

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

DISSERTATION

**Funktionelle Charakterisierung hypomorpher  
Proteinvarianten beim  
Nijmegen Breakage Syndrom**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Moritz Kaspar Kieslich

aus Berlin

**Datum der Promotion: 25.10.2013**

Für Annette und Ralf

## Abkürzungsverzeichnis

AON	Antisense-Oligonukleotide
ATM	ataxia telangiectasia mutated
ATP	Adenosintriphosphat
BCRT	breast cancer carboxy terminal
bp	Basenpaare
CK2	Casein Kinase 2
Co-IP	Co-Immunpräzipitation
CtIP	carboxyterminal binding protein interacting protein
DDR	DNA damage response
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSB	Doppelstrangbruch
ESE	exonic splicing enhancer
FHA	fork-head-associated
GSH	Glutathion
GST	glutathione S-Transferase
h	hours
H2AX	Histonvariante H2AX
HR	homologous recombination
IB	Immunoblot
IP	Immunpräzipitation
IR	ionizing radiation
kDa	Molekulargewicht in Kilodalton
LCL	lymphoblastoide Zelllinie
M	molar
MD	Muskeldystrophie
MDC1	Mediator of DNA damage checkpoint protein 1
min	minutes
mM	millimolar
MPG	3-Methyladenine-DNA Glycosylase
Mre11	Meiotic recombination 11-Protein
MRN	Mre11-/Rad50-/Nibrin-Komplex
mRNA	messenger RNA (Ribonukleinsäure)
<i>NBN</i>	humanes Nibrin-Gen
<i>Nbn</i>	murines Nibrin-Gen
NBS	Nijmegen Breakage Syndrom
NBS1	Alte Bezeichnung für das humane Nibrin-Gen
NE	nuclear extract
NHEJ	non homologous end joining
NHS	N-Hydroxysuccinimide
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
PST-Repeats	seronin- und threoninreiche Peptidmotive
q-AP-MS	quantitative affinity purification followed by mass spectrometry
Rad50	DNA repair protein RAD50
rpm	rotations per minute
SDT-Repeats	threoninreiche Peptidmotive
sec	seconds
SILAC	stable isotope labeling by amino acids in cell culture
siRNA	small interfering RNA
SN	Supernatant (Überstand)
WB	Western-Blot
WCE	whole cell extract
Wt	Wildtyp
Y2H	yeast to hybrid
$\gamma$ H2AX	phosphorylierte Histonvariante H2AX

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>2</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>4</b>
1.1. Klinisches Bild des Nijmegen Breakage Syndroms.....	4
1.2. Molekulare Grundlagen.....	7
1.3. Nibrin und DNA-Reparatur.....	9
1.4. NBS mit abweichender molekularer Grundlage und milderem Phänotyp.....	11
1.5. Gerichtetes alternatives Splicing.....	15
1.6. <i>NBN</i> -Missense-Mutationen.....	16
1.7. Weitere Nibrin-Interaktionspartner.....	17
1.7.1. <i>MDC1</i> .....	17
1.7.2. <i>Histonvariante H2AX</i> .....	18
1.7.3. <i>CtIP</i> .....	19
1.7.4. <i>MPG</i> .....	20
<b>1.8. Zielsetzung dieser Arbeit</b> .....	<b>20</b>
<b>2. Material</b> .....	<b>22</b>
2.1. Zellreihen.....	22
2.2. Transfektionsreagenzien.....	23
2.3. Gewebekultur-Materialien.....	23
2.4. Verwendete Puffer und Lösungen.....	23
2.5. Enzyme.....	24
2.6. Bakterien.....	24
2.7. Antikörper.....	24
2.8. Gele.....	25
2.9. Präzipitationsmaterialien.....	25
2.10. Kits.....	25
2.11. Sonstige Chemikalien und Reagenzien.....	25
2.12. Plasmide.....	26
2.13. Verbrauchsmaterialien.....	27
2.14. Hergestellte Lösungen und Puffer.....	27
2.14.1. <i>Bakterienkultur-Medien und Platten</i> .....	27
2.14.2. <i>Puffer zur Herstellung des Fusionsproteins</i> .....	28
2.14.3. <i>Lösungen für Plasmid-DNA-Präparation</i> .....	28
2.14.4. <i>Puffer für GST-Pulldown</i> .....	28

2.15. Geräte .....	29
2.16. Oligonukleotide.....	29
<b>3. Methoden .....</b>	<b>30</b>
3.1. Zellkultur.....	30
3.1.1. <i>Allgemeine Bedingungen</i> .....	30
3.1.2. <i>Kultivierung und Ernte</i> .....	30
3.1.3. <i>Zellzahlbestimmung</i> .....	30
3.1.4. <i>Bleomycin Behandlung</i> .....	30
3.1.5. <i>Behandlung mit Proteasominhibitor MG-132</i> .....	31
3.2. Proteinaufarbeitung .....	31
3.2.1. <i>Aufarbeitung für Western-Blot</i> .....	31
3.2.2. <i>Aufarbeitung für Immunpräzipitation</i> .....	31
3.2.3. <i>Extraktion nukleärer Proteine</i> .....	32
3.3. Immunpräzipitation .....	33
3.4. Proteinanalytik.....	35
3.4.1. <i>Proteingelelektrophorese</i> .....	35
3.4.2. <i>Western Blot</i> .....	35
3.4.3. <i>Immunoblot</i> .....	36
3.5. Transfektion (Lipofektion) mit Antisense/Sense Oligonukleotiden .....	38
3.6. Transiente Doppeltransfektionen zur Interaktionsanalyse .....	40
3.7. Herstellung des MDC1-Fusionsproteins M3.....	42
3.7.1. <i>Transformation</i> .....	43
3.7.2. <i>Plasmid-DNA-Präparation und Restriktionsverdau</i> .....	43
3.7.3. <i>Induktion</i> .....	44
3.7.4. <i>Proteinaufarbeitung und -analytik</i> .....	44
3.7.5. <i>Phosphorylierung des GST-Fusionsproteins</i> .....	45
3.8. GST-Pulldown .....	45
3.9. Analyse von Proteinwechselwirkungen anhand von quantitativer Massenspektrometrie nach Affinitätsaufreinigung .....	47
3.9.1. <i>Markieren per SILAC</i> .....	48
3.9.2. <i>Crosslink und Immunpräzipitation</i> .....	49
3.9.3. <i>Elution und Analyse</i> .....	52
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>53</b>
4.1. Interaktion Nibrin/MDC-1 .....	53
4.1.1. <i>(Co-) Immunpräzipitation</i> .....	53
4.1.2. <i>GST-Pulldown</i> .....	55
4.2. Interaktion Nibrin/ $\gamma$ H2AX .....	61

4.3. Interaktion CtIP/Nibrin .....	65
4.4. Interaktionsanalyse mit Hilfe von Doppeltransfektionen.....	66
4.4.1. Immunpräzipitation mit A-FLAG in HEK293 .....	68
4.4.2. IP mit A-c-myc in HEK293.....	69
4.4.3. IP mit A-P95 in GMSV.....	71
4.5. Zelluläre Lokalisation von Mre11.....	72
4.6. Stabilisierung des p80-Nibrins durch den Proteasominhibitor MG-132.....	75
4.7. Ergebnisse der quantitativen Massenspektrometrie .....	76
4.7.1. p95- vs. p70-Nibrin .....	76
4.7.2. p80- vs. p70-Nibrin .....	79
4.7.3. Charakterisierung des MRN-Komplexes per Co-IP.....	81
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>82</b>
5.1. Interaktion Nibrin/MDC1 – Grenzen der eingesetzten Methoden.....	82
5.1.1. p80-Nibrin/MDC1 .....	84
5.1.2. MDC1/ Missense-Nibrin .....	86
5.1.3. Rolle von FHA/BRCT bei der Foci-Bildung und Checkpoint-Kontrolle .....	88
5.2. Interaktion von Nibrin mit $\gamma$ H2AX.....	89
5.3. Interaktionspotential des Nibrins bezogen auf CtIP .....	92
5.4. Zelluläre Lokalisation von Mre11.....	94
5.5. Per Massenspektrometrie identifizierte Proteine.....	95
5.5.1. p70 präferierende Proteine.....	95
5.5.2. Identifikation des MRN-Komplexes .....	96
5.5.3. Weitere identifizierte Proteine .....	97
<b>6. Ausblick .....</b>	<b>101</b>
<b>7. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>103</b>
<b>8. Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>118</b>
<b>9. Lebenslauf .....</b>	<b>119</b>
<b>10. Publikationsliste.....</b>	<b>120</b>
<b>11. Danksagung.....</b>	<b>121</b>

## Zusammenfassung

Das Nijmegen Breakage Syndrom gehört zur Gruppe der DNA-Reparaturdefekte und ist klinisch durch das gehäufte Auftreten von Tumoren im jungen Lebensalter, eine zelluläre und humorale Immunschwäche sowie eine Mikrozephalie gekennzeichnet. In mehr als 90% der Fälle wird das Syndrom durch die Mutation 657del5 im *NBN*-Gen im homozygoten Zustand verursacht, die zu einem hypomorphen carboxyterminalen Protein (p70-Nibrin) führt. Dieses hat eine residuale Funktion, die für das zelluläre Überleben essentiell ist. *NBN* wird als haploinsuffizientes Tumorsuppressorgen interpretiert, da auch bei heterozygoten Merkmalsträgern ein erhöhtes Auftreten maligner Erkrankungen beobachtet wird. Eine Reihe von *NBN*-Missense-Mutationen sind bei verschiedenen malignen Erkrankungen beschrieben. Diese sind innerhalb oder in unmittelbarer Nähe von funktionell wichtigen Domänen des Nibrins lokalisiert. Die in Zusammenhang mit einem besonders milden Phänotyp beschriebene 742-743insGG-Mutation resultiert in Folge von alternativem Splicing in einem Protein mit einer internen Deletion und intaktem Amino- und Carboxyterminus (p80-Nibrin). In dieser Arbeit wurde anhand von Interaktionsstudien die Proteinfunktion der unterschiedlichen Varianten charakterisiert und verglichen. Durch Transfektion mit Antisense-Oligonukleotiden lässt sich das p80-Nibrin in NBS-Patientenzellen anreichern, was in dieser Arbeit regelhaft angewendet wurde. Wir konnten zeigen, dass das p70- und auch p80-Nibrin nicht mit bekannten aminoterminalen Interaktionspartnern in Wechselwirkung treten (MDC1,  $\gamma$ H2AX oder CtIP). Daraus leitet sich ab, dass ein intakter Aminoterminus für diese Proteininteraktionen notwendig ist. Die Experimente mit Nibrinvarianten, die aus aminoterminal lokalisierten Missensemutationen resultieren, belegen diese Annahme. Diese Ergebnisse legen nahe, dass das durch Aminosäureaustausche verminderte Interaktionspotential zur Tumorassoziation führt. Experimente zur Analyse von Proteinwechselwirkungen mit quantitativer Massenspektrometrie nach Affinitätsaufreinigung lieferten Hinweise dafür, dass die carboxyterminal vermittelte Wechselwirkung mit Bestandteilen des MRN-Komplexes (Mre11, Rad50) mit p80- (und auch mit wt-/p95-Nibrin) im Vergleich zum p70-Nibrin deutlich stabilisiert ist. Über die Interaktion mit Mre11 und Rad50 nimmt Nibrin eine zentrale Rolle bei der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen ein. Weiterhin wurden potentielle Interaktionspartner identifiziert, die das p80- und p95-Nibrin gegenüber dem p70-Nibrin favorisieren. Einige dieser Proteine können funktionell mit der DNA-Reparatur oder der Zellzyklusregulation in Verbindung gebracht werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass die

funktionelle Überlegenheit des p80-Nibrins in einer Stabilisation des MRN-Komplexes liegen kann. Außerdem wurden Proteine identifiziert, welche potentielle Interaktionspartner des p80-Nibrins sind und daher den assoziierten mildereren Phänotyp begründen könnten. Diese Daten liefern pathomechanistische Erklärungsansätze für die variierenden Phänotypen bei unterschiedlichen *NBN*-Mutationen und legen nahe, dass die hier verwendete Behandlung mit Antisense-Oligonukleotiden als innovativer therapeutischer Ansatz beim NBS genutzt werden könnte.

### **Abstract**

Nijmegen breakage syndrome is a DNA repair deficiency disorder whose clinical features include increased cancer susceptibility, cellular and humoral immunodeficiency and microcephaly. The vast majority of cases are caused by the homozygous *NBN* mutation 657del5, which results in a hypomorphic protein representing the carboxy-terminal two-thirds of the protein (p70-nibrin). This protein has been found to be essential for cellular survival due to its residual function. An increased incidence of malignant diseases has also been observed in heterozygous individuals. Therefore, *NBN* is considered to be a haploinsufficient tumoursuppressor gene. Various *NBN* missense mutations have been reported to be associated with a number of different malignancies. The resulting altered amino acids are located within or adjacent to important functional protein domains. A distinctively mild NBS-phenotype is associated with the 742-743insGG mutation which results *via* alternative splicing in a protein variant containing an internal deletion but including both the amino and carboxy termini (p80-nibrin).

In the experiments described here, the protein function of the different nibrin variants was characterized and compared using protein interaction studies. In NBS-cells, p80-nibrin can be generated after transfection of specific antisense oligonucleotides. We were able to show that neither p70- nor p80-nibrin interact with previously described amino-terminal binding partners (MDC1,  $\gamma$ H2AX, CtIP). This illustrates the importance of an intact amino-terminus for these interactions. The experiments with nibrin variants containing missense mutations substantiate this assumption and suggest that loss of protein-protein interactions may account for the association of these mutations with tumour occurrence. The formation of the MRN-complex (mre11, rad50, nibrin) plays an essential role in DNA-double-strand-break repair. Affinity purification followed by mass spectrometry (q-AP-MS) studies indicate that the MRN-complex containing p80- (and p95-) nibrin is more stable than the complex containing p70-nibrin. Moreover, various

---

proteins interacting preferentially with p80- and p95-nibrin could be identified. Some of these proteins are functionally related to DNA repair and cell cycle control. The results of this study show that the stabilization of the MRN-complex can lead to a functional advantage for p80-nibrin. Furthermore the identified putative interaction partners are possibly related to the milder phenotype of the patient with the 742-743insGG mutation. The data presented provide a molecular model for phenotypic variation related to different *NBN*-mutations and demonstrate the potential implementation of antisense oligonucleotides as an innovative therapeutic strategy in NBS.

## 1. Einleitung

Das Nijmegen Breakage Syndrom (NBS) ist eine seltene, autosomal-rezessiv vererbte genetische Erkrankung, die erstmals 1979 bei einem Patienten mit Mikrozephalie, Wachstums- und mentaler Retardierung, Immundefekt sowie erhöhter Chromosomenbrüchigkeit in den Niederlanden beschrieben wurde [1]. Formal wurde die Erkrankung zwei Jahre später als NBS bezeichnet, nachdem ein Bruder des genannten Patienten mit ähnlichen Symptomen auffällig wurde [2]. Das bei der Erkrankung betroffene Gen *NBS1* (heute in *NBN* umbenannt und im Weiteren als Letzteres bezeichnet) sowie dessen Genprodukt Nibrin wurden schließlich 1998 identifiziert [3-5].

### 1.1. Klinisches Bild des Nijmegen Breakage Syndroms

Der klinische Phänotyp von NBS-Patienten ist variabel. Zu den Hauptmerkmalen zählen Mikrozephalie, Wachstumsretardierung, Ovarieninsuffizienz sowie zelluläre und humorale Immundefekte mit erhöhter Infektanfälligkeit. Weiterhin besteht ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung maligner Erkrankungen, insbesondere hämatologischen Ursprungs, bei den betroffenen Patienten bereits in jungem Alter.



Abb.1.1.: Zwei Geschwister mit genetisch gesichertem NBS. Bei dem älteren Kind treten die Mikrozephalie und kraniofazialen Dysmorphien deutlich zu Tage, während sie bei dem jüngeren Kind weniger offensichtlich sind. Abbildung dankenswerterweise zur Verfügung gestellt von Prof. Seemanova.

Die ausgeprägte Mikrozephalie als Leitsymptom des NBS ist meist schon bei Geburt oder in der Pränataldiagnostik sichtbar [6, 7]. Im weiteren Verlauf der Erkrankung kann der okzipitofrontale Umfang bei NBS-Patienten im Vergleich zu gesunden gleichaltrigen Kindern um bis zu 9 Standardabweichungen reduziert sein [8]. Die charakteristische kraniofaziale Dysmorphie bei NBS Patienten ist im typischen Fall gekennzeichnet durch

eine flache Stirn, Retrognathie, eine große gerade Nase mit flacher Nasenwurzel und tiefsitzende Ohrmuscheln.

In Einzelfällen wurden bei NBS-Patienten ebenso Lippen-Kiefer-Gaumenspalten und Choanalatresien beschrieben [9]. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass trotz der ausgeprägten Mikrozephalie in der Mehrzahl der beschriebenen Fälle die psychomotorische Entwicklung zunächst weitgehend unauffällig verläuft und Meilensteine der Entwicklung für gewöhnlich in normalem Alter erreicht werden [6, 9-12]. In einigen Fällen wurden Beeinträchtigungen der psychomotorischen Entwicklung in Zusammenhang mit der frühen Manifestation schwerwiegender Infektionen gebracht [2, 7, 13]. Die mentale Entwicklung von NBS-Patienten ist variabel, so sind Patienten mit normaler Intelligenz ebenso beschrieben, wie Patienten mit milder oder moderater mentaler Retardierung [2, 9, 12]. Die Wachstumsretardierung wurde in einer polnischen Studie aus dem Jahre 2010 systematisch untersucht [14]. Bereits bei Geburt waren Gewicht, Größe und Kopfumfang in der NBS-Gruppe deutlich niedriger als in der gesunden Kohorte. Die Wachstumsretardierung und der disproportionierte Minderwuchs mit gänzlich fehlender Zunahme des Kopfumfanges werden im Alter von 2-3 Jahren zunehmend offensichtlich (vgl. Abb.1.1.). Hormonelle Veränderungen oder Nutritionsstörungen als Ursache für die Wachstumsretardierung wurden in der Studie ausgeschlossen.

Die Pubertätsentwicklung bei NBS-Patienten ist besonders beim weiblichen Geschlecht gestört. So weisen Patientinnen charakteristischerweise hohe Gonadotropin- und niedrige E2-Konzentrationen auf, die mit einer frühen Ovarieninsuffizienz vereinbar sind. Streakgonaden und hypoplastische Uteri in der Bildgebung sind ebenfalls im Zusammenhang mit NBS beschrieben [15]. Weitere assoziierte Fehlbildungen bei Patienten mit NBS beinhalten Entwicklungsstörungen des Gehirns, insbesondere der Frontallappen [16-18], skelettale Veränderungen wie Syn- [6] oder Polydaktylien [16], Pigmentstörungen der Haut wie Café au lait- Flecke oder Vitiligo [6, 11] sowie verschiedene Fehlbildungen der Nieren [7, 10].

Die Prädisposition für die Entwicklung von Malignomen kann als Haupttodesursache bei NBS-Patienten angesehen werden. Bis zum Alter von 20 Jahren erkranken mehr als 40% aller Patienten an einer malignen Erkrankung [19]. Die große Mehrzahl der Neoplasien ist dabei lymphatischen Ursprungs. Am häufigsten kommen Non-Hodgkin-Lymphome (NHL), sowohl der B- als auch der T-Zellreihe vor [20]. Darüber hinaus sind

Hodgkin-Lymphome sowie akute Leukämien bei NBS-Patienten beschrieben worden [9, 21, 22]. Weiter zählen das gehäufte Auftreten von Neoplasien des Zentralnervensystems und Rhabdomyosarkomen sowie Einzelfälle solider Tumoren anderen Ursprungs zum Spektrum des NBS [23-25]. Erwähnenswert ist im Zusammenhang mit der Prädisposition für die Entwicklung maligner Erkrankungen die Tatsache, dass NBS-Patienten ebenso ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Zweitmalignomen aufweisen [20, 21]. Dieses kann zudem durch die Therapie der ersten malignen Erkrankung (etwa durch Bestrahlung) erhöht werden, was bei der onkologischen Behandlung von NBS-Patienten berücksichtigt werden und entsprechende Therapiemodifikationen nach sich ziehen sollte [26]. Ein weiteres Hauptcharakteristikum der Erkrankung ist die Immunschwäche und Infektanfälligkeit der betroffenen Patienten, wobei ein Großteil der Infektionen den Respirationstrakt betreffen [2, 9-11, 13, 27]. Opportunistische Infektionen spielen bei NBS hingegen nur eine untergeordnete Rolle [28]. Bei etwa der Hälfte der untersuchten NBS-Patienten konnten verminderte Leukozyten- und Lymphozytenzahlen bestimmt werden [29], wobei vor allem die CD4+ T-Zellen depletiert sind [30]. Niedrige B-Zell-Zahlen wurden in ca. 75% der Patienten beobachtet [10, 28, 31]. Auch das humorale Immunsystem ist bei NBS-Patienten betroffen, der Phänotyp ist in dieser Hinsicht jedoch sehr variabel ausgeprägt. Als Ursache wird vor allem ein Defekt beim Immunglobulin-Klassen-Switch in den B-Lymphozyten angesehen [32-34]. In den meisten Fällen ist die Konzentration von mindestens einer, häufig aber auch mehrerer Immunglobulin-Subklassen vermindert [10, 28, 35].

Zu den Leitsymptomen der klinischen Kriterien für die Diagnose NBS zählen zusammengefasst: Mikrozephalie und disproportionierter Minderwuchs, rezidivierende Infektionen des Respirationstraktes und die Entwicklung von Malignomen, insbesondere hämatologischen Ursprungs. Natürlich ist die Diagnose heute nicht nur klinisch, sondern vor allem durch den Nachweis chromosomaler Instabilität sowie anhand genetischer und proteinbiochemischer Untersuchungen zu stellen.

## 1.2. Molekulare Grundlagen

Das bei der Erkrankung betroffene Gen *NBN*, welches auf Chromosom 8q21 lokalisiert ist, wurde 1998 identifiziert [3-5]. Es besteht aus 16 Exons und kodiert für das Protein Nibrin, welches in der Wildtypvariante aus 754 Aminosäuren besteht und im Western-Blot als Bande mit einem Molekulargewicht von etwa 95 kDa nachweisbar ist (daher die im Weiteren verwendete Bezeichnung p95-Nibrin) [5].

Etwa 90 % der beschriebenen NBS-Patienten sind homozygot für eine Deletion von 5 Basenpaaren in Exon 6 (c.657\_661del5, 657del5), wobei die meisten Patienten mit dieser Mutation slawischen Ursprungs sind und somit von einer Gründermutation ausgegangen und diese auch als „slawische Mutation“ bezeichnet wird. Es wurden hohe Trägerfrequenzen der Mutation in den entsprechenden Populationen beobachtet (etwa 1/177 Neugeborenen), zuletzt wurde auch eine hohe Trägerfrequenz der Mutation in Südostdeutschland beschrieben [36, 37].

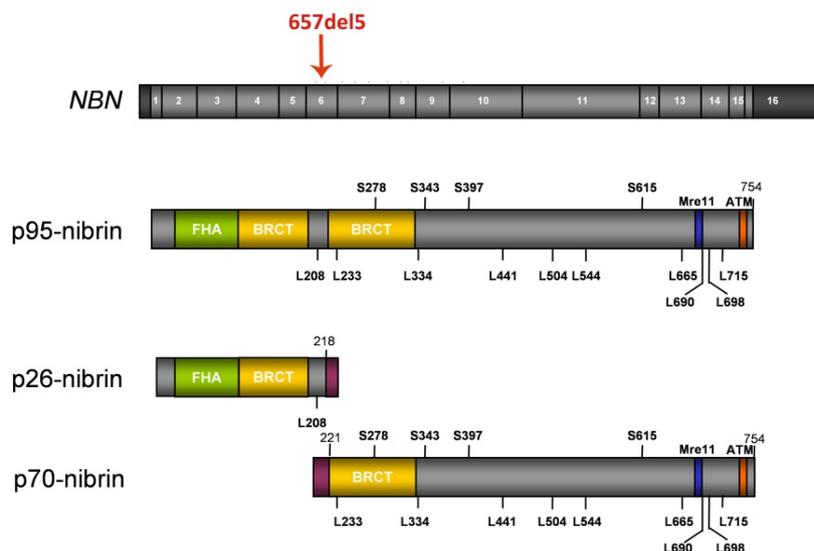


Abb.1.2.: Oben: Schema des aus 16 Exons bestehenden *NBN*. Die Lage der „slawischen Mutation“ ist gekennzeichnet. Mitte: Aufbau des wt- (p95-) Nibrin mit Kennzeichnung funktionell wichtiger Domänen. Durch ATM phosphorylierte Serinreste sind ebenso wie zu acetylierende Lysinreste eingetragen. Unten: Aus der oben gekennzeichnet Mutation resultierende hypomorphe Proteine (p26 +p70- Nibrin). Modifiziert nach Varon et al. Cell 1998

Das Resultat der Mutation sind zwei trunkierte Proteine: zum einen das zu erwartende 26 kDa große aminoternale Fragment und zum anderen ein 70 kDa großes Fragment, welches durch Translation ausgehend von einem kryptischen Startcodon

strangaufwärts der Mutation gebildet wird und den carboxyterminalen Anteil des Proteins repräsentiert (siehe Abb. 1.2.) [38]. Bei der 657del5-Mutation handelt es sich demnach um eine hypomorphe Mutation. Das 70 kDa-Fragment (im Weiteren als p70-Nibrin bezeichnet) wird als essentiell für das Überleben der Betroffenen angesehen. So sind *Nbn*-Nullmutante Mäuse nicht überlebensfähig und versterben bereits in utero [39, 40]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Expression des p70-Nibrins sowohl in *NBN*-Nullmutanten-Zellen als auch *Nbn*-Nullmutanten-Mäusen einen funktionellen Effekt zeigt und deren Letalität aufhebt [41, 42]. Daraus wird offensichtlich, dass das hypomorphe Protein über eine residuale Funktion verfügen muss. Es wurde beobachtet, dass Mäuse, die heterozygot für die 657del5 Mutation sind, eine höhere Rate an Tumoren entwickeln [40]. Die daraus abgeleitete Überlegung, *NBN* als ein haploinsuffizientes Tumorsuppressorgen zu bezeichnen [43], wird dadurch untermauert, dass für heterozygote Verwandte von NBS-Patienten im Vergleich mit Kontrollpopulationen ein signifikant erhöhtes Tumorrisiko beschrieben wird [44]. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass das Krebsrisiko bei NBS-Patienten mit der stark variierenden Menge an nachweisbarem p70-Nibrin korreliert, so dass von einem Dosiseffekt des hypomorphen Proteins in Bezug auf die Krebsdisposition ausgegangen wird [45]. Neuere Untersuchungen zeigen, dass die Variation der p70-Menge unter NBS-Patienten auf Unterschieden im Abbau durch das Proteasom beruht und nicht etwa auf unterschiedlicher Genexpression [46, 47].

Das Protein Nibrin beinhaltet eine Reihe charakteristischer und funktionell bedeutsamer Domänen (siehe Abb. 1.2.). Im aminoterminalen Abschnitt findet man eine so genannte fork-head-associated Domäne (FHA) sowie zwei Breast-Cancer-Carboxy-Terminal Domänen (BRCT). Solche Domänen kommen regelmäßig in Proteinen vor, die mit phosphorylierten Bereichen anderer Proteine interagieren und sind weit verbreitet bei solchen Proteinen, die funktionell der DNA-Reparatur oder der Zellzykluskontrolle zuzuordnen sind [48, 49]. FHA-Domänen sind exklusiv zur Bindung von Phosphothreonin-Resten fähig und sind neben Nibrin auch in den funktionell verwandten Proteinen MDC1, Chk2 und RNF8 vorhanden [50, 51]. BRCT-Domänen kommen häufig in Form einer Tandem-BRCT-Domäne zum Beispiel in den Proteinen MDC1, Ligase IV, 53BP1 oder BRCA1 vor und binden in dieser Form Phosphopeptide mit einer Präferenz für Phosphoserin-Reste [52, 53].

Die Bezeichnung BRCT beruht auf der initialen Beschreibung einer solchen Domäne bei dem Genprodukt des mit familiärem Brustkrebs assoziierten *BRCA1*. Erwähnenswert ist hier, dass das aus der Mutation 657del5 resultierende p70- Nibrin nicht über die FHA- bzw. die erste der beiden BRCT-Domänen verfügt. Die zweite beschriebene BRCT-Domäne ist hinter der Deletion lokalisiert [54]. Am carboxyterminalen Ende des Proteins sind Domänen zu finden, welche für die Interaktion mit wichtigen, an der DNA-Reparatur beteiligten, Proteinen essentiell sind: Eine Domäne vermittelt die Interaktion mit der Kinase ATM, welche eine Vielzahl von Proteinen (darunter auch Nibrin) phosphoryliert [55]. Außerdem beinhaltet der Carboxyterminus eine Domäne für die Bindung von Nibrin an die Exonuklease Mre11, die gemeinsam mit Nibrin und dem Protein Rad50, den für die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen essentiellen MRN-Komplex bildet [56-58].

Nibrin verfügt über eine Reihe von Serin-Resten, welche als Antwort auf DSB-Induktion durch ATM phosphoryliert werden [59]. Die Phosphorylierung von Nibrin wird weiterhin durch die Deacetylase SIRT1 reguliert, welche Nibrin, bzw. dessen Lysinreste im hypoacetylierten Zustand stabilisiert und somit eine Phosphorylierung durch ATM begünstigt [60].

### 1.3. Nibrin und DNA-Reparatur

Genomische Stabilität ist unter anderem abhängig von der Antwort der Zellen auf DNA-Schäden (DNA-damage response, DDR). Diese besteht aus einem funktionellen Netzwerk von Kaskaden, welches die DNA-Reparatur und Zellzyklus-Regulation beinhaltet. NBS gehört zur klinisch überlappenden Gruppe der DNA-Reparaturdefekte, zu welcher unter anderem auch die genetisch bedingten Erkrankungen Ataxia teleangiectatica (AT), Ataxia teleangiectatica like disorder (ATLD) und Xeroderma pigmentosum (XP) zählen.

Nibrin ist Bestandteil des trimeren MRN-Komplexes, an dem außerdem die bereits erwähnten Proteine Rad50 und Mre11 beteiligt sind [61]. Dabei handelt es sich um einen evolutionär hoch konservierten Komplex. In Hefen wird der Komplex aus Xrs2, Rad50 und Mre11 gebildet, wobei Xrs2 das funktionelle Ortholog zu Nibrin darstellt [29]. Der MRN-Komplex ist an der DNA-Doppelstrangbruch (DSB)-Reparatur sowohl beim Menschen als auch bei der Hefe beteiligt. Zum einen spielt er eine funktionelle und regulatorische Rolle bei der homologen Rekombination (HR), zum anderen ist er am Non-homologous-end-joining (NHEJ) beteiligt. Darüber hinaus beeinflusst der Komplex die Telomer-Homöostase, die Meiose, die Apoptoseregulation und die Entwicklung des

Immunsystems [62-65]. Werden durch beispielsweise ionisierende Strahlen in einer Zelle DSB induziert, kann der MRN-Komplex innerhalb kürzester Zeit im Bereich der DSB nachgewiesen werden und gilt als „Sensor“ für DSB. Für diese Anreicherung des Komplexes an DSB ist Nibrin essentiell, wobei es im Gegensatz zu Mre11 und Rad50 nicht über eigene enzymatische Aktivität sondern eher über regulative Funktionen verfügt [56, 58]. Das Protein Mre11 mit einem Molekulargewicht von etwa 80 kDa besitzt die Fähigkeit zur DNA-Bindung sowie eine Endo- und Exonuclease-Aktivität [66-68]. Mre11 ist bei der Erkrankung ATLD betroffen. Das dritte Protein des Komplexes Rad50 mit etwa 150 kDa Molekulargewicht ist an der Entwindung von Doppelstrang-DNA beteiligt und kann ATP als energielieferndes Substrat binden [69, 70]. Nach Anreicherung an DSB, beeinflusst der MRN-Komplex die DNA-Reparatur zum einen strukturell durch das Bilden einer Art Brücke zwischen den beteiligten DNA-Molekülen und zum anderen enzymatisch durch die Resektion von DSB-Enden [71, 72]. Eine weitere Funktion des Komplexes besteht in der Interaktion mit der DNA-abhängigen Protein-Kinase ATM, welche bei Ataxia telangiectatica (AT) betroffen ist. Wie erwähnt wird diese Wechselwirkung durch einen carboxyterminal lokalisierten Bereich des Nibrins vermittelt. Der MRN-Komplex ist essentiell für die Monomerisation des im Zellkern als inaktives Dimer vorliegenden ATM und ebenso für eine ATM-Autophosphorylierung [56, 58]. Ferner ist die Wechselwirkung von Nibrin mit ATM eine Voraussetzung für die Rekrutierung von ATM zu DSB. ATM selbst spielt eine zentrale Rolle bei der DSB-Reparatur und phosphoryliert eine Vielzahl von Proteinen, zu denen neben Nibrin unter anderem p53, MDM2, CHK1, CHK2, BRCA1 und die Histonvariante H2AX zählen [55, 59]. Neben der DSB-Reparatur ist der MRN-Komplex über seine Interaktion mit ATM auch in die Regulation des Zellzyklus involviert: so zählt beispielsweise das ATM-Substrat Chk2 zu den Zellzyklus-Checkpointproteinen. Die Chk2-Aktivierung nach DNA-Schäden ist abhängig von intaktem Nibrin und dessen Interaktion mit ATM [73, 74]. Entsprechend konnte gezeigt werden, dass in *Nbn*<sup>-/-</sup>-Zellen nach Behandlung mit der DSB-induzierenden Substanz Bleomycin die G2/M-Checkpointkontrolle komplett aufgehoben ist und *Nbn*<sup>-/-</sup>-Zellen sowie NBS-Patientenzellen eine verzögerte ATM-Aktivierung zeigen [41, 75]. ATM ist auch in die Apoptoseregulation involviert, so spielt z.B. das ATM-Substrat p53 hier eine zentrale Rolle [76]. Die Krebsdisposition beim NBS bzw. die erhöhte Prävalenz von Malignomen bei heterozygoten Merkmalsträgern kann also unter anderem durch die gestörte Apoptoseregulation bei verminderter ATM-Aktivierung und damit verbunden beeinträchtigter p53-abhängiger Apoptose erklärt

werden [77]. Neben der Interaktion mit ATM, ist Nibrin ebenso an der Aktivierung der verwandten Kinase ATR (AT und Rad-3 related) beteiligt, die gleichfalls eine Reihe von Substraten im Rahmen der Reparatur von DNA-Einzelstrangbrüchen phosphoryliert [78].

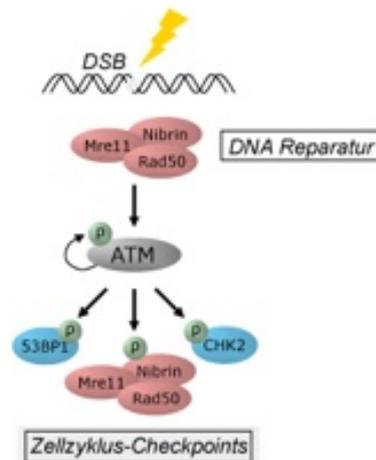


Abb.1.3.: Stark vereinfachtes Schema zur Rolle von Nibrin bzw. des MRN-Komplexes bei der zellulären Antwort auf DNA-DSB.

#### 1.4. NBS mit abweichender molekularer Grundlage und milderem Phänotyp

Wie beschrieben sind mehr als 90% der beschriebenen NBS-Patienten homozygot für die Mutation 657del5. Dennoch sind eine Reihe weitaus seltener vorkommende Mutationen im *NBN*-Gen beschrieben (Abb. 1.4.).

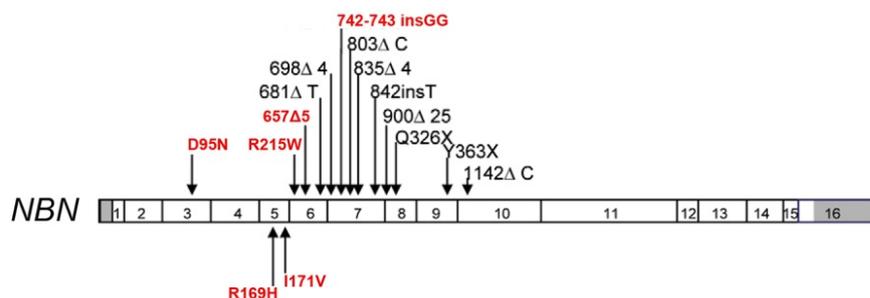


Abb. 1.4.: Darstellung von im *NBN*-Gen beschriebenen Mutationen, ohne Anspruch auf Vollständigkeit. Die in dieser Arbeit relevanten Mutationen sind in roter Farbe hervorgehoben. Abbildung modifiziert nach Varon et al. 2008

Von besonderem Interesse für diese Arbeit ist die Mutation 742-743insGG, eine im Exon 7 lokalisierte Insertion von zwei Guaninen. Maraschio et al. beschrieben 1986

eine Patientin, die, wie sich später herausstellte, homozygot für diese Mutation ist [79, 80]. Bei der Erstbeschreibung dieser Patientin wurde aufgrund des ungewöhnlichen Phänotyps zunächst angenommen, dass es sich um ein anderes Chromosomeninstabilitätssyndrom als NBS handeln müsste. Bei der Patientin wurde aufgrund einer primären Amenorrhö im Alter von 33 Jahren eine Chromosomenanalyse durchgeführt, welche eine hohe Anzahl an Aberrationen und Translokationen unter Beteiligung der Chromosomen 14 und 7 zeigte. Ebenso wurde eine Zunahme der chromosomalen Aberrationen nach Exposition mit einem DSB-induzierenden Agens beobachtet. Klinisch wurden bei der Patientin eine Mikrozephalie, jedoch keine Immundefizienz oder Infektanfälligkeit als Hauptmerkmale des NBS festgestellt. Bei der Schwester der Patientin war ebenso eine primäre Amenorrhö beschrieben. Sie verstarb im Alter von 20 Jahren an einem malignen Lymphom. Es kann retrospektiv davon ausgegangen werden, dass sie an der gleichen Erkrankung wie ihre Schwester litt. Die Eltern der Patientin sind konsanguin und der Vater als heterozygoter Träger der 742insGG Mutation entwickelte zeitlich unabhängig voneinander zwei maligne Erkrankungen in der Prostata und in der Brustdrüse. Die beschriebene Patientin war im Alter von über 50 Jahren in einem guten Gesundheitszustand und gilt als die älteste beschriebene NBS-Patientin [79].



Abb. 1.5.: Links: Bild der Patientin R.R. im Alter von 16 Jahren mit ihrer jüngeren Schwester und rechts im Alter von 31 Jahren. Man vergleiche die kraniofazialen Dysmorphien mit Abb.1.1. Abbildung aus [80].

Durch die 742-743insGG Mutation wird auf molekularer Ebene ein Stopp-Codon fünf Aminosäuren strangabwärts der Mutation generiert. Auf Proteinniveau ergäbe sich als Konsequenz dieser Mutation ein aminotermiales Fragment von 26 kDa. Durch ein

weiter strangabwärts gelegenes Start-Codon ist ein carboxyterminales Fragment von ca. 52 kDa denkbar, welches aber im Western-Blot nicht nachweisbar ist [79]. Durch Analyse der Transkriptionsprodukte bei Zellen der beschriebenen Patientin konnte gezeigt werden, dass eine Reihe von alternativen Splice-Produkten nachweisbar waren. Insbesondere wurde ein Splice-Produkt beobachtet, bei dem die Exons 6 sowie 7 fehlen - und somit auch die 742-743insGG-Mutation nicht transkribiert wird. Dieses Splice-Produkt ist sowohl in Kontroll- als auch in NBS-Patienten-RNA nachweisbar, jedoch ist die Menge bei der Patientin R.R. ca. 100fach erhöht [79]. In der Nähe der Polyguanin-Region, in welcher bei der Insertion zwei weitere Guanine vorhanden sind (siehe Abb.1.6.), ist ein sogenannter Exon-Splicing-Enhancer (ESE) lokalisiert, ein Motiv mit einer Sequenz von sechs Basenpaaren, welches das korrekte Splicen der prä-mRNA unterstützt [81].

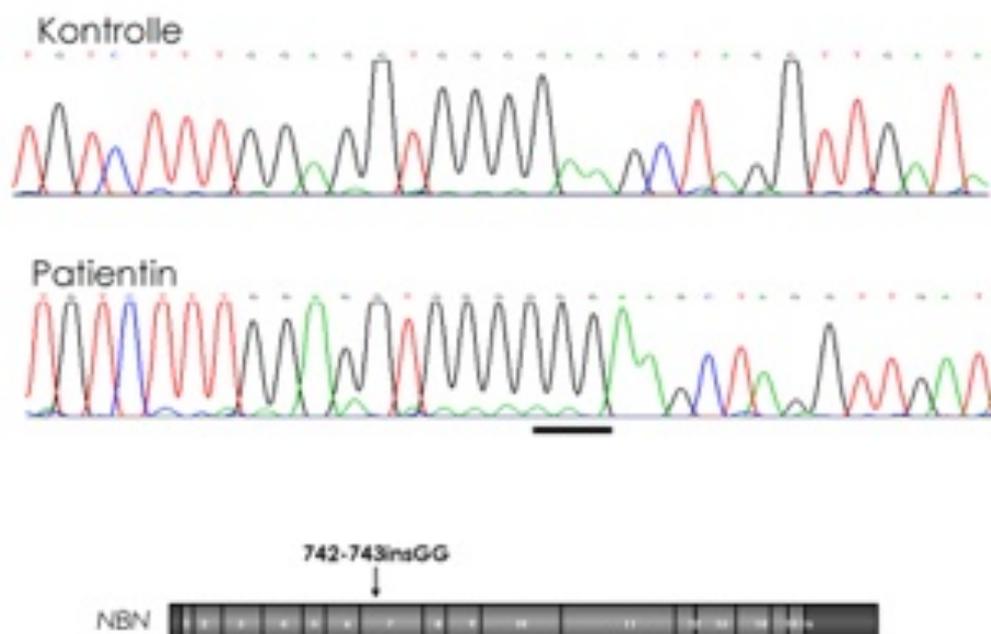


Abb. 1.6.: Insertion von zwei Guaninen in Position 742-743 bei Patientin R.R. im Vergleich zu einer Kontrollsequenz. Adaptiert aus [79].

Möglicherweise beeinflusst die Insertion an dieser Stelle den Splicing-Mechanismus und erklärt somit das vermehrte Vorhandensein von alternativen Splice-Produkten. Dieser Mechanismus des In-Frame-Skipping ist für eine Reihe von weiteren Genen beschrieben, in denen Mutationen zu vorzeitigen Stopp-Codons führen, wobei alternative Splice-Produkte entstehen, in denen die mutationstragenden Bereiche bzw.

Exons fehlen und somit der Schweregrad der Erkrankung moduliert wird [82, 83]. Im *NBN* besteht das Exon 6 aus 118 Basenpaaren (bp), das Exon 7 aus 194 bp und das alternative Splice-Produkt würde zu einem Protein von ca. 80 kDa mit einer internen in-frame Deletion von 104 Aminosäuren führen. Interessant an diesem Protein ist, dass es sowohl die funktionell wichtigen FHA und BRCT-Domänen (letztere zumindest anteilig) am Aminoterminus als auch die Mre11-Bindungsstelle am Carboxyterminus des Proteins beinhaltet.

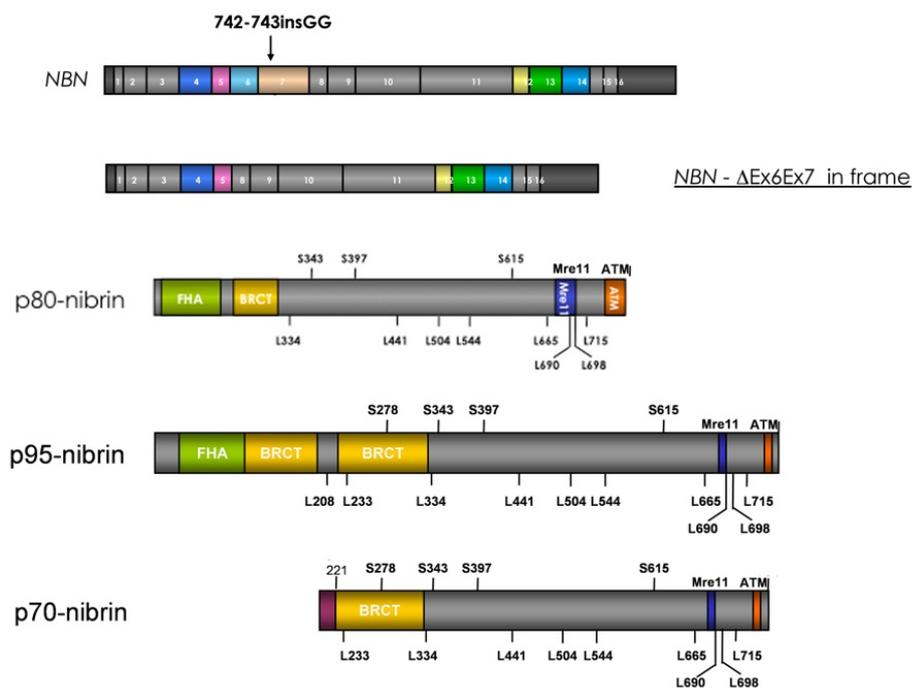


Abb.1.7.: Oben: *NBN* mit der insGG-Mutation und darunter das alternative Splice-Produkt ohne Exon 6+7. Mitte: Proteinstruktur des resultierenden Produktes mit einer internen Deletion von 104 Aminosäuren (p80-Nibrin). Zum Vergleich: Wildtyp-(p95-)Nibrin und unten das p70-Nibrin als Resultat der 657del5-Mutation. Adaptiert aus [79].

Tatsächlich konnte ein 80kDa-Nibrin (p80-Nibrin) in lymphoblastoiden Zellen (LCLs) der Patientin RR nachgewiesen werden [79]. Es ist denkbar, beziehungsweise naheliegend, dass dieses Protein (p80-Nibrin) dem aus der 657del5-Mutation resultierenden p70-Nibrin funktionell überlegen ist und somit den besonders milden Phänotyp bei Patientin R.R. begründen könnte. Insbesondere das Vorhandensein der funktionellen FHA- und BRCT-Domänen am Aminoterminus des Proteins könnte hinsichtlich der Fähigkeit mit anderen Proteinen, die an der DNA-Reparatur beteiligt sind in Wechselwirkung zu

treten, die funktionelle Überlegenheit des p80-Nibrins gegenüber der p70-Variante erklären.

### 1.5. Gerichtetes alternatives Splicing

Die „slawische“ 657del5 Mutation ist in Exon 6 lokalisiert, also in einem Bereich, der durch das bei Patientin R.R. nachgewiesene alternative Splicing in der resultierenden mRNA (*NBN*- ΔEx6 ΔEx7 in frame) fehlt. Es ist also vorstellbar, dass bei für 657del5 homozygoten NBS-Patienten durch gerichtetes alternatives Splicing die Translation von p80-Nibrin im Verhältnis zur p70-Nibrin-Translation erhöht werden kann. Unter der Annahme, dass das p80-Nibrin dem p70-Nibrin funktionell überlegen ist, ergibt sich daraus eine theoretische Behandlungsstrategie. Gerichtetes Splicing kann durch Verwendung sogenannter Antisense-Oligonukleotide (AON) erreicht werden, die Exon-Splicing-Enhancer (ESE)- Motive maskieren und dadurch die Bindung von Serin/Arginin-reichen Proteinen und eine Aktivierung des Splicing-Mechanismus verhindern [84, 85]. Therapeutische Strategien, welche die Verwendung solcher AON beinhalten sind für eine Reihe von Krankheitsbildern beschrieben, so zum Beispiel für die X-chromosomal vererbte Muskeldystrophie (MD) vom Typ Duchenne [86-88]. Bei der verwandten MD vom Typ Becker führt eine andere Mutation in demselben Gen zu einem weitaus milderem Phänotyp, da aus dieser ein funktionell überlegenes Protein resultiert. Auch bei der MD Duchenne gab es schon früh Beobachtungen, dass alternatives Splicing zu vermehrter Translation von funktionell überlegenen Proteinen führt [89]. Als weiteres Beispiel für den Versuch AON therapeutisch einzusetzen, soll hier noch bcl-2 positive B-Zell-Lymphome mit der Translokation t(14:18) erwähnt werden [90]. Durch das Programm ESEfinder konnten wir in Exon 6 und 7 des *NBN*-Gens Positionen identifizieren, die als Bindungsstellen für Splicing-Faktoren in Frage kommen [91]. Nach Synthese von gegen diese Positionen gerichteten AON führten wir Experimente auf zellulärem Niveau durch. Durch Transfektion der AON in die Zellen konnte die vermehrte Transkription von mRNA, bei der durch alternatives Splicing die Exons 6 und 7 fehlen, gezeigt werden (Abb.3.3). Ebenso konnte nach der Behandlung im Western-Blot ein Protein mit dem prädiktierten Molekulargewicht von ca. 80 kDa nachgewiesen werden (siehe Abb.3.4. + 3.5.). Nach Transfektion der NBS-Zellen mit den AON bilden diese also ein Protein, das sowohl die funktionell wichtigen aminoterminalen als auch carboxyterminalen Domänen enthält. Diese Zellen sind im Vergleich zu den uns vorliegenden von der Patientin RR stammenden

lymphoblastoiden Zellen besser für funktionelle Experimente geeignet, da sie eine größere Menge des Proteins exprimieren, wohingegen das 80 kDA-Nibrin in den lymphoblastoiden Zellen nur in geringen Mengen im Western-Blot nachweisbar ist.

### 1.6. *NBN*-Missense-Mutationen

Neben der 657del5 Mutation sind noch eine Reihe weitaus seltenere Mutationen im *NBN*-Gen mit unterschiedlicher klinischer Relevanz beschrieben (siehe Abb.1.4.).

Die Mehrzahl der beschriebenen Mutationen sind wie 657del5 trunkierende Frameshift-Mutationen. Punktmutationen, die zu einem Aminosäureaustausch führen, sind die Minderheit [5]. Eine solche Mutation ist die Mutation 643C>T, die wie die 657del5 Mutation im Exon 6 lokalisiert ist. Diese Mutation hat einen Austausch der basischen Aminosäure Arginin gegen die unpolare Aminosäure Tryptophan zur Folge (R215W). Zuerst wurde die Mutation bei heterozygoten Merkmalsträgern in gehäufte Assoziation mit soliden Tumoren [92, 93], bei Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie (ALL) [94] sowie bei Kindern mit Astrozytomen [95] beschrieben. Seemanova et al. charakterisierten 2006 eine NBS-Familie mit monozygoten Zwillingen, die compound heterozygot für die *NBN*-Mutationen 643C>T und 657del5 sind [96]. Die Eltern sind nicht konsanguin und jeweils heterozygote Merkmalsträger einer der beiden Mutationen. Die Zwillinge zeichnen sich durch einen besonders schweren Phänotyp mit ausgeprägter psychomotorischer Entwicklungsretardierung aus. Interessanterweise zeigten die Chromosomenanalysen bei den beiden Zwillingen jedoch keine erhöhte Brüchigkeit und Strahlensensibilität im Vergleich mit Kontrollzellen. Es konnte aber im Western-Blot gezeigt werden, dass in den Zellen der beiden Zwillinge im Vergleich zu heterozygoten Zellen (*NBN*<sup>657del5/wt</sup>) eine stark reduzierte Menge an Nibrin nachweisbar ist. Das R215W-Nibrin scheint also deutlich destabilisiert im Vergleich zum wt-Nibrin zu sein. Einerseits ist es vorstellbar, dass der schwere Phänotyp durch ein funktionelles Defizit des R215W-Nibrins erklärt werden kann. Andererseits könnte auch die Instabilität des R215W-Nibrins das schwere klinische Bild der beschriebenen Patienten erklären. Es ist derzeit Gegenstand der Forschung, ob die Instabilität des R215W-Nibrins durch eine kürzere Halbwertszeit der mRNA oder zum Beispiel einen erhöhten Abbau durch das Proteasom bedingt ist. Hinsichtlich eines funktionellen Defizits des R215W-Nibrins beschrieben Seemanova et al. 2006, dass die Phosphorylierung von ATM und p53 in den compound-heterozygoten Zellen im Vergleich sowohl zu Kontrollen als auch zu *NBN*<sup>657del5/wt</sup>- und *NBN*<sup>657del5/657del5</sup>- Zellreihen reduziert ist. Ebenso wurde gezeigt, dass die Bindung von Nibrin an das phosphorylierte Histon H2AX ( $\gamma$ H2AX)

durch die Mutation R215W gestört wird und die Reparatur-Foci-Bildung in entsprechenden Zellen besonders beeinträchtigt ist [97, 98]. Eine weitere Mutation ist die in Exon 5 lokalisierte Mutation 511 A>G. Diese Mutation ist in der für die erste BRCT-Domäne kodierenden Region lokalisiert und führt auf Proteinniveau zu dem Aminosäureaustausch von Valin gegen Isoleucin innerhalb jener funktionell wichtigen Proteinregion (I171V). Heterozygote I171V-Mutationen wurden gehäuft bei Kindern mit akuter lymphatischer Leukämie (ALL) [94] und Medulloblastomen [99], bei erwachsenen und pädiatrischen Patienten mit verschiedenen soliden Tumoren [93, 100, 101] sowie bei Brustkrebspatienten [102] gefunden. Ferner ist ein für diese Mutation homozygoter Patient mit aplastischer Anämie beschrieben, der sonst keine weiteren Charakteristika des NBS zeigt [103].

Bei einer Patientin mit familiärem Brustkrebs ist die ebenfalls im Exon 5 lokalisierte Mutation 506G>A im heterozygoten Zustand beschrieben (Daten nicht veröffentlicht).

Diese Missensemutation führt zum Austausch der Aminosäure Arginin gegen Histidin an Position 169 (R169H). Interessant hierbei ist zum einen die Lokalisation in der hochkonservierten BRCT-Domäne sowie zum anderen die Nähe zum Aminosäureaustausch I171V. Die ebenfalls bei Kindern mit ALL beschriebene, in Exon 3 lokalisierte Mutation 283 G>A führt zu dem Aminosäureaustausch D95N innerhalb der FHA-Domäne am Aminoterminus des Proteins, was ein funktionelles Defizit des resultierenden Proteins nahelegt [94]. Aufgrund der variablen phänotypischen Auswirkungen der verschiedenen Mutationen sind besonders die Varianten D95N und I171V sowie R169H hinsichtlich der Fähigkeit Protein-Protein-Wechselwirkungen einzugehen interessant, da sie die hierfür funktionell wichtigen FHA- bzw. BRCT-Domänen direkt beeinflussen. Bei der R215W-Variante ist neben den funktionellen Auswirkungen durch die Lokalisation zwischen den Tandem-BRCT-Domänen auch die Überlegung von Interesse, inwieweit die offensichtliche Instabilität des Genproduktes den bei Mutationsträgern beobachteten Phänotyp beeinflusst.

## **1.7. Weitere Nibrin-Interaktionspartner**

### **1.7.1. MDC1**

Neuere Untersuchungen zeigen, dass für die Akkumulation des MRN-Komplexes und weiteren für die DDR wichtigen Proteinen wie BRCA1 und 53BP1 an den DSB-Stellen, das Protein MDC1 (Mediator of DNA-damage checkpoint 1) notwendig ist, mit welchem der MRN-Komplex über die FHA-Domäne des Nibrins interagiert [104, 105]. MDC1 ist

ein großes nukleäres Protein, das über eine Reihe für Proteininteraktionen wichtige Domänen verfügt (u.a. FHA- und BRCT-Domänen) [106, 107]. Hinsichtlich der identifizierten Wechselwirkung mit Nibrin sind dies multiple, sich wiederholende seronin- und threoninreiche Motive (PST-Repeats), die durch die Casein-Kinase CK2 phosphoryliert werden und die Interaktion mit der FHA-Domäne des Nibrins ermöglichen [104, 105, 108-110]. Die in den zitierten Publikationen durchgeführten Experimente weisen darauf hin, dass für die Interaktion sämtliche charakterisierten aminoterminalen Domänen des Nibrins, also FHA und die Tandem-BRCT-Domäne, notwendig sind. Aus den Beobachtungen, dass durch die Interaktion mit phosphorylierten Proteinen via der aminoterminalen Domänen strukturelle Veränderungen des Nibrins induziert werden, wurde die Vermutung abgeleitet, dass darin eine molekulare Grundlage für den regulatorischen Einfluss des Nibrins auf den MRN-Komplex zu finden ist [62]. Es ist zudem bekannt, dass MDC1 direkt mit der phosphorylierten Histonvariante  $\gamma$ H2AX interagiert, einem zentralen Regulator bei der Bildung von DSB-induzierten Reparatur-Foci [111]. Diese Bindung wird über zwei carboxyterminale BRCT-Domänen des MDC1 ermöglicht [112]. Des Weiteren ist eine direkte Interaktion zwischen einer aminoterminalen FHA- Domäne des MDC1 mit ATM beschrieben [113, 114]. Die zahlreichen Interaktionen mit zentralen Effektoren der DNA-Reparatur machen deutlich, dass MDC1 eine zentrale Rolle bei der Antwort auf DNA-Schäden spielt.

### 1.7.2. Histonvariante H2AX

Die Phosphorylierung des bereits erwähnten Histons H2AX stellt eine sehr frühe Antwort auf DSB in der Zelle dar und spielt eine zentrale Rolle bei der Regulation der DDR [115, 116]. Die Phosphorylierung wird durch Mitglieder der PIKK-Familie (phoinositide-3-kinase-related Proteinkinase) katalysiert, zu der unter anderem auch das ATM zählt [73].  $\gamma$ H2AX (welches der phosphorylierten Form entspricht) markiert geschädigtes Chromatin und ist wichtig für die Lokalisation von DNA-Reparatur-Proteinen an den nukleären Foci, insbesondere der Proteine des MRN-Komplexes [117]. Diese Akkumulation wird dabei zumindest teilweise über Protein-Protein-Interaktionen vermittelt und nicht etwa über direkte Interaktionen mit geschädigter DNA. Es sind in diesem Zusammenhang Interaktionen von  $\gamma$ H2AX mit den aminoterminalen Domänen des Nibrins beschrieben und diese Wechselwirkung als Voraussetzung für die Lokalisation des MRN-Komplexes an nukleären Foci dargestellt [118]. In der

gleichen Publikation wird gezeigt, dass die Phosphorylierung von H2AX zwar auch in NBS-Zellen stattfindet, die Wechselwirkung aufgrund des Fehlens der FHA/BRCT-Domänen des Nibrins in solchen Zellen aber ausbleibt.

Es wird weiterhin erläutert, dass die Interaktion  $\gamma$ H2AX/Nibrin entscheidend für die ATM-Aktivierung und somit für die Regulation der vielfältigen ATM-vermittelten Antworten der Zellen auf DSB inklusive der Zellzykluskontrolle ist [119]. Eine Wechselwirkung von  $\gamma$ H2AX mit der BRCT-Domäne des Proteins MDC1 ist bekannt und wird als wichtiges regulatives Element innerhalb der DSB-Reparatur gewertet [111]. H2AX-defiziente Zellen zeigen vermehrte chromosomale Aberrationen nach Exposition gegenüber ionisierender Strahlung mit Hinweisen darauf, dass sowohl HR als auch NHEJ beeinträchtigt sind [120-122]. Interessanterweise gibt es Berichte darüber, dass es auch einen  $\gamma$ H2AX-unabhängigen Signalweg geben könnte, bei dem der MRN-Komplex unter anderem mit den Proteinen CtIP und 53BP1 interagiert und auch in Abwesenheit von  $\gamma$ H2AX die Antwort auf DSB via HR und Checkpointregulation initiiert [123].

### 1.7.3. CtIP

Ein weiterer beschriebener Interaktionspartner des Nibrins ist CtIP (carboxyterminal binding protein interacting Protein), welches ein nukleäres Protein mit Beteiligung an der Zellzykluskontrolle und DNA-Reparatur darstellt. Als regulative Elemente dafür sind unter anderem Wechselwirkungen mit BRCA1 und CDK2 (Cyclin dependent Kinase 2) beschrieben [124, 125]. Ferner ist CtIP in Abhängigkeit von einer Interaktion mit dem MRN-Komplex an DSB zu finden und an der DSB-Reparatur durch Resektion von DNA-Enden und HR direkt beteiligt [126-128]. Es wurde gezeigt, dass diese Interaktion über den Aminoterminus des Nibrins ermöglicht wird. Strukturelle Analysen der aminoterminalen FHA und BRCT-Domänen des Nibrins bei *Schizosaccharomyces pombe* zeigen, dass die Anordnung der Domänen in diesem Protein einen komplexen phosphorylierungsabhängigen Proteininteraktionsmodus mit CtIP ermöglicht [129, 130]. Bezogen auf das humane CtIP bzw. das Ortholog Ctp1 in *S.cerevisiae* deuten die Analysen darauf hin, dass an der Interaktion mit der aminoterminalen FHA-Domäne des Nibrins auch die beiden nahegelegenen BRCT-Domänen beteiligt sind. So sind nach Interaktion mit dem phosphorylierten Interaktionspartner (in diesem Falle Ctp1) ausgeprägte strukturelle Veränderungen der BRCT-Domänen zu beobachten.

Das Protein CtIP beinhaltet sogenannte SXT-Cluster, welche Substrate für die Casein-Kinase 2 (CK2) darstellen, deren Phosphorylierung für die Interaktion mit FHA-

Domänen (so z.B. mit Nibrin) essentiell ist [129]. Bisher ging man davon aus, dass FHA und BRCT-Domänen unabhängig voneinander an phospho-abhängigen Proteininteraktionen beteiligt sind [53, 131]. Die beschriebenen Analysen der CtIP/Nibrin-Interaktion weisen jedoch auf eine simultane Beteiligung sämtlicher aminoterminaler Domänen des Nibrins an der Wechselwirkung hin. Weitere Untersuchungen legen nahe, dass die CtIP/Nibrin (bzw. CtIP/MRN)-Interaktion vorrangig die DNA-Reparatur bzw. deren Regulation und nicht die Zellzykluskontrolle beeinflusst [132].

#### 1.7.4. MPG

Aus yeast-to-hybrid (Y2H)-Experimenten zum Interaktionspotential von Nibrin, welche in unserem Institut durchgeführt wurden, ergaben sich Hinweise darauf, dass zwischen MPG und Nibrin eine Wechselwirkung besteht. Diese konnte aber durch Immunpräzipitationen nicht verifiziert werden. MPG ist eine N-methylpurine-DNA Glycosylase, welche über die Basen-Exzisions-Reparatur an der zellulären Antwort auf DNA-Schäden beteiligt ist [133, 134]

#### 1.8. Zielsetzung dieser Arbeit

Das Nijmegen Breakage Syndrom als monogene Erkrankung beruht auf einer hypomorphen Mutation im *NBN*-Gen. Wie erwähnt, ist das aus der in der großen Mehrzahl der Fälle vorhandenen 657del5-Gründermutation resultierende p70-Nibrin für ein Überleben essentiell. Die residuale Proteinfunktion beinhaltet entsprechend der Struktur des trunkierten Proteins die Fähigkeit mit den beiden wichtigsten Interaktionspartnern Mre11 und Rad50 den MRN-Komplex zu bilden, welcher eine zentrale Rolle bei der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen einnimmt. Außerdem verfügt p70-Nibrin über die Fähigkeit mit ATM als ein wichtiges Element der DNA-Reparatur zu interagieren. Andererseits ist aus der Struktur des p70-Nibrins offensichtlich, dass aufgrund des Fehlens der aminoterminalen Domänen (FHA, BRCT), eine Interaktion mit Proteinen wie z.B.  $\gamma$ H2AX, MDC1 und CtIP nicht zu erwarten ist und hierin ein funktionelles Defizit des trunkierten Proteins liegt. Interessant ist in diesem Zusammenhang das bei der besonders milde betroffenen und für die Mutation 742-743insGG homozygoten NBS-Patientin nachgewiesene p80-Nibrin. Da dieses im Vergleich zum p70-Nibrin über die aminoterminal lokalisierten Domänen verfügt, ist eine funktionelle Überlegenheit zu vermuten, insbesondere bezogen auf die Fähigkeit

Protein-Protein-Wechselwirkungen einzugehen. Diese Annahme erscheint aufgrund des deutlich milderen Phänotyps der Patientin besonders wahrscheinlich.

Ziel dieser Arbeit ist es, zu untersuchen inwieweit funktionelle Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Varianten des Nibrins nachzuweisen sind. Weiterhin soll die residuale Proteinfunktion der hypomorphen Proteinvarianten charakterisiert, untereinander verglichen und somit unter Umständen molekulare Erklärungen für Genotyp-Phänotyp-Korrelationen geliefert werden. Im Mittelpunkt des Interesses steht dabei das p80-Nibrin, zum einen aufgrund des damit assoziierten Phänotyps und zum anderen aufgrund der Tatsache, dass es durch Transfektion mit spezifischen Antisense-Oligonukleotiden gelingt, in für die Gründermutation homozygoten zellulären Modellen, die Bildung des p80-Nibrins zu induzieren. Dies ermöglicht einerseits gute experimentelle Voraussetzungen und andererseits gegebenenfalls die Perspektive eines therapeutischen Nutzens bei der zukünftigen Behandlung von NBS-Patienten. Ergänzend wird hier die residuale Proteinfunktion von solchen Proteinen charakterisiert, welche die oben beschriebenen *NBN*-Missense-Mutationen als molekulare Grundlage haben. In diesem Zusammenhang sind diese insbesondere aufgrund der Lokalisation der resultierenden Aminosäureaustausche innerhalb bzw. in der Nähe der aminoterminalen Domänen mit funktioneller Bedeutung interessant. Der wesentliche Bestandteil der hier vorgenommenen Charakterisierung sind Experimente zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen. Methodisch wurden dabei vor allem Co-Immunpräzipitationen durchgeführt. Im Falle des Interaktionspartners MDC1, welcher von besonderem Interesse für die in dieser Arbeit bearbeitete Fragestellung ist, erfolgte die Charakterisierung vorrangig anhand von Pulldown-Experimenten mit einem spezifischen Fusionsprotein. Des Weiteren erfolgte im Sinne eines „Screening“ nach potentiellen Interaktionspartnern der verschiedenen Nibrinvarianten die Kombination von Immunpräzipitation und quantitativer Massenspektrometrie (q-AP-MS). Weitere hier beschriebene Experimente beschäftigen sich mit der Charakterisierung der subzellulären Organisation bei Vorhandensein unterschiedlicher molekularer Hintergründe bzw. verschiedener (hypomorpher) Nibrinvarianten.

## 2. Material

### 2.1. Zellreihen

Name	Genotyp <i>NBN</i>	Art der Zellreihe	Herkunft/ Ort der Transformation
04P0014	R215W/657del5	Humane LCL	Institut für Humangenetik, Berlin
04P0314	R215W/wt	Humane LCL	Institut für Humangenetik, Berlin
96P111	657del5/wt	Humane LCL	Institut für Humangenetik, Berlin
96P126	wt/wt	Humane LCL	Institut für Humangenetik, Berlin
GMAV0766 (GMSV)	657del5/657del5	SV-40 transformierte humane Fibroblasten	Universität Hiroshima [135]
GMSV + pLXIN R215W	657del5/657del5 + R215W	SV-40 transformierte humane Fibroblasten	Institut für Humangenetik, Berlin
GMSV + pLXIN	657del5/657del5	SV-40 transformierte humane Fibroblasten	Institut für Humangenetik, Berlin
GMSV + pLXIN D95N	657del5/657del5 + D95N	SV-40 transformierte humane Fibroblasten	Institut für Humangenetik, Berlin
GMSV + pLXIN I171V	657del5/657del5 + I171V	SV-40 transformierte humane Fibroblasten	Institut für Humangenetik, Berlin
GMSV + pLXIN NBS1	657del5/657del5 + wt	SV-40 transformierte humane Fibroblasten	Institut für Humangenetik, Berlin
GMSV + pLXIN R169H	657del5/657del5 + R169H	SV-40 transformierte humane Fibroblasten	Institut für Humangenetik, Berlin
HEK293	wt/wt	"Human Embryonic Kidney"- Zellen	Universität Leiden
HeLa	wt/wt	„HeLa-Zellen“ (Zervixkarzinomzellen)	Johns Hopkins Hospital, Baltimore
LN 9SV	wt/wt	SV-40 transformierte humane Fibroblasten	Institut für Humangenetik, Berlin

**2.2. Transfektionsreagenzien**

Name	Hersteller
FuGene6	Roche
Lipofectamine 2000	Invitrogen

**2.3. Gewebekultur-Materialien**

Material	Hersteller
$^{12}\text{C}_6^{14}\text{N}_4$ L-Arginin und $^{12}\text{C}_6^{14}\text{N}_2$ L-Lysin	Sigma Aldrich
$^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_4$ L-Arginin und $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_2$ L-Lysin	Cambridge Isotope Laboratories
Bleomedac (Bleomycin)	Medac GmbH
Dubecco's modified Eagle Medium (DMEM) (low bzw. high Glucose)	PAA Laboratories
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) ohne Arginin und Lysin	Gibco
Fetales Kälberserum (FKS)	Gibco
G418-Sulfate, Geneticin®	Invitrogen
InSolution™ MG-132	Calbiochem
Opti-MEM® Reduced Serum Medium, GlutaMAX™	Gibco
PBS	PAN Biotech GmbH
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA Laboratories
RPMI-14 Medium	PAA Laboratories
Trypsin-EDTA	PAA Laboratories

**2.4. Verwendete Puffer und Lösungen**

Name	Hersteller
CK2 Reaction Buffer (10x)	NEB
NEB-Buffer	NEB
NuPAGE - Antioxidant	Invitrogen
NuPAGE LDS –Ladepuffer (4x)	Invitrogen
NuPAGE MES SDS Runnig Buffer (20x)	Invitrogen
NuPAGE MOPS SDS Runnig Buffer (20x)	Invitrogen
NuPAGE Sample Reducing Agent (10x)	Invitrogen
NuPAGE Transfer Buffer (20x)	Invitrogen
NuPAGE Tris-Acetat SDS Runnig Buffer (20x)	Invitrogen
Rainbow Marker RPN 800	Amersham

Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder	Fermentas
Spectra™ Multicolor Low Range Protein Ladder	Fermentas

### 2.5. Enzyme

Enzym	Hersteller
CK2	NEB
EcoR1	NEB
Pst1	NEB
Xho I	NEB

### 2.6. Bakterien

Stamm	Hersteller
One Shot® BL21 (DE3) pLysS	Invitrogen

### 2.7. Antikörper

Antikörper	Hersteller	Klonalität	Epitop	Katalognummer
A-a-Tubulin DM1A	abcam	monoklonal	Mouse	ab7291
A-cmyc	Sigma Aldrich	monoklonal	Mouse	MM4439
A-Ctip	Abcam	polyklonal	Rabbit	ab70163
A-Flag M2	Sigma Aldrich	monoklonal	Mouse	F9291
A-H2AX	Abcam	polyklonal	Rabbit	ab11175
A-MDC1	Abcam	polyklonal	Rabbit	ab11170
A-MDC1	Abcam	polyklonal	Rabbit	ab11169
A-MPG M10 1G6	Novus biol.	monoclonal	Mouse	H0004350-M10
A-Mre11	Abcam	polyklonal	Rabbit	ab397
A-Mre11 12D7	Abcam	monoklonal	Mouse	ab214
A-P95	Abcam/Novus biol.	polyklonal	Rabbit	ab398/ NB 100-143
A-P95 1D7	Abcam	monoklonal	Mouse	ab117261
A-Rad50	Novus biol.	molyklonal	Rabbit	NB 100-154
A-Rad50 13B3	Abcam	monoklonal	Mouse	ab89
A-TRF2	Imgenex	monoklonal	Mouse	IMG-124A
A-γH2AX	Millipore	polykonal	Rabbit	07-164
A-γH2AX	Upstate	monoklonal	Mouse	05-636
A-γH2AX 3F2	Abcam	monoklonal	Mouse	ab22551
Anti-mouse IgGHRP	Amersham	-	-	NXA931
Anti-rabbit IgGHRP	Amersham	-	-	NA934V

**2.8. Gele**

Gel	Hersteller
Bis-Tris (12%)	Invitrogen
Tris Acetat (3-8%)	Invitrogen
Bis-Tris (4-12%)	Invitrogen

**2.9. Präzipitationsmaterialien**

Material	Hersteller
Dynabeads Protein G	Invitrogen
Gluthation Sepharose	GE Lifescience
NHS-Activated Sepharose 4 Fast Flow	GE Lifescience

**2.10. Kits**

Kit	Hersteller
ECL-Detection-Kit	Amersham
Nuclear Extraction Kit	Cayman Chemicals

**2.11. Sonstige Chemikalien und Reagenzien**

Produkt	Hersteller
Agarose	Serva
Ampicillin	Sigma Aldrich
ATP (lithium salt, 100 mM, pH 7)	Roche
Bacto™ Agar	Becton Dickinson
Bacto™ Trypton	Becton Dickinson
Bacto™ Yeast Extract	Becton Dickinson
Borsäure	Roth
Bradford Reagenz	Sigma Aldrich
BSA	Sigma Aldrich
Chloramphenicol	Sigma Aldrich
Commassie Blue	Serva
Complete Mini, Protease Inhibitor Tabletten	Roche
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
DTT	Sigma Aldrich
EDTA	Merck
Entwickler	Kodak
Ethanolamin	Roth

Ethidiumbromid	Serva
Fixativ	Kodak
Glycerol	Merck
GSH	Sigma Aldrich
HCl	Merck
KCl	Roth
Magermilchpulver Sucofin	TSI GmbH
Mercaptoethanol	Merck
Methanol	J.T. Baker
Methanol	J.T. Baker
NaCl	Roth
NaF	Roth
NaOH	Merck
NP40 10%	Roche
PMSF	Sigma Aldrich
Ponceau S	Fluka
SDS 20%	MP Biomedicals
Streptavidin-HRP	Amersham
Thiourea	Sigma Aldrich
Thiourea	Merck
Tris-HCl	Merck
Triton X 100 10%	Calbiochem
Tween20	Sigma
Urea	Sigma Aldrich
$\beta$ -Glycerolphosphat	Sigma Aldrich

### 2.12. Plasmide

Plasmid	Herkunft	TAG
pCMV-Tag2B-p70	Institut für Humangenetik, Charité	FLAG
pCMV-Tag2B-p80	Institut für Humangenetik, Charité	FLAG
pCMV-Tag2B-p95	Institut für Humangenetik, Charité	FLAG
pCMV-Tag3B-CtIP	Institut für Humangenetik, Charité	c-myc
pCMV-Tag3B-MPG	Institut für Humangenetik, Charité	c-myc
pGEX 4T3-M3	Universität Zürich	GST

**2.13. Verbrauchsmaterialien**

Material	Hersteller
Blotting-Papier	Schleicher + Schuell
Blue Caps (15/50 ml)	Becton Dickinson
Dialyseschläuche Float-A-Lyzer (MWCO 25000, 5 ml)	SPECTRUM, Roth
Gewebekulturflaschen (50/250/500 ml)	Becton Dickinson
Petrischalen	Becton Dickinson
Pipettenspitzen	Sarstedt
Poly-Prep Chromotography Columns (0,8x4 cm)	BioRad
PVDF-Membran (0,45 µm)	GE Healthcare
Röntgenfilme	Kodak
Sterilpipetten (5/10/25 ml)	Falcon
Transferpipetten (2,5 ml)	Sarstedt

**2.14. Hergestellte Lösungen und Puffer****2.14.1. Bakterienkultur-Medien und Platten**

<u>LM-Platten:</u>	Bacto Trypton	4g
	Bacto-Yeast-Extract	2g
	5M NaCl	800µl
	Bacto-Agar	6g
		Ad 400ml

Antibiotikazusätze: Chloramphenicol (CAM)-Endkonzentration: 34 µg/ml  
 Ampicillin (Amp)-Endkonzentration: 50 µg/ml

<u>SOB- Medium (1 l):</u>	Bacto Trypton	20g
	Yeast Extract	5g
	5M NaCl	2ml
	2M KCl	1,25ml

<u>SOC – Medium (1 l):</u>	Bacto Trypton	20g
	Yeast Extract	5g
	5M NaCl	2ml
	2M KCl	1,25ml
	2M Glucose	1 ml

**2.14.2. Puffer zur Herstellung des Fusionsproteins**

<u>ELB-Puffer:</u>	50 mM	Tris pH 7,0
	150 mM	NaCl
	0,5 %	NP40

<u>E1A-Lysepuffer:</u>	ELB-Puffer +	
	5 mM	EDTA
	1 mM	DTT
	1 mM	PMSF

<u>20mM GSH (pH 7,0):</u>	61,5 mg	GSH
	1 ml	10x TBS

<u>Dialysepuffer:</u>	1 x	TBS
	10%	Glycerol

**2.14.3. Lösungen für Plasmid-DNA-Präparation**

<u>MP I:</u>	250 mM	Tris/HCl pH 8,0
	100 mM	EDTA
	500 mM	Glucose

<u>MP II:</u>	0,2 M	NaOH
	1%	SDS

<u>MP III:</u>	3 M	Na Ac pH 4,8
----------------	-----	--------------

<u>MP IV:</u>	50 mM	Tris/HCl pH 8,0
	100 mM	Na-Acetat

**2.14.4. Puffer für GST-Pulldown**

<u>Wasch- Puffer:</u>	50 mM	Tris pH 7,5
	150 mM	NaCl
	1 M	DTT
	0,2 %	NP40

**2.15. Geräte**

Gerät	Hersteller
„Centrifuge 5415 C“	Eppendorf
Brutschränke	Heraeus
Coulter Counter	Beckmann
Feinwaage	Sartorius
Gelelektrophoresekammer	PEQ-Lab
Laminarflow-Werkbank	Heraeus
Magnetständer PL-MCS12	Varian
Megafuge 2.0	Heraeus Sepatech
Mikroskop	Zeiss
pH-Meter	Mettler Toledo
Rotationsgerät RM5	CAT
Sonifier 450	Branson
Spannungsquellen	Gibco
Tecan Sunrise	Tecan
Thermomixer	Eppendorf
Vortex Genie 2	Scientific Industries
Wasserbad	Th. Karow GmbH
XCell IITM Blot Module	Invitrogen
XCell SureLock™ Mini-Cell	Invitrogen

**2.16. Oligonukleotide**

Sequenzen der Antisense- Oligonukleotide:

NBS1-Ex6-ESE-AS: CUUCCUGCCGUCCUGACAGAUCAA

NBS1-Ex7-ESE-AS: ACAGUCAGGAAUUAAGGUCUGUGAG

Sequenzen der Sense- Oligonukleotide:

NBS1-Ex6-ESE-S: UUGAUCUGUCAGGACGGCAGGAAAG

NBS1-Ex7-ESE-S: CUCACAGACCUUAAUCCUGACUGU

---

### **3. Methoden**

#### **3.1. Zellkultur**

##### **3.1.1. Allgemeine Bedingungen**

Die Zellkultivierung wurde unter sterilen Bedingungen mit sterilen Medien, Lösungen und Materialien unter einer Laminairflow-Werkbank durchgeführt. Die Zellkulturen wurden in Gewebezuchtflaschen oder -schalen bei 37°C mit 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Die in Einfriermedium (10% DMSO) im Stickstofftank bei ca. -180°C gelagerten Zellen wurden aufgetaut, in 9 ml Kulturmedium aufgenommen und in einer 50 ml Kulturflasche in Kultur genommen. Nach erfolgter Zelladhäsion erfolgte ein Mediumwechsel um das DMSO zu entfernen.

##### **3.1.2. Kultivierung und Ernte**

In 50 ml Kulturflaschen wurde in der Regel in 5 ml Medium, in 175 ml Flaschen in 10 ml Medium und in 275 ml Flaschen in 20 ml Medium kultiviert. Ebenso wurde in 6 cm Kulturschalen in 5 ml, in 10 cm Kulturschalen in 10 ml und in 15 cm Kulturschalen in 20 ml kultiviert. Medienwechsel und Verdünnungen wurden in der Regel nach Erreichen von 80-90% Konfluenz durchgeführt. Waschschritte erfolgten jeweils mit PBS. Das Ablösen der Zellen erfolgte mit Trypsin, welches nach dem Waschen mit PBS vorsichtig auf die Zellen gegeben wurde. Für eine schnelle Zellablösung erfolgte eine kurze Inkubation bei 37°C im Kulturschrank. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von Medium beendet und die Suspension entweder für die weitere Verarbeitung geerntet, verdünnt oder in 10% DMSO-Medium eingefroren.

##### **3.1.3. Zellzahlbestimmung**

Für die Zellzahlbestimmung wurden 200 µl einer Zellsuspension mit 10 ml isotoner Lösung verdünnt. Die Zellzahl wurde dann mit dem Partikelzähler der Firma Beckmann-Coulter bestimmt. Für Fibroblasten betrug der Messbereich 10-30 µm, für lymphoblastoide Zellen 8-13,5 µm.

##### **3.1.4. Bleomycin Behandlung**

Zur Behandlung mit dem DSB-induzierenden Bleomycin wurde zunächst die vorhandene Lösung mit einer Konzentration von 1 mg/ml in dem jeweils zur Kultivierung verwendeten Medium zur jeweils gewünschten Konzentration verdünnt. Dann erfolgte die Entnahme des alten Kulturmediums und einmaliges Waschen des Zellrasens mit

PBS und das Bleomycin wurde für den angegebenen Zeitraum auf die Zellen zur Inkubation gegeben. Endzeitpunkt der Behandlung war dabei jeweils die Zugabe von Trypsin zum Ernten der Zellen.

### **3.1.5. Behandlung mit Proteasominhibitor MG-132**

Nach Transfektion der GMSV (*NBN*<sup>657del5/657del5</sup>)-Zellen mit Antisense-Oligonukleotiden (siehe unten) für 8 h wurde das Transfektionmedium entnommen und gegen Medium mit 1 µM/ml des Proteasominhibitors MG-132 ausgetauscht.

Nach Inkubation bei 37°C für 2 h bzw. 8 h wurden die Zellen jeweils geerntet und eine Proteinaufarbeitung mit IP-Lysepuffer durchgeführt. Zu jedem Erntezeitpunkt wurden auch Zellen geerntet und aufgearbeitet, die nicht mit MG-132 behandelt wurden. Anschließend wurde eine Immunpräzipitation mit gegen Nibrin und Mre11 gerichteten Antikörpern durchgeführt und die Proben per Western-Blot und selektivem Immunoblot analysiert.

## **3.2. Proteinaufarbeitung**

Nach Ernte der Zellen wurden diese im Medium bei 1000 rpm für 10 min abzentrifugiert, das Pellet in 10 ml PBS resuspendiert und eine erneute Zentrifugation durchgeführt. Danach erfolgte die Aufnahme der Pellets in 1ml PBS, das Überführen in ein Eppendorfgefäß und zwei Zentrifugationen bei 6000 rpm bei 4°C für 4 min. Nach dem Trocknen wurden die Pellets bei -80°C gelagert oder direkt weiter verarbeitet.

### **3.2.1. Aufarbeitung für Western-Blot**

Die Zellpellets wurden in PBS resuspendiert, üblicherweise in 50 µl pro 1 x 10<sup>6</sup> Zellen. Dann erfolgte die Zugabe der gleichen Menge 2 x LDS-Ladepuffer und das Kochen der Lysate im Wasserbad bei 100°C für 5 min. Nach kurzer Abzentrifugation wurden die Proben auf Eis gelagert. Anschließend wurden die Proben mit dem Branson Sonifier für 30 sec (Output Control 4, Duty Cycle 70%) sonifiziert um darin enthaltene DNA zu scheren. Optional erfolgte eine Proteinquantifizierung nach der Bradford-Methode oder die Probe wurde direkt auf ein Gel aufgetragen.

### **3.2.2. Aufarbeitung für Immunpräzipitation**

Die Zellpellets wurden in insgesamt jeweils 500 µl frisch angesetztem IP-Lysepuffer resuspendiert und für 30min – 1h bei 4°C unter Rotation inkubiert.

IP-Lysepuffer:

Tris HCl pH 7,5	50 mM
NaCl	150 mM
EDTA pH 8,0	5 mM
Triton X100	0,3 %
Complete Mini	1 Tablette pro 10 ml IP-Lysepuffer

Anschließend wurden die Proben mit dem Branson Sonifier für 30 sec (Output Control 4, Duty Cycle 70%) sonifiziert um enthaltene DNA zu scheren. Optional erfolgte eine Proteinquantifizierung nach der Bradford-Methode oder die Probe wurde direkt für eine Immunpräzipitation eingesetzt.

**3.2.3. Extraktion nukleärer Proteine**

Für die spezifische Extraktion nukleärer Proteine wurde das Nuclear Extraction Kit der Firma Cayman Chemical verwendet. Folgende Pufferlösungen sind bei der Aufarbeitung verwendet worden:

PBS/Phosphatase Inhibitor -Puffer

Nuclear Extraction PBS (10x)	1 ml
Nuclear Extraction Phosphatase Inhibitor (50x)	0,2 ml
H <sub>2</sub> O dd	8,8 ml

Hypotoner Puffer

Nuclear Extraction Hypotonic Buffer (10x)	50 µl
Nuclear Extraction Phosphatase Inhibitor (50x)	10 µl
Nuclear Extraction Protease Inhibitors (100x)	5 µl
H <sub>2</sub> O dd	870 µl

Extraktionspuffer

Nuclear Extraction Buffer (2x)	25 µl
Nuclear Extraction Phosphatase Inhibitor (50x)	1 µl
Nuclear Extraction Protease Inhibitors (100x)	0,5 µl
DTT (10 mM)	5 µl
H <sub>2</sub> O dd	18,5 µl

Nach der Ernte wurden die Zellen im Medium bei 1000 rpm für 10 min in der Heraeus Megafuge abzentrifugiert, das Zellpellet dann in jeweils 5 ml PBS/Phosphatase Inhibitor-Puffer pro  $1 \times 10^7$  Zellen insgesamt zweimal resuspendiert und jeweils bei 1100 rpm für 5 min abzentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen in jeweils 500  $\mu$ l des hypotonen Puffers pro  $1 \times 10^7$  resuspendiert und 15 min auf Eis gelagert. Hier quollen die Zellen osmotisch auf und die Zellmembran wurde zerstört, wobei die Kernmembran intakt blieb. Anschließend wurden 50  $\mu$ l NP40 (10%) hinzugegeben und vorsichtig resuspendiert. Im direkten Anschluss erfolgte eine Zentrifugation für 30 sec bei 4°C und 12.000 rpm. Der Überstand (ca. 500  $\mu$ l je  $1 \times 10^7$  Zellen) entsprach der cytoplasmatischen Proteinfraction und konnte für weitere Untersuchungen aufgehoben und nach Schockgefrieren in flüssigem N<sub>2</sub> bei -80°C gelagert werden. Das Pellet entsprach den Zellkernen und wurde in 50  $\mu$ l je  $1 \times 10^7$  Zellen Extraktionspuffer aufgenommen und resuspendiert. Die Probe wurden insgesamt 6x bei maximaler Stärke 30 sec auf dem Vortex geschüttelt und anschließend für 10 min auf Eis gelagert. Zum Abschluss erfolgte eine Zentrifugation für 10 min sec bei 4°C und 12.000 rpm. Der Überstand (ca. 50  $\mu$ l je  $1 \times 10^7$  Zellen) entsprach der nukleären Proteinfraction und konnte nach Schockgefrieren in flüssigem N<sub>2</sub> bei -80°C gelagert oder direkt weiter verarbeitet werden.

### 3.3. Immunpräzipitation

Mit der Immunpräzipitation (IP) werden Proteine mithilfe spezifischer Antikörper aus einem Proteinlysate präzipitiert. Durch so genannte Co-Immunpräzipitation werden darüber hinaus Interaktionspartner des Zielproteins des verwendeten Antikörpers co-präzipitiert. Die nach Zugabe des Antikörpers gebildeten Immunkomplexe können mit Hilfe unterschiedlicher Matrices präzipitiert werden. So zum Beispiel unter Verwendung Protein G-gekoppelter Magnetbeads, welche spezifisch an die Fc-Region der Immunglobuline binden.

Zu den aufgearbeiteten Proteinlysaten, entweder mittels IP-Lysepuffer oder Kernextraktion, wurde bei einem Probevolumen von 500  $\mu$ l (bei niedrigeren Volumina wurde entsprechend mit PBS aufgefüllt) jeweils eine definierte Menge einer oder mehrerer Antikörper hinzugegeben und für eine definierte Dauer zwischen 30 min und Übernacht bei 4°C bzw. Raumtemperatur inkubiert (Antikörperabhängige Angaben siehe nachfolgende Tabelle). Nach Bildung des Immunkomplexes wurden 25  $\mu$ l Protein G-Dynabeads (nach Herstellerangaben vorbereitet) hinzugegeben und für eine

Mindestdauer von 3 h bei 4°C inkubiert. Die weitere Aufarbeitung der Proben fand auf Eis oder im Kühlraum statt.

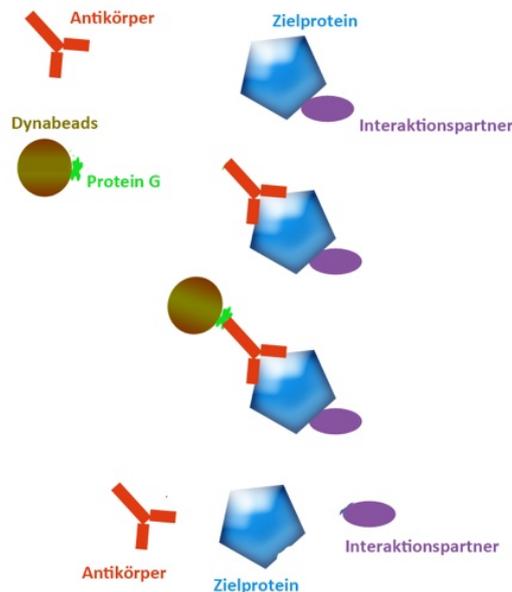


Abb.3.1.: Schematische Darstellung des Ablaufs einer (Co-)Immunpräzipitation mit Protein G-Dynabeads.

Es folgten drei Waschschriffe mit jeweils 500 µl IP-Lysepuffer, in welchem die Proben und Beads jeweils resuspendiert wurden. Die Abtrennung der Magnetbeads samt der gebundenen Immunkomplexe erfolgte mittels eines magnetischen Eppendorfgefäßständers. In einem vierten Waschschriff mit 800 µl IP-Lysepuffer erfolgte die Übertragung der Probe zur Vermeidung von Verunreinigungen in ein neues Eppendorfgefäß. Nach Entfernung des Lysepuffers wurden die Magnetbeads schließlich in 10 µl 1,1 x LDS-Ladepuffer aufgenommen und die Proben bei 100 °C für 2-3 min im Wasserbad gekocht. Hierbei lösten sich die Immunkomplexe wieder von den Magnetbeads. Mit dem Magnetständer wurde die Probe von den Magnetbeads getrennt und erneut in ein neues Eppendorfgefäß übertragen. Das gewonnene IP-Lysat konnte nun entweder bei -80°C gelagert oder direkt für die weitere Analytik per Gelelektrophorese aufgetrennt werden.

Antikörper	Eingesetzte Menge je IP in µl	Dauer der Bindungsreaktion
Rb pAb p95	0,5	1 h
Rb pAb Mre11	0,5	1 h
Rb pAb A-MDC1	4	2 h
A-Flag M2	1	1 h

A-cmyc	1	30 min
Rb pAb CtIP	1	30 min
A-MPG M10	1	30 min
A- $\gamma$ H2AX 07-164	5	1 h
A- $\gamma$ H2AX 05-636	1	1 h
A-H2AX ab11175	1	1 h

### 3.4. Proteinanalytik

#### 3.4.1. Proteingelektrophorese

Bei der Proteingelektrophorese werden die Protein- bzw. Immunpräzipitationslysate in einer Elektrophoresekammer, nachdem sie auf ein Gel aufgetragen wurden, der Proteingröße nach in einem Spannungsfeld aufgetrennt.

Für die Gelelektrophorese wurden jeweils 10% des Probevolumens an 10x Reducing Agent hinzugegeben. Dadurch wurden die kovalenten Disulfidbrücken gespalten und somit die Sekundärstruktur der aufzutrennenden Proteine aufgehoben. Die Denaturierung der Proben erfolgte zuvor bei 70°C für 10 min im Heizblock. Je nach verwendetem Gel wurden die entsprechenden Laufpuffer in einfacher Konzentration eingesetzt. Die angelegte Spannung und Laufdauer hing sowohl von der gewünschten Auftrennung, als auch von den Laufeigenschaften des jeweils verwendeten Gels ab. Zur Orientierung hinsichtlich der erfolgten Proteinauftrennung wurde üblicherweise ein kommerziell hergestellter Proteinmarker mit aufgetragen.

#### 3.4.2. Western Blot

Mit der Western-Blot Methode wurden die zuvor per Gelelektrophorese nach Größe aufgetrennten Proteine mittels des sogenannten Tank-Blot-Verfahrens auf eine Membran transferiert, die sich für weitere spezifische Proteinnachweise per Immunoblot eignet. Bei dem verwendeten System der Firma Invitrogen wurde das Gel auf die gewünschte (in der Regel PVDF-) Membran gelegt. Dazu wurden Schwämme und Transferpapier in unten skizzierter Anordnung angeordnet.

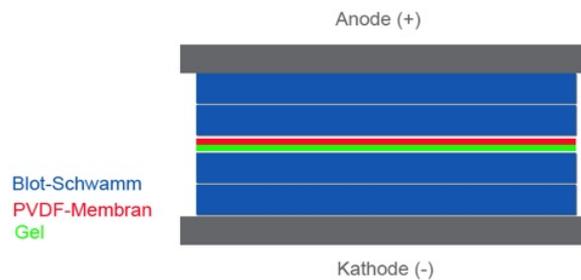


Abb 3.2.: Schematische Skizze des Western-Blot-Verfahrens

Nach Auffüllen der Transferkammer mit Transferpuffer in einfacher Konzentration mit Zusatz von Methanol (Menge je nach zu transferierender Proteingröße) sowie Antioxidans, wurde eine Spannungsquelle angeschlossen und die Proteine für eine Dauer von in der Regel 1-2 h (je nach Molekulargewicht der zu übertragenden Proteine) auf die Membran transferiert. Für eine Erfolgskontrolle des Proteintransfers auf die Membran, wurde diese jeweils reversibel mit Ponceau S angefärbt und wieder entfärbt. Zur Vermeidung von unspezifischen Antikörperbindungen im Immunoblotverfahren, wurde die Membran in der Folge (in der Regel über Nacht bei 4°C) mit einem Blockingpuffer abgesättigt. Dieser bestand aus 10% Magermilchpulver gelöst in TBS-T.

### 3.4.3. Immunoblot

Zur Detektion spezifischer Proteine auf den Membranen wurde das Immunoblotverfahren angewendet. Dabei wurden die Membranen nach vorheriger Sättigung in 10% Magermilch mit einem spezifischen Primärantikörper (verdünnt in Blocking-Puffer: 5% Magermilchpulver/TBS-T) inkubiert. Die Dauer und Bedingungen der jeweiligen Inkubation waren vom verwendeten Antikörper abhängig und sind in nachfolgender Tabelle aufgelistet. Nach Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgten drei Waschschriffe mit TBS-T für jeweils 10 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde mit einem ebenfalls in Blocking-Puffer verdünnten Sekundärantikörper in der Regel für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und die Membran schließlich erneut 5 x für 10 min in TBS-T gewaschen. Die verwendeten sekundären Antikörper sind mit Meerrettich Peroxidase („Horseradish peroxidase“; HRP) konjugiert, was man sich bei der enzymatischen Detektion mit dem ECL Western Blotting Detection Kit zu Nutzen macht. Nach Abschluss der Reaktion, welche für 1 min durchgeführt wurde, erfolgte die Belichtung eines Röntgenfilms für unterschiedliche Expositionszeiten, die von wenigen

Sekunden bis zu 1 h variierten. Der belichtete Film wurde dann in Entwickler- und schließlich Fixationslösung in der Dunkelkammer getränkt.

### 3.4.3.1. Primäre Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Dauer
A-a-Tubulin	1: 10 000	1 h
A-cmyc 9E10	1: 2000	1 h
A-CtIP ab70163	1: 1000	1 h
A-Flag M2	1: 2000	2 h
A-MDC1 ab11169	1: 10 000	30 min
A-MDC1 ab11170	1: 500	1 h
A-MPG M10	1: 1000	1 h
A-Mre 11 12D7	1: 5000	1 h
A-P95 1D7	1: 5000	1 h
A-Rad50 ab89	1: 1000	1 h
A-TRF2	1: 500	2 h
A-γH2AX 3F2	1: 1000	1 h

### 3.4.3.2. Sekundäre Nachweislösungen

Antikörper	Verdünnung	Dauer
A-Mouse	1: 5000 - 1: 10 000	1 h
A-Rabbit	1: 2000 – 1: 5000	1 h
Streptavidin	1: 200	2 h

### 3.4.4. Strippen von Blots

Sollte eine Membran auf mehrere Proteine untersucht werden, insbesondere wenn die zu identifizierenden Proteine ein ähnliches Molekulargewicht hatten, erfolgte teilweise die Behandlung der Membranen mit Stripping-Puffer. Dadurch wurden die auf der Membran bereits befindlichen Antikörper von ihren Bindungsstellen gelöst. Die Membranen wurden dazu für 30 min in Stripping-Puffer bei 70 °C im Wasserbad inkubiert. Darauf folgte zweimaliges Waschen für jeweils 10 Minuten mit H<sub>2</sub>O und einmaliges Waschen mit TBS-T für erneut 10 Minuten bei Raumtemperatur. Nach erneutem Absättigen der Membran mit 10% MMP, konnte eine weitere Immundetektion durchgeführt werden.

Stripping-Puffer:

Tris-HCl pH 7,5	2 mol/l
SDS	20%
Mercaptoethanol	14,19 mol/l
H <sub>2</sub> O	

**3.5. Transfektion (Lipofektion) mit Antisense/Sense Oligonukleotiden**

Die Transfektion mit Antisense-Oligonukleotiden zum gezielten Exon-skipping und konsekutiver Produktion des beschriebenen „p80-Nibrins“, bzw. die als Kontrolle dienende Transfektion mit Sense-Oligonukleotiden, wurde in den hier beschriebenen Experimenten stets in GSMV (GM 017166VA7)- Zellen mit dem Genotyp *NBN*<sup>(657del5/67del5)</sup> durchgeführt. Die Antisense-Oligonukleotide waren dabei gegen ESEs in Exon 6 und 7 gerichtet. Die Sense-Oligonukleotide bestanden jeweils aus der dazu komplementären Sequenz. Die kommerziell erworbenen Oligonukleotide waren Phosphorothioat modifiziert, um die Resistenz gegenüber Nukleasen zu erhöhen. Eine erhöhte Resistenz gegenüber RNase H wurde durch die Modifikation des Zuckers 2'-O-methyl-Ribose erreicht, da diese die Bildung stabiler Heteroduplexe begünstigt.

Einen Tag vor der Transfektion wurden die Zellen in definierter Zellzahl in DMEM-Medium in Kulturschalen ausplattiert, sodass eine Konfluenz der Zellen von 30-50% erreicht wurde. Bezogen auf die GSMV-Zellen wurden für eine 6 cm Kulturschale  $1 \times 10^6$  Zellen, für eine 10 cm Kulturschale  $3 \times 10^6$  Zellen und für eine 15 cm Kulturschale jeweils  $8 \times 10^6$  Zellen ausplattiert. Die Transfektionsansätze wurden am Folgetag wie folgt vorbereitet: Zunächst wurden die Oligonukleotide (Antisense 1 + Antisense 2 bzw. Sense 1 + Sense 2) in OPTI-MEM I –Medium verdünnt: Die Oligonukleotide (Konzentration von 100 pmol/μl) sollten dabei eine Endkonzentration von 400 pmol/ml haben, d.h. es wurden z.B. je 4 μl Oligonukleotid 1 bzw. 2 in 4 ml OPTI-MEM-I Medium verdünnt. Von dem Transfektionsreagenz Lipofectamine 2000 (Konzentration 1 μg/μl) wurde zeitgleich eine Verdünnung von 20 μg/ml hergestellt, z.B. 40 μl in 4 ml OPTI-MEM-I-Medium verdünnt. Diese Verdünnungen wurden für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zusammengegeben. Nach weiteren 20 min Inkubation bei Raumtemperatur zur Komplexbildung der Oligonukleotide mit dem Lipofectamine, wurde der Ansatz schließlich tropfenweise auf die ausplattierten Zellen gegeben. Je nach Versuchsaufbau erfolgte dann die Inkubation bei 37°C für unterschiedliche Zeiträume. Die Behandlungsdauer wurde entsprechend der gewünschten Menge an p80-Nibrin bzw. des gewünschten Verhältnis p70/p80-Nibrin gewählt. In Vorversuchen wurde die

Kinetik der Transfektion genau charakterisiert, sowohl im Hinblick auf die Menge der entstehenden mRNA, als auch im Hinblick auf die resultierenden Proteinmengen (Abb.3.3.+3.4.).

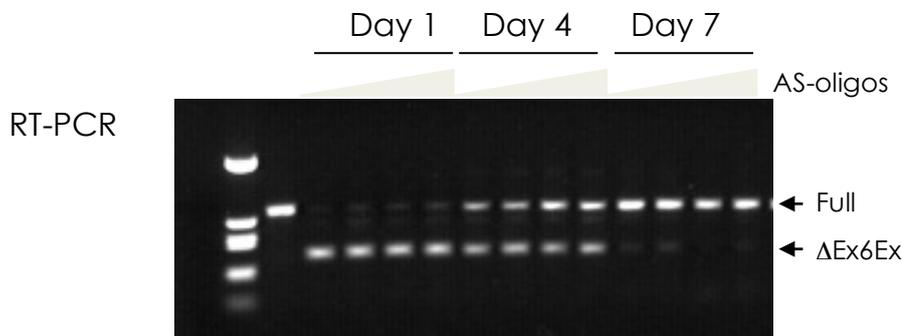


Abb. 3.3.: RT-PCR mit Primern in *NBN* Exon 5 bzw. 10. Die RNA wurde nach angegebener Dauer nach Behandlung mit AON extrahiert und eine reverse Transkription durchgeführt. Das Produkt „full length“ entspricht dem Transkript, welches die Exons 6 und 7 enthält. Das kleinere Produkt entspricht der mRNA ohne Exon 6 und 7.

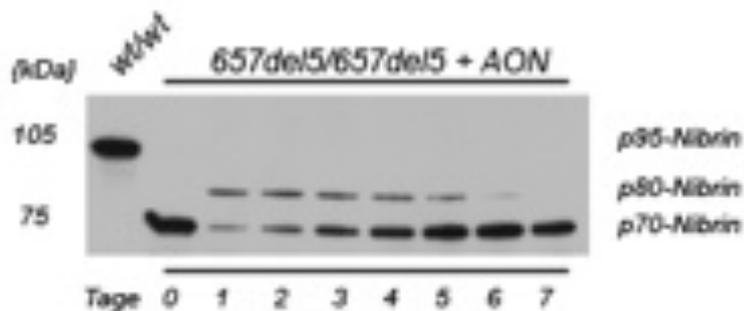


Abb.3.4.: Western-Blot der Proteinlysate aus GSMV-Zellen nach Behandlung mit AON für die jeweils angegebene Dauer. IB mit A-Nibrin-Antikörper und Nachweis des p70- bzw. p80-Nibrins.

Aus den Vorversuchen wird deutlich, dass die Transfektion mit Antisense-Oligonukleotiden zu gezieltem alternativem Splicing führt, so dass vermehrt eine mRNA ohne Exon 6 und 7 ( $\Delta\text{Ex}6+7$ ) entsteht. Die Behandlung führt darüber hinaus zur vermehrten Bildung des Nibrin-Proteins mit der erwarteten Größe von ca. 80 kDa, welches sich im Immunoblot deutlich von dem 70 kDa-Nibrin unterscheiden lässt. Dieses Protein verfügt, wie oben beschrieben und entsprechend dem bei Patientin R.R. identifizierten Protein, sowohl über den Carboxy- als auch über den Aminotermus des Nibrins. Das Ausbleiben der Entstehung dieses Proteins nach Behandlung mit Sense-Oligonukleotiden beweist, dass es sich um einen spezifischen Effekt der Transfektion mit Antisense-Oligonukleotiden handeln muss (siehe Abb. 3.5.).

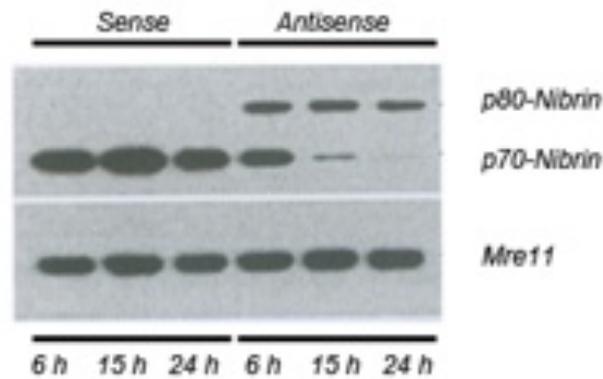


Abb.3.5.: IP aus GMSV-Zellen nach Transfektion mit Antisense- bzw. Sense Oligonukleotiden zu angegebenen Zeitpunkten nach Beginn der Behandlung. IP mit A-Nibrin und A-Mre11 (polyklonale Antikörper) und IB mit A-Nibrin und A-Mre11 (monoklonale Antikörper). Mre11 dient hier als endogene Ladekontrolle.

Aufgrund der beobachteten Kinetik, wurde für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche in der Regel eine Behandlungsdauer von 24 h gewählt, weil dies zu der größtmöglichen Menge an p80-Nibrin führt (siehe Abb. 3.5.). Für bestimmte Fragestellungen und Experimente war jedoch ein ausgeglichenes Verhältnis von p70- und p80-Nibrin erwünscht, so dass in diesem Fall eine Behandlungsdauer von 8 h gewählt wurde, entsprechend dem in der Abbildung 3.5. sichtbaren Verhältnis für diese Behandlungsdauer.

### 3.6. Transiente Doppeltransfektionen zur Interaktionsanalyse

Zur Untersuchung von Proteininteraktionen wurden in kompetenten Zellen transiente Transfektionen unterschiedlicher Konstrukte durchgeführt. Es wurden sowohl HEK293- als auch GMSV (*NBN*<sup>657del5/657del5</sup>)-Zellen in den Experimenten eingesetzt.

Die pCMV Tag2B -Konstrukte kodierten für die Proteine p70-/p80- bzw. p95-Nibrin, die jeweils mit einem FLAG-Tag markiert waren. FLAG-Tags sind rekombinante Polypeptide mit einem Molekulargewicht von 1012 Da, die in diesem Fall aminoterminal eingebaut wurden [136]. Die pCMV Tag3B -Konstrukte kodierten für die Proteine CtIP bzw. MPG, die jeweils aminoterminal mit einem c-myc-Tag markiert waren. Der c-myc-Tag ist ein rekombinantes Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 1202 Da und stellt einen Anteil des Genproduktes des *c-myc*-Gens dar, welches als Onkogen im Zusammenhang mit vielen Tumoren bekannt ist [137]. Hier war das Ziel durch Doppeltransfektion jeweils einer FLAG-markierten Nibrinvariante und eines c-myc-

markierten potentiellen Interaktionspartners, die Proteine in der Zelle anzureichern, eine Co-IP durchzuführen und ggf. eine Interaktion der transient gebildeten Proteine nachzuweisen. Es wurden vor der Transfektion je 10 cm Petrischale jeweils  $3 \times 10^6$  HEK293- bzw. GMSV- Zellen in 6 ml DMEM High-Glucose-Medium ohne Antibiotikazusätze ausplattiert. Nach erfolgter Zelladhäsion wurde der Transfektionsansatz tröpfchenweise auf die Zellen gegeben und die Schalen bei 37°C, 21%O<sub>2</sub>, 5%CO<sub>2</sub> für 24h inkubiert. Die Transfektionsansätze setzten sich für die entsprechenden Experimente dabei wie folgt zusammen (Tag3B= c-myc-Tag; Tag2B= FLAG-Tag):

Doppeltransfektion Nibrin + MPG						
pCMV-Tag3B-	MPG		MPG		MPG	
pCMV-Tag2B-	p70		p80		p95	
DMEM High Glucose <sup>(*)</sup>	545	µl	545	µl	545	µl
Fugene-6	36	µl	36	µl	36	µl
Plasmid-DNA Nibrin [4,5 µg]	9	µl	9	µl	9	µl
Plasmid-DNA MPG [4,5 µg]	10	µl	10	µl	10	µl
Summe	600	µl	600	µl	600	µl

Doppeltransfektion Nibrin + CtIP						
pCMV-Tag3B-	CtIP		CtIP		CtIP	
pCMV-Tag2B-	p70		p80		p95	
DMEM High Glucose <sup>(*)</sup>	543	µl	543	µl	543	µl
Fugene-6	36	µl	36	µl	36	µl
Plasmid-DNA Nibrin [4,5 µg]	9	µl	9	µl	9	µl
Plasmid-DNA CtIP [4,5 µg]	12	µl	12	µl	12	µl
Summe	600	µl	600	µl	600	µl

Transfektion mit Nibrin (eingesetzt im GST-Pulldown mit MDC1-Fragment M3)						
pCMV-Tag2B-	p70		p80		p95	
DMEM High Glucose <sup>(*)</sup>	555	µl	555	µl	555	µl
Fugene-6	36	µl	36	µl	36	µl
Plasmid-DNA Nibrin [4,5 µg]	9	µl	9	µl	9	µl
Summe	600	µl	600	µl	600	µl

Vor Gabe des Transfektionsansatzes auf die Zellen wurden zunächst das FuGene-6 und das High-Glucose-Medium zusammengegeben und für 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach Zugabe der Plasmid-DNA wurde der Ansatz erneut für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, damit sich ein Komplex aus Plasmid und Transfektionsreagenz bilden konnte.

Nach der Inkubation für 24 h erfolgte die Zellernte und Zellzahlbestimmung. Anschließend wurden die Zellen je Ansatz auf 2 Portionen à  $2 \times 10^6$  Zellen verteilt, welche in der Folge für eine Immunpräzipitation aufgearbeitet wurden. Eine dritte Portion à  $1 \times 10^6$  Zellen wurde jeweils für Western-Blot-Analysen aufgearbeitet.

Folgende Immunpräzipitationen und Immunoblot-Nachweise wurden gemäß der oben beschriebenen Methodik mit folgenden Antikörpern durchgeführt:

Doppeltransfektion Nibrin+MPG in HEK293:

a) IP: A-FLAG (F3165)

IB: A-c-myc (MM4439), A-Nibrin (1D7), A-FLAG (F8291)

b) IP: A-c-myc (MM4439) + A-MPG (M10)

IB: A-c-myc (MM4439), A-Nibrin (1D7), A-FLAG (F8291)

Doppeltransfektion Nibrin+CtIP in HEK293:

a) IP: A-FLAG (F3165)

IB: A-c-myc (MM4439), A-Nibrin (1D7), A-FLAG (F8291), A-CtIP (ab70163)

b) IP: A-c-myc (MM4439) + A-CtIP (ab70163)

IB: A-c-myc (MM4439), A-Nibrin (1D7), A-FLAG (F8291)

Doppeltransfektion Nibrin+MPG in GMSV:

IP: A-Nibrin (ab398)

IB: A-c-myc (MM4439), A-Nibrin (1D7), A-FLAG (F8291), A-MPG (M10)

Doppeltransfektion Nibrin+CtIP in GMSV:

IP: A-Nibrin (ab398)

IB: A-c-myc (MM4439), A-Nibrin (1D7), A-Flag (F8291), A-CtIP (ab70163)

Die parallel zur IP aufgetragenen WB-Proteinlysate entsprachen jeweils  $1 \times 10^5$  Zellen.

### 3.7. Herstellung des MDC1-Fusionsproteins M3

Das mit einem GST-Tag markierte Fusionsprotein M3 sollte in Bakterien hergestellt werden, um damit aus nukleären Zellextrakten Nibrin und seine Interaktionspartner zu präzipitieren bzw. zu co-präzipitieren. Dieses besteht aus den Aminosäuren 301-506 des humanen MDC1. Die Fähigkeit der Bindung an Nibrin ist in der Literatur beschrieben, das Plasmid wurde großzügig von C.Spycher (Universität Zürich) zur

Verfügung gestellt [104]. Der verwendete E.coli-Stamm One Shot® BL21 (DE3) verfügt über Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Chloramphenicol sowie über das Gen für T7-RNA-Polymerase. Das verwendete Plasmid (pGEX 4T3-M3) beinhaltet den Vektor pGEX- 4T3 kodierend für das GST-Fusionsprotein M3 mit den Aminosäuren 301-506 des humanen MDC1, welcher hinter dem durch IPTG induzierbarem *tac*-Promoter lokalisiert ist. Ebenso trägt es Resistenzfaktoren gegenüber dem Antibiotikum Ampicillin.

### 3.7.1. Transformation

Zu den aufgetauten Bakterien wurde 1 µl des 1:10 verdünnten Plasmides gegeben, für 30 min auf Eis inkubiert, in der Folge ein Hitzeschock im Wasserbad bei 42°C durchgeführt und die Probe wieder auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 250 µl SOC-Medium und 1 h Inkubation im horizontalen Schüttler bei 37°C wurden die Bakterien auf LM-Platten mit CAM/Amp als Antibiotika ausplattiert. Die am Folgetag selektierten Kolonien wurden erneut über Nacht in SOB- Medium (mit CAM/Amp) bei 37°C inkubiert. Zum Nachweis der erfolgreichen Transformation erfolgte ein Restriktionsverdau einer Plasmid-DNA-Präparation.

### 3.7.2. Plasmid-DNA-Präparation und Restriktionsverdau

Anschließend wurde 1,5 ml der Übernachtskultur aufgearbeitet und bei 6.000 rpm für 10 min zentrifugiert. Danach wurde das Pellet in 100 µl MP I resuspendiert und 10 min auf Eis stehen gelassen. Es wurden zuerst 200 µl MP II, dann 150 µl MP III zugegeben, die Proben gemischt, 15 min auf Eis stehen gelassen und bei 13.000 rpm für 10 min zentrifugiert. Danach folgte die Fällung mit 1 ml 100% Ethanol für 15 min bei Raumtemperatur, Zentrifugation mit 13.000 rpm für 10 min und Trocknen des Pellet. Anschließend erfolgte ein Resuspendieren des Pellets in 200 µl MP IV und eine erneute Fällung mit 500 µl 100% Ethanol für 15 min bei Raumtemperatur. Dann Durchführung einer erneuten Zentrifugation mit 13.000 rpm für 10 min und Trocknen des Pellets bei 37°C. Schließlich wurden die Pellets in jeweils 50µl TE gelöst. Als nächstes wurden die Ansätze für den Restriktionsverdau hergestellt.

#### Zusammensetzung je Ansatz:

- 1µl 10xNEB-Puffer
- 1µl 1mg/ml BSA
- 3U Restriktionsenzym
- H<sub>2</sub>O ad 5 µl

Je 5 µl Plasmid-DNA und 5 µl des oben genannten Mix wurden für 90 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert und nach Zugabe von 3 µl Ladepuffer auf 1%-Agarose Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die erwarteten Produkte nach erfolgreicher Transformation bei Restriktionsverdau mit Pst1 haben Größen von 4200 bp, 1323 bp sowie 219 bp (Pst1 schneidet zweimal im Insert und einmal im Vektor). Die erwarteten Produkte bei erfolgreicher Transformation bei Restriktionsverdau mit EcoR1/Xho 14935bp und 789bp (EcoR1/Xho schneidet das Insert heraus).

### 3.7.3. Induktion

Zwei frische Übernachtskulturen (10 ml SOB + CAM 34 µg/ml + Amp 50 µg/ml) des im Restriktionsverdau verwendeten Klons 4 wurden in jeweils 500 ml SOB (CAM 34 µg/ml + Amp 50 µg/ml) bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 bei 37°C inkubiert. Diese war nach etwa 3h erreicht. Danach Zugabe von 50 µl 0,5 M IPTG (50 µmol/l) zu einer Kultur und Inkubation bei 37°C für weitere 3 h, danach betrug die OD<sub>600</sub> 1,750.

Die zweite Kultur wurde ohne Zugabe von IPTG bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1,750 inkubiert. Dann erfolgte eine Verteilung der Kulturen auf 50 ml Falcon-Tubes und Zentrifugation bei 5000 rpm für 20 min bei 4°C. Die Pellets wurden nach Schockgefrieren in flüssigem N<sub>2</sub> bei -80°C gelagert und jeweils eine Probe des Gesamtextraktes für die Protein-Analytik aliquotiert.

### 3.7.4. Proteinaufarbeitung und -analytik

Nach jeweils zweimal Einfrieren und wieder Auftauen wurden die Proben in E1A-Lysepuffer resuspendiert und anschließend mit dem Sonifizierstab für jeweils 5 und 20 Sekunden sonifiziert. Danach wurden die Proben auf Eppendorfgeläße verteilt und bei 12.500 rpm bei 4°C für 30 min zentrifugiert und die Überstände nach Schockgefrieren in flüssigem N<sub>2</sub> bei -80°C gelagert. Zu den Proben wurden jeweils 1 ml 50% GSH-Sepharose (zuvor dreimal mit ELB und 10.000 rpm für 5 min equilibriert) gegeben und 15 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei 4°C in die Polychromatographiesäule überführt, wobei der Durchlauf aufgefangen und ein Aliquot für Protein-Analytik abgenommen wurde. Es erfolgte ein sechsmaliges Waschen der Beads mit 5ml ELB (letzter ml: Aliquot „Wasch“ für Protein-Analytik). Die Elution des Proteins wurde mit 6x 0,5 ml Glutathion (-20°C) in 6 Fraktionen à 0,5 ml durchgeführt. Schließlich erfolgte die Protein-Analytik der Proteinpräparationen zur Identifikation der Eluate mit der höchsten Proteinmenge. Dazu wurde ein 7% Tris-Acetat Gel verwendet.

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt bei 150 V für 1 h und die Färbung des Gels mit Comassie-Blau für 30 min.

In der Folge wurden die Fraktionen 1-3 bzw. 4-6 zusammengegeben und eine Dialyse gegen Dialysepuffer durch einen Dialyseschlauch für 2 h und über Nacht durchgeführt. (Vorbereitung der Dialyseschläuche: Entleeren, zweimal mit Wasser spülen. Mit Wasser füllen und 1h gegen Wasser dialysieren. Dann mit Dialysepuffer füllen und 1h gegen Dialysepuffer dialysieren.) Anschließend erfolgte eine Proteinbestimmung der Dialysate mittels Bradford-Methode im Tecan Sunrise. Die Dialysate wurden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  in Aliquotierungen mit einer Konzentration von 1 mg/ml eingefroren und gelagert.

### 3.7.5. Phosphorylierung des GST-Fusionsproteins

Damit das Fusionsprotein mit dem Nibrin in den nukleären Zellextrakten interagiert, war zuvor eine spezifische Phosphorylierung der threoninreichen SDT-Repeats durch das Enzym Casein Kinase 2 (CK2) notwendig. Diese Phosphorylierung wurde in folgendem Versuchsaufbau ermöglicht. Der Erfolg der Reaktion konnte anhand des Laufverhaltens des Fusionsproteins in der Gelelektrophorese überprüft werden.

Ansatz für eine Reaktion :

- 5µg Fusionsprotein (Lysat 1-3)
- + 0,2 µl CK2 100U
- + 2,5 µl 10x Reaction Buffer
- +1,25 µl 10mM ATP
- + 16,05 µl steriles Wasser ad 25 µl

Die Proben wurden bei  $30^{\circ}$  für 30 min im Thermoblock bei leichtem Schütteln inkubiert und dann auf Eis gelagert. Die Protein- Analytik zur Überprüfung der Phosphorylierung erfolgte durch gelelektrophoretische Auftrennung der Proben auf einem 4-12% Bis-Tris Gel nach Zugabe von 8,3 µl 4fach Ladepuffer und 3,3 µl Reducing Agent je Probe und 10 min Denaturierung bei  $70^{\circ}\text{C}$ . Die Auftrennung fand bei einer Spannung von 150 V für 1h und die Färbung mit Comassie-Blau für 30 min statt.

### 3.8. GST-Pulldown

Zu den nukleären Extrakten (Volumen 5 -50 µl) wurden jeweils 5 µg des phosphorylierten Fusionsproteins gegeben und der Reaktionsansatz mit PBS auf ein Gesamtvolumen von 500 µl aufgefüllt. Zur Vermeidung einer Dephosphorylierung

wurden NaF 1mM und Beta-Glycerol-phosphat 100 mM ergänzt. Es erfolgte anschließend eine Inkubation bei 4°C unter Rotation für 1 h. In diesem Schritt wurde das GST-markierte Fusionsprotein an das Zielprotein (Nibrin) gebunden. Nach der Reaktion erfolgte die Zugabe von 40 µl 50% GSH-Sepharose (zuvor equilibriert mit 3 x 1 ml PBS, Zentrifugation je 5 min bei 1000 rpm) und eine erneute Inkubation bei 4°C unter Rotation für 1 h. Die Sepharose reagierte in diesem Schritt mit dem GST-Tag des Fusionsproteins im Sinne einer kovalenten Bindung. Danach erfolgte ein dreimaliges Waschen der Proben mit je 1 ml Wasch-Puffer (Zentrifugation bei 12.000 rpm für 1 min bei 4°C und einmalig 5 min Inkubation unter Rotation bei 4°C). Hierdurch wurden nicht an das Fusionsprotein bzw. die GSH-Sepharose gebundene Proteine aus dem Ansatz entfernt. Danach wurde die Sepharose in 25 µl 2x SDS-Ladepuffer aufgenommen, die Proben bei 100°C für 5 min im Wasserbad gekocht und somit die Proteine wieder von der Sepharose abgetrennt.

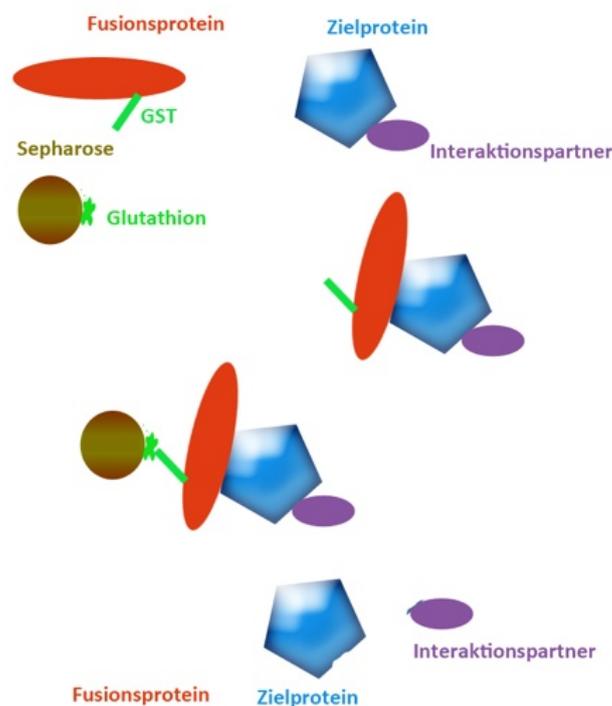


Abb.3.6.: Schematische Darstellung des GST-Pulldowns. Es erfolgt eine Anreicherung des Fusionsproteins, des damit interagierenden Zielproteins (hier Nibrin) sowie dessen Interaktionspartnern (hier z.B. Rad50).

Durch kurzes Abzentrifugieren konnte der Überstand von der Sepharose getrennt und die elektrophoretische Auftrennung der Proteine durchgeführt werden. Im Anschluss erfolgte der Transfer der Proteine mittels Western-Blot auf eine PVDF-Membran und in

der Folge ein spezifischer Nachweis der präzipitierten bzw. co-präzipitierten Proteine im Immunoblot-Verfahren.

### **3.9. Analyse von Proteinwechselwirkungen anhand von quantitativer Massenspektrometrie nach Affinitätsaufreinigung**

Zur Analyse und Identifikation von spezifischen Protein-Protein- Wechselwirkungen (PPI) hat sich eine relativ neue Methode etabliert, in welcher die affinitätsaufgereinigten Proben (z.B. per Immunpräzipitation) quantitativ per Massenspektrometrie analysiert und somit Interaktionspartner identifiziert und quantitativ bestimmt werden (q-AP-MS: „quantitative affinity purification followed by mass-spectrometry“) [138, 139]. Dabei wird ein Kontrollexperiment zur Identifikation von unspezifischen Bindungen durchgeführt und in die Analyse mit einbezogen. Im Kontrollexperiment wird dabei die identische Affinitätsaufreinigung (z.B. Immunpräzipitation) parallel zum eigentlichen Experiment durchgeführt, wobei das Zielprotein in der Probe nicht vorhanden ist (z.B. Nullmutante, Konock-down etc.).

In der anschließenden Analyse werden beide Proben massenspektrometrisch quantitativ verglichen. Um Unterschiede zwischen Experiment und Kontrollexperiment zu quantifizieren, eignet sich unter anderem die Methode des Markierens der Proteine mit stabilen Isotopen (SILAC :„stable isotope labeling by amino acids“). Dabei werden die verwendeten Zellen in Kulturmedium zum Beispiel ohne die Aminosäuren Arginin und Lysin kultiviert, wobei zu den Zellen für das eigentliche Experiment und zu denen für das Kontrollexperiment jeweils die entsprechenden Aminosäuren mit verschiedenen stabilen Kohlenstoff- und Stickstoff- Isotopen hinzugegeben werden („Light-„ bzw. „Heavy“- Arginin/Lysin). Zur besseren Reproduzierbarkeit der Daten wird das Experiment parallel als sogenanntes „label-swap“ – Experiment durchgeführt. Das eigentliche Experiment sowie das Kontrollexperiment werden somit jeweils einmal nach Labeln mit „Heavy“- bzw. „Light“- Aminosäuren durchgeführt. In der massenspektrometrischen Analyse kann dann zwischen den leichten und schweren Isotopen unterschieden und die entsprechenden Proteine den unterschiedlichen Experimenten zugeordnet werden. Dadurch kann auch zwischen spezifischen und unspezifischen Interaktionspartnern differenziert werden. Übertragen auf die Fragestellung des Interaktionspotentials der verschiedenen Nibrin-Proteinvarianten wurden entsprechende Versuche durchgeführt. Die Affinitätsaufreinigung erfolgte per Immunpräzipitation mit einem gegen Nibrin gerichteten polyklonalen Antikörper. Ein erstes Experiment sollte dabei die Interaktionspartner von p95- und p70- Nibrin

vergleichen. Dazu wurden SV-transformierte *NBN*<sup>657del5/657del5</sup>- Zellen, stabil transduziert mit einem für das Wildtyp- Nibrin kodierenden Vektor (+ pLXIN NBS1) sowie als Kontrolle mit einem Leervektor (+ pLXIN) verwendet. Dabei wurden beide Zellreihen jeweils einmal in „Light“- bzw. „Heavy“-Medium kultiviert (im Sinne eines „label-swaps“). Im eigentlichen Experiment ist somit neben dem endogenen p70-Nibrin zusätzlich p95-Nibrin vorhanden, während in der Kontrolle lediglich das endogene p70-Nibrin vorhanden ist.

In einem zweiten Experiment sollte die Interaktionsfähigkeit von p80- und p70-Nibrin verglichen werden, dazu wurden, analog zu den oben beschriebenen Experimenten *NBN*<sup>657del5/657del5</sup>- Zellen eingesetzt und „Light“ bzw. „Heavy“ gelabelt. Anschließend wurde die Lipofektion mit Antisense-Oligonukleotiden wie oben beschrieben für 24 h durchgeführt. Als Kontrollexperiment erfolgte die Lipofektion entsprechend mit Sense-Oligonukleotiden. Erneut wurde das eigentliche Experiment sowie das Kontrollexperiment im Sinne eines Label-swaps jeweils sowohl „heavy“ als auch „light“ markiert durchgeführt. Der Ablauf des Experimentes ist schematisch am Beispiel des Versuches zur Untersuchung der Bindungseigenschaften von p80-Nibrin im Vergleich mit p70-Nibrin in Abbildung 3.9. dargestellt. Als Bedingung zur Durchführung der Experimente musste zunächst die Eignung der verwendeten *NBN*<sup>657del5/657del5</sup>- Zellen zur Markierung mit stabilen Isotopen nachgewiesen werden. Dazu erfolgte eine Kultivierung der Zellen in „Heavy-Medium“ (siehe unten) und nach viermaligem 1:5-Umsetzen die massenspektrometrische Analyse des Proteinlysates. Hier zeigte sich eine Labeling-Effizienz von >94% und eine Arginin zu Prolin-Konversion von < 3%, was die Eignung der GMSV-Zellen für ein Markieren mit den verwendeten Lysin- und Arginin-Isotopen beweist.

### 3.9.1. Markieren per SILAC

Die Kultivierung der verwendeten Zellen fand in folgenden Medien statt:

Dubecco's Modified Eagle's High-Glucose Medium (DMEM) ohne Arginin und Lysin.

- „Light“: + <sup>12</sup>C<sub>6</sub> <sup>14</sup>N<sub>4</sub> L-Arginin und <sup>12</sup>C<sub>6</sub> <sup>14</sup>N<sub>2</sub> L-Lysin.
- „Heavy“: + <sup>13</sup>C<sub>6</sub> <sup>15</sup>N<sub>4</sub> L-Arginin und <sup>13</sup>C<sub>6</sub> <sup>15</sup>N<sub>2</sub> L-Lysin.
- jeweils in Medium mit 10%igem fetalen Kälberserum (FKS) und ohne den Zusatz von Antibiotika.

Zu den stabil transduzierten GMSV-Zellen wurde G418 in einer Konzentration von 50µg/ml zum Medium hinzugegeben. Vor der Durchführung des Experimentes bzw. der

Lipofektion wurden die Zellen fünfmal 1:5 umgesetzt, um einen ausreichenden Einbau der spezifischen Aminosäuren zu gewährleisten. Die Proteinextraktion erfolgte mit IP-Lysepuffer für  $1 \times 10^7$  Zellen je Ansatz und Experiment.

### 3.9.2. Crosslink und Immunpräzipitation

Um bei der massenspektrometrischen Analyse besser verwertbare Daten zu erhalten, ist es erforderlich, den für die Immunpräzipitation verwendeten Antikörper kovalent an die Affinitätsmatrix (z.B. Sepharose-Beads) zu binden, damit dieser nach der Elution nicht in der Probe vorhanden ist und ggf. aufgrund der großen Menge die präzipitierten Proteine bei der Analyse überlagert. Dieser Vorgang wird als „Crosslinking of Antibodies“ bezeichnet. Hier wurde zum „Crosslinken“ N-Hydroxysuccinimide (NHS) -aktivierte Sepharose verwendet, welche über aktivierte Ester mit Aminogruppen zu Amiden reagiert und somit den Antikörper kovalent binden kann. Dazu benötigte Puffer:

#### -Quenching-Puffer

- HCl		1 mM
- NaBorat	pH 9,0	0,2 M
- Ethanolamin	pH 8,0	0,2 M

#### - W1-Waschpuffer:

NaAcetat	pH 5,0	0,1 M
NaCl		0,5 M

#### - W2-Waschpuffer:

Tris	pH 8,0	0,1 M
------	--------	-------

#### - Strigency-Waschpuffer:

Tris	pH 7,5	20 mM
NaCl		300 mM
MgCl <sub>2</sub>		5 mM
Triton X-100		0,3 %

#### - Pre-elution-Puffer:

Tris	pH 7,5	1 mM
NaCl		150 mM
MgCl <sub>2</sub>		5 mM

-U/T- Elutionspuffer:

Harnstoff		6 M
Thioharnstoff		2 M
HEPES	pH 8,0	10 mM

Zunächst wurde die NHS-Sepharose mit 1 mM HCl zur Entfernung des Isopropanols und anschließend mehrmals mit Coupling-Buffer (0,2 M NaBorat pH 9,0) gewaschen. Die Bindung von je 5 µl Antikörper (NB-100-143) pro Ansatz erfolgte in je 30 µl coupling buffer pro Ansatz für 2h bei Raumtemperatur bei 1400 rpm im Thermomixer. Nach Zentrifugation und Entfernen des Überstandes erfolgte die Zugabe von 125 µl 0,2 M Ethanolamin pH 8,0 und Inkubation für 30 min bei 1400 rpm im Thermomixer zur Sättigung freier Bindungsstellen. Nach erneuter Zentrifugation und Entfernen des Überstandes erfolgten Waschschrte mit alternierenden Waschpuffern in folgender Reihenfolge: W1-Waschpuffer (200 µl), W2- Waschpuffer (200 µl), W1-Waschpuffer (200 µl), W2- Waschpuffer (200 µl), IP-Lysepuffer (200 µl). Im nächsten Schritt erfolgte die Zugabe der Proteinlysate zu den an die Sepharose „gecrosslinkten“ Antikörpern sowie eine Inkubation bei 4°C über Nacht zur eigentlichen Immunreaktion. Zuvor wurde je Ansatz eine definierte Menge des Proteinlysates zur Erfolgskontrolle der Immunpräzipitation per Western-Blot aliquotiert („Input“). Nach der Reaktion wurde von dem Überstand ein weiteres Aliquot („Output“) in gleicher Menge aufgenommen. Die Erfolgskontrolle der Immunpräzipitation mit Depletion des Zielproteins (Nibrin) im Aliquot „output“ ist in Abbildung 3.7. exemplarisch in einem Vorversuch mit  $NBN^{wt/wt}$ -Zellen demonstriert.

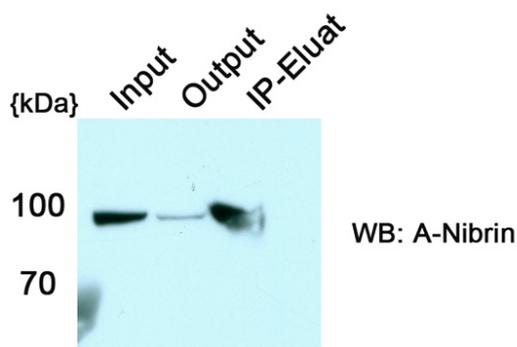


Abb.3.7.: Sichtbare Depletion des Nibrins nach IP mit NHS-gelinktem A-Nibrin Antikörper. Einsatz von  $1 \times 10^6$  LN9SV-Zellen. Elution mit U/T-Puffer. WB mit A-Nibrin 1D7

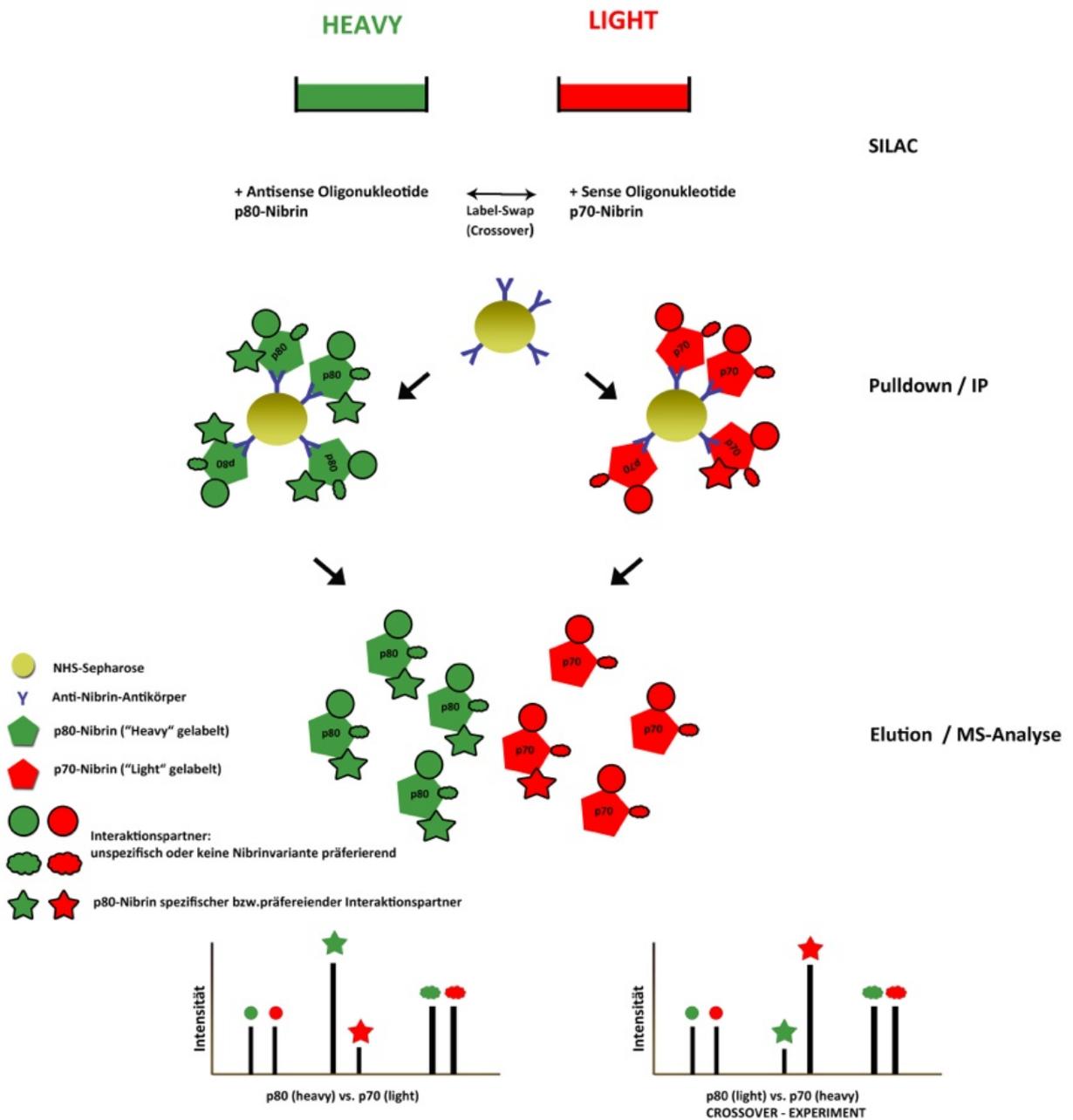


Abb.3.8.: Schematische Darstellung des q-AP-MS-Experimentes zur Charakterisierung des Interaktionspotentials von p80- im Vergleich zum p70-Nibrin. Grüne Farbe repräsentiert hier das Heavy-Medium bzw. entsprechend gelabelte Proteine, rote Farbe dementsprechend das Light-Medium bzw. light-gelabelte Proteine. Im Crossover-Experiment sind Light-/und Heavy-Medium „vertauscht“. Abb. angelehnt an [139].

### **3.9.3. Elution und Analyse**

Nach der Immunpräzipitation erfolgten drei Waschschriffe mit „stringency-Puffer“ und ein Waschschriff mit „pre-elution-Puffer“. Die Elution der Proteine erfolgte in jeweils 25 µl U/T-Elutionspuffer für 15 min bei Raumtemperatur und 1400 rpm im Thermomixer. Anschließend wurden jeweils die Proben des eigentlichen Versuchs mit denen des Kontrollansatzes zusammengegeben (jeweils eine light und eine heavy markierte Zellreihe). Die weitere Aufarbeitung und massenspektrometrischen Analysen wurden dann im Max-Dellbrück-Zentrum für molekulare Medizin in der AG Selbach durchgeführt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Interaktion Nibrin/MDC-1

#### 4.1.1. (Co-) Immunpräzipitation

Im einleitenden Experiment mit Wildtypzellen stellt sich eine unterschiedliche Effektivität der (Co-)Präzipitation von Nibrin durch unterschiedliche Antikörper dar.

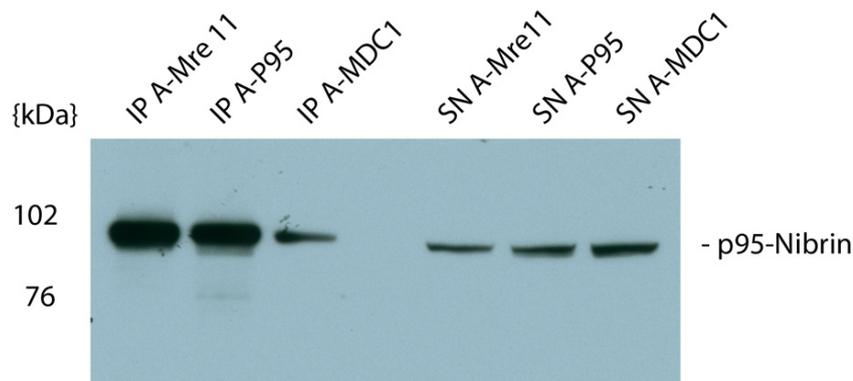


Abb.4.1.: Immunpräzipitation mit angegebenen Antikörpern aus  $5 \times 10^6$   $NBN^{wt/wt}$ - Zellen. SN: Überstände der entsprechenden Ansätze. IB mit A-P95 1D7.

Es wird deutlich, dass, wie erwartet, A-P95 und A-Mre11 als Bestandteile des trimeren MRN-Komplexes Nibrin immun- bzw. co-immunpräzipitieren können. Weiterhin ist auch über das als Interaktionspartner am Aminoterminus des Nibrin beschriebene MDC1 eine Co-Immunpräzipitation möglich. Auffällig ist jedoch, dass keine der drei Präzipitationen sämtliches Nibrin aus der Probe anreichert, sondern immer ein Anteil im Überstand zurückbleibt. Entsprechend der vergleichsweise schwachen Bande bei der Co-IP mit A-MDC1 ist die Bande im zugehörigen Überstand relativ kräftig.

Durch Immunpräzipitation mit A-MDC1 ist es weiterhin möglich, die anderen Bestandteile des MRN-Komplexes, also Mre11 und Rad50, zu co-präzipitieren (Abb.4.2.). Es zeigte sich jedoch eine relativ geringe Bandenstärke im Verhältnis zur Ausgangsmenge (vgl. WCE), was für eine geringe Effektivität der Präzipitation spricht. Die jeweils im IB mit A-MDC1 sichtbaren Begleitbanden stellen unspezifische Signale des zum Nachweis eingesetzten Primärantikörpers dar. Das erwartete Signal liegt dem Molekulargewicht des MDC1 entsprechend bei etwa 225 kDa.

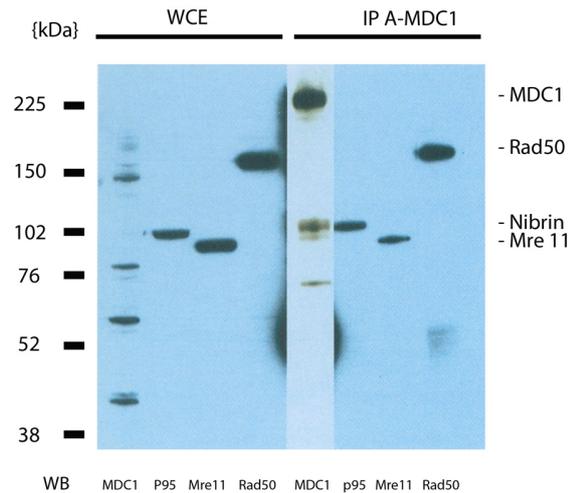


Abb.4.2.: IP mit A-MDC1 (ab11170) aus  $NBN^{wt/wt}$ -Zellen. WCE: Proteinlysat vor IP entsprechend jeweils  $1 \times 10^5$  Zellen, WB: Immunoblot mit entsprechenden Primärantikörpern. IP aus jeweils  $1 \times 10^7$  Zellen.

In Abb.4.3. dargestellte Immunpräzipitationen erfolgten, um das Bindungsverhalten von MDC1 gegenüber dem p70- und p80-Nibrin zu untersuchen. GMSV-Zellen wurden zuvor mit Antisense- bzw. Sense-Oligonukleotiden transfiziert.

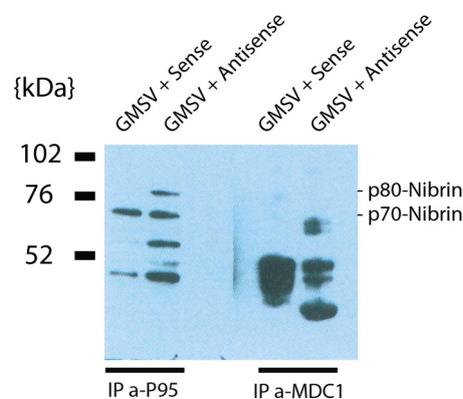


Abb.4.3.: IP mit A-P95 (ab398) und A-MDC1 (ab11170), IB mit A-Nibrin (1D7). Transfektion mit Oligonukleotiden wie gekennzeichnet für jeweils 8 h

Hier zeigte sich zunächst in der IP mit A-P95, dass die Antisense-Behandlung erfolgreich war und das erwartete p80-Nibrin entstanden ist und auch präzipitiert wurde. Weder das p70- noch das p80-Nibrin konnten hingegen in der IP mit A-MDC1 co-präzipitiert werden. Die Begleitbanden mit Molekulargewichten zwischen 40 und 60 kDa werden regelmäßig unspezifisch nach IP mit A-P95 beobachtet. Gleiches gilt für die zahlreichen unspezifischen Begleitbanden nach IP mit A-MDC1.

### 4.1.2. GST-Pulldown

Da die Interaktion MDC1/p80-Nibrin anhand der vorangegangenen Immunpräzipitationen nicht ausreichend beurteilbar war, wurden Pulldown-Experimente mit einem MDC1-Fusionsprotein durchgeführt.

#### 4.1.2.1. Herstellung des Fusionsproteins

Wie beschrieben erfolgte die Transformation des Plasmides in einen E.coli-Stamm. Zum wurde ein Restriktionsverdau, der die zu erwartenden Fragmentgrößen zeigte, durchgeführt (Abb.4.4.).

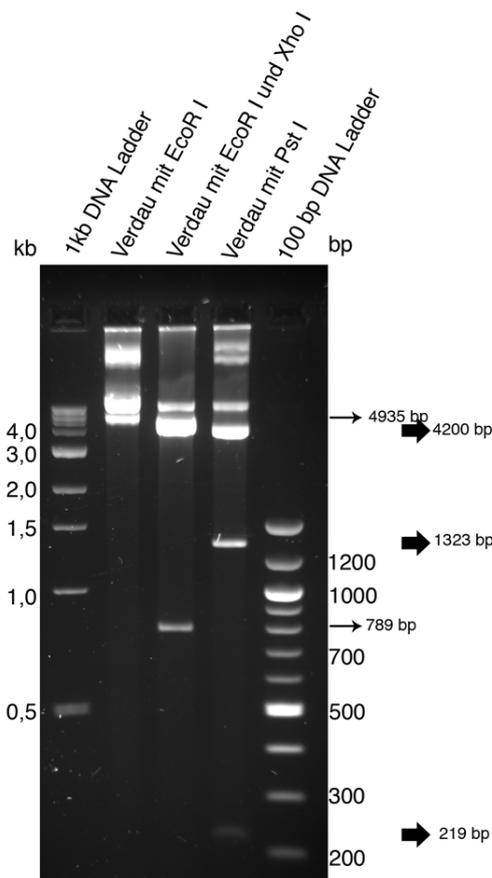


Abb.4.4.: Restriktionsverdau der Kolonie 4. Die erwarteten Fragmentgrößen sind mit dicken Pfeilen für Pst1 und schmalen Pfeilen für EcoR I bzw. Xho I gekennzeichnet.

Es ließen sich die erwarteten Fragmente von 4200, 1323 und 219 bp für den Verdau mit Pst1, bzw. von 4935 und 789 bp für den Verdau mit EcoR I/Xho I nachweisen.

Nach Induktion mit IPTG und beschriebener weiterer Proteinaufarbeitung erfolgte eine Proteinanalytik der gewonnenen Eluate (Abb.4.5.).

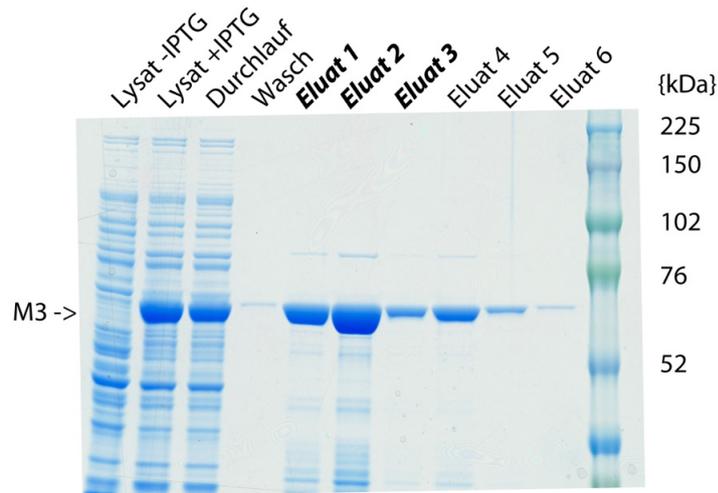


Abb.4.5.: Comassie-Färbung der aufgetragenen Bakterienlysate +/- Induktion mit IPTG sowie der verschiedenen aufgefangenen Elutionsfraktionen. Das Fusionsprotein M3 ist bei erwartetem Molekulargewicht gekennzeichnet.

Hier zeigte sich die erfolgreiche Induktion des GST-Fusionsproteins M3 durch IPTG, welches auf der zu erwartenden Proteingröße von rund 60 kDa als ausgeprägte Bande sichtbar ist. Entsprechend der Stärke der Banden wurden die Elutionsfraktionen 1-3 bzw. 4-6 zusammengefasst und für die weitere Aufarbeitung verwendet. Die erfolgreiche Phosphorylierung des Fusionsproteins durch CK2 kann in der folgenden Abbildung demonstriert werden.

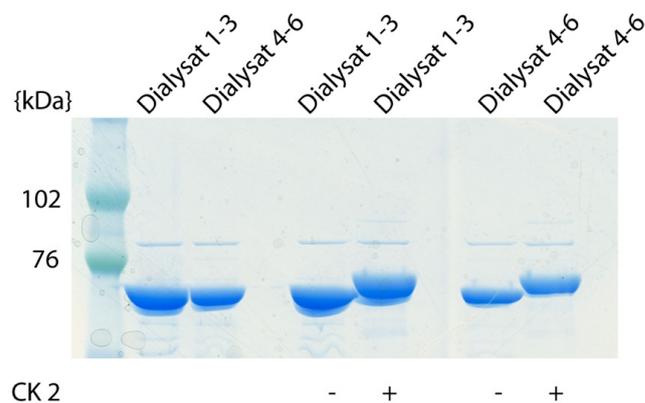


Abb.4.6.: Comassiefärbung des aufgetragenen Fusionsproteins M3, Fraktionen 1-3 bzw. 4-6. CK2: Casein- Kinase 2

Es wird deutlich, dass durch Inkubation mit CK2 das Laufverhalten des Fusionsproteins, entsprechend einer erfolgreichen Phosphorylierung an den drei vorhandenen SDT-Motiven, modifiziert wurde und die Bande einen deutlich sichtbaren Shift im Vergleich zur unphosphorylierten Variante (-CK2) zeigt.

#### 4.1.2.2. GST- Pulldown von p95-Nibrin

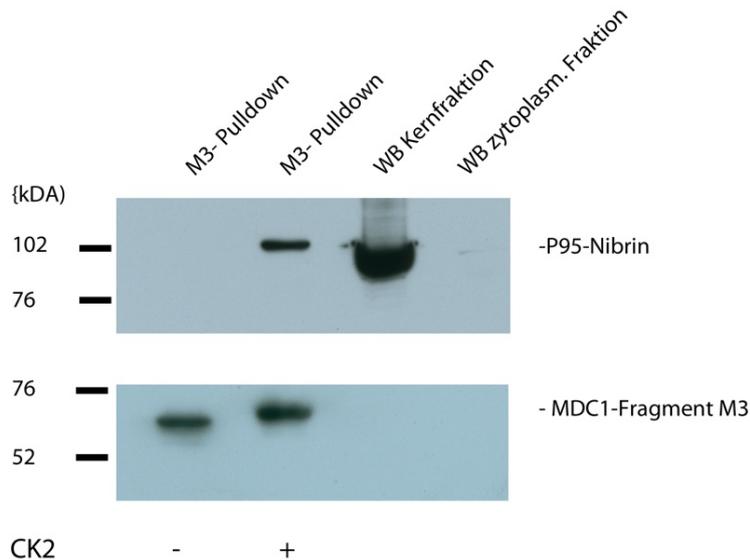


Abb.4.7.: GST-Pulldown aus HEK293-Zellysaten (nukleär) und anschließender Nachweis mit A-p95 (1D7) und A-MDC1 (ab11169). Zum Vergleich wurden gleiche Anteile der Kernfraktion bzw. zytoplasmatischen Fraktionen der verwendeten Zellen aufgetragen.

In Wildtypzellen kann durch das Fusionsprotein M3 Nibrin im Pulldown angereichert werden. Ebenso wird deutlich, dass für die Bindung des Fusionsproteins an Nibrin eine vorherige Phosphorylierung durch CK2 essentiell ist. Diese konnte mit einem gegen MDC1 gerichteten Antikörper nachgewiesen werden. Weiterhin zeigt dieser Versuch durch die Aufarbeitung mit Kernextraktion, dass Nibrin zum überwiegenden Anteil im Zellkern lokalisiert ist (siehe Abb.4.7.).

#### 4.1.2.3. GST-Pulldown von p80-Nibrin

Die Pulldown-Experimente zur Untersuchung der Bindungsfähigkeit des Fusionsproteins M3 hinsichtlich des p80-Nibrins erfolgten nach Transfektion von *NBN*<sup>657del5/657del5</sup>-Zellen mit Antisense-Oligonukleotiden.

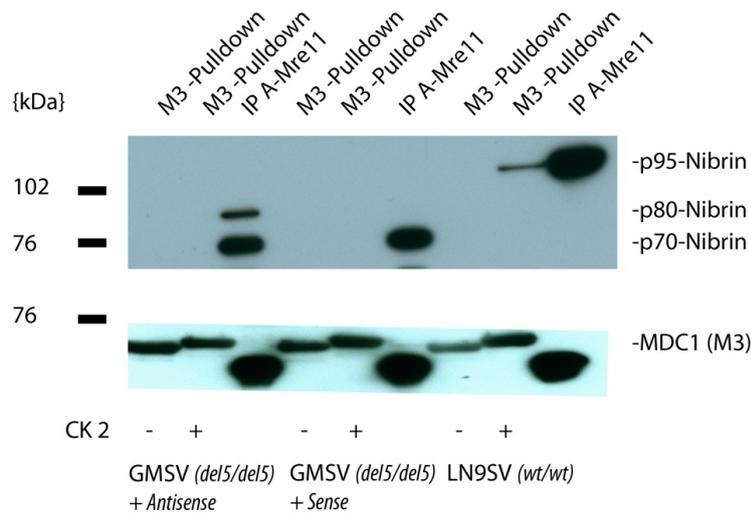


Abb.4.8.: Pulldown aus gekennzeichneten und entsprechend behandelten Zellen. IP mit A-Mre11 (ab397). IB entsprechend Abb.4.7. Transfektion für jeweils 8 h (Genotypen beziehen sich auf *NBN*).

In einem analogen Versuchsansatz erfolgte nach durchgeführtem GST-Pulldown der Nachweis von Rad50 als bekannter Bestandteil des MRN-Komplexes.

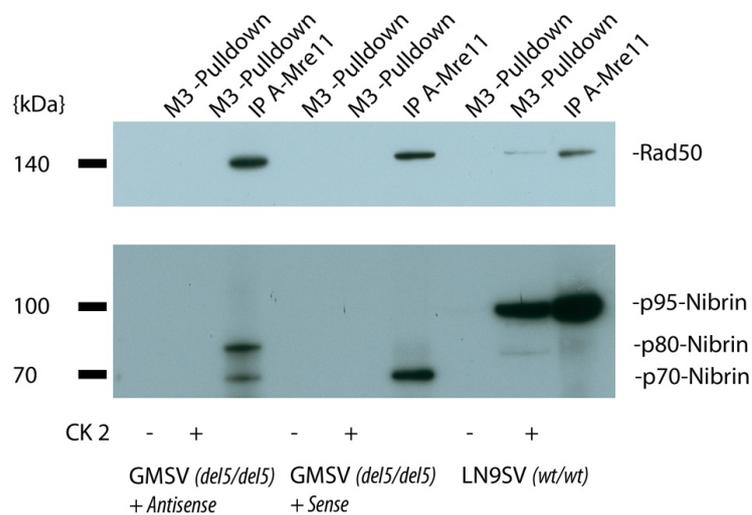


Abb.4.9.: GST-Pulldown und Nachweise mit A-P95 (1D7) bzw. A-Rad50 (ab89). Transfektionen für jeweils 24 h (Genotypen beziehen sich auf *NBN*).

Abermals wird demonstriert, dass die Behandlung mit AON für 8 h im ersten Ansatz bzw. 24 h im zweiten Ansatz zur Bildung von p80-Nibrin führt, wobei die Mengen entsprechend der bekannten Kinetik je nach Behandlungsdauer variieren (siehe

Abb.4.8. + 4.9.). Auch die erfolgreiche Phosphorylierung des Fusionsproteins kann durch direkten Nachweis des geänderten Laufverhaltens der Bande im ersten Versuch sowie indirekt durch erfolgreichen Pulldown in Wildtypzellen werden. In beiden Ansätzen wird deutlich, dass eine Interaktion des MDC1-Fragments nur mit dem Wildtyp-(p95-)Nibrin und nicht mit den beiden Varianten p70- bzw. p80-Nibrin anhand dieser Methode nachgewiesen werden kann. Ein Pulldown von Rad50 im Sinne einer Copräzipitation gelang ebenfalls nur aus Lysaten von *Nbn<sup>wt/wt</sup>*-Zellen (Abb.4.9.).

Ergänzend wurde das Experiment auch mit *NBN<sup>wt/wt</sup>*-(HEK293-) Zellen durchgeführt, die transient mit unterschiedlichen Varianten eines FLAG-markierten Nibrins transfiziert waren.

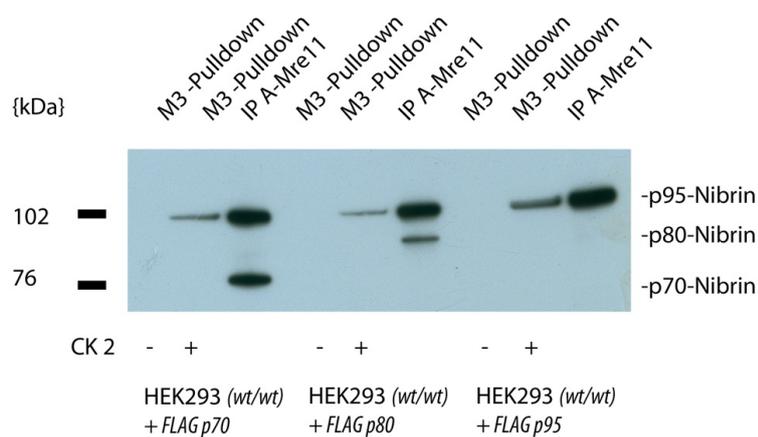


Abb.4.10.: GST-Pulldown bzw. IP aus mit FLAG-markierten Nibrinvarianten transfizierten HEK293-Zellen. Für den Pulldown wurde jeweils Kernextrakt aus  $5 \times 10^6$  Zellen, für die IP aus jeweils  $2 \times 10^6$  Zellen eingesetzt. Nachweis mit A-P95 (1D7).

Hier zeigt sich analog zu den anderen Versuchen, dass das M3-Fusionsprotein jeweils nur das p95-Nibrin bindet (Abb.4.10.). p70- und p80-Nibrin werden wie erwartet jeweils durch A-Mre11 co-präzipitiert. Durch Nachweis mit A-FLAG auf der gleichen Membran konnte ebenso kein p80- bzw. p70-Nibrin im GST-Pulldown detektiert werden (Bild nicht gezeigt).

#### 4.1.2.4. GST-Pulldown von weiteren Nibrinvarianten

Die Interaktion von unterschiedlichen Nibrinvarianten mit MDC1 wurde auch anhand von Pulldown-Experimenten in Lysaten aus lymphoblastoiden Zellen untersucht.

Hier erfolgte der Nachweis der Interaktion des R215W-Nibrins mit MDC1.

In  $NBN^{742-743insGG/742-743insGG}$ -LCL-Lysaten konnte keine Interaktion nachgewiesen werden.

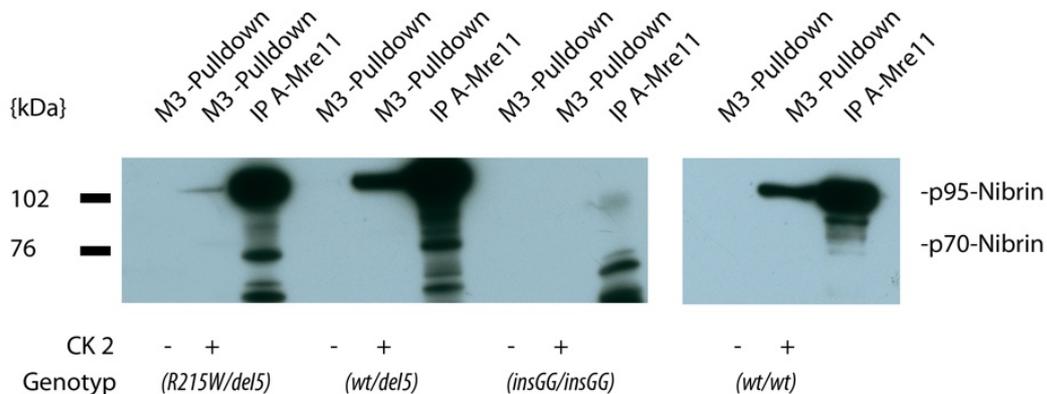


Abb.4.11.: GST-Pulldown aus LCL-Zellen mit dem gekennzeichneten *NBN*-Genotyp. Eingesetzte Zellzahl: Je Pulldown:  $1 \times 10^7$ , je IP:  $2 \times 10^6$ ; IB: A-P95 (1D7).

Es zeigt sich, dass das R215W-Nibrin, welches der sichtbaren Bande bei rund 100 (bzw. 95) kDa entspricht, offensichtlich an das MDC1-Fusionsprotein bindet. Im Vergleich zur für das Wildtypallel heterozygoten Zellreihe erscheint diese Interaktion jedoch eingeschränkt (siehe Abb.4.11.). p80-Nibrin konnte aus den  $NBN^{742-743insGG/742-743insGG}$ -LCL-Lysaten selbst in der Co-IP mit A-Mre11 nicht sicher nachgewiesen werden, sodass im GST-Pulldown hier ebenso kein Nibrin detektierbar ist. Es ist bereits bekannt, dass in diesen Zellen der Nachweis des p80-Nibrins sehr schwierig ist. Die unspezifischen Begleitbanden bei IP mit A-Mre11 werden bei langen Expositionszeiten des Röntgenfilms regelmäßig beobachtet.

Die Verwendung von  $GMSV(NBN^{657del5/657del5})$ -Zellen, die stabil mit unterschiedlichen zusätzlichen *NBN*-Allelen (I171V, R169H, D95N und R215W) transduziert sind, ermöglicht die Untersuchung der Interaktion der zugehörigen Nibrinvarianten mit MDC1 durch einen GST-Pulldown. Die in den folgenden Abbildungen sichtbaren Banden bei 95kDa repräsentieren jeweils jene Nibrinvarianten, die aus den stabil transduzierten zusätzlichen Allelen resultierten.

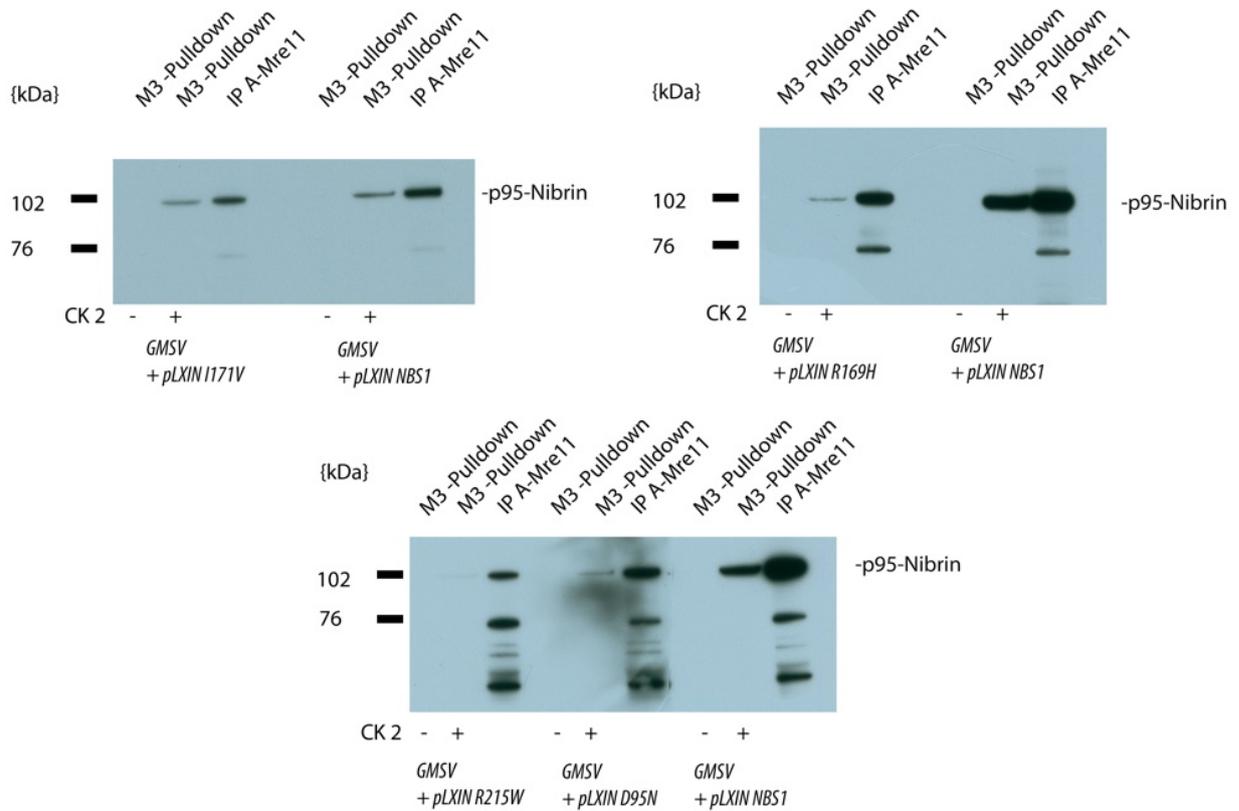


Abb.4.12: GST-Pulldown aus GMSV, die jeweils stabil mit dem jeweils gekennzeichneten Plasmid (NBS1= Wildtypallel) transduziert wurden. Eingesetzte Zellzahl: Je M3-Pulldown:  $1 \times 10^7$ , je IP A-Mre11:  $2 \times 10^6$ ; Nachweis mit A-p95 (1D7).

Im Pulldown mit phosphoryliertem Fusionsprotein zeigte sich bei allen untersuchten Varianten eine Bande entsprechend jeweils des zusätzlich transduzierten Allels. Verglichen mit dem Wildtypallel ist diese jedoch besonders bei den Varianten R215W und D95N sowie R169H deutlich signalschwächer. Entsprechend der vorausgegangenen Versuche ist die Ausbeute des Pulldowns insgesamt schwach im Vergleich zur Co-IP mit dem bekanntem Interaktionspartner Mre11. Dass die schwachen Banden nach Pulldown jeweils unspezifische Verunreinigungen sind, wird durch den spezifischen Nachweis im Experiment mit zuvor phosphoryliertem GST-Fusionsprotein ausgeschlossen. In den IPs mit A-Mre11 zeigten sich erneut eine Reihe unspezifischer Begleitbanden.

#### 4.2. Interaktion Nibrin/ $\gamma$ H2AX

Zur Charakterisierung der Wechselwirkung zwischen der phosphorylierten Histonvariante  $\gamma$ H2AX und Nibrin erfolgten unterschiedliche Co-Immunpräzipitationen.



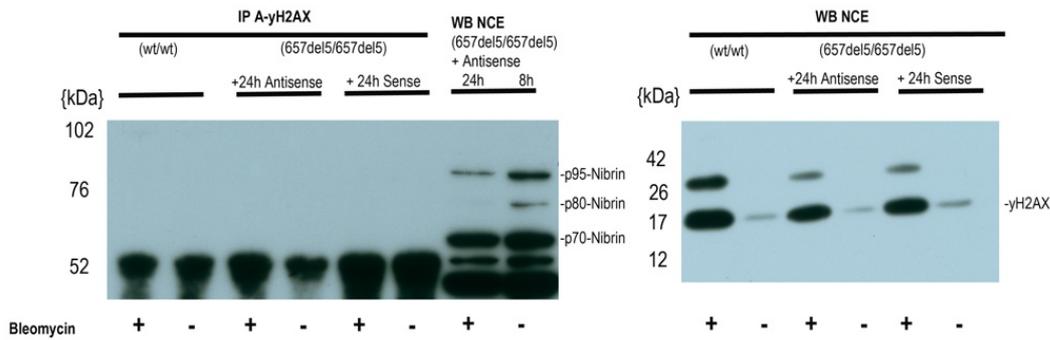


Abb. 4.14.: IP aus jeweils  $5 \times 10^6$  Zellen (NCE= Kernextrakt). WB: Kernextrakt aus je  $1 \times 10^5$  Zellen. Bleomycinexposition  $50 \mu\text{g/ml}$  für 1 h. IP mit A- $\gamma$ H2AX (07-164). IB mit A- $\gamma$ H2AX (2F3) und A-Nibrin (1D7). Transfektion mit Oligonukleotiden für den angegebenen Zeitraum. Aufgrund des stark unterschiedlichen Molekulargewichts von Nibrin und H2AX (15 kDa) sind diese bei guter Auftrennung im Bereich des Nibrins nicht auf einem Gel nachweisbar (links). Daher wurde ein Teil der Proben separat auf einem zweiten Gel aufgetrennt (rechts), um die Bildung von  $\gamma$ H2AX nachzuweisen.

Hier zeigt sich, dass durch die Bleomycinexposition eine Phosphorylierung der Histonvariante H2AX erfolgt und  $\gamma$ H2AX im WB der nukleären Extrakte spezifisch nachweisbar ist. Bei der zweiten Bande bei 26 kDa handelt es sich offensichtlich um ein zweites, infolge der Bleomycinexposition phosphoryliertes Protein, welches ebenfalls von dem verwendeten Antikörper detektiert wird oder aber um H2AX welches an mehreren Stellen phosphoryliert wurde. In der IP ist hier erneut keine Co-IP von Nibrin nachweisbar, auch nicht bei der Wildtypvariante. Zur Orientierung wurden auf dem gleichen Gel Teile der Proben vor IP aufgetragen (linkes Gel, rechte Spuren in Abb.4.14.). Aufgrund dieser Ergebnisse erfolgte der Versuch, die Wechselwirkung über die Co-Präzipitation von  $\gamma$ H2AX in einer IP mit einem gegen Nibrin gerichteten Antikörper genauer zu charakterisieren.

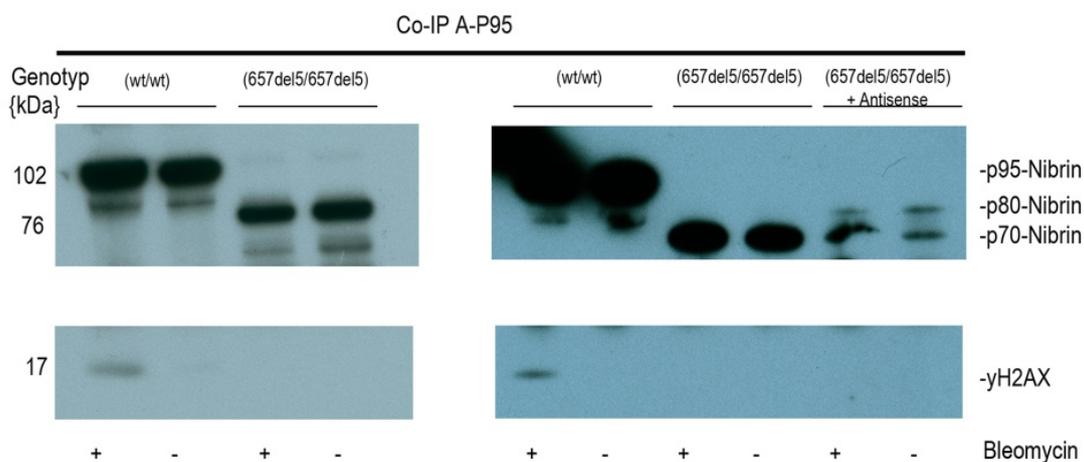


Abb.4.15.: IP aus jeweils  $5 \times 10^6$  Zellen (Kernextrakt). Bleomycinexposition  $50 \mu\text{g/ml}$  für 1 h. IP mit A-Nibrin (ab398). IB mit A- $\gamma$ H2AX (2F3) und A-Nibrin (1D7). Transfektion mit Oligonukleotiden für 24h.

Hier zeigt sich die erfolgreiche Co-IP von  $\gamma$ H2AX in den mit Bleomycin behandelten Wildtypzellen. Wie erwartet findet bei  $Nbn^{657del5/657del5}$ - Zellen keine Copräzipitation von  $\gamma$ H2AX statt. Auch wenn diese nach Transfektion mit AON die 80 kDa Nibrinvariante bilden, lässt sich keine Copräzipitation nachweisen.

Entsprechend des vorausgegangenen Experimentes, wurde die IP mit A-Nibrin in lymphoblastoiden Zellen unterschiedlichen Genotyps durchgeführt:

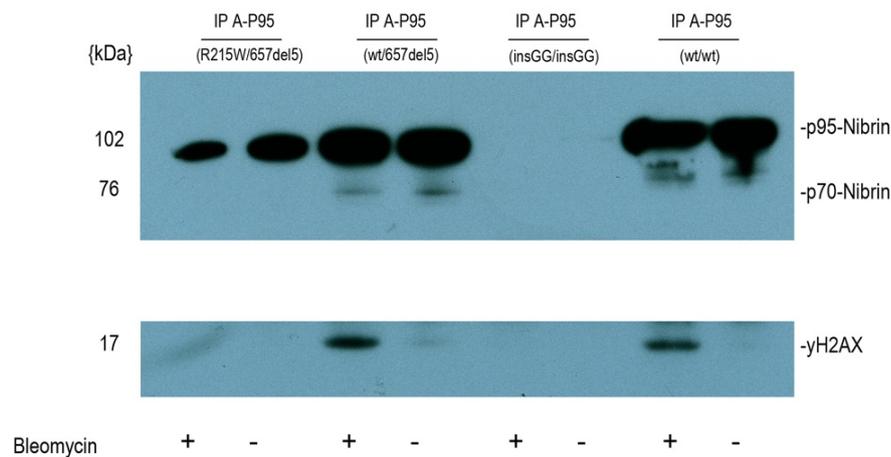


Abb.4.16.: IP aus jeweils  $5 \times 10^6$  LCL-Zellen (Kernextrakt). Bleomycinexposition  $50\mu\text{g/ml}$ : 1h. IP mit A-Nibrin (ab398). IB mit A- $\gamma$ H2AX (2F3) und A-Nibrin (1D7) (Genotypen beziehen sich auf *NBN*).

In sämtlichen Zellreihen, die entsprechend ihres Genotyps das wt-Nibrin bilden, lässt sich eine Co-IP von  $\gamma$ H2AX in den mit Bleomycin behandelten Proben nachweisen (Abb.4.16.). In der für die Mutationen 657del5 und R215W compound-heterozygoten Zellreihe ist keine Interaktion nachweisbar. Bezogen auf die für die insGG-Mutation homozygote Zellreihe, lässt sich über die Interaktion aufgrund des fehlenden Nachweises von Nibrin im Präzipitat keine Aussage treffen.

Zur weiteren Charakterisierung der Interaktion erfolgte das Experiment schließlich auch in mit unterschiedlichen Nibrinvarianten stabil transduzierten  $NBN^{657del5/657del5}$ - SV transformierten Zellen. In diesen Experimenten wird deutlich, dass die Co-IP von  $\gamma$ H2AX zum wiederholten Male nur mit wt-Nibrin nachweisbar ist. Auffallend ist, dass auch bei der Zellreihe, die mit einem für das wt-Nibrin kodierendem Plasmid (+pLXIN NBS1) transduziert wurde, die Wechselwirkung nicht nachweisbar ist (Abb.4.17.).

Die Begleitbanden bei einem Molekulargewicht zwischen 20 und 50 kDa werden regelmäßig bei IPs mit A-Nibrin (ab398) beobachtet.

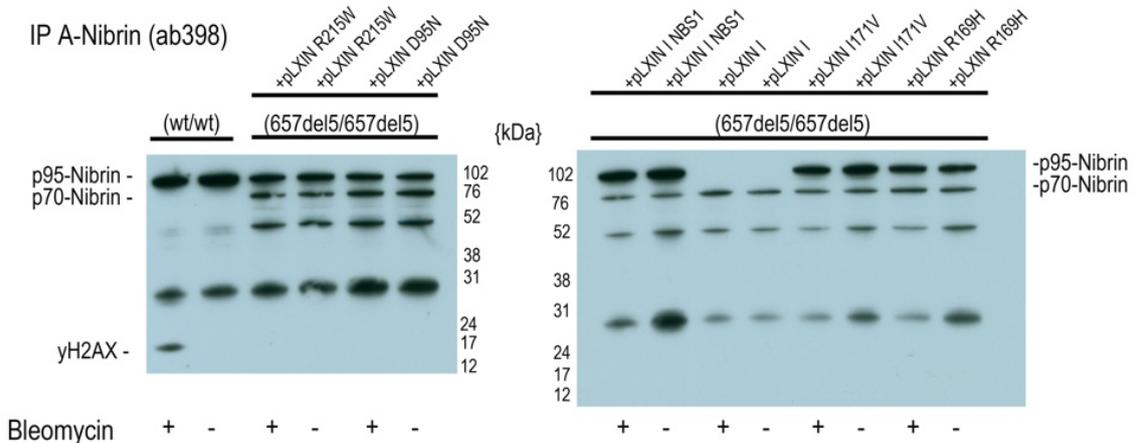


Abb.4.17.: IP aus jeweils 5 x 10<sup>6</sup>-Zellen (Kernextrakt). NBN-Genotypen und transduzierte Plasmide wie angegeben. Bleomycinexposition 50µg/ml: 1h. IP mit A-Nibrin. IB mit A-γH2AX (2F3) und A-Nibrin (1D7).

### 4.3. Interaktion CtIP/Nibrin

Wie in der Einleitung beschrieben, ist auch das Protein CtIP als Interaktionspartner von Nibrin identifiziert worden, wobei an dieser Wechselwirkung offensichtlich der Aminoterminus des Nibrins beteiligt ist. Zur genaueren Charakterisierung der Interaktion, insbesondere mit den unterschiedlichen hypomorphen Varianten des Nibrins, wurden Co-Immünpräzipitationen mit gegen Nibrin bzw. CtIP gerichteten Antikörpern durchgeführt. Dabei erfolgten die Experimente auch in Zellen nach Exposition mit dem DSB induzierenden Bleomycin, unter der Vorstellung, dass dies zu einer Potenzierung der Interaktion und somit besserer Nachweisbarkeit derselben kommt (Abb.4.18.). Mit dem gegen CtIP gerichteten Antikörper gelingt eine Copräzipitation von wt-Nibrin. Dabei scheint die Wechselwirkung nicht abhängig von der Exposition gegenüber Bleomycin bzw. der Induktion von DNA-DSB zu sein.

In *NBN*<sup>657del5/657del5</sup>-Zellen erfolgt offenbar keine Interaktion zwischen dem p70-Nibrin und CtIP. Eine Copräzipitation von p80-Nibrin, welches nach Transfektion mit Antisense-Oligonukleotiden gebildet wird, wie die IP mit A-Nibrin im rechten Teil der Abbildung zeigt, ist hier ebenso wenig nachweisbar. In der Co-IP mit dem gegen Nibrin gerichteten Antikörper ist bei keiner der drei hier untersuchten Nibrinvarianten CtIP im Präzipitat detektierbar (Abb.4.18.). Eine Wechselwirkung von CtIP mit Nibrin ist anhand der hier durchgeführten Methodik also nur für das wt-Protein und für keine der untersuchten hypomorphen Varianten nachweisbar.

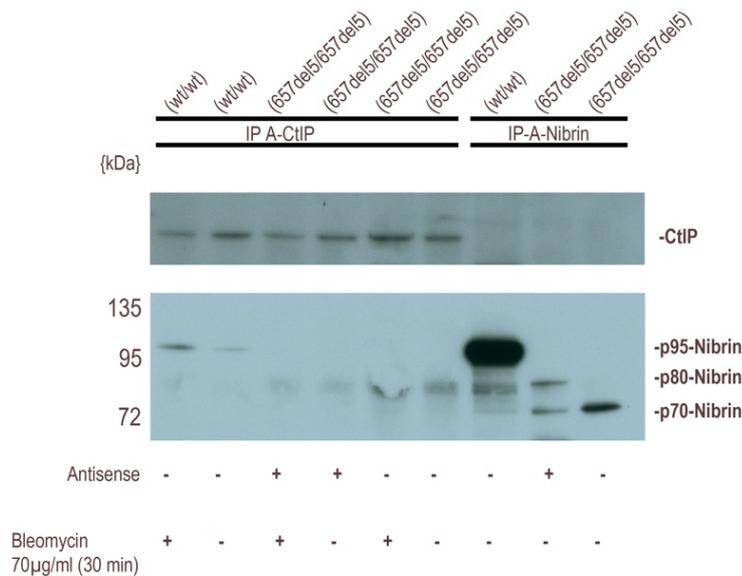


Abb.4.18.: IP aus jeweils  $5 \times 10^6$  Zellen (nukleäre Extrakte). Verwendete Zellreihen sind LN9SV und GSMV. Bleomycinexposition wie angegeben. Transfektion mit Antisense-Oligonukleotiden für 24h. IB mit A-Nibrin (1D7) und A-CtIP (ab70163).

#### 4.4. Interaktionsanalyse mit Hilfe von Doppeltransfektionen

Ziel dieser Versuche war die Charakterisierung der Interaktion von Nibrin, im Speziellen der unterschiedlichen Varianten (p95-, p80- und p70-Nibrin) mit dem bekannten Interaktionspartner CtIP sowie dem Protein MPG (N-methylpurine-DNA Glycosylase).

Vorversuche: Die verwendeten Plasmide zeigten sich in den Vorversuchen als geeignet, die entsprechenden Proteine zu exprimieren. Die Transfektionen wurden dabei entsprechend den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten mit FuGene-6 als Transfektionsreagenz durchgeführt.

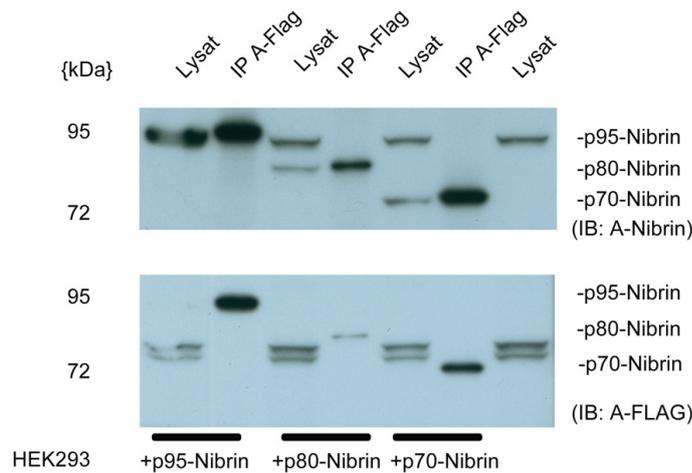


Abb.4.19.: Nachweis der effektiven Transfektion der FLAG-Nibrin-Konstrukte in HEK293-Zellen. Oben: IB mit A-P95 (1D7). Unten: IB mit A-FLAG (M2)

Die mit den unterschiedlichen Nibrin-Konstrukten transfizierten HEK293-Zellen zeigten im Vorversuch im Zelllysat zusätzlich zum endogenen p95-Nibrin ein weiteres Signal auf der entsprechend des eingesetzten Plasmids erwarteten Höhe nach Immundetektion mit dem 1D7-Nibrin-Antikörper. Die Immundetektion mit A-FLAG lieferte im Lysat nur eine unspezifische Doppelbande (vergleiche: untransfizierte HEK293 rechts in Abb.4.19.). In der IP mit A-FLAG konnte nach Immundetektion durch A-FLAG das jeweils erwartete Signal nachgewiesen werden. Das p80- Signal hatte dabei die geringste Intensität. Eine Immundetektion mit A-Nibrin (oben) lieferte dieselben Signale wie im Lysat, es zeigte sich jedoch wie erwartet eine Anreicherung der FLAG-markierten Konstrukte.

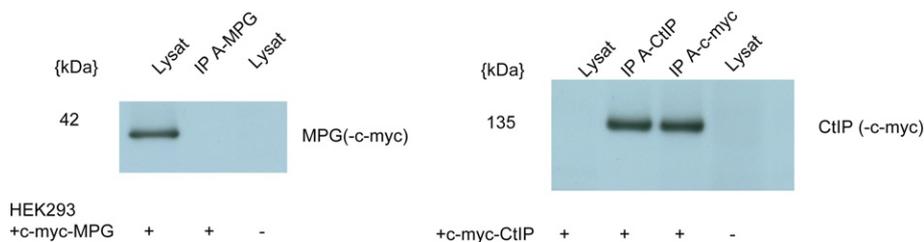


Abb.4.20.: Nachweis der erfolgreichen Transfektion von c-myc-MPG und c-myc-CtIP-Konstrukten.

Die Transfektion der c-myc-markierten potentiellen Interaktionspartner zeigte im Vorversuch eine unterschiedliche Effektivität. Das c-myc-MPG-Konstrukt war lediglich im Lysat nachweisbar. Das c-myc-CtIP-Konstrukt war hingegen nur nach Anreicherung



wurden (Abb.4.22.). Hier war eine Co-Präzipitation des c-myc-markierten CtIP nicht erfolgreich. Ein Nachweis des c-myc-markierten CtIP ist auch im Lysat nicht erfolgt. Schon in den Vorversuchen war dieses nur nach vorheriger IP per IB mit A-cmyc nachweisbar (vgl. Abb.4.19.). Bei der hier im Lysat (WB) im IB mit A-CtIP nachgewiesenen Bande kann nicht unterschieden werden, ob es sich um endogenes oder transfiziertes (bzw. FLAG-markiertes) Protein handelt.

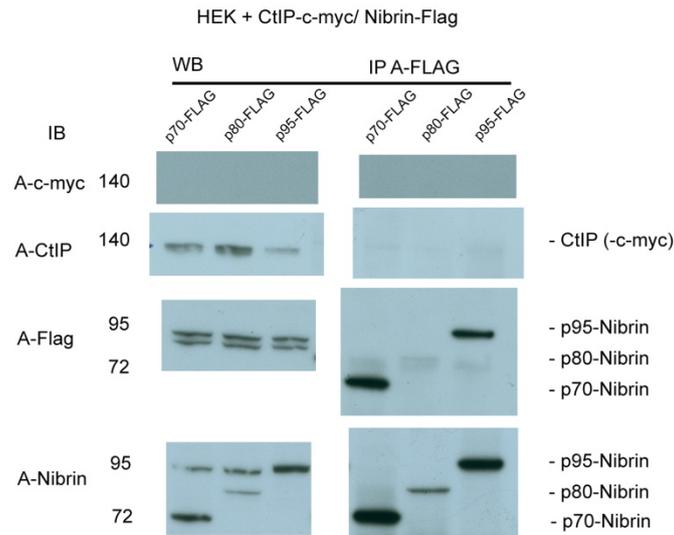


Abb.4.22.: WB von Proteinlysaten und IP mit A-FLAG in HEK293. IB: jeweils zur Immundetektion verwendeter Antikörper. p70/p80/p95-FLAG: jeweils transfizierte Nibrinvariante mit FLAG-Tag.

#### 4.4.2. IP mit A-c-myc in HEK293

Aufgrund der nicht erfolgreichen Co-IP mit A-FLAG, wurde versucht in Lysaten aus denselben Zellen die IP mit einem gegen c-myc gerichteten Antikörper durchzuführen und somit gegebenenfalls die verschiedenen FLAG-markierten Nibrinkonstrukte zu co-präzipitieren. Zur Erhöhung der Ausbeute wurde im IP-Ansatz jeweils zusätzlich ein Antikörper gegen MPG bzw. CtIP eingesetzt. Die im WB der Lysate nachgewiesenen Banden, entsprechen denen in den vorausgegangenen Versuchen. Die erfolgreiche Transfektion der Nibrinkonstrukte wird über Banden mit der zu erwartenden Größe im Immunoblot mit dem A-Nibrin-Antikörper nachgewiesen. Das transfizierte MPG ist mit dem A-cmyc-Antikörper im Proteinlysate detektierbar. In der IP zeigt sich, dass eine Co-IP von keinem der drei Nibrinkonstrukte über Präzipitation des c-myc-markierten MPG erfolgt ist (Abb.4.23.). Ein Nachweis mit A-FLAG (nicht gezeigt) lieferte keine zusätzlichen Erkenntnisse. Die Anreicherung des c-myc-Signals in der IP spricht für eine gute Präzipitation des Zielproteins in diesem Experiment.

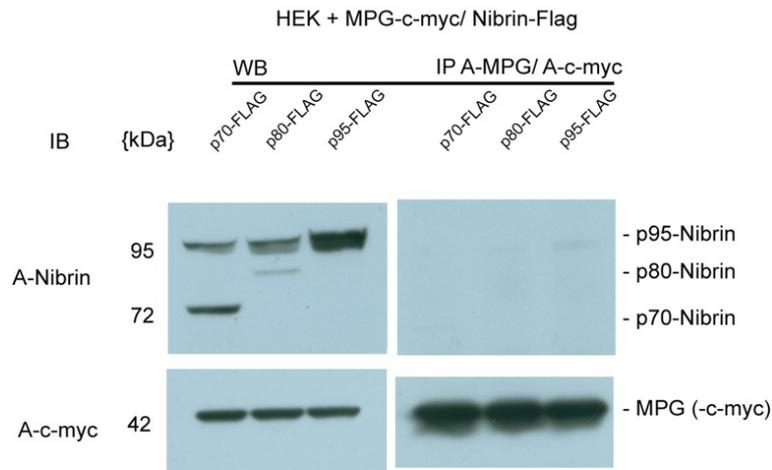


Abb.4:23.: WB aus Proteinlysaten und IP mit A-c-myc + A-MPG in HEK293. IB: jeweils zur Immundetektion verwendeter Antikörper. p70/p80/p95-FLAG: jeweils transfizierte Nibrinvariante mit FLAG-Tag.

Abb. 4.24. stellt die Ergebnisse eines entsprechenden Versuches mit HEK293-Zellen dar, die zuvor mit CtIP und Nibrinvarianten transient transfiziert wurden.

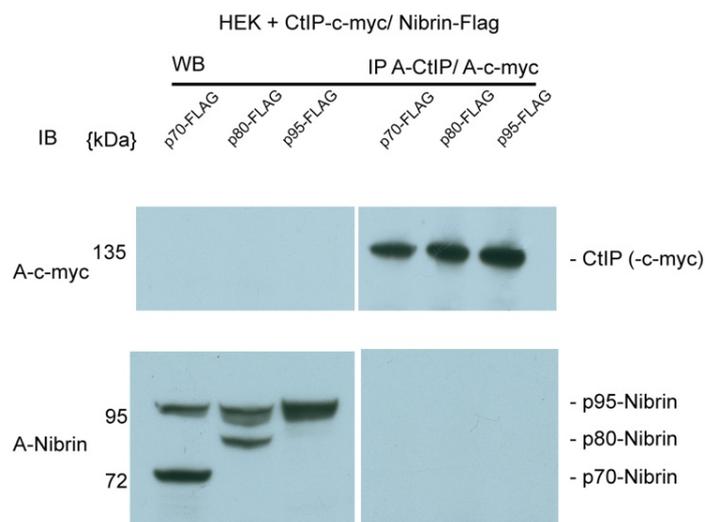


Abb.4:24.: WB aus Proteinlysaten und IP mit A-c-myc + A-CtIP in HEK293. IB: jeweils zur Immundetektion verwendeter Antikörper. p70/p80/p95-FLAG: jeweils transfizierte Nibrinvariante mit FLAG-Tag.

Erneut zeigt sich eine erfolgreiche Transfektion von Nibrin entsprechend der vorausgegangen Abbildungen. Das c-myc-markierte CTIP, ist wie bereits in den Vorversuchen beobachtet (Abb.4.20), erst nach Anreicherung durch IP nachweisbar.

Erneut ist hier eine Co-IP des Nibrins nicht erfolgt, es können weder das (endogene) Wildtyp-Nibrin noch eines der FLAG-markierten Konstrukte nachgewiesen werden (Abb.4.24.).

#### 4.4.3. IP mit A-P95 in GMSV

Mit einem gut etablierten A-Nibrin-Antikörper erfolgten Co-IPs in *NBN*<sup>657del5/657del5</sup>- Zellen (GMSV) nach transients Doppeltransfektion mit FLAG- und c-myc-markierten Konstrukten. In HEK293- Zellen (*NBN*<sup>wt/wt</sup>) wäre bei erfolgreicher CO-IP mit A-Nibrin keine Differenzierung möglich, ob das endogene Nibrin oder das transfizierte Konstrukt an der ggf. nachgewiesenen Interaktion beteiligt ist.

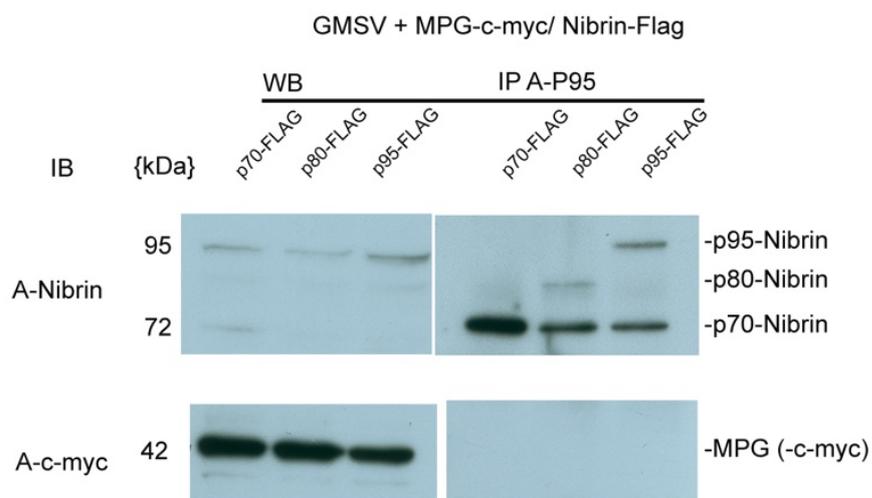


Abb.4:25.: WB aus Proteinlysaten und IP mit A-Nibrin (A-p95) in GMSV (+MPG-c-myc/Nibrin-FLAG). IB: jeweils zur Immundetektion verwendeter Antikörper. p70/p80/p95-FLAG: jeweils transfizierte Nibrinvariante mit FLAG-Tag.

Auch in GMSV-Zellen lässt sich eine erfolgreiche Transfektion von sowohl Nibrin, über den Nachweis von Banden entsprechender Größe als auch von MPG, über den Nachweis des c-myc-markierten Proteins im WB, nachweisen. Es zeigt sich jedoch, dass sich auch in diesem Ansatz keine Interaktion zwischen Nibrin und MPG nachweisbar ist (Abb.4.25.). Nach IP ist per Immundetektion mit dem A-c-myc-Antikörper kein spezifisches Protein nachweisbar. Entsprechend den

vorausgegangen Versuchen lässt sich in den mit Nibrin- und CtIP-Konstrukten transfizierten GSMV-Zellen die erfolgreiche Transfektion zumindest der Nibrinvarianten nachweisen (Abb.4.26.). Zuvor wurde gezeigt, dass das c-myc-CtIP erst nach Anreicherung durch IP im Immunoblot detektierbar ist (Abb.4.20.).

Dieser Nachweis ist hier nicht möglich, was bedeutet, dass keine Co-IP des c-myc-markierten CtIP in der IP mit dem gegen Nibrin gerichteten Antikörper erfolgt ist.

Dabei spielt es keine Rolle, welche Nibrinvariante co-transfiziert wurde.

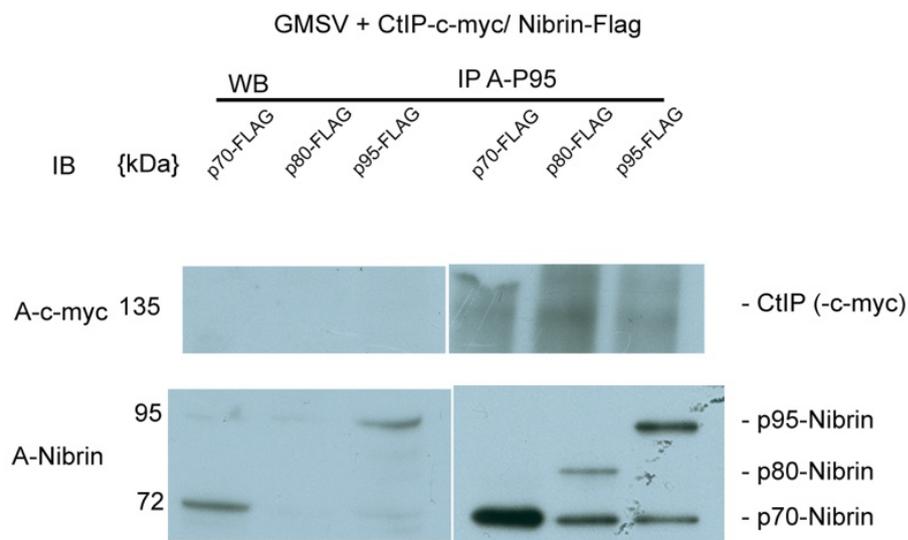


Abb.4:26.: WB und IP mit A-Nibrin (A-p95) in GSMV (+CtIP-c-myc/Nibrin-FLAG). IB: jeweils zur Immundetektion verwendeter Antikörper. p70/p80/p95-FLAG: jeweils transfizierte Nibrinvariante mit FLAG-tag.

#### 4.5. Zelluläre Lokalisation von Mre11

*NBN*<sup>657del5/657del5</sup>-Zellen zeigen in funktionellen Untersuchungen im Vergleich zu *NBN*<sup>wt/wt</sup>-Zellen ein Defizit hinsichtlich der zellulären Lokalisation des Proteins Mre11. Während in Wildtypzellen der überwiegende Anteil des Proteins entsprechend seiner Funktion als ein zentraler Akteur bei der DNA-Reparatur im Zellkern lokalisiert ist, ist bekannt, dass in Nibrin-defizienten Zellen ein erheblicher Teil des Proteins im Cytoplasma nachweisbar ist [140]. Um den Einfluss verschiedener Nibrinvarianten auf die Mre11-Lokalisation zu untersuchen, wurden nukleäre und cytoplasmatische Fraktionen von verschiedenen Zellen mit unterschiedlichen *NBN*-Genotypen mit dem Nuclear Extraction Kit der Firma Cayman Chemicals extrahiert und im Western-Blot hinsichtlich der Lokalisation von Mre11 untersucht.

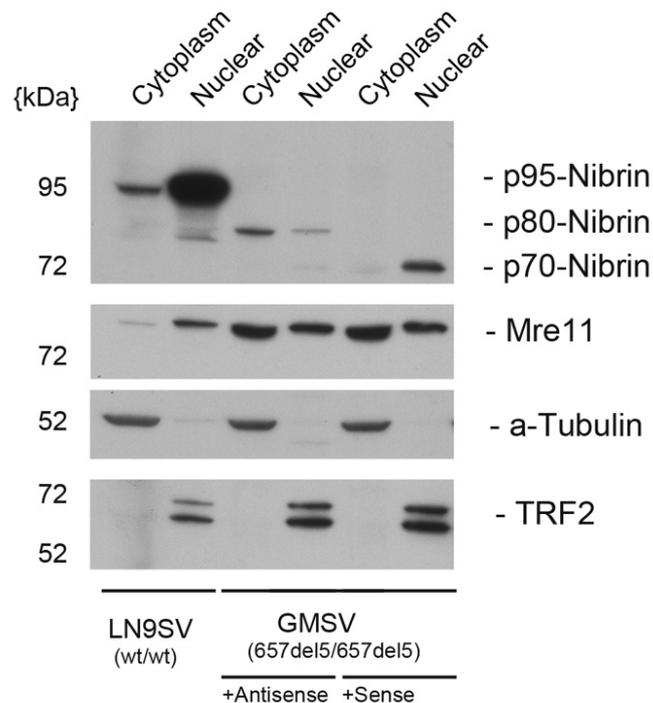


Abb.4.27.: Nukleäre und cytoplasmatische Fraktionen von je  $1,5 \times 10^5$  Zellen. Genotypen beziehen sich auf *NBN*. Transfektion mit Antisense- bzw. Sense-Oligonukleotiden für 24h. IB mit A-Nibrin (1D7), A-Mre11 (12D7), A- $\alpha$ -Tubulin (DM1A) und A-TRF-2 (124-A).

In diesem Experiment ist in der verwendeten Wildtypzellreihe (LN9SV) das Protein Mre11 nahezu ausschließlich im Zellkern lokalisiert. In den *NBN*<sup>657del5/657del5</sup>-Zellen (GMSV) nach Behandlung mit Sense-Oligonukleotiden zeigt sich eine nahezu ausgeglichene Verteilung von Mre11 sowohl im Zellkern als auch im Cytoplasma.

Auch nach Transfektion mit Antisense-Oligonukleotiden, die zur Bildung des p80-Nibrins führt, wie im oberen Teil der Abbildung gezeigt, bleibt diese Verteilung unverändert und es lässt sich keine vermehrte Lokalisation von Mre11 im Zellkern nachweisen. Die nachgewiesenen Proteine TRF-2 (telomeric repeat-binding factor 2) als streng nukleär lokalisiertes Protein, bzw.  $\alpha$ -Tubulin im Cytoplasma, dienen hier als Nachweis für eine erfolgreiche Auftrennung der zellulären Fraktionen. Die Lokalisation von Mre11 wurde im Weiteren auch in den mit unterschiedlichen Nibrinvarianten stabil transduzierten *NBN*<sup>657del5</sup>-Zellen (GMSV) untersucht. Im Western-Blot wurde dabei zunächst die tatsächliche Expression der zusätzlich transduzierten Allele nachgewiesen (Abb.4.28.). Es zeigt sich, dass in jenen *NBN*<sup>657del5/657del5</sup>-Zellen, die ein entsprechendes zusätzliches transduziertes Allel tragen, ein Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 95kDA zusätzlich zum endogenen p70-Nibrin nachweisbar ist

(Abb.4.28.). Dies ist erwartungsgemäß bei den Plasmiden NBS1 (=wt), R169H, I171V, R215W und D95N der Fall. Bei den Zellen, die mit dem Leervektor (+pLXIN), und den Allelen 657del5 bzw. 1142delC transduziert wurden, lässt sich erwartungsgemäß kein p95-Nibrin nachweisen.

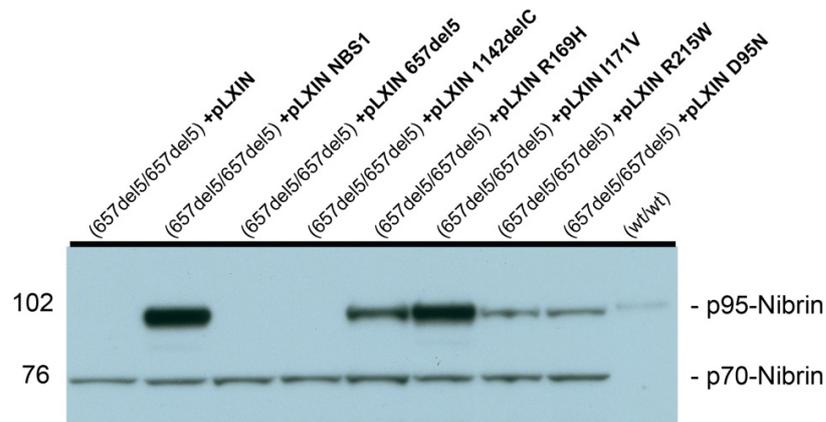


Abb.4.28.: WB aus Proteinlysaten entsprechend je  $1 \times 10^5$  Zellen. Transduzierte zusätzliche *NBN*-Allele sind fett gekennzeichnet. Zellkultivierung in DMEM + G418.

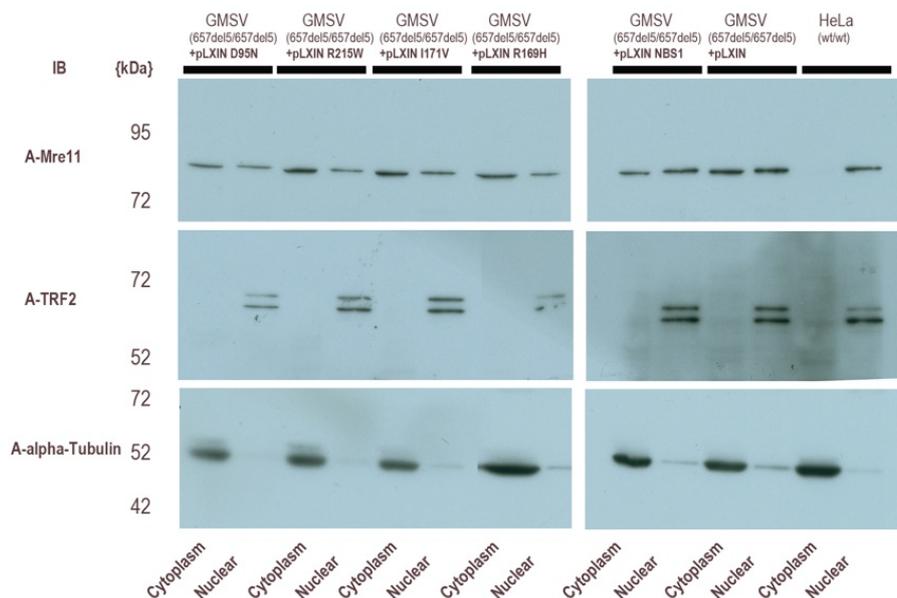


Abb.4.29.: Nukleäre und cytoplasmatische Fraktionen von je  $1,5 \times 10^5$  Zellen. Kultivierung in DMEM+G418. IB mit A-Mre11, A-TRF2 als nukleärer Marker, A-alpha-Tubulin als cytoplasmatischer Marker. Angegebene Genotypen beziehen sich auf *NBN*. IB mit A-Mre11 (12D7), A-a-Tubulin (DM1A) und A-TRF-2 (124-A).

Die selektive Lokalisation von TRF-2 und alpha-Tubulin als nukleäres bzw. cytoplasmatisches Markerprotein beweist die erfolgreiche Auftrennung der entsprechenden Fraktionen (Abb.4.29). Eine nukleäre Lokalisation von Mre11 zeigt sich hier lediglich in den *NBN<sup>wt/wt</sup>*-Zellen (HeLa). Sämtliche zusätzlich transduzierte Allele bzw. wie oben gezeigt zusätzlich exprimierte Proteine in *NBN<sup>657del5/657del5</sup>*-Zellen führen nicht zu einer Veränderung der Mre11-Lokalisation zu Gunsten der nukleären Proteinfraction. Dieser Effekt ist auch nicht bei den mit dem wt-Nibrin (+ pLXIN NBS1) transduzierten Zellen zu beobachten.

#### 4.6. Stabilisierung des p80-Nibrins durch den Proteasominhibitor MG-132

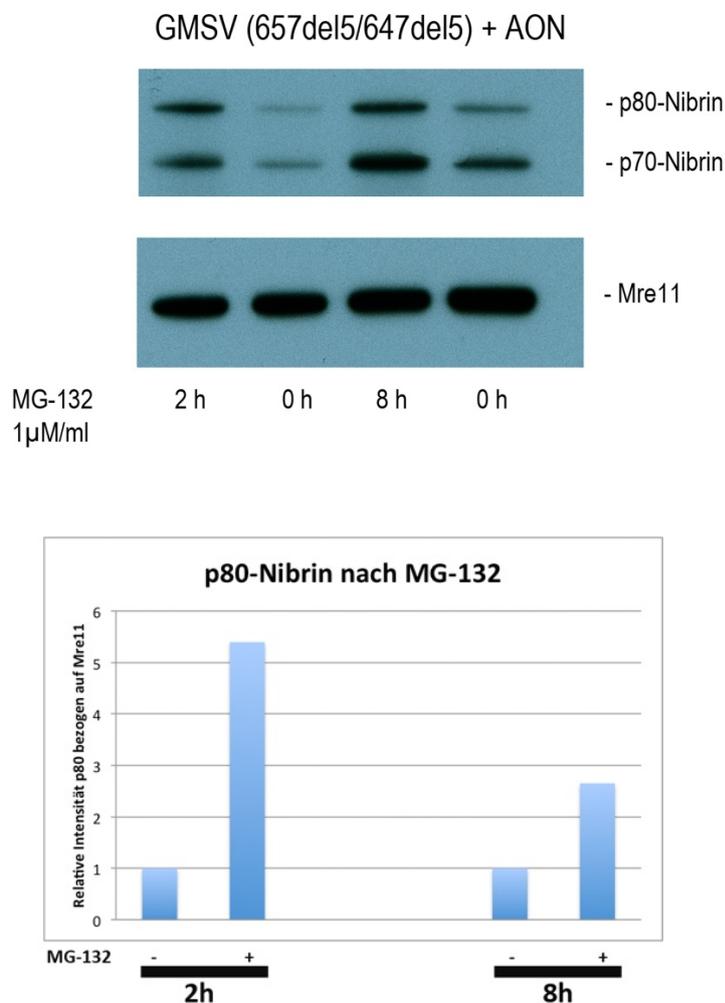


Abb.4.30.: Oben: WB nach IP mit A-p95 + A-Mre11 aus Lysaten von je  $5 \times 10^6$  Zellen. Die Mre11-Bande dient als endogene Kontrolle. Unten: Quantifizierung der Bandenstärken des p80-Signals relativ bezogen auf die Bandenstärke des entsprechenden Mre11-Signals.

Die Zugabe des Proteasominhibitors MG-132 zu  $NBN^{657del5/657del5}$ -Zellen nach Lipofektion mit Antisense-Oligonukleotiden führt in Western-Blot-Analysen zu einer deutlichen Anreicherung des durch die Behandlung entstandenen p80-Nibrins.

Die quantitative Analyse der Bandenstärke mit der Software ImageQuant zeigt bei zweistündiger Expositionsdauer eine Anreicherung um den Faktor 5,4 bzw. um den Faktor 2,3 bei achtstündiger Exposition (jeweils bezogen auf Mre11 als endogene Kontrolle).

#### 4.7. Ergebnisse der quantitativen Massenspektrometrie

##### 4.7.1. p95- vs. p70-Nibrin

In dem Versuch mit stabil transduzierten  $NBN^{657del5/657del5}$ -Zellen (GMSV) zur Analyse der Interaktionsfähigkeit von p95- und p70-Nibrin ergab die Analyse der Immunpräzipitate in folgendem Diagramm dargestelltes Proteinmuster.

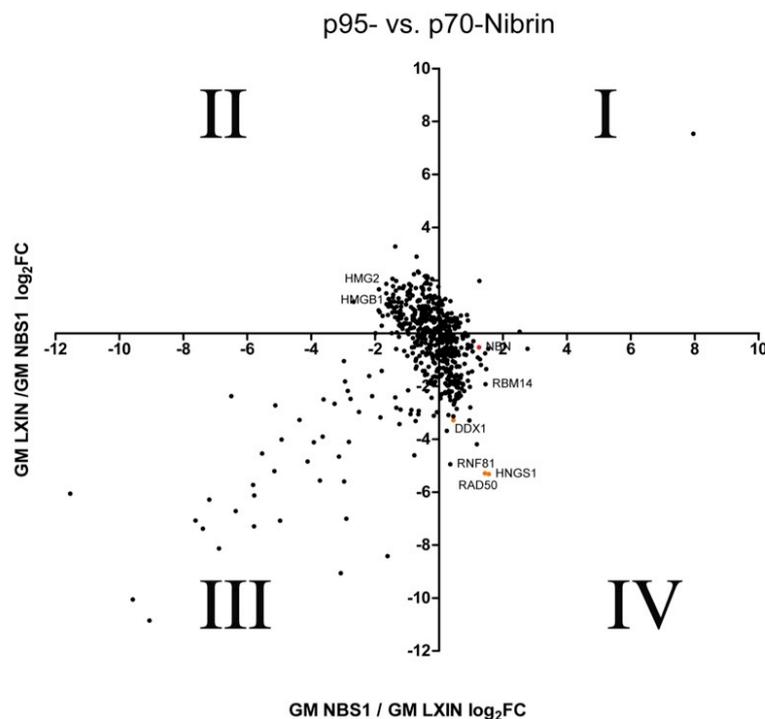


Abb.4.31.: Logarithmische Auftragung der identifizierten Proteine im Experiment „GMSV +pLXIN vs. GMSV +pLXIN NBS1“ (inklusive Crossover-Experiment bzw. label-swap).

In dieser grafischen Darstellung ist der Versuch inklusive des „Crossover-Experiments“ nach „label-swap“ dargestellt. Jeder Punkt repräsentiert dabei ein identifiziertes Protein.

Die Achsen sind logarithmisch angeordnet und haben die Dimension der relativen Zuordnung eines Proteins entsprechend des Einbaus der unterschiedlichen Arginin- und Lysin-Isotope. Positive Werte bedeuten dabei, dass vorrangig die schweren Isotope in der Analyse nachgewiesen wurden. Auf der x-Achse wird der Versuch repräsentiert, in welchem die Zellreihe mit dem stabil transduzierten Wildtypnibrin (+pLXIN NBS1, p95-Nibrin) im „heavy“-Medium und die mit dem Leervektor (+pLXIN, p70-Nibrin) transduzierten Zellen im „light“-Medium kultiviert wurden. Als zweite Dimension ist der umgekehrte Versuch im Sinne eines „label-swaps“ auf der y-Achse aufgetragen, hier wurde die Zellreihe mit dem stabil transduzierten Wildtyp-Nibrin (+pLXIN NBS1, p95-Nibrin) in „light“-Medium und die mit dem Leervektor (+pLXIN, p70-Nibrin) transduzierten Zellen im „heavy“-Medium kultiviert.

Für die Auswertung des Diagramms bedeutet dies, dass sämtliche Spots im rechten unteren Quadranten (IV), solche Proteine repräsentieren, die eher an das Wildtyp-Nibrin (p95-Nibrin) binden. Entsprechend präferieren Proteine die sich im linken oberen Quadranten (II) abbilden, eher das p70-Nibrin. Spots in den beiden anderen Quadranten (I+III) zeigen in beiden Versuchen (also auch nach label-swap) eine Tendenz zu der selben Nibrinvariante, sind somit für die Auswertung zu vernachlässigen und als unspezifische Bindungspartner oder Kontaminationen (z.B. aus dem fetalen Kälberserum) zu werten. Einige gegebenenfalls interessante Proteine, sowie jene mit besonders eindeutiger Präferenz zu einer der beiden Nibrinvarianten, sind in der Abbildung hervorgehoben. Nachfolgende tabellarische Auflistung gibt einen exemplarischen Überblick über weitere unter Umständen relevante identifizierte Proteine.

Proteine, welche das p95-Nibrin präferieren

Gen/Protein	ABS	Swap
Mre11/Mre11 (=HNGS1)	6,8	2
Rad50/Rad50	6,7	2
RPS18/ 40S Ribosomal protein S18	5,4	2
RNF81,TRIM21/ RING finger protein 81, 52 kDA Ro Protein	5,3	2
RPS16/ 40S Ribosomal protein S16	3,7	2
DDX1/ ATP-dependent RNA helicase, DEAD BOX Helicase 1	3,7	2
RBM 14/ Paraspeckle protein 2, RNA-binding motif protein 14	3,7	2
GRHPR / Glyoxylat reductase, Hydroxypyruvat reductase	3,6	2

FBL/ rRNA 2-O-methyltransferase fibrillarin	3,1	2
U2AF2 / Splicing factor U2AF 65 kDa subunit	2,7	2
U2AF1 / Splicing factor U2AF 35 kDa subunit	2,6	2
DDX3 / ATP-dependent RNA helicase , DEAD BOX Polypeptid 3	2,4	2
HISTH2AB / Histone 2A Type B	2,2	2
H2AFO / Histone 2A Type C	2,2	2
NBN / Nibrin	1,7	2
NONO, NRB54 / 54 kDa nuclear RNA- and DNA-binding protein	1,7	2

Proteine, welche das p70-Nibrin präferieren

Gen/Protein	ABS	Swap
LASP1 / LIM and SH3 protein 1	4,6	0
HGM 2B/ high mobility group box 2	3,5	0
TPR / translocated promoter region, nuclear basket protein	3,0	0

Zur Erläuterung der Daten:

- Der Wert „ABS“ ergibt sich aus der absoluten Summe der ermittelten  $\log_2FC$ -Werte von „forward“- und „crossover“- Experimenten. Dabei bedeutet ein positiver  $\log_2FC$ -Wert im „forward“- Experiment (GMSV +pLXIN NBS1 „heavy“ gelabelt), dass dieses Protein eher das p95-Nibrin gegenüber p70-Nibrin präferiert.

Dementsprechend ist ein negativer  $\log_2FC$ -Wert im „crossover“-Experiment (GMSV +pLXIN NBS1 „light“ gelabelt) zu interpretieren. Je höher also der „ABS“-Wert, umso stärker sind die Hinweise, dass das entsprechende Protein eine der beiden - untersuchten Nibrinvarianten präferiert.

- Der Wert „Swap“ zeigt an, ob ein identifiziertes Protein nach „label-swap“, d.h. im „crossover“-Experiment, das Vorzeichen des  $\log_2FC$ -Wert wie erwartet verändert. Der Wert 2 bedeutet hier demnach das eher die p95-Variante präferiert wird, wohingegen der Wert 0 als Hinweis für Präferenz zur p70-Variante zu interpretieren ist. Der Wert 1 bedeutet, dass keine Änderung des Vorzeichen erfolgt und die Werte somit nicht auszuwerten bzw. nicht spezifisch sind.

- Das Zustandekommen der Werte in der Tabelle und des Diagramms lässt sich am Beispiel des hier identifizierten Proteins Mre11 nachvollziehen:  $\log_2FC$  NBS1 heavy: 1,5;  $\log_2FC$  NBS1 light: -5,3; ABS: 6,8; Swap: 2

Es ist auffällig, dass die drei Proteine des MRN-Komplex offensichtlich das Wildtyp-Nibrin präferieren und dabei sogar von allen identifizierten Proteinen die stärkste Tendenz (höchste ABS-Werte) hinsichtlich des p95-Nibrins zeigen. Kritisch zu beurteilen ist hierbei zunächst die Tatsache, dass das Zielprotein (Nibrin) der Immunpräzipitation ebenfalls in Richtung des p95-Nibrins „shiftet“. Diese Beobachtung ist aber hinreichend dadurch erklärt, dass bei der hier erfolgten Auswertung zumindest drei Peptide massenspektrometrisch identifiziert werden, die im p95- nicht aber im p70-Nibrin vorhanden sind. Da die quantitative Bestimmung dieser Peptide in die Gesamtquantifizierung des Nibrins miteingehen, ist der Nibrin-Shift in Richtung p95-Nibrin nicht verwunderlich und hat keinen Einfluss auf die Beurteilung des Verhaltens der andere identifizierten Proteine.

#### 4.7.2. p80- vs. p70-Nibrin

Die massenspektrometrische Analyse des Versuches inklusive cross-over Experiment mit label-swap mit GMSV<sup>657del5/657del5</sup>-Zellen mit anschließender Behandlung mit Antisense- bzw. Sense- Oligonukletiden ergab das im folgenden Diagramm dargestellte Muster identifizierter Proteine. Entsprechend des p95- vs. p70-Nibrin- Versuches repräsentiert jeder Punkt in der Abbildung ein spezifisches identifiziertes Protein. In dieser Darstellung repräsentieren die Spots im rechten unteren Quadranten (IV) des Diagramms solche Proteine, welche eher das p80-Nibrin gegenüber dem p70-Nibrin präferieren. Analog zum oben beschriebenen Experiment sind Proteine welche eher an das p70-Nibrin binden im linken oberen Quadranten (II) zu finden. Im Quadranten I+III bilden sich erneut jene identifizierte Proteine ab, welche im Crossover-Experiment ihre Präferenz nicht verändern und sind somit als unspezifisch oder Kontamination zu interpretieren sind.

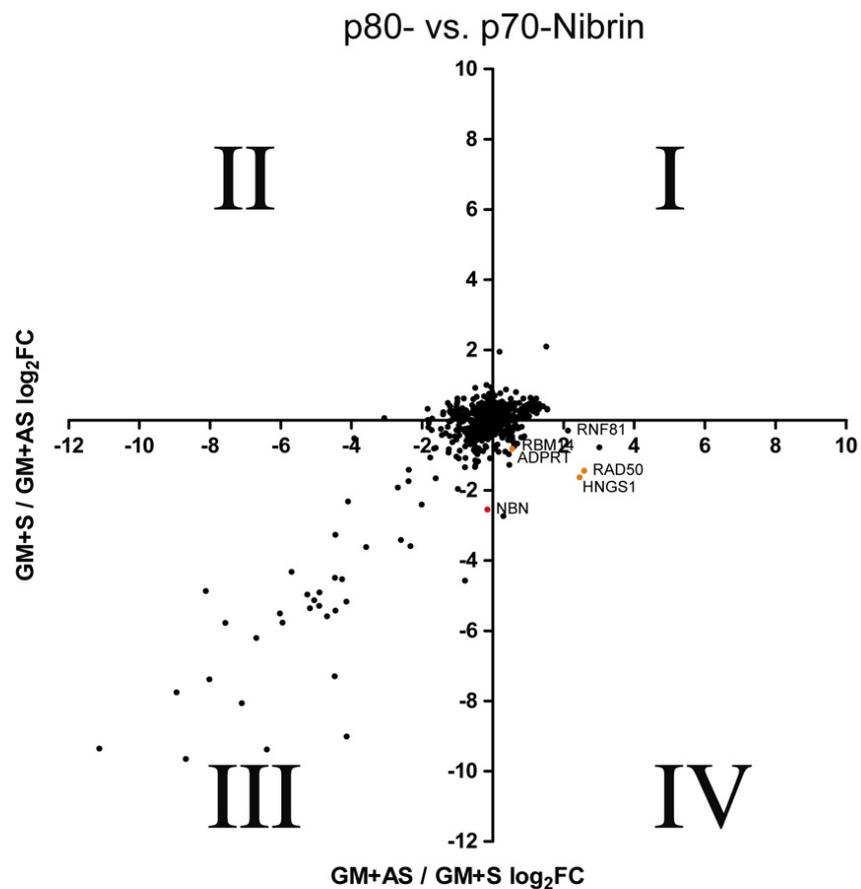


Abb.4.32.: Logarithmische Auftragung der identifizierten Proteine im Experiment „GMSV +AS vs. GMSV + SENSE“ (inklusive Crossover-Experiment bzw. label-swap).

Ergänzend zu den bereits in der Darstellung hervorgehobenen Proteinen folgt ein Auszug der in diesem Versuch identifizierten Proteine mit ggf. interessantem Verteilungsmuster.

Proteine, welche das p80-Nibrin präferieren

Gen/Protein	ABS	Swap
Mre11 /Mre 11 (=HNGS1)	4,1	2
Rad50/ Rad50	4,0	2
IQGAP1 / IQ motif containing GTPase activating protein 1, p195	3,8	2
RNF81,TRIM21/ RING finger protein 81, 52 kDA Ro Protein	2,4	2
PARP1 / poly (ADP-ribose) polymerase 1	1,4	2
SSBP1 / Mitochondrial Single-stranded DNA binding protein 1	1,4	2

RBM 14/ Paraspeckle protein 2, RNA-binding motif protein 14	1,3	2
FBL/ rRNA 2-O-methyltransferase fibrillarin	1,3	2
CBX3 / Chromobox protein homolog 3	1,2	2
DDX3 / ATP-dependent RNA helicase , DEAD BOX 3	1,0	2

Proteine, welche das p70-Nibrin präferieren

Gen/Protein	ABS	Swap
PSMC2 / Proteasom 26S subunit	3,1	0
NDUFA5 / NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha	2,7	0

Auch in diesem Experiment sind die beiden Bestandteile des MRN-Komplex Mre11 und Rad50, die beiden identifizierten Proteine, welche am stärksten in Richtung p80-Nibrin im Vergleich mit dem p70-Nibrin shiften. Bezogen auf Nibrin ist hier anzumerken, dass dieses in diesem Experiment im „crossover“- Experiment im Vergleich zum eigentlichen Versuch keine kongruenten Werte in der Analyse zeigte

(*Nibrin: log<sub>2</sub>FC ASHeavy: -0,15; log<sub>2</sub>FC ASlight: -2,54; ABS: -2,69; Swap: 1*). Das Verhalten im Experiment mit Antisense-Behandlung in heavy gelabelten Zellen ist mit einem log<sub>2</sub>Fc annähernd 0 wie erwartet, der Shift im crossover-Experiment mit Antisense-Behandlung in light gelabelten Zellen mit einem log<sub>2</sub>FC von -2,54 ist aber kritisch zu beurteilen im Hinblick auf die Verwertbarkeit der übrigen Daten. Anzumerken ist hier, dass die zur Identifikation verwendeten Peptidsequenzen anders als bei dem p95- vs. p70-Nibrin-Experiment, ausnahmslos sowohl in der p70- und p80-Variante vorkommen und ein Shift somit hierdurch nicht erklärt werden kann.

#### 4.7.3. Charakterisierung des MRN-Komplexes per Co-IP

Aufgrund der Befunde in den beiden zuvor beschriebenen Experimenten mit auffälliger Verteilung der Proteine Mre11 und Rad50 als Bestandteile des MRN-Komplexes, erfolgten Experimente zur Reproduktion dieser Beobachtung mit *NBN<sup>657del5/657del5</sup>*-Zellen nach AON mit ausgeglichenem Verhältnis an p70/p80-Nibrin.

Dabei sollte gezeigt werden, ob in einer IP mit A-Mre11 oder A-Rad50 mehr p80-Nibrin im Verhältnis zu p70-Nibrin co-präzipitiert, als es in einer direkten IP mit A-Nibrin der Fall ist. Das Verhältnis sich also zu Gunsten des p80-Nibrins verändert, weil dieses vermeintlich stärker an Mre11 bindet.

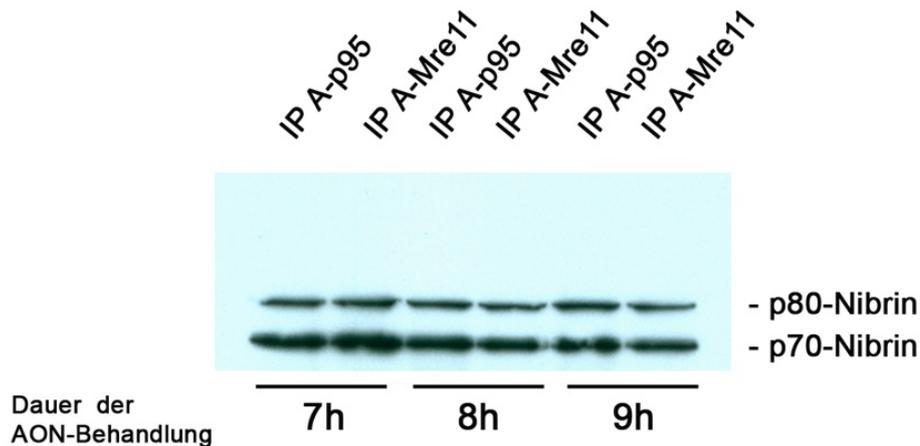


Abb.4.33.: Vergleich IP A-Nibrin (A-p95) und A-Mre11. WB mit A-Nibrin 1D7. IP aus jeweils  $3 \times 10^6$  Zellen. Transfektion mit AON für angegebene Dauer.

Hier sind keine Unterschiede in der Bandenstärke des p80-Nibrins in der IP mit A-p95 (A-Nibrin) und A-Mre11 zu erkennen. Das Verhältnis p70/p80-Nibrin ist unabhängig von der AON-Behandlungsdauer in jeweils beiden Immunpräzipitaten annähernd 1:1.

## 5. Diskussion

### 5.1. Interaktion Nibrin/MDC1 – Grenzen der eingesetzten Methoden

Zur Charakterisierung der Wechselwirkung von Nibrin beziehungsweise unterschiedlicher hypomorpher Varianten mit MDC1 erfolgten diverse Versuche. Zunächst sollte die Co-Immunpräzipitation von Nibrin mit einem gegen MDC1 gerichteten Antikörper aus Proteinlysaten unterschiedlicher Zellen versucht werden.

Eine spezifische Co-Präzipitation von wt-Nibrin gelang mit Hilfe dieses Antikörpers, die Ausbeute der Präzipitation war aber verhältnismäßig gering. Dazu betrachte man in Abb.4.1. die Unterschiede in den Nibrin-Bandenstärken nach IP mit A-MDC1 im Gegensatz zu der Signalstärke nach IP mit gegen Bestandteile des MRN-Komplexes gerichteten Antikörpern (A-Mre11, A-p95). Entsprechend der unterschiedlichen Menge an co-präzipitierten Nibrin ist auch das Nibrin-Signal im Überstand nach IP mit A-MDC1 vergleichsweise stark (Abb.4.1.). Die Spezifität der Co-Präzipitation von wt-Nibrin durch A-MDC1 wird durch die Tatsache bestätigt, dass p70-Nibrin (aufgrund der

Proteinstruktur erwartungsgemäß) nicht co-präzipitiert wird. Außerdem ist die Co-Präzipitation von Rad50 und Mre11 als weitere Bestandteile des MRN-Komplexes bei *NBN<sup>wt/wt</sup>*-Zellen nachweisbar (Abb.4.2.). Als Erklärung für die geringe Ausbeute der IP mit A-MDC1 ist zum einen eine sterische Behinderung oder Verlegung der für die Interaktion mit Nibrin wichtigen Regionen des MDC1 durch den Antikörper möglich, bzw. eine Behinderung der Antikörperbindung durch interagierendes Nibrin vorstellbar. Zum Anderen kann die Tatsache der beobachteten Unterschiede in der Ausbeute der verschiedenen Co-IPs darin begründet sein, dass ein deutlich größerer Anteil des zellulär vorhandenen Nibrins im MRN-Komplex gebunden ist als der mit MDC1 in Abwesenheit von spezifischem zellulärem Stress interagierende Nibrinanteil. Als alternatives Experiment wäre eine Co-IP mit einem gegen Nibrin gerichteten Antikörper zum Nachweis von MDC1 im Präzipitat denkbar. Dies war in *NBN<sup>wt/wt</sup>*-Zellen jedoch nicht erfolgreich (hier nicht gezeigt). In Anbetracht der daraus resultierenden Mengenproblematik bei der Charakterisierung dieser Interaktion in Zellen, welche andere Nibrinvarianten exprimieren, die erfahrungsgemäß in niedrigerer Konzentration verfügbar sind, wurde als weitere Methode ein GST-Pulldown mit einem dafür hergestellten MDC1-Fusionsprotein durchgeführt. Die Interaktion von Fusionsprotein (MDC1-Fragment) und Nibrin erfolgte dabei extrazellulär und das Fusionsprotein steht im Überschuss für die Bindung von Nibrin zur Verfügung, wodurch die Problematik des nur geringen mit MDC1 interagierenden Nibrin-Anteils vernachlässigt werden kann. Ebenso spielt hier eine sterische Hinderung der Antikörperbindung bzw. der Interaktion mit Nibrin durch erstere keine Rolle. Durch den GST-Pulldown kann eine Interaktion des MDC1-Fusionsproteins mit wt-Nibrin nachgewiesen werden, ebenso kann Rad50 als weiterer Bestandteil des MRN-Komplexes präzipitiert werden (siehe Abb.4.7.-4.9.). Die Spezifität des Pulldowns wird durch die Abhängigkeit der Wechselwirkung vom Phosphorylierungsstatus des Fusionsproteins und den Einsatz von unphosphoryliertem Fusionsprotein als Negativkontrolle untermauert. Die Ausbeute des GST-Pulldowns scheint im Vergleich zur Co-IP mit A-MDC1 besser zu sein und eine Mengenproblematik in diesem Versuchsaufbau vor allem aufgrund oben genannter Überlegungen eine deutlich geringere Rolle zu spielen. Nichtsdestotrotz ist auffällig, dass das Nibrin-Signal nach Co-IP mit A-Mre11 (Positivkontrolle) deutlich stärker als jenes nach Pulldown mit phosphoryliertem MDC1-Fragment ist (Abb.4.7.).

### 5.1.1. p80-Nibrin/MDC1

Im Mittelpunkt des Interesse der hier durchgeführten Versuchsreihen steht das Interaktionspotential des p80-Nibrins im Vergleich zum Wildtyp- (p95-)Nibrin und hypomorphen p70-Nibrin. Die Interaktion Nibrin/MDC1 wird über die funktionell wichtigen Domänen am Aminoterminus des Nibrins vermittelt. Daher kommt das p80-Nibrin im Gegensatz zum p70-Nibrin, welches durch ein kryptisches Startcodon entsteht und somit keinen Aminoterminus aufweist, potentiell als Interaktionspartner des MDC1 in Frage. Es erscheint aus dieser Überlegung möglich, dass hierin eine funktionelle Überlegenheit des p80-Nibrins gegenüber der p70-Variante besteht und diese ggf. mit dem für *NBN*<sup>742-743insGG/742-743insGG</sup>-Patienten beschriebenen Phänotyp korreliert. Aufgrund der etablierten Methode das p80-Nibrin durch Transfektion mit spezifischen AON in *NBN*<sup>657del5/657del5</sup>-Zellen anzureichern bzw. zu exprimieren, sind für die Versuche günstige methodische Grundlagen geschaffen. Außerdem besteht in der potentiell denkbaren perspektivischen Nutzbarkeit dieser Methodik als Therapiestrategie, ein besonderer Reiz in der Charakterisierung der residualen Proteinfunktion des p80-Nibrins im Allgemeinen und der Interaktion mit MDC1 im Speziellen. Elegant an dieser Methode ist auch, dass durch eine Transfektion mit Sense-Oligonukleotiden eine Negativkontrolle mit identischem genetischen Hintergrund eingesetzt werden kann. Per Co-IP mit A-MDC1 ließ sich keine Interaktion von p80-Nibrin mit MDC1 nachweisen. Aufgrund der auch für wt-Nibrin relativ schwachen Ausbeute dieser Co-Präzipitation, ist hier eine Mengenproblematik offensichtlich und aufgrund der im Vergleich zum wt-Nibrin in diesen Versuchen deutlich geringeren verfügbaren Proteinmenge an p80-Nibrin, ein Vorhandensein dieser Interaktion nicht auszuschließen (Abb.4.3.). Auch im GST-Pulldown aus *NBN*<sup>657del5/675del5</sup>-Zellen nach AON-Behandlung konnte keine Interaktion von p80-Nibrin mit MDC1 (bzw. dem Fragment M3) nachgewiesen werden (Abb.4.8. und 4.9.). Ebenso war ein Nachweis der Interaktion auch nach transienter Transfektion von HEK-Zellen mit einem Allel für p80-Nibrin und anschließendem GST-Pulldown nicht nachweisbar (vgl. Abb.4.10.). Hierbei muss eine Disruption der Interaktion durch den aminoterminal vorhandenen FLAG-Tag des Nibrins diskutiert werden, da dieser nahe an den funktionell wichtigen FHA/BRCT-Domänen lokalisiert ist. Dass eine Interaktion von p80-Nibrin mit MDC1 auch aufgrund von dessen Proteinstruktur verhindert werden könnte, ist in die Interpretation der hier gewonnenen Ergebnisse miteinzubeziehen. Wie erwähnt ist über die räumliche Struktur des Nibrins nicht viel bekannt, so dass es im Bereich der Spekulation liegt,

inwieweit die beim p80-Nibrin vorhandene interne Deletion von 104 Aminosäuren die Tertiär- und Quartärstruktur des Proteins modifiziert und diese Veränderungen die Bindungsmodi beeinflussen. Aufgrund der Nähe der Deletion zum Aminoterminus des Proteins und somit zu den für genannte Interaktion wichtigen Domänen, ist es gut vorstellbar, dass alleine durch Änderungen der dreidimensionalen Struktur oder Faltung des Proteins sterische Behinderungen der Wechselwirkungen verursacht werden könnten. Die Identifikation einer 2. BRCT-Domäne, zunächst in xNibrin (*xenopus laevis*) und die Übertragung, dass diese aufgrund der hohen Konservierung funktionell wichtiger Aminosäuren in dem Bereich auch im humanen Nibrin vorhanden ist, müssen in die Interpretation und Diskussion der Interaktion von p80-Nibrin mit MDC1 miteinbezogen werden [54, 110]. Stellt man die Nibrinvarianten p80 und p95 gegenüber, so wird deutlich, dass das p80-Nibrin nicht über jene 2. BRCT Domäne verfügt (siehe Abb.5.1.).

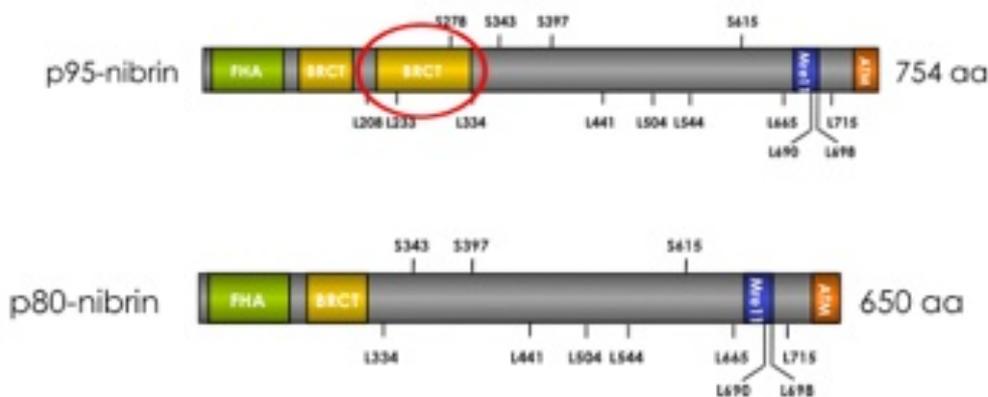


Abb.5.1.: Proteinstruktur und funktionell wichtige Domänen des p80- und p95-Nibrin.

Die genauere Charakterisierung der Interaktion der am Aminoterminus lokalisierten Domänen des Nibrins mit MDC1 ist Gegenstand diverser Publikationen. So ist beschrieben, dass der Aminosäureaustausch R28A am Beginn der FHA-Domäne die Wechselwirkung verhindert. [104, 105, 108, 141] In weiteren Experimente mit den Nibrin-Veränderungen K160M (innerhalb der BRCT-Domäne) und H45A (innerhalb der FHA-Domäne) lässt sich die Wechselwirkung mit MDC1 nicht nachweisen [108]. Die Lokalisation der genannten Aminosäureveränderungen ist in Abb.5.2. unten skizziert. In anderen Experimenten mit rekombinanten Proteinen ist für R28A- und K160M-Nibrin eine residuale Bindungsfähigkeit gegenüber MDC1 beschrieben. Eine Variante, die

beide Aminosäureaustausche zugleich beinhaltet, hebt diese Fähigkeit jedoch völlig auf. Sobald man humane Zellen mit entsprechenden Varianten untersucht, reicht hingegen eine isolierte Mutation aus, um die Nachweisbarkeit der Interaktion aufzuheben [142]. Diese Beschreibungen weisen auf eine essentielle Bedeutung eines unveränderten Aminoterminus des Nibrins für die Interaktion mit MDC1 hin. In diesem Zusammenhang sind Pulldown-Experimente in humanen Zellen nach Co-Transfektion von Nibrinvarianten mit unterschiedlichen internen Deletionen und wt-MDC1 beschrieben. Diese zeigen, dass eine Interaktion nicht nachweisbar ist, sobald die interne Deletion entweder einen Teil der FHA oder eine der beiden BRCT-Domänen miteinbezieht [109]. Unter Berücksichtigung dieser (teilweise nach Beginn der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche veröffentlichten) Daten, erscheint die fehlende Nachweisbarkeit einer Interaktion von p80-Nibrin mit MDC1 nachvollziehbar. Offensichtlich ist für die Interaktion eine unversehrte FHA- und Tandem-BRCT- Struktur unverzichtbar. Da die zweite BRCT-Domäne innerhalb der im p80-Nibrin vorhandenen internen Deletion von 104 Aminosäuren lokalisiert ist (Abb.5.1.), ist der für MDC1/Nibrin postulierte FHA/BRCT2-Bindungsmodus durch das p80-Nibrin nicht zu realisieren.

### 5.1.2. MDC1/ Missense-Nibrin

Aufgrund der im vorausgehenden Abschnitt erwähnten Untersuchungen zur Nibrin/MDC1-Interaktion bei Nibrinvarianten mit Aminosäureveränderungen in den funktionellen aminoterminalen Domänen (R28A, K160M), sind die hier durchgeführten Experimente mit aus Missense-Mutationen resultierenden Nibrinvarianten interessant. Wie aus der Abbildung 5.2. ersichtlich, sind diese Veränderungen sowohl in der FHA als auch in der BRCT-Domäne lokalisiert.

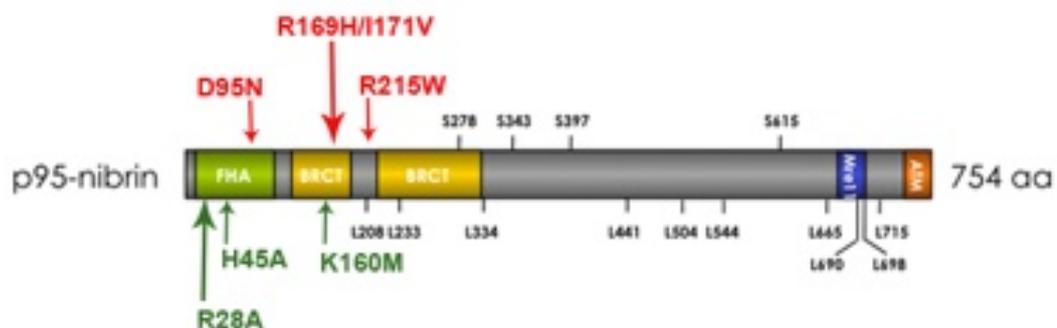


Abb.5.2.: Schematische Darstellung der Proteinstruktur des p95-Nibrins mit wichtigen funktionellen Domänen. Die Lokalisationen hier untersuchter Missensemutationen sind oben rot gekennzeichnet. In der Literatur beschriebene Aminosäureveränderungen mit Einfluss auf die Interaktion Nibrin/MDC1 sind unten in grün gekennzeichnet.

Der GST-Pulldown aus Proteinlysaten von mit unterschiedlichen Nibrinvarianten stabil transduzierten *NBN*<sup>657del5/657del5</sup>-Zellen zeigt, dass eine Interaktion zwar in allen Fällen spezifisch mit phosphoryliertem MDC1-Fragment nachweisbar ist, diese jedoch im Vergleich zur Interaktion von wt-Nibrin jeweils schwächer ausgeprägt ist (siehe Abb.4.12.). Dies trifft vor allem auf die Varianten D95N, R169H und R215W zu. Die Variante D95N ist funktionell am ehesten mit den in den erwähnten Veröffentlichungen verwendeten Varianten R28A und H45A zu vergleichen.

Während für diese Variante mit Ausnahme einer Publikation [142] eine komplette Aufhebung der Interaktion beschrieben ist, konnte hier gezeigt werden, dass D95N über ein gewisses residuales Interaktionspotential gegenüber MDC1 verfügt. Der Austausch von Asparaginsäure (D) als polare saure Aminosäure gegen das unpolare neutrale Asparagin (N) an Position 95 scheint also weniger gravierend in Bezug auf die Wechselwirkung zu sein als der Austausch von dem jeweils polaren basischen Arginin (R) in Position 28 oder Histidin (H) in Position 45 gegen das neutrale unpolare Alanin (A). Dies könnte die für D95N beobachtete residuale Interaktion mit MDC1 erklären. Die vermeintlich eingeschränkte Bindungsfähigkeit untermauert jedoch die Bedeutung der FHA-Domäne für die Wechselwirkung mit MDC1. Dementsprechend können die in der BRCT1-Domäne lokalisierten Veränderungen R169H und I171V mit der in den Publikationen untersuchten Variante K160M funktionell verglichen werden. Auch hier ist in beiden Fällen, anders als für K160M beschrieben, eine residuale Interaktion mit MDC1 im GST-Pulldown nachweisbar. Der Austausch im Falle von R169H betrifft das basische polare Arginin (R) gegen das ebenfalls basische polare Histidin (H). Histidin verfügt aber im Gegensatz zu Arginin über eine aromatische Struktur in der Seitenkette, was die relativ starke Beeinträchtigung der Interaktion erklären könnte (Abb.4.12.). Bei der Variante I171V wird unpolares neutrales Isoleucin (I) gegen ebenfalls unpolares neutrales Valin (V) ausgetauscht. Die beiden Seitenketten sind sich strukturell und in den chemischen Eigenschaften sehr ähnlich, was also die im GST-Pulldown beobachtete vergleichsweise geringe Beeinträchtigung der Wechselwirkung begründen könnte (Abb.4.12.). Im Vergleich dazu erfolgt bei der Variante K160M ein Austausch von zwei chemisch weniger ähnlichen Aminosäuren: Lysin (K) ist basisch und polar, wohingegen Methionin (M) neutral und unpolar ist. Es ist also nachvollziehbar, dass dieser Austausch einen größeren Einfluss auf die Interaktionsfähigkeit der resultierenden Nibrinvariante mit MDC1 hat.

Für Nibrin mit dem Aminosäureaustausch R215W wurden hier zum einen Versuche mit stabil transduzierten  $NBN^{657del5/657del5}$ -Zellen als auch mit compound heterozygoten  $NBN^{R215W/657del5}$ -Patienten LCLs durchgeführt. In beiden Fällen konnte eine Interaktion mit dem MDC1-Fragment nachgewiesen werden (Abb. 4.11.-12.).

Auch hierbei scheint die Bindung aufgrund der geringeren Bandenstärke im WB deutlich vermindert im Vergleich zum wt-Nibrin bzw. dem Signal der heterozygoten LCLs zu sein. Zum einen könnte dies daran liegen, dass der Austausch des stark basischen, polaren und eine aliphatische Seitenkette beinhaltenden Arginins (R) gegen das neutrale, unpolare und eine aromatische Seitenkette beinhaltende Tryptophan (W) zwei chemisch sehr verschiedene Aminosäurereste miteinbezieht und somit die Eigenschaften des Proteins an dieser Position deutlich verändert. Zum anderen liegt die Position 215 zwar hinter der 1. BRCT-Domäne, aber genau innerhalb einer Verbindungsregion zwischen der ersten und zweiten BRCT-Domäne (Abb.5.2.). Solche Regionen sind auch für andere Tandem-BRCT-Domänen tragende Proteine beschrieben (MDC1, BRCA1) [110]. Im Falle des Nibrins beinhaltet diese Region 24 Aminosäuren und es ist denkbar, dass die Veränderung R215W die Anordnung der beiden BRCT-Domänen modifiziert und somit die Fähigkeit phosphorylierte Interaktionspartner zu binden beeinträchtigt.

Weiterhin wird beschrieben, dass der Aminosäureaustausch R215W die Proteinfaltung wesentlich beeinflusst und es somit vorstellbar ist, dass hierin der Grund für die Beeinträchtigung der Bindungsfähigkeit dieser Nibrinvariante liegt [129].

Die hier gewonnenen Erkenntnisse unterstreichen erneut die Bedeutung der FHA-bzw. BRCT- Domäne für die Interaktion mit MDC1. In der Störung dieser durch die hier untersuchten Missense-Mutationen kann unter Umständen eine funktionelle Ursache für die phänotypischen Auswirkungen dieser genetischen Veränderungen liegen. Diese Auswirkungen beinhalten, wie einleitend erwähnt, die Nachweisbarkeit und Häufung der Mutationen in Assoziation mit verschiedenen malignen Erkrankungen und im speziellen Fall von R215W-Nibrin zusätzlich die Beschreibung eines ausgeprägten abweichenden Phänotyps bei für diese Mutation compound heterozygoten ( $NBN^{R215W/657del5}$ ) NBS-Patienten.

### 5.1.3. Rolle von FHA/BRCT bei der Foci-Bildung und Checkpoint-Kontrolle

Interessante funktionelle Untersuchungen gibt es in diesem Zusammenhang auch bezüglich des Einflusses der unterschiedlichen Veränderungen auf Bildung von Reparatur-Foci und die Zellzyklus-Kontrolle. Experimentell lässt sich für R28A-Nibrin

eine gestörte Bildung von Nibrin-positiven Foci nach Bestrahlung und ein G2/M-Checkpoint-Defekt nachweisen [104]. Dies legt nahe, dass die über die FHA-Domäne vermittelten Protein-Protein-Wechselwirkungen sowohl für die Akkumulation von Reparaturproteinen an DSB als auch für die Checkpointkontrolle wichtig sind.

Für K160M-Nibrin ist zwar eine deutliche Beeinträchtigung der Foci-Bildung zu beobachten, die Checkpointkontrolle bleibt jedoch weitgehend unbeeinträchtigt. K160M-Zellen sind im Vergleich mit wt-Zellen bezogen auf die G2/M-Checkpoint-Aktivierung annähernd genauso effektiv [142]. Wie beschrieben sind für die Interaktion mit MDC1 intakte FHA sowie BRCT-Domänen notwendig. Ebenso sind diese offenbar für die Foci-Formierung essentiell. Offensichtlich scheint aber eine Änderung innerhalb der BRCT-Domänen (K160M) die Checkpointaktivierung ganz im Gegensatz zu einer modifizierten FHA-Domäne (R28A) nicht zu beeinflussen. Daraus lässt sich ableiten, dass die Interaktion von Nibrin mit MDC1 zwar die Bildung von Reparatur-Foci an DSB beeinflusst jedoch nicht die G2/M-Checkpointaktivierung. Es scheint also denkbar, dass weitere Interaktionspartner mit den aminoterminalen Domänen des Nibrins interagieren und Einfluss auf die Zellzykluskontrolle haben. Dabei ist es aus den vorhergegangenen Überlegungen naheliegend, dass jene vorstellbaren Interaktionen einen Bindungsmodus haben könnten, welcher nicht streng von einer unversehrten BRCT-Struktur abhängig ist. Dies würde für das p80-Nibrin aminoterminal vermittelte Interaktionen ermöglichen, auch wenn die BRCT2-Domäne nicht Bestandteil des p80-Nibrins ist. Möglicherweise ist die vermutete funktionelle Überlegenheit des p80-Nibrins auf eine intakte Checkpointkontrolle und diese wiederum funktionell auf aminoterminal über die FHA-Domäne vermittelte Protein-Protein-Interaktionen zurückzuführen. Als möglicher Kandidat für solch eine zugrundeliegende Interaktion kommt dabei beispielsweise das in der Literatur beschriebene CtIP in Betracht., dessen Wechselwirkung wie erwähnt über den aminoterminalen Abschnitt des Nibrins vermittelt wird.

## **5.2. Interaktion von Nibrin mit $\gamma$ H2AX**

In den hier durchgeführten Versuchen ließ sich anhand von Co-Immünpräzipitationen eine Interaktion von  $\gamma$ H2AX mit wt-Nibrin nach Induktion von DSB in Bleomycin behandelten Zellen spezifisch nachweisen. Wie den Ergebnissen zu entnehmen, gelingt dies durch Co-IP von  $\gamma$ H2AX mit einem gegen Nibrin gerichteten Antikörper (Abb.4.15.). Mit einem gegen H2AX bzw.  $\gamma$ H2AX gerichteten Antikörper gelingt hingegen keine Co-

IP von Nibrin, was am ehesten auf methodische Probleme im Sinne fehlender Eignung der kommerziell verfügbaren Antikörper für diesen Versuchsaufbau zurückzuführen ist (insbesondere aufgrund einer unspezifischen Bande auf der für Nibrin erwarteten Höhe von ca. 95kDa im WB, Abb.4.13.). Der fehlende Nachweis von  $\gamma$ H2AX in der Co-IP mit A-Nibrin nach Behandlung von *NBN*<sup>657del/5657del5</sup>-Zellen mit AON und sukzessiver Bildung von p80-Nibrin spricht gegen eine Interaktion von p80-Nibrin mit  $\gamma$ H2AX (Abb.4.14.).

Legt man die von Kobayashi et. al 2002 veröffentlichten Ergebnisse und Überlegungen zu Grunde [118], sollte p80-Nibrin zu dieser Interaktion in der Lage sein, da es über einen intakten Aminoterminus inklusive FHA/BRCT(1)-Domäne verfügt. Jene wird in genannter Publikation als die Interaktion vermittelndes Element charakterisiert: Zellfreie Experimente mit rekombinanten GST-Nibrin FHA/BRCT –Konstrukte (Aminosäuren 1 - 197) und rekombinatem  $\gamma$ H2AX zeigen eine spezifische Interaktion beider in Pulldown-Experimenten. Die beim p80-Nibrin fehlende BRCT2-Domäne scheint also für eine etwaige Interaktion mit  $\gamma$ H2AX entbehrlich (diese wäre hinter der Aminosäureposition 197 lokalisiert). Unter Berücksichtigung dieser Überlegung, müsste eine Interaktion von  $\gamma$ H2AX auch mit R215W-Nibrin möglich sein. Diese konnte hier aber nicht nachgewiesen werden und ist auch in der Literatur als gestört beschrieben [97]. Die Ursache hierfür könnte darin liegen, dass in Anwesenheit von R215W-Nibrin (bzw. in *NBN*<sup>R215W/657del5</sup>-Zellen) die ATM-Aktivierung gestört ist [96], dadurch auch weniger  $\gamma$ H2AX gebildet wird und somit keine Interaktion mit Nibrin nachgewiesen werden kann. Es darf in diesem Zusammenhang aber nicht außer Acht gelassen werden, dass die oben genannten Experimente (Pulldowns) im Gegensatz zu den hier durchgeführten Co-IPs nicht in Zellkultur stattgefunden haben. Es ist somit durch jene nicht definitiv beurteilbar, ob die Nibrin/ $\gamma$ H2AX- Wechselwirkung zellulär tatsächlich direkt vermittelt wird oder nicht zumindest andere Co-Faktoren dafür notwendig sind. Ein denkbarer Co-Faktor ist MDC1, welches als direkter Interaktionspartner von sowohl Nibrin als auch  $\gamma$ H2AX beschrieben ist [111]. Letztere Interaktion wird über die Tandem-BRCT-Domäne des MDC1 vermittelt. Ausgehend von dieser Beobachtung wird die direkte Interaktion von  $\gamma$ H2AX und dem MRN-Komplex (bzw. mit der FHA/BRCT-Domäne des Nibrins) angezweifelt und als Alternative ein durch MDC1 vermittelter Mechanismus der Interaktion angenommen. Dieser in der Literatur teilweise als gültig akzeptierte Mechanismus wird durch folgende Überlegungen gestärkt:  $\gamma$ H2AX (bzw. ein C-terminales Phosphopetid) bindet MRN in Pulldownexperimenten nur in Anwesenheit von MDC1 und nicht nach MDC1-siRNA-Knockdown [141]. Ebenso führt ein

Knockdown von MDC1 zu einer Verminderung der MRN-Foci-Bildung nach DSB-Induktion [106]. Weiterhin stören (wie oben beschrieben) Veränderungen in der FHA/BRCT-Domäne die Interaktion MDC1/NBS1 und die Bildung von MRN-positiven Reparatur-Foci an DSB. Interessant sind in diesem Zusammenhang die Auswirkungen von weiteren aminoterminalen Nibrin-Missensemutationen auf die Interaktion  $\gamma$ H2AX/Nibrin. In den hier durchgeführten CO-IPs mit A-Nibrin in mit unterschiedlichen Nibrinvarianten stabil transduzierten *NBN*<sup>657del/5657del5</sup>-Zellen wird jeweils kein  $\gamma$ H2AX nach Induktion von DSB durch Bleomycin nachgewiesen (Abb.4.17.). Diese Ergebnisse sind allerdings nur eingeschränkt aussagekräftig, da auch in mit wt-Nibrin (+pLXIN NBS1) transduzierten Zellen kein  $\gamma$ H2AX copräzipitiert wird und es somit fraglich ist, ob diese zellulären Modelle für die Untersuchung dieser Fragestellung überhaupt geeignet sind.

Unter Zusammenschau der hier erhobenen Befunde und der beschriebenen Überlegungen scheint der unter anderem von Spycher et al. [104] vorgeschlagene Mechanismus der Interaktion  $\gamma$ H2AX/Nibrin mit MDC1 als Mediator am ehesten mit den Ergebnissen der hier durchgeführten Versuche vereinbar zu sein. Hier wird davon ausgegangen, dass ein Teil des MRN-Komplexes auch in Abwesenheit von DSB mit phosphorylierten SDT-Repeats des MDC1 interagiert. Nach Induktion von DSB wird ein Teil der MRN-Komplexe unabhängig von MDC1 zu freien DSB-Enden rekrutiert, wobei der genaue Mechanismus unklar bleibt. In der Folge kommt es unter anderem zur ATM-Aktivierung und somit auch zur Phosphorylierung von H2AX. Das so entstandene  $\gamma$ H2AX wird dann vom MDC1/MRN-Komplex durch die BRCT2-Domäne des MDC1 registriert, was zur Akkumulation von weiteren Reparaturproteinen (insbesondere von weiteren MRN-Komplexen) führt. Somit amplifiziert MDC1 in diesem Modell das durch DSB induzierte zelluläre Signal und reguliert somit eine adäquate Antwort auf DNA-Doppelstrangbrüche. Eine Gegenüberstellung der beiden denkbaren Mechanismen ist in Abb.5.3. skizziert.

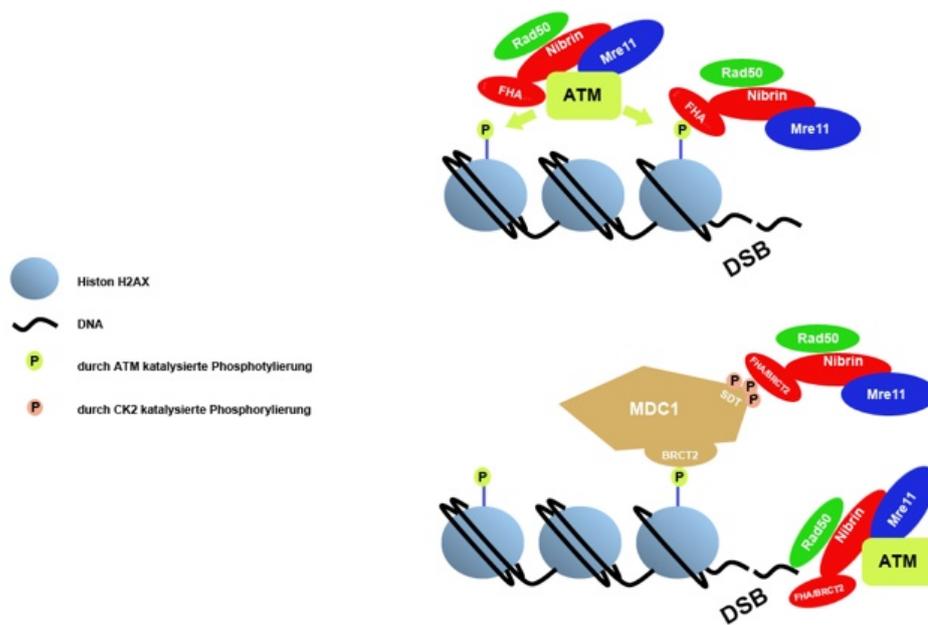


Abb.5.3.: Schematische Darstellung von zwei Modellen zum Mechanismus der Wechselwirkung von Nibrin mit  $\gamma$ H2AX als Antwort auf DNA-DSB. Oben: Direkte Interaktion der FHA-Domäne des Nibrins mit  $\gamma$ H2AX. Unten: Vermittlung der Wechselwirkung über Interaktion von  $\gamma$ H2AX mit der BRCT2-Domäne des MDC1. (Adaptiert nach [104, 111])

Unter der Annahme, dass der in Abb.5.3. unten skizzierte Mechanismus Gültigkeit besitzt, könnte der fehlende Nachweis einer Interaktion von p80-Nibrin mit  $\gamma$ H2AX erklärt werden, da diese über die Interaktion Nibrin/ MDC1 vermittelt wird und das p80-Nibrin nicht über die dafür essentielle Tandem-BRCT-Domäne verfügt, wie oben ausführlich diskutiert. Der in der Abb.5.3. oben dargestellte Mechanismus wäre also theoretisch mit p80-Nibrin vorstellbar, der im unteren Teil der Abbildung dargestellte Mechanismus hingegen nicht.

### 5.3. Interaktionspotential des Nibrins bezogen auf CtIP

Die Interaktion von Nibrin mit CtIP ist für diese Arbeit von Interesse, da sie ähnlich wie die Interaktion Nibrin/MDC1 als phosphospezifische Interaktion, die über die FHA/BRCT-Domänen am Aminoterminus des Nibrins vermittelt wird, charakterisiert wurde [129, 130]. Entsprechend der oben für MDC1 geschilderten Überlegungen, kommt aufgrund der Proteinstruktur das p80-Nibrin mit zum Teil intaktem Aminoterminus als Interaktionspartner für CtIP theoretisch in Frage, wohingegen das p70-Nibrin aufgrund des fehlenden Aminoterminus als Interaktionspartner ausgeschlossen werden kann. In den hier durchgeführten Co-Immunpräzipitationen

wurde in wt-Zellen mit den gegen Nibrin bzw. CtIP gerichteten Antikörpern jeweils der erwartete Interaktionspartner co-präzipitiert (Abb.4.18.). Die Interaktion scheint dabei jeweils nicht abhängig von zuvor induzierten DSB zu sein (Bleomycin-Behandlung). In *NBN*<sup>657del5/657del5</sup>-Zellen ist eine Interaktion mit p70-Nibrin erwartungsgemäß nicht nachweisbar, aber auch nach einer Transfektion dieser Zellen mit AON und Bildung von p80-Nibrin bleibt der Nachweis einer Interaktion aus.

Zum Ausschluss einer Mengenproblematik, wurde ein Versuchsaufbau mit transientser Doppeltransfektion von c-myc-markiertem CtIP und FLAG-markierten unterschiedlichen Nibrinvarianten (p70, p80, p95) in HEK293 Zellen und anschließender Co-Präzipitation gewählt. Zunächst wurde eine IP mit A-FLAG durchgeführt, in der aber keine Co-Präzipitation von CtIP nachgewiesen werden konnte (Abb. 4.22.). Ebenso wenig gelang dieser Nachweis im umgekehrten Versuchsansatz im Sinne einer Co-IP mit A-c-myc (Abb.4.24.). Um in diesem Versuchsaufbau eine IP mit A-Nibrin zur Charakterisierung der Interaktion anzuwenden, wurde die Doppeltransfektion in *NBN*<sup>657del5/657del5</sup>-Zellen durchgeführt, da hier kein endogenes p95-Nibrin vorhanden ist. Jedoch ließ sich auch hier keine Co-Präzipitation von CtIP beziehungsweise c-myc-CtIP nachweisen (Abb.4.26.). Der fehlende Nachweis der Interaktion in transient transfizierten Zellen könnte darin begründet sein, dass die hier verwendeten c-myc bzw. FLAG-Tags jeweils aminoterminal lokalisiert waren. Bezogen auf die FLAG-markierten Nibrinvarianten ist es vorstellbar, dass eine Wechselwirkung sterisch behindert wird, weil die Tags direkt neben den für die Interaktion wichtigen Domänen (FHA/BRCT) lokalisiert sind. Retrospektiv scheint die Wahl dieses aminoterminal markierten Konstruktes also unglücklich. Um das Interaktionspotential von p80-Nibrin bezogen auf CtIP weiter zu untersuchen, wäre wie bei den MDC1-Experimenten, der Einsatz eines rekombinant hergestellten Fusionsproteins denkbar. Weiterhin wären nach Etablierung einer stabilen Methode, die Auswirkungen von Missense-Mutationen mit aminoterminal lokalisierten Aminosäureaustauschen (D95N, I171V, R215W) auf die Interaktion CtIP/Nibrin von Interesse.

Die hier erhobenen Ergebnisse lassen keine sichere Aussage darüber treffen, inwiefern insbesondere das p80-Nibrin in der Lage ist, mit CtIP zu interagieren. Es ist anzumerken, dass es ähnlich wie für MDC1, in der Literatur deutliche Indizien dafür gibt, dass die Interaktion der aminoterminalen Domänen des Nibrins mit CtIP (bzw. dem Ortholog Ctp1) für einen komplexen Bindungsmodus eine intakte FHA sowie Tandem-BRCT-Domäne benötigt. Dabei werden bereits kleine Modifikationen der Proteinfaltung

(z.B. durch Aminosäureaustausche wie R215W) als massive Störfaktoren in dem dynamischen Prozess der Interaktion mit phosphorylierten Interaktionspartnern (hier Ctp1) beschrieben [127, 129]. Aufgrund des bekannten Fehlens der 2.BRCT-Domäne im p80-Nibrin, erscheint eine Interaktion p80/CtIP in Anbetracht dieser Beobachtungen zumindest problematisch.

#### 5.4. Zelluläre Lokalisation von Mre11

Als weiteres Kriterium zur Charakterisierung der funktionellen Unterschiede unterschiedlicher Nibrinvarianten, wurde hier die Verteilung von Mre11 im Zytoplasma bzw. Zellkern untersucht. Die nukleäre Lokalisation von Mre11 dient dabei als Hinweis auf eine intakte Nibrinfunktion. Auch wenn p70-Nibrin anhand der Proteinstruktur mit intakter carboxyterminal gelegener Mre11-Bindungsstelle (vgl. Abb.1.2.) nachgewiesen mit Mre11 interagiert, ist es offensichtlich nicht in der Lage, die vorrangig nukleäre Lokalisation des Mre11 zu bewirken. Dies deutet darauf hin, dass für die Lokalisation von Mre11 (bzw. des MRN-Komplexes) andere Faktoren oder ggf. Interaktionspartner notwendig sind. Eine Behandlung mit AON und Bildung von p80-Nibrin führte in diesen Versuchen zu keiner wesentlichen Veränderung der Mre11-Lokalisation in *NBN*<sup>657del/657del5</sup>-Zellen (Abb.4.27.). Hierin besteht also anscheinend keine funktionelle Überlegenheit des p80-Nibrins, die den mit der Mutation 742-743insGG assoziierten milden Phänotyp erklären könnte. Es ist allerdings dabei zu beachten, dass in diesem Experiment das p80-Nibrin nur vorübergehend (maximal 24h) von den Zellen gebildet wurde und ggf. dieser Zeitraum nicht ausreicht, um einen Effekt auf die Mre11-Verteilung in der Zelle nachzuweisen. Darüberhinaus ist das in Folge der AON-Behandlung entstandene p80-Nibrin, wie in Abb.4.25. ersichtlich, vorrangig im Zytoplasma nachweisbar und nicht etwa im Zellkern, wie es für endogenes p70- bzw. p95-Nibrin der Fall ist. Daher sollte man die Mre11-Lokalisation in insGG-Patientenzellen (LCLs, Fibroblasten) in einem entsprechenden Experiment untersuchen. Weiterhin wäre hier interessant, ob man einen Effekt der AON-Behandlung auf die Mre11-Lokalisation nach Induktion von DSB (z.B. durch ionisierende Strahlen) nachweisen kann, indem man den nukleären Transport von Mre11 sozusagen triggert. In den hier durchgeführten Versuchen zur Mre11-Lokalisation vor dem genetischen Hintergrund der Nibrinvarianten mit aus Missensemutationen resultierenden Aminosäureaustauschen (D95N, R169H, I171V, R215W), wurden erneut *NBN*<sup>657del/657del5</sup>-Zellen mit stabil transduzierten Plasmiden eingesetzt. Wie im Ergebnisteil bereits erläutert, ist aufgrund der Tatsache, dass auch

in Zellen mit zusätzlichem wt-Allel (+pLXIN NBS1) der erwartete Effekt auf die Mre11-Verteilung ausbleibt, keine Aussage hinsichtlich der residualen Funktion der anderen Nibrinvarianten zu treffen (Abb.4.28.). Wie schon in den Experimenten zur Interaktion mit  $\gamma$ H2AX, scheinen diese Zellen für die Untersuchung dieser Fragestellung nicht geeignet zu sein. Unter Zusammenschau der Ergebnisse erscheint es, als seien für die nukleäre Lokalisation von Mre11 sowohl ein intakter Carboxyterminus des Nibrins (für die Bindung von Mre11) als auch intakte aminoterminalen Domänen essentiell. Die Bildung von p80-Nibrin zeigt keinen Effekt auf die zelluläre Verteilung von Mre11. Es scheint in diesem Zusammenhang möglich, dass ein aminoterminaler Interaktionspartner, der weder mit p70- noch p80-Nibrin in Wechselwirkung tritt, hier funktionell eine Rolle spielt (z.B. MDC1).

### **5.5. Per Massenspektrometrie identifizierte Proteine**

Sowohl in den Versuchen zur Unterscheidung zwischen p95- und p70-Nibrin als auch zwischen p80- und p70-Nibrin wurden einige Proteine identifiziert, die jeweils eine der beiden Varianten präferieren. Erwartungsgemäß ist dabei der Anteil der Proteine, die jeweils vorrangig mit p95- bzw. p80-Nibrin in Interaktion treten, deutlich größer im Vergleich zu den p70-Nibrin präferierenden Proteinen.

#### **5.5.1. p70 präferierende Proteine**

Aufgrund des strukturellen Aufbaus der hier untersuchten Nibrinvarianten erscheint es unwahrscheinlich, dass das p70-Nibrin eine funktionelle Überlegenheit gegenüber den anderen beiden Varianten hinsichtlich der Fähigkeit Protein-Protein-Wechselwirkungen einzugehen besitzt. Dementsprechend sind die hier exemplarisch aufgeführten identifizierten Proteine auch am ehesten als falsch-positive Treffer zu werten. Im ersten Versuch wurden das zytoskelett-assoziierte LASP1, welches ein Actin-bindendes Protein darstellt, sowie das TPR (ein am Aufbau des nukleären Pore Komplexes beteiligtes Protein) identifiziert [143, 144]. Das in diesem Versuch ebenso identifizierte HGM2B zählt zur „high mobility group“- Proteinfamilie, deren Mitglieder DNA-bindende Proteine sind. In der Literatur wird diesen eine Rolle bei der Initiierung der Transkription aber auch bei der DNA-Reparatur und der V(D)J-Rekombination zugesprochen [145, 146]. Im Falle der ersten beide Proteine ist kein funktionell sinnvoller Zusammenhang zum Nibrin herzuleiten, während zwischen Nibrin und HGM2B eine gewisse funktionelle Verbindung besteht. Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass im Falle einer tatsächlichen Interaktion, diese vermehrt mit hypomorphem p70-Nibrin besteht. Denkbar wäre in

diesem Zusammenhang die Überlegung, dass in p70 exprimierenden Zellen kompensatorisch andere mit DNA-Reparatur assoziierte Proteine hochreguliert werden und es somit zu einer scheinbar präferierenden Interaktion kommt. Dies müsste durch entsprechende Experimente belegt werden. Wahrscheinlicher erscheint aber eine unspezifische Verunreinigung des Präzipitats, insbesondere deswegen, weil es sich bei den drei hier genannten Proteinen um Chromatin-assoziierte Proteine handelt. Ebenso erscheinen die beiden identifizierten Proteine, welche im zweiten Versuch p70- gegenüber p80-Nibrin präferieren, am ehesten unspezifische Kontaminationen zu sein. Es handelt sich hierbei um eine Untereinheit des Proteasoms (PSMC2) und ein mit der mitochondrialen Atemkette assoziiertes Enzym (NDUFA5). In beiden Fällen ist kein Zusammenhang zu Funktionen des Nibrins bzw. des MRN-Komplexes erkennbar.

### 5.5.2. Identifikation des MRN-Komplexes

Bei den Ergebnissen fällt als Erstes ins Auge, dass in beiden Experimenten die Bestandteile des MRN-Komplexes Rad50 und Mre11 jeweils p95- bzw. p80-Nibrin gegenüber p70-Nibrin präferieren und offensichtlich stärker binden. Dabei zeigen beide Proteine in beiden Experimenten jeweils die stärkste Tendenz zu den beiden vermeintlich funktionell überlegenden Nibrinvarianten von allen identifizierten Proteinen. Dies drücken die „ABS“-Werte von 6,8/6,7 für p95-Nibrin und 4,1/4,0 für p80-Nibrin aus. Die Tatsache, dass Nibrin selbst einen von 0 abweichenden „ABS-Wert“ zeigt, ist zumindest im p95- vs. p70- Versuch auf die zur Identifikation verwendeten Peptide zurückzuführen. Eine stärkere Bindung beider Bestandteilen des MRN-Komplexes an die p95- und vor allem an die p80-Nibrinvariante stellt einen interessanten Befund dar. Das p70-Nibrin verfügt über einen intakten Carboxyterminus und damit auch über die für die Mre11-Bindung bzw. für Bildung des MRN-Komplexes notwendigen Bereiche. Bekanntermaßen ist per Co-IP eine Bildung von MRN-Komplexen mit p70-Nibrin nachweisbar (siehe zum Beispiel IP A-Mre11 in Abb.4.8.). Es ist jedoch durchaus vorstellbar, dass durch die deutliche Abweichung der Proteinstruktur dieser hypomorphen Variante im Vergleich zum wt-Nibrin (und auch zum p80-Nibrin), das Bindungsverhalten gegenüber Mre11 verändert bzw. behindert wird. Eine bessere Bindung von Mre11 und damit eine Stabilisation des MRN-Komplexes, würde einen deutlichen funktionellen Vorteil des p80-Nibrins darstellen. Theoretisch könnte ableitend aus den hier erhobenen Befunden spekuliert werden, dass hierin die Überlegenheit der residualen Proteinfunktion des p80- gegenüber p70-Nibrin liegt. Somit könnte ein funktioneller Erklärungsansatz für den milden Phänotyp der *NBN*<sup>742-743insGG/742-743insGG</sup>

Patientin vorgeschlagen werden. Aufgrund des annähernden 1:1-Verhältnis von Mre11 und Rad50 sowie dem beobachteten erwarteten Verhalten in den „Crossover-Experimenten“, sind die hier erhobenen Ergebnisse insgesamt als robust einzustufen. Außerdem zeigte sich in Vorversuchen zur Methodenetablierung bereits eine ähnliche Tendenz (Daten hier nicht gezeigt). Ein weiterer Hinweis auf eine stärkere Bindung von Mre11/Rad50 an p80-Nibrin im Vergleich zu p70-Nibrin findet sich in Abb.4.9.: In den Co-IPs mit A-Mre11 ist nach AON-Transfektion mehr Rad50 im Präzipitat nachweisbar als nach Transfektion mit Sense-Oligonukleotiden. Zur Verifizierung dieser Ergebnisse wurden weitere Co-IPs durchgeführt, in denen jedoch die beschriebene Tendenz nicht zu reproduzieren war (siehe Abb.4.33.). Dies schließt dieses Phänomen jedoch nicht aus, da anhand dieser Methode Protein-Protein-Wechselwirkungen nur bedingt quantitativ zu beurteilen sind.

### 5.5.3. Weitere identifizierte Proteine

In beiden Experimenten wurden eine Reihe von Proteinen identifiziert, die jeweils die vermeintlich überlegende Nibrinvariante (p95 bzw. p80) stärker binden und in den Crossover-Experimenten eine entsprechende Verteilung zeigen (Swap-wert: 2).

Besonders interessant sind dabei Proteine, die in beiden Experimenten als solche identifiziert wurden und somit sowohl p95- als auch p80-Nibrin gegenüber p70-Nibrin präferieren. Hier ist zunächst das Genprodukt des Gens *TRIM21* aufzuführen: Das Protein wird als RNF81, Ro52 oder auch SSA (Sjögren-Syndrome-Antigen) bezeichnet. Letztere Bezeichnung beruht auf der Entdeckung von gegen ein Epitop des Proteins gerichteten Autoantikörpern bei gleichnamiger Autoimmunerkrankung [147]. Interessanterweise wird Ro52 als Protein beschrieben, welches in einem p53-unabhängigen Signalweg an der Apoptoseinduktion mitwirkt und somit funktionell eine Rolle in der Antwort auf Zellschäden wie zum Beispiel DSB spielt und mit Nibrin in Verbindung gebracht werden könnte [148]. Weiterhin gibt es auch eine beschriebene Assoziation des Genproduktes mit der Zellzyklusregulation [149].

Zu den in beiden Experimenten identifizierten Proteinen zählt weiterhin RBM14 (RNA binding motif protein 14), welches auch als COAA bezeichnet wird. Dieses Protein ist ein nukleäres Protein, welches über Interaktion mit TRBP (Thyroid receptor binding protein) und einer Vielzahl von nukleären Rezeptoren an der Transkriptionsregulation beteiligt ist [150]. Als funktionelle Verbindung zu Nibrin bzw. zur DNA-Reparatur sind Interaktionen des COAA mit Ku86, einer regulativen Untereinheit der an der DSB-Reparatur beteiligten DNA-Helicase XRCC5, sowie mit PARP (Poly-ADP-Ribose-

Polymerase) beschrieben [151]. Bezüglich der Interaktion mit PARP wurde kürzlich über eine PARP-Hyperaktivierung durch erhöhten oxidativen Stress in Nibrindefizienten Zellen berichtet [152]. Ebenfalls in beiden Versuchen wurde das Protein DDX3 (Deadbox-Polypeptid-3) als p95- bzw. p80-präferierend identifiziert. Bei DEADBOX-Proteinen handelt es sich um RNA-Helicasen, die eine Rolle bei der Zellteilung, Zellwachstum und auch bei der Regulation des Zellzyklus spielen [153, 154]. Weiterhin wird DDX3 aufgrund seiner wachstumsunterdrückenden Wirkung als Tumorsuppressor mit regulativem Einfluss auf proliferationsfördernde Gene eingeordnet [155]. Somit besteht auch hier eine Verbindung zu den Funktionen des Nibrins. Noch deutlicher ist diese allerdings für DDX1 (Dead-box-helicase1). DDX1 wurde im Experiment p95 vs. p70 als p95-präferierend identifiziert, im p80 vs. p70-Nibrin wurde keine auffällige Verteilung registriert. Für DDX1 ist eine Akkumulation an  $\gamma$ H2AX-postiven Reparatur-Foci in Abhängigkeit von ATM beschrieben [156]. Eine direkte funktionelle Verknüpfung zur DSB-Reparatur ist also für DDX1 vorhanden. Ein weiteres in beiden Experimenten mit auffälliger Verteilung identifiziertes Protein ist Fibrillarin (FBL). Dieses mit ribosomaler RNA assoziierte Protein spielt zwar eine Rolle beim Zellwachstum, eine direkte funktionelle Assoziation mit Nibrin ist aber nicht offensichtlich [157]. Eine Präferenz zum p95-Nibrin gegenüber p70-Nibrin zeigten die Histonvarianten H2A Typ B und C. Diese sind zwar verwandt mit dem erwähnten H2AX, von diesem aber abzugrenzen [158]. H2A-Varianten werden nach UV-Exposition ubiquitinyliert und können somit eine Rolle bei der Regulation der Antwort auf DNA-Schäden spielen [159].

Das in der q-AP-MS p95-Nibrin präferierende NONO bzw. Nrb54 stellt ein RNA-bindendes Protein mit einer Rolle im Nukleinsäuremetabolismus dar. Bezüglich einer Verbindung von NONO zur DNA-Reparatur ist eine Beteiligung am NHEJ über Interaktion mit Ku-Proteinen sowie die Anreicherungen an DSB und Interaktionen mit Ligase IV beschrieben [160, 161]. Letztere ist ein zentraler Akteur bei der DSB-Reparatur via NHEJ [162].

Die weiteren im Versuch p95- vs. p70-Nibrin identifizierten Proteine mit Tendenz zu p95-Nibrin, welche im Ergebnisteil aufgeführt sind, werden aufgrund des fehlenden funktionellen Zusammenhangs hier nur der Vollständigkeit halber erwähnt und sind am ehesten als unspezifisch zu bewerten. Im einzelnen sind dies ribosomale Proteine (40S Ribosomal protein S16 + S18), ein Transferrinrezeptor (CD71), das Enzym Hydroxypyruvat-Reduktase sowie zwei Untereinheiten des Splicingfaktors U2AF. Bei

einigen dieser Proteine ist eine Kontamination durch das in der Zellkultur verwendete fetale Kälberserum denkbar, ebenso sind Kontaminationen mit Nukleinsäure-assoziierten Proteinen (Histonvarianten, ribosomalen Einheiten und Splicingfaktoren) bei Präzipitation von nukleären Proteinen nicht ungewöhnlich.

Im p80- vs. p70-Nibrin Experiment wurden einige Proteine identifiziert, die das p80-Nibrin präferieren, aber im p95- vs. p70-Nibrin Experiment nicht als p95-präferierend identifiziert wurden. Aus proteinstrukturellen Überlegungen ist es zunächst nicht nachvollziehbar, dass ein Interaktionspartner eher mit p80- als mit p95-Nibrin interagiert. Da Protein-Protein-Wechselwirkungen jedoch chemische Gleichgewichte darstellen, ist es aber vorstellbar, dass durch die im p80-Nibrin vorhandenen Abweichungen von der Proteinstruktur des p95-Nibrins das Gleichgewicht in beide Richtungen verschoben werden kann und somit hier Proteine eine auffällige Verteilung zeigen. Identifiziert wurde das SSBP1 (Mitochondrial Single-stranded DNA binding protein 1). Dieses Protein ist an der DSB-Reparatur beteiligt und es ist sogar eine Interaktion mit dem MRN-Komplex über Nibrin beschrieben [163, 164].

Ebenso scheint SSBP1 sowohl wichtig für die Bildung von Reparatur-Foci als auch für die ATM-Aktivierung nach DNA-Schädigung zu sein [165, 166]. Für das identifizierte CBX3 (chromobox homolog 3), auch als HP1 $\gamma$  bezeichnet, welches Bestandteil des Heterochromatin im Zellkern ist, ist bekannt, dass es an DSB akkumuliert und eine Rolle bei der Regulation der DSB-Reparatur in heterochromatin-reichen Bereichen spielt [167, 168].

Eine Verbindung zu Nibrin und dem identifizierten PARP1 (poly-ADP-ribose-polymerase 1) besteht, wie bereits erwähnt, in der beschriebenen PARP-Hyperaktivierung in Folge von erhöhtem oxidativen Stress in *NBN*- bzw. *Nbn*-defizienten Zellen [152]. Eine direkte Protein-Protein-Wechselwirkung mit Nibrin ist aber nicht bekannt. Das im Experiment mit auffällig hohem "ABS-Wert" identifizierte IQGAP1 ist ein Zytoskelett-assoziiertes Protein und daher aufgrund eines fehlenden funktionellen Zusammenhangs am ehesten als unspezifisch zu interpretieren [169].

Einige der in den Experimenten als p95- oder p80-Nibrin präferierend identifizierten Proteine, sind also funktionell mit DNA-Reparatur und anderen Funktionen des Nibrins in Verbindung zu bringen. Es ist auffällig, dass bekannte mit dem Aminoterminus des Nibrins interagierende Proteine wie zum Beispiel MDC1 und CtIP in den hier

durchgeführten Experimenten nicht identifiziert wurden. Zumindest der Nachweis einer Interaktion mit p95-Nibrin wäre hier zu erwarten gewesen. Diese bekannten Interaktionspartner wären in Anbetracht der Struktur der hier verglichenen Nibrinvarianten und aufgrund der Rolle des Aminoterminus für diese Wechselwirkungen von besonderem Interesse gewesen. Möglicherweise ist der hier zur IP eingesetzte A-Nibrin-Antikörper nicht in der Lage, aminoterminal interagierende Proteine zu co-präzipitieren. Dies würde sich mit den Schwierigkeiten in den vorausgegangenen Co-IP-Experimenten decken, in welchen der gleiche Antikörper verwendet wurde. Von daher wäre es denkbar, die Experimente mit alternativen Antikörpern oder rekombinanten Proteinen zur Präzipitation zu wiederholen. Weiterhin wäre es unter Umständen spannend, ob eine Induktion von DSB (durch zum Beispiel ionisierende Strahlen) zur Identifikation weiterer Interaktionspartner mit interessantem Verteilungsmuster führen würde (wie z.B.  $\gamma$ H2AX). Auch wenn die hier gewonnen Ergebnisse aufgrund der Verwendung von Crossover-Experimenten insgesamt als relativ robust zu bewerten sind, ist es, um ihre Relevanz letztendlich sicher zu beurteilen, notwendig diese zu reproduzieren.

Insbesondere ist dies für bisher nicht als Interaktionspartner bekannte identifizierte Proteine notwendig. Diese sollten anhand konventioneller Co-IP verifiziert und ggf. auch anhand von funktionellen Experimenten genauer charakterisiert werden.

Von besonderem Interesse für die hier behandelte Fragestellung wären in diesem Zusammenhang vor allem die Proteine, welche in beiden Experimenten identifiziert wurden. Ließe sich hier eine Wechselwirkung mit p95- und p80- aber nicht mit p70-Nibrin reproduzieren, könnte darin ein Erklärungsansatz für den mit p80-Nibrin assoziierten milden Phänotyp liegen. Wie oben beschrieben, stellen in dieser Gruppe aufgrund des funktionellen Zusammenhanges die DEADBOX-Proteine, das RNF81 und RBM14 attraktive potentielle Interaktionspartner dar. In der Gruppe der lediglich als p95-präferierend identifizierten Proteine stellt NONO einen interessanten Interaktionspartner dar, dessen weitere Charakterisierung und Verifizierung der Interaktion lohnend wäre. Aus funktioneller Sicht sind auch die identifizierten Proteine SSBP1 und CBX3 (HP1y) spannend und sollten weiter charakterisiert werden. Hier ist auch anzumerken, dass sich die beiden Experimente nicht 1:1 vergleichen lassen: In beiden Experimenten wurde zwar prinzipiell die gleiche Zellreihe eingesetzt, im p95- vs. p70 Nibrin-Experiment wurden die Zellen jedoch stabil mit einem zusätzlichen Allel transduziert, während im p80- vs. p70-Nibrin-Experiment eine transiente Transfektion

mit AON durchgeführt wurde. Es ist spekulativ, inwiefern sich diese Unterschiede in der Methodik die Fähigkeit des in Folge gebildeten „protein of interest“ beeinflussen, Protein-Protein-Wechselwirkungen einzugehen.

## 6. Ausblick

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse sollten einen Anstoß für verschiedene weiterführende Experimente liefern, wie schon teilweise im Diskussionsteil beschrieben. Die folgenden Vorschläge konnten aber aufgrund des zeitlichen Rahmens und der begrenzten Ressourcen nicht Bestandteil dieser Arbeit sein.

Zur Untersuchung potentieller Interaktionspartner, insbesondere solcher mit denen Nibrin über seinen Aminoterminus interagiert, wären Präzipitationsversuche mit Nibrin-Proteinvarianten denkbar und vielversprechend. Wie beschrieben gibt es in der Literatur Hinweise auf eine Bedeutung intakter aminoterminal lokalisierter Domänen des Nibrins für die effektive Zellzykluskontrolle. Somit wären Experimente zur Checkpoint-Kontrolle nach Induktion von DNA-DSB interessant mit Zellen interessant, die p80-Nibrin bilden oder die untersuchten aminoterminalen *NBN*-Missensemutationen beinhalten. Zur Untersuchung der effektiven Checkpointkontrolle (G2/M-Checkpoint), könnte die Histon H3-Phosphorylierung nach Induktion von DSB durch ionisierende Strahlung in *NBN*<sup>657del5/657del5</sup>-Zellen nach Behandlung mit Antisense- bzw. Sense-Oligonukleotiden (und somit Expression von p80- bzw. p70-Nibrin) per Durchflusszytometrie oder Fluoreszenzmikroskopie quantifiziert und verglichen werden. In entsprechenden Experimenten konnten für murine *Nbn*<sup>-/-</sup>-Zellen signifikante Defizite identifiziert werden [41]. Weiterhin sollte die Rolle der aminoterminalen Domänen des Nibrins bei der Antwort auf DNA-DSB weiter untersucht werden. Mögliche Experimente dazu sind die Untersuchung und Quantifizierung der Phosphorylierung von ATM-Substraten nach Induktion von DSB in Zellen, welche die hier charakterisierten Nibrinvarianten exprimieren. Denkbar wäre hierbei beispielsweise die Quantifizierung der Phosphorylierung von Chk2, p53, Nibrin oder ATM selbst. Auch die zelluläre Lokalisation von Mre11 bleibt in diesem Zusammenhang von Interesse. Als weiterführende Experimente wären hier, wie bereits beschrieben, Versuche mit vorheriger Induktion von DSB vorstellbar. Weiterhin könnten Experimente zur Mre11-Lokalisation in anderen p80-Nibrin exprimierenden Zellen durchgeführt werden, so zum Beispiel in Fibroblasten der *NBN*<sup>742-743insGG/742-743insGG</sup>-Patientin. Auch die in den Experimenten zur Analyse von Proteinwechselwirkungen anhand quantitativer Massenspektrometrie nach Affinitätsaufreinigung (q-AP-MS) identifizierten Proteine

---

sollten weiter untersucht und charakterisiert werden. Zunächst sollten die Interaktionen anhand von z.B. Co-IP reproduziert und im Weiteren ggf. funktionelle Studien durchgeführt werden. Die q-AP-MS – Versuche könnten auch abgewandelt durch den Einsatz von anderen Antikörpern (z.B. gegen den Aminoterminus des Nibrins gerichtet) oder markierten rekombinanten Proteinen zur Affinitätsaufreinigung durchgeführt werden. Unter Umständen wären solche Versuche nach vorheriger Induktion von DNA-DSB interessant, um dadurch eventuell ein verändertes Muster der identifizierten Proteine zu beobachten. Anlehnend an die hier gewonnen Hinweise, dass scheinbar eine stärkere Interaktion von p95- und p80-Nibrin mit den anderen Bestandteilen des MRN-Komplexes besteht, sollte speziell diesen Hinweisen weiter nachgegangen werden. Da sich diese Beobachtung anhand Co-IP mit gegen Bestandteile des MRN-Komplexes gerichteten Antikörpern nicht eindeutig reproduzieren lässt, wäre hier ein Versuchsaufbau mit z.B. rekombinanten Proteinen denkbar. Die Rolle von p80-Nibrin im Sinne einer mildereren phänotypischen Ausprägung ist momentan Gegenstand von Untersuchungen in Mausmodellen mit humanisierten NBS-Allelen. Hier wird durch systemische Applikation von Antisense-Oligonukleotiden die Bildung von p80-Nibrin induziert. Effekte dieser Maßnahme und abschließende Ergebnisse dieser Studien sind hinsichtlich eines theoretischen therapeutischen Ansatzes für die Behandlung des NBS mit Spannung zu erwarten.

---

**7. Literaturverzeichnis**

1. Hustinx, T.W., J.M. Scheres, C.M. Weemaes, B.G. ter Haar, and A.H. Janssen, *Karyotype instability with multiple 7/14 and 7/7 rearrangements*. Hum Genet, 1979. **49**(2): p. 199-208.
2. Weemaes, C.M., T.W. Hustinx, J.M. Scheres, P.J. van Munster, J.A. Bakkeren, and R.D. Taalman, *A new chromosomal instability disorder: the Nijmegen breakage syndrome*. Acta Paediatr Scand, 1981. **70**(4): p. 557-64.
3. Carney, J.P., R.S. Maser, H. Olivares, et al., *The hMre11/hRad50 protein complex and Nijmegen breakage syndrome: linkage of double-strand break repair to the cellular DNA damage response*. Cell, 1998. **93**(3): p. 477-86.
4. Matsuura, S., C. Weemaes, D. Smeets, et al., *Genetic mapping using microcell-mediated chromosome transfer suggests a locus for Nijmegen breakage syndrome at chromosome 8q21-24*. Am J Hum Genet, 1997. **60**(6): p. 1487-94.
5. Varon, R., C. Vissinga, M. Platzer, et al., *Nibrin, a novel DNA double-strand break repair protein, is mutated in Nijmegen breakage syndrome*. Cell, 1998. **93**(3): p. 467-76.
6. van der Burgt, I., K.H. Chrzanowska, D. Smeets, and C. Weemaes, *Nijmegen breakage syndrome*. J Med Genet, 1996. **33**(2): p. 153-6.
7. Muschke, P., H. Gola, R. Varon, et al., *Retrospective diagnosis and subsequent prenatal diagnosis of Nijmegen breakage syndrome*. Prenat Diagn, 2004. **24**(2): p. 111-3.
8. Chrzanowska, K.H., M. Stumm, M. Bekiesiska-Figatowska, et al., *Atypical clinical picture of the Nijmegen breakage syndrome associated with developmental abnormalities of the brain*. J Med Genet, 2001. **38**(1): p. E3.
9. Seemanova, E., E. Passarge, D. Beneskova, J. Houstek, P. Kasal, and M. Sevcikova, *Familial microcephaly with normal intelligence, immunodeficiency, and risk for lymphoreticular malignancies: a new autosomal recessive disorder*. Am J Med Genet, 1985. **20**(4): p. 639-48.
10. Chrzanowska, K.H., W.J. Kleijer, M. Krajewska-Walasek, et al., *Eleven Polish patients with microcephaly, immunodeficiency, and chromosomal instability: the Nijmegen breakage syndrome*. Am J Med Genet, 1995. **57**(3): p. 462-71.
11. Wegner, R.D., M. Metzger, F. Hanefeld, et al., *A new chromosomal instability disorder confirmed by complementation studies*. Clin Genet, 1988. **33**(1): p. 20-32.

12. Green, A.J., J.R. Yates, A.M. Taylor, et al., *Severe microcephaly with normal intellectual development: the Nijmegen breakage syndrome*. Arch Dis Child, 1995. **73**(5): p. 431-4.
13. Gennery, A.R., M.A. Slatter, A. Bhattacharya, et al., *The clinical and biological overlap between Nijmegen Breakage Syndrome and Fanconi anemia*. Clin Immunol, 2004. **113**(2): p. 214-9.
14. Chrzanowska, K., *Growth pattern in patients with Nijmegen breakage syndrome: evidence from a longitudinal study (abstract)*. Horm Res Pediatr, 2010. **74**: p. Suppl 3.
15. Chrzanowska, K.H., M. Szarras-Czapnik, M. Gajdulewicz, et al., *High prevalence of primary ovarian insufficiency in girls and young women with Nijmegen breakage syndrome: evidence from a longitudinal study*. J Clin Endocrinol Metab, 2010. **95**(7): p. 3133-40.
16. Maraschio, P., C. Danesino, A. Antoccia, et al., *A novel mutation and novel features in Nijmegen breakage syndrome*. J Med Genet, 2001. **38**(2): p. 113-7.
17. Bekiesinska-Figatowska, M., K.H. Chrzanowska, J. Sikorska, et al., *Cranial MRI in the Nijmegen breakage syndrome*. Neuroradiology, 2000. **42**(1): p. 43-7.
18. Bekiesinska-Figatowska, M., K.H. Chrzanowska, E. Jurkiewicz, et al., *Magnetic resonance imaging of brain abnormalities in patients with the Nijmegen breakage syndrome*. Acta Neurobiol Exp (Wars), 2004. **64**(4): p. 503-9.
19. *Nijmegen breakage syndrome. The International Nijmegen Breakage Syndrome Study Group*. Arch Dis Child, 2000. **82**(5): p. 400-6.
20. Dembowska-Baginska, B., D. Perek, A. Brozyna, et al., *Non-Hodgkin lymphoma (NHL) in children with Nijmegen Breakage syndrome (NBS)*. Pediatr Blood Cancer, 2009. **52**(2): p. 186-90.
21. Gladkowska-Dura, M., K. Dzierzanowska-Fangrat, W.T. Dura, et al., *Unique morphological spectrum of lymphomas in Nijmegen breakage syndrome (NBS) patients with high frequency of consecutive lymphoma formation*. J Pathol, 2008. **216**(3): p. 337-44.
22. Resnick, I.B., I. Kondratenko, O. Togojev, et al., *Nijmegen breakage syndrome: clinical characteristics and mutation analysis in eight unrelated Russian families*. J Pediatr, 2002. **140**(3): p. 355-61.
23. Distel, L., S. Neubauer, R. Varon, W. Holter, and G. Grabenbauer, *Fatal toxicity following radio- and chemotherapy of medulloblastoma in a child with*

- unrecognized Nijmegen breakage syndrome*. *Med Pediatr Oncol*, 2003. **41**(1): p. 44-8.
24. Bakhshi, S., K.M. Cerosaletti, P. Concannon, et al., *Medulloblastoma with adverse reaction to radiation therapy in nijmegen breakage syndrome*. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2003. **25**(3): p. 248-51.
25. Meyer, S., H. Kingston, A.M. Taylor, et al., *Rhabdomyosarcoma in Nijmegen breakage syndrome: strong association with perianal primary site*. *Cancer Genet Cytogenet*, 2004. **154**(2): p. 169-74.
26. Chrzanowska, K.H., H. Gregorek, B. Dembowska-Baginska, M.A. Kalina, and M. Digweed, *Nijmegen breakage syndrome (NBS)*. *Orphanet J Rare Dis*, 2012. **7**: p. 13.
27. Kondratenko, I., O. Paschenko, A. Polyakov, and A. Bologov, *Nijmegen breakage syndrome*. *Adv Exp Med Biol*, 2007. **601**: p. 61-7.
28. Gregorek, H., K.H. Chrzanowska, J. Michalkiewicz, M. Syczewska, and K. Madalinski, *Heterogeneity of humoral immune abnormalities in children with Nijmegen breakage syndrome: an 8-year follow-up study in a single centre*. *Clin Exp Immunol*, 2002. **130**(2): p. 319-24.
29. Digweed, M. and K. Sperling, *Nijmegen breakage syndrome: clinical manifestation of defective response to DNA double-strand breaks*. *DNA Repair (Amst)*, 2004. **3**(8-9): p. 1207-17.
30. New, H.V., C.M. Cale, M. Tischkowitz, et al., *Nijmegen breakage syndrome diagnosed as Fanconi anaemia*. *Pediatr Blood Cancer*, 2005. **44**(5): p. 494-9.
31. Gregorek, H., K.H. Chrzanowska, K. Dzierzanowska-Fangrat, et al., *Nijmegen breakage syndrome: Long-term monitoring of viral and immunological biomarkers in peripheral blood before development of malignancy*. *Clin Immunol*, 2010. **135**(3): p. 440-7.
32. Dinkelman, M., E. Spehalski, T. Stoneham, et al., *Multiple functions of MRN in end-joining pathways during isotype class switching*. *Nat Struct Mol Biol*, 2009. **16**(8): p. 808-13.
33. Reina-San-Martin, B., M.C. Nussenzweig, A. Nussenzweig, and S. Difilippantonio, *Genomic instability, endoreduplication, and diminished Ig class-switch recombination in B cells lacking Nbs1*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(5): p. 1590-5.

34. Kracker, S., Y. Bergmann, I. Demuth, et al., *Nibrin functions in Ig class-switch recombination*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(5): p. 1584-9.
35. Conley, M.E., N.B. Spinner, B.S. Emanuel, P.C. Nowell, and W.W. Nichols, *A chromosomal breakage syndrome with profound immunodeficiency*. Blood, 1986. **67**(5): p. 1251-6.
36. Varon, R., E. Seemanova, K. Chrzanowska, et al., *Clinical ascertainment of Nijmegen breakage syndrome (NBS) and prevalence of the major mutation, 657del5, in three Slav populations*. Eur J Hum Genet, 2000. **8**(11): p. 900-2.
37. Maurer, M.H., K. Hoffmann, K. Sperling, and R. Varon, *High prevalence of the NBN gene mutation c.657-661del5 in Southeast Germany*. J Appl Genet, 2010. **51**(2): p. 211-4.
38. Maser, R.S., R. Zinkel, and J.H. Petrini, *An alternative mode of translation permits production of a variant NBS1 protein from the common Nijmegen breakage syndrome allele*. Nat Genet, 2001. **27**(4): p. 417-21.
39. Zhu, J., S. Petersen, L. Tessarollo, and A. Nussenzweig, *Targeted disruption of the Nijmegen breakage syndrome gene NBS1 leads to early embryonic lethality in mice*. Curr Biol, 2001. **11**(2): p. 105-9.
40. Dumon-Jones, V., P.O. Frappart, W.M. Tong, et al., *Nbn heterozygosity renders mice susceptible to tumor formation and ionizing radiation-induced tumorigenesis*. Cancer Res, 2003. **63**(21): p. 7263-9.
41. Demuth, I., P.O. Frappart, G. Hildebrand, et al., *An inducible null mutant murine model of Nijmegen breakage syndrome proves the essential function of NBS1 in chromosomal stability and cell viability*. Hum Mol Genet, 2004. **13**(20): p. 2385-97.
42. Difilippantonio, S., A. Celeste, O. Fernandez-Capetillo, et al., *Role of Nbs1 in the activation of the Atm kinase revealed in humanized mouse models*. Nat Cell Biol, 2005. **7**(7): p. 675-85.
43. Demuth, I. and M. Digweed, *The clinical manifestation of a defective response to DNA double-strand breaks as exemplified by Nijmegen breakage syndrome*. Oncogene, 2007. **26**(56): p. 7792-8.
44. Seemanova, E., P. Jarolim, P. Seeman, et al., *Cancer risk of heterozygotes with the NBN founder mutation*. J Natl Cancer Inst, 2007. **99**(24): p. 1875-80.

45. Kruger, L., I. Demuth, H. Neitzel, et al., *Cancer incidence in Nijmegen breakage syndrome is modulated by the amount of a variant NBS protein*. *Carcinogenesis*, 2007. **28**(1): p. 107-11.
46. Lins, S., R. Kim, L. Kruger, K.H. Chrzanowska, E. Seemanova, and M. Digweed, *Clinical variability and expression of the NBN c.657del5 allele in Nijmegen Breakage Syndrome*. *Gene*, 2009. **447**(1): p. 12-7.
47. Salewsky, B., P. Wessendorf, D. Hirsch, H. Krenzlin, and M. Digweed, *Nijmegen breakage syndrome: The clearance pathway for mutant nibrin protein is allele specific*. *Gene*, 2013. **519**(2): p. 217-21.
48. Williams, R.S., N. Bernstein, M.S. Lee, et al., *Structural basis for phosphorylation-dependent signaling in the DNA-damage response*. *Biochem Cell Biol*, 2005. **83**(6): p. 721-7.
49. Mohammad, D.H. and M.B. Yaffe, *14-3-3 proteins, FHA domains and BRCT domains in the DNA damage response*. *DNA Repair (Amst)*, 2009. **8**(9): p. 1009-17.
50. Durocher, D., J. Henckel, A.R. Fersht, and S.P. Jackson, *The FHA domain is a modular phosphopeptide recognition motif*. *Mol Cell*, 1999. **4**(3): p. 387-94.
51. Hofmann, K. and P. Bucher, *The FHA domain: a putative nuclear signalling domain found in protein kinases and transcription factors*. *Trends Biochem Sci*, 1995. **20**(9): p. 347-9.
52. Callebaut, I. and J.P. Mornon, *From BRCA1 to RAP1: a widespread BRCT module closely associated with DNA repair*. *FEBS Lett*, 1997. **400**(1): p. 25-30.
53. Manke, I.A., D.M. Lowery, A. Nguyen, and M.B. Yaffe, *BRCT repeats as phosphopeptide-binding modules involved in protein targeting*. *Science*, 2003. **302**(5645): p. 636-9.
54. Becker, E., V. Meyer, H. Madaoui, and R. Guerois, *Detection of a tandem BRCT in Nbs1 and Xrs2 with functional implications in the DNA damage response*. *Bioinformatics*, 2006. **22**(11): p. 1289-92.
55. Matsuoka, S., B.A. Ballif, A. Smogorzewska, et al., *ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage*. *Science*, 2007. **316**(5828): p. 1160-6.
56. Uziel, T., Y. Lerenthal, L. Moyal, Y. Andegeko, L. Mittelman, and Y. Shiloh, *Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage*. *EMBO J*, 2003. **22**(20): p. 5612-21.

57. Lee, J.H. and T.T. Paull, *ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex*. Science, 2005. **308**(5721): p. 551-4.
58. Paull, T.T. and J.H. Lee, *The Mre11/Rad50/Nbs1 complex and its role as a DNA double-strand break sensor for ATM*. Cell Cycle, 2005. **4**(6): p. 737-40.
59. Gatei, M., D. Young, K.M. Cerosaletti, et al., *ATM-dependent phosphorylation of nibrin in response to radiation exposure*. Nat Genet, 2000. **25**(1): p. 115-9.
60. Yuan, Z., X. Zhang, N. Sengupta, W.S. Lane, and E. Seto, *SIRT1 regulates the function of the Nijmegen breakage syndrome protein*. Mol Cell, 2007. **27**(1): p. 149-62.
61. Stewart, G.S., R.S. Maser, T. Stankovic, et al., *The DNA double-strand break repair gene hMRE11 is mutated in individuals with an ataxia-telangiectasia-like disorder*. Cell, 1999. **99**(6): p. 577-87.
62. Stracker, T.H. and J.H. Petrini, *The MRE11 complex: starting from the ends*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011. **12**(2): p. 90-103.
63. Lamarche, B.J., N.I. Orazio, and M.D. Weitzman, *The MRN complex in double-strand break repair and telomere maintenance*. FEBS Lett, 2010. **584**(17): p. 3682-95.
64. Stracker, T.H., M. Morales, S.S. Couto, H. Hussein, and J.H. Petrini, *The carboxy terminus of NBS1 is required for induction of apoptosis by the MRE11 complex*. Nature, 2007. **447**(7141): p. 218-21.
65. Stracker, T.H. and J.H. Petrini, *Working together and apart: the twisted relationship of the Mre11 complex and Chk2 in apoptosis and tumor suppression*. Cell Cycle, 2008. **7**(23): p. 3618-21.
66. de Jager, M., M.L. Dronkert, M. Modesti, C.E. Beerens, R. Kanaar, and D.C. van Gent, *DNA-binding and strand-annealing activities of human Mre11: implications for its roles in DNA double-strand break repair pathways*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(6): p. 1317-25.
67. Paull, T.T. and M. Gellert, *The 3' to 5' exonuclease activity of Mre 11 facilitates repair of DNA double-strand breaks*. Mol Cell, 1998. **1**(7): p. 969-79.
68. Zhuang, J., G. Jiang, H. Willers, and F. Xia, *Exonuclease function of human Mre11 promotes deletional nonhomologous end joining*. J Biol Chem, 2009. **284**(44): p. 30565-73.

69. Hopfner, K.P., A. Karcher, D.S. Shin, et al., *Structural biology of Rad50 ATPase: ATP-driven conformational control in DNA double-strand break repair and the ABC-ATPase superfamily*. Cell, 2000. **101**(7): p. 789-800.
70. Hopfner, K.P., A. Karcher, L. Craig, T.T. Woo, J.P. Carney, and J.A. Tainer, *Structural biochemistry and interaction architecture of the DNA double-strand break repair Mre11 nuclease and Rad50-ATPase*. Cell, 2001. **105**(4): p. 473-85.
71. Mimitou, E.P. and L.S. Symington, *DNA end resection: many nucleases make light work*. DNA Repair (Amst), 2009. **8**(9): p. 983-95.
72. de Jager, M., J. van Noort, D.C. van Gent, C. Dekker, R. Kanaar, and C. Wyman, *Human Rad50/Mre11 is a flexible complex that can tether DNA ends*. Mol Cell, 2001. **8**(5): p. 1129-35.
73. Falck, J., J. Coates, and S.P. Jackson, *Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage*. Nature, 2005. **434**(7033): p. 605-11.
74. Buscemi, G., C. Savio, L. Zannini, et al., *Chk2 activation dependence on Nbs1 after DNA damage*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(15): p. 5214-22.
75. Cerosaletti, K., J. Wright, and P. Concannon, *Active role for nibrin in the kinetics of atm activation*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(5): p. 1691-9.
76. Powers, J.T., S. Hong, C.N. Mayhew, P.M. Rogers, E.S. Knudsen, and D.G. Johnson, *E2F1 uses the ATM signaling pathway to induce p53 and Chk2 phosphorylation and apoptosis*. Mol Cancer Res, 2004. **2**(4): p. 203-14.
77. Zhang, Y., C.U. Lim, J. Zhou, and H.H. Liber, *The effects of NBS1 knockdown by small interfering RNA on the ionizing radiation-induced apoptosis in human lymphoblastoid cells with different p53 status*. Toxicol Lett, 2007. **171**(1-2): p. 50-9.
78. Stiff, T., C. Reis, G.K. Alderton, L. Woodbine, M. O'Driscoll, and P.A. Jeggo, *Nbs1 is required for ATR-dependent phosphorylation events*. EMBO J, 2005. **24**(1): p. 199-208.
79. Varon, R., V. Dutrannoy, G. Weikert, et al., *Mild Nijmegen breakage syndrome phenotype due to alternative splicing*. Hum Mol Genet, 2006. **15**(5): p. 679-89.
80. Maraschio, P., D. Peretti, S. Lambiase, et al., *A new chromosome instability disorder*. Clin Genet, 1986. **30**(5): p. 353-65.
81. Blencowe, *Exonic splicing enhancers; mechanism of action, diversity and role in human genetic disease*. Trends Biochem Sci, 2000. **25**: p. 106-110.

82. Chen, B., B. Rigat, C. Curry, and D.J. Mahuran, *Structure of the GM2A gene: identification of an exon 2 nonsense mutation and a naturally occurring transcript with an in-frame deletion of exon 2*. Am J Hum Genet, 1999. **65**(1): p. 77-87.
83. Vuoristo, M.M., J.G. Pappas, V. Jansen, and L. Ala-Kokko, *A stop codon mutation in COL11A2 induces exon skipping and leads to non-ocular Stickler syndrome*. Am J Med Genet A, 2004. **130A**(2): p. 160-4.
84. Dias, N. and C.A. Stein, *Antisense oligonucleotides: basic concepts and mechanisms*. Mol Cancer Ther, 2002. **1**(5): p. 347-55.
85. Sazani, P. and R. Kole, *Therapeutic potential of antisense oligonucleotides as modulators of alternative splicing*. J Clin Invest, 2003. **112**(4): p. 481-6.
86. Mann, C.J., K. Honeyman, A.J. Cheng, et al., *Antisense-induced exon skipping and synthesis of dystrophin in the mdx mouse*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(1): p. 42-7.
87. van Deutekom, J.C., A.A. Janson, I.B. Ginjaar, et al., *Local dystrophin restoration with antisense oligonucleotide PRO051*. N Engl J Med, 2007. **357**(26): p. 2677-86.
88. Goemans, N.M., M. Tulinius, J.T. van den Akker, et al., *Systemic administration of PRO051 in Duchenne's muscular dystrophy*. N Engl J Med, 2011. **364**(16): p. 1513-22.
89. Nicholson, L.V., *The "rescue" of dystrophin synthesis in boys with Duchenne muscular dystrophy*. Neuromuscul Disord, 1993. **3**(5-6): p. 525-31.
90. Dias, N. and C.A. Stein, *Potential roles of antisense oligonucleotides in cancer therapy. The example of Bcl-2 antisense oligonucleotides*. Eur J Pharm Biopharm, 2002. **54**(3): p. 263-9.
91. Cartegni, L., J. Wang, Z. Zhu, M.Q. Zhang, and A.R. Krainer, *ESEfinder: A web resource to identify exonic splicing enhancers*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(13): p. 3568-71.
92. Steffen, J., R. Varon, M. Mosor, et al., *Increased cancer risk of heterozygotes with NBS1 germline mutations in Poland*. Int J Cancer, 2004. **111**(1): p. 67-71.
93. di Masi, A. and A. Antoccia, *NBS1 Heterozygosity and Cancer Risk*. Curr Genomics, 2008. **9**(4): p. 275-81.
94. Varon, R., A. Reis, G. Henze, H.G. von Einsiedel, K. Sperling, and K. Seeger, *Mutations in the Nijmegen Breakage Syndrome gene (NBS1) in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL)*. Cancer Res, 2001. **61**(9): p. 3570-2.

95. Piekutowska-Abramczuk, D., E. Ciara, E. Popowska, et al., *The frequency of NBN molecular variants in pediatric astrocytic tumors*. J Neurooncol, 2010. **96**(2): p. 161-8.
96. Seemanova, E., K. Sperling, H. Neitzel, et al., *Nijmegen breakage syndrome (NBS) with neurological abnormalities and without chromosomal instability*. J Med Genet, 2006. **43**(3): p. 218-24.
97. di Masi, A., M. Viganotti, F. Polticelli, P. Ascenzi, C. Tanzarella, and A. Antoccia, *The R215W mutation in NBS1 impairs gamma-H2AX binding and affects DNA repair: molecular bases for the severe phenotype of 657del5/R215W Nijmegen breakage syndrome patients*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **369**(3): p. 835-40.
98. Mendez, G., D. Cilli, F. Berardinelli, et al., *Cleavage of the BRCT tandem domains of nibrin by the 657del5 mutation affects the DNA damage response less than the Arg215Trp mutation*. IUBMB Life, 2012. **64**(10): p. 853-61.
99. Ciara, E., D. Piekutowska-Abramczuk, E. Popowska, et al., *Heterozygous germline mutations in the NBN gene predispose to medulloblastoma in pediatric patients*. Acta Neuropathol, 2010. **119**(3): p. 325-34.
100. Nowak, J., M. Mosor, K. Nowicka, J. Rembowska, and D. Januszkiewicz, *Is the NBN gene mutation I171V a potential risk factor for malignant solid tumors in children?* J Pediatr Hematol Oncol, 2011. **33**(6): p. e248-9.
101. Nowak, J., M. Mosor, I. Ziolkowska, et al., *Heterozygous carriers of the I171V mutation of the NBS1 gene have a significantly increased risk of solid malignant tumours*. Eur J Cancer, 2008. **44**(4): p. 627-30.
102. Roznowski, K., D. Januszkiewicz-Lewandowska, M. Mosor, M. Pernak, M. Litwiniuk, and J. Nowak, *I171V germline mutation in the NBS1 gene significantly increases risk of breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 2008. **110**(2): p. 343-8.
103. Shimada, H., K. Shimizu, S. Mimaki, et al., *First case of aplastic anemia in a Japanese child with a homozygous missense mutation in the NBS1 gene (I171V) associated with genomic instability*. Hum Genet, 2004. **115**(5): p. 372-6.
104. Spycher, C., E.S. Miller, K. Townsend, et al., *Constitutive phosphorylation of MDC1 physically links the MRE11-RAD50-NBS1 complex to damaged chromatin*. J Cell Biol, 2008. **181**(2): p. 227-40.
105. Melander, F., S. Bekker-Jensen, J. Falck, J. Bartek, N. Mailand, and J. Lukas, *Phosphorylation of SDT repeats in the MDC1 N terminus triggers retention of*

- NBS1 at the DNA damage-modified chromatin.* J Cell Biol, 2008. **181**(2): p. 213-26.
106. Stewart, G.S., B. Wang, C.R. Bignell, A.M. Taylor, and S.J. Elledge, *MDC1 is a mediator of the mammalian DNA damage checkpoint.* Nature, 2003. **421**(6926): p. 961-6.
107. Coster, G. and M. Goldberg, *The cellular response to DNA damage: a focus on MDC1 and its interacting proteins.* Nucleus, 2010. **1**(2): p. 166-78.
108. Chapman, J.R. and S.P. Jackson, *Phospho-dependent interactions between NBS1 and MDC1 mediate chromatin retention of the MRN complex at sites of DNA damage.* EMBO Rep, 2008. **9**(8): p. 795-801.
109. Wu, L., K. Luo, Z. Lou, and J. Chen, *MDC1 regulates intra-S-phase checkpoint by targeting NBS1 to DNA double-strand breaks.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(32): p. 11200-5.
110. Xu, C., L. Wu, G. Cui, M.V. Botuyan, J. Chen, and G. Mer, *Structure of a second BRCT domain identified in the nijmegen breakage syndrome protein Nbs1 and its function in an MDC1-dependent localization of Nbs1 to DNA damage sites.* J Mol Biol, 2008. **381**(2): p. 361-72.
111. Stucki, M., J.A. Clapperton, D. Mohammad, M.B. Yaffe, S.J. Smerdon, and S.P. Jackson, *MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks.* Cell, 2005. **123**(7): p. 1213-26.
112. Lee, M.S., R.A. Edwards, G.L. Thede, and J.N. Glover, *Structure of the BRCT repeat domain of MDC1 and its specificity for the free COOH-terminal end of the gamma-H2AX histone tail.* J Biol Chem, 2005. **280**(37): p. 32053-6.
113. Lou, Z., K. Minter-Dykhouse, S. Franco, et al., *MDC1 maintains genomic stability by participating in the amplification of ATM-dependent DNA damage signals.* Mol Cell, 2006. **21**(2): p. 187-200.
114. So, S., A.J. Davis, and D.J. Chen, *Autophosphorylation at serine 1981 stabilizes ATM at DNA damage sites.* J Cell Biol, 2009. **187**(7): p. 977-90.
115. Rogakou, E.P., C. Boon, C. Redon, and W.M. Bonner, *Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo.* J Cell Biol, 1999. **146**(5): p. 905-16.
116. Pilch, D.R., O.A. Sedelnikova, C. Redon, A. Celeste, A. Nussenzweig, and W.M. Bonner, *Characteristics of gamma-H2AX foci at DNA double-strand breaks sites.* Biochem Cell Biol, 2003. **81**(3): p. 123-9.

117. Paull, T.T., E.P. Rogakou, V. Yamazaki, C.U. Kirchgessner, M. Gellert, and W.M. Bonner, *A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage*. *Curr Biol*, 2000. **10**(15): p. 886-95.
118. Kobayashi, J., H. Tauchi, S. Sakamoto, et al., *NBS1 localizes to gamma-H2AX foci through interaction with the FHA/BRCT domain*. *Curr Biol*, 2002. **12**(21): p. 1846-51.
119. Kobayashi, J., H. Tauchi, B. Chen, et al., *Histone H2AX participates the DNA damage-induced ATM activation through interaction with NBS1*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009. **380**(4): p. 752-7.
120. Bassing, C.H., K.F. Chua, J. Sekiguchi, et al., *Increased ionizing radiation sensitivity and genomic instability in the absence of histone H2AX*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(12): p. 8173-8.
121. Celeste, A., S. Petersen, P.J. Romanienko, et al., *Genomic instability in mice lacking histone H2AX*. *Science*, 2002. **296**(5569): p. 922-7.
122. Xie, A., N. Puget, I. Shim, et al., *Control of sister chromatid recombination by histone H2AX*. *Mol Cell*, 2004. **16**(6): p. 1017-25.
123. Yuan, J. and J. Chen, *MRE11-RAD50-NBS1 complex dictates DNA repair independent of H2AX*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(2): p. 1097-104.
124. Yun, M.H. and K. Hiom, *CtIP-BRCA1 modulates the choice of DNA double-strand-break repair pathway throughout the cell cycle*. *Nature*, 2009. **459**(7245): p. 460-3.
125. Buis, J., T. Stoneham, E. Spehalski, and D.O. Ferguson, *Mre11 regulates CtIP-dependent double-strand break repair by interaction with CDK2*. *Nat Struct Mol Biol*, 2012. **19**(2): p. 246-52.
126. Sartori, A.A., C. Lukas, J. Coates, et al., *Human CtIP promotes DNA end resection*. *Nature*, 2007. **450**(7169): p. 509-14.
127. Limbo, O., C. Chahwan, Y. Yamada, R.A. de Bruin, C. Wittenberg, and P. Russell, *Ctp1 is a cell-cycle-regulated protein that functions with Mre11 complex to control double-strand break repair by homologous recombination*. *Mol Cell*, 2007. **28**(1): p. 134-46.
128. Chen, L., C.J. Nievera, A.Y. Lee, and X. Wu, *Cell cycle-dependent complex formation of BRCA1.CtIP.MRN is important for DNA double-strand break repair*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(12): p. 7713-20.

129. Williams, R.S., G.E. Dodson, O. Limbo, et al., *Nbs1 flexibly tethers Ctp1 and Mre11-Rad50 to coordinate DNA double-strand break processing and repair*. Cell, 2009. **139**(1): p. 87-99.
130. Lloyd, J., J.R. Chapman, J.A. Clapperton, et al., *A supramodular FHA/BRCT-repeat architecture mediates Nbs1 adaptor function in response to DNA damage*. Cell, 2009. **139**(1): p. 100-111.
131. Yu, X., C.C. Chini, M. He, G. Mer, and J. Chen, *The BRCT domain is a phospho-protein binding domain*. Science, 2003. **302**(5645): p. 639-42.
132. Porter-Goff, M.E. and N. Rhind, *The role of MRN in the S-phase DNA damage checkpoint is independent of its Ctp1-dependent roles in double-strand break repair and checkpoint signaling*. Mol Biol Cell, 2009. **20**(7): p. 2096-107.
133. Engelward, B.P., M.S. Boosalis, B.J. Chen, Z. Deng, M.J. Siciliano, and L.D. Samson, *Cloning and characterization of a mouse 3-methyladenine/7-methyl-guanine/3-methylguanine DNA glycosylase cDNA whose gene maps to chromosome 11*. Carcinogenesis, 1993. **14**(2): p. 175-81.
134. Roy, R., A. Kumar, J.C. Lee, and S. Mitra, *The domains of mammalian base excision repair enzyme N-methylpurine-DNA glycosylase. Interaction, conformational change, and role in DNA binding and damage recognition*. J Biol Chem, 1996. **271**(39): p. 23690-7.
135. Komatsu, K., S. Matsuura, H. Tauchi, et al., *The gene for Nijmegen breakage syndrome (V2) is not located on chromosome 11*. Am J Hum Genet, 1996. **58**(4): p. 885-8.
136. Einhauer, A. and A. Jungbauer, *The FLAG peptide, a versatile fusion tag for the purification of recombinant proteins*. J Biochem Biophys Methods, 2001. **49**(1-3): p. 455-65.
137. Taub, R., I. Kirsch, C. Morton, et al., *Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(24): p. 7837-41.
138. Selbach, M. and M. Mann, *Protein interaction screening by quantitative immunoprecipitation combined with knockdown (QUICK)*. Nat Methods, 2006. **3**(12): p. 981-3.
139. Paul, F.E., F. Hosp, and M. Selbach, *Analyzing protein-protein interactions by quantitative mass spectrometry*. Methods, 2011. **54**(4): p. 387-95.

140. Desai-Mehta, A., K.M. Cerosaletti, and P. Concannon, *Distinct functional domains of nibrin mediate Mre11 binding, focus formation, and nuclear localization*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(6): p. 2184-91.
141. Lukas, C., F. Melander, M. Stucki, et al., *Mdc1 couples DNA double-strand break recognition by Nbs1 with its H2AX-dependent chromatin retention*. EMBO J, 2004. **23**(13): p. 2674-83.
142. Hari, F.J., C. Spycher, S. Jungmichel, L. Pavic, and M. Stucki, *A divalent FHA/BRCT-binding mechanism couples the MRE11-RAD50-NBS1 complex to damaged chromatin*. EMBO Rep, 2010. **11**(5): p. 387-92.
143. Krull, S., J. Dorries, B. Boysen, et al., *Protein Tpr is required for establishing nuclear pore-associated zones of heterochromatin exclusion*. EMBO J, 2010. **29**(10): p. 1659-73.
144. Schreiber, V., C. Moog-Lutz, C.H. Regnier, et al., *Lasp-1, a novel type of actin-binding protein accumulating in cell membrane extensions*. Mol Med, 1998. **4**(10): p. 675-87.
145. Thomas, J.O., *HMG1 and 2: architectural DNA-binding proteins*. Biochem Soc Trans, 2001. **29**(Pt 4): p. 395-401.
146. Thomas, J.O. and A.A. Travers, *HMG1 and 2, and related 'architectural' DNA-binding proteins*. Trends Biochem Sci, 2001. **26**(3): p. 167-74.
147. Buyon, J.P., S.G. Slade, J.D. Reveille, J.C. Hamel, and E.K. Chan, *Autoantibody responses to the "native" 52-kDa SS-A/Ro protein in neonatal lupus syndromes, systemic lupus erythematosus, and Sjogren's syndrome*. J Immunol, 1994. **152**(7): p. 3675-84.
148. Jauharoh, S.N., J. Saegusa, T. Sugimoto, et al., *SS-A/Ro52 promotes apoptosis by regulating Bcl-2 production*. Biochem Biophys Res Commun, 2012. **417**(1): p. 582-7.
149. Sabile, A., A.M. Meyer, C. Wirbelauer, et al., *Regulation of p27 degradation and S-phase progression by Ro52 RING finger protein*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(16): p. 5994-6004.
150. Auboeuf, D., D.H. Dowhan, X. Li, et al., *CoAA, a nuclear receptor coactivator protein at the interface of transcriptional coactivation and RNA splicing*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(1): p. 442-53.
151. Iwasaki, T., W.W. Chin, and L. Ko, *Identification and characterization of RRM-containing coactivator activator (CoAA) as TRBP-interacting protein, and its*

- splice variant as a coactivator modulator (CoAM)*. J Biol Chem, 2001. **276**(36): p. 33375-83.
152. Krenzlin, H., I. Demuth, B. Salewsky, et al., *DNA damage in Nijmegen Breakage Syndrome cells leads to PARP hyperactivation and increased oxidative stress*. PLoS Genet, 2012. **8**(3): p. e1002557.
153. Pek, J.W. and T. Kai, *DEAD-box RNA helicase Belle/DDX3 and the RNA interference pathway promote mitotic chromosome segregation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(29): p. 12007-12.
154. Lai, M.C., W.C. Chang, S.Y. Shieh, and W.Y. Tarn, *DDX3 regulates cell growth through translational control of cyclin E1*. Mol Cell Biol, 2010. **30**(22): p. 5444-53.
155. Chao, C.H., C.M. Chen, P.L. Cheng, J.W. Shih, A.P. Tsou, and Y.H. Lee, *DDX3, a DEAD box RNA helicase with tumor growth-suppressive property and transcriptional regulation activity of the p21waf1/cip1 promoter, is a candidate tumor suppressor*. Cancer Res, 2006. **66**(13): p. 6579-88.
156. Li, L., E.A. Monckton, and R. Godbout, *A role for DEAD box 1 at DNA double-strand breaks*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(20): p. 6413-25.
157. Amin, M.A., S. Matsunaga, N. Ma, et al., *Fibrillarin, a nucleolar protein, is required for normal nuclear morphology and cellular growth in HeLa cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **360**(2): p. 320-6.
158. Marzluff, W.F., P. Gongidi, K.R. Woods, J. Jin, and L.J. Maltais, *The human and mouse replication-dependent histone genes*. Genomics, 2002. **80**(5): p. 487-98.
159. Bergink, S., F.A. Salomons, D. Hoogstraten, et al., *DNA damage triggers nucleotide excision repair-dependent monoubiquitylation of histone H2A*. Genes Dev, 2006. **20**(10): p. 1343-52.
160. Bladen, C.L., D. Udayakumar, Y. Takeda, and W.S. Dynan, *Identification of the polypyrimidine tract binding protein-associated splicing factor.p54(nrb) complex as a candidate DNA double-strand break rejoining factor*. J Biol Chem, 2005. **280**(7): p. 5205-10.
161. Salton, M., Y. Lerenthal, S.Y. Wang, D.J. Chen, and Y. Shiloh, *Involvement of Matrin 3 and SFPQ/NONO in the DNA damage response*. Cell Cycle, 2010. **9**(8): p. 1568-76.
162. Jeggo, P.A., *Identification of genes involved in repair of DNA double-strand breaks in mammalian cells*. Radiat Res, 1998. **150**(5 Suppl): p. S80-91.

163. Huang, J., Z. Gong, G. Ghosal, and J. Chen, *SOSS complexes participate in the maintenance of genomic stability*. Mol Cell, 2009. **35**(3): p. 384-93.
164. Nam, E.A. and D. Cortez, *SOSS1/2: Sensors of single-stranded DNA at a break*. Mol Cell, 2009. **35**(3): p. 258-9.
165. Li, Y., E. Bolderson, R. Kumar, et al., *HSSB1 and hSSB2 form similar multiprotein complexes that participate in DNA damage response*. J Biol Chem, 2009. **284**(35): p. 23525-31.
166. Richard, D.J., K. Savage, E. Bolderson, et al., *hSSB1 rapidly binds at the sites of DNA double-strand breaks and is required for the efficient recruitment of the MRN complex*. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(5): p. 1692-702.
167. Oka, Y., K. Suzuki, M. Yamauchi, N. Mitsutake, and S. Yamashita, *Recruitment of the cohesin loading factor NIPBL to DNA double-strand breaks depends on MDC1, RNF168 and HP1gamma in human cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2011. **411**(4): p. 762-7.
168. Goodarzi, A.A., P. Jeggo, and M. Lobrich, *The influence of heterochromatin on DNA double strand break repair: Getting the strong, silent type to relax*. DNA Repair (Amst), 2010. **9**(12): p. 1273-82.
169. Pelikan-Conchaudron, A., C. Le Clainche, D. Didry, and M.F. Carlier, *The IQGAP1 protein is a calmodulin-regulated barbed end capper of actin filaments: possible implications in its function in cell migration*. J Biol Chem, 2011. **286**(40): p. 35119-28.

**8. Eidesstattliche Versicherung**

„Ich, Moritz Kieslich, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Funktionelle Charakterisierung hypomorpher Proteinvarianten beim Nijmegen Breakage Syndrom“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

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

Datum

Unterschrift

**9. Lebenslauf**

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

---

**10. Publikationsliste**

1. Clayton, P., Fischer, B., Mann, A., Mansour, S., Rossier, E., Veen, M., Lang, C., Baasanjav, S., **Kieslich, M.**, Brossuleit, K., Gravemann, S., Schnipper, N., Karbasiyan, M., Demuth, I., Zwerger, M., Vaya, A., Utermann, G., Mundlos, S., Stricker, S., Sperling, K., Hoffmann, K.: *Mutations causing Greenberg dysplasia but not Pelger anomaly uncouple enzymatic from structural functions of a nuclear membrane protein*. Nucleus, 2010. **1**(4): p. 354-66.

---

**11. Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. rer. nat. Martin Digweed unter dessen wissenschaftlicher Leitung diese Arbeit entstanden ist. Ohne seine Ideen und Anregungen sowie seine ständige Verfügbarkeit bei Fragen oder Problemen, wäre das Zustandekommen dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Ebenso bedanke ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die stets angenehme Arbeitsatmosphäre und die Unterstützung bei der Durchführung der Experimente. Insbesondere gilt dies für Susanne Rothe, Gabriele Hildebrandt sowie Bastian Salewsky, die beispielsweise in meiner Abwesenheit die verwendeten Zellen mit ausreichender Nahrung versorgt sowie mich bei aufwendigen Versuchen tatkräftig unterstützt haben und unter deren Anleitung ich viele der hier verwendeten Methoden erlernen konnte. Weiterhin möchte ich mich bei Prof. Dr. Matthias Selbach und Fabian Hosp vom Max-Delbrück-Centrum für molekulare Medizin Berlin-Buch für die gelungene Kooperation bei der Durchführung der q-AP-MS-Experimente bedanken.

Weiterhin bin ich meiner Familie und Anna dafür dankbar, dass sie mir immer motivierend und unterstützend zur Seite gestanden sowie diese Arbeit von zahlreichen Rechtschreibfehlern befreit haben.