

**Aus dem Institut für Humangenetik
der Medizinischen Fakultät der Charité - Universitätsmedizin Berlin**

DISSERTATION

Identifizierung veränderter Proteinexpression durch 2D-
Gelelektrophorese beim Nijmegen Breakage Syndrom

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

**vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin**

von

Svenja Buchwald, geb. Kriener

aus Berlin

Datum der Promotion: 11.12.2015

Für Heike und Bernhard

Inhaltsverzeichnis

Abstrakt	5
Abkürzungsverzeichnis	7
1 Einleitung	9
1.1 Genom und Stabilität.....	9
1.2 Chromosominstabilitätssyndrome.....	10
1.3 Das klinische Bild vom Nijmegen Breakage Syndrom.....	10
1.4 Die Molekularbiologie Nibrins	13
1.4.1 Nibrin und DNA-Reparatur.....	15
1.4.2 Nibrin und die Checkpoints.....	19
1.4.3 Nibrin und Telomerinstabilität.....	22
1.4.4 Nibrin und Apoptose	22
1.5 Die Mausmodelle	24
1.5.1 Konditionelle Nullmutante.....	24
1.5.2 Weitere Mausmodelle	25
1.6 Die Proteomanalyse.....	27
1.7 Zielsetzung	29
2 Material und Methoden	31
2.1 Material	31
2.1.1 Zelllinien & Zellkulturmedien	31
2.1.2 Plasmid.....	31
2.1.3 Chemikalien	31
2.1.4 Enzyme & Antikörper	32
2.1.5 Puffer & Lösungen.....	32
2.1.6 Geräte & Verbrauchsmaterial.....	36
2.1.7 Primer	37
2.1.8 Software & Datenbanken	37
2.2 Methoden.....	39
2.2.1 Proteinisolierung	39
2.2.2 Zellbiologische Methoden.....	40
2.2.3 Biochemische Methoden.....	43
2.2.4 Molekularbiologische Methoden.....	45
2.2.5 Zweidimensionale Gelelektrophorese.....	48
2.2.6 Massenspektrometrische Methoden	54
2.2.7 Datenbankanalysen.....	55
3 Ergebnisse	56
3.1 Elutionsprofil.....	56
3.2 SDS-Page	57
3.3 Bestimmung der optimalen Konzentration der Cre-Recombinase.....	57
3.4 Deletionseffizienz.....	58
3.5 Zeitfenster für die Proteomanalyse der nullmutanten Zellen.....	59
3.6 Proteomanalysen	62
3.6.1 Gesamtheit der identifizierten Proteine.....	62
3.6.2 Expressionsveränderungen der Proteine	63
3.6.3 Funktionelle Proteingruppen	67
4 Diskussion	77
4.1 Vorbereitung zur Proteom-Analyse	77
4.2 Diskussion der Proteom-Analyse	78
4.3 Diskussion der in nullmutanten Zellen differenziell exprimierten Proteine	80

4.3.1 Proteine des Proteinmetabolismus	80
4.3.2 Die Chaperone	82
4.3.3 Die Kategorie Transkription und Translation	84
4.3.4 Energiemetabolismus	87
4.3.5 Die Zytoskelett-assoziierten Proteine.....	89
4.3.6 Kollagen-zugehörige Proteine.....	89
4.3.7 Proteine der Signaltransduktion	90
4.3.8 Zellzyklus und Zellproliferation.....	90
4.3.9 Ausblick	91
5 Zusammenfassung	94
6 Literaturverzeichnis.....	96
Eidesstattliche Versicherung	107
Lebenslauf	108
Danksagung.....	109

Abstrakt

In dieser Arbeit werden differentiell exprimierte Proteine bei der autosomal-rezessiven Krankheit Nijmegen Breakage Syndrom mittels Proteom-Analyse vorgestellt. Patienten mit NBS zeigen Minderwuchs und Mikrozephalie, charakteristische faziale Dysmorphien, Immundefizienz und ein erhöhtes Krebsrisiko; in Zellen von NBS-Patienten finden sich darüber hinaus gehäuft Chromosomschäden und eine erhöhte Radiosensitivität. Über 90 % aller Patienten sind homozygot für eine bestimmte Mutation auf dem *NBS1* Gen, so dass als Genprodukt zwei Nibrinfragmente gebildet werden.

Um die Funktionen von Nibrin besser zu verstehen, sollen in dieser Arbeit die in Abwesenheit von Nibrin zusätzlich betroffenen Proteine nach Bestrahlung identifiziert werden. Hierbei wurden homozygot nullmutante Fibroblasten aus einem murinen Knock-Out-Modell bestrahlt. Anschließend wurde das Proteom mittels 2-D-Gelelektrophorese dargestellt und die differentiell exprimierten Proteine durch Maldi TOF Massenspektrometrie identifiziert. Es wurden insgesamt 35 Proteine identifiziert und in funktionelle Gruppen eingeteilt (Energie-Metabolismus, Protein-Metabolismus, Chaperone, Zellzyklus/Proliferation, Signaltransduktion, Transkription/Translation, Zytoskelett, Kollagen).

Die Ergebnisse bestätigen Nibrins Rolle bei Zellzyklus- und Checkpoint-Kontrollen sowie der Tumorgenese und liefern Informationen über weitere Funktionen des Genprodukts. Hierbei ergeben sich Aufschlüsse über die Mechanismen, welche bei DNA Schädigungen und Mutationen ablaufen, und ergänzen somit das Geschehen in den Patientenzellen auf molekularem Niveau. Ein umfassenderes Verständnis des Chromosominstabilitätssyndroms NBS könnte zu einer Verbesserung der Behandlungsoptionen beitragen und das individuelle Krebsrisiko und ein Ansprechen auf Therapie besser einschätzen lassen.

Abstract

In this thesis, differentially expressed proteins in the autosomal genetic disorder Nijmegen Breakage Syndrome were identified by proteome analysis. NBS patients show growth retardation und microcephaly, a characteristic facial appearance,

immunodeficiency and an increased risk of cancer; in addition, NBS patient cells were found to be sensitive to ionizing irradiation und have higher levels of spontaneous chromosomal damage. Over 90 % of all patients are homozygous for a truncating mutation, producing two mutated forms of the *NBS1* gene product nibrin.

For a better understanding of the role of Nibrin, other proteins were identified whose abundance is altered in the absence of Nibrin. Homozygous null mutant fibroblasts of a murine model were exposed to ionising radiation, separated in a two-dimensional gel electrophoresis and then analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry and by searching the Swiss Prot Database. In total, 35 proteins were identified which fall into different functional categories (metabolism, chaperones, cell cycle, signal transduction, transcription/translation, cytoskeleton, collagen).

The results confirm Nibrin's role in cell cycle and checkpoint control as well as tumorigenesis and indicate additional functions of Nibrin. The mechanisms operating in cells to combat DNA damage und mutation are further defined enabling a much more detailed insight into the processes disturbed in patient cells. A more thorough understanding of the chromosome instability syndrome NBS could contribute to further improvements in treatment and, with the introduction of individualised medicine, allow prediction of individual cancer risk und likely response to therapeutic regimes.

Abkürzungsverzeichnis

1D / 2D	1. Dimension / 2. Dimension
2D-PAGE	2D-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
APS	Ammoniumpersulfat
A-T	Ataxia telangiectasia
ATLD	Ataxia telangiectasia-like disorder
ATM	Ataxia telangiectasia, mutated
ATR	ATM und RAD3-related
BER	Base Excision repair
bp	Basenpaar
BRCT	breast cancer carboxy terminal
BSA	bovines Serumalbumin
CDK	Cyclin-dependent Kinase
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylamino]-propansulfate
CHK	Checkpoint-Kinase
CKI	Cyclin Kinase Inhibitor
Cre Recombinase	cyclization recombination
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMEM	Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium
DNA-PK	DNA-abhängige Protein-Kinase
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSB	Doppelstrangbruch
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
F / R	Vorwärts- / Rückwärts-Primer
FAM-markiert	Fluoreszenzfarbstoff-markiert
FancD2	Protein des Fanconi-Gens D2
FHA	forkhead-associated
FKBP	FK506-binding protein
FKS	fetales Kälberserum
G1-/G2-Phase	erste/zweite gap-Phase im Zellzyklus
G2/M-Checkpoint	Kontrollpunkt zwischen G2-Phase und Mitose
Gy	Gray (Einheit der Strahlungsdosis)
γH2AX	phosphoryliertes Mitglied X der Familie der Histone H2A
hnRNP	heterogenous nuclear ribonucleoprotein
HR	homologe Rekombination
HRP	Enzym Meerrettichperoxidase
HSP	heat shock protein
HTNC	polyhistidine, HIV TAT, nuclear localization sequences cre
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IPG	immobilisierter pH-Gradient
IR	ionisierende Strahlung
IRIF	Foci nach ionisierender Strahlung
KCl	Kaliumchlorid
KDa	Kilodalton
loxP/gefloxt	loxP-flankiert, locus of crossing over of P1 (Cre-DNA-Substrat)
Maldi-TOF	Matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight

Abkürzungsverzeichnis

μM	mikromolar
MilliQ H ₂ O	Bidestilliertes Wasser
Mowse	molecular weight search, Protein-Score
mRNA	messenger-RNA
MRN-Komplex	MRE11/RAD50/Nibrin-Komplex
MS	Massenspektroskopie
Nbs1	Nibrin, Produkt des NBN
<i>Nbn</i>	murines Homolog des NBN
NBS	die Erkrankung Nijmegen Breakage Syndrom
NBN	Gen des Nijmegen Breakage Syndrom
NER	Nukleotid Exzisions Reparatur
NHEJ	nicht-homologe Endverknüpfung
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man (Datenbank)
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDA	Piperazindiacrylamid
pI	Isoelektrischer Punkt
RDS	radio-resistente DNA-Synthese
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reactive oxygen species
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
Smc1	structural maintenance of chromosome
S-Phase	Synthese-Phase im Zellzyklus
SQ-PCR	semiquantitative Polymerase-Kettenreaktion
Ss/ds DNA	Einzel-/Doppelstrang-DNA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris/Borat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TCA	Trichloressigsäure
TCR	T-Cell Receptor
TEMED	(Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitan Monolaurat
V(D)J	variable (diversity) joining
wt	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Genom und Stabilität

Die Integrität des menschlichen Genoms ist für das Überleben des Organismus von essenzieller Bedeutung. DNA ist jedoch ständig schädigenden Einflüssen ausgesetzt: zum einen exogenen Faktoren wie Strahlung und chemische Agenzien, zum anderen endogenen Faktoren bei natürlichen Vorgängen wie reaktive Sauerstoffspezies, entstanden beim normalen Zellmetabolismus. Um genomische Stabilität und die fehlerfreie Weitergabe der Erbinformationen zu gewährleisten, besitzt jede Zelle vielseitige Mechanismen zur Schadenserkennung und Schadensreparatur, die komplexe Netzwerke aus Sensoren, Signalüberträgern und Effektoren aufweisen.

Ebenso bedarf getreue Replikation einer geordneten und kontrollierten Abfolge der Zellzyklusphasen. Um Veränderungen des gleichmäßigen Phasenablaufs und damit Tumorentstehung zu verhindern, gibt es verschiedene DNA-Reparaturenzyme und kooperierende Kontrollpunkte (Checkpoints), die die Progression des Zellzyklus kontrollieren und überprüfen, ob ein Prozess abgeschlossen ist, bevor der nächste beginnt^{1,2}. Kommt es dagegen zu irreparablen Schädigungen, können diese Zellen in den programmierten Zelltod, die Apoptose, geleitet werden³.

Ein exogener, mutagener Faktor ist die ionisierende Strahlung. So kommt es zu direkten chemischen Wirkungen wie das Aufbrechen kovalenter Bindungen und indirekt zur Bildung von DNA-schädigenden Radikalen. Besonders bei Bestrahlung des Zellkerns häufen sich lokal Basenmodifikationen und Läsionen des Phosphat-Zucker-Rückgrats, so dass durch gleichzeitige Schädigung beider Stränge oft DNA-Doppelstrangbrüche entstehen. In einer menschlichen Zelle soll eine Dosis von 1 Gy ionisierender Strahlung über 35 DSB verursachen, die bei fehlerhafter Reparatur oder falscher Endverknüpfung zu Chromosomenaberrationen und genomischer Instabilität führen können⁴. So werden bei einer Reihe von autosomal-rezessiv vererbten Krankheiten Defekte in Sicherheits- und Reparaturmechanismen beschrieben, bezeichnet als Chromosominstabilitätssyndrome.

1.2 Chromosominstabilitätssyndrome

Chromosomale Instabilitätssyndrome sind auf zellulärer Ebene durch eine gehäufte spontane und auch durch Mutagene oder Strahlung induzierbare Brüchigkeit der Chromosomen gekennzeichnet⁵⁻⁷. Zu ihrer Gruppe gehören unter anderem: Nijmegen Breakage Syndrom (NBS), Ataxia Telangiectasia (A-T), und AT-ähnliche Erkrankung (ATLD). So führt eine hypomorphe Mutation im ATM-Gen zu Ataxia teleangiectasia, im MRE11-Gen zu Ataxia telangiectasia-ähnlichen Erkrankung und im Nibrin-Gen NBN zum Nijmegen Breakage Syndrom. Bei einem Vergleich in der Tabelle Nr. 1 zeigt sich, dass viele zellulären Merkmale von Nijmegen Breakage Syndrom und Ataxia Telangiectasia übereinstimmen, wie Strahlenempfindlichkeit, Chromosominstabilität und Rearrangements, Radioresistente DNA-Synthese und Zellzyklusdefekte.

Tabelle 1: Chromosominstabilitätssyndrome mit den sich überschneidenden Symptome (NBS: Nijmegen Breakage Syndrom, A-T: Ataxia telangiectasia, ATLD: Ataxia telangiectasia-ähnliche Erkrankung).

Merkmale	NBS	A-T	ATLD
Radiosensitivität	+	+	+
Chromosomabberationen	+	+	+
Tumorprädisposition	B- & T-Zell-Lymphome	T-Zell-Lymphome	Nicht bekannt
Mikrozephalie	Immer	-	-
Mentale Retardierung	+/-	Selten	Selten
Gesichtsdysmorphien	Immer	-	-
Wachstumsretardierung	Oft	Selten	-
Immundefizienz	Überwiegend	Oft	Selten
Hautpigmentation	Oft	Oft	Nicht bekannt
Ataxie	-	Immer	Moderat
Telangiectasie	-	Immer	-
α-Protein Erhöhung	-	Immer	Gelegentlich

1.3 Das klinische Bild vom Nijmegen Breakage Syndrom

Das Nijmegen Breakage Syndrom (NBS; OMIM 251260) ist eine sehr seltene, autosomal rezessive Erkrankung, die zum ersten Mal 1981 von Weemaes et al. anhand zweier Jungen mit Mikrozephalie, mentaler Retardierung, Wachstumsverzögerung und

Immundefekten beschrieben wurde⁸. Derzeit sind etwa 100 betroffene Familien bekannt, von denen die meisten in Polen, Tschechien und der Ukraine leben. So liegt die Heterozygotenfrequenz für die so genannte slawische Mutation in Polen, Tschechien und der Ukraine etwa bei 1:170 Neugeborenen.

Die klinische Ausprägung des Nijmegen Breakage Syndroms ist variabel; Hauptsymptome sind frontal betonte Mikrozephalie mit progressiver mentaler Retardierung⁹, Minderwuchs, Immundefizienz, eine hohe Sensibilität der Zellen gegenüber ionisierender Strahlen und eine Prädisposition für Tumoren¹⁰.

Phänotypisch auffällig bei Patienten mit Nijmegen Breakage Syndrome ist ihre Gesichtsmorphologie, gekennzeichnet durch große, tiefsitzende Ohren, ein fliehendes Kinn ebenso wie eine fliehende, flache Stirn, schräg ansteigende Lidspalten und ein prominentes Mittelgesicht. Diese charakteristischen Merkmale treten in den ersten drei Jahren in Erscheinung. Das Geburtsgewicht von Kindern mit NBS liegt normalerweise unter dem Durchschnitt; der Minderwuchs manifestiert sich häufig erst im frühen Kindesalter und trotz entsprechender Wachstumsrate bleiben die betroffenen Individuen klein für ihr Alter¹¹. Häufig gibt es begleitende Hauterscheinungen wie "Café au lait"-Flecken, Vitiligo, kutane Teleangiectasien und Pigmentflecken der Retina¹², sowie kongenitale Fehlbildungen wie Klino- und Syndaktylien und Atresien¹⁰.

In fast allen Fällen zeigen sich eine Mikrozephalie, die in 75% der Fälle bei der Geburt vorhanden ist, und eine Abnahme der intellektuellen Fähigkeiten, so dass im Alter von zehn Jahren eine leichte bis moderate geistige Behinderung vorliegt¹³.

Auffällig sind häufig wiederkehrenden Infektionen wie Pneumonien und Bronchitiden, die zu Lungenversagen und Tod führen können. Auch Diarrhöen und Infektionen des Urogenitaltraktes treten gehäuft auf¹⁴. Dies scheint bedingt durch eine sowohl zelluläre als auch humorale Immundefizienz. Die Mehrzahl der Patienten zeigt einen erniedrigten IgA und IgG-Serumspiegel bei meist normalem IgM-Level^{15, 16}. Der Klassenwechsel von Immunglobulinen scheint defekt¹⁷.

Die Störung des zellulären Immunsystems ist gekennzeichnet durch eine Lymphopenie mit niedrigen CD3+- und CD4+-Helferzellzahlen mit reduziertem CD4+/CD8+-Quotient¹⁸. Hingegen scheint die V(D)J-Rekombination nicht betroffen zu sein^{17, 19}. Auch hier kommt es physiologischerweise zu DSB, um eine möglichst breite Diversität

von Immunglobulinen und T-Zell-Rezeptoren bereitzustellen²⁰. Neben gehäuft Translokationen in den Immunglobulin-Genen wurden diese auch bei der V(D)J-Rekombination im T-Zell-Rezeptor-Locus beobachtet^{21, 22}; somit könnte Nibrin eine Bedeutung für die Proliferation und das Überleben von Lymphozyten haben.

Fast die Hälfte der Patienten entwickelt vor dem 20. Lebensjahr bösartige Tumoren, somit die primäre Todesursache bei NBS. Insbesondere großzellige B-Zell-Lymphome, untypischerweise bereits im Kindesalter, T-Zell-Lymphome und Leukämien treten auf²³⁻²⁵. Dies ist in einer fehlerhaften DNA-Reparatur begründet, die über Mutationen die Entwicklung von Tumoren beschleunigt²⁶.

Hinzu kommt bei Patientinnen aufgrund einer Ovariendysgenese mit fehlender Oogenese eine Infertilität. In Mausmodellen wurden eine veränderte Spermato- und Oogenese beobachtet^{27, 28}, und es erscheint auch plausibel, dass Nibrin wichtig für die homologe Rekombination während der Meiose ist, weil auch hier DSB verarbeitet werden müssen²⁹⁻³¹.

Heterozygote Individuen sind phänotypisch asymptomatisch, wobei eine Tendenz zu Chromosom- und Chromatidbrüchigkeit und Rearrangements bei leichter genetischer Instabilität der Lymphozyten gefunden wurde³². Ebenso wie Patienten, die heterozygot sind für die ATM-Mutation, eine Prädisposition für Brustkrebs und Leukämien aufweisen, liegt bei heterozygoten Trägern der häufigsten NBN-Mutation ein erhöhtes Risiko für eine Tumorentwicklung vor³³⁻³⁷. So könnte Nibrin ein haploinsuffizientes Tumorsuppressor-Gen sein, wobei die Dosis der Nibrinexpression entscheidend für die Entstehung von malignen Erkrankungen ist. Durch die Haploinsuffizienz könnte es vermehrt zu Aberrationen und damit zu einem erhöhten Tumorrisiko kommen, da die Schutzfunktion Nibrins als Tumorsuppressor nicht ausreichend ausgeübt werden würde³⁸. Je geringer die Expression von Nibrin, desto eher scheinen so Tumoren zu entstehen²⁶.

Derzeit gibt es keine kausale Therapie des Nijmegen Breakage Syndroms. Schwerpunkte in der Behandlung sind neben größtmöglichem Verzicht auf Strahlung und Chemotherapie zum einen die Früherkennung von malignen Erkrankungen, zum anderen die Prophylaxe und symptomatische Therapie von Infektionen.

1.4 Die Molekularbiologie Nibrins

Aufgrund der immunologischen, chromosomalen und zellulären Übereinstimmungen mit Ataxia teleangiectasia wurde NBS lange Zeit als eine Variante von AT angesehen^{39, 40}. Hierbei kommt es zu einer fehlenden Synthese des vollständigen Proteins ATM. Allerdings zeigten sich bei NBS nicht die AT-typischen Symptome wie zerebelläre Ataxie, apraxische Augenbewegungen oder erniedrigter Alphafetoproteinspiegel. Durch Kopplungsanalysen wurde bewiesen, dass der Genort 11q22-q23 von AT als Locus für NBS ausgeschlossen werden konnte^{11, 14, 41-43} und 1997 wurde das NBN-Gen (OMIM 602667) auf Chromosom 8q21 lokalisiert^{44, 45}. Unabhängig und zeitgleich wurden dann 1998 die genaue Basensequenz und verschiedene Mutationen identifiziert und eine Charakterisierung von Nibrin veröffentlicht^{46, 47}.

NBN ist bis heute das einzige Gen, das Nijmegen Breakage Syndrom verursacht, und enthält insgesamt 16 Exons. Die meisten Patienten aus Polen, Tschechien und der Ukraine sind homozygot für die Mutation 657del5, die mit über 90% am häufigsten auftritt und als slawische Gründermutation bezeichnet wird. Diese wurde als ein fünf Basenpaare umfassender Verlust (ACAAA) im Exon 6 identifiziert. Die Deletion führt zu einem Frameshift (Leserasterverschiebung) und einem vorzeitigen Abbruch der Translation des Genprodukts, so dass statt einem vollständigen Protein nur Proteinfragmente gebildet werden^{47, 48}.

In Zellen mit der 657del5 Mutation wurden ein 26 kDa, N-terminales Peptid, welches die FHA- und BRCT-Domänen enthält, und ein 70 kDa Peptid gefunden, welches durch einen internen Translationsstart generiert wird und die ATM- und MRE-Bindungsregionen enthält. Diese durch hypomorphe Mutation entstandenen Fragmente gewährleisten das Überleben und verringern wahrscheinlich den Schweregrad der Erkrankung^{48, 49}; denn eine Nullmutation, bzw. ein kompletter Verlust führen zu früher embryonaler Letalität in der Maus⁵⁰. Allerdings besitzen sie nur partielle Funktionen, so dass es zu verschiedenen Störungen in der Zellzykluskontrolle und bei der DNA-Reparatur kommt. So korrelieren niedrige Level des 70 kDa Peptid-Fragmentes mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von Tumoren, insbesondere von Lymphomen, und hohe Level verlängern die Zeit bis zu ihrer Genese. Mittlerweile wurden zehn weitere, krankheitsverursachende Mutationen identifiziert, aufgelistet in

Einleitung

der Tabelle Nr. 2 und veranschaulicht in der Abbildung Nr. 1, von denen viele in einem verkürzten Nibrin-Proteinfragment resultieren ^{32, 51-54}.

Tabelle 2: Mutationen im Gen Nibrin, modifiziert nach Patrick Concannon und Richard Gatti, <http://www.geneclinics.org/profiles/nijmegen>

Mutation	Nukleotid-änderung	Betroffenes Exon	Folge der Mutation	Herkunft
657del5	657-661delACAAA	6	Frameshift	Slawisch
643C→T	C→T bei 643	6	R215W	Slaw./Russisch
681delT	681-682delT	6	Frameshift	Russisch
698del4	698-701delAACA	6	Frameshift	Englisch
742insGC	742-742insGC	7	Frameshift	Italienisch
835del4	835-838delCAGA	7	Frameshift	Italienisch
842insT	842-842insT	7	Frameshift	Mexikanisch
900del25	900-924del25	8	Frameshift	Marokkanisch
976C→T	C→T bei 976	8	Q326X	Niederländisch
1089C→A	C→A bei 1089	9	Y363X	Pakistanisch
1142delC	1142-1143delC	10	Frameshift	Kanadisch

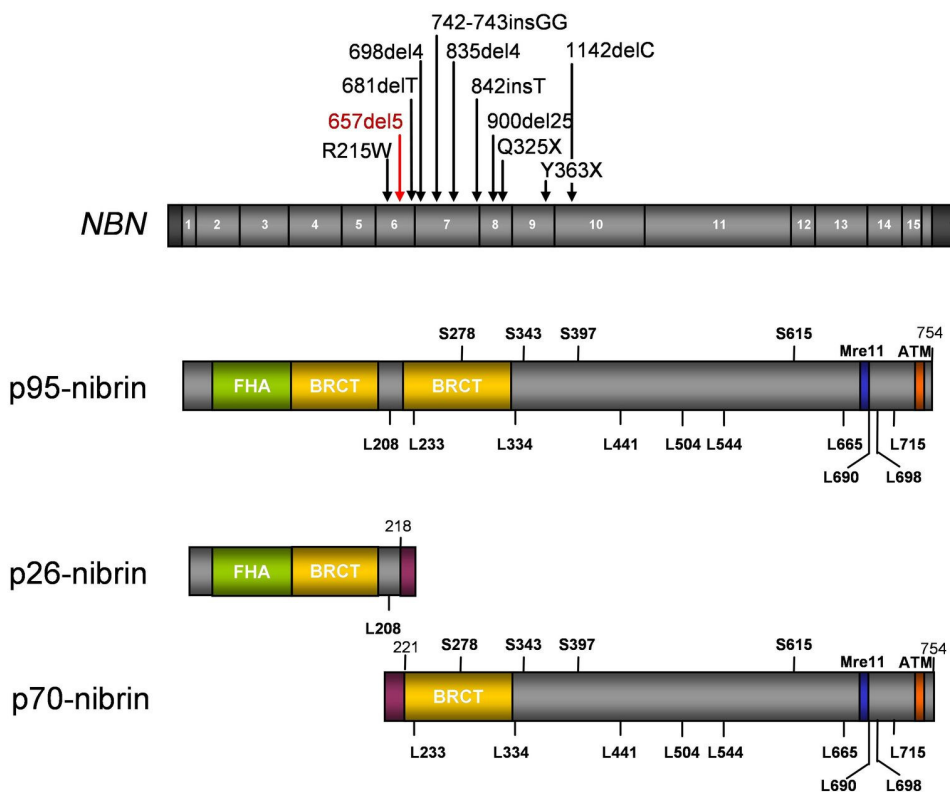


Abb. 1: Schematische Struktur des Proteins Nibrin mit Positionen der Mutationen und seiner Domänen.

Nibrin besitzt drei funktionelle Regionen: am N-terminalen Ende befinden sich die FHA (fork-head-associated) und die BRCT (breast-cancer-carboxy-terminal) Domänen, am C-Terminus die MRE11-Bindungsregion und im Zentrum die Serinphosphorylierungsstellen.

Das Produkt des NBN-Gens Nibrin (auch p95 oder Nbs1) von 85 kDa Molekulargewicht und 754 Aminosäuren wird ubiquitär exprimiert. Wie dargestellt in der Abbildung Nr. 1 besitzt Nibrin zwei funktionelle N-terminale Proteindomänen, die Homologien zu bereits bekannten Domänen aufweisen: eine „fork-head associated“ (FHA)-Domäne und eine „breast cancer carboxy-terminal“ (BRCT)-Domäne. C-terminal ist eine hMRE-Bindungs-Domäne für die Lokalisation des Rad50/Mre11/Nibrin-Komplexes an DSB der DNA im Zellkern verantwortlich. In der zentralen Region befinden sich mehrere Serinmoleküle (SQ-Motive) als ATM-Phosphorylierungs-Region.

Diese N-terminalen Domänen (FHA und BRCT) scheinen die T-Zell- und Oozyten-Entwicklung zu sichern ²³, eine Rolle für die Funktion des intra-S- und G2/M-Checkpoints zu spielen und die Interaktion Nibrins mit MDC1 und γ H2Ax zu gewährleisten ⁵⁵. Durch die C-terminalen Regionen kann die genomische Stabilität aufrechterhalten werden und die Apoptose nach ionisierender Strahlung eingeleitet werden ^{56, 57}.

Nibrin wird zwar in allen Geweben während der Embryogenese der Maus exprimiert, ist jedoch besonders reichhaltig in Geweben zu finden, die eine hohe Proliferationsaktivität aufweisen, wie Testes, Thymus, Milz, Telenzephalon, Leber, Lunge, Niere und Darm ⁵⁸. Somit wurde Nibrin nicht nur als Teil des DNA DSB-Reparaturkomplexes gesehen, sondern auch als funktionelles Protein in der Embryogenese.

1.4.1 Nibrin und DNA-Reparatur

Aufgrund der phänotypischen Ähnlichkeiten zwischen AT und NBS wurde angenommen, dass es sich bei den dazugehörigen Genen um Gene handelt, deren Produkte an einem Multiproteinkomplex, hier der trimere Doppelstrangbruchreparaturkomplex mit MRE11 und RAD50, mitwirken ^{46, 59}.

Eukaryotische Zellen besitzen verschiedene Mechanismen, um Schäden der DNA, wie Doppel- und Einzelstrangbrüche und Basenmutationen, zu reparieren. Vor allem Doppelstrangbrüche (DSB) sind für das Überleben der Zelle gefährlich, da sie zu Chromosomenbrüchen und genetischen Imbalancen führen können und so die erhöhte

Tumorinzidenz bei einigen Chromosominstabilitätssyndromen erklären. DSB werden häufig durch ionisierende Strahlung erzeugt, treten aber auch unter physiologischen Bedingungen im Rahmen der genetischen Rekombination während der Meiose und der V(D)J-Rekombination der Immunglobulinen und T- und B-Zell-Rezeptorgene auf. Die Zelle reagiert auf DSB mit einem Zellzyklusarrest und der Initiierung von differenzierten Reparaturmechanismen. Entscheidende Reparaturmechanismen sind bei DSB vor allem die homologe Rekombination (HR) und die nicht-homologe Endverknüpfung (NHEJ), beide dargestellt in der Abbildung Nr. 2.

Das Reparaturprinzip beim NHEJ beruht auf der einfachen Verknüpfung der beiden freigewordenen DNA-Enden, durchgeführt von einem Komplex aus Ku-Heterodimeren, DNA-PKinasen und dem XRCC4/Ligase4-Komplex⁶⁰. Da dieser Reparaturmechanismus zyklusunabhängig ist und auch bei physiologischen Vorgängen zum Einsatz kommt, stellt er den Hauptreparaturweg beim Säugetier dar, insbesondere vor der DNA-Replikation.

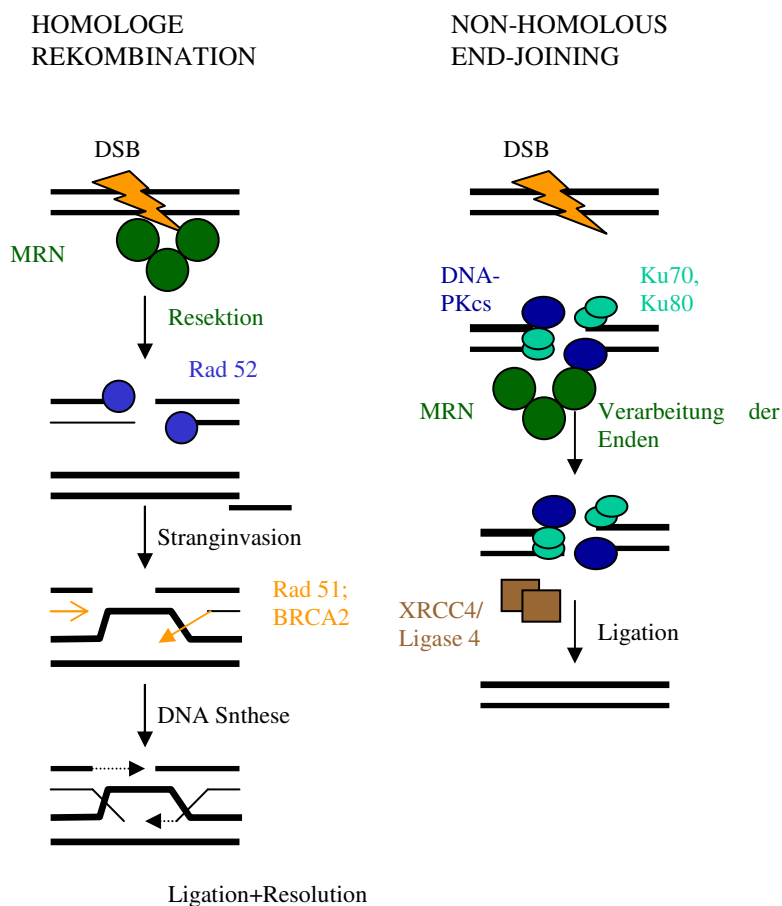


Abb. 2: Vereinfachte Darstellung der beiden Reparaturmechanismen Homologe Rekombination und die Verknüpfung freier Enden (Non-homologous end-joining)

Bei der homologen Rekombination wird der homologe Chromosomabschnitt der Schwesterchromatide als Matrize für die Reparatur benutzt. Sie kommt vorwiegend in der S- und G2-Phase des Zellzyklus zum Einsatz, d.h. während oder nach der DNA-Synthese, in der sich die neu synthetisierten, identischen Erbinformationen in unmittelbarer Nähe befinden. Nibrin scheint an der Verarbeitung des DSB zu einem Einzelstrang mit 3'-Überhang beteiligt zu sein, so dass sich dieser an die intakte homologe Doppelhelix anlagern kann. Außerdem hält der MRN-Komplex die DNA-Enden zusammen, so dass eine Polymerase die korrekte Basenabfolge meist ohne Basenpaarverlust kopieren kann⁶¹⁻⁶³. In NBN-defiziente Hühnerzellen wurde eine Reduktion der homologen Rekombination nach Mitomycin C nachgewiesen^{17, 64}. Somit scheint der MRN-Komplex an beiden Reparaturmechanismen mitzuwirken^{65, 66}.

Entscheidend für die Aktivierung dieser Vorgänge und den Ablauf der Reparatur sind Signal-Transduktions-Kaskaden, bei denen der DSB von Sensoren erkannt, das Signal von Transducer-Proteinen verstärkt und an die Effektoren weitergeleitet wird, welche die nachfolgenden Reaktionen einleiten^{67, 68}. Der MRN-Komplex, bestehend aus Nibrin, MRE11 und RAD50, scheint die Funktion eines Sensors für DSB durch γ -Strahlung inne zu haben. Dessen Rolle ist eng verknüpft mit der Kinase ATM und beide, Nibrin und ATM, beeinflussen sich gegenseitig.

Zum einen wurde belegt, dass nach ionisierender Strahlung Nibrin von ATM phosphoryliert wird⁶⁹, und gezeigt, dass die Antwort auf IR auch eine Aktivierung des S-Phase-Checkpoints und die Formation von MRN-Foci, sichtbar im Lichtmikroskop, im Nukleus beinhaltet⁷⁰. Dies positioniert Nibrin in der Reparaturkaskade unterhalb ("downstream") und abhängig von ATM⁷¹⁻⁷³.

Zum anderen scheint Nibrin unabhängig von ATM zum Ort der DNA-Schädigung rekrutiert zu werden, die Aktivierung und Autophosphorylierung von ATM zu stimulieren und die ATM-bedingte Phosphorylierung anderer Substrate zu modulieren, folglich unabhängig und "upstream" von ATM zu agieren^{23, 57, 74-78}. In Patientenzellen wurde eine teilweise eingeschränkte ATM-Aktivierung gefunden^{79, 80} und der Zellkontrollpunktdefekt scheint weniger stark ausgeprägt zu sein als in ATM-Zellen⁸¹.

Da Nibrin als ATM-Modulator fungiert, wird in NBN-Knockout-Zellen auch eine reduzierte ATM-abhängige Phosphorylierung des Histons γ H2AX beschrieben⁸². Durch die Interaktionen der FHA/BRCT-Regionen mit γ H2AX wird Nibrin zusammen mit

MRE11 und RAD50 zu den DS-Bruchstellen gelenkt und markiert diese^{64, 83, 84}. MRE11 und RAD50 werden durch Nibrin aus dem Zytoplasma in den Nukleus reloziert und interagieren zu einem Komplex, dem MRN-Komplex, der nukleare Foci am Ort des DNA-Schadens formt^{46, 85}.

Ein funktioneller MRN-Komplex, vor allem ein vorhandener C-Terminus mit der ATM-Interaktionsdomäne, scheint Voraussetzung für eine regelrechte ATM-Rekrutierung und Aktivierung durch Autophosphorylierung und Monomerisierung von ATM⁵⁷. Denn ATM liegt in der Zelle anfänglich als inaktives Dimer vor^{86, 87} und die Aktivierung von ATM ist stark beeinflusst von der Anwesenheit des MRN-Komplexes⁸⁸⁻⁹⁰.

Die Komponente MRE11 besitzt verschiedene enzymatische Funktionen, u.a. eine Exonuklease, eine Endonuklease und die Fähigkeit zur Entwindung des Doppelstranges^{91, 92}. RAD50 ist wichtig für die Aufrechterhaltung der Chromosomstruktur, die Entwindung der DNA zur ATM-Stimulierung⁹³ und für die Formation zur Überbrückung des Bruches⁵⁹. Mutationen, die einen totalen Funktionsverlust eines dieser Proteine bedingen, führen zu embryonaler Letalität in der Maus^{50, 94, 95}.

Nach Bestrahlung unterbleibt in NBS-Zellen der Vorgang der Komplexrekrutierung und Foci-Bildung an den DSBs, die Proteine RAD50 und MRE11 bleiben über das Zytoplasma verteilt⁷⁹.

Nach der Foci-Bildung des Komplexes kommt es nun zur Rekrutierung weiterer Proteine zur DS-Bruchstelle und deren aktivierende Phosphorylierung wie BRCA1, p53, CHK2, Smc1. Daraufhin kann mit Hilfe weiterer Effektoren die DNA-Reparatur ausgeführt werden.

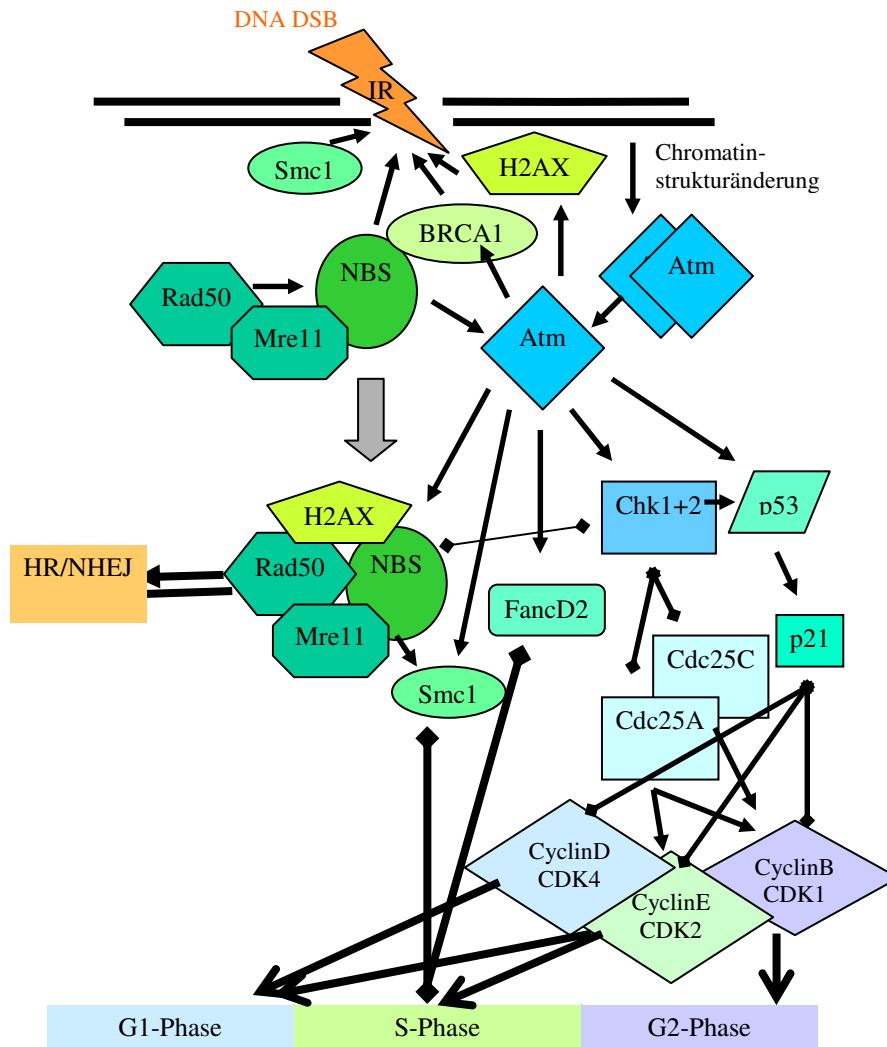


Abb. 3: Model für eine durch ionisierende Strahlung induzierte Signaltransduktion. Der MRN-Komplex lokalisiert sich am Doppelstrangbruch, es folgen die Rekrutierung und Autophosphorylierung von ATM zu aktiven ATM-Monomeren. Mehrere Proteine werden zum DSB rekrutiert und durch ATM-abhängige Phosphorylierungen aktiviert.

1.4.2 Nibrin und die Checkpoints

Der MRN-Komplex hat neben der beschriebenen Rolle als Caretaker bei der Reparatur von Doppelstrangbrüchen auch eine wichtige Bedeutung als Modulator der Zellzykluskontrolle. Allgemein wird der Zyklus der Zelle in vier Phasen unterteilt: die G1-Phase, die S-/Synthese-Phase mit der Replikation der DNA, die G2-Phase sowie die Mitose (Kernteilung). Um Zeit für eine akkurate DNA-Reparatur sicherzustellen und das Eintreten defekter DNA in die nächste Phase zu verhindern, erfolgt die Arretierung des Zellzyklus an den Checkpoints; gegebenenfalls wird die Apoptose eingeleitet.

Es werden mindestens drei Kontrollpunkte unterschieden: der G1/S-Phase-Checkpoint, der Intra-S-Phase-Checkpoint und der G2/M-Phase-Checkpoint vor Eintritt in die Mitose.

Dirigiert werden der Zellzyklus und seine Kontrollpunkte von der Proteinfamilie der Cycline, ihren Bindungspartnern, den Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK), und den Kinasen-inhibierenden Proteine (CKIs), welche in die universalen Cip/Kip- Inhibitoren (p21, p27, p57) und die spezifischen CDK4/6-Inhibitoren wie p15, p16, p18, p19 unterteilt werden. Die Inhibitoren binden bevorzugt an den Komplex aus CDK und Cyclin und bewirken bei Bedarf einen Zellzyklusarrest.

Jede Zyklusphase ist durch ein einzigartiges Netzwerk von aktivierten Cdk's und Cyclinen charakterisiert, die eine phasenabhängige Periodizität ihrer Expression und Aktivität zeigen; so ist die G1-Phase abhängig von der Aktivierung von Cdk2-4, Cdk6 und Cdk8 und von Cyclin vom D-Typ (D1, D2, D3) und Cyclin E. Diese stimulieren Zellen im Ruhezustand zum Eintritt in den Zellzyklus, regulieren die Proteolyse und entscheiden über den Eintritt der Zelle in die nächste Phase. Die S-Phase wird von den Proteinen Cyclin A und Cyclin B und von der Cdk2 dominiert, die G2-Phase von den Cyclinen B und A und Cdk1.

Die Daten zur Rolle Nibrins bezüglich des G1/S-Kontrollpunktes sind widersprüchlich. Dieser blockiert die Progression der geschädigten Zelle in die S-Phase. Als Restriktionspunkt bezeichnet entscheidet sich hier, ob ein neuer Teilungszyklus oder ein permanenter Arrest stattfindet. Einige Arbeitsgruppen beschreiben einen gestörten G1/S-Checkpoint in NBS-Zellen mit z.T. verzögerter p53 Akkumulation^{52, 96, 97}, andere eine normale Phasenarretierung. Anhand eines Mausmodells wurde sogar eine verstärkte Arretierung im Vergleich mit Kontrollzellen publiziert⁹⁸⁻¹⁰⁰.

Dies scheint begründet in zwei distinkten, parallelen Signalwegen des G1/S-Phase-Checkpoints: der erstere ist bedeutend schneller aktiviert, aber auch rascher deaktiviert und verhindert über die Faktoren CHK2, Cdc25a, CyclinE/Cdk2, das Protein Retinoblastom und den Transkriptionsfaktor E2F eine Initiation der DNA-Synthese^{101, 102}. Der zweite Signalweg vom verzögerten Typ verhindert permanent eine DNA-Synthese, indem durch eine erhöhte Expression von p21, über CHK1+2, ATM und Hochregulierung vom Transkriptionsfaktor p53¹⁰³⁻¹⁰⁶. Zudem interagiert p21 mit dem

DNA-Polymerase-Cofaktor PCNA und kann so den G1-Arrest noch verstärken, welches später noch ausführlich diskutiert werden wird.

Der intra-S-Phase-Checkpoint reguliert die Initiation der DNA-Replikation. Im Gegensatz zu den anderen beiden Kontrollpunkten scheint der S-Phase-Checkpoint nur eine vorübergehende Hemmung, bzw. verlangsamte Zellzyklusprogression bewirken zu können und unabhängig von p53 zu agieren. Bei Fehlfunktion eines oder mehrerer Proteine kommt es zur radioresistenten Synthese (RDS), einer fehlenden, regulierenden Hemmung der DNA-Synthese bei nachweisbaren DNA-Schäden nach ionisierender Strahlung. Dieses Phänomen wird sowohl bei NBS als auch bei AT beobachtet und die Funktion Nibrins bei diesem Kontrollpunkt scheint gesichert ^{97, 107}.

Es können mindestens zwei parallele, kooperierende intra-S-Phase-Checkpoint-Regulierungen unterschieden werden, da Zellen mit einer partiellen RDS entweder keine Degradierung von Cdc25a oder keine Phosphorylierung von Nibrin zeigten ⁸¹.

Einerseits erfolgt eine Aktivierung des Checkpoints über die Phosphorylierung von CHK2 an Serin 68 durch ATM und dann über Cdc25a und Cdk45 ^{73, 108}.

Zum anderen interagiert der N-Terminus von Nibrin mit E2F1, und E2F1 dirigiert den MRN/E2F1-Komplex zum DNA-Replikationsausgangspunkt ⁴⁹. Dort kommt es über die ATM-Phosphorylierung an den Serinen 278 und 343 durch Nibrin zur Phosphorylierung von Smc1, welches eine Blockierung der Replikation bewirkt ^{81, 109}. Diese Phosphorylierung von Smc1 ist sowohl Nibrin als auch BRCA1-abhängig, was auf derer beiden Funktion der ATM-Rekrutierung hindeutet ⁷⁹. Der MRN/E2F1-Komplex und die Phosphorylierung von Nibrin scheinen entscheidend für eine Unterdrückung der DNA-Replikation nach einer DNA-Schädigung zu sein. Da für die Interaktion mit E2F1 die N-terminalen Domänen benötigt werden, kommt es bei einer trunkeierten Mutation zum Verlust dieses Kontrollmechanismus.

Auch Nibrins Funktion im G2/M-Kontrollpunkt wird kontrovers behandelt, der letzten Möglichkeit, Schäden vor der Zellteilung zu reparieren. Hier lassen sich schnell aktivierte Mechanismen mit posttranslationalen Modifikationen von verzögert einsetzenden Mechanismen durch Transkriptionsänderungen unterscheiden. Bezüglich der Rolle Nibrins wird zum einen eine normale Arretierung in NBS- Lymphozyten beschrieben ^{110, 111}, bzw. kein G2/M-Defekt in primären NBS-Fibroblasten ^{98, 99}; zum

anderen zeigen NBS-Zellen schwere Checkpointdefekte und Nbn-nullmutante Mauszellen einen funktionslosen G2/M-Kontrollpunkt^{100, 112-114}. Diesbezüglich scheint wiederum das bei 657del5 NBS-Patienten exprimierte, verkürzte Nibrinfragment für eine teilweise Aufrechterhaltung der Funktion auszureichen²³.

1.4.3 Nibrin und Telomerinstabilität

Telomere, die Enden der Chromosomen, welche repetitive DNA-Sequenzen enthalten, sorgen für deren Schutz und Stabilität. Die natürliche Verkürzung bei der DNA-Replikation gleicht das Enzym Telomerase mit reverser Transkriptasefunktion aus. Es gibt Ähnlichkeiten zwischen den Telomeren und den DNA-Enden, die bei einem DSB entstehen. Auch überlappen sich einige der Proteine beider Mechanismen, wie beispielsweise der MRN-Komplex und das Ku Heterodimer¹¹⁵⁻¹¹⁷.

In einem Modell ist der MRN-Komplex zuständig für die Telomerenden, öffnet und modifiziert diese zu ssDNA-Enden, die dann als Primer fungieren und von der Telomerase verlängert werden können¹¹⁸⁻¹²⁰. In NBS- und AT-Zellen werden häufig Fusionen der Telomere und verkürzte Telomerenden beobachtet und NBS-Fibroblasten zeigen eine vorzeitige Telomer-Dysfunktion und Telomererosion, die mit der Seneszenz der Zellen korreliert^{82, 121, 122}. Deshalb wird angenommen, dass Nibrin mit Hilfe der Telomerase die Aufrechterhaltung der Telomere stabilisiert und dadurch Chromosomenanomalien und vorzeitiger Zellalterung entgegenwirkt¹²³.

1.4.4 Nibrin und Apoptose

Durch Bestrahlung kann neben den beschriebenen Reaktionen der Reparatur und des Zellzyklusarrests auch die Apoptose, der programmierte Zelltod, ausgelöst werden, wenn nämlich die Schäden irreparabel sind. Dies geschieht meist über ATM als Signalübermittler. Entweder wird über eine Stabilisierung des Tumorsuppressorproteins p53 die Transkription proapoptotischer Faktoren bewirkt^{67, 124}, oder sie wird p53-unabhängig über CHK2 und E2F1 eingeleitet¹²⁵. Die in NBS-Zellen beobachtete gestörte Apoptose-Initiierung und radioresistente Synthese erklären sich wahrscheinlich

mit der Rolle des MRN-Komplexes für die Aktivierung ATMs und Modulierung ATMs bezüglich dessen Bindung an spezifische Apoptoseproteine^{56, 126-128}.

Nibrin ist somit wichtig zur Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität, insbesondere in Antwort auf DSB, die durch exogene Faktoren, z. B. ionisierende Strahlung, als auch bei physiologischen Prozessen wie dem Ig-Klassenwechsel und der T-Zell-Rezeptor-Reorganisation auftreten, veranschaulicht in der Abbildung Nr. 4. Die Kontroversen der verschiedenen Publikationen deuten allerdings auf die Verfügbarkeit von multiplen Reparatursystemen hin und entstehen vermutlich auch durch Verwendung unterschiedlicher Zellarten.

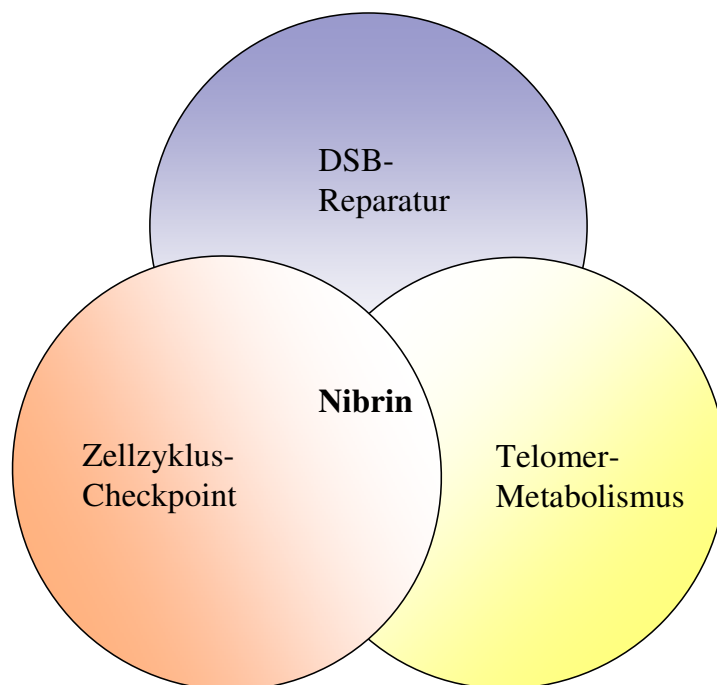


Abb. 4: Modell der bekannten Funktionen Nibrins.

Somit lassen sich einige Aspekte des klinischen Bildes von NBS erklären. Die Formation des MRN-Komplexes ist beeinträchtigt und damit dessen Funktionen in der Embryogenese, dem Zellwachstum, der Zellproliferation und der Meiose. Die defekten Reparaturmechanismen und fehlerhaft funktionierenden Zellzykluskontrollen in NBS-Zellen führen zu Reparaturfehlern, radioresistenter DNA-Synthese und genomischer Instabilität. Schwer geschädigte Zellen werden der Apoptose zugeführt und

verursachen so möglicherweise Minderwuchs und Mikrozephalie. Gleichzeitig erhöht eine behinderte Apoptose-Initiierung das onkogene Risiko. Ein Defekt in der Aufrechterhaltung der Telomerlänge bewirkt beschleunigte Seneszenz. Translokation, die Promotoren vor Protoonkogenen versetzen, begünstigen eine Tumorgenese und alle diese Fehlfunktionen könnten ein erhöhtes Krebsrisiko verursachen. Die nachgewiesene Chromosominstabilität und ebenso die gehäuften Translokationen und Inversionen betreffen vor allem Genloci der Immunglobulin- und T-Zell-Rezeptor-Gene. Das Immundefizit mit erniedrigtem IgG und IgA aber unverändertem IgM-Spiegel lässt sich teilweise durch die defekte Funktion der NHEJ bei der V(D)J-Rekombination und Klassenwechsel-Rekombination erklären, ebenso die Ovarialdysgenese als Folge von fehlerhafter Meiose.

1.5 Die Mausmodelle

1.5.1 Konditionelle Nullmutante

Gentechnisch generierte Tiermodelle tragen zu einem besseren Verständnis der molekularen Mechanismen und der humanen Pathologie bei. Um die biologischen Funktionen von Nibrin zu verstehen und eindeutig zu klären, sind nullmutanten Zellen, also Zellen mit totalem Verlust der Genfunktion, hilfreich. Deshalb wurde von Dumon-Jones 2003 durch inaktivierende Insertion in Exon 6 des NBN-Gens versucht, homozygote, nullmutante Mäuse zu generieren. Dies resultierte in embryonaler Letalität, so dass stattdessen ein konditionelles „Knock-out-Modell“ generiert wurde¹¹³, um das Genom von Mäusen gezielt nach der Geburt zu modifizieren.

Dazu wurde das Cre/loxP-Rekombinations-System verwendet. Das relevante Enzym Cre Recombinase (cyclization recombination) ist ein 38 kDa Protein des Bakteriophagen P1. Cre katalysiert die Rekombination zwischen zwei 34 bp loxP (locus of crossing over of P1) Erkennungssequenzen, indem es die spezifischen loxP-Sequenzen bindet, die DNA zerschneidet und die beiden Seiten kovalent zusammenfügt. Abhängig von der Orientierung der loxP-Sequenzen zueinander und dem Ort ihrer Integration kann man durch Cre-vermittelte Rekombination eine Inversion, Exzision oder Translokation von DNA erzeugen; so kommt es bei gegensätzlicher

Orientierung zur Inversion, bei Sequenzen auf verschiedenen Molekülen zur Translokation.

Die Abbildung Nr. 5 zeigt schematisch das veränderte Nibrin-Gen. So wurde zum einen durch Insertion eine Neomycin-Resistenzkassette das Nibrin-allel inaktiviert (Nbn^{ins6}). Das von loxP-flankierte („gefloxte“) Exon 6 wurde aufgrund gleicher Orientierung der Sequenzen deletiert, um das Gen NBN durch Cre-vermittelte Exzision zu inaktivieren. Diese generierten heterozygoten Knockout-Mäuse sind lebensfähig und deren Zellen besitzen ein durch Insertion einer Neomycin-Resistenzkassette inaktiviertes Allel und ein von loxP-Sites gefloxtes Nibrin-Allel. Durch Cre-Rekombinase werden sie zu homozygot Null-mutierten Zellen.

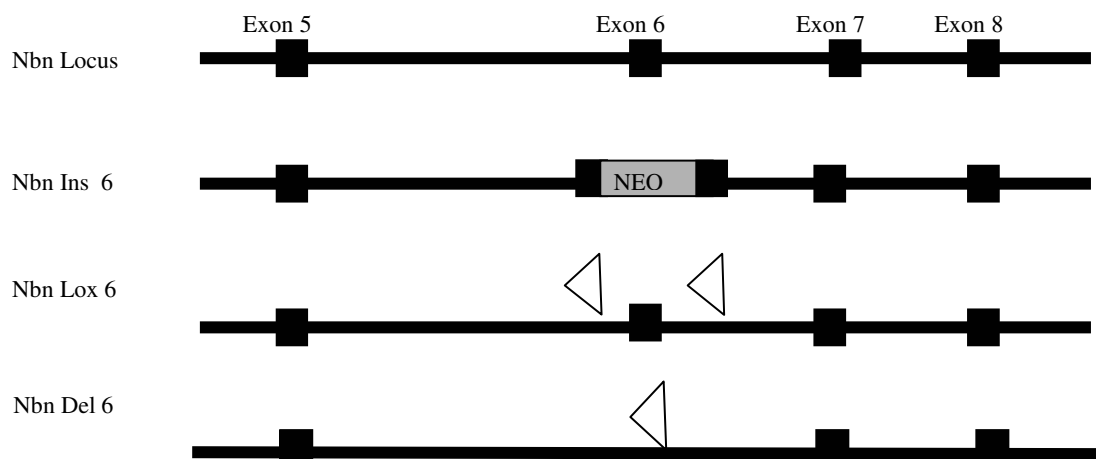


Abb. 5: Gezielte Markierung und Zerstörung des Nibrin-Gens. Der relevante Ausschnitt des Nbn-Locus ist abgebildet, die schwarzen Kästchen symbolisieren die Exons, die Dreiecke die loxP-Regionen. Nach Cre-Rekombinase vermittelter Deletion werden aus Allele mit flankiertem Exon 6 (Nbn^{lox-6}) deletierte Exon 6 (Nbn^{del6})-Allele gebildet. Verwendet wird außerdem ein Nbn-Allel mit Zerstörung des Exon 6 durch Insertion einer Neomycin-Resistenzkassette (Nbn^{ins-6}).

1.5.2 Weitere Mausmodelle

Neben unserem gibt es weitere Mausmodelle, die wertvolle Erfahrungen brachten und hilfreich für das Verständnis von NBS waren. Allgemein ist festzustellen, dass keines der publizierten Tiermodelle die humane Pathologie vollständig erschließt.

Zhu et al. entwickelten 2001 ein Mausmodell, in welchem durch Deletion des NBN Promoters, des Exon 1 und eines Teiles des Introns 1 ein kompletter Nibrin-Verlust

generiert wurde⁵⁰. Diese Nbn-nullmutanten Mäuse starben vor der Geburt und zeigten geringe embryonale Gewebeentwicklung. Daraus wurde geschlossen, dass es sich bei dem in NBS-Patienten beobachteten Phänotyp nicht um eine komplette Inaktivierung des Genproduktes handelt, sondern um eine hypomorphe Kürzung, die das Überleben des Individuums sichert. Auch wurden Übereinstimmungen mit den Null-Mutationen von MRE11 und RAD50 gefunden: diese zeigten ebenso embryonale Letalität, womit eine ähnliche Funktionsweise im Reparaturmechanismus wahrscheinlich ist^{94, 95}.

Aus diesen Überlegungen entstand 2002 durch gezielte Unterbrechung der N-terminalen Exons 2 und 3 des Nbn-Gens ein weiteres Mausmodell²⁷. In diesen Zellen wird ein Nibrinfragment von 75 kDa gebildet, welches somit der Situation im Menschen sehr ähnlich ist. Diese NBS-Mäuse überlebten die Embryogenese und wiesen viele Merkmale des humanen Mutationstyps auf: Neben Wachstumsretardierung und fehlender Oogenese waren sie immundefizient und hatten eine Prädisposition für Tumoren. Auf zellulärer Ebene fanden sich RDS, prolongierte G2-Akkumulation, vermehrt Translokationen im TCR-Loci und erhöhte p21-Spiegel. Weder Ig-Klassenwechseldefekte noch V(D)J-Rekombinations-Defekte wurden gefunden, und auch die Spermatogenese schien unbeeinträchtigt, welches bei AT-defizienten Mausmodellen nicht der Fall ist. Die Autoren folgerten, dass ATM und Nibrin sowohl in den gleichen Reparaturmechanismen - etwa der Aktivierung von CHK2 - wie auch in unterschiedlichen Signalkaskaden agieren, so dass es nur in Atm-defizienten Zellen aufgrund fehlerhafter Meiose zu blockierter Spermatogenese kommt.

Ein weiteres hypomorphes Mausmodell wurde von Williams et al. generiert¹⁰⁰. Die Exons 4 und 5 des Nbn-Gens wurden ersetzt und damit auch die BRCT- und FHA-Domänen zerstört. Das Nbn-Produkt ist ein 80 kDa Protein. Auch diese homozygot Nibrin-defizienten Mäuse waren lebensfähig und präsentierten Übereinstimmungen mit dem humanen Phänotyp: So kam es gehäuft zu Chromosomenaberrationen und RDS; der S-Phase-Checkpoint und der G2/M-Checkpoint schienen defekt und es wurde keine Foci-Formation detektiert. Jedoch entwickelten die Mäuse keine erhöhte Tumorgenese, keine Ovarialabnormalitäten und keine Immundefizienz. Gleichzeitig zeigte dieses Modell, dass Doppelmutanten, die sowohl Nbn- als auch ATM-defizient waren, nicht

überlebten und sich demnach wahrscheinlich die negativen Effekte der Mutationen addierten.

Difilippantonio et al. generierten 2005 ein transgenes Mausmodell, in dem ein humanes NBN-Gen mit der Mutation 657del5 das murine Nbn-Gen funktionell ersetzt ²³. Die entstehenden Mäuse wiesen keine embryonale Letalität und keine verstärkte Tumorzinzidenz, aber Chromosomaberrationen, T-Zell-Defekte, reduzierte IgG-Spiegel und Gonadendefekte auf. Die Autoren berichteten, dass das N-terminale Fragment mit den FHA- und BRCT-Domänen nicht essentiell sei für das Rekrutment des MRN-Komplexes zu den DSB. Ebenso kann ATM in hypomorphen Zellen aktiviert werden, CHK2 jedoch erst nach hohen Dosen ionisierender Strahlung. Demgegenüber sichert das C-terminale Ende mit der MRE-Bindungssequenz das Überleben und ist wesentlich für die Funktion des Intra-S-Phase-Checkpoints, welcher in diesem Mausmodell gestört war. Insgesamt führen so sowohl der reduzierte Spiegel des Nibrinfragments als auch die Fehlfunktion der FHA-Domäne zu den pleotropen Defekten in NBS-Patienten und erklären die unvollständige Penetranz der Erkrankung.

Frappart et al. kreierten ein Mausmodell, welches dem unseren entspricht, mit einer Nbn-Inaktivierung, die auf das zentrale Nervensystem beschränkt war ¹³. Die Mäuse überlebten und zeigten neben Wachstumsretardierung Akinese und zerebelläre Ataxia, Tremor und andere neuronale Auffälligkeiten. Die Autoren postulierten, dass Nibrin in proliferierenden Zellen überwiegend für die DNA-Reparatur zuständig ist, in postmitotischen Zellen dagegen auch für die Signalkaskaden, die Checkpointregulation und Interaktion mit ATM. So wird durch das Fehlen von Nibrin der ATM-p53-Signalweg aktiviert und es kommt zu einer verlangsamten Proliferation. Das hypomorphe Nibrinfragment in NBS-Patienten scheint die bei A-T und ATLD auftretenden neuronalen Defekte zu verhindern.

1.6 Die Proteomanalyse

Ein Hauptbestandteil dieser Arbeit ist die Proteomanalyse. Das Proteom bezeichnet die Gesamtheit aller Proteine, die zu einem bestimmten Zeitpunkt in Zelle, Gewebe oder Organismus vorhanden sind. Im Gegensatz zum Genom einer Zelle ist das Proteom

nicht statisch. So ergänzt die Proteomforschung das Gebiet der Genomforschung, denn Proteine werden durch posttranslationale Modifikationen, wie Glykosylierung, Phosphorylierung und Acetylierung, verändert. Außerdem ist die Biosynthese der Proteine zell- und gewebespezifisch und abhängig von äußeren Faktoren wie Stress, Temperatur oder Strahlung, das Proteom ist dynamisch und komplex. Denn jedes Protein wird mehrfach post-translational verändert mit Auswirkungen auf dessen Funktion. Oft kommt es zu Ubiquinierungen und Phosphorylierungen, was die Bindung anderer Proteine an die phosphorylierten Sequenzen begünstigt. Die Bestimmung dieser Proteine zu einem bestimmten Zeitpunkt ermöglicht die Analyse von spezifischen Signalwegen. Viele Proteine können zudem methyliert, acetyliert, glycosyliert oder oxidiert werden, wodurch sich die Komplexität der Proteomforschung erklären lässt.

Neben der eher geringen Korrelation zwischen Gentranskription und Proteinexpression, der multiplen posttranslationalen Modifikationen und Proteindegradationsabläufe ergeben sich hierdurch wichtige Hinweise für das Verständnis von Krankheiten, sowie Angriffspunkte für eine Therapie beziehungsweise Markeridentifizierung zur Diagnosefindung. So können über die genaue Analyse und Identifikation eines Proteins Informationen zur Herstellung spezifischer und effektivere Medikamente gewonnen werden, die dieses Protein dann beispielsweise inaktivieren können. Eine weitere Nutzungsmöglichkeit der Proteomforschung ist die Testung einer Erkrankung mittels spezifischen Protein-Biomarkern.

Somit ist die Expression auf Proteinebene möglicherweise informativer als auf mRNA-Ebene. Derzeit wird von 500 000 bis 1000 000 Proteinspezies ausgegangen, da aus einer proteincodierenden Sequenz mehrere Proteinformen synthetisiert werden können.

Um die vielseitigen Funktionen von Nibrin, dessen Auswirkungen auf das Proteom und die posttranslationale Modifikationen zu beleuchten, bieten sich Proteomanalysen an. Diese befassen sich mit Sequenzierung, Identifikation, Expression und weiterführend mit der Aufklärung und Struktur der Protein-Protein-Interaktionen, der verschiedenen Komponenten der Stoffwechselwege und molekularen Regelkreise.

Mit Hilfe der 2D-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2D-PAGE), einer Kombination aus isoelektrischer Fokussierung und SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, werden Proteine aus einem Proteom aufgetrennt und anschließend als Proteinexpressionsprofile dargestellt. Diese Technologie gründet vor allem auf einer

1975 entwickelten Methodik¹²⁹⁻¹³¹. So beruht die 1. Dimension auf einer chemischen Trennung hinsichtlich des isoelektrischen Punktes, die 2. Dimension auf einer physikalischen Trennung aufgrund des Molekulargewichtes. Danach erfolgt die Exzision und dann Identifizierung und Charakterisierung mittels der Massenspektrometrie¹³². Anschließend werden die Proteine mittels verschiedener Datenbanken identifiziert. So hat die Verwendung von Tiermodellen den Vorteil der überschaubaren Heterogenität und Proteinviefalt, und es handelt sich beim Vergleich zweier Proteome meist um quantitative Unterschiede der Spotintensität, und nicht um qualitative (An- oder Abwesenheit des Spots). Zudem sind die beschriebenen Nullmutationen nur in Tiermodellen möglich. Generell sollten die Ergebnisse durch Ergebnisse humaner Proteomanalysen bestätigt werden, jedoch sind Nullmutationen nur im Tiermodell wie hier möglich.

1.7 Zielsetzung

Noch immer gibt es viele offene Fragen bezüglich NBS und seiner klinischen Variabilität bei NBS-Patienten. Unklar sind die genauen Signalkaskaden und beteiligten Proteine an den verschiedenen Regulierungs- und Reparaturmechanismen.

Hauptziel dieser Arbeit ist deshalb die Identifizierung der modifizierenden Faktoren, die durch den Ausfall von NBN unmittelbar betroffen sind. Dies wird durch einen vergleichenden, nicht hypothesebestimmten Proteomik-Ansatz erreicht. Besonderes Interesse liegt auf der Untersuchung von krankheitsrelevanten Proteinen, die eine Rolle im DNA-Reparatur-Mechanismus, im Zellzyklusarrest und/oder bei der Seneszenz und der Apoptose der Zellen spielen. Ebenso ist die Beschreibung von Proteinen interessant, die prognostische Bedeutung für den Krankheitsverlauf oder die klinische Variabilität besitzen.

Verwendet werden heterozygote Mausfibroblasten unseres Mausmodells, die durch Cre-Rekombinase in vitro zu homozygoten nullmutanten Zellen modifiziert werden. Die Quantifizierung der Exon 6-Deletion wird mittels einer semiquantitativen PCR überprüft. Als Referenz dienen Wildtypzellen.

Zur Induktion von DSB und chromosomalen Aberrationen werden diese Fibroblasten mit unterschiedlichen Strahlendosen von ionisierender Strahlung behandelt. Publikationen zeigten, dass NBS-Lymphoblasten einen G2/M-Checkpoint-Defekt nach

geringer Strahlendosis aber nicht nach hoher Dosis aufwiesen¹³³ und dass p53-Phosphorylierungen durch ATM nur nach geringer Strahlendosis (1 Gy) Nibrin-abhängig scheinen, welches sich möglicherweise durch die Rolle des MRN-Komplexes in Form einer Amplifizierungsschleife zur ATM-Aktivitätssteigerung erklären lässt¹³⁴. Außerdem wurde beobachtet, dass NBS-T-Zellen 2 Gy IR mit unreparierten DSB überlebten¹³⁵. Ausgehend davon werden in dieser Arbeit Dosierungen von 0,5 Gy und 10 Gy gewählt und diese mit unbestrahlten Kontrollen verglichen. Mithilfe von Experimenten zur Nibrinexpression und zum Zellwachstum der Fibroblasten nach Exon6-Deletion durch die Cre Recombinase wird das Zeitfenster zur Bestrahlung ermittelt.

Um die Proteine zu isolieren und identifizieren, wird ein biochemischer Ansatz verwendet, die 2D Gel-Elektrophorese. Diese Methode ermöglicht die Differenzierung der einzelnen Proteine durch Auftrennung nach isoelektrischem Punkt und molekularer Masse auf einem 2D- Polyacrylamid-Gel. Anschließend können die Proteine durch Massenspektrometrie analysiert und die verschiedenen Proteome dargestellt werden. Durch den Vergleich der isogenen Zelllinien mit den Wildtyp-Kontrollzellen können Unterschiede ermittelt und die Proteinmuster verglichen werden. Die Identifizierung der differentiell exprimierten Proteine und die Diskussion einer möglichen Beteiligung an Mechanismen der DNA-Reparatur, Zellzykluskontrolle und Apoptose sollen einen Beitrag zum Verständnis des Nijmegen Breakage Syndroms liefern und einige der phänotypischen Merkmale näher beleuchten.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien & Zellkulturmedien

Durch homologe Rekombination wurden in der Arbeitsgruppe Mäuselinien generiert. Zum einen wurde in deren Genom das Exon 6 in einem Allel von zwei LoxP-Sequenzen flankiert, im anderen Allel durch Insertion einer Neomycin-Resistenzkassette inaktiviert. Aus Kreuzungen entstanden Mäuse mit $Nbn^{lox6/ins6}$ und $Nbn^{lox6/wt}$. Aus diesen Tieren und aus Wildtyp-Mäusen ($Nbn^{wt/wt}$) wurden durch Ohrbiopsien Zelllinien dermalen Fibroblasten etabliert, die spontan transformierten und in dieser Arbeit verwendet wurden.

Murine Fibroblasten von heterozygoten Mäusen ($Nbn^{lox6/ins6}$)

Murine Fibroblasten von homozygoten Mäusen ($Nbn^{wt/wt}$)

Murine Fibroblasten von heterozygoten Mäusen ($Nbn^{lox6/wt}$)

Die Medien und Produkte für die Zellkulturen wurden von PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich, Gibco BRL GmbH, Eggenstein und Pan Biotech GmbH bezogen.

2.1.2 Plasmid

Das Plasmid pTriEx wird von Peitz et al. 2002 beschrieben und zur bakteriellen Transformation in dieser Arbeit verwendet.

2.1.3 Chemikalien

Nicht gesondert aufgeführte Standardchemikalien stammen von den folgenden handelsüblichen Firmen wie Biorad Laboratories, Hercules, CA, USA; Merck, Darmstadt; Carl Roth, Karlsruhe; und Serva, Heidelberg.

Agarose	Gibco BRL GmbH, Eggenstein
dNTPs (je 2,5 mM)	Rapidozym, Berlin
Ethanol 100 Vol-%	Herbeta-Arzneimittel, Berlin
Pharmalyte	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
NuPage	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Sephadex	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Silikonpaste	GE Bayer Silicone, Baysilone, Leverkusen
Sodium thiosulfate Pentahydrate	Fluka BioChemika, Buchs, Schweiz
Thimerosal	Sigma, Steinheim
Trizma base	Sigma, Steinheim

2.1.4 Enzyme & Antikörper

Proteinase K	Roche / Boehringer Mannheim GmbH
Taq-DNA-Polymerase	Perkin Elmar, Foster City, CA, USA
DNA-Polymerase	Gibco BRL GmbH, Eggenstein
Kaninchen Anti-Maus p95 AK	Pineda-Antikörper-Service, Berlin
Anti-Kaninchen AK	Amersham plc/GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
β -Actin Maus-AK	abcam plc, Cambridge, UK
Anti-Maus AK	Amersham plc, Buckinghamshire, UK
Rainbow Marker RPN800	Amersham plc, Buckinghamshire, UK

2.1.5 Puffer & Lösungen

Bradfordlösung	100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 in 50 ml 95% Ethanol und 10 ml 86,5% H ₃ PO ₄ , auf 1000 ml mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt
Carrier Ampholyt Mix	1x Servalyte (pH 2-11), 1x Pharmalyte (pH 3,5-10), 3x Pharmalyte (pH 4-6,5), 2x Pharmalyte (pH 5-8), 1x Pharmalyte (pH 6,5-9) ad 48,75 ml MilliQ H ₂ O
Coomassiefärbung	0.125% Coomassie Brilliant Blue, 50% Ethanol, 7% Essigsäure
Entwickler/Developer A+B+C	AGFA, Köln

Fixierkonzentrat ASEFOFIX	Adefo-Chemie, Dietzenbach
Inkubationslösung 2D-Elektrophorese	125 mM Trizma, 40% Glycerol, 65 mM DTT, 3% SDS
Gelladepuffer Agarose-Dye	20% Ficoll 400, 0,005% Xylencyanol FF, 0,005% Bromphenolblau, 20% EDTA
Laufpuffer 2. Dimension	Tris Base 0,3%, Glycin 1,44%, SDS 01%
PCR-Puffer 10x (mit Mg)	Perkin Elmar, Foster City, CA, USA
Polyacrylamid-Gelelektrophoreselösung	10 ml Rotiphorese A, 5 ml Rotiphorese B, 5 ml 5x TBE, 12µl Temed, 0,25 ml APS 10%, 5 ml H ₂ O
Ponceau S-Lösung	0,1% in Essigsäure
Schutzlösung	6 g Harnstoff, 1 g Glyzerin, ad 19 ml MilliQ H ₂ O, davon 7,6 ml mit 0,4 ml Servalyte (pH 2-4)
SDS-Gelelektrophorese-Laufpuffer	50 mM Tris, 190 mM Glycin, 0.1 % SDS
SDS-Gelelektrophorese-Auftragspuffer	50 % Glyzerin, 7.5 % SDS, 250 mM Tris, 0.5 % Bromphenolblau, 12.5% 2-Mercaptoethanol mit HCl auf pH 8.0
Sephadex	Sephadex, 70 mM DTT, 9 M Harnstoff, 2% Carrier-Ampholytmischung,
Spüllösung 2D-Elektrophorese	375 mM Trizma Hydrochlorid, 0,1% SDS
Stripping Puffer	0,2 M Glycin, 0,05% Tween 20, pH 2,2
TBE	900 mM Tris, 900 mM Borsäure, 40 mM EDTA
TBS-T	20 mM Tris (pH 7,6), 137 mM NaCl, 0,1% Tween 20, ad 5 l H ₂ O
Western Blot- Laufpuffer	20 ml 20x Novex Running Buffer, 1 ml Antioxidant, ad 400 ml MilliQ H ₂ O
Western Blot- Transferpuffer	20 ml NuPage Transfer Puffer, 40 ml Methanol, 1 ml Antioxidant, ad 400 ml MilliQ H ₂ O

Tab. 3: Puffer der Ni-NTA-Affinitätschromatographie

	Puffer A/ Lysispuffer	Puffer B/ Waschpuffer	Puffer C/ Elutionspuffer	Puffer D/ Dialysepuffer
Tris pH 8,0	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM
NaH₂PO₄⁻	100 mM	100 mM	100 mM	100 mM
NaCl	500 mM	500 mM	500 mM	500 mM
Imidazol	10 mM	20 mM	250 mM	

Tab. 4: 12%-Polyacrylamidgel der Semiquantitativen PCR

Rotiphorese A (30% Acryamidlösung)	10 ml
Rotiphorese B (2% Bisacrylamidlg.)	5 ml
5x TBE	5 ml
TEMED	12 µl
10% APS (Ammoniumpersulfatlg.)	250 µl
H ₂ O	5 ml

Tab. 5: Zusammensetzung der Gele für die 1. Dimension.

	Separationsgel	Capgel
Acrylamid	3,5%	12%
PDA	0,3%	0,13%
Carrier Ampholyt Mix	4%	4%
Harnstoff	54%	54%
Glyzerin	5%	5%
TEMED	0,06%	0,06%
Persulfat	0,02%	0,02%

Tab. 6: Puffer der 1. und 2. Dimension.

Anodenpuffer

Harnstoff	18% = 3 M Endkonzentration
85% Phosphorsäure	0,742 M Endkonzentration

Kathodenpuffer

Harnstoff	54% = 9 M Endkonzentration
Glycerin	5% Endkonzentration
Ethylendiamin	0,749 M

Agarose-Puffer

Trizma Hydrochlorid	125 ml
SDS	0,1%
Agarose	1%

Tab. 7: Zusammensetzung der Gele für die 2. Dimension.

Acrylamid	15%
Bisacrylamid	0,2%
SDS	0,1%
TEMED	0,03%
Trizma Base	375 mM
Persulfat	0,08%
Trizma Hydrochlorid	375 mM

Tab. 8: Analytische Silberfärbung

0. Fixierung	50% Ethanol 10% Essigsäure	über Nacht
1. Inkubation	0,1% Natrium-Thiosulfat 0,5 M Natrium-Acetat 30% Ethanol 0,5% Glutaraldehyd	2 h
2. Wässerung	bidestilliertes Wasser	2 x 20 min
3. Silberfärbung	0,1% Silbernitrat 0,01% Formalin	30 min
4. Wässerung	bidestilliertes Wasser	einige sec.
6. Spülung	2,5% Natrium-Carbonat	1 min
7. Entwicklung	2,5% Natrium-Carbonat 0,01% Formalin	2-7 min
8. Stopp	0,05 M Titriplex 0,02% Thimerosal	20 min
9. Wässerung	bidestilliertes Wasser	> 10 min

Tab. 9: Präparative Silberfärbung nach Heukshoven 1988

1. Inkubation	0,02% Na-Thiosulfat	1 min
2. Wässerung	bidestilliertes Wasser	2 x 1 min
3. Silberfärbung	0,15% Silbernitrat	60 min
4. Wässerung	bidestilliertes Wasser	einige sec.
6. Spülung	2,5% Na-Carbonat	1 min
7. Entwicklung	2,5% Na-Carbonat 0,01% Formalin 0,02% NaHCO ₃ , 0,025% Thimerosal	5-20 min
8. Stopp	0,05 M Titriplex	10 min
9. Wässerung	bidestilliertes Wasser	> 5 min

2.1.6 Geräte & Verbrauchsmaterial

Geräte und Gebrauchswaren wurden, wenn nicht explizit aufgeführt, von den Firmen Eppendorf, Hamburg; Falcon, Heidelberg, Sarstedt, Nümbrecht, und Heraeus Holding, Hanau, bezogen.

1D Elektrophoresekammer	Wita, Berlin
1D Glasröhrchen	Schott Glas, Mainz
2D Kammer (Desaphor VA300)	Desaga, Wiesloch
Ausstanzer	Rosemann und Sohn, Stahnsdorf
Bidestilliertes Wasser	MilliQ UFplus, Microsoft Corp., Seattle, USA
Feinwaage BP3100S	Sartorius AG, Göttingen
Filterpapier	Schleicher & Schuell, Dassel
Gel-Blotting-Papier	Schleicher & Schuell, Dassel
Gel-Loading Pipette	Starlab GmbH, Ahrsenburg
Gelelektrophoresekammer	Renner GmbH, Dannstadt
GENOVISION Biorobot M48	Qiagen, Hilden
Hamilton-Spritzen	Hamilton, Bonaduz, Schweiz
Kimwipes	Hakle-Kimberly, Mainz
Kryoröhrchen	Greiner Labortechnik, Frickenhausen
Leuchtkasten	Biotec-Fischer, Reiskirchen

Lichtmikroskop	Zeiss, Oberkochen
MALDI-TOF Massenspektrometer	Bruker, Bremen
Neubauer-Zählkammer	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Nitrozellulose Membrane Hybond-ECL	Amersham Bioscience, Freiburg
Parafilm M	Pechiney Plastic Packaging, Neenah, WI, USA
Photometer: Gene Quant II	Pharmacia Biotech AG, Dübendorf
Probentaschenkämme	Hoefer, San Francisco, CA, USA
Röntgenbestrahlungsgerät	Xstrahl RS225, Surrey, UK
Scanner UMAX Mirage 2	Umax, Willich
Spannungsgeräte	Pharmacia Biotech, San Francisco, CA, USA /
Stickstofftank	Messer Griesheim GmbH, Krefeld
Spannungsgerät EPS 3500XL	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Sterilfilter	Milipore, Eschborn
Siliconpaste	Baysilone-Paste, Bayer, Leverkusen
Thermocycler GeneAmp PCR 9600	Perkin Elmar, Foster City, CA, USA
Thermocycler GeneAmp PCR 2400	AB Applied Biosystems, Darmstadt
Trockenschrank / Wärmeschrank	Th. Karow GmbH, Berlin
Ultraschallbad Sonorex RK 31	Bandelin, Berlin
UV-Film	Kodak X-Omat, Rochester, NY, USA
Vakuumpumpe Jet-1	Genser Scientific Instruments, Rothenburg
Zellophanfolie	Gehring & Neidweiser GmbH & CO KG, Bielefeld

2.1.7 Primer

Primer: NBN-Intron5.Forward	ATAAGACAGTCACCAC
NBN-LoxPtest.Forward	GCTTGGCTCAAGTAGTACTG
NBN-LoxPtest.Reverse, FAM-markiert	CCTCCAGGAGTCACTGTATT

2.1.8 Software & Datenbanken

ImageQuaNT Software (Version 5.2)	Molecular Dynamics GmbH, Krefeld
Microsoft Word & Excel	Microsoft Corp., Seattle, WA, USA

Adobe Photoshop	Adobe Systems, Inc., San Jose, CA, USA
Mascot	Matrix Science, London, England
AKTA Purifier	Amersham Bioscience, Freiburg
EndNote 6.0.2	ISI Researchsoft, CA, USA
Vistra FlourImager SI	Amersham Bioscience, Freiburg

ExPASy Proteomics Server: <http://www.expasy.ch>

Mascot: <http://www.matrixscience.com>

PubMed-Datenbank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed>

Human Proteome Organisation (HUPO): <http://www.hupo2005.com/>

Cytoscape: <http://www.cytoscape.org>

2.2 Methoden

Das folgende Schema gibt einen Überblick über die für meine Doktorarbeit notwendigen Arbeitsschritte und Abläufe.

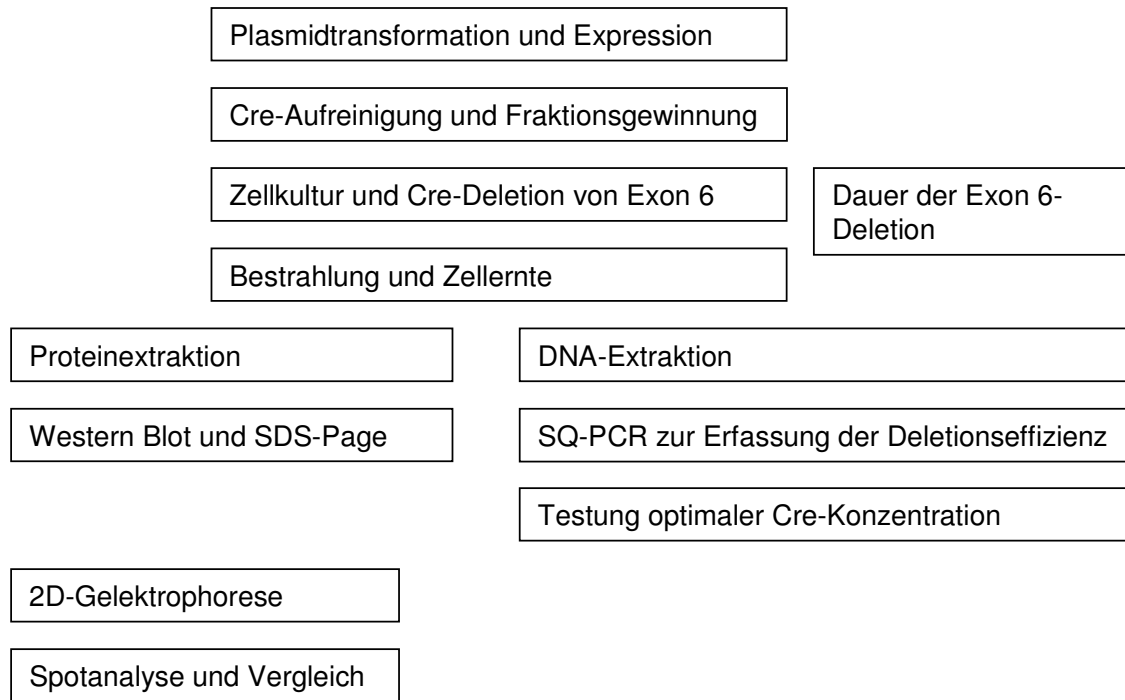


Abb. 6: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus und der Arbeitsschritte.

2.2.1 Proteinisolierung

2.2.1.1 Bakterielle Transformation und Protein-Expression

Transformation ist die Aufnahme isolierter DNA in eine Bakterienzelle. Die Information für das Protein Cre-Rekombinase wurde zuvor in das pTriEx-Plasmid kloniert, welches dann in das Wirtsbakterium Escherichia Coli transformiert wurde. Da E. coli Bakterien nicht natürlich kompetent sind, wurde die Plasmid-DNA mit Hilfe eines kurzen Hitzeschocks (1½ min) bei 42 °C aufgenommen und die Zellen daraufhin in Super Oprimol Broth-Medium auf einem Wärmeschwenker bei 37 °C für 1 h inkubiert. Ein Antibiotikum-Resistenzgen auf dem Plasmid ermöglichte eine Expression des Proteins

unter Ampicillin- (100 µg/ml) und Chloramphenicol- (34 µg/ml) Zusatz im Medium und bewirkte somit eine Selektion der Zellen, die den Vektor aufgenommen hatten.

2.2.1.2 Nickel-NTA-Affinitätschromatographie

Die Aufreinigung des Proteins erfolgte mittels Affinitätschromatographie durch eine befreundete Arbeitsgruppe. Die Säule wurde mit einer Gelmatrix gefüllt, an der über Nitrilotriazetat Nickelionen gebunden waren (Nickel-NTA), um das mit Histidinresten fusionierte Protein aufgrund deren Affinität zu Histidin aus der Lösung zu fischen. Das Protein lagerte sich mit seinen Affinitätstags an den Bindungspartner Ni-NTA an, wobei der Imidazolring vom Histidin an das Nickelion band. Durch Waschen der Säule mit ansteigenden Konzentrationen von Imidazol wurden andere Proteine, die eine geringere Affinität zur Ni-NTA-Matrix besaßen, verdrängt, so dass eine immer größere Reinheit des rekombinanten Proteins entstand. Um das Cre-Protein von der Säulenmatrix zu lösen, wurde dem Elutionspuffer Imidazol zur Konkurrenz zugesetzt, welches die Histidinreste verdrängte, so dass das Protein einen frei in Lösung schwimmenden Bindungspartner wählte und sich von der Matrix löste.

Nach dem Laden auf die Ni-NTA-Säule wurden die in Tab. Nr. 3 unter 2.1.4. aufgelisteten Puffer gegeneinander ausgetauscht und die Proteine innerhalb von fünf Säulenvolumen (4 ml/min, 3 ml Fraktionen) eluiert, so dass pures 6xHis-tagged Protein entstand. Die Fraktionen wurden filtriert (0,22 µm) und über Nacht gegen 2x 5 l Dialysepuffer (D) bei 40 °C dialysiert.

2.2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.2.1 Kultivierung und Passage der Zellen

Die verschiedenen Zelllinien wurden in einem Stickstofftank bei -196 °C aufbewahrt und im 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut. Das Zellkulturmedium (DMEM) wurde mit 10% fetalem Kälberserum (FKS) und Antibiotika (1% Streptomycin und Penicillin) angereichert und bei 4 °C aufbewahrt. Die aufgetauten Zellen wurden mit einer Transferpipette in 9 ml Medium überführt und 10 min bei 800 rpm zentrifugiert. Das

Pellet wurde nach dem Absaugen des Überstandes in frischen Medium resuspendiert und in eine Gewebezuchtflasche (275 ml) überführt.

Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank bei 37 °C in einer Wasserdampf gesättigten, 5% CO₂-Atmosphäre. Die Passage der Zellen erfolgte im Durchschnitt alle 3-4 Tage, je nach Teilungsrate und bei 100% Konfluenz der Zellen, mit Überführung in eine neue Flasche an sterilen Werkbänken mit vertikalem Luftstrom. Hierzu wurden das Medium mit einer Pipette abgesaugt, die am Flaschenboden haftenden Zellen mit 10 ml PBS gewaschen und dieses dann wieder abgenommen. Anschließend wurden sie für einige Minuten in 3 ml Trypsin geschwenkt, welches vor dem Lösen der Zellen vom Boden sofort abgesaugt wurde. Nach Zusetzen von 10 ml DMEM und Vereinzelung der Zellen durch Resuspendieren wurde die entsprechende Menge an Zellsuspension in eine neue Flasche überführt.

2.2.2.2 Zellernte und Zellzählung

Zum Zählen der Zellen wurden diese wie auch bei der Zellpassage mit PBS gewaschen, trypsinisiert und mit 5 ml Medium resuspendiert. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt, indem alle vier Felder à 16 Kästchen unter dem Mikroskop ausgezählt und der Mittelwert genommen wurde. Hiernach wurden die Zellen zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellen in frischem Medium aufgenommen und erneut ausgelegt.

Um ein Zellpellet für die DNA- und Proteinbestimmung zu erhalten, wurden die Zellen ebenfalls gewaschen, trypsinisiert, in Medium aufgenommen und für 3 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Zellen in 5 ml PBS resuspendiert. Nach weiteren 3 min Zentrifugation bei 1000 rpm und Verwerfung des Überstandes wurden die Zellen in 1 ml PBS aufgenommen, in ein kleines Eppendorfgefäß transferiert und bei 5000 rpm für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Eppendorfgefäß gewogen und das Pellet bei -80 °C eingefroren.

2.2.2.3 Zellmanipulation: NBN Exon6-Deletion durch Cre Recombinase

Um eine NBN Exon6-Deletion durch das Fusionsprotein HTNC, bestehend aus einem His-tag, der HIV-tat-Sequenz, einer nuklearen Lokalisationsfrequenz und Cre Recombinase, zu erreichen, wurde bei 50% Konfluenz den Fibroblasten nach Absaugen des Mediums 10 ml frisches DMEM-Medium ohne FKS- und Pen/Strep-Zusatz dazugegeben, 10 min inkubiert und wieder abgesaugt. Dann wurden die Zellen bei 37 °C mit 4 ml vorbereitete Lösung aus Cre Recombinase für 5 h inkubiert, um das „gefloxte“ Exon zu deletieren. Nach dem Absaugen wurden wiederum 10 ml pures DMEM für 10 min dazugegeben und anschließend mit Medium (DMEM+10% FKS+Pen/Strep) aufgefüllt und in den Brutschrank zurückgestellt. Dieser Vorgang wurde am nächsten Tag wiederholt und die Zellen daraufhin ausplattiert.

2.2.2.4 Zellmanipulation: Ionisierende Bestrahlung

Da NBS-Zellen gekennzeichnet sind durch eine erhöhte Chromosombrüchigkeit besonders nach ionisierender Strahlung, wurden sowohl die mit Cre Recombinase inkubierten, als auch die Kontrollzellen 48 Stunden später bestrahlt. Hierfür wurde ein Röntgenbestrahlungsgerät verwendet, welches speziell zur Bestrahlung von Zellkulturen und Versuchstieren entwickelt wurde. Die Proben wurden auf einem temperierbaren Drehteller positioniert, mit einem Strahlenfeld von 20 cm Durchmesser und einer Spannung von 100 kV für 2,25 min Dauer bestrahlt. Zur Evaluation einer dosisabhängigen Differenz wurden die Dosierungen 0,5 Gy und 10 Gy gewählt.

Die Tabelle Nr. 10 verdeutlicht noch einmal schematisch den Ablauf:

Tab. 10: Schema des chronologischen Ablaufs.

	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	
Nbn ^{lox6/ins6}	Cre	Cre	Pause	Pause	Lyse	Nbn ^{del6/ins6}
Nbn ^{lox6/ins6}	Cre	Cre	Pause	Bestrahlung 0,5 Gy	Lyse	Nbn ^{del6/ins6}
Nbn ^{lox6/ins6}	Cre	Cre	Pause	Bestrahlung 10 Gy	Lyse	Nbn ^{del6/ins6}
Nbn ^{lox6/ins6}	keine Behandlung	keine Behandlung	Pause	Pause	Lyse	Nbn ^{lox6/ins6}
Nbn ^{lox6/ins6}	keine Behandlung	keine Behandlung	Pause	Bestrahlung 0,5 Gy	Lyse	Nbn ^{lox6/ins6}
Nbn ^{lox6/ins6}	keine Behandlung	keine Behandlung	Pause	Bestrahlung 10 Gy	Lyse	Nbn ^{lox6/ins6}

2.2.3 Biochemische Methoden

2.2.3.1 Photometrische Proteinquantifizierung

Bei der Bindung von Coomassie Blue an die Proteine im sauren Milieu verschiebt sich das Absorptionsmaximum und die Zunahme der Absorption ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung. Aus der Bradfordlösung wurde eine Proteinstandardlösung erstellt, indem aus einer 10 mg/ml Stammlösung BSA in Wasser die Verdünnungen 0 – 0,2 – 0,4 – 0,6 – 0,8 – 1 mg/ml hergestellt und eine Eichkurve angelegt wurde. Die bei -80 °C gelagerten Fraktionen wurden, je 2 µl mit 1 ml Bradfordlösung versetzt, bei 595 nm im Photometer gemessen und bestimmt.

2.2.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Um die einzelnen Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen, wurden diese auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen, wo einzelne Polypeptidketten mit den negativ geladenen Natrium-Dodecyl-Sulfatmolekülen einen Komplex bildeten. Die Proteine wanderten im elektrischen Feld durch die porösen Gele mit der ihrer Größe und

Nettoladung entsprechenden Geschwindigkeit in Richtung des positiven Pols. Um die Disulfidbrücken zwischen den Proteinen zu zerstören, wurde Mercaptoethanol als Reduktionsmittel zugesetzt.

Die 15%igen Gele wurden in die Kammern gespannt und der Laufpuffer eingefüllt. Die Proben wurden mit SDS-Auftragspuffer versetzt und bei 95 °C 5 min denaturiert. Es wurden 1 µl der Fraktionen pro Tasche aufgetragen und die Banden nach dem Lauf (35 mA, 100-150 Volt) mit Coomassiefärbung nach 30 min Schütteln visualisiert. Als Proteinstandart wurde der „Rainbow“-Marker mitgeführt.

2.2.3.3 Western Blot

Aus Gewebe- und Zellextrakten können Proteine durch Western-Blot-Analyse nachgewiesen werden. Mittels Westernblotting wurden die aufgetrennte Proteingemische samt Marker Multi-Colored Standard und Kontrolle (M3 70 kD Lysat zu 4,8 µg/ml) aus dem 7% Tris-Acetat Gel über ein angelegtes elektrisches Feld (120 V, 25 mA, 100 W für 1 h) aufgetrennt und mittels Westernblotting auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (30 V, 400 mA, 100 W für 90 min). Nun wurde die Membran kurz in Wasser gewaschen, die transferierten Proteine mit Ponceau S-Lösung gefärbt und danach wieder mit Wasser entfärbt, um die Qualität des Transfers zu dokumentieren. Die freien Bindungsstellen auf der Membran wurden mit Roti Block abgesättigt. Die Membran wurde mit 2 µl Kaninchen Anti-Maus Nibrin Ig (in einer Verdünnung von 1:1000) in 5%em Magermilchpulver inkubiert und für 1 h bei RT auf dem Rotator inkubiert. Nach mehrfachen Waschen mit TBST wurde nun mit einem spezies-spezifischer sekundärer Antikörper, Anti-Kaninchen (1:2000), der mit HRP (Horseradish-Peroxidase/Meerrettichperoxidase) gekoppelt war, um die spezifische Bindung der Antikörper an die Epitope des Antigens nachzuweisen, für ebenfalls 1 h bei RT auf dem Rotator inkubiert. Das an den Antikörper konjugierte Enzym HRP oxidierte Luminol zur Detektion in einer Lumineszenzreaktion, die dann auf dem Röntgenfilm sichtbar wurde. Die Membran wurde nach der Inkubation gewaschen, mit ECL Detektion Reagenzien behandelt und in der Dunkelkammer entwickelt.

Zur Entfernung der primären Antikörper wurde die Membran anschließend 30 min in Stripping Puffer inkubiert, wiederholt mit TBST gewaschen und mit Roti Block für 15 min abgesättigt. Als Kontrolle der geladenen Proteinmenge wurde die Membran in einem

zweiten Schritt mit einem monoklonalen Maus-Antikörper zu β -Actin (1:2000) für 1 h gefärbt. Nach TBST-Waschungen wurde der spezifische sekundäre Anti-Maus-Antikörper (1:2000), HRP-gekoppelt, appliziert. Nach 1 h wurde mit TBST gewaschen und in der Dunkelkammer ein weiteres Radioautogramm angefertigt.

2.2.3.4 Proteinaufschlüsselung für 2D-Gelelektrophorese

Die Pellets wurden gewogen und eine errechnete Menge von P2-CHAPS/MgSO₄ (Gewicht x 1,25) hinzugefügt. Anschließend wurde die Probe einer Ultraschallbehandlung von 6x 10 Sekunden unterzogen, dann zentrifugiert. Nach erneuter Bestimmung des Probengewichts wurde Benzonase (Gewicht x 0,025) hinzugefügt, um die DNA zu kurzen Oligonukleotiden abzubauen. Vor dem Auftrag auf das 1D-Gel wurde Harnstoff (Gewicht x 1,02), DTT (Gewicht x 0,1) und Ampholin (Gewicht x 0,1) in μ l zugeben und verrührt.

2.2.4 Molekularbiologische Methoden

2.2.4.1 Quantitative Ermittlung der Exon6-Deletionseffizienz mittel SQ-PCR

Nachdem die DNA der Proben im Roboter isoliert und in Lösung verdünnt wurde, wurde im Photometer bei 260 nm die Konzentration bestimmt. Anschließend diente die semiquantitative PCR zur Ermittlung der Exon6-Deletionseffizienz.

Hierfür wurden drei Primer ausgewählt, die ähnlich große Amplifikate ergaben. So waren zwei Vorwärtsprimer im Intron 5 des Nbn-Gens lokalisiert, der erste, NBN-Intron5.F, der zweite, NBN-LoxPtest.F bis zum Exon 6. Der mit FAM fluoreszenzmarkierte Rückwärtsprimer, NBN-LoxPtest.R, band kurz hinter der zweiten LoxP-Site im Intron 6. Daraus ergaben sich dann die Produkte von verschieden großer Basenpaarlänge. Die amplifizierten Produkte der drei Allele waren Nbn^{wt} mit 515 bp, Nbn^{del6} mit 601 bp und Nbn^{lox-6} mit 554 bp (siehe Abbildung Nr. 7).

Da es sich bei den von mir quantifizierten Zellen ausschließlich um murine Fibroblasten mit einem "gefloxten" und einem insertiertem Allel handelte, wurde das Amplifikat des Wildtyp-Allels nicht detektiert.

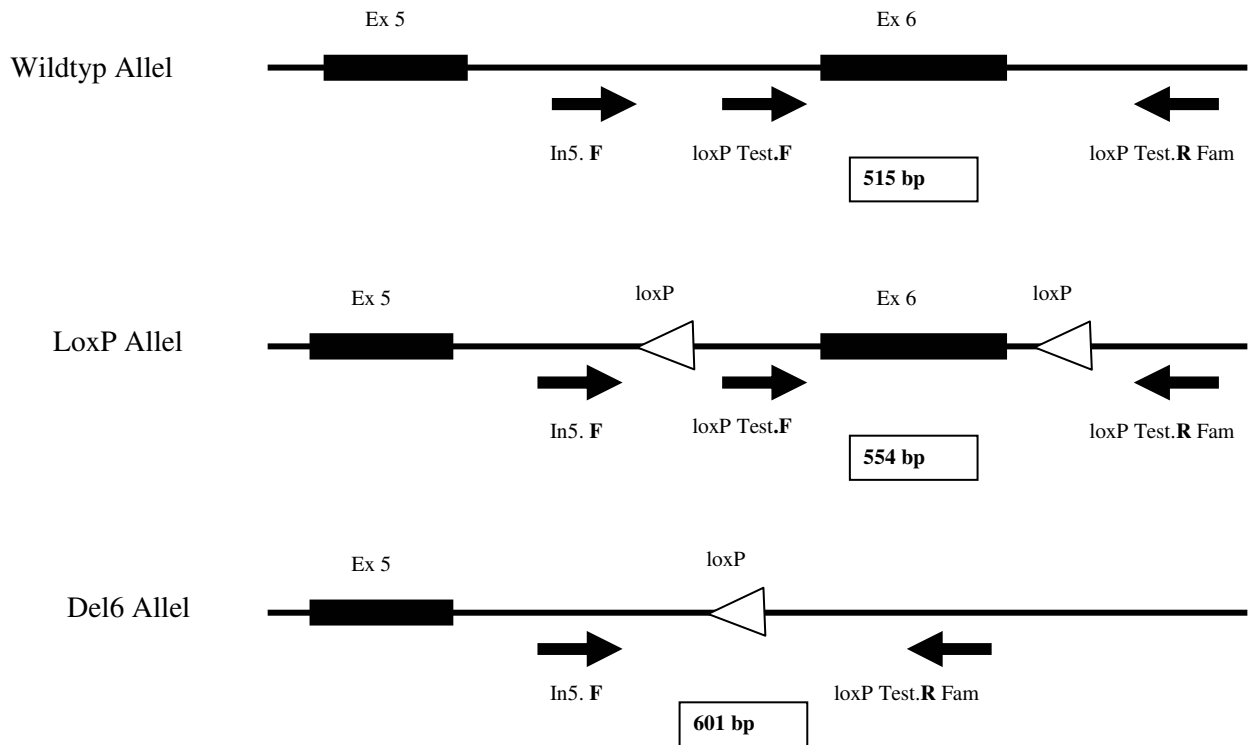


Abb. 7: Schematische Darstellung der Exon6-Deletion mit der Anzahl der Basenpaare der entstehenden Produkte.

Es wurden 20 µl PCR-Mix angesetzt:

Primer (1,0 µl Primer 15 µM NBN-Intron5.Forward; 1,0 µl Primer 25 µM NBN-LoxP.Test.Forward; 1,0 µl Primer 35 µM NBN-LoxP.Test.Reverse, FAM-markiert),
 0,2 µl Taq-DNA-Polymerase (PE),
 2,0 µl 10 mM dNTPs,
 2,5 µl PCR-Puffer 10x (PE mit Mg) und 14,3 µl H₂O
 mit je 5 µl DNA (20 ng/µl); Endvolumen 25 µl

Folgendes Temperaturprofil wurde gewählt:

Denaturierung	94 °C	5 min	} 28 Zyklen
Denaturierung	94 °C	30 sec	
Primerbindung	55 °C	1 min	
DNA-Synthese	72 °C	1 min	
DNA-Synthese	72 °C	7 min	

In jeder SQ-PCR liefen Kontrollen (Nbn flox/del) aus DNA-Gemischen mit bekannten Allelverhältnissen mit, deren PCR-Produkte mit den Ausgangsverhältnissen verglichen wurden.

2.2.4.2 Agarose-Gelelektrophorese

Mittels der Agarose-Gelelektrophorese lassen sich Nukleinsäurefragmente aufgrund ihrer Länge im elektrischen Feld trennen, indem sie -negativ geladen- zur positiv geladenen Kathode wandern. Für die Herstellung des Agarose-Gels wurden 0,8 g Agar in 80 ml TBE für 2 min zum Lösen aufgekocht, unter kaltem Wasser abkühlt und 2,5 µl Ethiumbromid (1 µg/ml) hinzugegeben. Nach Gießen des Gels in den Gelschlitten unter Verwendung von Gelkämmen wurde das Gel in die mit 1x TBE Puffer gefüllte Kammer überführt. Die Auftrennung erfolgte bei einer Feldstärke von 2-10 V/cm.

2.2.4.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte auf ein 0,75 mm dickes, 12%-Polyacrylamidgel. Zwei Glasplatten wurden mit zwei 0,75 mm dicken Abstandshaltern durch zwei Schraubzwingen fixiert und in einen Gießständer eingespannt. Ein Kamm für 20 Probestaschen à 4 mm Breite wurde zwischen die Platten gesteckt, die Gellösung eingegossen und für einige Stunden zum Polymerisieren stehen gelassen. In der Zwischenzeit wurden die Proben mit 5 µl Marker versetzt und durchgemixt. Dann wurden der Kamm entfernt, die Taschen mit Hilfe einer dünnen Pipettenspitze mit je 12 µl Probe gefüllt und die Pufferkammern mit 1x TBS gefüllt. Die Auftrennung der Produkte lief gekühlt auf 12 °C bei 100 V für 22 h.

2.2.4.4 Visualisierung

Die Gele wurden im Vistra FlourImager SI mit einem 530 DF 30 Emissionsfilter gescannt und mit ImageQuaNT Software ausgewertet: Das Verhältnis der PCR-Produkte innerhalb einer Probe wurde bestimmt und ergab somit die Fraktion der mit Cre behandelten Zellen. In Image Quant wurde mit Hilfe einer über die Banden jeder Probe gelegten Linie die Intensität des Fluoreszenz-Signals der Banden gemessen und

graphisch dargestellt. Die Fläche unter einem Peak im Verhältnis zur Gesamtfläche der Peaks eines Graphen ergab den prozentualen Anteil eines Allels. So konnte die Deletion des mit LoxP-Sites flankierten Exons 6 nach der Inkubation mit Cre Recombinase bestimmt und in Prozent angegeben werden.

Um sicherzustellen, dass allein durch die Inkubation mit dem Cre Recombinase Fusionsprotein keine Unterschiede in der Proteinexpression der Zelllinien auftraten, wurden drei unterschiedliche Fibroblastenzelllinien verwendet: zum einen Wildtypzellen, deren beide Allele im Wildtypzustand vorlagen, und Zellen, bei denen ein Wildtypallel und ein mit loxP-Sites flankiertes Allel vorlag. Zum anderen Zellen, die aus heterozygoten Mäusen generiert wurden, deren eines Nibrin-6-Allel "gefloxt" war und deren anderes durch Insertion deletiert wurde

2.2.5 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Die 2D-Gelelektrophorese ist eine Kombinationsmethode zur Auftrennung von Proteinen, bestehend aus isoelektrischer Fokussierung (IEF) und SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE). Daraus ergibt sich eine Spatorientierung, bei der Proteine mit saurem isoelektrischen Punkt sich links im sauren Bereich befinden (pH 3) und Proteine mit geringem Molekulargewicht durch schnelle Wanderung unten erscheinen.

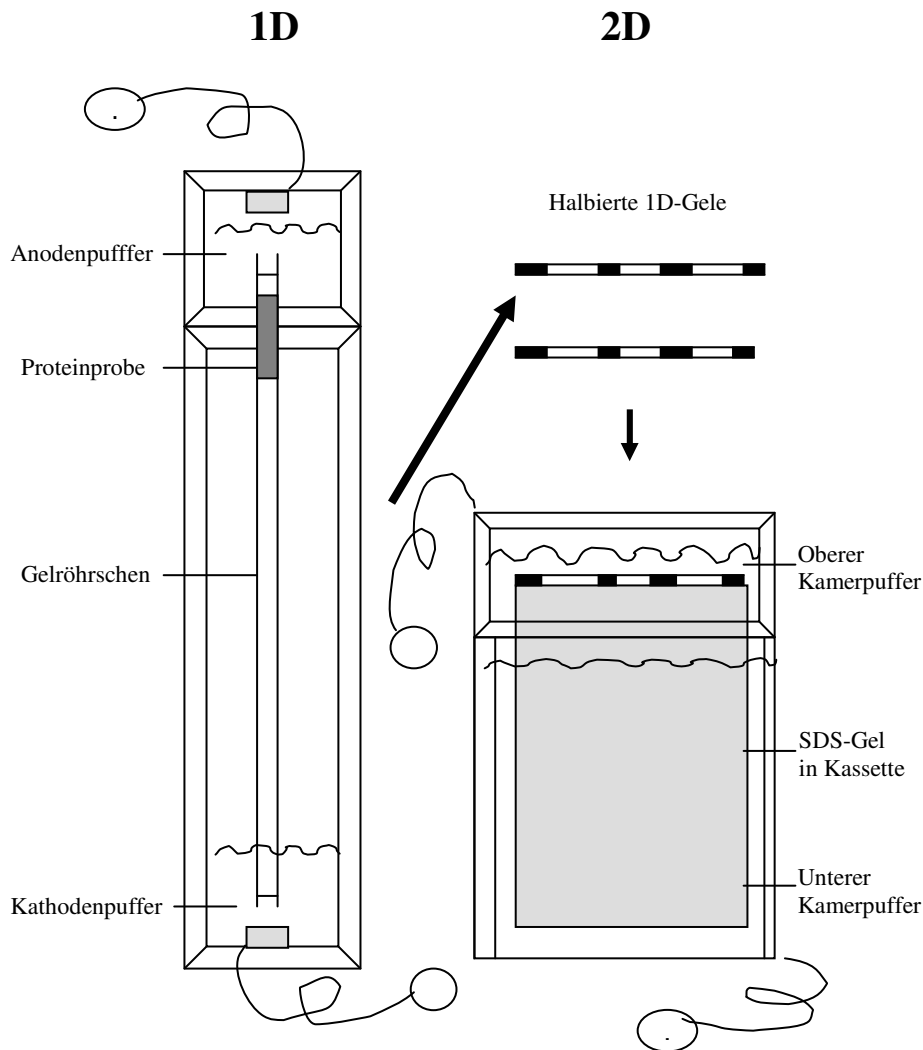


Abb. 8: Illustration der 2D-Gelelektrophorese mit 1D-Kammer (links) und 2D-Kammer (rechts).

Zuerst werden die Proteine in einem Polyacrylamidgel, in dem ein stabilisierter pH-Gradient aufgebaut wird, elektrophoretisch nach dem isoelektrischen Punkt des jeweiligen Proteins (bis die Nettoladung gleich 0 ist) aufgetrennt (unten basisch, oben sauer). In der zweiten Dimension wird der Gelstreifen auf ein SDS-Polyacrylamidgel gelegt und die Proteine in vertikaler Ausrichtung nach ihren Molekulargewichten getrennt. Dies geschieht, indem denaturierende SDS-Moleküle sich entsprechend der Proteingröße anlagern und deren Ladungen die Wanderungsgeschwindigkeit bestimmen. Nach der Anfärbung der Proteine (mit Silber oder Coomassie-Blau) können mehrere tausend verschiedene Proteine getrennt und dargestellt werden. Die Abbildung Nr. 8 illustriert Geräteaufbau und Vorgang von erster und zweiter Dimension.

Bei der 2D-Gelelektrophorese handelt es sich um eine hochauflösende Methode, die, wenn sie standardisiert abläuft, eine sehr gute Reproduzierbarkeit ermöglicht. Sie bietet darüber hinaus einige Vorteile gegenüber anderen Proteinauftrennungsmethoden, da zum einen Zelllysate oder Gewebeextrakte direkt auf das Gel aufgetragen werden können und zum anderen die aufgetrennten Proteine gut detektiert werden und ebenso gut extrahiert werden können, um sie mit der Massenspektrometrie aufgrund ihrer typischen Peptidmischung zu analysieren und zu charakterisieren.

Die Versuche dieser Arbeit wurden in den Laboren der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Klose, Institut der Humangenetik, durchgeführt.

2.2.5.1 Die erste Dimension

Es kamen zwei Arten von zylindrische Glasröhrchen von 44,8 cm Länge zum Einsatz: mit einem Innendurchmesser von 0,9 mm für die Spotdetektion (analytische Gele) und mit 1,5 mm Durchmesser für die Spotidentifizierung (präparative Gele), für welche die doppelte Menge an Gellösungen verwendet und an Probe aufgetragen wurde. In diese Röhrchen wurden Nylonziehfäden eingezogen, sie wurden in einen Gelröhrchenständer eingespannt und auf eine Gießschiene aufgesetzt. Die beiden Gellösungen wurden in einem 30 °C warmen Wasserbad aufgetaut, bis der Harnstoff vollständig gelöst war, und jeweils 5 min mit einer Wasserstrahlpumpe entgast, um Blasenbildung während des Gießens zu vermeiden und eine reproduzierbare Polymerisierungsgeschwindigkeit sicher zu stellen. Für vier Gele mit eine Durchmesser von 0,9 mm wurden 50 µl einer 0,8% Ammoniumpersulfatlösung zu den 1950 µl Separationsgels zugegeben, umgerührt, in die Giesschiene gefüllt und die Nylonfäden 40 cm hochgezogen. Nach Austauschen der Schiene wurden 20 µl APS Lösung zu 780 µl Capgellösung gegeben, gerührt, in die Schiene gefüllt und 1 cm hochgezogen. Anschließend wurde die Schiene entfernt und die Gellösungen in Röhrchen 1 cm nach oben gezogen, so dass ein kleiner Raum Luft am Ende entsteht. Zum Polymerisieren wurde das Gel für 25 min bei Raumtemperatur stehen gelassen, dann die Fäden entfernt und die Gele für 30 min im 37 °C Brutschrank inkubiert. Um sie über Nacht bei RT vollständig auspolymerisieren zu lassen und eine Dehydrierung zu verhindern, wurden die Röhrchen an den Enden mit einem Tropfen bidestilliertem Wasser abgedichtet und mit Parafilm M verschlossen.

Zum Probenauftrag und IEF Lauf wurden die Röhrrchen mit dem Cappel nach unten in eine IEF Elektrophoresekammer eingespannt und in die unteren Kammer (Kathodenkammer) die basische Ethylendiaminlösung gegossen. Mit diesem Puffer wurden auch die Lufträume vor dem Cappel gefüllt und die Röhrrchen in die Lösung getaucht. In das obere Ende der Gellösungen wurde nun eine 2 mm breite Sephadexschicht gefüllt, die als Schutzschicht fungierte und als Ionenaustauscher das Einwandern der Proteine verbesserte. Auf die Sephadexlage wurden nun 30 µl der Proteinproben mit einer Hamiltonspritze aufgetragen. Bei dicken ID-Gelen zur Spotidentifizierung wurde die doppelte Menge Probe appliziert. Zum Schutz vor dem sauren Anodenpuffer wurde eine 0,5 cm Schicht von Schutzlösung aufgetragen und der restliche Freiraum mit Anodenpuffer aufgefüllt.

Der Anodenpuffer wurde in die obere Anodenkammer gefüllt, diese mit der Anode, die untere mit der Kathode verbunden und das Spannungsgerät programmiert. Die IEF lief bei RT in 25 h und 40 min ab, mit einer maximalen Stromstärke von 10 mA und maximaler elektrische Leistung von 10 W, nach folgendem Spannungsprofil:

1 h	bei 100 V
1 h	bei 300 V
23 h	bei 1000 V
30 min	bei 1500 V
10 min	bei 2000 V

Nach Abbruch des Elektrophoreselaufs wurden die Gele mit einem Nylonfaden in eine mit Inkubationslösung benetzte Schiene ausgestoßen, wobei die Gele in der Mitte in zwei Gelhälften geteilt wurden, in eine saure Seite (pH 3,5 – 6,0) und eine basische Seite (pH 6,0 – 9,5). Die Gele konnten nun bei –80 °C gelagert werden.

2.2.5.2 Die zweite Dimension

In der zweiten Dimension erfolgte die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht auf einem Großgel SDS-PAGE.

Zum Gießen der Gele von einer Größe von 28 cm Länge, 23,2 cm Breite und 0,75 mm Dicke für analytische Gele (1,0 mm Dicke für präparative Gele), wurden Gellösungen zu

67,5 ml für 30 min bei 40 °C in Wasserbad erwärmt, ebenso die Persulfatlösungen, um die Gelpolymerisation zu initiieren.

Die zu verwendenden Glasplatten wurden gründlich mit destilliertem Wasser gespült und mit 70% und 100% Ethanol und Kimwipes gereinigt. Anschließend wurden zwei Glasplatten und zwei mit Silikonpaste zur Abdichtung bestrichenen Abstandshaltern mit Plastikklammern und Schrauben zu einer Gieskassette zusammengebaut. Die zusammengebauten Kassetten wurden zu je zwei auf einen Giesständer gesetzt und festgepresst. Zu den flüssigen Gellösungen wurden 4,5 ml (5,7 ml) Persulfatlösung zugegeben, vermischt und zügig in die Gelform gegossen. Luftblasen wurden mit einem Draht entfernt und das Gel wurde mit 1,2 ml (2,4 ml) einer 40% Glycerinlösung unterschichtet, um später das Auftragen des ID Gels zu gewährleisten. Nach 25 min Polymerisationszeit wurden die Kassetten auf den Kopf gedreht und die Geloberfläche mit Spüllösung vom Glycerin gereinigt. Der ca. 0,5 cm breite Spalt wurde mit Spüllösung aufgefüllt, mit Parafilm abgedeckt und bei RT zum Polymerisieren stehen gelassen. Vor der Lagerung über Nacht bei 4 °C wurde nochmalig gespült, aufgefüllt und mit Parafilm versiegelt.

Für den SDS-PAGE Lauf wurden 11 Liter Laufpuffer hergestellt und in die untere Kammer (Anodenkammer) gefüllt und auf 15 °C gekühlt. Für die obere Kathodenkammer wurden 1,5 Liter Laufpuffer vorbereitet und mit 500 µl Bromphenolblau marker versetzt, um bei der Wanderung durch das Gel eine Bromphenolblaubande als Lauffront zu erhalten.

Die Gele wurden noch einmal mit frischer Spüllösung gespült und dann vollständig von dieser befreit. Die IEF Gelhälften wurden aus dem Kühlschrank geholt und von der Schiene mit Hilfe eines Drahtes vorsichtig und luftblasenfrei auf je ein SDS-PAGE-Gel übertragen. Anschließend wurden die Gele mit Agaroselösung überschichtet, um ein Aufschwimmen der Gele zu verhindern. Es wurde darauf geachtet, dass jeweils die sauren Seiten ein Probenpaar bildeten und zusammen in einer Laufkammer liefen, und jeweils die basischen Seiten. Nachdem der obere Laufpuffer in die Kathodenkammer gegossen worden war, wurde das Spannungsgerät angeschlossen. Die Anfangsstromstärke betrug 65 A für die ersten 15 min, bei der die Proteine vorsichtig vom 1D Gel auf das 2D Gel übertragen wurden, danach 85 A für die folgenden 6 Stunden, bei denen die Temperatur bei 15 °C gehalten wurde. Sobald die Bromphenolblaubande die Markierung am unteren Rand der Platten erreicht hatte,

wurde der Lauf abgebrochen, die Gele aus den Platten gelöst und sofort fixiert. So konnte eine weitere Diffusion der Proteine im Gel verhindert werden.

Die Glasplatten wurden mit 100% Ethanol und Scheuermilch gereinigt, mit deionisiertem Wasser gespült und über Nacht in 0,2% NaOH gestellt.

2.2.5.3 Silberfärbung

Für die Anfärbung der Gele und den Proteinnachweis wurden zwei verschiedene Silberfärbungen verwendet, zum einen eine analytische Färbung für die Spotdetektion, zum anderen eine präparative Färbung. Wichtig ist eine möglichst hohe Detektionsempfindlichkeit. So liegt der lineare Bereich für Proteine bei der Silberfärbung zwischen etwa 0,5 und 30 ng/mm². Das Ag⁺-Ion bildet einen Komplex mit verschiedenen Resten der Proteine, wobei die Reduktionsgeschwindigkeit von der Konzentration des reduzierenden Stoffes und dem pH-Wert abhängt.

Dafür wurden die Gele in Plastikwannen auf Schüttler gelegt. Zuerst wurden die 2D Gele aus der Fixierlösung für 2 h in der Inkubationslösung bewegt und anschließend zweimal 20 min in 2 l bidestilliertem Wasser gewaschen. Dann wurden die Gele 30 min in einer Silberlösung inkubiert und hinterher kurz in bidestilliertem Wasser gewaschen. Für 1 min lagen die Gele in einem Vorentwickler, der so genannten Spüllösung, die noch vorhandenes Silber aus dem Gel wäscht, um dann 2-7 min im eigentlichen Entwickler zu inkubieren. Die Entwicklungszeit war abhängig von der Menge an aufgetragenem Protein. Durch die Zugabe einer Stopplösung, die Thimerosal für eine intensivere Färbung der Spots enthält und außerdem eine nachträgliche Gelbfärbung des Gels beim Trocknen verhindert, wird die Entwicklung beendet und nach 20 min wurden die Gele in bidestilliertes Wasser gelegt.

Durch die Zugabe von Glutaraldehyd, welches durch Bindung an die freien Aminogruppen die Proteine miteinander vernetzt und somit als Fixiermittel fungiert, konnte diese Färbemethode nur zur vergleichenden Spotanalyse verwendet werden; zur Spotidentifikation mit Hilfe der Massenspektrometrie wurde das MS taugliche, präparative Protokoll der Silberfärbung benutzt.

2.2.5.4 Trocknung

Zur Analyse der silbergefärbten Gele wurden diese getrocknet. Dafür wurden die Gele zwischen Filterpapieren und Zellophanfolien geschichtet. Zu unterst lag eine gelochte Metallplatte, auf der sich mehrere Lagen feuchtes Filterpapier befinden. Auf diese wurde eine vorher 10 min eingeweichte Folie gelegt und darauf das Gel, welches nach Bedarf zurechtgeschnitten wurde. Nun folgte wiederum eine Zellophanfolie. Filterpapier, Folien und Gel wurde so beschnitten, dass ein schmaler Rand der Lochplatte frei blieb. Die verbliebenen Luft- und Wasserblasen zwischen den verschiedenen Schichten wurden durch Glätten mit einem Spatel entfernt. Obenauf kamen eine Pappmatte und darauf eine 1 mm dicke Silikonmatte, so dass sich im Trockenschrank ein Vakuum ausbilden kann. Die Gele sollten nach 1,5 bis 2,5 h trocken, aber nicht porös sein.

2.2.5.5 Spotanalyse

Zur Beurteilung der getrockneten Gele wurden diese visuell auf einem Leuchtkasten ausgewertet und nach den folgenden Aspekten miteinander verglichen: Vorhandensein des Spots, Größe, Farbintensität und Positionsveränderung der Spots durch Shift des IEP oder des Molekulargewichts.

2.2.6 Massenspektrometrische Methoden

Die für die Massenspektrometrie gefärbten Gele zur Spotidentifizierung wurden nach der Färbung nicht getrocknet. Die relevant veränderten Spots wurden manuell mit einem Ausstanzer unter Wasser herausgestochen und einzeln in kleinen Eppendorfgläser gegeben. Durch die spezifische Protease Trypsin wurde das Protein direkt in der Gelmatrix enzymatisch in Peptidfragmente gespalten und gleichzeitig werden Reste der Färbung entfernt.

Die massenspektrometrische Proteinidentifikation wurde von der Arbeitsgruppe Klose, Institut der Humangenetik, durchgeführt.

Die Ionisierung mittels der Matrix-assistierten Laser-Desorption/Ionisierung-Technik basiert auf Erkenntnissen Ende der 80er Jahre¹³⁶. Das Prinzip der MALDI-

Massenspektrometrie gepaart mit einem Flugzeitanalysator (MALDI Time-of-flight) beruht darauf, dass Ionen in einem magnetischen oder elektrischen Feld massenabhängig ihre Flugbahn ändern. Der zu untersuchende Analyt wird mit einer Matrix aus organischen Molekülen im Massenspektrometer kokristallisiert, durch Laserbeschuss ionisiert, detektiert und über die Bestimmung der Flugzeit dessen Masse berechnet. Die Analyte wurden dafür mit 2,5-Dihydroxybenzolsäurelösung (DHB 3,3 mg/ml) in 90% Aceton und 0,1% Trifluoressigsäure versetzt und auf eine Nitrozellulosematrix zur Kokristallisation aufgetragen. Die Massenspektren wurden mit einem Bruker Reflex IV MALDI-TOF Massenspektrometer im Reflexmodus gemessen.

2.2.7 Datenbankanalysen

Das so aus der individuellen Masse generierte Spektrum ergibt einen so genannten charakteristischen Fingerabdruck (peptide mass fingerprinting) und wird mit Datenbankeinträgen von theoretisch errechneten Verdauungsprodukten verglichen. Mit Hilfe der Suchmaschine Mascot lassen sich Parameter vor einstellen, wie die untersuchte Spezies (Maus), die verwendete Protease (Trypsin) und Anzahl deren Spaltungen, und die festgelegte Massenabweichung. Für jede Probe ergibt sich eine Wahrscheinlichkeitsliste möglicher Proteinidentitäten mit Hilfe des Scoring-Algorithmus (Mowse-Score). Ein Score höher als 61 ergibt eine Wahrscheinlichkeit zufälliger Übereinstimmung zwischen dem Protein und der hier verwendeten Datenbank von kleiner als 0.05 ($p < 0,05$) und die Proteine können mit großer Sicherheit identifiziert werden. Dafür wurde mit dem Programm Mascot gegen NCBI gesucht und Expasy und Cytoscape zur genaueren Bestimmung der Proteininteraktionen verwendet. Alle Proteine wurden anhand ihres zu erwartenden Molekulargewichts und isoelektrischen Punktes mit ihrer Position auf dem Gel verglichen.

3 Ergebnisse

3.1 Elutionsprofil

Die Nickel-NTA-Affinitätschromatographie ergab das in Abbildung Nr. 9 dargestellte Elutionsprofil. Dabei wurde die Absorption bei 280 nm verfolgt (blaue Linie) bis nahezu keine mehr zu erkennen war. Die Flussgeschwindigkeit betrug 1 ml/min. Die Elution wurde in 3 ml Fraktionen gesammelt und diese werden im Profil durch die senkrechten Striche unterteilt. Der Absorptionspeak liegt bei der Fraktion 6. Insgesamt wurden 6 Fraktionen gesammelt, die erste eigentliche Elutionsfraktion von 3 ml ist die Fraktion Nummer 5, die letzte die Nummer 10.

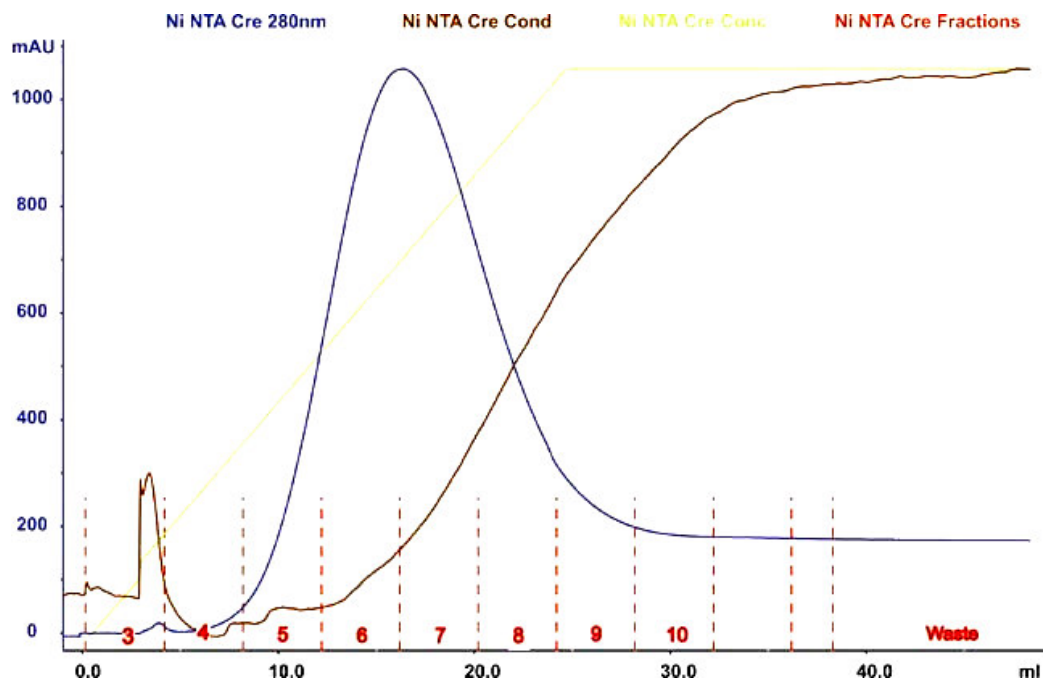


Abb. 9: Elutionsprofil. Die Absorption wurde bei 280 nm verfolgt (blaue Linie) und zeigt ihren Peak in der Fraktion 6; die Abszisse zeigt die Unterteilung der Fraktionen in 3 ml.

3.2 SDS-Page

Von den Elutionsfraktionen (Nummer 5 bis 10) wurden Aliquots auf ein 10%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und analysiert (Abbildung Nr. 10) Die Spuren sind mit den jeweiligen Fraktionsnummern gekennzeichnet, links befindet sich der Marker. Alle Spuren zeigen eine Bande im Bereich des erwarteten Molekulargewichts von etwa 40 kDa.

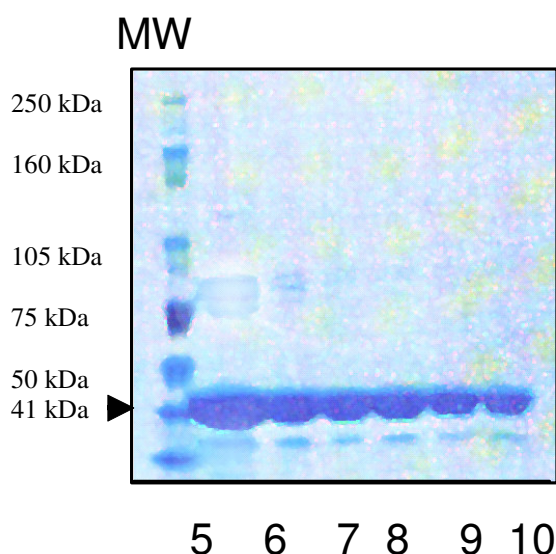


Abb. 10: SDS-PAGE der Fraktionen 5 bis 10, Coomassie gefärbt. Die Banden entsprechen dem erwarteten Molekulargewichts des Cre Recombinase Proteins (Pfeil).

3.3 Bestimmung der optimalen Konzentration der Cre-Recombinase

Die Aktivität der einzelnen Cre Fraktionen wurde mit Hilfe der semiquantitativen PCR genauer bestimmt. Hierbei wurden die Stoffmengen von 2, 4, 6, 8 und 10 μM der Fraktionen Nr. 6, 7 und 8 analysiert und mit bekannten Proben verglichen; das Ergebnis ist in Abbildung Nr. 11 dargestellt. Es lässt sich erkennen, dass die Fraktion Nr. 6 die höchste Exon6-Deletion für die Konzentrationen von 6 bis 10 μM erzielt. So ergibt sich bei 6 μM eine Exon6-Deletion von 95%, bei 8 μM von 97% und bei 10 μM von 96%. Annähernd gute Ergebnisse erreicht die Fraktion 8 in den Stoffmengen von 6 und 10 μM mit 90% und 91%. In der Fraktion 7 ist mit 86% die 10 μM von bester Qualität. Für

die Exon6-Deletion der Fibroblasten wurde deshalb die Fraktion 6 (6 μM) in 0,5 ml Aliquots vorbereitet und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

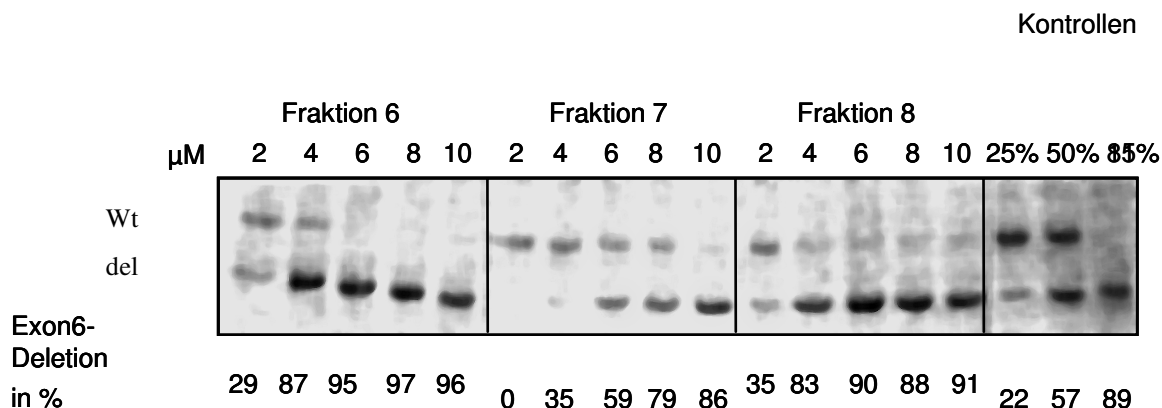
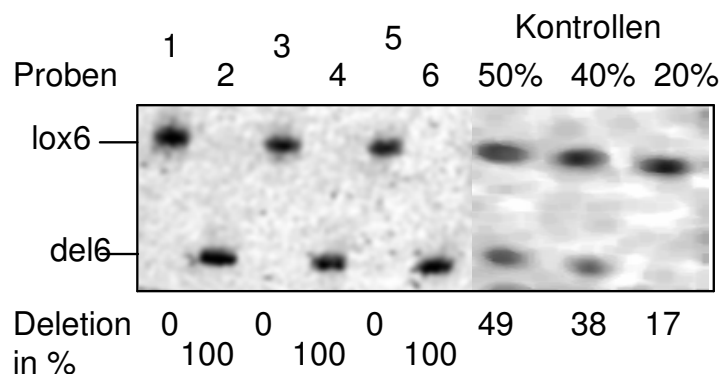


Abb. 11: Deletionseffizienzbestimmung mittels semiquantitativer PCR bei $\text{Nbn}^{\text{del6/wt}}$ -Zellen. Die senkrechten Linien unterteilen die Fraktionen, welche jeweils in 5 verschiedenen Mengen analysiert wurden. Zur Kontrolle dienen Proben bekannter Anteile Nbn^{del6} -Allele mit 25%, 50% und 85% Exon6-Deletion.

3.4 Deletionseffizienz

Nach zweimaliger Inkubation der Zellen ($\text{Nbn}^{\text{lox6/ins6}}$) mit Cre Recombinase mit 24 Stunden Abstand wurde die DNA 24 Stunden nach Bestrahlung extrahiert und mit Hilfe der semiquantitativen PCR wurde die Deletionseffizienz des Exon 6 bestimmt. Hierdurch ließ sich erkennen, in wie viel Prozent der Zellen das Exon 6 deletiert wurde, somit diese Nullmutanten sind und kein funktionstüchtiges Nbn -Allel mehr besitzen. Die Abbildung Nr. 12 zeigt die 6 aufgetragenen Proben: Proben Nr. 2, 4 und 6 waren mit Cre Recombinase inkubiert worden, Proben Nr. 3 und 4 wurden mit 0,5 Gy bestrahlt und die Proben Nr. 5 und 6 wurden mit 10 Gy bestrahlt. Als Kontrollen liefen Proben mit bekannten Anteilen von 20%, 40% und 50% Exon6-deletiertem Allel. Alle Spuren zeigen nur eine einzige Bande. So wurden die Zellen, die mit Cre Recombinase inkubiert worden waren (Proben 2, 4 und 6) zu annähernd 100% zur Homozygotität Exon6-deletiert. Die unbehandelten Zellen zeigten zu etwa 100% die Bande des lox6 -Allels (Probe 1, 3 und 5).

Das Ergebnis der semiquantitativen PCR verdeutlicht die gute Effizienz der Exon6-Deletion durch Cre Recombinase, da alle Spuren nur die alleinige Bande des del6 -Allels präsentierten.



Probe 1 (lox6/ins6)	unbehandelt	unbestrahlt
Probe 2 (del6/ins6)	deletiert	unbestrahlt
Probe 3 (lox6/ins6)	unbehandelt	0,5 Gy
Probe 4 (del6/ins6)	deletiert	0,5 Gy
Probe 5 (lox6/ins6)	unbehandelt	10 Gy
Probe 6 (del6/ins6)	deletiert	10 Gy

Abb. 12: Semiquantitative PCR zur Bestimmung der Deletionseffizienz verschiedener Versuchsreihen. Neben unbestrahlten Kontrollzellen ($Nbn^{lox6/ins6}$) wurden mit Cre behandelte Zellreihen ($Nbn^{del6/ins6}$) verwendet, die teilweise bestrahlt worden waren. Als Kontrollen fungierten bekannte Deletionskonzentrationen. Das Nbn^{ins6} -Allel wird in dieser PCR nicht erfasst.

Um die Vergleichbarkeit der Zellen zu gewährleisten wurde ein Vorversuch durchgeführt. Hierbei wurden Wildtypzellen ($Nbn^{wt/wt}$) mit Fibroblasten von heterozygoten Mäusen ($Nbn^{lox6/wt}$) verglichen. Die Zelllinien wurden gesplittet und ein Teil mit Cre Recombinase inkubiert. Anschließend wurden die 2D-Gelelektrophorese-Spotmuster analysiert und paarweise miteinander verglichen. Dabei konnten nahezu keine Unterschiede festgestellt werden, die sich auf Expressionsveränderungen allein durch Cre Recombinase zurückführen ließen. Somit kann die Inkubation mit Cre Recombinase als Störgröße vernachlässigt werden.

3.5 Zeitfenster für die Proteomanalyse der nullmutanten Zellen

Die Kultivierung der Zellen erfolgte wie unter 2.2.2 beschrieben. Mittels Western Blot wurde das Zeitfenster für die Bestrahlung der Zellen bestimmt. Hierzu wurden die Zellen an unterschiedlichen Tagen nach der Induktion der Exon6-Deletion geerntet und deren

Nibrinexpression im Western Blot detektiert. Abbildung Nr. 13 A zeigt das Ergebnis und veranschaulicht die Effizienz der Exon6-Deletion durch Cre Recombinase. Neben dem Marker (links) sind die Banden mit den entsprechenden Tagen (1, 2, 3, 4, 5, 6, 10 und 17 Tage) nach der Exon6-Deletion gekennzeichnet. Einen Tag nach der Deletion zeigt sich noch eine geringe Restexpression (Tag 1); daraufhin wird Nibrin bis 10 Tage danach fast nicht detektiert. Nach 17 Tagen entspricht die Expression wieder dem Ausgangsniveau, da nun die heterozygoten Zellen die nullmutanten Zellen ersetzt haben und wieder Nibrin exprimiert haben. Dieses Zeitfenster der fehlenden Expression entspricht dem optimalen Zeitpunkt für die Bestrahlung der Zellen, und die Tage 2 und 3 wurden für die Bestrahlung gewählt.

Zum Vergleich erfolgte danach zusätzlich der Nachweis von β -Actin und alle Bahnen zeigen einen gleichmäßigen Proteinauftrag (Abbildung Nr. 13 B).

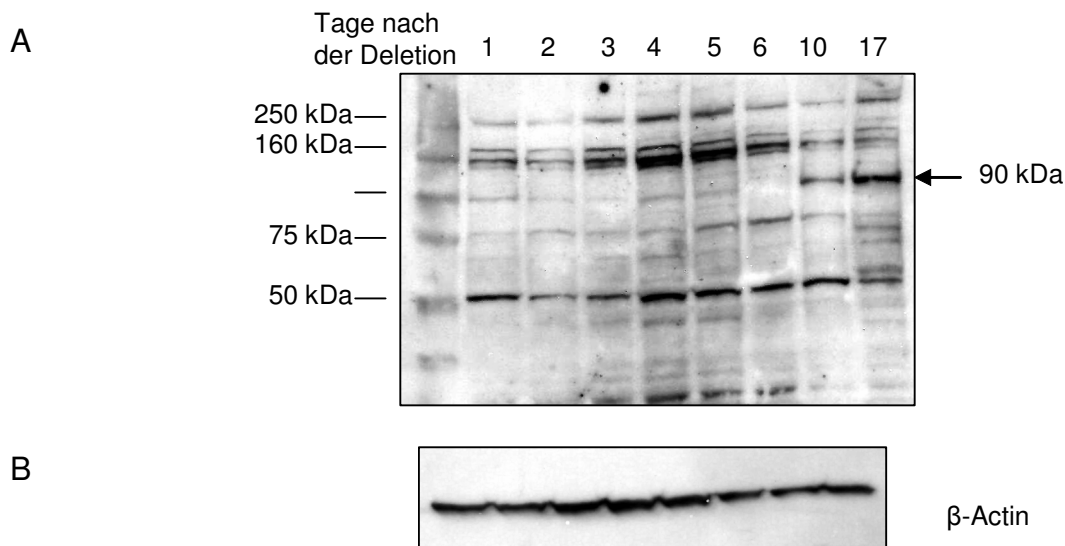
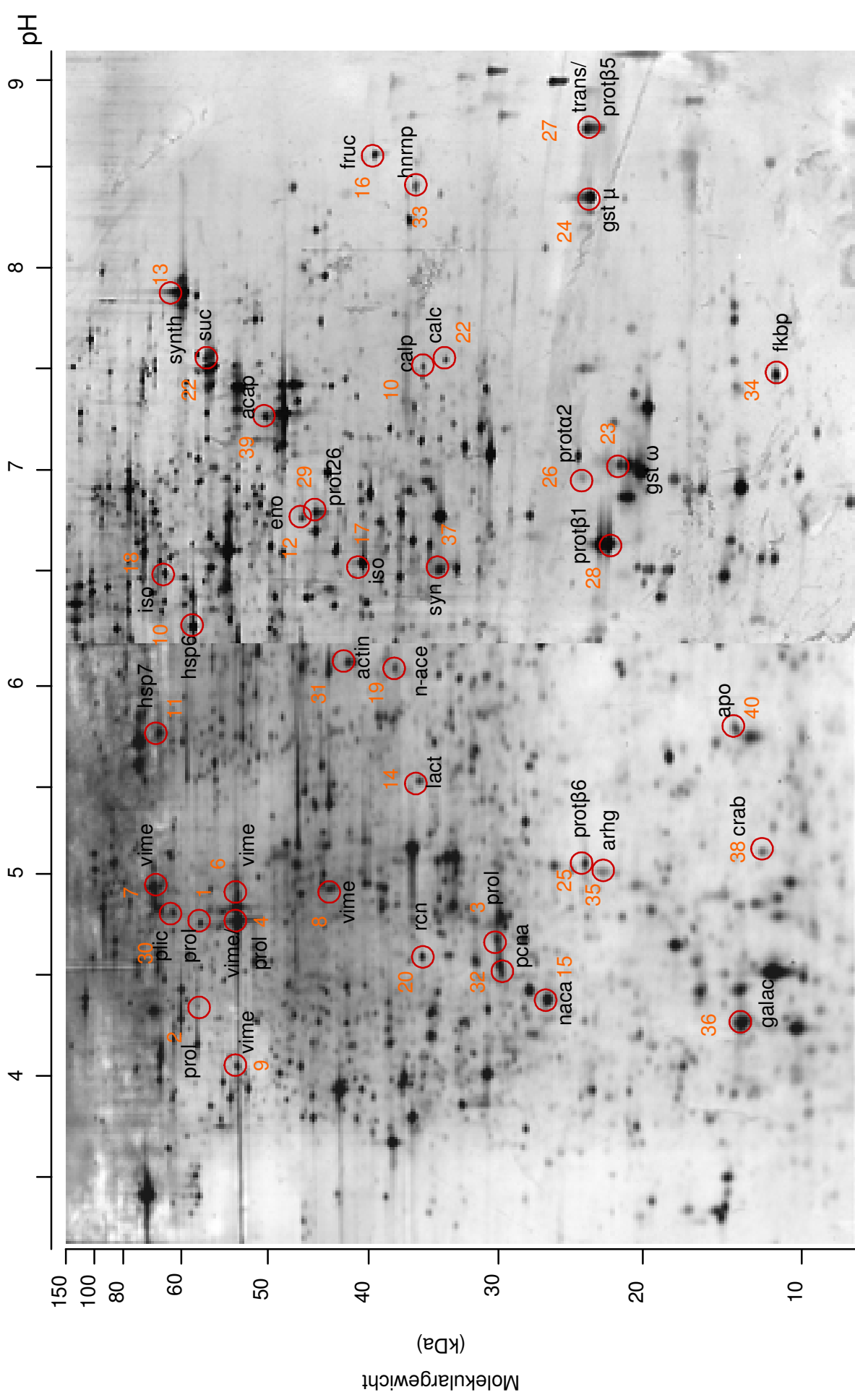


Abb. 13 A: Western Blot zum Nachweis der Nibrinexpression an verschiedenen Zeitpunkten nach der Exon6-Deletion durch Cre Recombinase, 1. AK α -Kaninchen Anti-Maus Nibrin, 2. AK Anti-Kaninchen. Der Tag der Zellernte nach der Deletion ist oberhalb der Spur markiert. Nibrin wird 10 Tage nach der Exon6-Deletion wieder im Western Blot bei 90 kDa detektiert. Darüberhinaus zeigen sich unspezifische Banden.

Abb. 13 B: Kontrollproteinnachweis von β -Actin

Ergebnisse

Abb. 14: 2D-Großgel-Elektrophorese des Proteoms von murinen Fibroblasten. Die Abszisse kennzeichnet den pH, die Ordinate das Molekulargewicht. Die identifizierten Spots sind mit Nummer und interner Abkürzung versehen.



3.6 Proteomanalysen

3.6.1 Gesamtheit der identifizierten Proteine

Zur Proteomanalyse wurden Fibroblasten unseres Nbn-Mausmodells miteinander verglichen. Es wurden Paare gebildet, die jeweils mit 0,5 Gy, 10 Gy oder nicht bestrahlt wurden; pro Gruppe gab es jeweils drei Paare. Die Identifizierung der Proteine wurde mit Hilfe der MALDI-TOF MS durchgeführt.

Die Abbildung Nr. 14 präsentiert das Proteom mit saurer und basischer Seite; die Abszisse kennzeichnet den pH-Wert, beginnend links mit einem pH von circa 3 bis rechts 9, die Ordinate benennt das Molekulargewicht, welches von ungefähr 150 kDa nach unten hin abnimmt. Umringt und mit Nummer und interner Abkürzung versehen sind die identifizierten Proteine gekennzeichnet.

Es wurden pro Gel etwa 60 Spots (basische und saure Seite) tryptisch hydrolysiert und analysiert. Die Datenbanksuche wurde mit MASCOT gegen die SwissProt-Datenbank durchgeführt. Aus dem massenspektrometrischen Fingerprinting eines Proteins (Masse per Ladungseinheit) ergeben sich die möglichen Übereinstimmungen, dargestellt als Säulen mit unterschiedlicher, auf dem Mowse-Score basierender Wahrscheinlichkeit (x-Achse). Nur Proteine mit einem Score größer als 61 wurden als signifikant bewertet ($p < 0,05$) und in der Tabelle aufgeführt.

Von den 60 ausgestochenen Spots wurden 40 eindeutig identifiziert und 35 verändert exprimierte Proteine gefunden, die in 8 verschiedene Gruppierungen eingeteilt wurden. Die Differenz ergibt sich dadurch, dass einige Proteine in mehreren Spots vorhanden waren. Die identifizierten Proteine sind in Tabelle Nr. 11 aufgelistet, mit Namen, Spotnummer, interner Abkürzung, der Accession SwissProt-Nummer, dem Mowse-Score, und mit Molekulargewicht und isoelektrischem Punkt.

Bei der Auswertung stellte sich heraus, dass drei Spots (Nummern 4, 20 und 27) mehr als ein Protein enthielten und dass verschiedene Spots als das gleiche Protein identifiziert wurden. Die Spotnummer 4 beispielsweise enthält sowohl Prolyl 4-Hydroxylase β als auch Vimentin. Diese beiden Proteine präsentieren sich auf dem Gel

als ein singulärer Spot mit gleichem MW und pI und wurden nur durch die MS differenziert.

Daneben bietet ein Protein zwei oder mehr verschiedene Spots mit gleichem Molekulargewicht, aber unterschiedlichem isoelektrischen Punkt. (vergleiche die Spotnummern 1 und 2). Ähnlich wurde ein Protein in verschiedenen Spots identifiziert mit gleichem isoelektrischen Punkt aber unterschiedlichem Molekulargewicht (vergleiche die Nummern 5, 6 und 7), was teilweise dadurch erklärbar ist, dass besonders stark exprimierte Spots streuen bzw. schmieren.

3.6.2 Expressionsveränderungen der Proteine

Im Vergleich aller Gele konnten 40 differenziell exprimierten Spots identifiziert und damit 35 Proteine bestimmt werden, aufgelistet in der Tabelle Nr. 11. Es wurden jeweils drei Gele angefertigt. Verglichen wurden die Gele der nullmutanten Zellen mit den Gelen der Kontrollzellen sowohl vor der Bestrahlung als auch nach Bestrahlung mit 0,5 bzw. 10 Gy. Interessanterweise nahmen die Expressionsunterschiede mit der Dosis der Bestrahlung zu, wobei in den Tabellen Nr. 12 und Nr. 13 zwischen erhöhter und erniedrigter Spotintensität unterschieden wird. Die Abbildung Nr. 15 verdeutlicht, dass sich vor der Bestrahlung lediglich drei Spotunterschiede zwischen den Kontrollzellen im Ausgangsgel und den nullmutanten Zellen detektieren lassen.

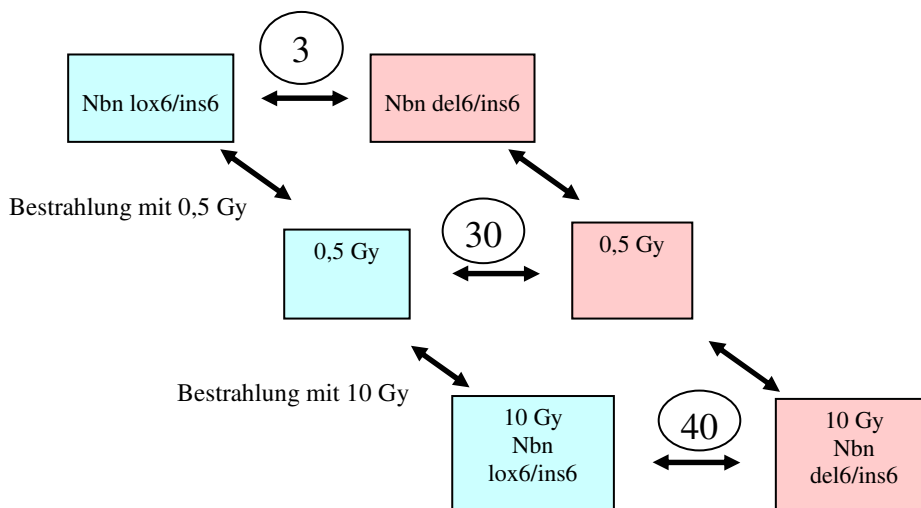


Abb. 15: Schema der Anzahl der veränderten Proteinspots. Gegenübergestellt sind die Kontrollzellen (Nbn^{lox6/ins6}, hellgrün) und die Nbn-nullmutanten Zellen (rosa), jeweils paarweise unbestrahlt, nach 0,5 Gy Bestrahlung und nach 10 Gy Bestrahlung.

Ergebnisse

Tab. 11: Auflistung aller identifizierten Proteine in Nbn-nullmutanten Zellen nach Bestrahlung im Vergleich zu den Kontrollzellen; Auflistung nach der Spotnummer, mit Namen, interner Abkürzung, SwissProt-Nummer, Molekulargewicht, isoelektrischen Punkt und Mowse-Score.

Spot-nummer	Protein-Name	Abkürzung (intern)	SwissProt-Nummer	Molekulargewicht	pI	Mowse Score
1	Prolyl4-Hydroxylase β	prol	P07237	57,09	4,8	1040
2	Prolyl4-Hydroxylase β	prol	P07237	57,09	4,3	127
3	Prolyl4-Hydroxylase β	prol	P07237	31	4,9	226
4	Prolyl4-Hydroxylase β	prol	P07237	53	4,8	78
4	Vimentin	vime	P08670	53	4,8	88
5	Vimentin	vime	P08670	53,55	5,06	1061
6	Vimentin	vime	P08670	65	5,06	1343
7	Vimentin	vime	P08670	44	5,06	284
8	Vimentin	vime	P08670	53,55	4,1	328
9	Calponin-2	calp	P922F8	33,15	7,53	374
10	Heat Shock Protein, 60 kDa	hsp6	P63038	60,9	6,3	219
11	Heat Shock Protein, 70 kDa	hsp7	Q61696	70,1	5,8	301
12	Alpha Enolase	eno	P06733	47,49	6,99	349
13	ATP Synthase α	synth	P25705	59,75	9,16	131
14	L-Lactat Dehydrogenase	lact	P07195	36,51	5,72	210
15	Nascent Polypeptid-Komplex α	naca	Q60817	23,38	4,52	323
16	Fruktose-Biphosphat Aldolase A	fruc	P04075	39,86	8,7	558
17	Isocitrat Dehydrogenase 1	iso	O8884	41	6,48	614
18	Isocitrat Dehydrogenase 1	iso	O8884	61	6,48	141
19	N-acetylneuraminic Acid-9-phosphat Synthetase	nana	Q9JJH0	39,96	6,61	100
20	Reticulocalbin 1	rcn1	Q05186	38,1	4,7	835
20	Reticulocalbin 3	rcn3	Q8BH97	38	4,74	630
21	Calcyclin Binding Protein	calc	Q9CXW3	34	7,64	457
22	Succinyl CoA Transferase 1	suc	Q9D0K2	55,98	8,73	701
23	Glutathion S-Transferase ω	gst ω	Q6V0Z6	23	6,92	71
24	Glutathion S-Transferase μ 1	gst μ	P10649	25,84	8,14	224
25	Proteasome subunit β 6	prot β 6	Q60692	25,42	4,97	222
26	Proteasome subunit α 2	prot α 2	P25787	25,77	7,12	186
27	Proteasome subunit β 5	prot β 5	O55234	22,97	8,65	709
27	Transgelin	trans	Q01995	22,65	8,9	137
28	Proteasome subunit β 1	prot β 1	O09061	25,37	6,5	378
29	Proteasome 26S subunit ATPase	prot26	P62334	44,17	7,09	214
30	PLIC-1/Ubiquilin 1	plic	Q8R317	61,98	4,86	166
31	Gamma-Actin	actin	P02571	41,33	6,1	586
32	Proliferating Cell Nuclear Antigen	pcna	P17918	28,78	4,66	724
33	Heterogeneous Nuclear-Ribonucleoprotein A/B	hnrbp	P22626	37,47	8,4	88

Ergebnisse

34	FK056 Binding Protein 1a	fkbp	P49025	11,79	7,5	189
35	Arhgdib Protein	arhg	P52565	23,2	5,03	256
36	B-Galactosid Binding Protein	galac	P09382	15,04	4,3	365
37	Syndecan Binding Protein	syn	O08992	32,37	6,66	61
38	Cellular Retinoic Acid Binding Protein 1	crab	P62965	15,46	5,3	349
39	Adenylyl Cyclase-assoziiertes Protein	acap	P40124	51,44	7,3	318
40	Apo-Cellular Retinoid Binding Protein	apo	Q9EPC5	15,42	5,9	155

Die Veränderungen im Proteom lassen sich in stärker oder schwächer exprimiert unterteilen, d.h. die Intensität eines Spots zum Vergleichsgel kann zu- oder abgenommen haben, der Spot kann aufgetaucht oder verschwunden sein.

Die Abbildung Nr. 16 veranschaulicht mittels Diagramm die Zahl der veränderten Proteine nach Bestrahlung. So werden nach 0,5 Gy Bestrahlung 18 Spots mit verstärkter Spotintensität detektiert und 12 mit verminderter Intensität. Nach 10 Gy Bestrahlung erhöht sich der Anteil der stärker exprimierten Spots auf 25, der der geringer exprimierten auf 15 Spots.

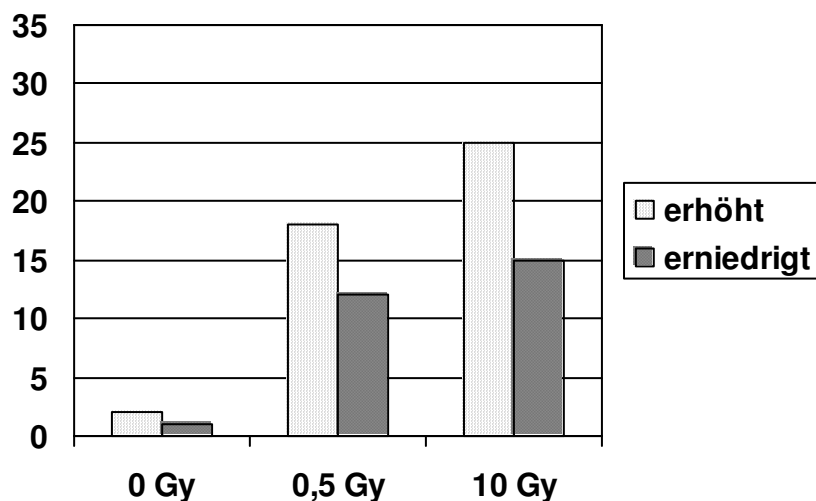


Abb. 16: Anzahl der Proteine, die erhöhte oder erniedrigte Spotintensitäten in Nbn-nullmutanten Zellen nach 0,5 Gy oder 10 Gy Bestrahlung im Vergleich zu nicht-behandelten Zellen zeigten.

Gesteigert exprimierte Proteine

Die Tabelle Nr. 12 listet alle Proteine auf, die eine Zunahme der Spotintensität zum Vergleichsgel aufweisen. Diese ist häufig nach 10 Gy Bestrahlung stärker als nach 0,5 Gy und wird mit einem Doppelplus (++) gekennzeichnet.

Auffällig ist, dass sämtliche dem Proteinmetabolismus zugeordnete Proteine eine Erhöhung des Expressionsgrads aufweisen; dagegen ist außer dem Cellular Retinol-binding Protein keines aus der Gruppe Zellzyklus/Proliferation enthalten.

Tab. 12: Liste der Proteine, die nach 0,5 Gy und 10 Gy Bestrahlung in den Nbn-nullmutanten Zellen eine gesteigerte Spotintensität aufweisen oder erschienen sind (+ bedeutet gering stärker exprimiert, ++ bedeutend stärker exprimiert, = keine Veränderung zum Referenzgel).

Nummer	Name	0,5 Gy	10 Gy
1,3	Prolyl4-Hydroxylase β	++	+
5,6,7	Vimentin	+	+
11	Heat Shock 70	+	++
10	Heat Shock 60	+	++
12	Alpha Enolase	+	++
13	ATP Synthase α	+	++
15	Nascent Polypeptid-Komplex α	+	++
16	Fruktose-Biphosphat Aldolase A	++	+
17	Isocitrat Dehydrogenase 1	=	+
20	Reticulocalbin 1+3	=	+
21	Calcyclin Binding Protein	+	++
25	Proteasome subunit β 6	+	++
26	Proteasome subunit α 2	+	++
27	Proteasome subunit β 5	+	+
28	Proteasome subunit β 1	=	+
29	Proteasome subunit ATPase	+	++
27	Transgelin	=	+
32	PCNA	+	++
33	HNRNP	=	++
34	FK506 Binding Protein	++	++
38	Cellular Retinoic Acid BP	+	+
40	Apo-Cellular Retinoid Binding Protein	+	+

Geringer exprimierte Proteine

Die in Tabelle Nr. 13 genannten Proteine weisen nach 0,5 Gy und oder nach 10 Gy eine geringere Spotintensität auf. Häufig ist die Abnahme nach 10 Gy Bestrahlung stärker als nach 0,5 Gy. Einige der Proteine lassen sich nicht mehr detektieren. Interessant ist,

dass die Proteine Prolyl4-Hydroxylase β , Vimentin und Isocitrat-Dehydrogenase nach Bestrahlung sowohl einen höheren als auch einen niedrigeren Expressionsgrad aufweisen, was darauf hindeutet, dass ein Protein in verschiedenen Modifikationen vorkommt und das Verhältnis der beiden Varianten durch die Bestrahlung verändert wird.

Tab. 13: Liste der Proteine, die nach 0,5 Gy und 10 Gy Bestrahlung eine geringere Spotintensität aufweisen oder nicht mehr detektierbar sind (- bedeutet gering schwächer exprimiert, -- deutlich schwächer exprimiert, = keine Veränderung zum Referenzgel, O bedeutet, der Spot ist nicht detektierbar).

Nummer	Name	0,5 Gy	10 Gy
2,4	Prolyl4-Hydroxylase β	-	--
4,8	Vimentin	-	--
9	Calponin-2	=	-
14	L-Lactat Dehydrogenase	=	--
15	Nascent Polypeptid-Komplex α	-	--
18	Isocitrat Dehydrogenase 1	--	-
19	N-acetylneuraminic Acid-9-phosphat Synthetase	-	--
22	Succinyl CoA Transferase 1	-	O
23	GST ω	O	O
24	GST μ	-	--
30	PLIC-1	=	--
35	Arhgdib Protein	--	-
36	Galectin	-	--
37	Syndecan Binding Protein	-	--
39	Adenylyl Cyclase-assoziiertes Protein	-	--

3.6.3 Funktionelle Proteingruppen

Die Proteine wurden in funktionelle Gruppen eingeteilt. Der Großteil der Proteine betraf entweder den Protein- oder den Energiestoffwechsel (Abbildung Nr. 17). So wurden 7 Proteine dem Protein-, 11 Proteine dem Energiestoffwechsel und 3 Proteine der Gruppe der Chaperone zugeordnet. Daneben wurden 5 Proteine in die Kategorie Zellzyklus/Proliferation, 2 Proteine in die Kategorie Signaltransduktion und 2 Proteine in die der Transkription und Translation assoziierten Proteine eingeteilt. Außerdem wurden 3 Proteine als Zytoskelett-assoziiert und 2 als Kollagen-assoziiert klassifiziert.

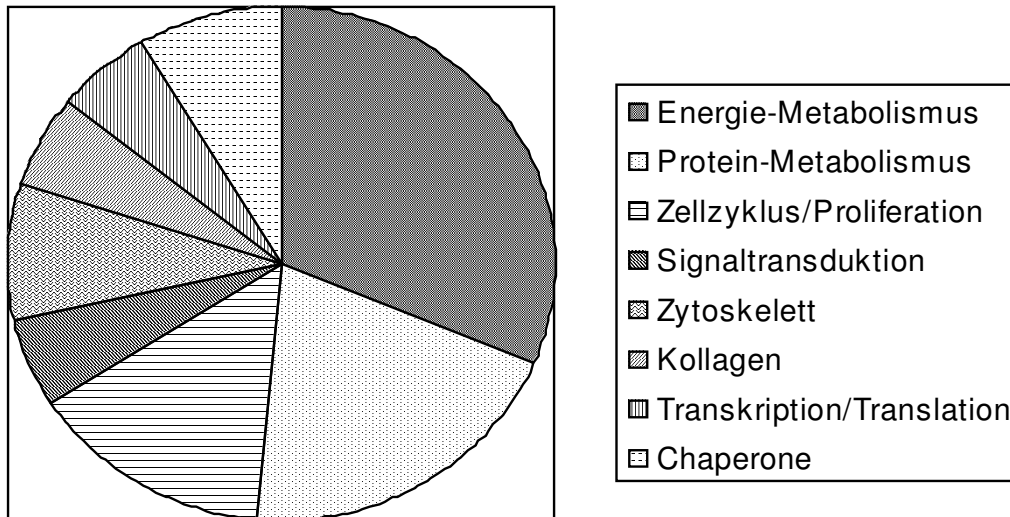


Abb. 17: Kreisdiagramm der 8 funktionellen Gruppen (Proteinmetabolismus, Energiemetabolismus, Chaperone, Zellzyklus/Proliferation, Signaltransduktion, Transkription/Translation, Zytoskelett- und Kollagen-assoziiert). Die Segmentgröße entspricht der Anzahl der veränderten Proteine der nullmutanten Zellen nach 10 Gy Bestrahlung.

In der Kategorie des Energiemetabolismus waren 6 Proteine von größerer Intensität und 5 Proteine von geringerer Intensität exprimiert. Die stärker gefärbten Proteinspots wurden als ATP Synthase α , Alpha Enolase, Fruktose-Biphosphat Aldolase A, Isocitrate-Dehydrogenase 1, Reticulocalbin 3 + 1 identifiziert. Die Abbildung Nr. 18 demonstriert die Expressionsunterschiede dieser Proteine. Allerdings wurden zwei Spots als Isocitrat-Dehydrogenase identifiziert, von denen sich der Spot Nummer 18 mit einem Molekulargewicht von 61 kDa als in seiner Expression reduziert zeigte.

Die Expressionsgrade korrelieren meist mit der Zunahme der Bestrahlungsdosis. Allerdings fällt bei der Betrachtung der Fruktose-Biphosphat Aldolase A auf, dass dieses nach 0,5 Gy Bestrahlung stärker exprimiert wird als nach 10 Gy. Auch zeigt sich die Intensitätszunahme der Proteine Reticulocalbin 1 und 3 erst nach 10 Gy Bestrahlung. Daneben ist der als Succinyl CoA Transferase 1 identifizierte Spot nach 10 Gy Bestrahlung kaum noch zu erkennen.

Proteine des Energiestoffwechsels

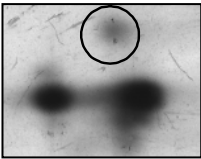
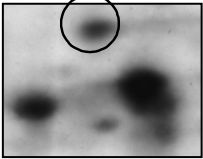
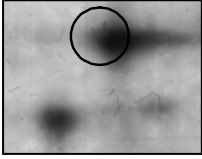
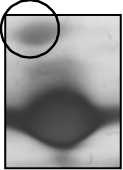
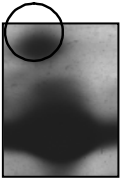
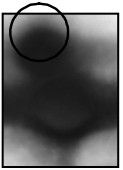
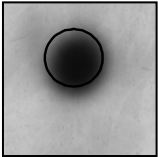
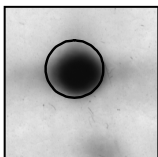
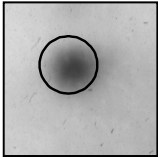
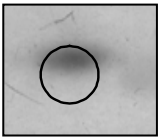
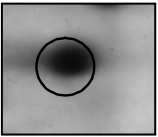
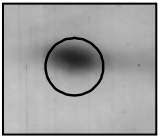
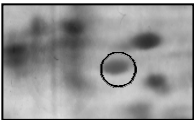
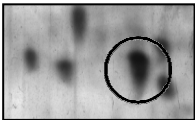
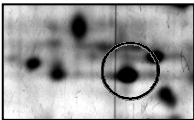
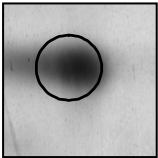
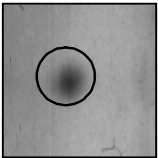
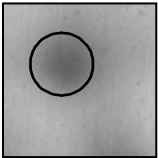
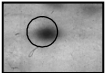
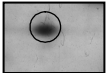
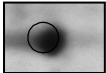
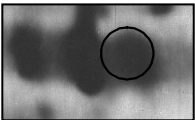
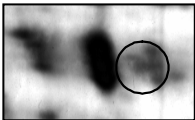
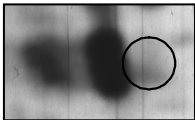
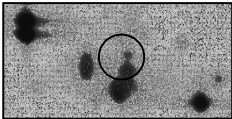
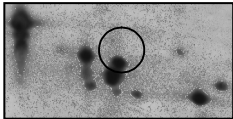
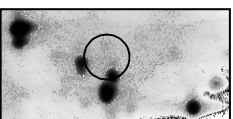
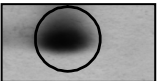
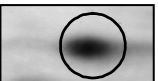
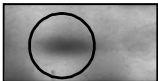
Name	Nbn ^{lox6/ins6}	Nbn ^{del6/ins6} 0,5 Gy	Nbn ^{del6/ins6} 10 Gy
Alpha Enolase			
ATP Synthase α			
L-Lactat Dehydrogenase			
Fruktose-Biphosphat Aldolase			
Isocitrat Dehydrogenase			
N-acetylneuraminic Acid-9-phosphat Synthetase			
Reticulocalbin 1+3			
Succinyl CoA Transferase 1			
Glutathion S-Transferase ω			
Glutathion S-Transferase μ			

Abb. 18: Spezifische Expressionsveränderungen der Spots, die der Gruppe des Energiemetabolismus zugeordnet wurden. Gelausschnitte aus drei Gelen (Referenzgel vs. Gele der Nbn-nullmutanten Zellen nach 0,5 Gy und nach 10 Gy Bestrahlung).

Die Kategorie Zellzyklus/Proliferation enthält das β -Galactosid Binding Protein (Galectin), das Syndecan Binding Protein, das Cellular Retinoic Acid Binding Protein (CRABP), das Apo-Cellular Retinoid-Binding Protein 1 und das Adenylyl Cyclase-assoziierte Protein. Von diesen zeigen CRABP und das zugehörige Apo-Cellular Retinoid-bindende Protein eine Veränderungen zu einem dunkleren Spot, die anderen Proteine demonstrieren hellere Spots nach Bestrahlung und somit geringere Proteinexpression (Abbildung Nr. 19).

Zellzyklus/Proliferation

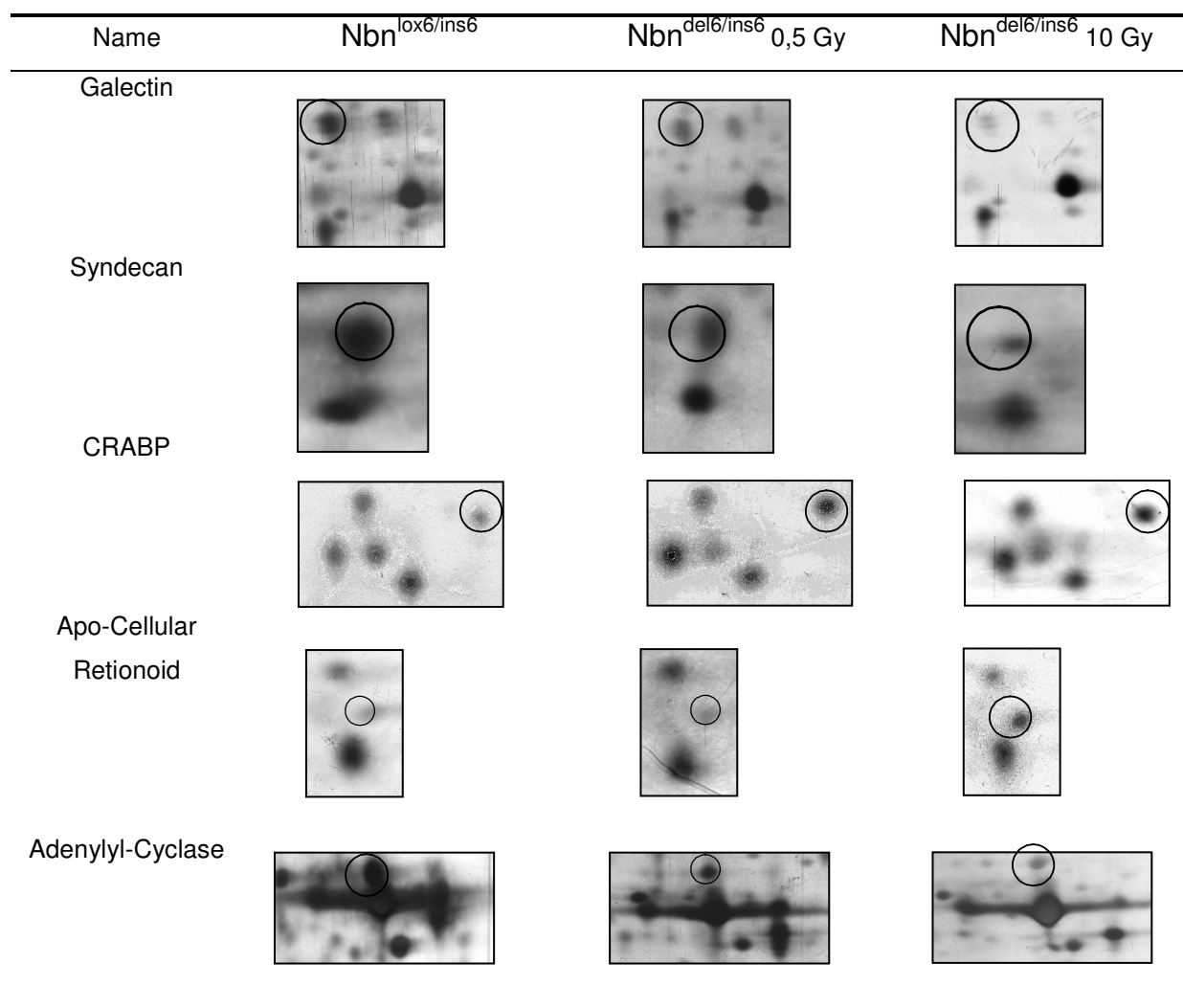


Abb. 19: Spezifische Intensitätsveränderung der Proteine, die der Gruppe Zellzyklus/Proliferation zugeteilt wurden. Gelausschnitte aus drei Gelen (Vergleichsgel vs. Gele der Nbn-nullmutanten Zellen nach 0,5 Gy und nach 10 Gy Bestrahlung).

Die Expressionsunterschiede in der Gruppe des Proteinmetabolismus stellt die Abbildungen Nr. 20 dar. Zu dieser gehören das Calcylin Binding Protein, PLIC-1, und mehrere Proteasome (subunits $\beta 6$, $\alpha 2$, $\beta 5$, $\beta 1$ und ATPase). Von diesen sind alle nach Bestrahlung von stärkerer Intensität im Vergleich zum Referenzgel außer PLIC-1, welches eine geringere Intensität zeigt.

Proteine des Proteinstoffwechsels

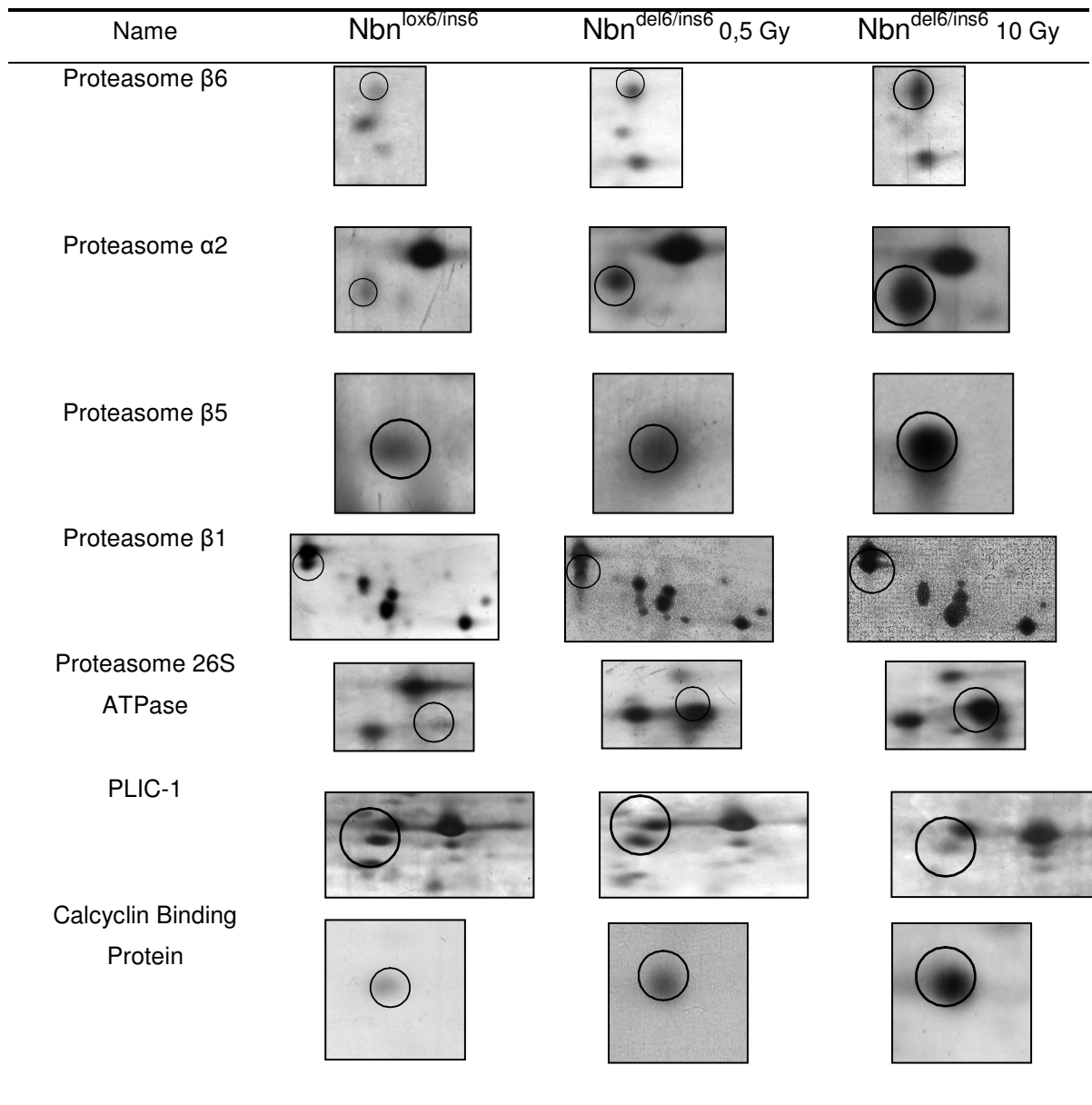


Abb. 20: Expressionszunahmen der Spots der Kategorie Proteinmetabolismus. Gelausschnitte aus drei Gelen (Vergleichsgel vs. Gele der Nbn-nullmutanten Zellen nach 0,5 Gy und nach 10 Gy Bestrahlung).

Die Gruppe der Chaperone umfasst das Heat Shock Protein 60 kDa, das Heat Shock Protein 70 kDa und den Nascent Polypeptide-Komplex α , wobei alle hochreguliert werden. Die Abbildung Nr. 21 verdeutlicht diese Unterschiede der Spotintensitäten.

Chaperone

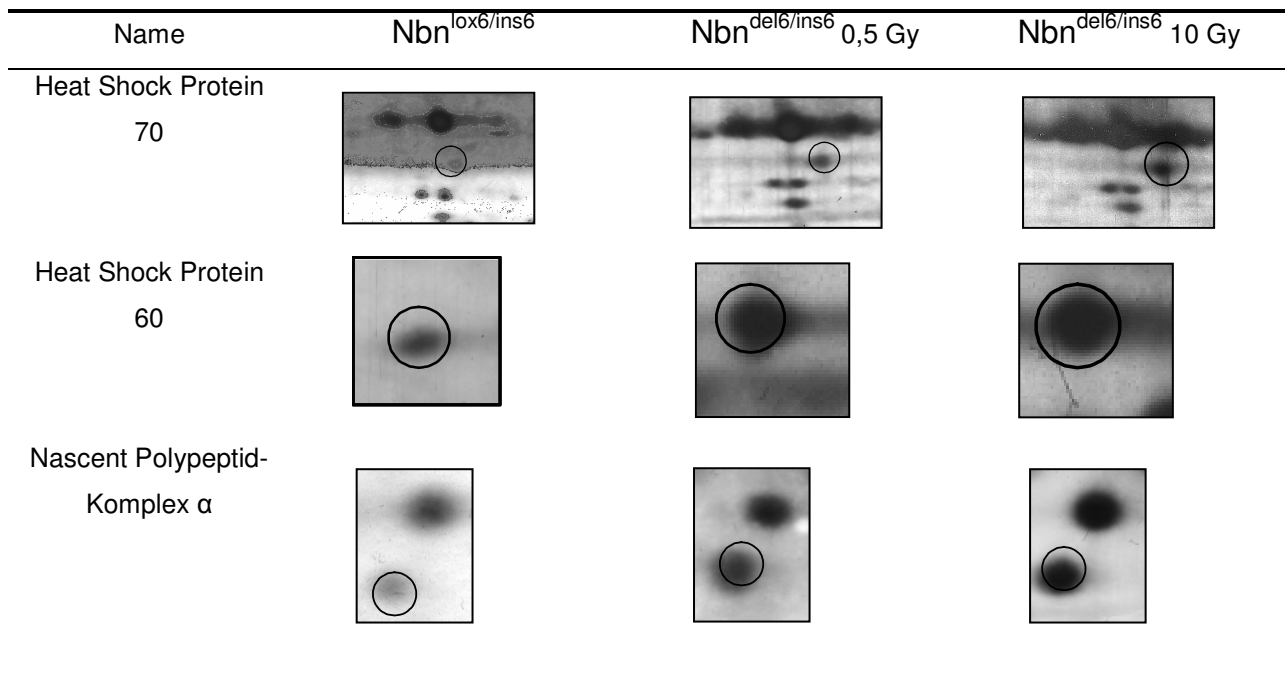


Abb. 21: Spezifische Intensitätsveränderungen der Gruppe der Chaperone. Gelausschnitte aus drei Gelen (Vergleichsgel, Gele der Nbn-nullmutanten Zellen nach 0,5 Gy und nach 10 Gy Bestrahlung).

Der Gruppe Signaltransduktion wurden das FK506 Binding Protein 1A und das Arhgdib-Protein zugeteilt, FK506 wird bereits nach 0,5 Gy Bestrahlung verstärkt exprimiert, das Arhgdib-Protein zeigt eine schwächere Expression besonders nach 0,5 Gy Bestrahlung, dargestellt in Abbildung Nr. 22.

Signaltransduktion

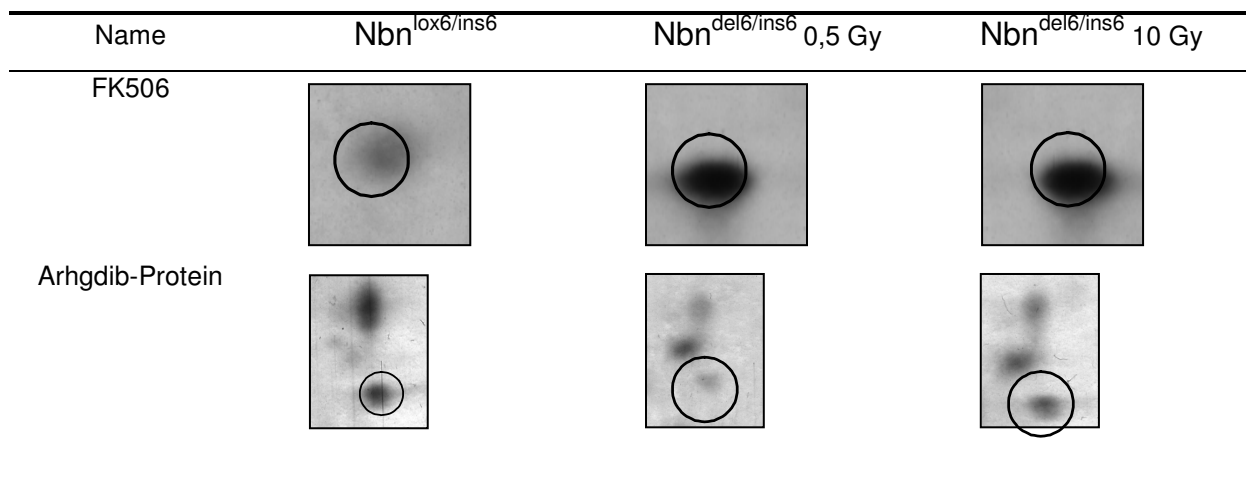


Abb. 22: Spezifische Expressionsveränderung der Gruppe Signaltransduktion. Gelausschnitte aus drei Gelen (Vergleichsgel vs. Gele der Nbn-nullmutanten Zellen nach 0,5 Gy und nach 10 Gy Bestrahlung).

Als Kollagen-assoziiert wurden Prolyl 4-Hydroxylase β und Calponin-2 klassifiziert. Prolyl 4-Hydroxylase β wurde zum einen wie auch der Spot Calponin-2 mit verminderter Spotintensität detektiert, zum anderen mit verstärkter Spotintensität (vergleiche die Spots in der Abbildung Nr. 23). Von den vier Spots, die als Prolyl 4-Hydroxylase β identifiziert wurden, zeigten zwei eine Zunahme und zwei eine Abnahme der Spotexpression, jeweils eins wird dargestellt.

Kollagen-assoziierte Proteine

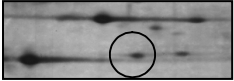
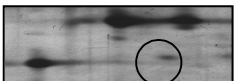
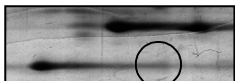
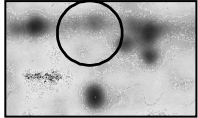
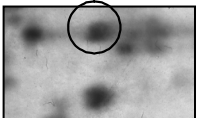
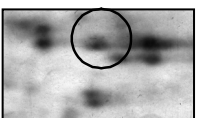
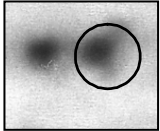
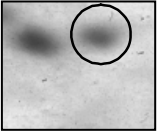
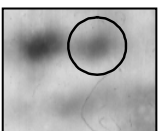
Name	Nbnlox6/ins6	Nbndel6/ins6 0,5 Gy	Nbndel6/ins6 10 Gy
Prolyl 4-Hydroxylase β			
			
Calponin-2			

Abb. 23: Intensitätsveränderungen der kollagen-zugehörigen Spots. Gelausschnitte aus drei Gelen (Vergleichsgel vs. Gele der Nbn-nullmutanten Zellen nach 0,5 Gy und nach 10 Gy Bestrahlung).

Als Zytoskelett-assoziiert wurden die Proteine Vimentin, γ -Actin und Transgelin eingruppiert. Von diesen erscheinen Gamma-Actin und Transgelin nach Bestrahlung in den mit Cre Recombinase Exon6-deletierten Zellen hochreguliert zu werden (Abbildung Nr. 24). Vimentin präsentiert in 3 der 5 analysierten Spots eine Steigerung des Expressionsgrades, jedoch in 2 Spots eine Reduktion, von denen 3 in der Abbildung 25 gezeigt sind.

Zytoskelett-assoziierte Proteine

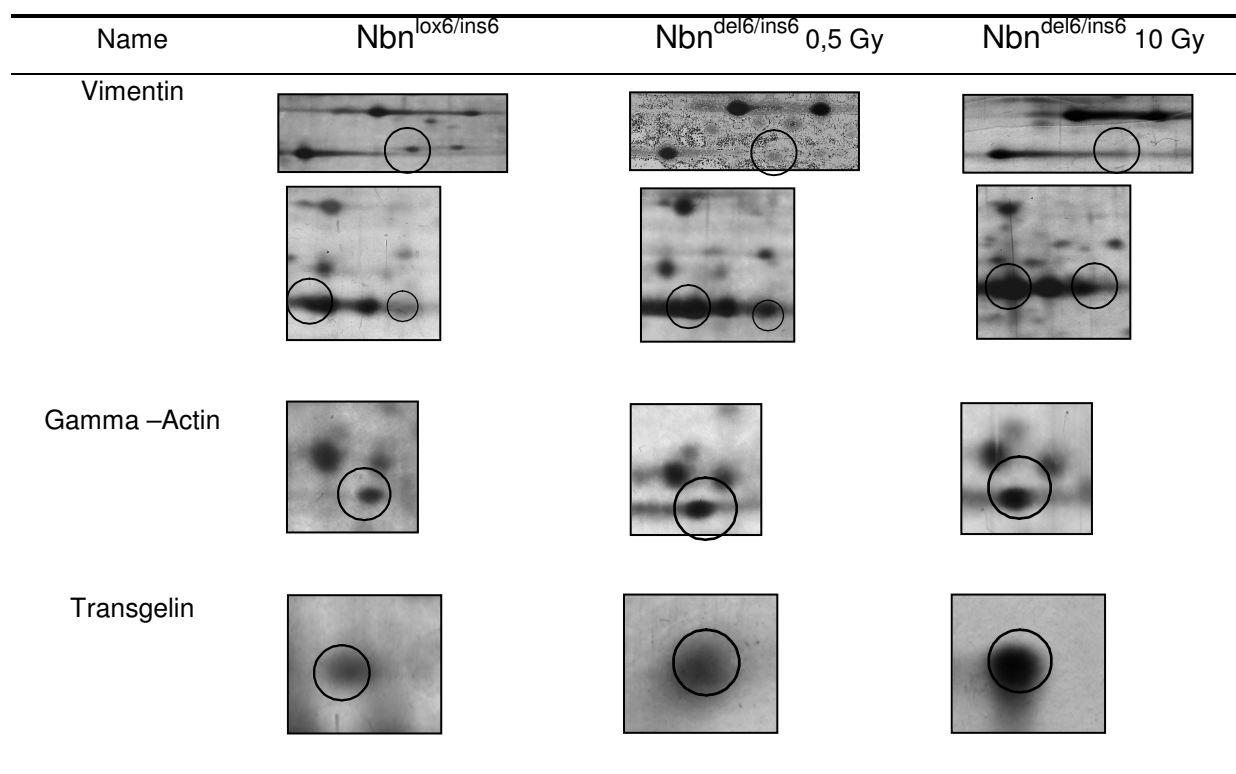


Abb. 24: Spezifische Expressionsveränderungen der Zytoskelett-assoziierten Spots. Gelausschnitte aus drei Gelen (Vergleichsgel vs. Gele der Nbn-nullmutanten Zellen nach 0,5 Gy und nach 10 Gy Bestrahlung).

Die Kategorie Transkription und Translation assoziierte Proteine beinhaltet das Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) und das Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A/B (HNRNP); beide weisen einen erhöhten Expressionsgrad in den durch Cre Recombinase deletierten Zellen nach Bestrahlung auf (Abbildung Nr. 25). Jedoch zeigt PCNA keinen Unterschied in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis, HNRNP dagegen präsentiert erst nach 10 Gy Bestrahlung eine eindeutige Zunahme der Spotintensität.

Insgesamt konnten etwa 19 Spots nicht identifiziert werden, da entweder ihre Massenspektren nicht mit in den Datenbanken vorhandenen übereinstimmten oder der Mowse-Score wurde als nicht signifikant beurteilt.

Transkription/Translation

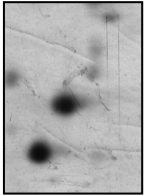
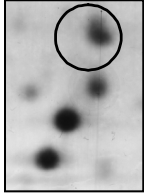
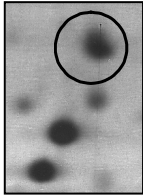
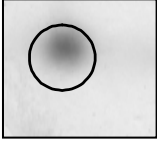
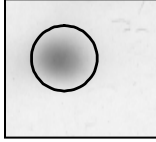
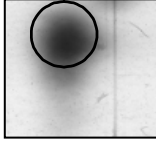
Name	Nbn ^{lox6/ins6}	Nbn ^{del6/ins6} 0,5 Gy	Nbn ^{del6/ins6} 10 Gy
PCNA			
HNRNP			

Abb. 25: Spezifische Spotveränderungen der Proteine der Kategorie Transkription/Translation. Gelausschnitte aus drei Gelen (Vergleichsgel vs. Gele der Nbn-nullmutanten Zellen nach 0,5 Gy und nach 10 Gy Bestrahlung).

So lassen sich die 35 eindeutig identifizierten Proteine in 8 verschiedene Gruppen unterteilen, welche relevant für das Krankheitsbild des Nijmegen Breakage Syndroms sein könnten. Auffällig sind insbesondere die Kategorien Signaltransduktion, Transkription/Translation und Zellzyklus/Proliferation, da es bei diesen durch Nibrindefizienz zu Modifizierungen gekommen sein kann und die Zelle Kompensationsmechanismen oder alternative Regulierungen benötigt.

4 Diskussion

4.1 Vorbereitung zur Proteom-Analyse

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung veränderter Proteinexpression beim Nijmegen Breakage Syndrom. Hierzu wurden mittels eines Knock-out-Modells nibrindefizienten Zellen generiert, welche durch das Protein Cre Recombinase zu nullmutanten Fibroblasten modifiziert worden waren. Das Cre Protein wurde mittels NTA-Nickel-Affinitätschromatographie aufgereinigt und zeigte ein starkes Absorptionspeak der Fraktion 6 im Elutionsprofil. Insgesamt wurden 5 Fraktionen gesammelt und in der SDS-Gelelektrophorese der verschiedenen Fraktionen wurden deutliche Banden detektiert, so dass von einer guten Aktivität und Reinheit ausgegangen werden konnte. Die Fraktion 6 wurde durch die PCR als diejenige mit der höchsten Aktivität bestimmt und lag mit 96% bei 6 μ M in einem befriedigenden Bereich. Diese wurde daraufhin für die Exon6-Deletion der heterozygoten Zellen verwendet. Die behandelten Zellen zeigten im Vergleich zu undeletierten Zellen annähernd keine Expressionsveränderungen im 2D-Großgel, welches die Rolle Nibrins vor allem im Rahmen der DNA-Reparatur verdeutlicht. Um gezielt Doppelstrangbrüche und chromosomale Abberationen zu erzeugen, wurden die Zellen mit einer Dosis von 0,5 Gy oder 10 Gy bestrahlt. Durch Experimente zur Nibrinexpression und zum Zellwachstum konnte das optimale Zeitfenster für die Bestrahlung bestimmt werden. So zeigte sich, dass ab Tag 2 bis zum Tag 10 nach der Behandlung mit Cre Recombinase so gut wie kein Nibrin exprimiert wurde und somit optimal für den Zeitpunkt der Bestrahlung ist. In dieser Zeit scheint in nahezu allen Zellen das Exon 6 deletiert und somit Nibrin exprimiert. Nach 17 Tagen wird Nibrin wieder stark detektiert, exprimiert von Zellen, deren Exon nicht deletiert wurde und die sich durch diesen Überlebensvorteil vermehren konnten. Ausgehend von diesem Versuch wurden die Fibroblasten an Tag 2 und 3 nach der Cre-Deletion bestrahlt und nach weiteren 24 Stunden Kultivierung lysiert. Die Deletionseffizienz wurde mit Hilfe der PCR bestimmt, die nach zweimaliger Inkubation mit Cre Recombinase annähernd 100% betrug, so dass insgesamt von aussagekräftigen Ergebnissen ausgegangen werden kann.

Die Zellen wurden zur weiteren Analyse durch die 2D-Gel-Elektrophorese vorbereitet und die einzelnen Proteine wurden nach ihrem isoelektrischem Punkt und ihrer

molekularer Masse auf einem 2D-Polyacrylamid-Großgel aufgetrennt. Die Gele zeigten eine hochaufgelöste Trennung bei hochsensitiver Silberfärbung, und mittels der Massenspektrometrie konnten 35 in nullmutanten gegenüber heterozygoten Zellen veränderte Proteine eindeutig und mit signifikantem Mowse-Score identifiziert werden.

4.2 Diskussion der Proteom-Analyse

Nach Entschlüsselung des menschlichen Genoms hat sich die Proteom-Analyse mit der Identifizierung und Quantifizierung der Proteine in ihrer Gesamtheit als fester Bestandteil in der biomedizinischen Forschung etabliert und bietet aufgrund ihrer schnellen Technologieweiterentwicklung und ihrer hohen Auflösungskapazität entscheidende Vorteile.

Da es sich bei den hier verwendeten Zellen um nullmutante Zellen handelte, konnte die volle Tragweite der Nibrindefizienz mit ihren Konsequenzen auf die Proteinexpression untersucht werden. Im Gegensatz dazu findet in Patientenzellen noch eine Teilkompensation durch das p70-Fragment statt und die exakte Analyse der verschiedenen Regulierungs- und Reparaturmechanismen gestaltet sich schwieriger. Natürlich müssen Ergebnisse durch humane Proteom-Studien oder andere Studien an Patienten untermauert werden.

Für diese Arbeit wurde die 2D-Elektrophorese auf Basis der isoelektrischen Fokussierung sowie Auftrennung nach Molekulargewicht in Kombination mit der hochsensitive Silberfärbung verwendet. Die Handhabung der 1. Dimension gestaltet sich komplikationslos, mehrere Gele können simultan gegossen und die Fokussierung gestartet werden. Um eine gute Denaturierung bei der Probenbehandlung zu erreichen, werden hohe Harnstoffkonzentrationen zugesetzt. Auch die Abläufe der 2. Dimension und der Silberfärbung routinierten sich nach einiger Zeit und ermöglichen vergleichbare, homogene Gele mit differenzierten Spotmustern.

Zum Spotvergleich wurden die Gele visuell auf einem Leuchtkasten evaluiert, es wurde keine Software benutzt. Dies ermöglicht eine gleichwertige Analyse aller Gele, ohne vorher ein Referenzgel festlegen zu müssen.

Zur Detektion der Proteine wurde eine Silberfärbung verwendet, die MS kompatibel und sensitiver als eine Coomassie Blue Färbung ist. Auch die im Lysepuffer enthaltenen Stoffe beeinträchtigen die Massenspektrometrie nicht. Insgesamt wurden etwa 60 Spots

tryptisch hydrolysiert und analysiert. Die Datenbanksuche wurde mit MASCOT gegen die SwissProt-Datenbank durchgeführt. Nur Proteine mit einem Score größer als 61 wurden als signifikant bewertet ($p < 0,05$).

Die Proteom-Analyse ergab eine Vielzahl von differentiell exprimierten Proteinen, 40 wurden eindeutig identifiziert und 35 verändert exprimierten Proteinen zugeordnet. Diese lassen sich hinsichtlich ihrer Funktionen verschiedenen Gruppen zuordnen. Folgende 8 Kategorien wurden definiert: Proteinmetabolismus, Energiemetabolismus, Chaperone, Signaltransduktion, Transkription/Translation, Zellzyklus/Proliferation, Zytoskelett und Kollagen.

Allerdings wird die Methode dem Anspruch, alle von der Zelle exprimierten Proteine darzustellen, meist nicht gerecht. Durch die Aufbereitung gehen Proteine verloren und sehr basische und sehr saure Proteine sind schwer darzustellen. Oft können besonders gering exprimierte Proteine wegen unzureichender Sensitivität nicht identifiziert werden¹³⁷. So wurden auch in dieser Arbeit Spots geringerer Intensität nicht identifiziert und beispielsweise Nibrin in den Kontrollzellen nicht dargestellt. Gerade Proteine, die an Reparaturmechanismen und Checkpointregulationen beteiligt sind, sind in der Zelle häufig nur in geringer Anzahl vorhanden und entziehen sich so einer Proteomanalyse.

Von den 35 identifizierten Proteinen in den nullmutanten Zellen wurden 21 Proteine verstärkt und 14 vermindert exprimiert. Auch korrelierte der Grad der Veränderung mit der Zunahme der Strahlendosis und nach 10 Gy waren mehr Proteine verändert (37) als nach 0,5 Gy (24 Proteine). Dahingehend lässt sich feststellen, dass Veränderungen sich eher bei hoher Bestrahlung (10 Gy) als geringer (0,5 Gy) zeigen, so dass die beiden Strahlungsdosen gut gewählt erscheinen.

Es wurden einige Spots analysiert, die zwei unterschiedliche Proteinidentitäten beinhalteten, obwohl visuell nur ein singulärer Spot zu erkennen war (Prolyl4-Hydroxylase β und Vimentin, Transgelin und Proteasome subunit $\beta 5$, Reticulocalbin 1 und 3). Dies veranschaulicht die gute Analysefähigkeit der Massenspektrometrie. Daneben wurden Proteine identifiziert, die zwei unterschiedliche isoelektrische Punkte bei gleichem Molekulargewicht aufweisen oder die in zwei verschiedenen Spots mit gleichem isoelektrischen Punkt aber unterschiedlichem Molekulargewicht identifiziert wurden (Prolyl4-Hydroxylase β , Vimentin, Isocitrat Dehydrogenase 1). Dies deutet auf

verschiedene Isoformen eines Proteins oder auf posttranslationale Modifizierungen hin. Solche elektrophoretische Shifts wurden bei Kollagen-assoziierten Proteinen beschrieben¹³⁸. Somit können Proteine nicht einfach anhand des Molekulargewichts und des theoretischen isoelektrischen Punkts, der von Datenbanken errechnet wird, erschlossen werden, da auch dieser gewebe- und zellspezifisch sein kann.

4.3 Diskussion der in nullmutanten Zellen differenziell exprimierten Proteine

Die einzelnen Proteine wurden in verschiedene funktionelle Gruppen eingeteilt. Wert gelegt wurde bei der Auswertung vor allem auf Proteine, die relevant für das molekularbiologische oder klinische Bild des Nijmegen Breakage Syndroms sind. Dies trifft besonders auf die Kategorien Proteinmetabolismus und Chaperone, sowie Transkription/Translation und Zellzyklus/Proliferation zu.

4.3.1 Proteine des Proteinmetabolismus

Innerhalb dieser Gruppe wurden folgende Proteine identifiziert: die Proteasomuntereinheiten $\beta 6$, $\alpha 2$, $\beta 5$, $\beta 1$ und 26S ATPase, PLIC-1 und das Calcyclin Binding Protein.

Interessant ist die starke Expressionssteigerung der verschiedenen Proteasomuntereinheiten. Proteasome sind Proteinkomplexe aus mehreren Untereinheiten, die für die Degradierung durch Proteolyse von geschädigten und falsch gefalteten Proteinen verantwortlich sind. Dies geschieht in Kollaboration mit Ubiquitinmolekülen und wird als Ubiquitin-Proteasom-System bezeichnet. Dieses System spielt sowohl eine entscheidende Rolle bei der Zellzyklusprogression und Checkpointkontrolle, da es die Konzentration phasenabhängiger Zykline reguliert, als auch beim Apoptoseprozess. So wurden verstärkte Protein-Ubiquitinierungen lange vor der Apoptoseeinleitung beobachtet¹³⁹. Die Proteasom-Inhibierung hat auf Zellen oft proapoptotische Effekte¹⁴⁰, beobachtet wurde auch ein Seneszenz-ähnlicher Zustand in diesen Zellen (replikative Seneszenz). Dieser irreversible Wachstumsstopp in Fibroblasten nach einer gewissen Anzahl von Teilungen scheint durch behinderte

proteasomale Funktionen und reduzierte Quantität einiger Untereinheiten gekennzeichnet zu sein ¹⁴¹.

Daneben wird eine verminderte Proteasomeaktivität mit verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen, wie die Parkinson-Krankheit, in Verbindung gebracht, da missgestaltete Proteine akkumulieren können ¹⁴².

Es wurde mehrfach eine enge Beziehung zwischen dem Ubiquitin-Proteasom-System und der Nukleotid Exzisions Reparatur (NER) konstatiert ¹⁴³, auf welche später noch genauer eingegangen wird. So erleichtert die 19S Untereinheit als Chaperonin die Konformation einiger an der NER beteiligten Proteine ¹⁴⁴. Außerdem gibt es Publikationen, die eine Rekrutierung von Proteasomuntereinheiten zu den Orten von Doppelstrangbrüchen und somit deren Involvierung in der Reparatur von DSB beschreiben ¹⁴⁵. Diese Rekrutierung scheint abhängig von Komponenten der HR und NHEJ zu sein und möglicherweise bewirken die Proteasome die Degradierung der beteiligten Komponenten nach Vollendung der Reparatur.

Kürzlich wurde eine Proteom-Analyse zu Ataxia telangiectasia publiziert, die vor allem Proteine identifizierte, die dem Ubiquitin-Proteasom-System angehören ¹⁴⁶. Die Autoren betonen die bedeutende Rolle dieser Proteine am G1/S-Checkpoint und der Zellzykluskontrolle.

Dies könnte durch Ergebnisse dieser Arbeit unterstützt werden. Beim Vergleich der Proteome fällt auf, dass die Anzahl der identifizierten Proteasomuntereinheiten (5) vergleichsweise hoch ist. Auch zeigen sämtliche Untereinheiten eine verstärkte Expression. Dies deutet daraufhin, dass nach Induktion von Schäden der DNA durch die Bestrahlung nullmutanter Zellen eine starke Aktivierung von Proteasomuntereinheiten erfolgt. Aufgrund fehlender Nibrinexpression sind die Reparatur- und Checkpointkontrollfähigkeit eingeschränkt und bedürfen alternativer Mechanismen und Pathways. Einige wichtige Funktionen könnten die Proteasomuntereinheiten übernehmen: neben der Degradierung von geschädigten oder nicht mehr benötigten Proteinen könnten sie eine Stimulierung von Reparaturmechanismen wie der HR und NHEJ bewirken und zudem die Kontrolle am G1/S-Checkpoint aufrechterhalten.

Allerdings könnte diese Aktivitätssteigerung des Proteasoms auch negative Konsequenzen für die Integrität der Zelle haben. Eine Überexpression von Proteasomen bessert zwar das zelluläre Überleben ¹⁴¹ aber erleichtert auch das Wachstum von tumorösen Zellen. Proteasom-Inhibitoren werden deshalb als

Chemotherapeutika eingesetzt, die die Apoptose von sich schnell teilenden Tumorzellen stimulieren. Diesbezüglich könnte im Rahmen des Nijmegen Breakage Syndrom die verstärkte Proteasomaktivität einen Beitrag zu der beobachteten frühen Tumorentstehung bei den Betroffenen leisten und gleichzeitig auf alternative Regulierungen hinweisen.

Der Gruppe der Proteinmetabolismus wurden außerdem das Calcyclin-binding Protein und PLIC-1 zugeteilt. PLIC-1 (auch Ubiquilin-1) zeigte nach Bestrahlung eine geringere Spotintensität, Calcyclin dagegen eine Heraufregulierung. Calcyclin ist ähnlich wie die Proteasomen involviert in der Ubiquinierung und proteasomalen Degradation von Proteinen. Seine Expression wird in proliferativen Zellen hochreguliert und erreicht seinen Peak beim Übergang der G1 zur S-Phase ¹⁴⁷.

4.3.2 Die Chaperone

Hierzu wurden die Heat Shock Proteine 70 und 60 und der Nascent Polypeptid-Komplex α gerechnet.

Proteasome arbeiten bei der Stressantwort Hand in Hand mit den Heat Shock Proteinen. Durch molekulare Schäden werden abnormal gefaltete Proteine verursacht, welche von den Heat Shock Proteine für die Degradierung durch die Proteasome gekennzeichnet werden ¹⁴⁸.

Heat Shock Proteine (HSPs) sind eine Gruppe von hoch konservierten Proteinen, die als Stressproteine nach Faktoren wie Temperaturerhöhungen, osmotische oder oxidative Veränderungen verstärkt exprimiert werden ^{149, 150}. Neben ihrer Rolle der Proteindegredierung helfen sie als Chaperone bei der Reparatur und korrekten Zurückfaltung von Proteinen. Zudem verhindern sie durch Bindung an diese Wechselwirkungen, die zur Aggregation führen ¹⁵¹. Durch Ruhigstellung veränderter Proteine können Chaperone Mutationskonsequenzen neutralisieren. Darüber hinaus sind sie wichtig für den Proteintransport von einem Kompartiment zum anderen und tragen allgemein zur Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase bei ¹⁵².

Vermutlich verhalten sich die Induktion von Heat Shock Proteinen und die Apoptoseinduktion gegensätzlich, da eine Akkumulation von Heat Shock Proteinen wie Hsp 10/10 oder Hsp 70/72 die zelluläre Apoptoseresistenz erhöht ¹⁵³. Von Hsp 70

wurde mehrfach berichtet, dass es in Apoptosewege einzugreifen vermag; so können apoptotische Stimuli inhibiert und Immortalität verursacht werden^{154, 155} oder durch Bindung an p53 können dessen proapoptotische Funktionen beeinträchtigt werden¹⁵⁶. Die beiden Mitglieder Hsp60 und Hsp70 wurden auch in dieser Arbeit als differenziell exprimiert identifiziert und bei NBS wurde auch eine verminderte Apoptose beobachtet. Daneben wird Altern mit einer verminderten Stressantwort durch Heat Shock Proteine in Verbindung gebracht¹⁵⁷. Die Produktion von HSPs im Alter sinkt¹⁵⁸, so dass geschädigte Proteine leichter akkumulieren können^{159, 160} und Hsp70 wurde bei der replikativen Seneszenz vermindert exprimiert gefunden¹⁶¹. Replikative Seneszenz bedeutet, dass Zellen eine begrenzte Anzahl an Teilungszyklen durchlaufen, bevor sie in einen irreversiblen Wachstumsstillstand übergehen. Dementsprechend wird eine Aktivitätsreduktion auch mit neurodegenerativen Erkrankungen korreliert¹⁶².

Dagegen wurde eine Erhöhung von Hsp60 besonders zu Beginn der replikativen Seneszenz beobachtet¹⁶³ und korreliert mit einer Verlangsamung des Zellzyklus. Des Weiteren wurde eine Assoziation von Hsp 60 mit der unkontrollierten Zellproliferation in Tumorzellen beschrieben und Hsp60-Inhibitoren könnten ebenso wie Proteasominhibitoren als Chemotherapeutika wirken und gezielt die Apoptose in Tumorzellen stimulieren¹⁶⁴.

Somit deutet die in dieser Arbeit beobachtete Expressionserhöhung von Hsp60 und Hsp70 zum einen auf die Induktion der Stressantwort nach Bestrahlung hin. Die Stressproteine werden hochreguliert, um Proteinmissfaltungen zu korrigieren und um den Zellzyklus zu verlangsamen. Zum anderen können die erhöhten Konzentrationen der Heat Shock Proteine eine Apoptoseeinleitung verhindern und so Wachstum von veränderten, malignen Zellen begünstigen. Hier lässt sich eine Beziehung zum klinischen Bild des NBS knüpfen. Ebenso könnte dessen Variabilität durch unterschiedliche Muster der Proteasom- und Hsp-Expression bedingt sein.

Der Nascent Polypeptid-assoziiierter Komplex Alpha (Naca) wurde auch in die Kategorie Chaperone eingruppiert und ist wie auch die Heat Shock Proteine in der Koordination und Konformation von Proteinen involviert. Es reguliert als Heterodimer den mitochondrialen Proteinimport und die Interaktion der neuen Polypeptide aus dem Ribosom. Die Alpha-Untereinheit scheint darüber hinaus als transkriptionaler Coaktivator zu fungieren¹⁶⁵. Die hier erhobenen Daten zeigen wie auch die der Heat Shock Proteine eine erhöhte Proteinexpression nach Bestrahlung.

4.3.3 Die Kategorie Transkription und Translation

In diese Kategorien fallen die Proteine PCNA und HNRNP.

Allgemein bedarf es zur Aufrechterhaltung der genetischen Stabilität neben einer Reparatur von DSB-Brüchen auch der Korrektur einzelner, geschädigter oder fehlerhaft eingebauter Basen. Diese werden durch Basen Exzisions Reparatur (BER), Nukleotid Exzisions Reparatur (NER) oder Mismatch Reparatur (MMR) korrigiert. So entfernen bei der BER spezifische DNA Glykosylasen die relevanten Basen, das dazugehörige Desoxyribosephosphat wird abgetrennt und eine DNA Polymerase setzt das korrekte Nukleotid ein. Bei der NER dagegen werden mehrere Nukleotide am Stück herausgeschnitten, DNA Polymerasen ergänzen mit Hilfe der DNA Synthese die fehlenden Nukleotide und Ligasen verbinden die Enden. Die MMR ist schließlich vor allem wichtig für die Korrektur von Kopierfehlern der normalen Basenpaarung nach der Replikation und spielt eine Rolle bei der Rekombination; z. T. werden Enzyme der NER und BER benutzt, z. T. gibt es spezielle Enzyme. Mutationen in den MMR Genen sind mit verschiedenen Krebsarten assoziiert, so z.B. HNPCC. Bei allen drei Mechanismen, besonders aber bei der MMR spielt das Proliferating Cellular Nuclear Antigen (PCNA) eine entscheidende Rolle.

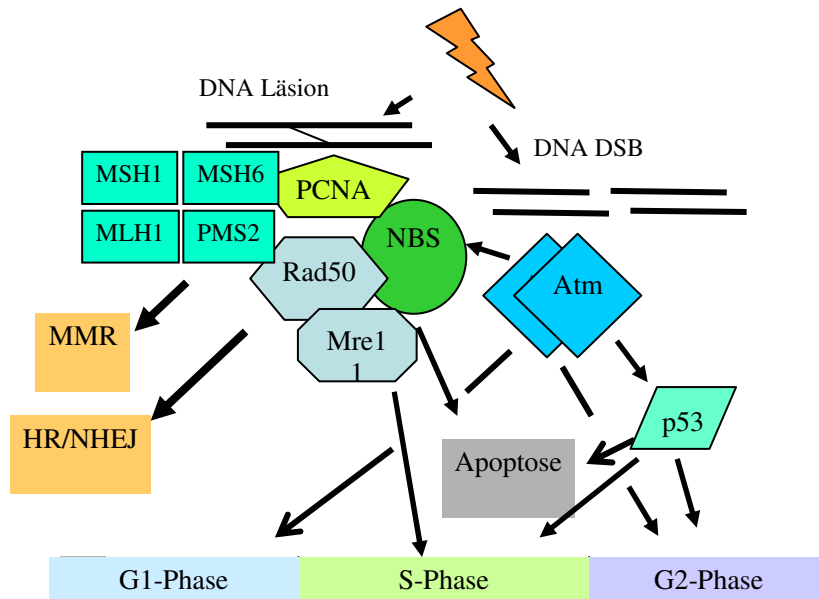


Abb. 26: Modell der Rolle des MRN-Komplexes bei der Mismatch Reparatur modifiziert nach Mirzoeva und Bellacosa. Die fehlerhafte Base wird durch MSH1 und MSH 3/6 erkannt und rekrutiert den Komplex aus MLH1 und PMS2; die Reparatur erfolgt u.a. durch das proliferating cell nuclear antigen (PCNA).

PCNA ist vor allem bekannt als Kofaktor der DNA Polymerasen. In Replikationskomplexen akkumulieren während der S-Phase die an der Replikation beteiligten Faktoren, und PCNA umringt aufgrund seiner Struktur die DNA und bindet so die Polymerasen an die DNA. Auch kann es helfen, blockierte Replikationsgabeln durch Transläsions-Synthese zu überwinden¹⁶⁶ und verhindert die wiederholte Amplifikation der fehlenden Base¹⁶⁷. Es bindet kompetitiv und nacheinander verschiedene Proteine und kann diese rekrutieren und stimulieren¹⁶⁸. Oft fungiert es auch als Katalysator oder Adapter für deren Bindung an die DNA. Dadurch ist PCNA von Bedeutung für den Mismatch Repair¹⁶⁹, die Base Excision Repair (BER) und die Nucleotid Excision Repair (NER)^{170, 171}.

Allerdings gibt es auch Berichte, die eine Rolle PCNAs bei der NHEJ^{172, 173} und bei der HR¹⁷⁴ nahe legen. Aufgrund der großen Anzahl von Proteinen, die mit PCNA assoziieren, kann auf einen Überschuss von PCNA im Verhältnis zu den anderen Proteinen geschlossen werden¹⁷⁵ und dessen Verfügbarkeit zelluläre Mechanismen beeinflussen. Diese Abundanz erklärt auch, warum PCNA mit Hilfe der Proteomtechnik analysiert werden konnte, wogegen andere Reparaturproteine zur Detektion in der Zelle zu gering vorhanden sind.

Wichtig ist auch die Balance zu p21; In normalen Fibroblasten sind p21 und PCNA in fast gleichen Konzentrationen vorhanden, aber unterschiedlich über den Nukleus verteilt^{176, 177}. In der S-Phase steigt der PCNA Spiegel, PCNA kann so andere Proteine binden, die Reparatur wird zugunsten der Replikation eingestellt. Kommt es zu DNA Schäden, steigt der p21 Level, es verdrängt die anderen Proteine von PCNA und die Replikation wird unterbrochen^{178, 179}. Stattdessen kommt es nun zur Reparatur. Des Weiteren ist interessant, dass PCNA über Interaktion mit p21 an der Zellzyklusregulation beteiligt ist und so eine Arretierung am G1 oder G2 Checkpoint auslösen kann. Bei defekter Checkpointregulation wegen Fehlens von Nibrin, wie in dieser Arbeit anhand einer Expressionssteigerung von PCNA nach Bestrahlung gezeigt, könnte ein Ausgleich über die verstärkte Expression von PCNA versucht werden, welcher letztendlich nicht ausreichend gelingt.

Auch in Abhängigkeit von p53 ändert sich die Funktion von PCNA: In humanen Fibroblasten zeigte sich eine p53 abhängige verstärkte Expression nach IR auf Protein und mRNA-Level¹⁸⁰. Geringe bis mittlere Level des Transkriptionsfaktors p53 stimulieren die PCNA-Transkription, wohingegen hohe Level diese hemmen¹⁸¹. Steigt p53 aufgrund von DNA-Läsionen an, erfolgt eine Stimulation der p21 Expression und mit Arretierung des Zellzyklus am G1/S-Checkpoint kommt es statt zur Replikation zur Reparatur¹⁸². Fehlt dagegen PCNA wird die Apoptose eingeleitet¹⁸³, so wie auch in Knockout-Modellen der Hefe¹⁸⁴.

In einigen Tumorzellen korrelierte eine Überexpression von PCNA mit verstärkter Radioresistenz^{185, 186} und diese Überexpression wird zum Tumormonitoring benutzt. Daneben wurde publiziert, dass Überexpression die DNA-Reparatur inhibiert^{187, 188}.

In alternden Fibroblasten wurde dagegen eine Expressionsreduktion beobachtet. Die geringe PCNA-Menge scheint mit reduzierter Reparaturfähigkeit einherzugehen¹⁸⁹ und Inhibierung führt zu Wachstumsarrest¹⁹⁰. Darüber hinaus gibt es Berichte, dass PCNA-Drosophilamutanten und Mäuse mit geringer PCNA-Expression eine erhöhte Radiosensitivität und Unfähigkeit zur DSB Reparatur aufweisen¹⁹¹.

Auch eine Rolle von ATM ist beschrieben worden¹⁸³, und WRN, das beim Werner Syndrom veränderte Protein, bildet gemeinsam mit MRE11 am Ort der arretierten Replikationsgabeln mit PCNA einen Komplex¹⁹² und ist somit von Bedeutung für die HR nach Doppelstrangbrüchen ist.

Allerdings muss berücksichtigt werden, dass es hierzu kontroverse Publikationen gibt und dies z. T. auf Unterschiede zwischen humanen und Nagetierzellen zurückzuführen ist. So wurde in murinen Zellen nach IR keine verstärkte PCNA-Expression beobachtet¹⁹³. Auch wurde keine p53-Bindungsregion am murinen PCNA detektiert¹⁹⁴ und dessen Induktion nach UV scheint p53 unabhängig¹⁹⁵. Dagegen kommt es zu einer p53 abhängigen Repression der PCNA-Expression^{194, 195}. Jedoch spricht die Korrelation von reduziertem PCNA Level und gesteigerter Radiosensitivität dafür, dass PCNA wichtig ist für ein Überleben nach genotoxischem Stress.

In dieser Arbeit wurde PCNA nach Bestrahlung von nullmutanten murinen Nbn-Fibroblasten verstärkt exprimiert. Diese Beobachtung könnte damit erklärt werden, dass bei Fehlen Nibrins auf andere Reparaturmechanismen zurückgegriffen werden muss und somit PCNA auch in Mäusezellen hochreguliert wird¹⁹³. Somit würde PCNA nach IR vermindert exprimiert werden, es sei denn, die üblichen Reparaturmechanismen, hier insbesondere die HR und die NHEJ, funktionieren nicht oder nur fehlerhaft, wie das bei Nbn-defizienten Mäusen der Fall ist^{17, 64}.

Das andere identifizierte Protein der Gruppe Transkription/Translation ist das Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A/B, welches erst nach 10 Gy Bestrahlung verstärkt exprimiert wurde. Bekannt sind die hnRNPs für ihre Funktionen bei der mRNA-Prozessierung^{17, 64}. Als Chromatin-binding Protein könnte es in der Antwort auf DSB involviert und Anteil an der Regulation der Genexpression nach einer DNA-Schädigung haben.

4.3.4 Energiemetabolismus

Zur großen Gruppe des Energiemetabolismus gehören die Alpha Enolase, Alpha-Untereinheit der ATP-Synthase, die L-Lactat-Dehydrogenase, die Fructose-Biphosphat Aldolase A, die Isocitrat Dehydrogenase, die Reticulocalbine 1 und 3, die Succinyl CoA-Transferase 1, die N-acteylneuraminic acid 9-phosphat Synthetase und die Glutathion S-Transferase μ 1 und ω . Von diesen waren 6 Proteine hoch- und 5 herunterreguliert. Zu den verstärkt exprimierten Proteinen gehören die Reticulocalbin (Rcn) 1 und 3. Diese aus der Familie der Calcium-binding Proteine scheinen auch eine Rolle als Chaperone

im endoplasmatischen Retikulum einzunehmen, wo sich der Hauptspeicherort für Calcium befindet. Es wurde eine Überexpression von Reticulocalbinen in Mammakarzinomen beschrieben und die Expression korrelierte mit der Radioresistenz der Tumoren ¹⁹⁶.

Auch werden die beiden glykolytischen Proteine Fructose-Biphosphat-Aldolase und Alpha Enolase hochreguliert. Die Alpha Enolase ist wichtig für die Differenzierung und das Wachstum der Zelle ¹⁹⁷. Ebenso ein glykolytisches Enzym ist die Aldolase ein Angriffspunkt bei oxidativem Stress und dessen Hochregulierung wurde in verschiedenen Krebszelllinien beschrieben ¹⁹⁸.

Vermindert exprimiert sind nach Bestrahlung in dieser Arbeit die Glutathion-S-Transferasen μ 1 und ω (GST). Diese schützen die Zelle vor oxidativem Stress. Durch Konjugation mit Glutathion werden reaktive Elektrophile inaktiviert und so DNA-Schädigung verhindert. Außerdem kann GSTM durch Bindung an die Apoptosesignal-regulierende Kinase 1 deren Aktivität unterdrücken und den Zelltod verhindern ¹⁹⁹. Eine Hochregulierung zeigte sich beim Übergang der ruhenden in die migrierende Zelle ²⁰⁰. Im Alter wird die Expression herunterreguliert ²⁰¹. Die in dieser Arbeit konstatierte Reduktion korreliert mit der bei einigen Chromosominstabilitätssyndromen beobachteten gestörten Regulation der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Dies könnte somit eine Bestätigung sein für eine weitere Rolle Nibrins im Rahmen der Apoptoseregulation und des ROS-Systems ^{202, 203}.

Die anderen Proteine dieser Gruppe (ATP-Synthase, L-Lactat-Dehydrogenase, Fructose-Biphosphat Aldolase A, Isocitrat Dehydrogenase, Succinyl CoA-Transferase 1, und N-acteylneuraminic acid 9-phosphat Synthetase) sind bisher nicht mit DNA-Reparatur, Zellzykluskontrolle oder Zellproliferation in Verbindung gebracht worden. Von diesen wurden die ATP-Synthase und ein Spot der Isocitrat- Dehydrogenase hochreguliert gefunden. Die L-Lactat-Dehydrogenase, wiederum die Isocitrat Dehydrogenase, die Succinyl CoA-Transferase 1 und die N-acteylneuraminic acid 9-phosphat Synthetase wiesen Spots mit verminderter Intensität im Vergleich zum Referenzgel auf. Auch von diesen Proteinen sind einige in Zusammenhang mit der ROS-Regulation beschrieben worden ^{204, 205}.

4.3.5 Die Zytoskelett-assoziierten Proteine

Als Zytoskelett-assoziiert sind die Proteine Vimentin, Gamma-Actin und Transgelin bestimmt worden. Gamma-Actin und Transgelin wurden stärker exprimiert gefunden, wobei Transgelin in einem singulären Spot mit der Proteasom-Untereinheit $\beta 5$ detektiert wurde. Vimentin präsentierte sich sowohl mit verstärkter als auch mit verminderter Spotintensität nach Bestrahlung. Vimentin bildet zusammen mit den aktinhaltigen Mikrofilamenten und den Mikrotubuli das Zytoskelett. Oft sind Modifikationen des Zytoskeletts mit malignen Zelltransformationen assoziiert und Vimentins Bedeutung für spontane Immortalisierung und den Schutz gegen DNA-Schäden wurde postuliert²⁰⁶. Hochregulierte Vimentinspiegel wurden beispielsweise in chemoresistenten Mammakarzinomzellen beobachtet²⁰⁷ und ein Anstieg der Expression wurde auch zu Beginn der replikativen Seneszenz beobachtet¹⁶³.

Auch Gamma-Actin ist eine Komponente des Zytoskeletts und beinhaltet neben seiner Rolle als Mediator für die Zellbewegung auch Bedeutung für nukleare Prozesse wie Chromatinremodelling. Bei Beginn der Seneszenz zeigt sich ein Anstieg der Vimentinkonzentration¹⁶³.

Die Informationen zu Transgelin, einem Mitglied der Calponinfamilie, sind spärlich. So gibt es Publikationen über dessen Funktion als Tumormarker und Tumorsuppressor^{208, 209}, so insbesondere in Prostata-, Brust- und Kolon-Karzinomen.

4.3.6 Kollagen-zugehörige Proteine

Hierunter wurden die Proteine Prolyl-4-Hydroxylase und Calponin-2 eingruppiert. Eine entscheidende Rolle bei der Kollagenbiosynthese spielt die Prolyl-4-Hydroxylase. Dessen β -Untereinheit, eine Protein-Disulphid Isomerase (PDI) katalysiert die Oxidation, Reduktion und Isomerisation von Disulfidbrücken. Da die Untereinheit als negativer Regulator auf den Transkriptionsfaktor NF κ B wirkt, hat PDI inhibitorische Effekte auf Cytokine und somit eine Bedeutung für die Proliferation. Daneben wurde eine Überexpression von Prolyl-4-Hydroxylase in Lungentumoren beschrieben²¹⁰. Prolyl-4-Hydroxylase wies sowohl Spots von geringerer als auch von verstärkter Intensität auf, was durch posttranslationale Modifikationen erklärt werden könnte. Daneben wurde Calponin-2, ein Protein zur Regulierung und Modulierung von Muskelkontraktionen in

diese Gruppe eingeteilt. Dieses scheint jedoch bisher nicht in Zusammenhang mit DNA-Reparatur, Apoptose oder dem Immunsystem gebracht worden zu sein.

4.3.7 Proteine der Signaltransduktion

Zwei Proteine wurden der Gruppe Signaltransduktion zugeteilt. Zu Arhgdib, welches sich sowohl nach 0,5 Gy als auch nach 10 Gy herunterreguliert zeigte, konnten keine relevanten Informationen gefunden werden. Das FK506-binding Protein war bereits nach 0,5 Gy stark vermehrt exprimiert. Die FK506-binding Proteine (FKBP) sind so genannte Immophiline und zeigen immunosuppressive Aktivität ²¹¹. Daneben hat es Einfluss auf die Zellzykluskontrolle, das Zellwachstum und wirkt an der Reparatur missgestalteter Proteine mit. So scheint FK506 eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung des Rekombinations-Checkpoints während der Meiose zu spielen. Bei fehlender Expression kommt es durch defiziente Zellwachstumsstimulierung zu embryonaler Letalität ²¹².

Die starke Hochregulierung von FKBP könnte zum einen mit dessen Funktion bei der Reparatur geschädigter Proteine zusammenhängen, zum anderen deutet diese verstärkte Expression darauf hin, dass FKBP in Zellen, die kein Nibrin exprimieren, vermehrt Funktionen der Zellzykluskontrolle übernimmt. In nibrindefizienten Zellen wurde G2S-Checkpointdefekt beobachtet, so dass die Zellen trotz DNA-DSB die Mitose beginnen ¹¹³.

4.3.8 Zellzyklus und Zellproliferation

Bemerkenswerterweise wurden 5 Proteine identifiziert, die Einfluss auf den Zellzyklus und die Zellproliferation nehmen. Zu diesen gehört das Beta-Galactosid-binding Protein (Galectin), Syndecan Binding Protein, Adenylyl cyclase-assoziiertes Protein 1, CRABP und das Apo-Cellular Retinoid-binding Protein. Galectin ist ein antiproliferatives Cytokin, welches von Bedeutung für die Zellzyklusprogression ist. Durch Vernetzungen der Glycokonjugate auf der Zelloberfläche werden Signalkaskaden ausgelöst, die einen reversiblen S-Phase-Arrest bewirken und Tumorzellen in die Apoptose führen können ²¹³. Des Weiteren werden anti-inflammatorische Funktionen und eine Rolle in der Immunantwort und Immunzellhomöostase beschrieben ²¹⁴⁻²¹⁶. Eine Überexpression, die

mit der Wachstumsaggressivität eines Tumors korreliert, wurde in verschiedenen Tumorzelllinien beschrieben; gleichzeitig jedoch auch eine Hochregulierung der Expression bei der Seneszenz ¹⁶³. In dieser Arbeit wurde Galectin nach Bestrahlung von nullmutanten Zellen vermindert exprimiert, was darauf hindeuten könnte, dass es bei der Signalkaskade zum S-Phase-Arrest von Nibrin abhängig ist und downstream aktiviert wird. Denn ein Hauptmerkmal von NBS-Zellen ist die radioresistente DNA-Synthese auf Grund eines defekten S-Phasecheckpoints.

Ebenso herunterreguliert wurde das Syndecan Binding Protein, welches zur Familie der transmembranen Proteoglykane gehört. Diese sind in vielseitigen Regulationen der Zelle, wie Zellwachstum und Migration, sowie in Signalverarbeitungen involviert. So ist zum einen der Verlust von Syndecan assoziiert mit dem Wachstum verschiedener Tumoren ²¹⁷, gleichzeitig soll eine Überproduktion der Zelle einen Überlebensvorteil verleihen ²¹⁸.

Auch beim Adenylyl cyclase-assoziiertes Protein 1, ein Katalysator beim Umsatz von Aktin, wurde verminderte Spotintensität festgestellt. Dieses konnte im Kontext dieser Arbeit und des Nijmegen Breakage Syndroms allerdings noch nicht hinreichend beurteilt werden.

Mit gesteigerter Expression präsentierten sich das zelluläre Retinol-binding Protein 1 (CRABP) und das damit assoziierte Apo-Cellular Retinoid-binding Protein. CRABP reguliert durch Bindung an Retinol dessen Konzentration und Transport im Nukleus. Retinole spielen eine entscheidende Rolle bei der Zellproliferation und Apoptose ²¹⁹ In Mammakarzinomzelllinie wurde eine Reduktion der Expression von CRABP nachgewiesen ²²⁰ In anderen Tumorzelllinien wurde dagegen wie auch in dieser Arbeit eine Überexpression beobachtet, die den Tumorzellen gesteigerte Radioresistenz und nach IR einen Überlebensvorteil verleiht ²²¹.

4.3.9 Ausblick

In dieser Arbeit wurden mittels 2D-Gelelektrophorese 35 Proteine gefunden, die in nullmutanten murinen Fibroblasten nach Bestrahlung differenziell exprimiert wurden. Wie in den letzten Abschnitten dargelegt, konnte für eine Vielzahl dieser Proteine eine Rolle bei Zellfunktionen gefunden werden, die bei Nibrindefizienz gestört werden. So wurden Proteine identifiziert, die bei Zellzyklus, Proliferation, Apoptose, DNA-Reparatur,

Tumoren oder generell dem Umgang mit zellulärem Stress eine Funktion besitzen. Inwiefern genau ihre veränderte Expression von Nibrin abhängt, kann nicht abschließend beantwortet werden. Interagieren sie direkt mit Nibrin oder werden sie sogar durch Nibrin reguliert? Sind es Kompensationsmechanismen der Zelle auf Grund der Schäden? Stressindikatoren, dass die Zelle nicht mehr richtig funktioniert? Für einige Proteine konnten mögliche Lösungsansätze aufgezeigt werden (z.B. FKBP als Kompensation für fehlenden G2-Arrest, Galectin als Downstreammediator am S-Phasecheckpoint, HSP als Stressindikator, ...).

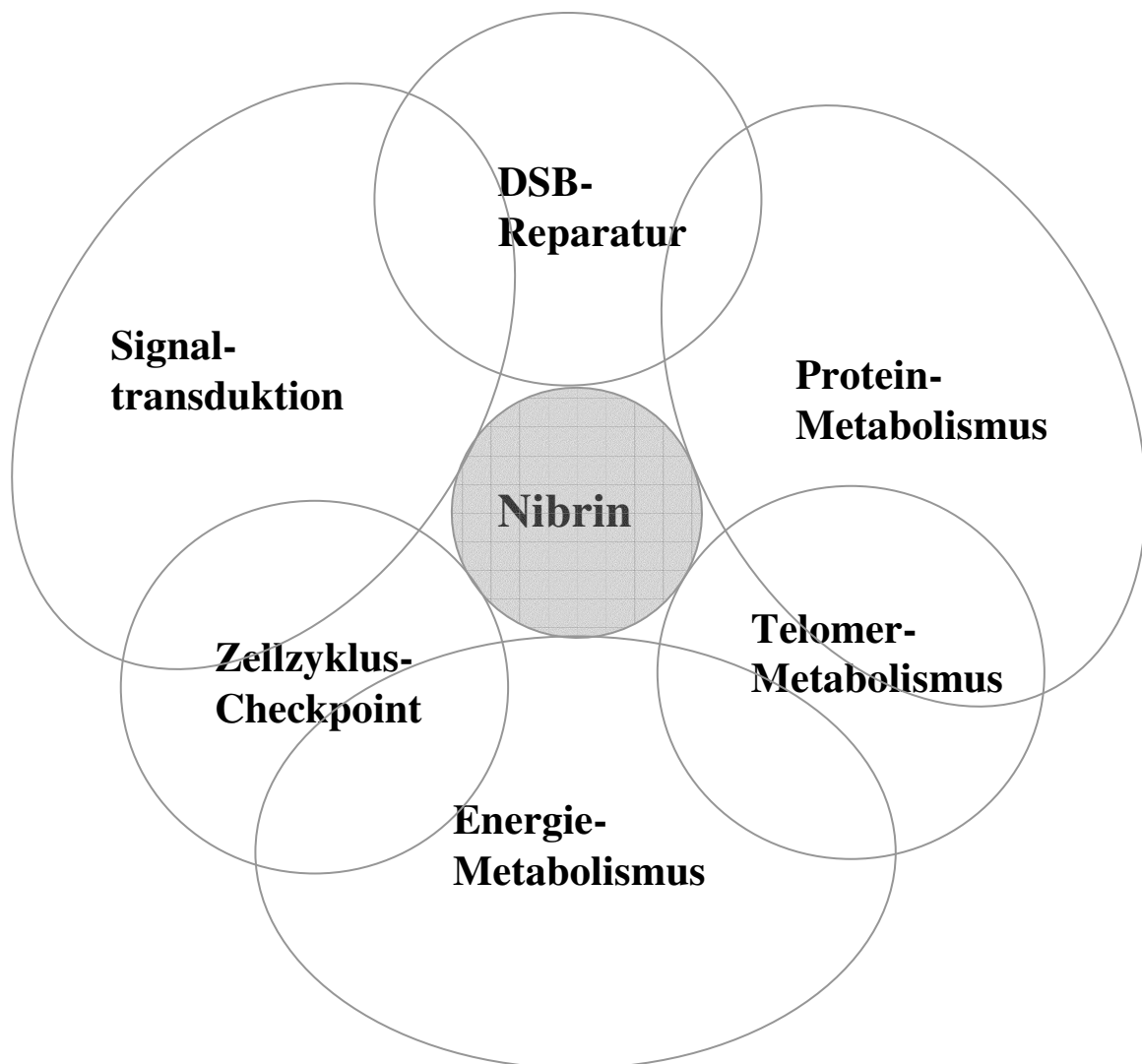


Abb. 27: Erweitertes Modell der Funktionen Nibrins.

Natürlich sind weitere Experimente und Studien notwendig, um deren exakte Funktionen bezüglich des Nijmegen Breakage Syndroms zu verstehen. So wäre es interessant herauszufinden, warum diese Proteine bei Nibrindefizienz differentiell exprimiert werden, und wie genau die Regulationsmechanismen und Abhängigkeiten funktionieren. Zudem böte es sich an zu untersuchen, ob die hier bestimmten Proteine nur bei einer Nullmutation verändert sind, oder auch bei hypomorphen Mutationen, wie sie bei den Patienten vorkommen.

Die hier erhobenen Daten bieten einen Ausgangspunkt und eine Grundlage für sich anschließende Untersuchungen zur detaillierten Bestimmung ihrer veränderten Expression und ihrer Bedeutung für DNA-Reparatur, Chromosomeninstabilitätssyndrome und Zellzykluskontrolle.

5 Zusammenfassung

Das Nijmegen Breakage Syndrom (NBS) gehört als autosomal-rezessive Erkrankung zu den Chromosominstabilitätssyndromen und ist gekennzeichnet durch kraniofaziale Dysmorphie, Minderwuchs, Mikrozephalie, Immundefizienz und einem erhöhten Risiko für die Entwicklung maligner Tumoren. Da die Funktionen des Genprodukts Nibrin noch nicht vollständig geklärt sind, war es Ziel dieser Arbeit, Veränderungen und Modifikationen auf Proteinebene zu untersuchen. Für ein besseres Verständnis wurden hierfür homozygot nullmutante murine Fibroblasten aus einem Knockout-Modell bestrahlt und das Proteom mittels 2D-Gelelektrophorese dargestellt. Mit Hilfe der Maldi TOF Massenspektrometrie wurden die gegenüber heterozygoten Zellen differenziell exprimierte Proteine analysiert und durch die Datenbank identifiziert. Hierbei wurden 35 differenziell exprimierte Proteine mit einem signifikanten Mowse-Score gefunden, von denen 21 verstärkt und 14 vermindert exprimiert wurden. Nach funktionellen Gesichtspunkten gruppiert ergaben sich die Kategorien Energie-Metabolismus, Protein-Metabolismus, Chaperone, Zellzyklus/Proliferation, Signaltransduktion, Transkription/Translation, Zytoskelett und Kollagen.

Besonders auffällig ist die hohe Anzahl detektierter Proteine, die den Gruppen der Heat Shock Proteine und der Proteasome angehören. Dies deutet auf deren Beteiligung an der Zellzykluskontrolle und Checkpointkontrolle hin, welche in Nibrindefizienten Zellen gestört sind und somit alternative Mechanismen gefragt sind. Ebenso kann deren verstärkte Aktivität mit der bei NBS-Patienten beobachteten Tumorgenese assoziiert sein. Möglich scheint auch eine Rolle Nibrins im Rahmen der ROS-Regulation und somit ein Fehlen Nibrins relevant für einige Merkmale des Nijmegen Breakage Syndroms.

Bemerkenswert ist auch die Identifizierung von PCNA als Reparaturprotein. Auf Grund des Defizits von Nibrin scheint durch verstärkte Expression von PCNA versucht zu werden, die Checkpointregulation und Reparaturmechanismen aufrecht zu erhalten.

In Zusammenschau könnte die klinische Variabilität des Krankheitsbildes in der Variation der verschiedenen Proteine und deren Interaktionen untereinander begründet liegen. Je nach Expressions- und Interaktionsmuster der Proteine ergeben sich unterschiedliche Symptome und deren verschieden starke Ausprägungen mit klinisch-praktischer Relevanz. So können Modifikationen bei der Behandlung von heterozygot

betroffenen Erkrankten angewendet werden. Auch das individuelle Risiko, an Krebs zu erkranken, sowie ein möglicher Therapieerfolg im Sinne einer individualisierten Medizin können eingeschätzt werden. Darüber hinaus sind die hier detektierten, differenziell exprimierten Proteine interessante Kandidaten in Zusammenhang mit DNA-Reparatur, Checkpointkontrolle und posttranslationalen Modifikationen und für weitere, tiefer gehende Analysen der Funktionen Nibrins.

6 Literaturverzeichnis

1. Hunt N, Adams S, Coxhead N, Sayer H, Murray C, Silverstone T. The incidence of mania in two areas in the United Kingdom. *Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol* 1993;28:281-4.
2. Hartwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer. *Science* 1994;266:1821-8.
3. Zhou BB, Elledge SJ. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 2000;408:433-9.
4. Bryant PE. Repair and chromosomal damage. *Radiother Oncol* 2004;72:251-6.
5. Petrini JH. The mammalian Mre11-Rad50-nbs1 protein complex: integration of functions in the cellular DNA-damage response. *Am J Hum Genet* 1999;64:1264-9.
6. Shiloh Y. Ataxia-telangiectasia and the Nijmegen breakage syndrome: related disorders but genes apart. *Annu Rev Genet* 1997;31:635-62.
7. Lavin MF, Shiloh Y. The genetic defect in ataxia-telangiectasia. *Annu Rev Immunol* 1997;15:177-202.
8. Weemaes CM, Hustinx TW, Scheres JM, van Munster PJ, Bakkeren JA, Taalman RD. A new chromosomal instability disorder: the Nijmegen breakage syndrome. *Acta Paediatr Scand* 1981;70:557-64.
9. Bekiesinska-Figatowska M, Chrzanowska KH, Sikorska J, et al. Cranial MRI in the Nijmegen breakage syndrome. *Neuroradiology* 2000;42:43-7.
10. Seemanova E, Passarge E, Beneskova D, Houstek J, Kasal P, Sevcikova M. Familial microcephaly with normal intelligence, immunodeficiency, and risk for lymphoreticular malignancies: a new autosomal recessive disorder. *Am J Med Genet* 1985;20:639-48.
11. Chrzanowska KH, Kleijer WJ, Krajewska-Walasek M, et al. Eleven Polish patients with microcephaly, immunodeficiency, and chromosomal instability: the Nijmegen breakage syndrome. *Am J Med Genet* 1995;57:462-71.
12. Nijmegen breakage syndrome. The International Nijmegen Breakage Syndrome Study Group. *Arch Dis Child* 2000;82:400-6.
13. Frappart PO, Tong WM, Demuth I, et al. An essential function for NBS1 in the prevention of ataxia and cerebellar defects. *Nat Med* 2005;11:538-44.
14. van der Burgt I, Chrzanowska KH, Smeets D, Weemaes C. Nijmegen breakage syndrome. *J Med Genet* 1996;33:153-6.
15. Pan Q, Petit-Frere C, Lahdesmaki A, Gregorek H, Chrzanowska KH, Hammarstrom L. Alternative end joining during switch recombination in patients with ataxia-telangiectasia. *Eur J Immunol* 2002;32:1300-8.
16. van Engelen BG, Hiel JA, Gabreels FJ, van den Heuvel LP, van Gent DC, Weemaes CM. Decreased immunoglobulin class switching in Nijmegen Breakage syndrome due to the DNA repair defect. *Hum Immunol* 2001;62:1324-7.
17. Yeo TC, Xia D, Hassouneh S, et al. V(D)J rearrangement in Nijmegen breakage syndrome. *Mol Immunol* 2000;37:1131-9.
18. Weemaes CM, Smeets DF, van der Burgt CJ. Nijmegen Breakage syndrome: a progress report. *Int J Radiat Biol* 1994;66:S185-8.
19. Harfst E, Cooper S, Neubauer S, Distel L, Grawunder U. Normal V(D)J recombination in cells from patients with Nijmegen breakage syndrome. *Mol Immunol* 2000;37:915-29.
20. Clatworthy AE, Valencia-Burton MA, Haber JE, Oettinger MA. The MRE11-RAD50-XRS2 complex, in addition to other non-homologous end-joining factors, is required for V(D)J joining in yeast. *J Biol Chem* 2005;280:20247-52.
21. Reina-San-Martin B, Chen HT, Nussenzweig A, Nussenzweig MC. ATM is required for efficient recombination between immunoglobulin switch regions. *J Exp Med* 2004;200:1103-10.
22. Weaver DT. Regulation and repair of double-strand DNA breaks. *Crit Rev Eukaryot*

Gene Expr 1996;6:345-75.

23. Difilippantonio S, Celeste A, Fernandez-Capetillo O, et al. Role of Nbs1 in the activation of the Atm kinase revealed in humanized mouse models. *Nat Cell Biol* 2005;7:675-85.
24. Michallet AS, Lesca G, Radford-Weiss I, Delarue R, Varet B, Buzyn A. T-cell prolymphocytic leukemia with autoimmune manifestations in Nijmegen breakage syndrome. *Ann Hematol* 2003;82:515-7.
25. Seidemann K, Henze G, Beck JD, et al. Non-Hodgkin's lymphoma in pediatric patients with chromosomal breakage syndromes (AT and NBS): experience from the BFM trials. *Ann Oncol* 2000;11 Suppl 1:141-5.
26. Kruger L, Demuth I, Neitzel H, et al. Cancer incidence in Nijmegen breakage syndrome is modulated by the amount of a variant NBS protein. *Carcinogenesis* 2007;28:107-11.
27. Kang J, Bronson RT, Xu Y. Targeted disruption of NBS1 reveals its roles in mouse development and DNA repair. *Embo J* 2002;21:1447-55.
28. Difilippantonio S, Nussenzweig A. The NBS1-ATM connection revisited. *Cell Cycle* 2007;6:2366-70.
29. Cherry SM, Adelman CA, Theunissen JW, Hassold TJ, Hunt PA, Petrini JH. The Mre11 complex influences DNA repair, synapsis, and crossing over in murine meiosis. *Curr Biol* 2007;17:373-8.
30. Tsubouchi H, Ogawa H. A novel mre11 mutation impairs processing of double-strand breaks of DNA during both mitosis and meiosis. *Mol Cell Biol* 1998;18:260-8.
31. Ivanov EL, Korolev VG, Fabre F. XRS2, a DNA repair gene of *Saccharomyces cerevisiae*, is needed for meiotic recombination. *Genetics* 1992;132:651-64.
32. Tanzanella C, Antoccia A, Spadoni E, et al. Chromosome instability and nibrin protein variants in NBS heterozygotes. *Eur J Hum Genet* 2003;11:297-303.
33. Seemanova E, Jarolim P, Seeman P, Varon R, Sperling K. [Increased risk of malignancies in heterozygotes in families of patients with Nijmegen breakage syndrome]. *Cas Lek Cesk* 2006;145:138-43.
34. Resnick IB, Kondratenko I, Pashanov E, et al. 657del5 mutation in the gene for Nijmegen breakage syndrome (NBS1) in a cohort of Russian children with lymphoid tissue malignancies and controls. *Am J Med Genet A* 2003;120:174-9.
35. Cybulski C, Gorski B, Debniak T, et al. NBS1 is a prostate cancer susceptibility gene. *Cancer Res* 2004;64:1215-9.
36. Varon R, Reis A, Henze G, von Einsiedel HG, Sperling K, Seeger K. Mutations in the Nijmegen Breakage Syndrome gene (NBS1) in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Cancer Res* 2001;61:3570-2.
37. Steffen J, Varon R, Mosor M, et al. Increased cancer risk of heterozygotes with NBS1 germline mutations in Poland. *Int J Cancer* 2004;111:67-71.
38. Dumon-Jones V, Frappart PO, Tong WM, et al. Nbn heterozygosity renders mice susceptible to tumor formation and ionizing radiation-induced tumorigenesis. *Cancer Res* 2003;63:7263-9.
39. Jaspers NG, Gatti RA, Baan C, Linssen PC, Bootsma D. Genetic complementation analysis of ataxia telangiectasia and Nijmegen breakage syndrome: a survey of 50 patients. *Cytogenet Cell Genet* 1988;49:259-63.
40. Jaspers NG, Taalman RD, Baan C. Patients with an inherited syndrome characterized by immunodeficiency, microcephaly, and chromosomal instability: genetic relationship to ataxia telangiectasia. *Am J Hum Genet* 1988;42:66-73.
41. Chrzanowska KH. [Microcephaly with chromosomal instability and immunodeficiency--Nijmegen syndrome]. *Pediatr Pol* 1996;71:223-34.
42. Komatsu K, Matsuura S, Tauchi H, et al. The gene for Nijmegen breakage syndrome (V2) is not located on chromosome 11. *Am J Hum Genet* 1996;58:885-8.

43. Stumm M, Gatti RA, Reis A, et al. The ataxia-telangiectasia-variant genes 1 and 2 are distinct from the ataxia-telangiectasia gene on chromosome 11q23.1. *Am J Hum Genet* 1995;57:960-2.
44. Saar K, Chrzanowska KH, Stumm M, et al. The gene for the ataxia-telangiectasia variant, Nijmegen breakage syndrome, maps to a 1-cM interval on chromosome 8q21. *Am J Hum Genet* 1997;60:605-10.
45. Matsuura S, Tauchi H, Nakamura A, et al. Positional cloning of the gene for Nijmegen breakage syndrome. *Nat Genet* 1998;19:179-81.
46. Carney JP, Maser RS, Olivares H, 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;93:477-86.
47. Varon R, Vissinga C, Platzer M, et al. Nibrin, a novel DNA double-strand break repair protein, is mutated in Nijmegen breakage syndrome. *Cell* 1998;93:467-76.
48. Maser RS, Zinkel R, Petrini JH. An alternative mode of translation permits production of a variant NBS1 protein from the common Nijmegen breakage syndrome allele. *Nat Genet* 2001;27:417-21.
49. Maser RS, Mirzoeva OK, Wells J, et al. Mre11 complex and DNA replication: linkage to E2F and sites of DNA synthesis. *Mol Cell Biol* 2001;21:6006-16.
50. Zhu J, Petersen S, Tessarollo L, Nussenzweig A. Targeted disruption of the Nijmegen breakage syndrome gene NBS1 leads to early embryonic lethality in mice. *Curr Biol* 2001;11:105-9.
51. Maraschio P, Danesino C, Antoccia A, et al. A novel mutation and novel features in Nijmegen breakage syndrome. *J Med Genet* 2001;38:113-7.
52. Antoccia A, Stumm M, Saar K, Ricordy R, Maraschio P, Tanzarella C. Impaired p53-mediated DNA damage response, cell-cycle disturbance and chromosome aberrations in Nijmegen breakage syndrome lymphoblastoid cell lines. *Int J Radiat Biol* 1999;75:583-91.
53. Resnick IB, Kondratenko I, Togojev O, et al. Nijmegen breakage syndrome: clinical characteristics and mutation analysis in eight unrelated Russian families. *J Pediatr* 2002;140:355-61.
54. Digweed M, Reis A, Sperling K. Nijmegen breakage syndrome: consequences of defective DNA double strand break repair. *Bioessays* 1999;21:649-56.
55. Lukas C, Melander F, Stucki M, et al. Mdc1 couples DNA double-strand break recognition by Nbs1 with its H2AX-dependent chromatin retention. *Embo J* 2004;23:2674-83.
56. Difilippantonio S, Celeste A, Kruhlak MJ, et al. Distinct domains in Nbs1 regulate irradiation-induced checkpoints and apoptosis. *J Exp Med* 2007;204:1003-11.
57. Falck J, Coates J, Jackson SP. Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. *Nature* 2005;434:605-11.
58. Wilda M, Demuth I, Concannon P, Sperling K, Hameister H. Expression pattern of the Nijmegen breakage syndrome gene, Nbs1, during murine development. *Hum Mol Genet* 2000;9:1739-44.
59. D'Amours D, Jackson SP. The Mre11 complex: at the crossroads of dna repair and checkpoint signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3:317-27.
60. Jackson SP. Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis* 2002;23:687-96.
61. de Jager M, van Noort J, van Gent DC, Dekker C, Kanaar R, Wyman C. Human Rad50/Mre11 is a flexible complex that can tether DNA ends. *Mol Cell* 2001;8:1129-35.
62. de Jager M, Dronkert ML, Modesti M, Beerens CE, Kanaar R, van Gent DC. DNA-binding and strand-annealing activities of human Mre11: implications for its roles in DNA double-strand break repair pathways. *Nucleic Acids Res* 2001;29:1317-25.
63. Anderson DE, Trujillo KM, Sung P, Erickson HP. Structure of the Rad50 x Mre11 DNA

- repair complex from *Saccharomyces cerevisiae* by electron microscopy. *J Biol Chem* 2001;276:37027-33.
64. Tauchi H, Kobayashi J, Morishima K, et al. Nbs1 is essential for DNA repair by homologous recombination in higher vertebrate cells. *Nature* 2002;420:93-8.
65. Goedecke W, Eijpe M, Offenberg HH, van Aalderen M, Heyting C. Mre11 and Ku70 interact in somatic cells, but are differentially expressed in early meiosis. *Nat Genet* 1999;23:194-8.
66. Haber JE. The many interfaces of Mre11. *Cell* 1998;95:583-6.
67. Shiloh Y. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer* 2003;3:155-68.
68. Khanna KK, Lavin MF, Jackson SP, Mulhern TD. ATM, a central controller of cellular responses to DNA damage. *Cell Death Differ* 2001;8:1052-65.
69. Gatei M, Young D, Cersaletti KM, et al. ATM-dependent phosphorylation of nibrin in response to radiation exposure. *Nat Genet* 2000;25:115-9.
70. Zhao S, Weng YC, Yuan SS, et al. Functional link between ataxia-telangiectasia and Nijmegen breakage syndrome gene products. *Nature* 2000;405:473-7.
71. Wu X, Rathbun G, Lane WS, Weaver DT, Livingston DM. Interactions of the Nijmegen breakage syndrome protein with ATM and BRCA1. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2000;65:535-45.
72. Wu X, Ranganathan V, Weisman DS, et al. ATM phosphorylation of Nijmegen breakage syndrome protein is required in a DNA damage response. *Nature* 2000;405:477-82.
73. Lim DS, Kim ST, Xu B, et al. ATM phosphorylates p95/nbs1 in an S-phase checkpoint pathway. *Nature* 2000;404:613-7.
74. Berkovich E, Monnat RJ, Jr., Kastan MB. Roles of ATM and NBS1 in chromatin structure modulation and DNA double-strand break repair. *Nat Cell Biol* 2007;9:683-90.
75. Lee JH, Ghirlando R, Bhaskara V, Hoffmeyer MR, Gu J, Paull TT. Regulation of Mre11/Rad50 by Nbs1: effects on nucleotide-dependent DNA binding and association with ataxia-telangiectasia-like disorder mutant complexes. *J Biol Chem* 2003;278:45171-81.
76. Carson CT, Schwartz RA, Stracker TH, Lilley CE, Lee DV, Weitzman MD. The Mre11 complex is required for ATM activation and the G2/M checkpoint. *Embo J* 2003;22:6610-20.
77. Gatei M, Sloper K, Sorensen C, et al. Ataxia-telangiectasia-mutated (ATM) and NBS1-dependent phosphorylation of Chk1 on Ser-317 in response to ionizing radiation. *J Biol Chem* 2003;278:14806-11.
78. Kim ST, Xu B, Kastan MB. Involvement of the cohesin protein, Smc1, in Atm-dependent and independent responses to DNA damage. *Genes Dev* 2002;16:560-70.
79. Kitagawa R, Bakkenist CJ, McKinnon PJ, Kastan MB. Phosphorylation of SMC1 is a critical downstream event in the ATM-NBS1-BRCA1 pathway. *Genes Dev* 2004;18:1423-38.
80. Horejsi Z, Falck J, Bakkenist CJ, Kastan MB, Lukas J, Bartek J. Distinct functional domains of Nbs1 modulate the timing and magnitude of ATM activation after low doses of ionizing radiation. *Oncogene* 2004;23:3122-7.
81. Falck J, Petrini JH, Williams BR, Lukas J, Bartek J. The DNA damage-dependent intra-S phase checkpoint is regulated by parallel pathways. *Nat Genet* 2002;30:290-4.
82. Zhang Y, Lim CU, Williams ES, et al. NBS1 knockdown by small interfering RNA increases ionizing radiation mutagenesis and telomere association in human cells. *Cancer Res* 2005;65:5544-53.
83. Tauchi H, Matsuura S, Kobayashi J, Sakamoto S, Komatsu K. Nijmegen breakage syndrome gene, NBS1, and molecular links to factors for genome stability. *Oncogene* 2002;21:8967-80.
84. Kobayashi J, Tauchi H, Sakamoto S, et al. NBS1 localizes to gamma-H2AX foci through interaction with the FHA/BRCT domain. *Curr Biol* 2002;12:1846-51.

85. Nelms BE, Mackie TR, MacKay JF, et al. A comparison of cytotoxicity after whole- or partial-cell irradiation with synchrotron-produced ultrasoft X rays. *Radiat Res* 1998;150:521-7.
86. Bakkenist CJ, Kastan MB. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 2003;421:499-506.
87. Buscemi G, Perego P, Carenini N, et al. Activation of ATM and Chk2 kinases in relation to the amount of DNA strand breaks. *Oncogene* 2004;23:7691-700.
88. Lee JH, Paull TT. Direct activation of the ATM protein kinase by the Mre11/Rad50/Nbs1 complex. *Science* 2004;304:93-6.
89. Shirata N, Kudoh A, Daikoku T, et al. Activation of ataxia telangiectasia-mutated DNA damage checkpoint signal transduction elicited by herpes simplex virus infection. *J Biol Chem* 2005;280:30336-41.
90. You Z, Chahwan C, Bailis J, Hunter T, Russell P. ATM activation and its recruitment to damaged DNA require binding to the C terminus of Nbs1. *Mol Cell Biol* 2005;25:5363-79.
91. Paull TT, Gellert M. The 3' to 5' exonuclease activity of Mre 11 facilitates repair of DNA double-strand breaks. *Mol Cell* 1998;1:969-79.
92. Paull TT, Gellert M. Nbs1 potentiates ATP-driven DNA unwinding and endonuclease cleavage by the Mre11/Rad50 complex. *Genes Dev* 1999;13:1276-88.
93. Lee JH, Paull TT. ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science* 2005;308:551-4.
94. Xiao Y, Weaver DT. Conditional gene targeted deletion by Cre recombinase demonstrates the requirement for the double-strand break repair Mre11 protein in murine embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res* 1997;25:2985-91.
95. Luo G, Yao MS, Bender CF, et al. Disruption of mRad50 causes embryonic stem cell lethality, abnormal embryonic development, and sensitivity to ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:7376-81.
96. Jongmans W, Vuillaume M, Chrzanowska K, Smeets D, Sperling K, Hall J. Nijmegen breakage syndrome cells fail to induce the p53-mediated DNA damage response following exposure to ionizing radiation. *Mol Cell Biol* 1997;17:5016-22.
97. Sullivan KE, Veksler E, Lederman H, Lees-Miller SP. Cell cycle checkpoints and DNA repair in Nijmegen breakage syndrome. *Clin Immunol Immunopathol* 1997;82:43-8.
98. Girard PM, Foray N, Stumm M, et al. Radiosensitivity in Nijmegen Breakage Syndrome cells is attributable to a repair defect and not cell cycle checkpoint defects. *Cancer Res* 2000;60:4881-8.
99. Yamazaki V, Wegner RD, Kirchgessner CU. Characterization of cell cycle checkpoint responses after ionizing radiation in Nijmegen breakage syndrome cells. *Cancer Res* 1998;58:2316-22.
100. Williams BR, Mirzoeva OK, Morgan WF, Lin J, Dunnick W, Petrini JH. A murine model of Nijmegen breakage syndrome. *Curr Biol* 2002;12:648-53.
101. Falck J, Lukas C, Protopopova M, Lukas J, Selivanova G, Bartek J. Functional impact of concomitant versus alternative defects in the Chk2-p53 tumour suppressor pathway. *Oncogene* 2001;20:5503-10.
102. Falck J, Mailand N, Syljuasen RG, Bartek J, Lukas J. The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature* 2001;410:842-7.
103. Lukas C, Bartkova J, Latella L, et al. DNA damage-activated kinase Chk2 is independent of proliferation or differentiation yet correlates with tissue biology. *Cancer Res* 2001;61:4990-3.
104. Bartek J, Falck J, Lukas J. CHK2 kinase--a busy messenger. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:877-86.
105. Bartek J, Lukas J. Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage. *Curr Opin Cell Biol* 2001;13:738-47.
106. Bartek J, Lukas J. Cell cycle. Order from destruction. *Science* 2001;294:66-7.

107. Taalman RD, Jaspers NG, Scheres JM, de Wit J, Hustinx TW. Hypersensitivity to ionizing radiation, in vitro, in a new chromosomal breakage disorder, the Nijmegen Breakage Syndrome. *Mutat Res* 1983;112:23-32.
108. Tauchi H, Kobayashi J, Morishima K, et al. The forkhead-associated domain of NBS1 is essential for nuclear foci formation after irradiation but not essential for hRAD50[middle dot]hMRE11[middle dot]NBS1 complex DNA repair activity. *J Biol Chem* 2001;276:12-5.
109. Yazdi PT, Wang Y, Zhao S, Patel N, Lee EY, Qin J. SMC1 is a downstream effector in the ATM/NBS1 branch of the human S-phase checkpoint. *Genes Dev* 2002;16:571-82.
110. Xu J, Xin S, Du W. Drosophila Chk2 is required for DNA damage-mediated cell cycle arrest and apoptosis. *FEBS Lett* 2001;508:394-8.
111. Xu B, Kim S, Kastan MB. Involvement of Brca1 in S-phase and G(2)-phase checkpoints after ionizing irradiation. *Mol Cell Biol* 2001;21:3445-50.
112. Stiff T, Reis C, Alderton GK, Woodbine L, O'Driscoll M, Jeggo PA. Nbs1 is required for ATR-dependent phosphorylation events. *Embo J* 2005;24:199-208.
113. Demuth I, Frappart PO, Hildebrand G, 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;13:2385-23897.
114. Buscemi G, Savio C, Zannini L, et al. Chk2 activation dependence on Nbs1 after DNA damage. *Mol Cell Biol* 2001;21:5214-22.
115. Boulton SJ, Jackson SP. Components of the Ku-dependent non-homologous end-joining pathway are involved in telomeric length maintenance and telomeric silencing. *Embo J* 1998;17:1819-28.
116. Nugent CI, Lundblad V. The telomerase reverse transcriptase: components and regulation. *Genes Dev* 1998;12:1073-85.
117. Nugent CI, Bosco G, Ross LO, et al. Telomere maintenance is dependent on activities required for end repair of double-strand breaks. *Curr Biol* 1998;8:657-60.
118. Bakkenist CJ, Drissi R, Wu J, Kastan MB, Dome JS. Disappearance of the telomere dysfunction-induced stress response in fully senescent cells. *Cancer Res* 2004;64:3748-52.
119. Bertuch A, Lundblad V. Telomeres and double-strand breaks: trying to make ends meet. *Trends Cell Biol* 1998;8:339-42.
120. Tauchi T, Nakajima A, Sashida G, et al. Inhibition of human telomerase enhances the effect of the tyrosine kinase inhibitor, imatinib, in BCR-ABL-positive leukemia cells. *Clin Cancer Res* 2002;8:3341-7.
121. Cabuy E, Newton C, Joksic G, et al. Accelerated telomere shortening and telomere abnormalities in radiosensitive cell lines. *Radiat Res* 2005;164:53-62.
122. Cabuy E, Newton C, Roberts T, Newbold R, Slijepcevic P. Identification of subpopulations of cells with differing telomere lengths in mouse and human cell lines by flow FISH. *Cytometry A* 2004;62:150-61.
123. Ranganathan V, Heine WF, Ciccone DN, et al. Rescue of a telomere length defect of Nijmegen breakage syndrome cells requires NBS and telomerase catalytic subunit. *Curr Biol* 2001;11:962-6.
124. Maya R, Balass M, Kim ST, et al. ATM-dependent phosphorylation of Mdm2 on serine 395: role in p53 activation by DNA damage. *Genes Dev* 2001;15:1067-77.
125. Powers JT, Hong S, Mayhew CN, Rogers PM, Knudsen ES, Johnson DG. E2F1 uses the ATM signaling pathway to induce p53 and Chk2 phosphorylation and apoptosis. *Mol Cancer Res* 2004;2:203-14.
126. Thierfelder N, Demuth I, Burghardt N, et al. Extreme variation in apoptosis capacity amongst lymphoid cells of Nijmegen breakage syndrome patients. *Eur J Cell Biol* 2008;87:111-21.
127. Stracker TH, Morales M, Couto SS, Hussein H, Petrini JH. The carboxy terminus of

- NBS1 is required for induction of apoptosis by the MRE11 complex. *Nature* 2007;447:218-21.
128. Zhang Y, Lim CU, Zhou J, Liber HH. 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;171:50-9.
129. Klose J, Kobalz U. Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome. *Electrophoresis* 1995;16:1034-59.
130. Klose J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik* 1975;26:231-43.
131. O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 1975;250:4007-21.
132. Appel RD, Bairoch A, Sanchez JC, et al. Federated two-dimensional electrophoresis database: a simple means of publishing two-dimensional electrophoresis data. *Electrophoresis* 1996;17:540-6.
133. Antoccia A, Ricordy R, Maraschio P, Prudente S, Tanzarella C. Chromosomal sensitivity to clastogenic agents and cell cycle perturbations in Nijmegen breakage syndrome lymphoblastoid cell lines. *Int J Radiat Biol* 1997;71:41-9.
134. Girard PM, Riballo E, Begg AC, Waugh A, Jeggo PA. Nbs1 promotes ATM dependent phosphorylation events including those required for G1/S arrest. *Oncogene* 2002;21:4191-9.
135. Porcedda P, Turinetto V, Lantelme E, et al. Impaired elimination of DNA double-strand break-containing lymphocytes in ataxia telangiectasia and Nijmegen breakage syndrome. *DNA Repair (Amst)* 2006;5:904-13.
136. Hillenkamp F, Karas M. Mass spectrometry of peptides and proteins by matrix-assisted ultraviolet laser desorption/ionization. *Methods Enzymol* 1990;193:280-95.
137. Westermeier R, Postel W, Weser J, Gorg A. High-resolution two-dimensional electrophoresis with isoelectric focusing in immobilized pH gradients. *J Biochem Biophys Methods* 1983;8:321-30.
138. Nuytinck L, Tukel T, Kayserili H, Apak MY, De Paepe A. Glycine to tryptophan substitution in type I collagen in a patient with OI type III: a unique collagen mutation. *J Med Genet* 2000;37:371-5.
139. Schwartz LM, Myer A, Kosz L, Engelstein M, Maier C. Activation of polyubiquitin gene expression during developmentally programmed cell death. *Neuron* 1990;5:411-9.
140. Orłowski RZ. The role of the ubiquitin-proteasome pathway in apoptosis. *Cell Death Differ* 1999;6:303-13.
141. Chondrogianni N, Stratford FL, Trougakos IP, Friguet B, Rivett AJ, Gonos ES. Central role of the proteasome in senescence and survival of human fibroblasts: induction of a senescence-like phenotype upon its inhibition and resistance to stress upon its activation. *J Biol Chem* 2003;278:28026-37.
142. Sharma N, Brandis KA, Herrera SK, et al. alpha-Synuclein budding yeast model: toxicity enhanced by impaired proteasome and oxidative stress. *J Mol Neurosci* 2006;28:161-78.
143. Russell SJ, Reed SH, Huang W, Friedberg EC, Johnston SA. The 19S regulatory complex of the proteasome functions independently of proteolysis in nucleotide excision repair. *Mol Cell* 1999;3:687-95.
144. Reed SH, Gillette TG. Nucleotide excision repair and the ubiquitin proteasome pathway--do all roads lead to Rome? *DNA Repair (Amst)* 2007;6:149-56.
145. Krogan NJ, Lam MH, Fillingham J, et al. Proteasome involvement in the repair of DNA double-strand breaks. *Mol Cell* 2004;16:1027-34.
146. Mu JJ, Wang Y, Luo H, et al. A proteomic analysis of ataxia telangiectasia-mutated (ATM)/ATM-Rad3-related (ATR) substrates identifies the ubiquitin-proteasome system as a regulator for DNA damage checkpoints. *J Biol Chem* 2007;282:17330-4.

147. Kuznicki J, Filipek A. Purification and properties of a novel Ca²⁺-binding protein (10.5 kDa) from Ehrlich-ascites-tumour cells. *Biochem J* 1987;247:663-7.
148. Wiederkehr T, Bukau B, Buchberger A. Protein turnover: a CHIP programmed for proteolysis. *Curr Biol* 2002;12:R26-8.
149. Feder ME, Hofmann GE. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu Rev Physiol* 1999;61:243-82.
150. Jolly C, Morimoto RI. Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:1564-72.
151. Loeffler KU, Mangini NJ. Immunohistochemical localization of Na⁺/Ca²⁺ exchanger in human retina and retinal pigment epithelium. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1998;36:929-33.
152. Daugaard M, Rohde M, Jaattela M. The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS Lett* 2007;581:3702-10.
153. Creagh EM, Carmody RJ, Cotter TG. Heat shock protein 70 inhibits caspase-dependent and -independent apoptosis in Jurkat T cells. *Exp Cell Res* 2000;257:58-66.
154. Nylandsted J, Brand K, Jaattela M. Heat shock protein 70 is required for the survival of cancer cells. *Ann N Y Acad Sci* 2000;926:122-5.
155. Nylandsted J, Rohde M, Brand K, Bastholm L, Elling F, Jaattela M. Selective depletion of heat shock protein 70 (Hsp70) activates a tumor-specific death program that is independent of caspases and bypasses Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:7871-6.
156. Hainaut P, Milner J. Interaction of heat-shock protein 70 with p53 translated in vitro: evidence for interaction with dimeric p53 and for a role in the regulation of p53 conformation. *Embo J* 1992;11:3513-20.
157. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 2000;408:239-47.
158. Soti C, Csermely P. Molecular chaperones and the aging process. *Biogerontology* 2000;1:225-33.
159. Verbeke P, Clark BF, Rattan SI. Modulating cellular aging in vitro: hormetic effects of repeated mild heat stress on protein oxidation and glycation. *Exp Gerontol* 2000;35:787-94.
160. Verbeke P, Siboska GE, Clark BF, Rattan SI. Kinetin inhibits protein oxidation and glycooxidation in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;276:1265-70.
161. Benvenuti S, Cramer R, Quinn CC, et al. Differential proteome analysis of replicative senescence in rat embryo fibroblasts. *Mol Cell Proteomics* 2002;1:280-92.
162. Bijur GN, Davis RE, Joje RS. Rapid activation of heat shock factor-1 DNA binding by H₂O₂ and modulation by glutathione in human neuroblastoma and Alzheimer's disease cybrid cells. *Brain Res Mol Brain Res* 1999;71:69-77.
163. Di Felice V, Ardizzone N, Marciano V, et al. Senescence-associated HSP60 expression in normal human skin fibroblasts. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2005;284:446-53.
164. Ghosh JC, Dohi T, Kang BH, Altieri DC. Hsp60 regulation of tumor cell apoptosis. *J Biol Chem* 2008;283:5188-94.
165. Moreau A, Yotov WV, Glorieux FH, St-Arnaud R. Bone-specific expression of the alpha chain of the nascent polypeptide-associated complex, a coactivator potentiating c-Jun-mediated transcription. *Mol Cell Biol* 1998;18:1312-21.
166. Lehmann AR. Replication of damaged DNA. *Cell Cycle* 2003;2:300-2.
167. Arias EE, Walter JC. PCNA functions as a molecular platform to trigger Cdt1 destruction and prevent re-replication. *Nat Cell Biol* 2006;8:84-90.
168. Moldovan GL, Pfander B, Jentsch S. PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell* 2007;129:665-79.
169. Ando T, Kawabe T, Ohara H, Ducommun B, Itoh M, Okamoto T. Involvement of the interaction between p21 and proliferating cell nuclear antigen for the maintenance of G₂/M

- arrest after DNA damage. *J Biol Chem* 2001;276:42971-7.
170. Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kacmaz K, Linn S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem* 2004;73:39-85.
171. Sancar A, Reardon JT. Nucleotide excision repair in *E. coli* and man. *Adv Protein Chem* 2004;69:43-71.
172. Jeggo PA. Identification of genes involved in repair of DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Radiat Res* 1998;150:S80-91.
173. Jeggo PA. DNA breakage and repair. *Adv Genet* 1998;38:185-218.
174. Takata M, Sasaki MS, Sonoda E, et al. Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *Embo J* 1998;17:5497-508.
175. Montecucco A, Rossi R, Levin DS, et al. DNA ligase I is recruited to sites of DNA replication by an interaction with proliferating cell nuclear antigen: identification of a common targeting mechanism for the assembly of replication factories. *Embo J* 1998;17:3786-95.
176. Li J, Lee YS. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression in pseudoepitheliomatous hyperplasia, keratoacanthoma and squamous cell carcinoma of the skin. *Ann Acad Med Singapore* 1996;25:526-30.
177. Li R, Hannon GJ, Beach D, Stillman B. Subcellular distribution of p21 and PCNA in normal and repair-deficient cells following DNA damage. *Curr Biol* 1996;6:189-99.
178. Warbrick E. The puzzle of PCNA's many partners. *Bioessays* 2000;22:997-1006.
179. Cazzalini O, Perucca P, Riva F, et al. p21CDKN1A does not interfere with loading of PCNA at DNA replication sites, but inhibits subsequent binding of DNA polymerase delta at the G1/S phase transition. *Cell Cycle* 2003;2:596-603.
180. Shan B, Xu J, Zhuo Y, Morris CA, Morris GF. Induction of p53-dependent activation of the human proliferating cell nuclear antigen gene in chromatin by ionizing radiation. *J Biol Chem* 2003;278:44009-17.
181. Morris GF, Bischoff JR, Mathews MB. Transcriptional activation of the human proliferating-cell nuclear antigen promoter by p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:895-9.
182. Rong YS, Golic KG. The homologous chromosome is an effective template for the repair of mitotic DNA double-strand breaks in *Drosophila*. *Genetics* 2003;165:1831-42.
183. Paunesku T, Mittal S, Protic M, et al. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): ringmaster of the genome. *Int J Radiat Biol* 2001;77:1007-21.
184. Andersson M, Jonsson M, Nielsen LL, et al. Mutations in the tumor suppressor gene p53 in human liver cancer induced by alpha-particles. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1995;4:765-70.
185. Tsurimoto T. PCNA binding proteins. *Front Biosci* 1999;4:D849-58.
186. Kelman Z. PCNA: structure, functions and interactions. *Oncogene* 1997;14:629-40.
187. Kao SY, Lemoine FJ, Marriott SJ. Suppression of DNA repair by human T cell leukemia virus type 1 Tax is rescued by a functional p53 signaling pathway. *J Biol Chem* 2000;275:35926-31.
188. Lemoine FJ, Kao SY, Marriott SJ. Suppression of DNA repair by HTLV type 1 Tax correlates with Tax trans-activation of proliferating cell nuclear antigen gene expression. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2000;16:1623-7.
189. Goukassian D, Gad F, Yaar M, Eller MS, Nehal US, Gilchrist BA. Mechanisms and implications of the age-associated decrease in DNA repair capacity. *Faseb J* 2000;14:1325-34.
190. Jaskulski D, Gatti C, Travali S, Calabretta B, Baserga R. Regulation of the proliferating cell nuclear antigen cyclin and thymidine kinase mRNA levels by growth factors. *J Biol Chem* 1988;263:10175-9.
191. Woloschak GE, Paunesku T, Libertin CR, et al. Regulation of thymus PCNA expression is altered in radiation-sensitive wasted mice. *Carcinogenesis* 1996;17:2357-65.

192. Franchitto A, Pichierri P. Werner syndrome protein and the MRE11 complex are involved in a common pathway of replication fork recovery. *Cell Cycle* 2004;3:1331-9.
193. Midgley CA, Owens B, Briscoe CV, Thomas DB, Lane DP, Hall PA. Coupling between gamma irradiation, p53 induction and the apoptotic response depends upon cell type in vivo. *J Cell Sci* 1995;108 (Pt 5):1843-8.
194. Saifudeen Z, Marks J, Du H, El-Dahr SS. Spatial repression of PCNA by p53 during kidney development. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002;283:F727-33.
195. Chang HW, Lai YC, Cheng CY, Ho JL, Ding ST, Liu YC. UV inducibility of rat proliferating cell nuclear antigen gene promoter. *J Cell Biochem* 1999;73:423-32.
196. Honore B, Vorum H. The CREC family, a novel family of multiple EF-hand, low-affinity Ca(2+)-binding proteins localised to the secretory pathway of mammalian cells. *FEBS Lett* 2000;466:11-8.
197. Pancholi V. Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases. *Cell Mol Life Sci* 2001;58:902-20.
198. Li C, Xiao Z, Chen Z, et al. Proteome analysis of human lung squamous carcinoma. *Proteomics* 2006;6:547-58.
199. Cho MK, Kim SG. Induction of class alpha glutathione S-transferases by 4-methylthiazole in the rat liver: role of oxidative stress. *Toxicol Lett* 2000;115:107-15.
200. Pawlowska Z, Baranska P, Jerczynska H, Koziolkiewicz W, Cierniewski CS. Heat shock proteins and other components of cellular machinery for protein synthesis are up-regulated in vascular endothelial cell growth factor-activated human endothelial cells. *Proteomics* 2005;5:1217-27.
201. Boraldi F, Bini L, Liberatori S, et al. Proteome analysis of dermal fibroblasts cultured in vitro from human healthy subjects of different ages. *Proteomics* 2003;3:917-29.
202. Sagan D, Mortl S, Muller I, Eckardt-Schupp F, Eichholtz-Wirth H. Enhanced CD95-mediated apoptosis contributes to radiation hypersensitivity of NBS lymphoblasts. *Apoptosis* 2007;12:753-67.
203. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006;160:1-40.
204. Beskow AP, Fernandes CG, Leipnitz G, et al. Influence of ketone bodies on oxidative stress parameters in brain of developing rats in vitro. *Metab Brain Dis* 2008.
205. Houstek J, Pickova A, Vojtiskova A, Mracek T, Pecina P, Jesina P. Mitochondrial diseases and genetic defects of ATP synthase. *Biochim Biophys Acta* 2006;1757:1400-5.
206. Tolstonog GV, Shoeman RL, Traub U, Traub P. Role of the intermediate filament protein vimentin in delaying senescence and in the spontaneous immortalization of mouse embryo fibroblasts. *DNA Cell Biol* 2001;20:509-29.
207. Bichat F, Mouawad R, Solis-Recendez G, Khayat D, Bastian G. Cytoskeleton alteration in MCF7R cells, a multidrug resistant human breast cancer cell line. *Anticancer Res* 1997;17:3393-401.
208. Huang Q, Chen W, Wang L, Lin W, Lin J, Lin X. Identification of transgelin as a potential novel biomarker for gastric adenocarcinoma based on proteomics technology. *J Cancer Res Clin Oncol* 2008.
209. Assinder SJ, Stanton JA, Prasad PD. Transgelin: An actin-binding protein and tumour suppressor. *Int J Biochem Cell Biol* 2008.
210. Chen G, Gharib TG, Huang CC, et al. Proteomic analysis of lung adenocarcinoma: identification of a highly expressed set of proteins in tumors. *Clin Cancer Res* 2002;8:2298-305.
211. Chambraud B, Radanyi C, Camonis JH, Rajkowski K, Schumacher M, Baulieu EE. Immunophilins, Refsum disease, and lupus nephritis: the peroxisomal enzyme phytanoyl-CoA alpha-hydroxylase is a new FKBP-associated protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:2104-9.

212. Hochwagen A, Tham WH, Brar GA, Amon A. The FK506 binding protein Fpr3 counteracts protein phosphatase 1 to maintain meiotic recombination checkpoint activity. *Cell* 2005;122:861-73.
213. Ravatn R, Wells V, Nelson L, Vettori D, Mallucci L, Chin KV. Circumventing multidrug resistance in cancer by beta-galactoside binding protein, an antiproliferative cytokine. *Cancer Res* 2005;65:1631-4.
214. Chen HY, Liu FT, Yang RY. Roles of galectin-3 in immune responses. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2005;53:497-504.
215. Rabinovich GA. Galectin-1 as a potential cancer target. *Br J Cancer* 2005;92:1188-92.
216. Rabinovich GA, Gruppi A. Galectins as immunoregulators during infectious processes: from microbial invasion to the resolution of the disease. *Parasite Immunol* 2005;27:103-14.
217. Juuti A, Nordling S, Lundin J, Louhimo J, Haglund C. Syndecan-1 expression--a novel prognostic marker in pancreatic cancer. *Oncology* 2005;68:97-106.
218. Shah L, Walter KL, Borczuk AC, et al. Expression of syndecan-1 and expression of epidermal growth factor receptor are associated with survival in patients with nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 2004;101:1632-8.
219. Klaassen I, Brakenhoff RH, Smeets SJ, Snow GB, Braakhuis BJ. Expression of retinoic acid receptor gamma correlates with retinoic acid sensitivity and metabolism in head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Int J Cancer* 2001;92:661-5.
220. Kuppumbatti YS, Bleiweiss IJ, Mandeli JP, Waxman S, Mira YLR. Cellular retinol-binding protein expression and breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:475-80.
221. Blaese MA, Santo-Hoeltje L, Rodemann HP. CRABP I expression and the mediation of the sensitivity of human tumour cells to retinoic acid and irradiation. *Int J Radiat Biol* 2003;79:981-91.
222. Peitz M, Pfannkuchen K, Rajewsky K, Edenhofer F. Ability of the hydrophobic FGF and basic TAT peptides to promote cellular uptake of recombinant Cre recombinase: A tool for efficient genetic engineering of mammalian genomes. *PNAS* 2002;99:4489-94

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Svenja Buchwald, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Identifizierung veränderter Proteinexpression durch 2D-Gelelektrophorese beim Nijmegen Breakage Syndrom“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements für Manuscripts (URM) des ICMJE) kenntlich gemacht, Die Abschnitte zu Methodik und Resultaten entsprechen den URM und werden von mir verantwortet.

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

Berlin, den

Lebenslauf

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

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Martin Digweed für die Überlassung des Themas, die mir gewährte Forschungsfreiheit und vor allem für die langandauernde Unterstützung und Begleitung und ständige Gesprächsbereitschaft.

Danken möchte ich Lars Stöckl für die Betreuung meiner Doktorarbeit, die zahlreichen Diskussionen und motivierenden Gespräche und Herrn Prof. Dr. Karl Sperling für die Möglichkeit, im Institut für Humangenetik zu promovieren

Meinen Kollegen der Arbeitsgruppe möchte ich danken für die Vermittlung der verschiedenen Methoden und dass sie mir stets motivierend und helfend zur Seite standen. Besonderer Dank geht an Susanne Rothe, Janina Radszewski, Gabriele Hildebrand, Bastian Salewsky und meine Mitdoktorantin Anna Melchers.

Für die Bereitstellung seines Labors zur Proteomanalyse und für die massenspektrometrische Identifizierung der Proteine danke ich Herrn Prof. Klose und seiner Arbeitsgruppe, insbesondere auch für die erfolgreiche Zusammenarbeit und die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre.

Zudem möchte ich Herrn Gneveckow für seine Hilfe bei der Bestrahlung und Beratung danken.

Schlussendlich geht mein besonderer Dank an meine Eltern, die meine Ausbildung ermöglichten und die jede Sekunde an mich und meine Fähigkeiten glauben.