 eine Phosphorylierung durch ATM unter der Bestrahlung. Phospho-SMC1 wird am Serin-Rest 957 phosphoryliert und kann unter der Verwendung eines spezifischen Antikörpers detektiert werden. Wie ersichtlich wird, ist jeweils nur eine Bande bei der Patientin (B-4523) und bei der Positivkontrolle (520) vorhanden. Bei den unbehandelten sowie den phosphatase-behandelten Proben dieser zwei Zelllinien sowie bei den drei Proben der Negativkontrolle (L6) zeigen sich keine Signale. Als interne Ladekontrolle diente die nicht-phosphorylierte Form von SMC1. Wie der Abbildung weiterhin zu entnehmen ist, wurden eindeutige Signale in annähernd gleicher Stärke je Zelllinie für SMC1 nachgewiesen. Die vorliegenden Ergebnisse deuten auf eine unauffällige ATM-vermittelte Phosphorylierung von SMC1 in den Patientenzellen (B-4523).



**Abb. 17: Western Blot zum Nachweis von phospho-SMC1 (Ser957) sowie SMC1 als Ladekontrolle für die Patientenzellen (B-4523) im Vergleich zu einer Positiv- (520) und einer Negativkontrolle (L6).** Die LCLs der drei Zelllinien wurden 60 min. nach der Behandlung mit ionisierender Strahlung in der angegebenen Dosis (Gy) aufgearbeitet. Darüber hinaus erfolgte eine Phosphatasebehandlung (P) je einer bestrahlten Probe pro Zelllinie.

## 3.2.2.3 Nachweis von p53

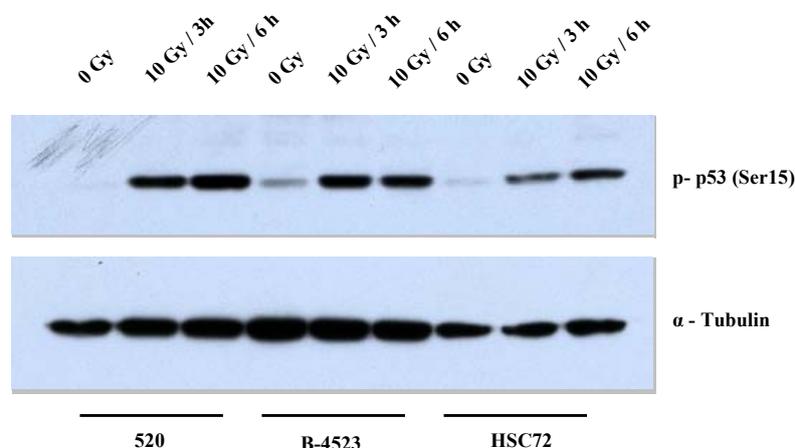
Auch in der Abb. 18 sind drei Zelllinien mit je zwei Proben zu erkennen. Die Aufarbeitung erfolgte wie bereits zuvor 60 min. nach der Behandlung mit ionisierender Strahlung in einer Dosis von 12 Gy. Unter der Bestrahlung kommt es zu einer Aktivierung von p53, welche in einer Intensitätssteigerung der Signale deutlich wird. Wie zu erkennen ist, wurde p53 in der ersten Kontrolle (520), ausgehend von der unbehandelten Probe, unter der Bestrahlung stärker exprimiert. Dieses Bandenprofil zeigte sich auch in der Patientenzelllinie (B-4523), jedoch in einer abgeschwächten Form. Die zweite Kontrolle (L6) zeigte in allen Proben eine annähernd identisch starke Signalintensität. Als interne Ladekontrolle diente  $\beta$ -Actin. Wie der Abbildung weiter zu entnehmen ist, konnten eindeutige Signale in annähernd gleicher Stärke je Zelllinie für  $\beta$ -Actin nachgewiesen werden. Im Vergleich der Zelllinien untereinander wurde jedoch eine geringere Proteinmenge bei den Kontrollproben (L6) deutlich. Die vorliegenden Ergebnisse scheinen darauf hinzudeuten, dass die Stabilisierung von p53 nach einer DNA-Schädigung in den Patientenzellen (B-4523) fehlerhaft ist.



**Abb. 18:** Western Blot zum Nachweis von p53 sowie  $\beta$ -Actin als Ladekontrolle für die Patientenzellen (B-4523) im Vergleich zu einer Positiv- (520) und einer Negativkontrolle (L6). Die LCLs der drei Zelllinien wurden 60 min. nach der Behandlung mit ionisierender Strahlung in der angegebenen Dosis (Gy) aufgearbeitet.

### 3.2.2.4 Nachweis von phospho-p53 (Ser15)

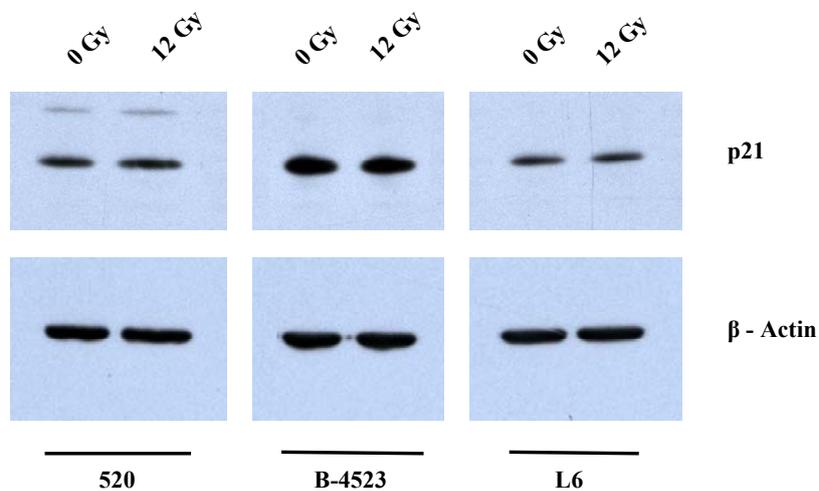
Im folgenden Western Blot (Abb. 19) wurden drei Zelllinien mit je drei Proben aufgetragen. Die Aufarbeitung der Zellen erfolgte 3 h bzw. 6 h nach der Behandlung mit einer Strahlendosis von 10 Gy. Phospho-p53 wird am Serin-Rest 15 phosphoryliert. Wie zu erkennen ist, wurde p53 in den zwei verwendeten Kontrollzelllinien (520, HSC72) mit fortgeschrittener Aufarbeitungszeit nach der Bestrahlung stärker phosphoryliert. Dabei wurde ein deutlicher Anstieg der Bandenintensität zwischen den unbehandelten und den ersten bestrahlten Proben der Kontrollzelllinien verzeichnet, da die unbehandelten Proben kaum sichtbar waren. Darüber hinaus fand sich das Bandenprofil der zweiten Kontrolle (HSC72) in einer gering abgeschwächten Form wieder. Die Patientenzelllinie (B-4523) zeigte ein etwas anderes Profil. Es war bereits bei der unbehandelten Probe deutlich eine Bande zu erkennen. Im Vergleich mit den Kontrollen fand sich auch hier die bereits gesehene Intensitätssteigerung gegenüber der ersten bestrahlten Probe, welche jedoch bei einer späteren Aufarbeitungszeit nicht wie bei den Kontrollen zunahm. Als interne Ladekontrolle diente  $\alpha$ -Tubulin. Wie der Abbildung weiterhin zu entnehmen ist, wurden eindeutige Signale in annähernd gleicher Stärke je Zelllinie für  $\alpha$ -Tubulin nachgewiesen. Im Vergleich der Zelllinien untereinander wurde jedoch eine geringere Proteinmenge bei den zwei Kontrollen gegenüber den Patientenproben (B-4523) sichtbar. Es fand sich darüber hinaus eine geringe Überladung der ersten Proben (0 Gy, 10 Gy/3 h) gegenüber der dritten Probe (10 Gy/6 h) in den Patientenzellen (B-4523). Obwohl die Stabilisierung von p53 nicht korrekt zu sein scheint, liegt dieses wahrscheinlich nicht an einem Fehler in der Phosphorylierung.



**Abb. 19: Western Blot zum Nachweis des phospho-p53 (Ser15) (oben) sowie  $\alpha$ -Tubulin als Ladekontrolle für die Patientenzellen (B-4523) im Vergleich zu zwei Kontrollen (520, HSC72).** Die LCLs der drei Zelllinien wurden 3 h bzw. 6 h nach der Behandlung mit ionisierender Strahlung in der angegebenen Dosis (Gy) aufgearbeitet.

## 3.2.2.5 Nachweis von p21

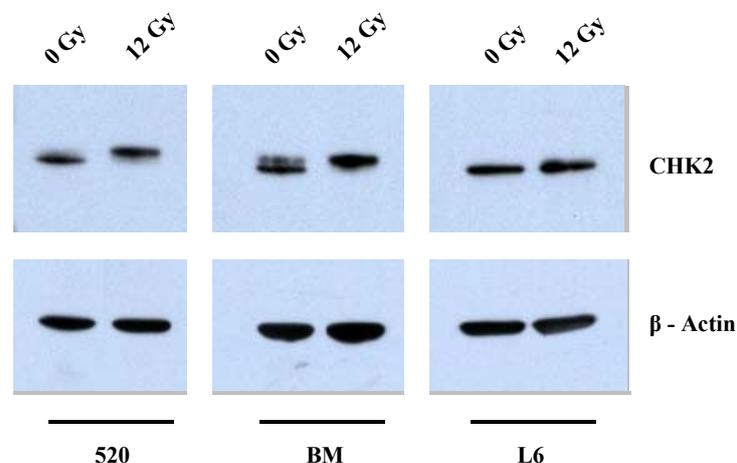
Auch in der Abb. 20 sind drei Zelllinien mit je zwei Proben zu erkennen. Wie zuvor erfolgte die Aufarbeitung 60 min. nach der Behandlung mit ionisierender Strahlung in einer Dosis von 12 Gy. Unter der Bestrahlung kommt es zu einer Aktivierung von p21 durch eine Phosphorylierung am Serin-Rest 146. Wie der Abbildung zu entnehmen ist, fanden sich eindeutige Signale in annähernd gleicher Stärke je Zelllinie für p21 und der internen Ladekontrolle  $\beta$ -Actin. Im Vergleich der Zelllinien untereinander wurde jedoch eine vermehrte Bandenintensität bei den Patientenproben (B-4523) für p21 deutlich. Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf, dass die Menge an p21 in der Patientenlinie (B-4523) im Vergleich zu den Kontrollen bereits ohne Bestrahlung erhöht ist.



**Abb. 20: Western Blot zum Nachweis von p21 (oben) sowie  $\beta$ -Actin (unten) als Ladekontrolle für die Patientenzellen (B-4523) im Vergleich zu zwei Kontrollen (520 und L6). Die LCLs der drei Zelllinien wurden 60 min. nach der Behandlung mit ionisierender Strahlung in der angegebenen Dosis (Gy) aufgearbeitet.**

### 3.2.2.6 Nachweis von CHK2

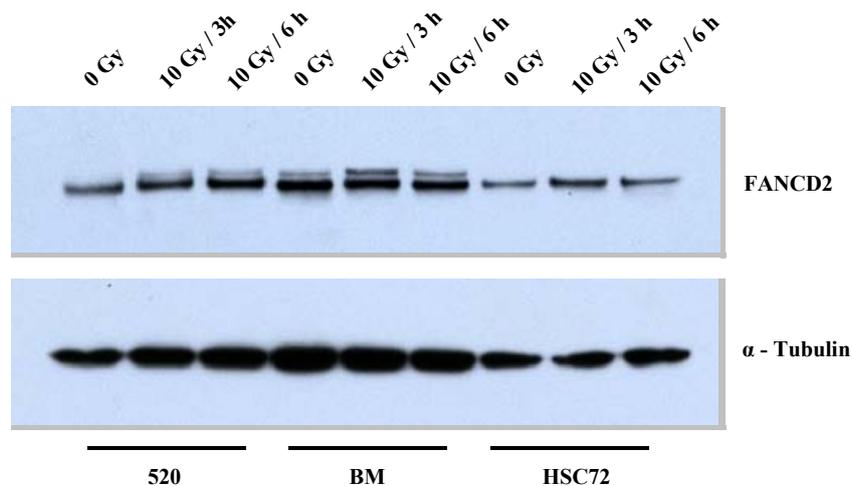
Für die Versuchsanordnung in Abb. 21 wurden jeweils nur zwei Proben je Zelllinie aufgetragen. Die Aufarbeitung erfolgte wie zuvor 60 min. nach der Bestrahlung mit einer Strahlendosis von 12 Gy. CHK2 wird am Threonin-Rest der Position 68 durch ATM phosphoryliert und kann von der nicht-phosphorylierten Form durch eine Mobilitätsverzögerung unterschieden werden. Wie zu erkennen ist, zeigte sich in der Positivkontrolle (520) die zuvor beschriebene Mobilitätsverzögerung deutlich zwischen der unbehandelten und der behandelten Probe. Die Banden der Patientenzelle (B-4523) zeigten im Grunde das zuvor beschriebene Profil, wobei jedoch bereits in der unbehandelten Probe eine Doppelbande sichtbar war. Die verwendete Negativkontrolle (L6) zeigte erwartungsgemäß keine Mobilitätsverzögerung, da hier ein Defekt von ATM vorliegt und es zu keiner Phosphorylierung von CHK2 kommen kann. Als interne Ladekontrolle wurde  $\beta$ -Actin verwendet. Es fanden sich eindeutige Signale in annähernd gleicher Signalstärke je Zelllinie. Scheinbar verursacht der vorliegende Basisdefekt der Patientenzelle (B-4523) bereits eine Phosphorylierung von CHK2 in der unbehandelten Probe, welche zuvor keine zusätzliche Behandlung erhalten hat.



**Abb. 21: Western Blot zum Nachweis von CHK2 sowie  $\beta$ -Actin als Ladekontrolle für die Patientenzellen (B-4523) im Vergleich zu einer Positiv- (520) und einer Negativkontrolle (L6).** Die LCLs der drei Zelllinien wurden 60 min. nach der Behandlung mit ionisierender Strahlung in der angegebenen Dosis (Gy) aufgearbeitet.

### 3.2.2.7 Nachweis von FANCD2

Die Versuchsanordnung in diesem Western Blot (Abb. 22) entspricht dem des Kapitels (3.2.2.4). Die Aufarbeitung erfolgte 3 h bzw. 6 h nach der Behandlung mit einer Strahlendosis von 10 Gy. FANCD2 wird unter der Behandlung monoubiquitiniert, was zu einer Mobilitätsverzögerung gegenüber der nicht-monoubiquitinierten Form führt. Die verwendete Positivkontrolle (520) zeigte unter zunehmender Aufarbeitungszeit nach der Bestrahlung eine stärker auftretende zweite Bande, wobei jedoch die unbehandelte Probe nur die nicht-monoubiquitinierten Form des FANCD2 zeigte. Dieses Bandenprofil findet sich auch in den Proben der Patientelinie (B-4523) wieder, wobei hier jedoch bereits in der unbehandelten Probe eine zweite Bande deutlich sichtbar war. Die verwendete Negativkontrolle (HSC72) lässt aufgrund ihrer Mutation im *FANCC*-Gen keine Monoubiquitinierung zu. Wie deutlich zu sehen ist, fand sich in den Proben jeweils nur die nicht-monoubiquitinierten Form des FANCD2 wieder. Als interne Ladekontrolle wurde  $\alpha$ -Tubulin verwendet. Wie der Abbildung weiterhin zu entnehmen ist, wurden eindeutige Signale in annähernd gleicher Stärke je Zelllinie für  $\alpha$ -Tubulin nachgewiesen. Im Vergleich der Zelllinien untereinander wurde jedoch eine geringere Proteinmenge bei den zwei Kontrollen gegenüber den Patientenproben (B-4523) deutlich. Es fand sich darüber hinaus eine geringe Überladung der ersten Proben (0 Gy, 10 Gy/3 h) gegenüber der dritten Probe (10 Gy/6 h) in den Patientenzellen (B-4523). Der Basisdefekt der Patientenzellen (B-4523) hat scheinbar keinen Einfluss auf die durch DNA-Schäden ausgelöste zusätzliche Monoubiquitinierung von FANCD2.

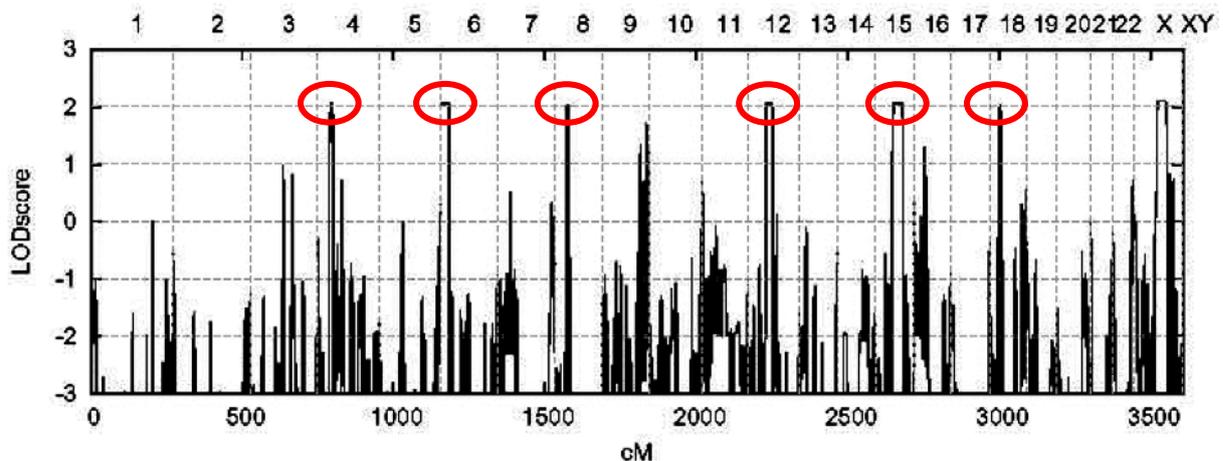


**Abb. 22: Western Blot zum Nachweis von FANCD2 sowie  $\alpha$ -Tubulin als Ladekontrolle für die Patientenzellen (B-4523) im Vergleich zu einer Positiv- (520) und einer Negativkontrolle (HSC72).** Die LCLs der drei Zelllinien wurden 3 h bzw. 6 h nach der Behandlung mit ionisierender Strahlung in der angegebenen Dosis (Gy) aufgearbeitet.

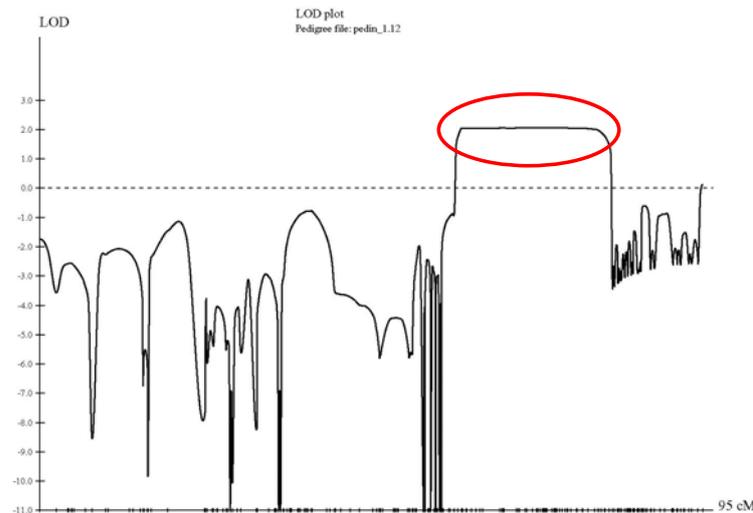
### 3.3 DNA-Analysen

#### 3.3.1 Homozygoty-Mapping

In dem bereits am Max-Delbrück-Zentrum durchgeführten „Homozygoty-Mapping“ mittels SNP's („Single Nucleotide Polymorphismen“) wurde der Affymetrix 10K GeneChip und die DNA einiger Familienmitglieder verwendet. Dabei lag die DNA der Betroffenen (B-4523 und MD), sowie der gesunden Eltern (4524 und 4525) und Geschwister (4519 und 4521) vor. Wie erwartet zeigten sich bei dem SNP-mapping mehrere kleine homozygote Regionen (<12 SNP's) auf Chromosomen vier, sechs, acht, fünfzehn und achtzehn bei der Betroffenen (B-4523) (Abb. 23). Besonders viel versprechend war jedoch eine große chromosomale Region auf Chromosom 12, in dem 84 aufeinander folgende homozygote SNP's bei den Betroffenen (B-4523 und MD) zu finden waren, in dem sich die Lokalisation des bei der Patientin (B-4523) mutierten Gens vermuten lassen konnte (Abb. 24). Der LODscore für die Kopplungsanalyse erreichte unter diesen Verwandten den theoretischen Maximalwert von 2,05.

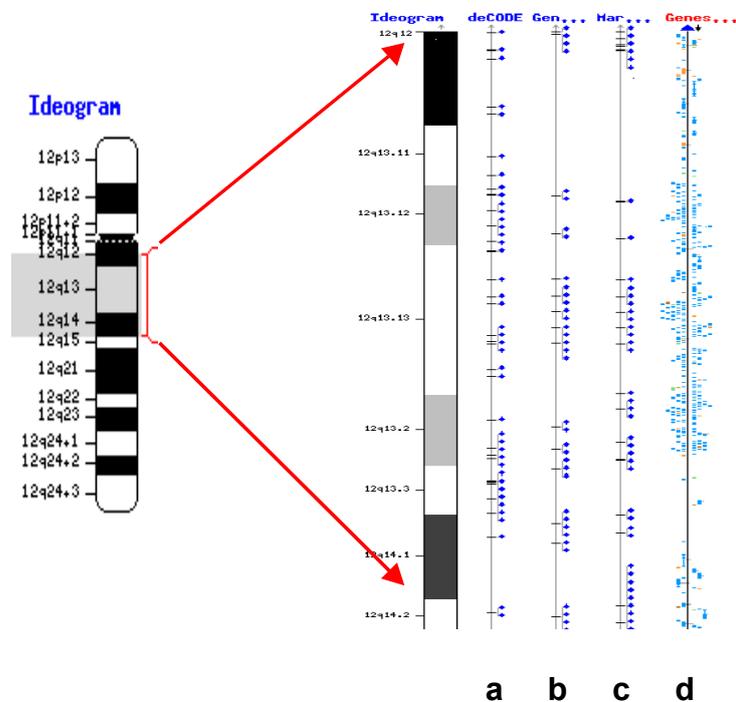


**Abb. 23: Genomweite LODscore-Kurve der Patientin (B-4523).** Dieses Diagramm zeigt die Ergebnisse der Kopplungsanalyse. Die untere X-Achse zeigt die Distanz zwischen zwei Loci, die obere X-Achse verweist auf die Chromosomen. Auf der Y-Achse wird der LOD-Score angegeben. Auf Chromosomen vier, sechs, acht, zwölft, fünfzehn und achtzehn wurden jeweils die höchsten LOD-Scores mit einem Wert von 2,05 gefunden.



**Abb. 24: LODscore-Kurve des Chromosoms 12 der Patientin 4523.** In diesem Diagramm verweist die X-Achse auf die SNP's, der LOD-Score von 2,05 wird in der Y-Achse dargestellt. Die in Rot markierte Region verweist auf den Bereich mit dem höchsten LOD-Score, in dem 84 aufeinander folgende homozygote SNP's zu finden waren.

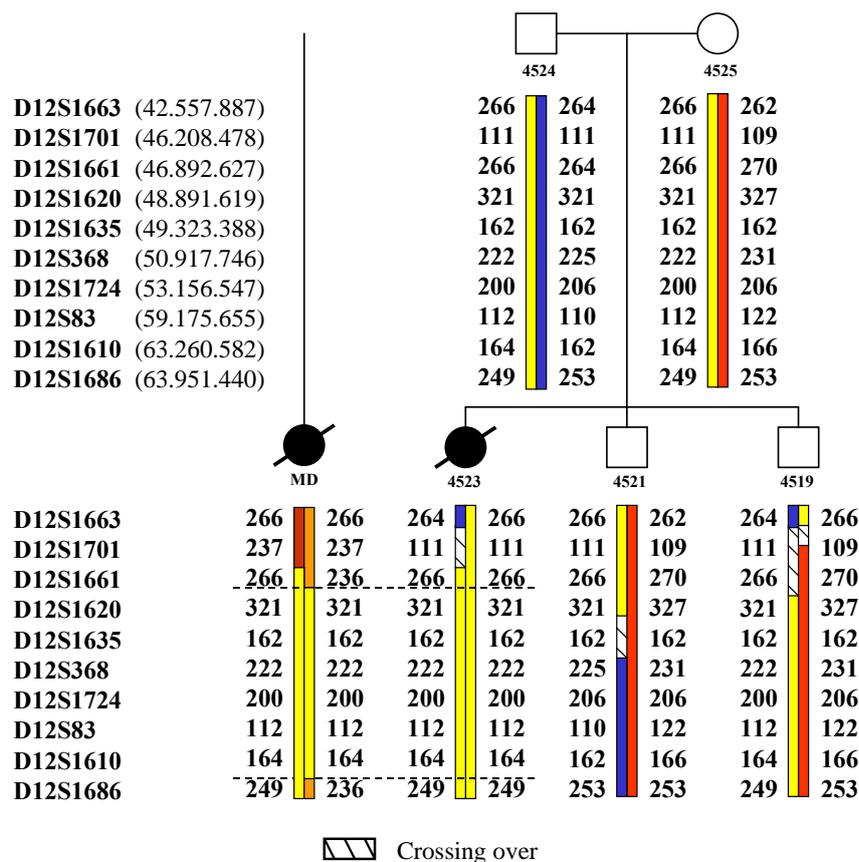
Eingegrenzt wurde diese Region durch die SNP's A-1518431 und A-15417298, dessen Positionen den Mikrosatelliten D12S1589 und D12S335 entsprechen. Die Region hat eine Größe von 21,10 cM und enthält 397 Gene (NCBI Map Viewer) (Abb. 25).



**Abb. 25: Menschliches Chromosom 12.** Angegeben sind einige Positionen von Mikrosatelliten-Markern (a, b, c) und bekannten bzw. hypothetischen Genen (d) (NCBI Map Viewer) die zwischen den Positionen D12S1589 und D12S335 liegen.

### 3.3.2 Feinkartierung

Aufgrund der multiplen Allelie haben Mikrosatelliten eine höhere Informativität als SNP's. Zu erwarten war, dass die Grenzen der fraglichen Region eingengt werden konnten. Es wurde eine Feinkartierung, mit zunächst sieben ausgewählten Mikrosatellitenpaaren aus dieser Region, bei der Patientin (B-4523) und deren Angehörigen (Vater 4524, Mutter 4525, Brüder 4519 und 4521, sowie Cousine MD), durchgeführt. Angesichts dieser Analyse konnte eine neue kleinere homozygote Region ermittelt werden. Dieser Bereich wurde durch die Positionen D12S1661 und D12S1686 flankiert, hatte eine Größe von 12,31 cM und enthielt 329 Gene. Aufgrund des immer noch großen Bereiches und der bestehenden Lokalisationsungenauigkeit bei der Cousine (MD), wurden drei weitere Mikrosatelliten (D12S1635, D12S368 und D12S1610) eingesetzt, um den in Frage kommenden Bereich weiter zu verkleinern. Dies konnte jedoch nicht erreicht werden, da die Analyse der Mikrosatelliten eine Homozygotie bei der Patientin (B-4523) sowie der Cousine (MD) zeigte (Abb. 26).



**Abb. 26: Mikrosatelliten-Feinkartierung des Chromosoms 12 der betroffenen Familie.** Die farbigen Balken geben die Verteilung der mütterlichen (4525) bzw. väterlichen (4524) Allele an. Schraffierte Flächen zeigen den Ort eines Crossing overs an. Aufgrund von Konsanguinität in der Familie konnte ein homozygoter Bereich zwischen dem Mikrosatelliten D12S1661 und D12S1686 bei der Cousine (MD) und der betroffenen Patientin (B-4523) lokalisiert werden.

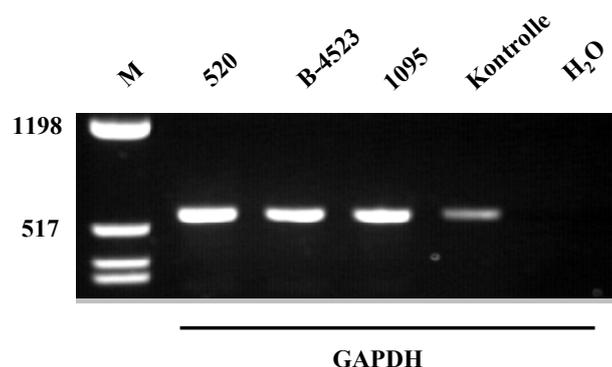
Dieser Bereich war deshalb interessant, da es zwei identisch homozygote Allelbereiche bei der Patientin (B-4523) und der Cousine (MD) enthält, welche beide durch die Verwandtenehe in dieser Familie beibehalten wurden (siehe Stammbaum Abb. 5).

### 3.3.3 Kandidatengenscreening

In die nähere Auswahl kamen die Gene, deren Funktionen in Bereichen der DNA-Reparatur, Zellzyklus-Regulation, Signaltransduktion, Zelldifferenzierung, Zellwachstum oder Apoptose liegen. Unter den 329 Genen waren 68 hypothetische Gene mit unbekanntem Aufgaben, 221 Gene, welche man direkt ausschließen konnte bzw. die infolge ihrer Funktion unwahrscheinlich waren, sowie 40 mögliche oder nicht bewertbare Gene. Die im Folgenden acht Gene kamen als direkte Kandidatengene in Betracht und wurden auf Mutationen oder Veränderungen auf cDNA-Ebene hin untersucht: DDX23, SMUG1, CDK2, PA2G4, RBMS2, DDIT3, CDK4 und XRCC6BP1 (siehe Tab. 18 im Anhang)

### 3.3.4 RT-PCR-Kontrolle durch GAPDH-Amplifizierung

Zur Ermittlung einer erfolgreichen Umschreibung der RNA in cDNA mittels der reversen Transkription wurde eine Amplifikation des *GAPDH*-Genabschnittes durchgeführt. Es handelte sich hierbei um ein so genanntes „Housekeeping“-Gen (HKG), welches in nahezu allen Zellen exprimiert wird.



**Abb. 27: Gelelektrophoretische Auftrennung der Produkte aus der *GAPDH*-Amplifikation.** Spur 1: Marker; 2: erste Kontrolle (520); 3: Patientin (B-4523); 4: zweite Kontrolle (1095); 5: dritte Kontrolle; 6: Leerwertkontrolle der PCR

In der Abb. 27 sind die *GAPDH*-Produkte der Patientin (B-4523) und der verwendeten Kontrollen zu sehen. Die PCR-Produkte der ersten drei Proben zeigten keine Unterschiede in den Bandenintensitäten. Die vierte Kontrolle wies eine etwas schwächere Bande auf. Abgesehen davon deuteten die Ergebnisse auf eine einheitliche Ausgangskonzentration der einzelnen Proben hin. Die Leerwertkontrolle (H<sub>2</sub>O) blieb erwartungsgemäß frei von Produkten.

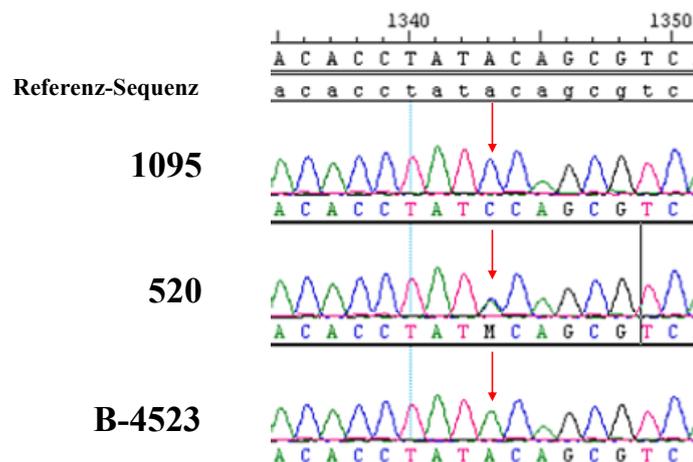
### 3.3.5 Auswertung der Kandidatengene

Durch die verwendeten Primerpaare in diesem Abschnitt wurden Amplikons in einer Größe von max. 800 Basenpaaren hergestellt. Die Größe der Amplikons wurde durch die verwendete Kapillarlänge begrenzt, was die Leseweite des Sequenzierers einschränkte. Bei cDNAs die diese Größe überschritten, wurden mehrere untereinander überlappende Primerpaare entworfen, um eine saubere Sequenzanalyse zu ermöglichen. Dabei wurde darauf geachtet, dass der gesamte offene Leserahmen („open reading frame“, ORF), welcher die Sequenz der zu kodierenden Proteine enthält, erfasst wurde.

Für die Herstellung der Amplikons wurden Touch-Down-PCR's mit dem Standard-PCR-Ansatz durchgeführt. Die PCR's liefen in 35 Zyklen, wobei die Annealing-Temperatur in den ersten fünf Zyklen jeweils um ein Grad Celsius auf die in der Tab. 9 genannten Annealing-Temperaturen gesenkt wurden. In den gezeigten PCR-Gelen wurde stets mit der gleichen Probenabfolge gearbeitet: 1. Spur: Marker; 2. Spur: erste Kontrolle (520); 3. Spur: Patientin (B-4523); 4. Spur: zweite Kontrolle (1095); 5. Spur: Leerwert (H<sub>2</sub>O). Verwendet wurde ein 1,5% Agarosegel. Alle hier verwendeten Primer wurden mit Hilfe des Programms „Clone Manager 6" und der Referenz-mRNA der NCBI-Datenbank erstellt. Die Proben wurden anschließend enzymatisch aufgereinigt und die Sequenzierungsreaktion mit dem Standard-Sequenzierungsansatz durchgeführt. Es folgte die Fällung mit dem Präzipitationsmix und die Lösung in 20 µl H<sub>2</sub>O. Die Proben wurden anschließend in einem Kapillarsequenziergerät sequenziert. Die Auswertung der vierfarbigen Ergebnisse erfolgte mittels der Software „Sequencing Analysis 3.4.1".

### 3.3.5.1 DDX23 („DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 23“)

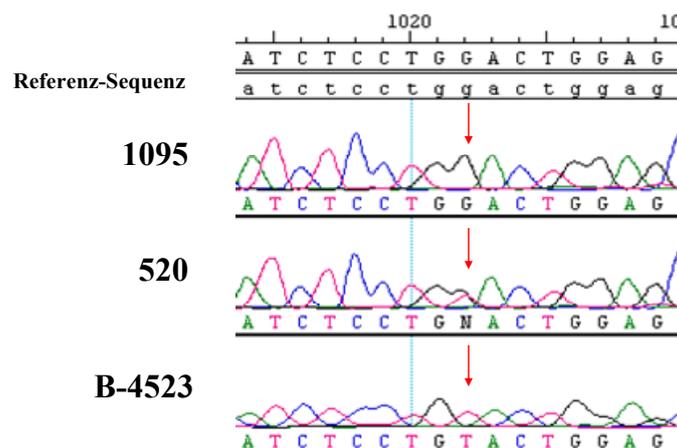
*DDX23* liegt auf Chromosom 12q13.12 und hat Aufgaben im Zellzyklus und in der Zellproliferation. Es liegt zwischen den Basenpaaren (bp) 47.509.806 und 47.532.224 und hat eine Gesamtgröße von 22418 bp mit 17 Exons. Die Referenz-mRNA besteht aus 3288 bp mit einem offenen Leserahmen von 2462 bp. Es wurden die folgenden sechs Primerpaare ausgewählt: *DDX23\_1* (533 bp), *DDX23\_2* (459 bp), *DDX23\_3* (544 bp), *DDX23\_4* (526 bp), *DDX23\_5* (504 bp) und *DDX23\_6* (494 bp). Alle PCR-Produkte, je drei pro Primerpaar, zeigten eine einzelne saubere Bande in der zu erwartenden Größe. Die Leerwertkontrollen (H<sub>2</sub>O) waren frei von Produkten. Die Auswertung des *DDX23*-Gens ergab einen bereits bekannten Polymorphismus bei Position 1343 für eine der Kontrollen (1095). Hierbei lag eine Homozygotie für Cytosin (C) vor. Die zweite Kontrolle (520) besitzt an dieser Position eine Heterozygotie von Adenin (A) und Cytosin (C). Die Patientinlinie (B-4523) wies keine Veränderungen zur Referenzsequenz von *DDX23* auf und ist homozygot für Adenin (A) (Abb. 28), wobei die Homozygotität erwartet wurde.



**Abb. 28: *DDX23*-Sequenzausschnitt mit dem gefundenen Polymorphismus an Position 1343.** Zu sehen ist (→) der Polymorphismus bei der Kontrolle (1095) die an dieser Position homozygot für Cytosin (C) ist. Die Kontrolle (520) ist heterozygot mit Adenin (A) und Cytosin (C), wobei die Patientin (B-4523) homozygot für Adenin (A) ist.

### 3.3.5.2 SMUG1 („single-strand-selective monofunctional uracil-DNA glycosylase 1“)

*SMUG1* liegt auf Chromosom 12q13.11-q13.3 und gehört in die Gruppe der DNA-Reparaturgene. Es liegt zwischen den Basenpaaren 52.861.519 und 52.869.024 und hat eine Gesamtgröße von 7505 bp mit 4 Exons. Die Referenz-mRNA besteht aus 1570 bp mit einem offenen Leserahmen von 812 bp. Für *SMUG1* wurden zwei Primerpaare, *SMUG1\_1* (581 bp) und *SMUG1\_2* (523 bp), ausgewählt. Bei der Analyse der Sequenzen wurde ein bereits bekannter Polymorphismus an Position 1022 gefunden. Dieser betraf die Proben der Patientin (B-4523) und der Kontrolle (520). Hierbei wurde bei der Patientin (B-4523) eine Homozygotie für Thymin (T) festgestellt. Die Kontrolle (520) wies an dieser Position eine Heterozygotie von Guanin (G) und Thymin (T) auf (Abb. 29). Weitere Veränderungen wurden in den Sequenzen von *SMUG1* nicht beobachtet.

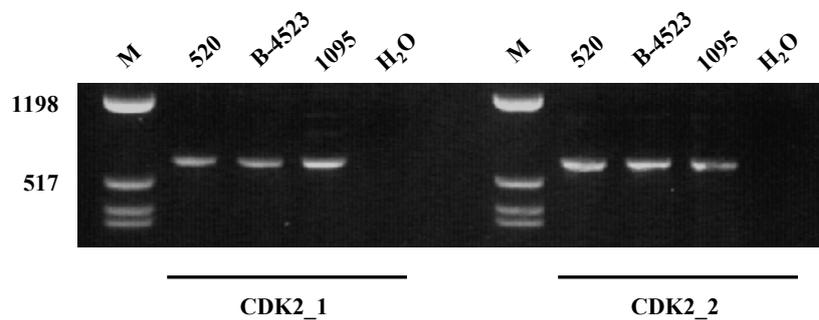


**Abb. 29: *SMUG1*-Sequenzausschnitt mit den gefundenen Polymorphismen an Position 1022.** Zu sehen ist (→), dass die Kontrolle (1095) an dieser Position homozygot für Guanin (G) ist. Die Kontrolle (520) ist heterozygot mit Guanin (G) und Thymin (T), wobei die Patientin (B-4523) homozygot für Thymin (T) ist.

### 3.3.5.3 CDK2 („cyclin-dependent kinase 2“)

*CDK2* liegt auf Chromosom 12q13 und ist im Zellzyklus und der Zellproliferation integriert. Es liegt zwischen den Basenpaaren 54.656.826 und 54.652.835 und hat eine Gesamtgröße von 6009 Basenpaaren mit 7 Exons. Die Referenz-mRNA besteht aus 2328 bp mit einem offenen Leserahmen von 896 bp. Für *CDK2* wurden zwei Primerpaare, *CDK2\_1* (597 bp) und *CDK2\_2* (600 bp), ausgewählt. Wie in Abb. 30 erkennbar ist, waren die Produkte der zwei verwendeten Primerpaare *CDK2\_1* und

*CDK2\_2* deutlich und ohne störende Nebenbanden. Die Leerwertkontrollen (H<sub>2</sub>O) waren erwartungsgemäß frei von Produkten.

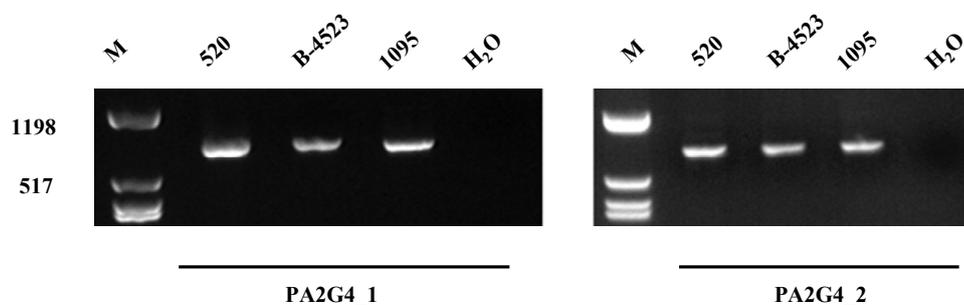


**Abb. 30: Gelelektrophoretische Auftrennung der Produkte aus der *CDK2*-Amplifikation.** Spur 1: Marker (pSP65); 2: erste Kontrolle (520); 3: Patientin (B-4523); 4: zweite Kontrolle (1095); 5: Leerwertkontrolle.

Die Auswertung der Patientensequenzen (B-4523), sowie die der Kontrollen (520 und 1095) ergaben im direkten Vergleich mit der Referenz-mRNA von *CDK2* keine Veränderungen oder Auffälligkeiten.

### 3.3.5.4 PA2G4 („proliferation-associated 2G4“)

*PA2G4* liegt auf Chromosom 12q13 und hat seine Aufgaben im Zellzyklus und der Zellproliferation. Es liegt zwischen den Basenpaaren 54.784.692 und 54.793.353 und hat eine Gesamtgröße von 8661 Basenpaaren mit 13 Exons. Die Referenz-mRNA besteht aus 1697 bp mit einem offenen Leserahmen von 1184 bp. Für *PA2G4* wurden zwei Primerpaare, *PA2G4\_1* (634 bp) und *PA2G4\_2* (704 bp), ausgewählt. Wie in Abb. 31 erkennbar ist, waren die Produkte der zwei verwendeten Primerpaare *PA2G4\_1* und *PA2G4\_2* deutlich und ohne störende Nebenbanden. Die Leerwertkontrollen (H<sub>2</sub>O) waren erwartungsgemäß frei von Produkten.

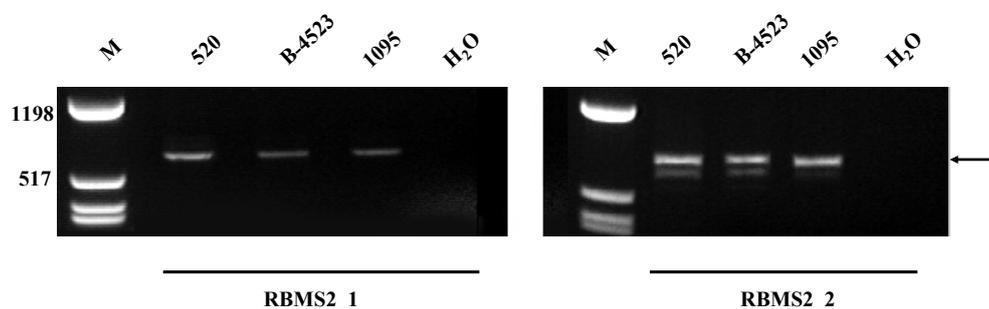


**Abb. 31: Gelelektrophoretische Auftrennung der Produkte aus der *PA2G4*-Amplifikation.** Spur 1: Marker (pSP65); 2: erste Kontrolle (520); 3: Patientin (B-4523); 4: zweite Kontrolle (1095); 5: Leerwertkontrolle.

Bei der Auswertung der Sequenzen fanden sich jeweils, im direkten Vergleich mit der Referenz-mRNA von *PA2G4*, zwei Auffälligkeiten. Diese betrafen nicht nur die Patientensequenz (B-4523), sondern auch die zwei Kontrollsequenzen (520 und 1095). Bei der ersten Position 235 wurde eine Homozygotie von Guanin (G) anstelle von Cytosin (C) vorgefunden. Dieser Polymorphismus ist bereits bekannt und hat keinen Einfluss auf die Struktur oder Funktion des Proteins. Die zweite Auffälligkeit ist bei Position 1238. Hier wurde wieder Homozygotie für Guanin (G) anstelle von Cytosin (C) in der Patienten- (B-4523), sowie den zwei Kontrollsequenzen (520 und 1095), vorgefunden. Dieser Polymorphismus hat zur Folge, dass es zu einem Aminosäureaustausch von Prolin zu Alanin kommt. Jedoch ist auch dies bereits in der Literatur beschrieben worden.

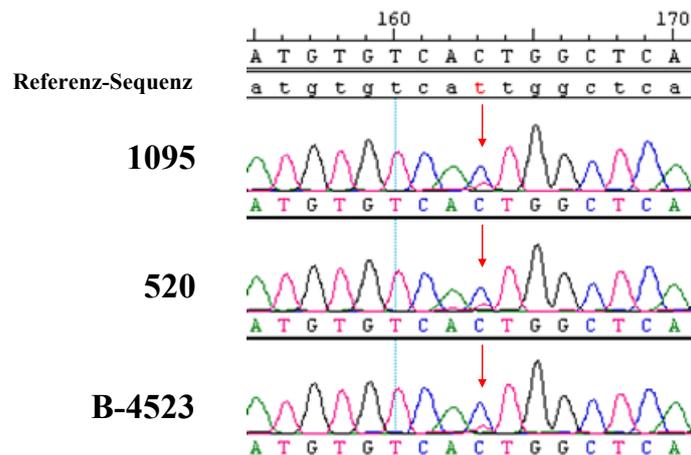
### 3.3.5.5 RBMS2 („RNA binding motif, single stranded interacting protein 2“)

*RBMS2* liegt auf Chromosom 12q13.3 zwischen den Basenpaaren 55.201.993 und 55.269.875 und im Zellzyklus und der Zellproliferation involviert. Es hat eine Gesamtgröße von 67394 Basenpaaren mit 14 Exons. Die Referenz-mRNA besteht aus 1997 bp mit einem offenen Leserahmen von 1223 bp. Für *RBMS2* wurden zwei Primerpaare, *RBMS2\_1* (613 bp) und *RBMS2\_2* (800 bp), ausgewählt. Wie in Abb. 32 erkennbar ist, waren die Produkte des verwendeten Primerpaares *RBMS2\_1* deutlich und ohne störende Nebenbanden. Die Produkte des *RBMS2\_2*-Primerpaares zeigten eine zweite unterhalb der erwarteten Bande (←) liegende Bande. Die Leerwertkontrollen (H<sub>2</sub>O) waren bei beiden Primerpaaren erwartungsgemäß frei von Produkten.



**Abb. 32: Gelelektrophoretische Auftrennung der Produkte aus der *RBMS2*-Amplifikation.** Spur 1: Marker (pSP65); 2: erste Kontrolle (520); 3: Patientin (B-4523); 4: zweite Kontrolle (1095); 5: Leerwertkontrolle.

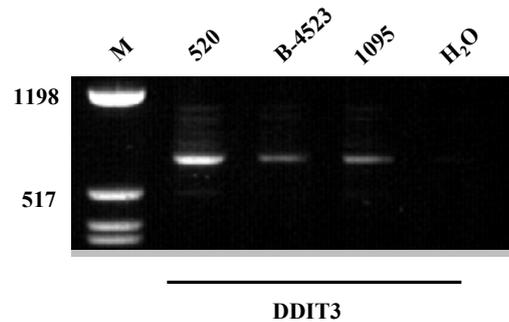
Die Proben des *RBMS2\_1* Primers wurden enzymatisch aufgereinigt. Die Produkte der *RBMS2\_2*-Primer wurden mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit aufgearbeitet. Dadurch wurden die gewünschten Produkte, welche in der oberen Bande vorlagen (←), aus dem Gel extrahiert und für die Sequenzierung gewonnen. Die Auswertung der Sequenzen ergab im Vergleich zu der Referenz-mRNA von *RBMS2* einen Unterschied in allen drei Proben. Es lag eine Homozygotie für Cytosin (C) anstelle von Thymin (T) an Position 163 vor (Abb. 33). Dieser Polymorphismus wurde bereits in der Literatur beschrieben und bedingt keine Veränderung der Proteinstruktur.



**Abb. 33: *RBMS2*-Sequenzausschnitt mit den gefundenen Polymorphismen an Position 163.** Zu sehen ist (→), dass alle drei Proben (1095, 520 und B-4523) an Position 163 Homozygot für Cytosin (C) sind.

### 3.3.5.6 *DDIT3* („DNA-damage-inducible transcript 3“)

*DDIT3* liegt auf Chromosom 12q13.1-q13.2 und gehört in die Gruppe der DNA-Reparaturgene. Es liegt zwischen den Basenpaaren 56.196.638 und 56.200.567 und hat eine Gesamtgröße von 3917 Basenpaaren mit 4 Exons. Die Referenz-mRNA besteht aus 927 bp mit einem offenen Leserahmen von 509 bp. Für *DDIT3* wurde ein Primerpaar mit einer Größe von 665 bp ausgewählt. Wie in Abb. 34 erkennbar ist, waren die Produkte des verwendeten Primerpaares deutlich und ohne störende Nebenbanden. Die Leerwertkontrolle (H<sub>2</sub>O) war erwartungsgemäß frei von Produkten.

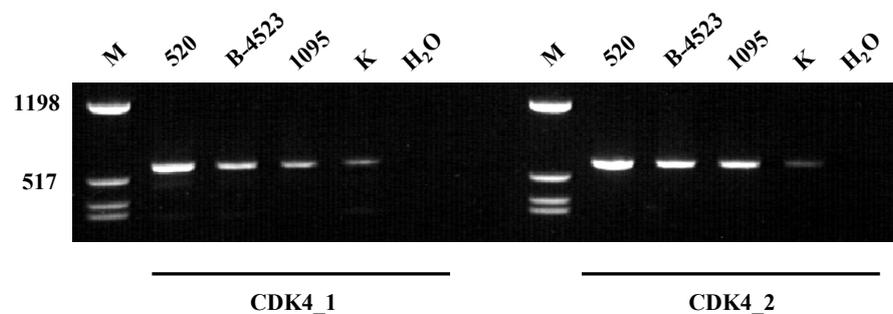


**Abb. 34: Gelelektrophoretische Auftrennung der Produkte aus der *DDIT3*-Amplifikation.** Spur 1: Marker (pSP65); 2: erste Kontrolle (520); 3: Patientin (B-4523); 4: zweite Kontrolle (1095); 5: Leerwertkontrolle.

Die Proben wurden enzymatisch aufgereinigt und mit dem Standard-Sequenzierungsansatz sequenziert. Es folgte die Fällung mit dem Präzipitationsmix und Lösung in 20 µl EDTA. Die Auswertung der Patientensequenzen (B-4523), sowie die der Kontrollen (520 und 1095) ergaben im direkten Vergleich mit der Referenz-mRNA-Sequenz von *DDIT3* keine Veränderungen oder Auffälligkeiten.

### 3.3.5.7 CDK4 („cyclin-dependent kinase 4“)

*CDK4* liegt auf Chromosom 12q14 und ist wie bereits *CDK2* im Zellzyklus und der Zellproliferation involviert. Es liegt zwischen den Basenpaaren 56.428.270 und 56.432.431 und hat eine Gesamtgröße von 4159 Basenpaaren mit 7 Exons. Die Referenz-mRNA besteht aus 1474 bp mit einem offenen Leserahmen von 911 bp. Für *CDK4* wurden zwei Primerpaare, *CDK4\_1* (571 bp) und *CDK4\_2* (589 bp), ausgewählt. Wie in Abb. 35 erkennbar ist, waren die Produkte der zwei verwendeten Primerpaare deutlich und ohne störende Nebenbanden. Die Leerwertkontrollen ( $H_2O$ ) waren erwartungsgemäß frei von Produkten.

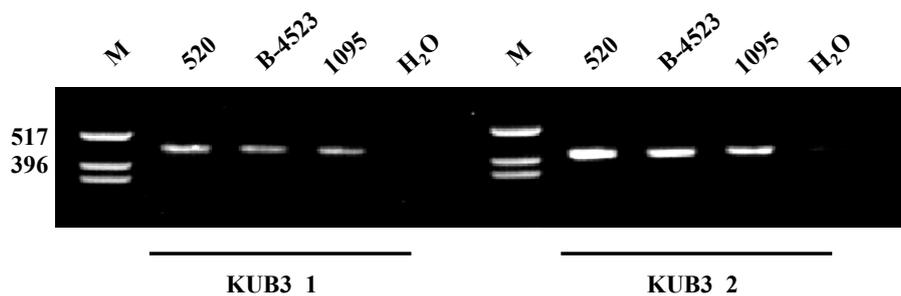


**Abb. 35: Gelelektrophoretische Auftrennung der Produkte aus der *CDK4*-Amplifikation.** Spur 1: Marker (pSP65); 2: erste Kontrolle (520); 3: Patientin (B-4523); 4: zweite Kontrolle (1095); 5: dritte Kontrolle (K); 6: Leerwertkontrolle der PCR

Die Auswertung der Patientensequenzen (B-4523), sowie die der Kontrollen (520, 1095 und K) ergaben im direkten Vergleich mit der Referenz-mRNA-Sequenz von *CDK4* keine Veränderungen oder Auffälligkeiten.

### 3.3.5.8 XRCC6BP1 (“X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 6 binding protein”) (KUB3)

*XRCC6BP1* liegt auf Chromosom 12q14.1 und ist, wie bereits *SMUG1* und *DDIT3*, in der DNA-Reparatur involviert. Es liegt zwischen den Basenpaaren 56.621.712 und 56.637.319 und hat eine Gesamtgröße von 15607 Basenpaaren mit 6 Exons. Die Referenz-mRNA besteht aus 1182 bp mit einem offenen Leserahmen von 740 bp. Für *XRCC6BP1* (*KUB3*) wurden zwei Primerpaare, *KUB3\_1* (453 bp) und *KUB3\_2* (410 bp), ausgewählt. Wie in Abb. 36 erkennbar ist, waren die Produkte der zwei verwendeten Primerpaare deutlich und ohne störende Nebenbanden. Die Leerwertkontrollen (H<sub>2</sub>O) waren erwartungsgemäß frei von Produkten.



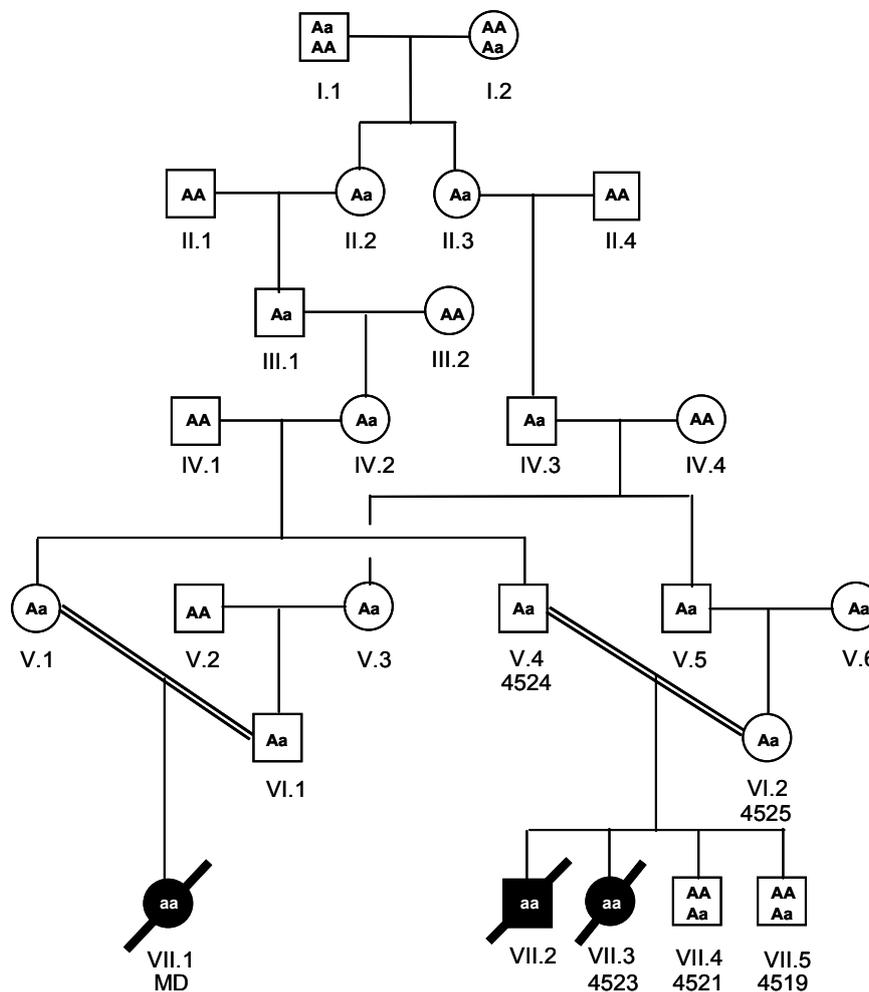
**Abb. 36: Gelelektrophoretische Auftrennung der Produkte aus der *XRCC6BP1* (*KUB3*)-Amplifikation.** Spur 1: Marker (pSP65); 2: erste Kontrolle (520); 3: Patientin (B-4523); 4: zweite Kontrolle (1095); 5: Leerwertkontrolle.

Bei der Auswertung der Sequenzen wurden zwei bekannte Polymorphismen vorgefunden, welche eine der Kontrollen (520) betrafen. Es wurde an Position 182 eine Homozygotie für Thymin (T) anstelle von Adenin (A) vorgefunden, sowie an Position 739 wo Homozygotie für Thymin (T) anstatt von Cytosin (C) vorlag. Die zwei Basenaustausche bedingen jedoch keinen Aminosäureaustausch und somit keine Änderung der Proteinstruktur. Die Patientin (B-4523) sowie die zweite Kontrolle (1095) wiesen keinen Unterschied zur Referenz-mRNA von *XRCC6BP1* (*KUB3*) auf.

## 4 Diskussion

### 4.1 Familie M: Autosomal rezessive Vererbung einer Krebs-disponierenden Genmutation

In der vorliegenden Dissertation wurde die Familie M (Abb. 37) vorgestellt, welche durch die Erkrankung von drei Familienmitgliedern auffällig geworden ist. Unter den drei Betroffenen befindet sich ein Geschwisterpärchen, bestehend aus einem Jungen (VII.2) und einem Mädchen (VII.3; B-4523), sowie eine Cousine (VII.1; MD) 1. Grades.



**Abb. 37: Stammbaum der Familie M.** In der Abbildung sind die drei betroffenen Familienmitglieder und ihr Verwandtschaftsverhältnis zu sehen. Deutlich ist eine Konsanguinität erkennbar, welche vermehrt bei autosomal rezessiven Erkrankungen vorhanden ist. Die mutmaßlichen Genotypen am Ort des Krankheitsgens sind angegeben.

Wie man dem Stammbaum (Abb. 37) entnehmen kann, besteht eine Konsanguinität unter den Eltern und den Großeltern der Betroffenen von väterlicher als auch von mütterlicher Seite in der 5. bzw. 6. Generation. Die Betroffenen selbst stammen aus der 7. Generation. Weiterhin kann man dem Stammbaum entnehmen, dass in der Familie M zuvor keine erkrankten Personen dokumentiert wurden. Zwei weitere Geschwisterkinder (VII.4 und VII.5) der zwei betroffenen Geschwisterkinder (VII.2 und VII.3) sind gesund. Die bestehende Konsanguinität unter den Eltern und Großeltern der Erkrankten weist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf eine autosomal rezessive Erkrankung, wie durch die Genotypen in Abb. 37 angedeutet wird.

Zu den Hauptsymptomen der Krankheit zählen Mikrozephalie, Wachstumsretardierung, Immundefizienz und eine Krebsprädisposition. Als Ursache für den vorliegenden Phänotyp kommt eine Vielzahl an möglichen genetisch bedingten Erkrankungen in Frage, die in einem ähnlichen Phänotyp resultieren.

Eines der vorliegenden Hauptsymptome bei den Patienten ist die Mikrozephalie. Es gibt viele Gründe, welche zu einem verminderten Gehirnwachstum führen können. Eine der wahrscheinlichsten Ursachen resultiert in einer reduzierten Anzahl neuronaler Zellen als Konsequenz aus einer verringerten Zellproliferation oder einem vermehrten Zelltod (Mochida and Walsh, 2001). Die Mikrozephalie kann in eine primäre und sekundäre Mikrozephalie unterschieden werden. Von einer primären Form spricht man, wenn bereits bei der Geburt eine Mikrozephalie manifest ist, wohingegen sich die sekundäre Mikrozephalie erst postnatal entwickelt (Woods, 2004). Ursachen sowohl für die primäre als auch für die sekundäre Form der Mikrozephalie sind zahlreich. So kann der Ursprung bereits kongenital sein oder durch exogene Faktoren, wie z. B. Alkoholmissbrauch während der Schwangerschaft, verursacht werden.

Eine sehr häufig auftretende genetische Ursache für eine primäre Mikrozephalie liegt in der Mutation eines der *MCPH*-Gene, auch „echte Mikrozephalien“ genannt. Diese Formen der Mikrozephalie werden autosomal rezessiv vererbt. Dabei ist zu beachten, dass die Definition der „echten Mikrozephalie“ die Anwesenheit weiterer kongenitaler schwerer Fehlbildungen oder neurologische Defizite ausschließt. Ausgenommen davon sind mentale Retardierungen, welche durch die Mikrozephalie selbst bedingt sind (Woods et al., 2005). Bisher wurden sieben *MCPH*-Loci lokalisiert. Drei dieser Proteine

(MCPH3/MCPH5/MCPH6) haben direkte Assoziationen mit dem Spindelapparat und den Zentrosomen. Jedoch findet sich in der hier vorgestellten Familie M die Mikrozephalie als ein Symptom unter vielen, eine direkte Beziehung zwischen den *MCPH*-Genen und den vorliegenden Erkrankten kommt daher wahrscheinlich nicht in Betracht.

Wie bereits für den Fall der Mikrozephalie müssen auch die zuvor erwähnten Hauptsymptome, darunter die Wachstumsretardierung, die Immundefizienz und die Krebsprädisposition, als ein Komplex zusammenhängender Faktoren gesehen werden. So war zum einen die Mikrozephalie und die Wachstumsretardierung zur Geburt noch nicht offensichtlich, manifestierte sich jedoch im Laufe der Entwicklung. Die Immundefizienz führte zu häufigen Pneumonien und bronchialen Infekten. Bei mindestens einer der Erkrankten führte ein Lymphom zum Tode.

Die Ursache der Erkrankung mit ihrem komplexen Erscheinungsbild darf nicht einem der spezifischen Gene (z. B. die *MCPH*-Gene) zugeordnet werden, welches jeweils für eine der auftretenden Hauptsymptome verantwortlich ist. Vielmehr ist eine übergeordnete Ebene in Betracht zu ziehen, welche die einzelnen Symptome in einem komplexen Syndrom vereinigt.

Unter Berücksichtigung der vorliegenden Symptome und des Krankheitsverlaufes lag die Vermutung nahe, dass die Ursache in einem Gen liegt, dem *NBS1*-Gen, welches das Nijmegen-Breakage-Syndrom (NBS) hervorruft. NBS stammt aus der Gruppe der Chromosomeninstabilitätssyndrome. Neben den bereits oben aufgeführten Symptomen weisen NBS-Patienten zusätzlich eine Radiosensitivität und eine Chromosomeninstabilität als Hauptmerkmale auf (van der Burgt et al., 1996; Tauchi et al., 2002). Dieser Symptomkomplex wird angesichts der Rolle des *NBS1*-Genproduktes Nibrin, zum einen in der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen und zum anderen in der Aufrechterhaltung der Zellzyklus-Checkpoints, verständlich (D'Amours and Jackson, 2002; Shiloh, 2003). Mutationen im *NBS1*-Gen wurden jedoch nicht gefunden.

Neben dem *NBS1*-Gen wurden drei weitere Gene (*RAD50*, *LIG4* und *XLF*) untersucht, welche in Verbindung mit dem NBS-Phänotyp gebracht werden konnten bzw. direkt mit dem Nibrin-Protein interagieren.

RAD50 ist ein Protein, welches mit NBS1 und MRE11 einen Komplex (MRN-Komplex) bildet, und an der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen beteiligt ist. Dabei übernimmt dieser Komplex unterschiedliche Aufgaben. Neben den Aufgaben der DNA-Reparatur bestehen Beziehungen zu wichtigen Aufgaben der Zellzyklus-Checkpointaktivierung, der Telomeraufrechterhaltung und der Zellteilung bzw. des Zellwachstums (Zhang et al., 2006).

Ein dem Nijmegen-Breakage-Syndrom ähnlicher Phänotyp zeigt die Mutation im *Ligase 4-Gen (LIG4)* (O'Driscoll et al., 2001; Ben-Omran et al., 2005). Wie das NBS1- oder das RAD50-Protein ist auch LIG4 bei der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen beteiligt. Die Ligase 4 bildet einen Komplex mit XRCC4 (X-ray repair cross complementing protein 4) und interagiert mit der DNA-PK (DNA-dependent protein kinase) während der NHEJ und der V(D)J-Rekombination (Critchlow et al., 1997; Grawunder et al., 1997; Wang et al., 2004).

Durch neue Untersuchungen an Patienten mit einem NBS-ähnlichen Krankheitsbild konnte ein weiterer Interaktionspartner, XLF (Cernunnos), in dem komplexen Zusammenspiel der beteiligten Proteine entdeckt werden (Ahnesorg et al., 2006; Buck et al., 2006; Sekiguchi and Ferguson, 2006).

Leider konnte der Verdacht durch ausführliche Sequenzanalysen im Vorfeld nicht bestätigt werden, dass eines der genannten Proteine (RAD50, LIG4 und XLF) ursächlich für die Erkrankungen der vorliegenden Familie M ist. Zwar zeigen sich phänotypische Korrelationen zwischen den Erkrankungen, jedoch sind keine deutlichen Parallelen auf zytogenetischer oder biochemischer Ebene zu finden. Es wurde eine deutlich erhöhte Basisbruchrate der Chromosomen gefunden, jedoch nicht die für NBS-Zellen typische Zunahme der Chromosomeninstabilität nach einer Bestrahlung. Dies deutet darauf hin, dass es sich in dem vorliegenden Fall um keinen Defekt in der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen handelt. Unterstützt wird diese Vermutung weiterhin dadurch, dass auch eine adäquate Reparatur über Doppelstrangbruch-Intermediäre offensichtlich erfolgreich ist, welche durch das Alkylans Mitomycin C hervorgerufen wird. Mitomycin C erzeugt DNA-Interstrang-Vernetzungen, die durch einen Komplex interagierender Fanconi-Gene repariert werden (Digweed and Sperling, 1996; Otsuki et al., 1998).

### **4.2 Dizentrische Chromosomen und Endoreduplikationen charakterisieren die Zellen von einer Betroffenen der Familie M**

Wie bereits erwähnt, zeigten die Zellen der Betroffenen im Verlauf der zytogenetischen Auswertungen keine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber ionisierender Strahlung oder dem Alkylans Mitomycin C, welche jedoch bei den klassischen Chromosomeninstabilitätssyndromen wie z. B. dem Nijmegen-Breakage-Syndrom oder der Fanconi-Anämie auftreten (Digweed, 2003; Demuth et al., 2004a; Seemanova et al., 2006). Bemerkenswerter Weise wurde aber eine erhöhte Anzahl an spontan auftretenden dizentrischen Chromosomen, sowie eine außergewöhnlich hohe Rate an Endoreduplikationen in den lymphoblastoiden Zellen der Betroffenen (B-4523) vorgefunden.

Man kann dizentrische Chromosomen in zwei Gruppen einteilen. Die erste Gruppe betrifft solche, bei denen in den mitotischen Zellen neben einem dizentrischen Chromosom auch ein azentrisches Fragment vorliegt. Dieses azentrische Fragment spricht für zwei durchlaufende Chromatidbruchereignisse vor der S-Phase. Bevor die Zelle die S-Phase durchläuft, liegen die Chromosomen als Ein-Chromatid-Chromosomen vor. Durch das Auftreten von Bruchereignissen an zwei nahe beieinander liegenden verschiedenen Chromatiden entstehen zwei Chromatidfragmente sowie zwei Chromatide mit verkürzten p- oder q-Armen, je nach Lokalisation des Chromatidbruchs. Im Verlauf von DNA-Reparaturprozessen fusionieren die entstandenen Bruchstücke miteinander, dabei können unterschiedliche Translokationsereignisse zwischen den einzelnen Chromatiden bzw. den Fragmenten eintreten. Zum einen kann es zu einfachen Translokationen zwischen den zwei Chromosomen und den zwei Fragmenten kommen. Zum anderen kann aber auch ein Zwei-Centromer-Chromatid und ein fusioniertes Fragment, bestehend aus den zwei Chromatidfragmenten, entstehen. Im zweiten Fall würde nach Durchlaufen der S-Phase ein dizentrisches Chromosom sowie ein azentrisches Fragment in der Mitose sichtbar werden.

Die zweite Gruppe der dizentrischen Chromosomen betrifft solche, bei denen neben den dizentrischen Chromosomen azentrische Fragmente in den mitotischen Zellen fehlen. Hier sind keine Bruchereignisse für das Fusionieren der Chromatide notwendig. Vielmehr ist eine Dysfunktion der Chromatidenden, den Telomeren, für die Bildung der Zwei-Centromer-Chromatide verantwortlich. Durch eine gestörte Funktion beteiligter Telomerproteine werden die Enden der Chromatide miteinander verknüpft. Diese

durchlaufen die S-Phase und zeigen sich als dizentrische Chromosomen in mitotischen Zellen.

Das Auftreten von dizentrischen Chromosomen wurde bereits in Tumoren, aber auch in einigen Chromosomeninstabilitätssyndromen beobachtet. Zu diesen Syndromen gehören neben der Ataxia telangiectasia (Pandita et al., 1995; Xia et al., 1996; Chan and Blackburn, 2003) und dem Nijmegen-Breakage-Syndrom (Digweed et al., 1999; Cabuy et al., 2005) auch das Werner- (Opresko et al., 2002) und Bloomsyndrom (German, 1993). Außerdem konnten auch bei einem weiterem Telomer-assoziierten DNA-Reparaturprotein, Artemis, Telomerfusionen in mutierten Patientenzellen beobachtet werden (Moshous et al., 2003).

Unabhängig von der erhöhten Chromosomeninstabilität durch eine fehlerhafte DNA-Doppelstrangreparatur dieser Patienten, tragen die Telomerdysfunktionen durch die Bildung dizentrischer Chromosomen mit zur Tumorenstehung bei (Fouladi et al., 2000; Gisselsson et al., 2001). Während der Mitose durchlaufen die Zellen die Anaphase, in deren Verlauf es zu einer Fehlverteilung oder sogar zu Chromosomenbrüchen bzw. Chromosomenzerreißungen der dizentrischen Chromosomen kommen kann. Die Spindelfasern versuchen, die vorliegenden Zwei-Centromer-Chromosomen zu den unterschiedlichen Polen zu transportieren, da dies jedoch nicht problemlos erfolgen kann, entstehen Chromosomenaberrationen unterschiedlichster Art. Die dabei auftretende genomische Instabilität kann die Einleitung der Apoptose bedingen oder wie bereits erwähnt eine mögliche Tumorenstehung zur Folge haben.

Neben den dizentrischen Chromosomen konnte ein weiteres zytogenetisches Phänomen beobachtet werden: Endoreduplikation. Zellen mit einer Endoreduplikation besitzen einen tetraploiden Chromosomensatz, 92 Chromosomen ( $4n$ ), welche während der Mitose sichtbar werden. Die betroffenen Zellen durchlaufen zweimal die S-Phase, ohne dass eine Zellteilung stattgefunden hat. Wie bereits die dizentrischen Chromosomen konnten auch Endoreduplikationen vermehrt in Tumoren (Grigorova et al., 2005) und sogar bei NBS-Patienten (Reina-San-Martin et al., 2005) beobachtet werden. Unabhängig von den Prozessen in Tumoren wurde diese Mitosestörung auch mit einer Telomerdysfunktion in Verbindung gebracht, bei der eine erhöhte Anzahl an Endoreduplikationen in den Zellen vorlag (Hockemeyer et al., 2006).

### 4.3 Der Basisdefekt in Betroffenen der Familie M

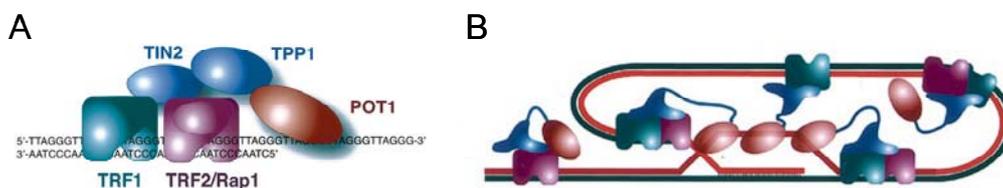
Da bei Zellen der Betroffenen keine azentrischen Fragmente vorlagen, welche für Translokationsereignisse sprechen würden, muss der Ursprung der dizentrischen Chromosomen vielmehr auf Telomerfusionen zurückzuführen sein.

Telomere sind die Enden von Chromosomen. Sie bestehen z. B. bei allen Wirbeltieren aus den sechs Nukleotiden 5'-TTAGGG-3', welche hochrepetitiv (bis zu mehr als 3000 mal; 5 - 30 kb) vorhanden sind. Darüber hinaus liegt ein einzelsträngiger Überhang der TTAGGG-Repeats am 3'-Ende der Telomere vor (Makarov et al., 1997). Diese repetitive Telomersequenz reicht jedoch alleine nicht aus, um die Enden vor dem Abbau zu schützen, der unter anderem durch die DNA-Replikation bedingt ist.

Die DNA-Polymerase benötigt bei der semikonservativen DNA-Replikation einen Primer, der an die DNA-Stränge bindet, um die DNA-Polymerisation in 5'-3'-Richtung zu beginnen. Nach Beendigung der Polymerisation wird der Primer abgebaut und durch DNA ersetzt. Die Primer am äußersten 5'-Ende der neusynthetisierten Tochterstränge können nicht ersetzt werden (Olovnikov, 1973). Somit würden bei jeder Zellteilung genetische Informationen verloren gehen. Dies wird als das Endreplikationsproblem bezeichnet. Nach jeder Replikation verliert die Zelle ca. 25 Basenpaare an den Chromosomenenden. Die Telomerlänge scheint jedoch die Anzahl der möglichen Zellteilungen zu bestimmen („mitotic clock“ oder „molecular clock“) (Allsopp et al., 1992). Bei somatischen Zellen nimmt im Gegensatz zu Keim- oder Stammzellen die Telomerlänge mit jeder Zellteilung ab, so dass dies ab einer bestimmten Telomerlänge zum Zelltod oder zum permanenten Wachstumsstopp führt (Harley et al., 1990; Blasco et al., 1997). Die Telomerase verhindert durch die Wiederherstellung der TTAGGG-Sequenz diese Verkürzung. Das Enzym gehört zur Gruppe der reversen Transkriptasen und enthält neben seiner Proteinstruktur eine RNA-Komponente, es ist somit ein Ribonukleoprotein. In den meisten menschlichen Zellen ist jedoch die Aktivität der Telomerase zu gering, um eine Telomerverlängerung und somit ein Schutz der Chromosomenenden zu gewährleisten. Ausgenommen davon sind Tumorzellen, in denen in 90 % der Fälle eine Hochregulierung der Telomeraseaktivität beobachtet worden ist (Gonzalez-Suarez et al., 2000; Hiyama and Hiyama, 2002).

Neben der durch die zelluläre Teilung bedingten Telomerverkürzung werden die Chromosomenenden durch einen weiteren Mechanismus vor dem Abbau geschützt. Hierbei wird eine räumliche Telomer-Schleifenstruktur („t-loop“) gebildet, woran ein als Shelterin bezeichneter Proteinkomplex beteiligt ist.

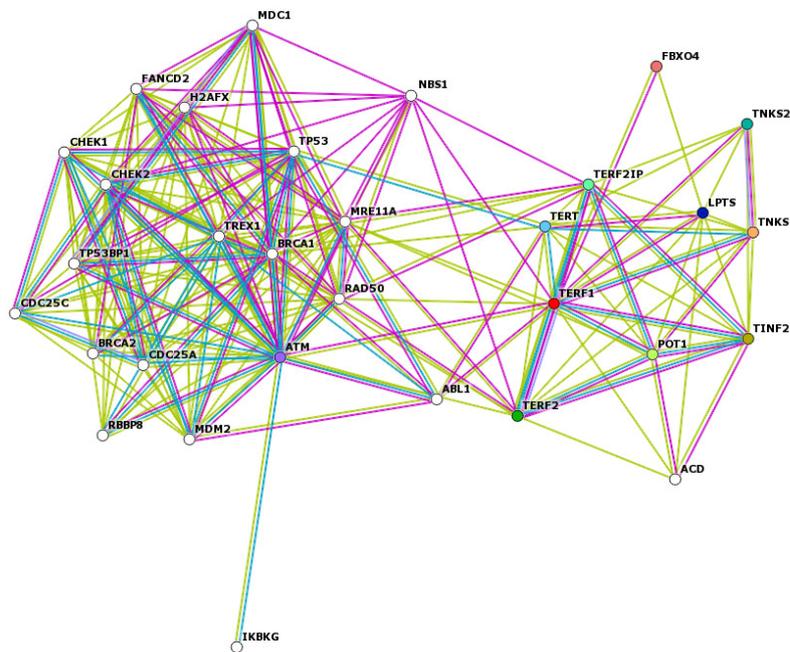
Der Shelterin-Komplex besteht aus sechs Proteinen (de Lange, 2005). Als erstes der Shelterin-Proteine konnte 1992 TRF1 („telomeric repeat binding factor 1“) aufgrund seiner hohen Spezifität für doppelsträngige repetitive TTAGGG-Sequenzen in Säugetieren isoliert werden. TRF2 („telomeric repeat binding factor 2“) wurde 1997 als ein Paralog von TRF1 identifiziert. Wie bereits TRF1 und TRF2 erkennt ein drittes Protein, POT1 („protection of telomeres 1“), spezifisch die einzelsträngigen TTAGGG-Repeats der Telomere. Gemeinsam besitzen diese drei Proteine insgesamt fünf spezifische Telomer-DNA-Bindungsdomänen (je zwei TRF1 und TRF2; eine POT1), wodurch der Shelterin-Komplex die Telomerenden von anderen DNA-Enden stark unterscheiden kann. Untereinander werden diese drei Proteine durch drei weitere Proteine, TIN2 („TRF1-interacting nuclear factor 2“), TPP1 („tripeptidyl peptidase I“) und Rap1, verbunden. Das Zusammenwirken dieser sechs Proteine schützt die Chromosomenenden vor dem Abbau und kontrolliert die Telomerstruktur, die Bildung der „t-loops“ und die Telomerase-Aktivität. Sie dienen somit in erster Hinsicht der Stabilität der Chromosomenenden, deren Replikation und dem Schutz vor DNA-Reparaturenzymen, die sonst die Chromosomenenden als DSB's erkennen könnten.



**Abb. 38: Vereinfachte schematische Darstellung der an den Telomerenenden lokalisierten Shelterin-Proteine.** Unter A sind die sechs Proteine dargestellt, welche den Shelterin-Komplex bilden (TRF1, TRF2, TIN2, Rap, TPP1 und POT1), sowie ihre Lokalisation an den Chromosomenenden, den Telomeren, mit ihrer repetitiven Sequenz (5'-TTAGGG-3'). Unter B ist die Bildung der t-loops an den Chromosomenenden dargestellt, wobei eine Stranginvasion des einzelsträngigen 3'-Endes in die Doppelhelixstruktur erfolgt (Stansel et al., 2001). Die Shelterin-Komplexe sind dabei wesentlich beteiligt und dienen der Stabilität der Chromosomenenden, deren Replikation und dem Schutz vor zellulären Reparaturenzymen. (de Lange, 2005).

Neben den Shelterin-Proteinen, welche direkt an den Telomeren lokalisiert sind, gibt es eine Vielzahl von Interaktionspartnern, vor allem DNA-Reparaturproteine. Aufgrund dieses Zusammenhanges zwischen Shelterin- und DNA-Reparatur Proteinen müssen daher neben der Beteiligung des Shelterin-Komplexes von weiteren Proteinen bei der Bildung der Schleifenstruktur sowie Aufrechterhaltung der Telomerenden ausgegangen werden (de Lange and Petrini, 2000).

Ausgehend von TRF1, einem der zentralen Telomerproteine, zeigt die Abb. 39 einige direkte bzw. indirekte Interaktionspartner.



**Abb. 39: Protein-Interaktionspartner des Telomerproteins TRF1.** Die Abbildung wurde mit „STRING“ (engl. „Search Tool for the Retrieval of Interacting Proteins“) hergestellt (<http://string.emble.de>). Die Farben der Verbindungslinien geben die Art der Belege an: Magenta: Experimente; Zyan: Datenbanken; Gelbgrün: Textsuchen.

Neben denen in der Abb. 39 dargestellten Proteinen, wie z. B. die MRN-Proteine (MRE11, RAD50 und NBS1), ATM und p53, finden sich auch Interaktionen der Shelterin-Proteine mit ERCC1/XPF, der WRN- und BLM-Helikase sowie der DNA-PK, welche für weitere genetisch bedingte Erkrankungen verantwortlich sind.

Besonders interessant ist die Häufung an Proteinen, welche direkt mit der DNA-Reparatur in Verbindung stehen. Es liegen ausführliche Ergebnisse vor, welche z. B. Interaktionen des MRN-Komplexes mit den Telomerproteinen aufzeigen. Der MRN-

Komplex wirkt neben der Erkennung und Reparaturinitialisierung von DSB bei der Modulierung und Stabilisierung der „t-loops“ mit (Ritchie and Petes, 2000; Zhu et al., 2000). Darüber hinaus wird vermutet, dass neben MRE11 und RAD50 auch Nibrin wichtige Eigenschaften an den Telomeren besitzt, da ein Fehlen von Nibrin die Telomerstabilität beeinflussen kann (Ranganathan et al., 2001; Bai and Murnane, 2003).

Wie bereits der MRN-Komplex besitzen auch viele Proteine, die der DNA-Reparatur über das non homologous end joining (NHEJ), aber auch der homologen Rekombination zugeordnet werden, wichtige Funktionen an den Telomerenden. In mehreren Arbeiten konnte bereits eine direkte Beteiligung der DNA-PK (Bailey et al., 1999; Gilley et al., 2001), der Ku-Proteine (Boulton and Jackson, 1998; Hsu et al., 2000), der BLM- und WRN-Helikase (Opresko et al., 2002; Bai and Murnane, 2003) sowie von RAD51 (Tarsounas et al., 2004) und ERCC1/XPF (Zhu et al., 2003) an der Aufrechterhaltung der Telomerintegrität nachgewiesen werden.

Die nahen Wechselbeziehungen zwischen den Shelterin-Proteinen und den DNA-Reparaturproteinen lassen sich gut mit dem vorliegenden Krankheitsbild vereinbaren, da neben Nibrin (NBS1) auch eine große Anzahl weiterer Proteine, zumindest zeitweilig, an den Telomeren lokalisiert sind und diese mit dem phänotypischen Erscheinungsbild, z. B. dem von NBS-Patienten, ähneln. Aufgrund dessen muss eine Miteinbeziehung eines nicht unbedingt essentiellen, jedoch bisher noch unbekanntes, Shelterin-Proteins in Betracht gezogen werden.

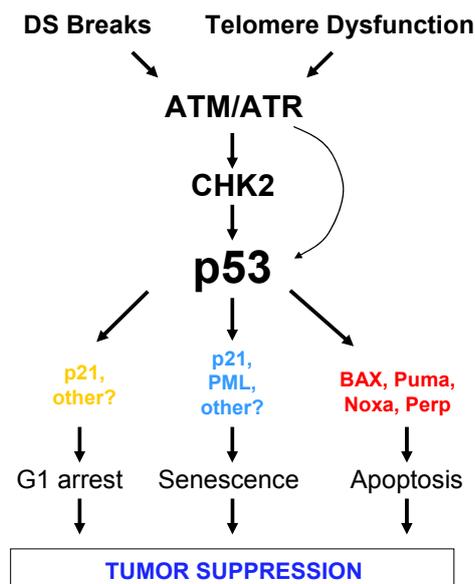
Ausgehend von einem Defekt in einem der Shelterin-Proteine bzw. in einem Protein, welches mit den Telomeren und den DNA-Reparaturproteinen interagiert, kann es zu Telomerfusionen und den daraus resultierenden dizentrischen Chromosomen kommen (van Steensel et al., 1998; Goytisolo et al., 2001).

Diese dizentrischen Chromosomen werden in der Anaphase des Zellzyklus zu den entgegengesetzten Polen gezogen und dabei zerrissen bzw. gebrochen. In Folge dessen entstehen neue ungeschützte Chromosomenenden oder sogar Chromatidbrüche, welche wiederum fusionieren können. Man spricht hierbei von einem sog. Bruch-Fusions-Zyklus.

#### 4.4 Dauerhafte Aktivierung der Zellzyklus-Checkpoints in Zellen von einer Betroffenen der Familie M

Lange Zeit wurde davon ausgegangen, dass eine Aktivierung der DNA-Reparatur-Kaskade nicht durch die Telomerproteine erfolgt. Jedoch konnte dies in Versuchen, in denen es zu einer Blockierung der TRF2-DNA-Bindung kam (van Steensel et al., 1998), widerlegt werden. Es wurde gezeigt, dass das Fehlen von TRF2 zu einer Aktivierung des ATM-Kinase-Pathways führt. Dafür spricht, dass das Vorhandensein von TRF2 zu einer Blockierung der Phosphorylierung von ATM an Position S1981 führt (Karlseder et al., 2004) und somit einer Aktivierung der ATM-Kaskade entgegenwirkt.

Eine in diesem Zusammenhang möglicherweise vorliegende Shelterindysfunktion führt zu einer Hochregulierung von p53, welche wiederum p21 aktiviert und in einer Blockade des G1/S-Phasenüberganges resultieren könnte (Karlseder et al., 1999; Artandi and Attardi, 2005) (Abb. 40).

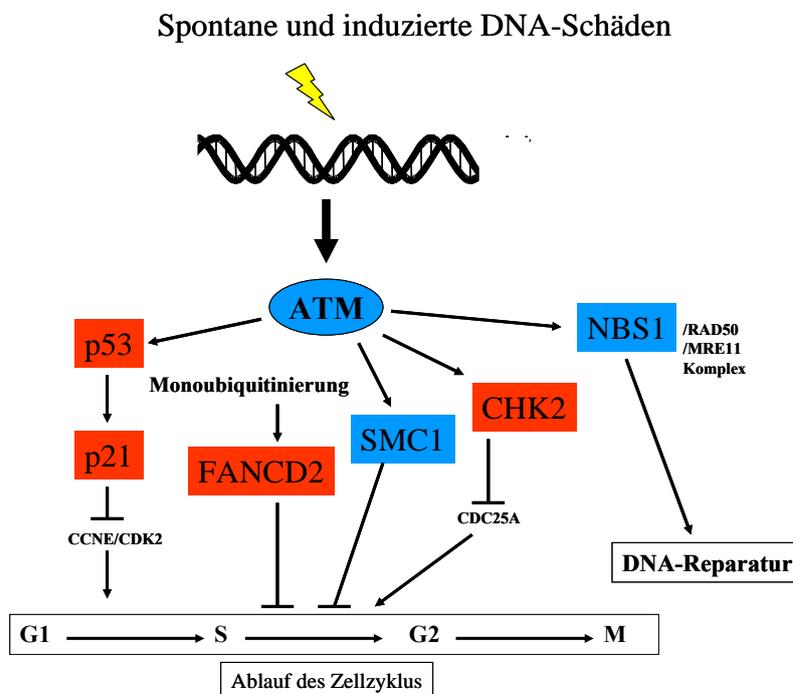


**Abb. 40: Pathway, welcher die Verknüpfung zwischen den Telomeren und p53 herstellt (Artandi and Attardi, 2005).** Durch DSB bzw. durch eine Telomerdysfunktion können die Telomerkappen ungeschützt vorliegen. Dies kann zu Telomerfusionen führen, welche den ATM-Proteinkinase-Pathway aktivieren. Dies führt zur Phosphorylierung von CHK2, p53 und weiteren Downstream-Substraten.

Diese Ergebnisse konnten an TRF2-Knock-out-Mausmodellen bestätigt werden, bei denen es zu einer ATM-Aktivierung und einem p53-abhängigen Zellzyklusstopp kam (Celli and de Lange, 2005). Darüber hinaus liegen Ergebnisse vor, in denen eine CHK2-Aktivierung durch eine fehlerhafte TRF2-Expression beobachtet werden konnte (Oh et al., 2003).

Neben der beschriebenen TRF2-bedingten Aktivierung von ATM und p53 konnte eine direkte Verbindung zwischen Telomerdysfunktionen bzw. –verkürzungen und der Aktivierung von p53 hergestellt werden (Chin et al., 1999). Dabei konnte gezeigt werden, dass p53-defiziente Mäuse die Konsequenzen von Telomerdysfunktionen, wie die Einleitung der Apoptose oder Seneszenz, besser tolerieren.

Die Ergebnisse, die bisher in den unterschiedlichsten Versuchen aufgezeigt werden konnten, spiegeln sich auch in den biochemischen Analysen in Zellen einer der Betroffenen (B-4523) wider. Auch hier zeigten sich konstitutiv, d. h. ohne exogene Beschädigungen der DNA, aktivierte Zellzyklus-Checkpoints (Abb. 41) - vermutlich als Konsequenz der dizentrischen Chromosomen.



**Abb. 41: Ausschnitt aus dem Netzwerk der DNA-Reparatur und Zellzyklus-Checkpoint-Proteine (Abb. 3).** In der Abbildung sind die in den Proteinanalysen untersuchten Proteine der Betroffenen (B-4523) dargestellt. **BLAU** markierte Felder zeigen unauffällige Proteine; die **ROT** markierten Felder verweisen auf Proteine, welche sich in den Analysen gegenüber den Kontrollen unterschieden.

Ausgehend von einer ATM-Aktivierung in den bereits unbehandelten Zellen der Betroffenen (B-4523), zeigten auch vier weitere Proteine eine Aktivierung. Neben der Hochregulierung von p53, p21 und CHK2, findet auch eine frühzeitige Monoubiquitinierung von FANCD2 in den unbehandelten Patientenzellen statt.

Eine der wichtigsten Komponenten der Doppelstrangbruch-Signal-Kaskade in Säugetierzellen ist die Proteinkinase ATM (Ataxia telangiectasia „mutated“). Sie dient der Erkennung und der Reparatur von induzierten als auch konstitutiv vorkommenden DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB). Diese DSB entstehen einerseits durch äußere Noxen oder ionisierende Strahlung, andererseits durch physiologische Prozesse in der Meiose, der Reifung des Immunsystems, aber auch bei der Aufrechterhaltung der Telomere. ATM wird an die Stelle der DSB transportiert und dort durch das Mitwirken des MRN-Komplexes aktiviert (Uziel et al., 2003). Anschließend phosphoryliert es verschiedene Downstream-Substrate, zu denen unter anderem p53, SMC1, CHK2 sowie NBS1, MRE11 und RAD50 (MRN-Komplex) gehören (Shiloh, 2001).

Eines der wichtigsten Downstream-Substrate ist das Tumorsuppressorprotein p53, welches eine zentrale Rolle in der Regulation der DNA-Reparatur und des Zellzyklus (Levine, 1997), speziell im G0/G1-Übergang, übernimmt. Das Protein p53 ist vor allem für die Reparatur geschädigter DNA oder für die Einleitung der Apoptose verantwortlich. Welcher Weg eingeschlagen wird, hängt vom Grad der DNA-Schädigung ab (Offer et al., 2002). Nach einer Bestrahlung oder durch zellschädigende Substanzen wird in irreparablen Zellen die Apoptose eingeleitet. Hierzu wird p53 durch CHK2 stabilisiert und von ATM und CHK2 spezifisch phosphoryliert (Hirao et al., 2000). Die Mutation bzw. Inaktivierung von p53 spielt eine wesentliche Rolle bei der malignen Entartung, was sich in dem autosomal dominant vererbten Li-Fraumeni-Syndrom manifestiert.

In Hinblick auf die Ergebnisse, bei denen eine Hochregulierung von p53 zu verzeichnen war, wurde p21 miteinbezogen. Das Protein p21 ist ein potenter Cyclin-abhängiger Kinase-Inhibitor. Das Protein bindet und inhibiert die Aktivität von CDK2- und/oder CDK4-Komplexen und fungiert somit als ein Regulator des Zellzyklus in der G1/S-Phase. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von p21 eine wichtige Schlüsselfunktion als Downstreamfaktor von p53-abhängigen Wachstumsstopps bei geschädigten Zellen ist (el-Deiry et al., 1994; Slebos et al., 1994). Das Protein p21 kann

durch p53 kontrolliert und gesteuert werden und ist somit ebenfalls an der Antwortreaktion auf eine Vielzahl von Stressfaktoren beteiligt.

Als Reaktion auf DNA-Schäden und Replikationsstörungen ist der Zellzyklus auf eine kritische Kontrolle angewiesen. Dies übernehmen spezifische Zellzyklus-Kontrollpunkte, die sog. Checkpoints. CHK2 gehört zu diesen Kontrollpunkten hauptsächlich in der G2/M-Phase und ist zudem ein mutmaßliches Tumorsuppressorprotein. Nach einer DNA-Schädigung oder einer Störung während der Replikation wird CHK2 durch ATM NBS1-abhängig (Buscemi et al., 2001) phosphoryliert. Dies inhibiert die CDC25C-Phosphatase und verhindert dadurch den Eintritt der Zellen in die Mitose. Weiterhin wird p53 stabilisiert, was zu einer Arretierung in der G1-Phase des Zellzyklus führt (Chehab et al., 2000). Wichtige Zusammenhänge sind auch zwischen CHK2 und BRCA1 zu finden. BRCA1 wird mitunter durch CHK2 phosphoryliert. Durch diese Regulierung kann CHK2 wesentlich bei der Reparatur von Doppelstrangbrüchen über das NHEJ mitwirken (Zhuang et al., 2006). Aufgrund der zentralen Rolle in der DNA-Reparatur ist eine Aktivierung von CHK2 bereits in den unbehandelten Zellen der Betroffenen (4523) zu verstehen.

Mehrere Untersuchungen ergaben bereits, dass der Fanconi-Anämie-Pathway mit dem MRN-Komplex interagiert. Dabei ist von Interesse, dass NBS1-, FANCD2- und AT-Zellen jeweils einen Defekt an dem durch Bestrahlung induzierten S-Phase-Checkpoint haben. Zudem zeigen FANCD2-Zellen eine stärkere Hypersensibilität gegenüber Röntgenstrahlen, die die übrigen FA-Gene gegenüber polyfunktionellen Alkylantien (Digweed et al., 2002) aufweisen. Die Monoubiquitinierung von FANCD2 erfolgt durch Aktivierung des FA-Komplexes, welche z. B. durch Mitomycin C (MMC) ausgelöst wird. Das aktivierte FANCD2, welches durch ATM phosphoryliert wird, interagiert mit BRCA1 und bildet nukleare Foci, welche auch BRCA2/FANCD1 beinhalten. BRCA2 interagiert wiederum direkt mit RAD51. Somit zeigt die Aktivierung von FANCD2 über BRCA1, BRCA2 und RAD51 eine Aktivierung der DNA-Reparatur über die homologe Rekombination (HR) (Houghtaling et al., 2005; Nakanishi et al., 2005).

Die hier bereits bei unbehandelten Zellen aktivierten Proteine spiegeln die genomische Instabilität wider, die durch die Telomerfusionen verursacht wird und belegen, dass die zelluläre Antwort auf DNA-Läsionen durch die Aktivierung einiger Zellzyklus-

Checkpoints in den Zellen der Betroffenen grundsätzlich intakt ist. Es ist vielmehr anzunehmen, dass eine erhöhte endogene Belastung mit einer entsprechenden Zunahme der genomischen Imbalance vorliegen muss.

Die Hypothese, dass eine Dysfunktion in einem der Shelterin-Proteine vorliegt, stellt einen reizvollen Aspekt dar, da diese nur an den Telomeren vorkommen und zudem mit einer Anzahl von DNA-Reparaturproteinen interagieren. Möglicherweise repräsentiert die hier beschriebene Familie den ersten Fall einer vererbten Mutation in einem Telomerprotein, welches nicht direkt in der DNA-Reparatur involviert ist, jedoch eine Schutzfunktion vor der Aktivierung durch die ATM-Kaskade übernimmt.

### **4.5 Genkartierung und Kandidatengenausschluss**

Die vorliegenden Ergebnisse weisen auf die Beteiligung eines Proteins, welches an den Telomeren lokalisiert ist und die Entstehung von dizentrischen Chromosomen verhindert. Es ist vermutlich eher als ein stabilisierendes Element zu betrachten als ein Reparaturenzym. Die häufigen Endoreduplikationen in den Zellen der Betroffenen (B-4523) weisen jedoch auch darauf hin, dass das Gen eine Rolle in der Zellzykluskontrolle spielen könnte.

Aufgrund der vorhandenen Daten wurden zunächst Kandidatengene gesucht, die an der Aufrechterhaltung der endogenen genomischen Stabilität beteiligt und weniger solche, die direkt in der Reparatur von exogen verursachten DNA-Läsionen involviert sind. Die hohe Anzahl an Telomerfusionen deutet auf ein Protein, welches möglicherweise selbst am Aufbau der komplexen Strukturen der Chromosomenenden beteiligt ist oder aber mindestens Beziehungen zu den Shelterin-Proteinen besitzt, was auch für die Aktivierung der ATM-Kaskade sprechen würde. Die zellulären Wechselwirkungen sind jedoch so vielfältig, dass ein Ausschluss von Genen für DNA-Reparatur- oder Zellzyklusproteine völlig unangebracht wäre.

Durch Kopplungsanalysen mit SNP's („Single Nucleotide Polymorphism“) konnte am Max-Delbrück-Zentrum ein besonders viel versprechender homozygoter Bereich für die mögliche Lokalisation einer genetischen Veränderung gefunden werden. Er lag auf Chromosom zwölf und umfasste einen Bereich von 21,10 cM, welcher durch die SNP's

A-1518431 und A-15417298 begrenzt wurde. Mit Hilfe von Mikrosatelliten wurde der in Frage kommende Bereich durch die Mikrosatelliten D12S1661 und D12S1686 flankiert und konnte somit auf eine Größe von 12,31 cM eingegrenzt werden.

Unter den 329 Genen (Tab. 18 im Anhang) waren 221 Gene, die aufgrund ihrer Funktion unwahrscheinlich waren und zunächst nicht in Betracht kamen. Diese 221 Gene haben verschiedene Aufgaben. Die zwei größten Gruppen gehören zu den Keratinen (31 Gene) und den olfaktorischen Rezeptoren (24 Gene). Die übrigen 166 Gene haben unterschiedliche Funktionen und sind keiner eindeutig gemeinsamen Gruppe zuzuordnen. Des Weiteren war eine Anzahl von 68 Genen (hypothetische Gene) vorhanden, deren Funktionen zum Zeitpunkt der Auswahl noch nicht ermittelt waren. Durch dieses Ausschlussverfahren verblieben 40 mögliche bzw. nicht bewertbare Gene.

Da leider unter den 40 möglichen Kandidatengenen kein direkter Bezug zu den Telomerproteinen oder zu Proteinen, welche mit dem Shelterin-Komplex interagieren, gefunden werden konnte, wurden die Suchkriterien erweitert. Unter diesem Aspekt wurden acht Kandidatengene auf eine Mutation mittels Sequenzanalyse hin untersucht. Fünf dieser Gene (*DDX23*, *CDK2*, *PA2G4*, *RBMS2* und *CDK4*) haben Aufgaben im Zellzyklus und der Zellproliferation. Die übrigen drei Gene (*SMUG1*, *DDIT3* und *XRCC6BP1*) sind der DNA-Reparatur zuzuordnen.

- **Gene des Zellzyklus und der Zellproliferation**

*DDX23* gehört in die Familie der DEAD-box-Proteine, welche das Motiv Asp-Glu-Ala-Asp (DEAD) beinhaltet und vermutlich RNA-Helicasen sind. Diese Gruppe ist in eine Anzahl von zellulären Prozessen involviert, wie z.B. der Umwandlung der RNA-Sekundärstruktur oder der Translationsinitiation. Aufgrund ihrer Verteilung wird vermutet, dass sie auch an Prozessen der Embryogenese, der Spermatogenese und des Zellwachstums sowie der Zellteilung beteiligt sind. *DDX23* ist ein Bestandteil des U5 snRNP-Komplexes, welcher den Wechsel der Konformation von Spliceosomen während des pre-mRNA-Splicings erleichtert (Teigelkamp et al., 1997).

*CDK2* gehört in die Gruppe der Ser/Thr-Proteinkinasen. Es ist eine katalytische Untereinheit des Cyclin-abhängigen Proteinkinasekomplexes, dessen Hauptfunktion in der Regulation des G1/S-Phase-Überganges liegt. *CDK2* interagiert unter anderem mit

Cyclin A oder E, wird durch p21 (CIP1) inhibiert und durch die eigene Phosphorylierung reguliert. Interessant in diesem Zusammenhang war, dass eine Untereinheit des Cyclin A, das Cyclin A1, welches in Verbindung mit CDK2 durch p53 induziert worden ist, einen noch nicht bekannten Zusammenhang in der Reparatur von Doppelstrangbrüchen (DSB) durch das NHEJ hat (Muller-Tidow et al., 2004). Dieser Cyclin A-CDK2-Komplex konnte auch mit dem Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in Verbindung gebracht werden, welcher direkt mit der DNA-Replikation sowie -Reparatur in Zusammenhang steht (Koundrioukoff et al., 2000).

PA2G4 (EBP1) ist das humane Homolog des Maus-Gens *p38-2G4*, einem Zellzyklus regulierenden DNA-Bindungsprotein (Radomski and Jost, 1995; Lamartine et al., 1997). Es konnte gezeigt werden, dass PA2G4 im Zytoplasma sowie im Nukleolus lokalisiert ist und bei Überexpression die Proliferation von menschlichen Fibroblasten hemmt. Es wird vermutet, dass PA2G4 am Zellkernwachstum beteiligt ist und ein neues Bindeglied zwischen Ribosomenbiosynthese und Zellwachstum darstellt (Squatrito et al., 2004). In neueren Untersuchungen konnte bewiesen werden, dass PA2G4 die Proliferation hemmt und die Differenzierung in menschlichen Tumorzellen induziert. PA2G4 besitzt zwei Isoformen, p48 und p42, wobei p48 die Apoptose unterdrückt und p42 die Zelldifferenzierung begünstigt (Liu et al., 2006).

RBMS2 (SCR3) gehört in eine kleine Gruppe von Proteinen, welche sich an Einzelstrang-DNA/RNA binden. Diese Proteine beinhalten kurze Abschnitte, RPN1 und RPN2, welche bereits in RNA-Bindungsproteinen beschrieben wurden und für die DNA-Bindung notwendig sind. Die RBMS-Proteine können somit in Zusammenhang mit Funktionen der DNA-Replikation, der Gentranskription, des Zellzyklus und der Apoptose gebracht werden (Kanaoka and Nojima, 1994). In tierexperimentellen Versuchen konnte gezeigt werden, dass das Fehlen von MSSP, welches ebenfalls in die oben genannte Gruppe gehört, zu Wachstumsretardierungen von Mäuseembryonen, sowie zu hormonellen Störungen bei erwachsenen weiblichen Mäusen führt (Fujimoto et al., 2001).

CDK4 gehört ebenso wie CDK2 (s.o.) in die Gruppe der Ser/Thr-Proteinkinasen. Es ist auch eine katalytische Untereinheit des Cyclin-abhängigen Proteinkinasekomplexes, dessen Hauptfunktionen in der Regulation des G1/S-Phase-Überganges liegen. Es wird

unter anderem kontrolliert durch die Untereinheiten der D-Cycline, sowie durch den CDK Inhibitor p16 (INK4a). Mutationen in CDK4, als auch in den Interaktionspartnern (D-Cycline, p16, RB1), wurden mit dem Wachstum von unterschiedlichen Tumoren in Verbindung gebracht (Pawar et al., 2004). Auch CDK4 konnte, wie bereits auch CDK2, mit dem „proliferating cell nuclear antigen“ (PCNA) assoziiert werden (Loor et al., 1997), was die Funktion in der DNA-Replikation und der -Reparatur bestätigte.

- **DNA-Reparaturgene**

Die DNA unterliegt einer ständigen Schädigung. Diese kann unter anderem durch exogene Prozesse, wie z. B. oxidative Schädigungen oder ionisierende Strahlen, oder endogene Ursachen, wie degenerative Erkrankungen, das Altern oder Krebs, bedingt sein. Der häufigste Basenaustausch, der in aeroben Organismen zu Mutationen führt, betrifft Cytosin:Guanin (C:G) zu Thymin:Adenin (T:A). Die Transition von C → T kann durch spontane hydrolytische Desaminierung von Cytosin hervorgerufen werden, was in Folge dessen zu einer Uracil-Fehlcodierung (CG → TG → UG) bei der DNA-Replikation durch die RNA-Polymerase führen kann (Nilsen et al., 2001). Eine mögliche Konsequenz ist die Erhöhung der Mutationsrate. Um die Zellen vor diesen Fehlcodierungen zu schützen, exprimieren Zellen Uracil-DNA-Glycosylasen (z.B. SMUG1), welche die Uracilfehlcodierungen ausschneiden, den „base excision repair“ Pathway (BER) initialisieren (Lindahl and Barnes, 2000) und die ursprüngliche Basenabfolge wieder herstellen.

DDIT3 (GADD153) ist ein Mitglied von Transkriptionsfaktoren der CCAAT/enhancer-binding Proteinfamilie, welche in der DNA-Bindung involviert sind. DDIT3 kommt in Zellen normalerweise nur in geringen Mengen vor, jedoch findet eine starke Expressierung statt, wenn Zellen DNA-schädigenden Substanzen (Johnson et al., 1997) bzw. unterschiedlichen Arten von zellulärem Stress, wie Nahrungsentzug oder metabolischen Faktoren, ausgesetzt wurden. Es hat somit direkte Beziehungen zu den DNA-Reparaturmechanismen in den geschädigten Zellen. Man konnte außerdem nachweisen, dass eine Medikamenten-induzierte Überexpression von DDIT3 dazu beitragen kann, das Wachstum von Tumorzellen durch die Induktion der Apoptose und des Zellwachstumsstopps zu verringern (Kim et al., 2002).

XRCC6BP1, auch KUB3 oder „Ku70 binding protein 3“ genannt, spielt eine wesentliche Rolle bei dem NHEJ in der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB) in Säugetierzellen. XRCC6BP1 (KUB3) interagiert mit Ku70 (Yang et al., 1999), welches wiederum mit Ku80 ein Heterodimer bildet, dieses bindet an den DNA-Bruchenden und verhindert dadurch die Degradation der DNA-Enden. Dies ermöglicht zudem das Binden einer Untereinheit (DNA-PK<sub>CS</sub>) der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PK). Es konnte nachgewiesen werden, dass eine Überexpression von XRCC6BP1 (KUB3) bzw. eine alternative Spleissvariante (GAS16) von XRCC6BP1 zu einer nicht idealen Bindung des DNA-PK-Komplexes führen, was die optimale Funktion der DNA-Reparatur wesentlich beeinträchtigt (Fischer et al., 2001) und somit zu Störungen führen kann.

Als mögliche Kandidatengene wurden acht aus 329 Genen (Tab. 18 im Anhang) aus dem am wahrscheinlichsten in Frage kommenden Bereich auf Chromosom 12q13.11-14.3 ausgewählt. Leider konnte eine Mutation in einem dieser Gene durch Sequenzanalysen nicht ermittelt werden.

### 4.6 Ausblick

Zur Aufklärung der Ursache der hier beschriebenen Erkrankung müssen weitere Kandidatengene untersucht werden, welche in dem eingegrenzten chromosomalen Bereich liegen. Dabei sollte bei der Kandidatengenanalyse weiterhin ein Augenmerk auf solche Gene gelegt werden, dessen Produkte in Zusammenhang mit den Telomerproteinen, DNA-Reparaturprozessen und/oder der Zellzykluskontrolle gebracht werden können. Natürlich dürfen bei der Kandidatengensuche Gene mit bisher noch unbekannter Funktion nicht außer Acht gelassen werden, da ein Funktionsverlust, sofern er ursächlich für den Phänotyp der Betroffenen ist, Hinweise über die Funktion dieser Gene geben kann.

### **5 Zusammenfassung**

In der vorliegenden Dissertation wird eine konsanguine Familie (M) vorgestellt, in der drei Kinder eine autosomal rezessive Krankheit aufweisen, deren Hauptsymptome Mikrozephalie, Wachstumsretardierung, Immundefizienz und Krebsprädisposition sind. Genmutationen, die zu ähnlichen Phänotypen führen, wurden im Vorfeld durch Mutationsanalyse ausgeschlossen. Dabei war ein Hauptkandidat das NBS1-Gen, das dem Chromosomeninstabilitätssyndrom, Nijmegen-Breakage-Syndrom (NBS), zu Grunde liegt. Neben den oben aufgeführten Symptomen weisen NBS-Patienten noch eine Radiosensitivität und Chromosomeninstabilität als Hauptmerkmale auf. Dieser Symptomkomplex wird angesichts der Rolle des *NBS1*-Genproduktes, Nibrin, zum einen in der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen und zum anderen in der Aufrechterhaltung der Zellzyklus-Checkpoints verständlich.

Eine Beteiligung des in der Familie M betroffenen Gens in den gleichen Reaktionswegen wie NBS1 wurde durch ausführliche zytogenetische und biochemische Analysen von Zellen eines der Betroffenen überprüft. Es konnte zwar eine Chromosomeninstabilität nachgewiesen werden, jedoch nicht die für NBS typische Zunahme der Chromosomenbrüche nach einer Bestrahlung. Damit kann in dem vorliegenden Fall ein Defekt in der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen weitgehend ausgeschlossen werden. Auch gegenüber dem Alkylans Mitomycin C, das DNA-Interstrangvernetzungen erzeugt, die jedoch über Doppelstrangbruch-Intermediäre repariert werden, zeigen die untersuchten Zellen keine erhöhte Empfindlichkeit.

Bemerkenswert in der zytogenetischen Analyse war die Beobachtung eines sehr hohen Anteils an spontan vorkommenden dizentrischen Chromosomen sowie eine außergewöhnliche hohe Endoreduplikationsrate. Als Ursprung der dizentrischen Chromosomen ist in diesem Fall eine Telomerfusion in der G1-Phase am wahrscheinlichsten, da azentrische Fragmente fehlten, die auf Translokationsereignisse hinweisen würden. Telomere stellen besondere Chromosomenstrukturen dar, an denen eine Vielzahl von Proteinen beteiligt sind, die in erster Linie entweder die Replikation der DNA-Enden oder deren Schutz vor zellulären Reparaturenzymen dienen. Nibrin ist ebenfalls zumindest zeitweilig an den Telomeren lokalisiert, demzufolge überrascht es nicht, dass Telomerfusionen auch häufig in Zellen von NBS-Patienten beobachtet

werden. In der Anaphase werden dizentrische Chromosomen auseinander gerissen, wenn die beiden Zentromere zu Entgegengesetzten Polen gezogen werden. Als Folge entstehen Chromatidbrüche die miteinander fusionieren können: ein sog. Bruch-Fusions-Zyklus.

Die biochemische Analyse von Patientenzellen zeigt, dass Schlüsselproteine der Zellzyklus-Checkpoints, wie ATM und CHK2, konstitutiv, d. h. auch ohne exogene Beschädigung der DNA aktiviert sind. Dieses spiegelt die genomische Instabilität wider, die durch die Telomerfusionen verursacht wird und belegt, dass die zelluläre Antwort auf DNA-Läsionen in diesen Zellen grundsätzlich intakt ist. Es ist vielmehr anzunehmen, dass eine erhöhte endogene Belastung vorliegt mit entsprechender Zunahme der genomischen Imbalance. Als Folge davon kann die betreffende Zelle in die Apoptose oder Seneszenz geleitet werden. Somit könnte die Wachstumsretardierung und die Mikrozephalie der Betroffenen auf eine herabgesetzte Zellzahl zurückgeführt werden. Auch die proliferationsaktiven Stammzellen des Knochenmarks werden hierdurch beeinträchtigt: die Immuninsuffizienz der Betroffenen ließe sich danach als eine eher unspezifische Folge der genomischen Instabilität zurückführen. Es versteht sich von alleine, dass die Krebsprädisposition der Betroffenen ebenfalls von der erhöhten genomischen Instabilität herrührt.

Die vorliegenden Befunde legen nahe, dass das hier betroffene Protein wahrscheinlich an den Telomeren der Chromosomen lokalisiert ist, vermutlich eher als stabilisierendes Element und nicht als Reparaturenzym *per se*. Die häufigen Endoreduplikationen in den Zellen der Patientin weisen jedoch auch daraufhin, dass das Gen eine Rolle bei der Zellzykluskontrolle spielen könnte. Um das Gen zu identifizieren wurde ein sog. „Homozygosity-Mapping“ durchgeführt. Als wahrscheinlichste Kandidatengenregion wurde ein 12,3 cM Bereich auf Chromosom 12q13.11-14.3 identifiziert. Unter den 329 Genen in diesem Abschnitt wurden aufgrund ihrer Funktion acht als Kandidatengene ausgewählt. Durch DNA-Sequenzanalyse der Betroffenen konnten diese Gene jedoch als krankheitsverursachend ausgeschlossen werden.

### **6 Literaturverzeichnis**

- Ahnesorg, P., Smith, P. and Jackson, S. P., (2006): XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining. *Cell*, 124(2):301-13.
- Allsopp, R. C., Vaziri, H., Patterson, C., et al., (1992): Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(21):10114-8.
- Antocchia, A., Ricordy, R., Maraschio, P., et al., (1997): Chromosomal sensitivity to clastogenic agents and cell cycle perturbations in Nijmegen breakage syndrome lymphoblastoid cell lines. *Int J Radiat Biol*, 71(1):41-9.
- Antocchia, A., Stumm, M., Saar, K., et al., (1999): Impaired p53-mediated DNA damage response, cell-cycle disturbance and chromosome aberrations in Nijmegen breakage syndrome lymphoblastoid cell lines. *Int J Radiat Biol*, 75(5):583-91.
- Artandi, S. E. and Attardi, L. D., (2005): Pathways connecting telomeres and p53 in senescence, apoptosis, and cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, 331(3):881-90.
- Bai, Y. and Murnane, J. P., (2003): Telomere instability in a human tumor cell line expressing NBS1 with mutations at sites phosphorylated by ATM. *Mol Cancer Res*, 1(14):1058-69.
- Bailey, S. M., Meyne, J., Chen, D. J., et al., (1999): DNA double-strand break repair proteins are required to cap the ends of mammalian chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(26):14899-904.
- Ben-Omran, T. I., Cerosaletti, K., Concannon, P., et al., (2005): A patient with mutations in DNA Ligase IV: clinical features and overlap with Nijmegen breakage syndrome. *Am J Med Genet A*, 137(3):283-7.
- Blasco, M. A., Lee, H. W., Hande, M. P., et al., (1997): Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell*, 91(1):25-34.
- Blocher, D. and Pohlit, W., (1982): DNA double strand breaks in Ehrlich ascites tumour cells at low doses of x-rays. II. Can cell death be attributed to double strand breaks? *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*, 42(3):329-38.
- Boulton, S. J. and Jackson, S. P., (1998): Components of the Ku-dependent non-homologous end-joining pathway are involved in telomeric length maintenance and telomeric silencing. *Embo J*, 17(6):1819-28.

- Bressan, D. A., Baxter, B. K. and Petrini, J. H., (1999): The Mre11-Rad50-Xrs2 protein complex facilitates homologous recombination-based double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 19(11):7681-7.
- Buck, D., Malivert, L., de Chasseval, R., et al., (2006): Cernunnos, a novel nonhomologous end-joining factor, is mutated in human immunodeficiency with microcephaly. *Cell*, 124(2):287-99.
- Buscemi, G., Savio, C., Zannini, L., et al., (2001): Chk2 activation dependence on Nbs1 after DNA damage. *Mol Cell Biol*, 21(15):5214-22.
- Cabuy, E., Newton, C., Joksic, G., et al., (2005): Accelerated telomere shortening and telomere abnormalities in radiosensitive cell lines. *Radiat Res*, 164(1):53-62.
- Carney, J. P., Maser, R. S., Olivares, H., et al., (1998): The hMre11/hRad50 protein complex and Nijmegen breakage syndrome: linkage of double-strand break repair to the cellular DNA damage response. *Cell*, 93(3):477-86.
- Celli, G. B. and de Lange, T., (2005): DNA processing is not required for ATM-mediated telomere damage response after TRF2 deletion. *Nat Cell Biol*, 7(7):712-8.
- Chan, S. W. and Blackburn, E. H., (2003): Telomerase and ATM/Tel1p protect telomeres from nonhomologous end joining. *Mol Cell*, 11(5):1379-87.
- Chehab, N. H., Malikzay, A., Appel, M., et al., (2000): Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G(1) by stabilizing p53. *Genes Dev*, 14(3):278-88.
- Chin, L., Artandi, S. E., Shen, Q., et al., (1999): p53 deficiency rescues the adverse effects of telomere loss and cooperates with telomere dysfunction to accelerate carcinogenesis. *Cell*, 97(4):527-38.
- Chrzanowska, K. H., Kleijer, W. J., Krajewska-Walasek, M., et al., (1995): Eleven Polish patients with microcephaly, immunodeficiency, and chromosomal instability: the Nijmegen breakage syndrome. *Am J Med Genet*, 57(3):462-71.
- Critchlow, S. E., Bowater, R. P. and Jackson, S. P., (1997): Mammalian DNA double-strand break repair protein XRCC4 interacts with DNA ligase IV. *Curr Biol*, 7(8):588-98.
- D'Amours, D. and Jackson, S. P., (2002): The Mre11 complex: at the crossroads of dna repair and checkpoint signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3(5):317-27.
- de Lange, T. and Petrini, J. H., (2000): A new connection at human telomeres: association of the Mre11 complex with TRF2. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 65:265-73.

- de Lange, T., (2005): Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev*, 19(18):2100-10.
- Demuth, I., Digweed, M. and Concannon, P., (2004a): Human SNM1B is required for normal cellular response to both DNA interstrand crosslink-inducing agents and ionizing radiation. *Oncogene*, 23(53):8611-8.
- Demuth, I., Frappart, P. O., Hildebrand, G., et al., (2004b): An inducible null mutant murine model of Nijmegen breakage syndrome proves the essential function of NBS1 in chromosomal stability and cell viability. *Hum Mol Genet*, 13(20):2385-97.
- Desai-Mehta, A., Cerosaletti, K. M. and Concannon, P., (2001): Distinct functional domains of nibrin mediate Mre11 binding, focus formation, and nuclear localization. *Mol Cell Biol*, 21(6):2184-91.
- Digweed, M. and Sperling, K., (1996): Molecular analysis of Fanconi anaemia. *Bioessays*, 18(7):579-85.
- Digweed, M., Reis, A. and Sperling, K., (1999): Nijmegen breakage syndrome: consequences of defective DNA double strand break repair. *Bioessays*, 21(8):649-56.
- Digweed, M., Rothe, S., Demuth, I., et al., (2002): Attenuation of the formation of DNA-repair foci containing RAD51 in Fanconi anaemia. *Carcinogenesis*, 23(7):1121-6.
- Digweed, M., (2003): Response to environmental carcinogens in DNA-repair-deficient disorders. *Toxicology*, 193(1-2):111-124.
- Digweed, M. and Sperling, K., (2004): Nijmegen breakage syndrome: clinical manifestation of defective response to DNA double-strand breaks. *DNA Repair (Amst)*, 3(8-9):1207-17.
- Distel, L., Neubauer, S., Varon, R., et al., (2003): Fatal toxicity following radio- and chemotherapy of medulloblastoma in a child with unrecognized Nijmegen breakage syndrome. *Med Pediatr Oncol*, 41(1):44-8.
- Dumon-Jones, V., Frappart, P. O., Tong, W. M., et al., (2003): Nbn heterozygosity renders mice susceptible to tumor formation and ionizing radiation-induced tumorigenesis. *Cancer Res*, 63(21):7263-9.
- Durocher, D., Taylor, I. A., Sarbassova, D., et al., (2000): The molecular basis of FHA domain:phosphopeptide binding specificity and implications for phospho-dependent signaling mechanisms. *Mol Cell*, 6(5):1169-82.
- el-Deiry, W. S., Harper, J. W., O'Connor, P. M., et al., (1994): WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res*, 54(5):1169-74.

- Fischer, U., Hemmer, D., Heckel, D., et al., (2001): KUB3 amplification and overexpression in human gliomas. *Glia*, 36(1):1-10.
- Fouladi, B., Sabatier, L., Miller, D., et al., (2000): The relationship between spontaneous telomere loss and chromosome instability in a human tumor cell line. *Neoplasia*, 2(6):540-54.
- Fujimoto, M., Matsumoto, K., Iguchi-Arigo, S. M., et al., (2001): Disruption of MSSP, c-myc single-strand binding protein, leads to embryonic lethality in some homozygous mice. *Genes Cells*, 6(12):1067-75.
- Gatei, M., Young, D., Cerosaletti, K. M., et al., (2000): ATM-dependent phosphorylation of nibrin in response to radiation exposure. *Nat Genet*, 25(1):115-9.
- German, J., (1993): Bloom syndrome: a mendelian prototype of somatic mutational disease. *Medicine (Baltimore)*, 72(6):393-406.
- Gilley, D., Tanaka, H., Hande, M. P., et al., (2001): DNA-PKcs is critical for telomere capping. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(26):15084-8.
- Gisselsson, D., Jonson, T., Petersen, A., et al., (2001): Telomere dysfunction triggers extensive DNA fragmentation and evolution of complex chromosome abnormalities in human malignant tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(22):12683-8.
- Gonzalez-Suarez, E., Samper, E., Flores, J. M., et al., (2000): Telomerase-deficient mice with short telomeres are resistant to skin tumorigenesis. *Nat Genet*, 26(1):114-7.
- Goytisolo, F. A., Samper, E., Edmonson, S., et al., (2001): The absence of the dna-dependent protein kinase catalytic subunit in mice results in anaphase bridges and in increased telomeric fusions with normal telomere length and G-strand overhang. *Mol Cell Biol*, 21(11):3642-51.
- Grawunder, U., Wilm, M., Wu, X., et al., (1997): Activity of DNA ligase IV stimulated by complex formation with XRCC4 protein in mammalian cells. *Nature*, 388(6641):492-5.
- Green, A. J., Yates, J. R., Taylor, A. M., et al., (1995): Severe microcephaly with normal intellectual development: the Nijmegen breakage syndrome. *Arch Dis Child*, 73(5):431-4.
- Grigorova, M., Lyman, R. C., Caldas, C., et al., (2005): Chromosome abnormalities in 10 lung cancer cell lines of the NCI-H series analyzed with spectral karyotyping. *Cancer Genet Cytogenet*, 162(1):1-9.

- Haber, J. E., (2000): Partners and pathways repairing a double-strand break. *Trends Genet*, 16(6):259-64.
- Harley, C. B., Futcher, A. B. and Greider, C. W., (1990): Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*, 345(6274):458-60.
- Hiel JA, Weemaes CM, van den Heuvel LP, et al., (2000): Nijmegen breakage syndrome. The International Nijmegen Breakage Syndrome Study Group. *Arch Dis Child*, 82(5):400-6.
- Hirao, A., Kong, Y. Y., Matsuoka, S., et al., (2000): DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2. *Science*, 287(5459):1824-7.
- Hiyama, E. and Hiyama, K., (2002): Clinical utility of telomerase in cancer. *Oncogene*, 21(4):643-9.
- Hockemeyer, D., Daniels, J. P., Takai, H., et al., (2006): Recent expansion of the telomeric complex in rodents: Two distinct POT1 proteins protect mouse telomeres. *Cell*, 126(1):63-77.
- Houghtaling, S., Newell, A., Akkari, Y., et al., (2005): Fancd2 functions in a double strand break repair pathway that is distinct from non-homologous end joining. *Hum Mol Genet*, 14(20):3027-33.
- Hsu, H. L., Gilley, D., Galande, S. A., et al., (2000): Ku acts in a unique way at the mammalian telomere to prevent end joining. *Genes Dev*, 14(22):2807-12.
- Iijima, K., Komatsu, K., Matsuura, S., et al., (2004): The Nijmegen breakage syndrome gene and its role in genome stability. *Chromosoma*, 113(2):53-61.
- Johnson, N. F., Carpenter, T. R., Jaramillo, R. J., et al., (1997): DNA damage-inducible genes as biomarkers for exposures to environmental agents. *Environ Health Perspect*, 105 Suppl 4:913-8.
- Kanaar, R., Hoeijmakers, J. H. and van Gent, D. C., (1998): Molecular mechanisms of DNA double strand break repair. *Trends Cell Biol*, 8(12):483-9.
- Kanaoka, Y. and Nojima, H., (1994): SCR: novel human suppressors of cdc2/cdc13 mutants of *Schizosaccharomyces pombe* harbour motifs for RNA binding proteins. *Nucleic Acids Res*, 22(13):2687-93.
- Karlseder, J., Broccoli, D., Dai, Y., et al., (1999): p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2. *Science*, 283(5406):1321-5.

- Karlseder, J., Hoke, K., Mirzoeva, O. K., et al., (2004): The telomeric protein TRF2 binds the ATM kinase and can inhibit the ATM-dependent DNA damage response. *PLoS Biol*, 2(8):E240.
- Karran, P., (2000): DNA double strand break repair in mammalian cells. *Curr Opin Genet Dev*, 10(2):144-50.
- Khanna, K. K. and Jackson, S. P., (2001): DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet*, 27(3):247-54.
- Kim, D. G., You, K. R., Liu, M. J., et al., (2002): GADD153-mediated anticancer effects of N-(4-hydroxyphenyl)retinamide on human hepatoma cells. *J Biol Chem*, 277(41):38930-8.
- Koundrioukoff, S., Jonsson, Z. O., Hasan, S., et al., (2000): A direct interaction between proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Cdk2 targets PCNA-interacting proteins for phosphorylation. *J Biol Chem*, 275(30):22882-7.
- Kracker, S., Bergmann, Y., Demuth, I., et al., (2005): Nibrin functions in Ig class-switch recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(5):1584-9.
- Lamartine, J., Seri, M., Cinti, R., et al., (1997): Molecular cloning and mapping of a human cDNA (PA2G4) that encodes a protein highly homologous to the mouse cell cycle protein p38-2G4. *Cytogenet Cell Genet*, 78(1):31-5.
- Lee, Y., Barnes, D. E., Lindahl, T., et al., (2000): Defective neurogenesis resulting from DNA ligase IV deficiency requires Atm. *Genes Dev*, 14(20):2576-80.
- Levine, A. J., (1997): p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, 88(3):323-31.
- Liang, F. and Jasin, M., (1996): Ku80-deficient cells exhibit excess degradation of extrachromosomal DNA. *J Biol Chem*, 271(24):14405-11.
- Lindahl, T. and Barnes, D. E., (2000): Repair of endogenous DNA damage. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 65:127-33.
- Liu, Z., Ahn, J. Y., Liu, X., et al., (2006): Ebp1 isoforms distinctively regulate cell survival and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(29):10917-22.
- Loor, G., Zhang, S. J., Zhang, P., et al., (1997): Identification of DNA replication and cell cycle proteins that interact with PCNA. *Nucleic Acids Res*, 25(24):5041-6.
- Lumsden, J. M., McCarty, T., Petiniot, L. K., et al., (2004): Immunoglobulin class switch recombination is impaired in Atm-deficient mice. *J Exp Med*, 200(9):1111-21.

- Makarov, V. L., Hirose, Y. and Langmore, J. P., (1997): Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening. *Cell*, 88(5):657-66.
- Maser, R. S., Zinkel, R. and Petrini, J. H., (2001): An alternative mode of translation permits production of a variant NBS1 protein from the common Nijmegen breakage syndrome allele. *Nat Genet*, 27(4):417-21.
- Matsuura, S., Tauchi, H., Nakamura, A., et al., (1998): Positional cloning of the gene for Nijmegen breakage syndrome. *Nat Genet*, 19(2):179-81.
- Mills, K. D., Ferguson, D. O. and Alt, F. W., (2003): The role of DNA breaks in genomic instability and tumorigenesis. *Immunol Rev*, 194:77-95.
- Mochida, G. H. and Walsh, C. A., (2001): Molecular genetics of human microcephaly. *Curr Opin Neurol*, 14(2):151-6.
- Moshous, D., Pannetier, C., Chasseval Rd, R., et al., (2003): Partial T and B lymphocyte immunodeficiency and predisposition to lymphoma in patients with hypomorphic mutations in Artemis. *J Clin Invest*, 111(3):381-7.
- Muller-Tidow, C., Ji, P., Diederichs, S., et al., (2004): The cyclin A1-CDK2 complex regulates DNA double-strand break repair. *Mol Cell Biol*, 24(20):8917-28.
- Nakanishi, K., Yang, Y. G., Pierce, A. J., et al., (2005): Human Fanconi anemia monoubiquitination pathway promotes homologous DNA repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(4):1110-5.
- Nilsen, H., Haushalter, K. A., Robins, P., et al., (2001): Excision of deaminated cytosine from the vertebrate genome: role of the SMUG1 uracil-DNA glycosylase. *Embo J*, 20(15):4278-86.
- O'Driscoll, M., Cerosaletti, K. M., Girard, P. M., et al., (2001): DNA ligase IV mutations identified in patients exhibiting developmental delay and immunodeficiency. *Mol Cell*, 8(6):1175-85.
- Offer, H., Erez, N., Zurer, I., et al., (2002): The onset of p53-dependent DNA repair or apoptosis is determined by the level of accumulated damaged DNA. *Carcinogenesis*, 23(6):1025-32.
- Oh, H., Wang, S. C., Prahash, A., et al., (2003): Telomere attrition and Chk2 activation in human heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(9):5378-83.
- Olovnikov, A. M., (1973): A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J Theor Biol*, 41(1):181-90.

- Opresko, P. L., von Kobbe, C., Laine, J. P., et al., (2002): Telomere-binding protein TRF2 binds to and stimulates the Werner and Bloom syndrome helicases. *J Biol Chem*, 277(43):41110-9.
- Otsuki, T., Wang, J., Demuth, I., et al., (1998): Assessment of mitomycin C sensitivity in Fanconi anemia complementation group C gene (Fac) knock-out mouse cells. *Int J Hematol*, 67(3):243-8.
- Pandita, T. K., Pathak, S. and Geard, C. R., (1995): Chromosome end associations, telomeres and telomerase activity in ataxia telangiectasia cells. *Cytogenet Cell Genet*, 71(1):86-93.
- Paull, T. T. and Gellert, M., (1998): The 3' to 5' exonuclease activity of Mre 11 facilitates repair of DNA double-strand breaks. *Mol Cell*, 1(7):969-79.
- Pawar, S. A., Szentirmay, M. N., Hermeking, H., et al., (2004): Evidence for a cancer-specific switch at the CDK4 promoter with loss of control by both USF and c-Myc. *Oncogene*, 23(36):6125-35.
- Radomski, N. and Jost, E., (1995): Molecular cloning of a murine cDNA encoding a novel protein, p38-2G4, which varies with the cell cycle. *Exp Cell Res*, 220(2):434-45.
- Ranganathan, V., Heine, W. F., Ciccone, D. N., et al., (2001): Rescue of a telomere length defect of Nijmegen breakage syndrome cells requires NBS and telomerase catalytic subunit. *Curr Biol*, 11(12):962-6.
- Reina-San-Martin, B., Nussenzweig, M. C., Nussenzweig, A., et al., (2005): Genomic instability, endoreduplication, and diminished Ig class-switch recombination in B cells lacking Nbs1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(5):1590-5.
- Ritchie, K. B. and Petes, T. D., (2000): The Mre11p/Rad50p/Xrs2p complex and the Tel1p function in a single pathway for telomere maintenance in yeast. *Genetics*, 155(1):475-9.
- Rooney, S., Chaudhuri, J. and Alt, F. W., (2004): The role of the non-homologous end-joining pathway in lymphocyte development. *Immunol Rev*, 200:115-31.
- Saar, K., Chrzanowska, K. H., Stumm, M., et al., (1997): The gene for the ataxia-telangiectasia variant, Nijmegen breakage syndrome, maps to a 1-cM interval on chromosome 8q21. *Am J Hum Genet*, 60(3):605-10.
- Seemanova, E., Passarge, E., Beneskova, D., et al., (1985): Familial microcephaly with normal intelligence, immunodeficiency, and risk for lymphoreticular malignancies: a new autosomal recessive disorder. *Am J Med Genet*, 20(4):639-48.

- Seemanova, E., Sperling, K., Neitzel, H., et al., (2005): Nijmegen Breakage Syndrome (NBS) with neurological abnormalities and without chromosomal instability. *J Med Genet*.
- Seemanova, E., Sperling, K., Neitzel, H., et al., (2006): Nijmegen breakage syndrome (NBS) with neurological abnormalities and without chromosomal instability. *J Med Genet*, 43(3):218-24.
- Sekiguchi, J. M. and Ferguson, D. O., (2006): DNA double-strand break repair: a relentless hunt uncovers new prey. *Cell*, 124(2):260-2.
- Shiloh, Y., (2001): ATM (ataxia telangiectasia mutated): expanding roles in the DNA damage response and cellular homeostasis. *Biochem Soc Trans*, 29(Pt 6):661-6.
- Shiloh, Y., (2003): ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer*, 3(3):155-68.
- Slebos, R. J., Lee, M. H., Plunkett, B. S., et al., (1994): p53-dependent G1 arrest involves pRB-related proteins and is disrupted by the human papillomavirus 16 E7 oncoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(12):5320-4.
- Squatrito, M., Mancino, M., Donzelli, M., et al., (2004): EBP1 is a nucleolar growth-regulating protein that is part of pre-ribosomal ribonucleoprotein complexes. *Oncogene*, 23(25):4454-65.
- Stansel, R. M., de Lange, T. and Griffith, J. D., (2001): T-loop assembly in vitro involves binding of TRF2 near the 3' telomeric overhang. *Embo J*, 20(19):5532-40.
- Taalman, R. D., Jaspers, N. G., Scheres, J. M., et al., (1983): Hypersensitivity to ionizing radiation, in vitro, in a new chromosomal breakage disorder, the Nijmegen Breakage Syndrome. *Mutat Res*, 112(1):23-32.
- Takata, M., Sasaki, M. S., Sonoda, E., et al., (1998): Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *Embo J*, 17(18):5497-508.
- Tanzanella, C., Antocchia, A., Spadoni, E., et al., (2003): Chromosome instability and nibrin protein variants in NBS heterozygotes. *Eur J Hum Genet*, 11(4):297-303.
- Tarsounas, M., Munoz, P., Claas, A., et al., (2004): Telomere maintenance requires the RAD51D recombination/repair protein. *Cell*, 117(3):337-47.
- Tauchi, H., (2000): Positional cloning and functional analysis of the gene responsible for Nijmegen breakage syndrome, NBS1. *J Radiat Res (Tokyo)*, 41(1):9-17.

- Tauchi, H., Matsuura, S., Kobayashi, J., et al., (2002): Nijmegen breakage syndrome gene, NBS1, and molecular links to factors for genome stability. *Oncogene*, 21(58):8967-80.
- Teigelkamp, S., Mundt, C., Achsel, T., et al., (1997): The human U5 snRNP-specific 100-kD protein is an RS domain-containing, putative RNA helicase with significant homology to the yeast splicing factor Prp28p. *Rna*, 3(11):1313-26.
- Trujillo, K. M., Yuan, S. S., Lee, E. Y., et al., (1998): Nuclease activities in a complex of human recombination and DNA repair factors Rad50, Mre11, and p95. *J Biol Chem*, 273(34):21447-50.
- Uziel, T., Lerenthal, Y., Moyal, L., et al., (2003): Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. *Embo J*, 22(20):5612-21.
- van der Burgt, I., Chrzanowska, K. H., Smeets, D., et al., (1996): Nijmegen breakage syndrome. *J Med Genet*, 33(2):153-6.
- van Steensel, B., Smogorzewska, A. and de Lange, T., (1998): TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell*, 92(3):401-13.
- Varon, R., Vissinga, C., Platzer, M., et al., (1998): Nibrin, a novel DNA double-strand break repair protein, is mutated in Nijmegen breakage syndrome. *Cell*, 93(3):467-76.
- Varon, R., Seemanova, E., Chrzanowska, K., et al., (2000): Clinical ascertainment of Nijmegen breakage syndrome (NBS) and prevalence of the major mutation, 657del5, in three Slav populations. *Eur J Hum Genet*, 8(11):900-2.
- Wang, H., Zeng, Z. C., Bui, T. A., et al., (2001): Efficient rejoining of radiation-induced DNA double-strand breaks in vertebrate cells deficient in genes of the RAD52 epistasis group. *Oncogene*, 20(18):2212-24.
- Wang, Y. G., Nnakwe, C., Lane, W. S., et al., (2004): Phosphorylation and regulation of DNA ligase IV stability by DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem*, 279(36):37282-90.
- Weemaes, C. M., Hustinx, T. W., Scheres, J. M., et al., (1981): A new chromosomal instability disorder: the Nijmegen breakage syndrome. *Acta Paediatr Scand*, 70(4):557-64.
- Woods, C. G., (2004): Human microcephaly. *Curr Opin Neurobiol*, 14(1):112-7.
- Woods, C. G., Bond, J. and Enard, W., (2005): Autosomal recessive primary microcephaly (MCPH): a review of clinical, molecular, and evolutionary findings. *Am J Hum Genet*, 76(5):717-28.

- Wu, X., Ranganathan, V., Weisman, D. S., et al., (2000): ATM phosphorylation of Nijmegen breakage syndrome protein is required in a DNA damage response. *Nature*, 405(6785):477-82.
- Xia, Y., Welch, C. L., Warden, C. H., et al., (1996): Assignment of the mouse ataxia-telangiectasia gene (*Atm*) to mouse chromosome 9. *Mamm Genome*, 7(7):554-5.
- Yang, C. R., Yeh, S., Leskov, K., et al., (1999): Isolation of Ku70-binding proteins (KUBs). *Nucleic Acids Res*, 27(10):2165-74.
- Yang, Y. G., Saidi, A., Frappart, P. O., et al., (2006): Conditional deletion of *Nbs1* in murine cells reveals its role in branching repair pathways of DNA double-strand breaks. *Embo J*.
- Zhang, Y., Zhou, J. and Lim, C. U., (2006): The role of NBS1 in DNA double strand break repair, telomere stability, and cell cycle checkpoint control. *Cell Res*, 16(1):45-54.
- Zhu, J., Petersen, S., Tessarollo, L., et al., (2001): Targeted disruption of the Nijmegen breakage syndrome gene *NBS1* leads to early embryonic lethality in mice. *Curr Biol*, 11(2):105-9.
- Zhu, X. D., Kuster, B., Mann, M., et al., (2000): Cell-cycle-regulated association of RAD50/MRE11/NBS1 with TRF2 and human telomeres. *Nat Genet*, 25(3):347-52.
- Zhu, X. D., Niedernhofer, L., Kuster, B., et al., (2003): ERCC1/XPF removes the 3' overhang from uncapped telomeres and represses formation of telomeric DNA-containing double minute chromosomes. *Mol Cell*, 12(6):1489-98.
- Zhuang, J., Zhang, J., Willers, H., et al., (2006): Checkpoint kinase 2-mediated phosphorylation of BRCA1 regulates the fidelity of nonhomologous end-joining. *Cancer Res*, 66(3):1401-8.

## 7 Anhang

Tab. 18: Übersicht über die Gene auf Chromosom 12q13.11-14.3

Region: 46892627.00..63951670.00

#start	stop	Symbol	O	LinkOut	Cyto	Description
47009030	47010329	LOC341567	+		12q13.11	HANP1
47022179	47030844	FLJ31295	-		12q13.11	hypothetical protein FLJ31295
47035709	47036695	OR5BK1P	-		12q13.11	olfactory receptor, family 5, subfamily BK, member 1 pseudogene
47065401	47066355	OR5BT1P	-		12q13.2	olfactory receptor, family 5, subfamily BT, member 1 pseudogene
47074533	47075436	OR5BJ1P	-		5pter-p15.3	olfactory receptor, family 5, subfamily BJ, member 1 pseudogene
47122083	47122997	OR8T1P	-		12q13.2	olfactory receptor, family 8, subfamily T, member 1 pseudogene
47152715	47153110	ANP32D	+	OMIM	12q13.11	acidic (leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 family, member D
47163290	47176434	MGC35033	+		12q13.11	hypothetical protein MGC35033
47205682	47208153	OR8S1	+		12q13.11	olfactory receptor, family 8, subfamily S, member 1
47239932	47240864	OR5BS1P	+		12q13.11	olfactory receptor, family 5, subfamily BS, member 1 pseudogene
47247735	47250096	LALBA	-	OMIM	12q13	lactalbumin, alpha-
47307890	47308862	OR11M1P	+		12q13.11	olfactory receptor, family 11, subfamily M, member 1 pseudogene
47333467	47362270	FLJ20436	-		12q13.11	hypothetical protein FLJ20436
47373019	47397048	CCNT1	-	OMIM	12pter-qter	cyclin T1
47407510	47446840	LOC255411	+		12q13.12	hypothetical LOC255411
47446248	47464179	ADCY6	-	OMIM	12q12-q13	adenylate cyclase 6
47480621	47481138	LOC390314	-		12q13.12	similar to Protein C20orf27
47496779	47508991	CACNB3	+	OMIM	12q13	calcium channel, voltage-dependent, beta 3 subunit
47509807	47532224	DDX23	-		12q13.12	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 23
47537195	47545920	RND1	-		12q12-q13	Rho family GTPase 1
47584197	47601625	NYD-SP28	+		12q13.12	NYD-SP28 protein
47602009	47605549	FKBP11	-		12q13.12	FK506 binding protein 11, 19 kDa
47616259	47637577	ARF3	-	OMIM	12q13	ADP-ribosylation factor 3
47645391	47651810	WNT10B	-	OMIM	12q13	wingless-type MMTV integration site family, member 10B
47658503	47662746	WNT1	+	OMIM	12q13	wingless-type MMTV integration site family, member 1
47675201	47679359	DDN	-		12q13.12	dendrin
47682323	47698859	PRKAG1	-	OMIM	12q12-q14	protein kinase, AMP-activated, gamma 1 non-catalytic subunit
47701830	47735374	MLL2	-	OMIM	12q12-q14	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 2
47744735	47750042	RHEBL1	-		12q13.12	Ras homolog enriched in brain like 1
47769475	47774869	DHH	-	OMIM	12q12-q13.1	desert hedgehog homolog (Drosophila)
47777192	47790731	LIMR	-		12q13.12	lipocalin-interacting membrane receptor
47807835	47809773	K-ALPHA-1	-	OMIM	12q13.12	tubulin, alpha, ubiquitous
47864852	47869128	TUBA3	-	OMIM	12q12-12q14.3	tubulin, alpha 3
47945132	47953380	TUBA6	+		12q12-q14	tubulin alpha 6
47975251	47978736	PRPH	+	OMIM	12q12-q13	peripherin
48003329	48011781	TROAP	+	OMIM	12q13.12	trophinin associated protein (tastin)
48012467	48017238	LOC338761	-		12q13.12	similar to C1q-related factor precursor
48027308	48031964	FLJ13236	+		12q13.12	hypothetical protein FLJ13236
48047560	48207276	SPATS2	+		12q13.12	spermatogenesis associated, serine-rich 2
48219207	48238344	KCNH3	+	OMIM	12q13	potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 3
48238355	48248178	MCRS1	-		12q13.12	microspherule protein 1
48267557	48285621	DKFZP434J0113	-		12q13.12	hypothetical protein DKFZP434J0113

48303670	48324716	HYPC	+		12q	Huntingtin interacting protein C
48317991	48387262	FMNL3	-		12q13.12	fornin-like 3
48432506	48444772	TEGT	+	OMIM	12q12-q13	testis enhanced gene transcript (BAX inhibitor 1)
48471202	48477727	KIAA1602	-		12q13.12	KIAA1602 protein
48482318	48485769	LOC283331	-		12q13.12	hypothetical protein LOC283331
48517827	48523142	LOC144233	-		12q13.12	hypothetical protein LOC144233
48546947	48589987	FAIM2	-	OMIM	12q13	Fas apoptotic inhibitory molecule 2
48588943	48591907	LOC283332	-		12q13.12	hypothetical protein LOC283332
48630796	48638931	AQP2	+	OMIM	12q12-q13	aquaporin 2 (collecting duct)
48641546	48645227	AQP5	+	OMIM	12q13	aquaporin 5
48647244	48657189	AQP6	+	OMIM	12q13	aquaporin 6, kidney specific
48669214	48705488	RACGAP1	-	OMIM	12q13.12	Rac GTPase activating protein 1
48737754	48763661	ACCN2	+	OMIM	12q12	amiloride-sensitive cation channel 2, neuronal
48765279	48780692	SMARCD1	+	OMIM	12q13-q14	SMN2 related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily d, member 1
48784068	48791363	GPD1	+	OMIM	12q12-q13	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 (soluble)
48792167	48800501	MGC14288	+		12q13.12	hypothetical protein MGC14288
48809848	48847366	LASS5	-		12q13.12	LAG1 longevity assurance homolog 5 (S. cerevisiae)
48855840	48963546	EPLIN	-	OMIM	12q13	epithelial protein lost in neoplasm beta
49007359	49076672	LOC121006	-		12q13.12	hypothetical protein LOC121006
49080917	49160055	LOC113251	+		12q13.12	c-Mpl binding protein
49185035	49360320	LOC439917	+		12q13.12	hypothetical gene supported by NM_173602
49444128	49500328	ATF1	+	OMIM	12q13	activating transcription factor 1
49522983	49567935	MGC57341	+		12q13.12	hypothetical protein MGC57341
49605036	49612555	DKFZP586A0522	+		12q13.12	DKFZP586A0522 protein
49666044	49706409	SLC11A2	-	OMIM	12q13	solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporters), member 2
49728399	49740471	HCCR1	+		12q13.12	cervical cancer 1 protooncogene
49741257	49763600	C12orf22	-		12q13.11-q13.12	chromosome 12 open reading frame 22
49774889	49852931	TFCP2	-	OMIM	12q13	transcription factor CP2
49870297	49918871	POU6F1	-		12q13.13	POU domain, class 6, transcription factor 1
49918893	49923834	DAZAP2	+	OMIM	12q12	DAZ associated protein 2
49925407	49950249	LOC57228	-		12q13.13	hypothetical protein from clone 643
49961090	50004191	BIN2	-	OMIM	12q13	bridging integrator 2
50008494	50026730	ELA1	-	OMIM	12q13	elastase 1, pancreatic
50033435	50059832	GALNT6	-	OMIM	12q13	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 6 (GalNAc-T6)
50105024	50177920	SLC4A8	+	OMIM	12q13	solute carrier family 4, sodium bicarbonate cotransporter, member 8
50181879	50189247	LOC283400	+		12q13.13	hypothetical protein LOC283400
50271287	50488365	SCN8A	+	OMIM	12q13	sodium channel, voltage gated, type VIII, alpha
50493991	50506144	LOC401720	-		12q13.13	similar to fidgetin
50524724	50532780	LOC440098	+		12q13.13	LOC440098
50568011	50571705	DKFZp686O1689	+		12q13.13	hypothetical protein DKFZp686O1689
50587469	50601120	ACVRL1	+	OMIM	12q11-q14	activin A receptor type II-like 1
50631753	50677127	ACVR1B	+	OMIM	12q13	activin A receptor, type IB
50687015	50695938	GRASP	+		12q13.13	GRP1 (general receptor for phosphoinositides 1)-associated scaffold protein
50723763	50739554	NR4A1	+	OMIM	12q13	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1
50750073	50757546	FLJ11773	+		12q13.13	hypothetical protein FLJ11773
50787369	50788314	OR7E47P	+		12q13.13	olfactory receptor, family 7, subfamily E, member 47 pseudogene

50849577	50865800	LOC144501	-		12q13.13	hypothetical protein LOC144501
50885636	50890874	LOC283403	-		12q13.13	hypothetical protein LOC283403
50892216	50913332	LOC401721	-		12q13.13	similar to DKFZP586A0522 protein
50913221	50928976	KRT7	+	OMIM	12q12-q13	keratin 7
50929672	50939395	KRTHBP4	-		12q13	keratin, hair, basic, pseudogene 4
50943932	50948448	KRTHBP3	+		12q13	keratin, hair, basic, pseudogene 3
50954898	50962839	LOC387859	-		12q13.13	hypothetical LOC387859
50965966	50971566	KRTHB1	-	OMIM	12q13	keratin, hair, basic, 1
50981916	50989214	KRTHB6	+	OMIM	12q13	keratin, hair, basic, 6 (monilethrix)
50994352	51001438	KRTHB3	-	OMIM	12q13	keratin, hair, basic, 3
51021148	51034414	KRTHBP2	+		12q13	keratin, hair, basic, pseudogene 2
51040059	51047576	KRTHB5	-	OMIM	12q13	keratin, hair, basic, 5
51057299	51065684	KRTHB4	-	OMIM	12q13	keratin, hair, basic, 4
51074002	51086443	KRTHB2	-	OMIM	12q13	keratin, hair, basic, 2
51094012	51099191	KRTHBP1	-		12q13	keratin, hair, basic, pseudogene 1
51104121	51114373	K6HF	-		12q13	cytokeratin type II
51126720	51132130	KRT6B	-	OMIM	12q12-q13	keratin 6B
51148862	51153826	KRT6E	-		12q13.13	keratin 6E
51167244	51173240	KRT6C	-		12q12-q13	keratin 6C
51167244	51173287	KRT6A	-	OMIM	12q12-q13	keratin 6A
51194628	51200510	KRT5	-	OMIM	12q12-q13	keratin 5 (epidermolysis bullosa simplex, Dowling-Meara/Kobner/Weber-Cockayne types)
51223961	51233170	KRT6RS	-	OMIM	12q13.13	keratin 6 rs
51245870	51253876	K6IRS4	-	OMIM	12q13.13	keratin 6 rs4
51265640	51281559	K6IRS2	-	OMIM	12q13.13	keratin protein K6irs
51287622	51298610	K6IRS3	-	OMIM	12q13.3	keratin 6 rs3
51324610	51332226	KRT2A	-	OMIM	12q11-q13	keratin 2A (epidermal ichthyosis bullosa of Siemens)
51354719	51360446	KRT1	-	OMIM	12q12-q13	keratin 1 (epidermolytic hyperkeratosis)
51369910	51383514	KRT1B	-		12q13.13	keratin 1B
51410476	51413060	LOC400036	+		12q13.13	similar to DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 23; PRP28p homolog; U5 snRNP 100 kD protein;
51448206	51457372	HUMCYT2A	-		12q13.13	cytokeratin 2
51469751	51476093	KRT3	-	OMIM	12q12-q13	keratin 3
51486601	51494602	KRT4	-	OMIM	12q12-q13	keratin 4
51501499	51514344	KRT6L	-		12q13.13	keratin 6L
51517856	51529045	K5B	-		12q13.13	keratin 5b
51577242	51585091	KRT8	-	OMIM	12q13	keratin 8
51628922	51632952	KRT18	+	OMIM	12q13	keratin 18
51696524	51720274	EIF4B	+	OMIM	12q13.13	eukaryotic translation initiation factor 4B
51727077	51744430	TENC1	+	OMIM	12q13.13	tensin like C1 domain containing phosphatase
51744665	51759405	FLJ14800	-		12q13.13	hypothetical protein FLJ14800
51777716	51782391	IGFBP6	+	OMIM	12q13	insulin-like growth factor binding protein 6
51783580	51804589	SOAT2	+	OMIM	12q13.13	sterol O-acyltransferase 2
51811682	51834541	LOC400039	+		12q13.13	similar to eukaryotic translation initiation factor 4A, isoform 1
51837714	51860647	CSAD	-		12q13.11-q14.3	cysteine sulfonic acid decarboxylase
51860799	51869475	LOC283337	+		12q13.13	hypothetical protein LOC283337
51871374	51881245	ITGB7	-	OMIM	12q13.13	integrin, beta 7
51890621	51912247	RARG	-	OMIM	12q13	retinoic acid receptor, gamma

51932147	51934455	MGC11308	+		12q13.13	hypothetical protein MGC11308
51948818	51973694	ESPL1	+	OMIM	12q	extra spindle poles like 1 (S. cerevisiae)
51975584	51979501	PFDN5	+	OMIM	12q12	prefoldin 5
51979769	51987222	C12orf10	+		12q13	chromosome 12 open reading frame 10
51987508	52001641	AAAS	-	OMIM	12q13	achalasia, adrenocortical insufficiency, alacrimia (Algrove, triple-A)
52006630	52015804	SP7	-	OMIM	12q13.13	Sp7 transcription factor
52060246	52096497	SP1	+	OMIM	12q13.1	Sp1 transcription factor
52103308	52111579	AMHR2	+	OMIM	12q13	anti-Müllerian hormone receptor, type II
52121713	52126694	DKFZP664J157	+		12q12	DKFZP664J157 protein
52132415	52159666	PCBP2	+	OMIM	12q13.12-q13.13	poly(rC) binding protein 2
52160547	52179538	MAP3K12	-	OMIM	12q13	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 12
52180972	52186482	TARBP2	+	OMIM	12q12-q13	TAR (HIV) RNA binding protein 2
52186741	52187689	NPFF	-	OMIM	12q13.13	neuropeptide FF-amide peptide precursor
52196026	52306403	ATF7	-	OMIM	12q13	activating transcription factor 7
52312829	52313206	LOC341412	-		12q13.13	similar to ribosomal protein L31
52345104	52352699	AIP5G2	-	OMIM	12q13.13	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit c (subunit 9), isoform 2
52391170	52407486	KIAA1536	-		12q13.13	KIAA1536 protein
52430511	52484745	LOC440100	-		12q13.13	LOC440100
52618843	52626595	HOXC13	+	OMIM	12q13.3	homeo box C13
52634981	52636617	HOXC12	+	OMIM	12q12-q13	homeo box C12
52642365	52647398	LOC400041	-		12q13.13	hypothetical LOC400041
52653196	52656470	HOXC11	+	OMIM	12q13.3	homeo box C11
52665221	52670330	HOXC10	+	OMIM	12q13.3	homeo box C10
52680144	52683388	HOXC9	+	OMIM	12q13.3	homeo box C9
52689157	52692814	HOXC8	+	OMIM	12q13.3	homeo box C8
52696940	52735630	HOXC4	+	OMIM	12q13.3	homeo box C4
52697103	52710865	HOXC6	+	OMIM	12q13.3	homeo box C6
52713099	52715412	HOXC5	+	OMIM	12q13.3	homeo box C5
52735847	52802285	LOC440101	+		12q13.13	hypothetical gene supported by AK022887; AK056417
52806140	52812894	LOC400043	+		12q13.13	hypothetical LOC400043
52861519	52869024	SMUG1	-	OMIM	12q13.11-q13.3	single-strand selective monofunctional uracil DNA glycosylase
52921678	52960151	CBX5	-	OMIM	12q13.13	chromobox homolog 5 (HP1 alpha homolog, Drosophila)
52960755	52965297	HNRPA1	+	OMIM	12q13.1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1
52972165	52975811	NFE2	-	OMIM	12q13	nuclear factor (erythroid-derived 2), 45kDa
53005178	53031900	COPZ1	+		12q13.2-q13.3	coatomer protein complex, subunit zeta 1
53042496	53044525	GPR84	-	OMIM	12q13.13	G protein-coupled receptor 84
53049187	53064748	ZNF385	-		12q13.13	zinc finger protein 385
53075315	53099272	ITGA5	-	OMIM	12q11-q13	integrin, alpha 5 (fibronectin receptor, alpha polypeptide)
53108354	53109454	LOC387864	+		12q13.2	hypothetical LOC387864
53136011	53151328	FLJ32942	-		12q13.2	hypothetical protein FLJ32942
53177780	53223160	HEM1	+	OMIM	12q13.1	hematopoietic protein 1
532592671	53259290	PDE1B	+	OMIM	12q13	phosphodiesterase 1B, calmodulin-dependent
53259299	53268710	PPP1R1A	-		12q13.2	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 1A
53310890	53314930	LACRT	-	OMIM	12q13	lacritin
53324899	53328413	DCD	-	OMIM	12q13	dermoxidin
53482902	53482952	VDAC5P	-		12q13.2	voltage-dependent anion channel 5, pseudogene

53534588	53538370	LOC118430	+		12q	small breast epithelial mucin
53628069	53664797	KIAA0748	-		12q13.2	KIAA0748 gene product
53699889	53707486	NEUROD4	+		12q13.2	neurogenic differentiation 4
53795584	53796522	OR9K1P	+		12q13.2	olfactory receptor, family 9, subfamily K, member 1 pseudogene
53809886	53810827	LOC441639	+		12q13.2	similar to Olfactory receptor 9K2
53838898	53839851	OR9R1P	+		12q13.2	olfactory receptor, family 9, subfamily R, member 1 pseudogene
53873912	53874867	OR10U1P	-		12q13.2	olfactory receptor, family 10, subfamily U, member 1 pseudogene
53942590	53943485	OR6C69P	+		12q13.2	olfactory receptor, family 6, subfamily C, member 69 pseudogene
53963801	53964734	OR6C72P	+		12q13.2	olfactory receptor, family 6, subfamily C, member 72 pseudogene
53991886	53992808	OR6C5P	+		12q13.2	olfactory receptor, family 6, subfamily C, member 5 pseudogene
54000651	54001589	OR6C1	+		12q13.2	olfactory receptor, family 6, subfamily C, member 1
54011752	54012687	OR6C3	+		12q13.2	olfactory receptor, family 6, subfamily C, member 3
54022889	54023827	OR6C7P	+		12q13.2	olfactory receptor, family 6, subfamily C, member 7 pseudogene
54056852	54057787	OR6C71P	-		12q13.2	olfactory receptor, family 6, subfamily C, member 71 pseudogene
54068496	54069428	OR6C66P	+		12q13.2	olfactory receptor, family 6, subfamily C, member 66 pseudogene
54076327	54077324	OR6C73P	+		12q13.2	olfactory receptor, family 6, subfamily C, member 73 pseudogene
54091773	54094838	LOC283368	-		12q13.2	similar to Polyhomeotic-like protein 1 (Early development regulator protein 1) (HPH1)
54106305	54107243	OR6C76	+		12q13.2	olfactory receptor, family 6, subfamily C, member 76
54114790	54159523	LOC440102	-		12q13.2	LOC440102
54202644	54203522	OR6C64P	+		12q13.2	olfactory receptor, family 6, subfamily C, member 64 pseudogene
54254466	54255392	OR2AP1	+		12q13.2	olfactory receptor, family 2, subfamily AP, member 1
54291674	54292605	OR6U2P	+		12q13.2	olfactory receptor, family 6, subfamily U, member 2 pseudogene
54326246	54328714	OR10AE3P	-		12q13.2	olfactory receptor, family 10, subfamily AE, member 3 pseudogene
54334606	54335186	PSMB3P	-		12q13.2	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 3 pseudogene
54361886	54364662	MGC17301	+		12q13.2	hypothetical protein MGC17301
54364623	54387894	ITGA7	-	OMIM	12q13	integrin, alpha 7
54396088	54399751	BLOC1S1	+	OMIM	12q13-q14	biogenesis of lysosome-related organelles complex-1, subunit 1
54400489	54404756	RDH5	+	OMIM	12q13-q14	retinol dehydrogenase 5 (11-cis and 9-cis)
54405519	54409076	CD63	-	OMIM	12q12-q13	CD63 antigen (melanoma 1 antigen)
54423331	54430332	GDF11	+	OMIM	12q13.2	growth differentiation factor 11
54437325	54497773	CIP29	-		12q13.2	cytokine induced protein 29 kDa
54499049	54501226	ORMDL2	+		12q13.2	ORM1-like 2 (S. cerevisiae)
54501011	54509603	DNAJC14	-	OMIM	12q13.2	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 14
54510816	54515521	LOC440104	+		12q13.2	similar to RIKEN cDNA 1110012D08
54515482	54523000	MMP19	-	OMIM	12q14	matrix metalloproteinase 19
54580351	54580762	GSTPP	+		12q13-q14	glutathione S-transferase pi pseudogene
54581464	54607964	PYM	-		12q13.2	PYM protein
54611213	54634074	DGKA	+	OMIM	12q13.3	diacylglycerol kinase, alpha 80kDa
54634157	54646093	SILV	-	OMIM	12q13-q14	silver homolog (mouse)
54646826	54652835	CDK2	+	OMIM	12q13	cyclin-dependent kinase 2
54654129	54674757	RAB5B	+	OMIM	12q13	RAB5B, member RAS oncogene family
54681550	54685109	SUOX	+	OMIM	12q13.2	sulfite oxidase
54704791	54717887	ZNFN1A4	+	OMIM	12q13	zinc finger protein, subfamily 1A, 4 (Eos)
54722193	54724274	RPS26	+	OMIM	12q13	ribosomal protein S26
54760154	54782854	ERBB3	+	OMIM	12q13	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3 (avian)
54784692	54793363	PA2G4	+	OMIM	12q13	proliferation-associated 2G4, 38kDa

54796641	54797883	RPL41	+		12q13	ribosomal protein L41
54798297	54802545	FLJ14451	+		12q13.2	hypothetical protein FLJ14451
54808321	54824722	MBC2	+		12q13.2	likely ortholog of mouse membrane bound C2 domain containing protein
54833923	54838027	MLC15A	+		12q13.13	myosin light chain 1 slow a
54838413	54841627	MYL6	+		12q13.2	myosin, light polypeptide 6, alkali, smooth muscle and non-muscle
54843396	54869544	SMARCC2	-	OMIM	12q13-q14	SMN1/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily c, member 2
54884555	54902002	RNF41	-		12q13.2-q13.3	ring finger protein 41
54904774	54909795	MGC2731	+		12q13.3	hypothetical protein MGC2731
54910894	54917897	SLC39A5	+	OMIM	12q13.3	solute carrier family 39 (metal ion transporter), member 5
54917855	54946817	FLJ34236	-		12q13.3	hypothetical protein FLJ34236
54946993	54951015	FLJ32452	+		12q13.3	hypothetical protein FLJ32452
54951750	54980442	CS	-	OMIM	12q13.2-q13.3	citrate synthase
54990484	54996387	TMEM4	-	OMIM	12q15	transmembrane protein 4
54996988	55014017	USP52	-		12q13.2-q13.3	ubiquitin specific protease 52
55018930	55020461	IL23A	+	OMIM	12q13.3	interleukin 23, alpha subunit p19
55021651	55040176	STAT2	-	OMIM	12q13.3	signal transducer and activator of transcription 2, 113kDa
55040820	55042833	APOF	-	OMIM	12q13.3	apolipoprotein F
55060412	55062864	LOC441640	-		12q13.3	similar to hypothetical protein FL10560
55097174	55129434	TIMELESS	-	OMIM	12q12-q13	timeless homolog (Drosophila)
55131149	55134709	MIP	-	OMIM	12q13	major intrinsic protein of lens fiber
55148629	55150067	LOC283377	+		12q13.3	hypothetical protein LOC283377
55151004	55169448	GLS2	-	OMIM	12q13	glutaminase 2 (liver, mitochondrial)
55191053	55192772	LOC400045	+		12q13.3	similar to 60 kDa heat shock protein, mitochondrial precursor (Hsp60)
55202059	55269463	RBMS2	+	OMIM	12q13.3	RNA binding motif, single stranded interacting protein 2
55275647	55316417	BAZ2A	-	OMIM	12q24.3-qter	bromodomain adjacent to zinc finger domain, 2A
55318228	55326024	ATP5B	-	OMIM	12q13.13	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, beta polypeptide
55343949	55368166	TEBP	-	OMIM	12q13.3	unactive progesterone receptor, 23 kD
55392486	55405318	NACA	-	OMIM	12q23-q24.1	nascant-polypeptide-associated complex alpha polypeptide
55411633	55432413	PRIM1	-	OMIM	12q13	primase, polypeptide 1, 49kDa
55443375	55467841	RODH	+	OMIM	12q13	3-hydroxysteroid epimerase
55503984	55614312	SDR-O	-		12q13.3	orphan short-chain dehydrogenase / reductase
55631487	55638370	RODH-4	-		12q13.3	microsomal NAD+-dependent retinol dehydrogenase 4
55661288	55666011	LOC390332	-		12q13.3	similar to RbDHL protein
55674622	55676736	ADMIR	+	OMIM	12q13.3	adrenomedullin receptor
55678855	55686532	KIAA0352	-		12q13.3	KIAA0352 gene product
55690053	55696554	TAC3	-	OMIM	12q13-q21	tachykinin 3 (neuromedin K, neurokinin beta)
55708569	55730160	MYO1A	-	OMIM	12q13-q15	myosin IA
55735694	55767787	KIAA0286	-		12q13.3	KIAA0286 protein
55769157	55775526	NAB2	+	OMIM	12q13.3-q14.1	NGFI-A binding protein 2 (EGR1 binding protein 2)
55775462	55791428	STAT6	-	OMIM	12q13	signal transducer and activator of transcription 6, interleukin-4 induced
55808549	55893401	LRP1	+	OMIM	12q13-q14	low density lipoprotein-related protein 1 (alpha-2-macroglobulin receptor)
55896845	55906493	NXPH4	+	OMIM	12q13.3	neuraxophilin 4
55909824	55914981	SHMT2	+	OMIM	12q12-q14	serine hydroxymethyltransferase 2 (mitochondrial)
55914953	55920812	LOC56901	-		12q13.3	NADH-ubiquinone oxidoreductase MLRQ subunit homolog
55923509	55931236	STAC3	-		12q13.3	SH3 and cysteine rich domain 3
55933815	55977083	KIAA1002	-		12q13.3	KIAA1002 protein

56114810	56130876	INHBC		+	OMIM	12q13.1	inhibin, beta C
56135363	56138058	INHBE		+		12q13.3	inhibin, beta E
56140201	56152312	GLI		+	OMIM	12q13.2-q13.3	glioma-associated oncogene homolog (zinc finger protein)
56152314	56168864	ARHGAP9		-		12q14	Rho GTPase activating protein 9
56168118	56196700	MARS		+	OMIM	12q13.2	methionine-tRNA synthetase
56196643	56200567	DDIT3		-	OMIM	12q13.1-q13.2	DNA-damage-inducible transcript 3
56202926	56210198	MBD6		+		12q13.2	methyl-CpG binding domain protein 6
56210361	56227245	DC1N2		-	OMIM	12q13.2-q13.3	dyncactin 2 (p50)
56230114	56264821	KIF5A		+	OMIM	12q13.13	kinesin family member 5A
56271324	56283298	PIF5K2C		+		12q13.3	phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, type II, gamma
56284871	56289850	DTX3		+		12q13.3	deltex 3 homolog (Drosophila)
56291485	56297293	GFT3		+		12q13.3	RAC/CDC42 exchange factor
56301135	56306201	SLC26A10		+		12q13	solute carrier family 26, member 10
56305945	56313251	GALGT		-	OMIM	12q13.3	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine-4-galactosylglucosylceramide N-acetylgalactosaminyltransferase
56312918	56355300	LOC441641		+		12q14.1	similar to ribosomal protein L13a; 60S ribosomal protein L13a; 23 kD highly basic protein
56374187	56401606	OS-9		+		12q13	amplified in osteosarcoma
56405261	56422207	CENTG1		-	OMIM	12q14.1	centaurin, gamma 1
56425051	56428293	SAS		+	OMIM	12q13.3	sarcoma amplified sequence
56428270	56432431	CDK4		-	OMIM	12q14	cyclin-dependent kinase 4
56435167	56439466	LOC92979		+		12q14.1	hypothetical protein BC009489
56442386	56447151	CYP27B1		-	OMIM	12q13.1-q13.3	cytochrome P450, family 27, subfamily B, polypeptide 1
56448523	56452522	METTL1		-	OMIM	12q13	methyltransferase-like 1
56452650	56462591	DKFZP586D0919		+		12q14.1	hepatocellularcarcinoma-associated antigen HCA557a
56462826	56476784	TSFM		+	OMIM	12q13-q14	Ts translation elongation factor, mitochondrial
56477710	56496119	AVIL		-		12q14.1	advinil
56499977	56526789	CTDSP2		-	OMIM	12q13-q15	CTD (carboxy-terminal domain, RNA polymerase II, polypeptide A) small phosphatase 2
56621711	56637319	KUB3		+		12q14.1	Ku70-binding protein 3
56663842	56692113	LOC338805		-		12q14.1	similar to heat shock 70kD protein binding protein;
57484116	57493109	LOC256176		+		12q14.1	hypothetical LOC256176
57552205	57600529	LRIG3		-		12q14.1	leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 3
58369393	58461675	SLC16A7		+	OMIM	12q13	solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 7
58492142	58492624	LOC390335		+		12q14.1	similar to poly(A) binding protein, cytoplasmic 4 isoform 2
59911198	59912994	PGBD3P1		-		12q13.12	piggylac transposable element derived 3 pseudogene 1
60388323	60872239	TAF42		-		12q14.1	TAF42 protein
60914435	60915623	LOC144583		-		12q14.1	similar to hypothetical protein FL40160
60940454	61086165	USP15		+	OMIM	12q14	ubiquitin specific protease 15
61146867	61276798	KIAA1040		+		12q14.1	KIAA1040 protein
61281798	61283481	FLJ25590		-		12q14.1	hypothetical protein FLJ25590
61324033	61615197	PPM1H		-		12q14.1-q14.2	protein phosphatase 1H (PP2C domain containing)
61645346	61646067	RPL14L		+		12q14.2	ribosomal protein L14-like
61682516	61684741	LOC121498		+		12q14.2	similar to lactate dehydrogenase A-like 6; lactate dehydrogenase A-like
61826483	61832857	AVPR1A		-	OMIM	12q14-q15	arginine vasopressin receptor 1A
62238960	62348542	FLJ32949		-		12q14.2	hypothetical protein FLJ32949
62364790	62408126	LOC390338		-		12q14.2	similar to T-box transcription factor TBX20
62459904	62489154	TMEM5		+	OMIM	12q14.2	transmembrane protein 5
62502829	62504052	LOC341315		+		12q14.2	similar to Polyadenylate-binding protein 1 (Poly(A)-binding protein 1) (PABP 1)

62524808	62823841	SRGAP1	+	OMIM	12q14.2	SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 1
62872688	62902319	FLJ32549	-		12q14.2	hypothetical protein FLJ32549
62947030	63085091	LOC115749	-		12q14.2	hypothetical protein LOC115749
63084500	63128731	XPOT	+	OMIM	12q14.2	exportin, tRNA (nuclear export receptor for tRNAs)
63132204	63182158	TBK1	+	OMIM	12q14.1	TANK-binding kinase 1
63290560	63375459	RASSF3	+	OMIM	12q14.2	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family 3
63393491	63439479	GNS	-	OMIM	12q14	glucosamine (N-acetyl)-6-sulfatase (Sanfilippo disease IIID)
63458479	63558350	KIAA0984	+		12q14.3	KIAA0984 protein
63558708	63657565	LOC400046	+		12q14.3	hypothetical LOC400046
63730676	63801356	WIF1	-	OMIM	12q14.3	WNT inhibitory factor 1
63849638	63928374	MAN1	+	OMIM	12q14	integral inner nuclear membrane protein

Als Kandidatengen unwahrscheinlich
hypothetische Proteine
Als Kandidatengen möglich/nicht bewertbar
Kandidatengene der vorliegenden Dissertation

### **8 Erklärung an Eides Statt**

„Ich, Martin Markovski, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: Zelluläre Charakterisierung eines neuen Chromosomeninstabilitätssyndroms und Ausschluss von Kandidatengenomen selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, 20.07.2007

---

Martin Markovski

### **9 Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

### **10 Danksagung**

Besonders herzlich danken möchte ich Prof. Dr. Martin Digweed, in dessen Arbeitsgruppe und unter seiner wissenschaftlicher Leitung diese Promotion stattgefunden hat. Mit Rat und Tat habe ich die unterstützenden und wegweisenden Gespräche gern angenommen, die für die Anfertigung dieser Arbeit stets hilfreich und bereichernd waren.

Ich danke Prof. Dr. Karl Sperling dafür, dass er mir es ermöglicht hat, diese interessante und anspruchsvolle Arbeit am Institut für Humangenetik durchzuführen.

Ein weiterer Dank geht an Prof. Dr. Eva Seemanova, Prof. Dr. Detlev Schindler, Dr. Raymonda Varon-Mateeva, Dr. Christiane Bommer und Gudrun Nürnberg für die Bereitstellung aller erforderlichen Materialien und gewonnenen Daten, ohne die diese Promotion nicht möglich gewesen wäre.

Weiterhin möchte ich mich besonders bei Susanne Rothe, Gabriele Hildebrand und Janina Radszewski bedanken, die mir durch ihre unermüdliche und geduldige Art jederzeit in allen Laborangelegenheiten so behilflich und ausdauernd waren. Dieser Dank gilt auch Bastian Salewsky, der mit zu der entspannten Arbeitsatmosphäre beigetragen und mich durch so einige Satzstellungen gescheucht hat, sowie Corinna Krüger, die mir bei bürokratischen Anliegen stets zur Seite stand. Darüber hinaus bedanke ich mich nicht zuletzt bei allen Helferinnen und Helfern die mir beim Verzehr der angefallen Massen von Keksen und Gummibärchen Beistand leisteten, ohne deren Hilfe ich wahrscheinlich eine neue Konfektionsgröße tragen würde.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern und Geschwistern bedanken. Der größte Dank geht jedoch an meine Ehefrau Ebru, sowie meine zwei Kindern Kian und Kiara, ohne die diese Arbeit nie zustande gekommen wäre. Sie gaben mir während der Arbeit viel Kraft und hatten stets Geduld sowie Verständnis in einigen Momenten größter Frustration, waren aber auch nicht unwesentlich an der Entstehung meiner ersten grauen Haare beteiligt.