

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

Dissertation

**Assoziationsstudie zur klinischen Variabilität bei Patienten
mit dem Nijmegen Breakage Syndrom**

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr.med.)

Vorgelegt der Medizinischen Fakultät
der Charite-Universitätsmedizin Berlin

von

Ryong Kim

Institut für Humangenetik

aus Pyongyang, DPR Korea

Gutachter: 1. Prof. Dr. K. Sperling
2. Prof. Dr. rer. nat. G. Rappold
3. Prof. Dr. H. Höhn

Datum der Promotion: 13. Juli 2010

Für die Familie

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	3
1. EINLEITUNG	6
1.1 Nijmegen Breakage Syndrom	7
1.1.1 Klinisches Bild	8
1.1.2 Genetische Grundlagen.....	9
1.1.3 Mutationen im <i>NBS</i> -Gen	11
1.2 DNA Reparatur	12
1.2.1 Allgemeine Grundlagen.....	12
1.2.2 DNA Reparatur und MRN Komplex	13
1.3 Apoptose	13
1.3.1 Allgemeine Grundlagen.....	13
1.3.2 Apoptose und Nibrin.....	15
1.4 Kopplungs- und Assoziationsstudien.....	15
1.4.1 Kopplungsanalyse	15
1.4.2 Assoziationsanalyse.....	16
2. AUFGABENSTELLUNG	18
3. MATERIAL	19
3.1 DNA-Analysen.....	19
3.2 Chromosomenanalysen.....	28
3.3 Proteinanalysen.....	28
3.4 Software	31
4. METHODEN	32
4.1 Zellkultur	32
4.1.1 Zellkultivierung.....	32
4.1.2 Zellzahlbestimmung.....	32
4.2. Genotypisierung	32
4.2.1 DNA-Extraktion aus LCLs und PCR	32
4.2.2 Gelelektrophorese.....	34
4.2.3 PCR-Aufreinigung	34
4.2.4 Sequenzierungsreaktion	35
4.2.5 Fällung.....	35
4.2.6 Snapshot-Analyse.....	36
4.3 Cytogenetische Analyse	37

4.4 Nachweis des phosphoATM mittels Immunpräzipitation.....	38
4.4.1 Proteinisolation	38
4.4.2 Immunpräzipitation	39
4.4.3 Elektrophorese	40
4.4.4 Proteintransfer	40
4.4.5 Proteinnachweis.....	41
4.4.6 Strippen des Blots	41
4.4.7 ATM Nachweis.....	42
4.5 Caspase-7 Nachweis mittels Western Blot.....	42
4.5.1 Proteinisolation	42
4.5.2 Proteintransfer	42
4.5.3 Proteinnachweis.....	43
5. ERGEBNISSE	44
5.1 Analyse von Polymorphismen in DNA Reparaturgenen bei NBS-Patienten.....	44
5.1.1 Bestimmung der einzelnen Polymorphismen bei NBS-Patienten	44
5.1.2 Allelfrequenzen und Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWG).....	44
5.1.3 Korrelationen zwischen den Genotypen der Polymorphismen und dem klinischen bzw. zellulären Phänotyp	51
5.2 Chromosomanalyse	62
5.3 ATM Phosphorylierung	66
5.4 Caspase Aktivierung und Apoptose.....	68
6. DISKUSSION	71
6.1 Assoziationsanalysen zwischen den Polymorphismen und verschiedenen klinischen Phänotypen.....	72
6.1.1 Auswirkung von Polymorphismen in DNA Reparaturgenen (NER).....	72
6.1.2 Auswirkung von Polymorphismen in DNA Reparaturgenen (HR)	74
6.1.3 Auswirkung von Polymorphismen in Genen gegen oxidativen Stress.....	75
6.1.4 Auswirkung von Polymorphismen in Genen des Apoptose Pathway.....	78
6.2 Funktionelle Untersuchungen an NBS Zelllinien	80
7. ZUSAMMENFASSUNG	83
8. ANHANG.....	86
9. LITERATURVERZEICHNIS	87
DANKSAGUNG	94
ERKLÄRUNG.....	95

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

ALL	akute lymphoblastische Leukämie
AS	Aminosäuren
AT	<i>ataxia-telangiectasia</i>
ATLD	<i>ataxia-telangiectasia disorder like disorder</i>
ATM	<i>ataxia telangiectasia „mutated“</i>
BCL2	<i>B-cell CLL/lymphoma 2</i>
BER	<i>Base-excision repair</i>
bp	Basenpaare
BRCA1	<i>breast cancer 1</i>
BRCA2	<i>breast cancer 2</i>
BRCT	<i>breast cancer carboxy-terminal domain</i>
bzw	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
CHK2	<i>Checkpoint Kinase 2</i>
cM	centiMorgan
ddH ₂ O	destilliertes Wasser
DLBL	<i>diffuse large B-cell lymphoma</i>
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
dNTP	2'-Desoxy-ribonucleosid-5'-triphosphat
ds	<i>double strand</i>
DSB	Doppelstrangbruch
E2F1	<i>E2F transcription factor 1</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	<i>et alii</i> (und andere)
EtBr	Ethidiumbromid
FHA	<i>fork head associated domain</i>
FKS	fötales Kälberserum
GWA	Genomweite Assoziationsstudie
GSTO	<i>Glutathione S-transferase Omega</i>

Abkürzungsverzeichnis

GSTP	<i>Glutathione S-transferase P</i>
Gy	<i>Gray</i>
hOGG1	<i>Human 8-oxoguanine DNA glycosylase</i>
HWE	Hardy-Weinberg Äquilibrium
HR	<i>homologous recombination</i>
IR	<i>ionizing radiation</i>
IRIF	<i>ionizing radiation induced foci</i>
kb	Kilobasen
kDa	Kilo-Dalton
LCL	Lymphoblastoide Zelllinie
M	Mol
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MnSOD	<i>Manganese Superoxide Dismutase</i>
MRN	Mre11/Rad50/Nibrin Komplex
mRNA	<i>messenger RNA</i>
Nbn	Nibrin
NBS	Nijmegen Breakage Syndrom
NER	<i>Nukleotide-excision repair</i>
NHEJ	<i>non homologous end joining</i>
NHL	Non-Hodgkin Lymphom
NQO1	<i>NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1</i>
OD	Optische Dichte
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
RDS	radioresistente DNA Synthese
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rpm	Umdrehungen / Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat

Abkürzungsverzeichnis

sec	Sekunde
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
TFIIH	<i>Transcription initiation factor by RNA polymerase II</i>
U	<i>Units</i>
V	Volt
XPD	<i>Xeroderma pigmentosum complementation group D</i>
XRCC1	<i>X-ray cross-complementing group 1</i>
XRCC3	<i>X-ray cross-complementing group 3</i>

1. Einleitung

Als unmittelbare Folge des Humangenomprojektes, des größten biologisch-medizinischen Forschungsvorhabens überhaupt, wird jede Woche die molekulare Ursache mehrerer genetisch bedingter Krankheiten aufgeklärt. Die zugrunde liegende Strategie beruht auf der sog. Positionsklonierung. Dabei wählt man Familien mit monogen bedingten Krankheiten aus, bei denen die Veränderung des betreffenden Gens regelmäßig mit einer manifesten Erkrankung einhergeht (engl. „mendelian disorders“). Dies ist die entscheidende Voraussetzung, um das Gen zunächst zu kartieren und danach anhand der pathogenetisch relevanten Mutation zu identifizieren. Diese Vorgehensweise hat dazu geführt, dass inzwischen die molekulare Ursache von etwa 3.500 Krankheiten aufgeklärt wurde (s. Datenbank OMIM „Online Mendelian Inheritance in Man“).

Es handelt sich hierbei um einen stark reduktionistischen Ansatz, durch den der übrige genetische Hintergrund sowie umweltbedingte, stochastische und epigenetische Prozesse weitgehend ausgeblendet werden. Besonders deutlich wird dies, wenn man zum Beispiel im Rahmen der vorgeburtlichen Diagnostik eine bekannte Mutation gefunden hat und eine Prognose hinsichtlich der zukünftigen Entwicklung des Kindes abgeben soll. Dann spielen diese Faktoren plötzlich eine wichtige Rolle und verdeutlichen, wie eingeschränkt jede Aussage zum späteren Erscheinungsbild der jeweiligen Krankheit ist. Der diagnostische Wert genetischer Tests ist daher wesentlich höher als ihr prognostischer Wert.

Eine wichtige Aufgabe besteht deshalb darin, diejenigen Faktoren zu identifizieren, die bei einer monogen bedingten Krankheit mit bekannter molekularer Ursache die Manifestation des klinischen Bildes beeinflussen. Dabei kann es sich um modifizierende genetische Elemente handeln (cis- und trans Effekte), um Umweltfaktoren und stochastische Prozesse. Zusätzlich sind epigenetische Veränderungen zu berücksichtigen, die keinen Einfluss auf die DNA Sequenz selbst haben, aber stabil über die Zellteilungen weitergegeben werden und die Genaktivität beeinflussen und damit auch das Ausmaß klinischer Variabilität [1].

Einleitung

Besonders günstig für die Ermittlung modifizierender Gene ist es, wenn die Patienten einer autosomal rezessiven Krankheit die gleiche Mutation aufweisen und daher cis-Effekte praktisch keine Rolle spielen. Ist zudem bekannt, in welche Stoffwechselprozesse das betreffende Gen einbezogen ist, kommen die Gene dieser „pathways“ als „trans-Faktoren“ infrage. Voraussetzung hierfür ist, dass sie in der betreffenden Bevölkerung in unterschiedlichen Varianten vorliegen, die sich in funktioneller Hinsicht unterscheiden (z. B. der Enzymaktivität oder der Stabilität des betreffenden Proteins). Bei Patienten mit einer genetisch bedingten Krankheit, die phänotypische gut charakterisiert sind, kann dann die Auswirkung dieser varianten Gene auf den klinischen Verlauf ermittelt werden. Es handelt sich dabei um sog. Assoziationsstudien. Im positiven Fall sollte durch weitergehende zelluläre, biochemische oder molekulare Untersuchungen der Befund der Assoziationsstudien erhärtet werden.

Das Nijmegen Breakage Syndrom ist ein besonders gut geeignetes Modell für derartige Assoziationsstudien. Mehr als 90% aller Patienten weisen die gleiche Gründermutation auf. Das betreffende Gen, *NBS* (in der Literatur finden sich auch die alternativen Bezeichnungen *NBS1* oder *NBN*), ist in die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB) und die Zellzykluskontrolle einbezogen. Für zahlreiche der hieran beteiligten anderen Gene sind bereits Polymorphismen bekannt. Darunter versteht man häufige Varianten, die bei mehr als 1% der Bevölkerung vorkommen. Ihre Häufigkeit kann zufällig bedingt sein („genetic drift“) oder auf funktionelle Besonderheiten hinweisen, die – zumindest in der früheren Stammesgeschichte – mit einem selektiven Vorteil verbunden waren. Gegenstand dieser Dissertation sind Assoziationsstudien bei Patienten mit dem Nijmegen Breakage Syndrom, wobei 18 Polymorphismen in 14 verschiedenen Genen getestet wurden.

1.1 Nijmegen Breakage Syndrom

Das Nijmegen Breakage Syndrom (NBS; MIM 251.260), erstmals 1981 bei niederländischen Patienten beschrieben, ist eine seltene, genetisch bedingte autosomal rezessive Krankheit. Es gehört zusammen mit dem Bloom-Syndrom, der Fanconi-Anämie und der Ataxia-Telangiectasia (AT) zu den Chromosomeninstabilitäts-Syndromen, die direkt oder indirekt durch einen Defekt in der Reparatur

Einleitung

von DNA Doppelstrangbrüchen gekennzeichnet sind. Patienten mit dem Nijmegen Breakage Syndrom weisen eine faciale Dysmorphie und eine hohe Empfindlichkeit gegenüber ionisierenden Strahlen in Verbindung mit erhöhter Chromosomenbrüchigkeit, Immundefizienz, Infertilität, Minderwuchs und einer Prädisposition für lymphoretikuläre Malignome auf. Über 200 Familien sind weltweit bekannt. Die Mehrheit davon kommt aus Osteuropa, Polen, der Ukraine und der Tschechischen Republik [2].

1.1.1 Klinisches Bild

Patienten mit dem Nijmegen Breakage Syndrom sind phänotypisch vor allem durch ihr charakteristisches Gesicht gekennzeichnet (Abbildung 1). Sie weisen eine flache Stirn, ein fliehendes Kinn und ein prominent wirkendes Mittelgesicht auf. Mikrozephalie und Minderwuchs manifestieren sich generell erst nach der Geburt. Hauterscheinungen, wie „café au lait“ Flecken, finden sich häufig. Ungefähr die Hälfte der Patienten weist außerdem Skelettfehlbildungen, wie Klino- (22/34) und Syndaktylien (12/36) auf. Andere Fehlbildungen, wie Hydronephrose (4/55), Analatresie (3/55) und Hüftdysplasie (3/55) treten gelegentlich auf. Eine geringgradige geistige Retardierung findet sich bei einem Teil der Kinder und verstärkt sich mit zunehmendem Alter [3].

NBS-Patienten haben auch Defizienzen sowohl bei der zellulären als auch bei der humoralen Immunantwort, was ein erhöhtes Infektionsrisiko bedingt. Nibrin, das Protein des *NBS* Gens, ist in den Klassenwechsel der Immunoglobuline einbezogen [4, 5], was die Immundefizienz der NBS Patienten verständlich macht [6]. Zudem ist bekannt, dass NBS Patienten eine extreme Prädisposition für Tumore, insbesondere Lymphome, aufweisen. Etwa 40% entwickeln eine Neoplasie bis zum 20. Lebensjahr [7].

NBS Patienten sind auch durch eine erhöhte spontane Chromosomeninstabilität und eine besondere Empfindlichkeit gegenüber ionisierender Strahlung gekennzeichnet. Typisch für die Lymphozyten sind chromosomale Umbauten wobei die jeweiligen Bruchstellen die Immunglobulin- und T-Zell-Rezeptor-Gene der Chromosomen 7 und 14 betreffen [7, 8]. Ionisierende Strahlung oder Radiomimetika, wie z.B. Bleomycin, induzieren besonders viele Chromatidbrüche in NBS-Zellen, was nicht nur Folge

Einleitung

einer Reparaturdefizienz sondern auch einer gestörten Zellzyklus-Checkpoint Kontrolle ist [9, 10].



Abbildung 1.1 Geschwisterpaar mit Nijmegen Breakage Syndrom

(Fotografie von Prof. E. Seemanova, Prag)

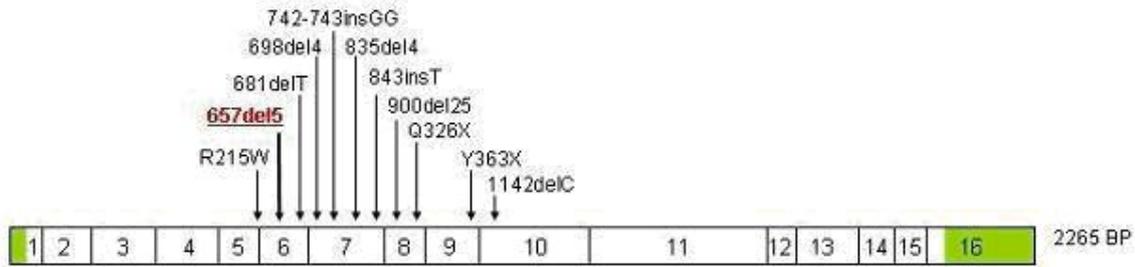
Zwei Geschwistern mit Nijmegen Breakage Syndrom. Das ältere Kind zeigt die phänotypischen Merkmale des NBS besonders deutlich.

1.1.2 Genetische Grundlagen

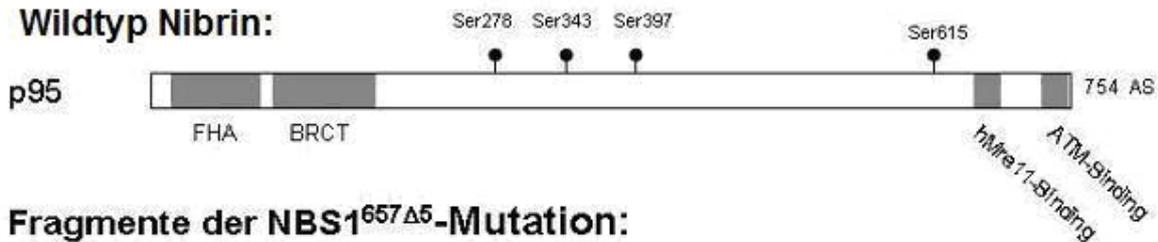
Das *NBS*-Gen, das für das Nijmegen Breakage Syndrom verantwortlich ist, wurde 1998 identifiziert [11-13]. Es wird auch als *NBS1*- oder *NBN*-Gen bezeichnet, hier aber einheitlich als *NBS*-Gen. Es wurde zunächst durch Kopplungsanalysen bei betroffenen Familien auf Chromosom 8q21 kartiert [11, 12]. Das *NBS*-Gen weist 16 Exons auf und erstreckt sich über ca. 50 kb. Als Folge alternativer Polyadenylierung werden mRNAs von 2.4 kb und 4.4 kb Länge gebildet, die ubiquitär exprimiert werden. In Testes und Ovarien wird die 2.4 kb mRNA vermehrt exprimiert, was auf eine Rolle in der Meiose hindeuten könnte [11-13].

Das Produkt des *NBS*-Gens, Nibrin, auch p95 genannt, besteht aus 754 Aminosäuren und hat ein errechnetes Molekulargewicht von 85 kDa [11-13]. Zusammen mit MRE11 und RAD50 bildet es einen Komplex, den MRN-Komplex, der eine entscheidende Rolle in der Zellzykluskontrolle, der Erkennung von DNA Doppelstrangbrüchen (DSBs) und deren Reparatur spielt.

NBS-Gen mit Mutationen



Wildtyp Nibrin:



Fragmente der NBS1^{657Δ5}-Mutation:

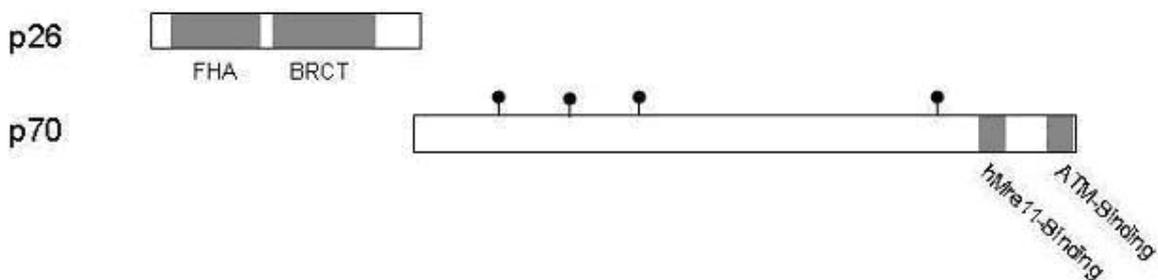


Abbildung 1.2 Schema des kodierenden Bereiches des *NBS*-Gens und des Proteins, Nibrin

Das *NBS*-Gen mit den bisher bei *NBS*-Patienten identifizierten Mutationen. Die in über 90% der Patienten nachgewiesene Foundermutation ist in roter Schrift hervorgehoben. In grüner Farbe ist der untranslatierte Bereich hervorgehoben. Darunter ist das Protein Nibrin mit seinen Bindungsstellen, funktionellen Regionen und Phosphorylierungsstellen dargestellt. Darunter die Proteinfragmente, die bei Patienten mit der Foundermutation nachgewiesen werden konnten. AS: Aminosäuren, BP: Basenpaare, BRCT: „breast cancer carboxy terminal“ Domäne, FHA: „forkhead-associated“ Domäne, Ser: Serinrest

Bei Nibrin können drei funktionelle Bereiche unterschieden werden: die carboxyterminale, die zentrale und die aminoternale Region. Im carboxyterminalen Bereich findet sich die Bindungsstelle für MRE-11, mit dem es zusammen mit RAD50 einen funktionellen Komplex (MRN) bildet und eine Interaktionsstelle für ATM [14]. Im aminoternalen Bereich finden sich zwei funktionelle Regionen, die „forkhead associated“-Domäne (FHA) und die „breast-cancer-carboxy-terminal“-Domäne (BRCT). Diese werden häufig in DNA-Reparaturproteinen gefunden, ihre direkte Nähe in Nibrin scheint aber einzigartig zu sein. Sie sind für die Kernlokalisierung, Foci-Bildung und Phosphorylierung von Nibrin bei der Reparatur von DSBs erforderlich, wie Mutationen in diesen Regionen belegen [15, 16]. In der zentralen Region sind

Einleitung

mehrere Phosphorylierungsstellen lokalisiert, deren Phosphorylierung, u.a. durch ATM, wesentlich zur Aktivierung des MRN-Komplexes beiträgt. Nibrin wird ubiquitär und schon in der frühen Embryonalentwicklung exprimiert [17, 18].

1.1.3 Mutationen im *NBS*-Gen

In über 90% aller NBS-Patienten findet sich die gleiche 5bp Deletion, 657 Δ 5, im *NBS*-Gen. Sie wird als slawische Mutation bezeichnet, weil sie vor allem in Osteuropa vorkommt. Die Heterozygotenfrequenz der NBS 657 Δ 5-Mutation liegt in dieser Region bei etwa 1/177 [19]. Neben dieser Gründermutation konnten zehn weitere trunkierende Mutationen in Patienten mit verschiedenem ethnischen Hintergrund nachgewiesen werden [19-23]. Alle Mutationen sind in Abb 1.2 dargestellt. Diese seltenen Mutationen liegen alle zwischen den Nukleotiden 657 und 1142. In den *breast cancer carboxy-terminal* (BRCT)- und *fork head associated* (FHA)-Domänen wurden bisher keine Mutationen gefunden,

Die Gründermutation führt zu einem vorzeitigen Abbruch der Translation nach den amino-terminalen BRCT und FHA-Domänen [24]. Deshalb kann bei den Patienten erwartungsgemäß kein vollständiges Nibrin nachgewiesen werden. Stattdessen wird ein verkürztes N-terminales 26kDa-Fragment gebildet. Überraschenderweise konnte aus lymphoblastoiden Zellen von NBS^{657 Δ 5}-Patienten auch ein C-terminales 70kDa-Fragment isoliert werden. Es beruht auf einem alternativen Translationsstart oberhalb der Mutation, wodurch die 5 bp-Deletion wieder ins Leserraster gerückt wird [25]. Dieses Fragment enthält noch sowohl die Phosphorylierungsstellen der Zentralregion, als auch die Bindungsstellen für ATM und MRE 11. Deshalb kann es einen Komplex mit MRE11 und RAD50 bilden und so einen Teil der Funktionen Nibrins ersetzen [26]. Die N-terminalen FHA- und BRCT-Domänen sind für die Bildung von Nibrinfoci an Stellen von DNA-Schäden notwendig [27]. Am carboxy-terminalen Ende liegt die MRE11-Bindungsdomäne. Nibrin-Mutationen in diesem Bereich führen zu einem Funktionsverlust dieser Domänen und dem Ausbleiben der Foci Bildung. Nullmutante Mäuse, die kein Nibrinfragment bilden, sind nicht lebensfähig, was die überlebenswichtige Funktion Nibrins belegt [28-30]. Durch Einbringen des NBS^{657 Δ 5}-Allels in nullmutante Zellkulturen oder nullmutante Mäuse kommt es zur Expression des p70-Fragments, wodurch sowohl die Zellen in der

Einleitung

Gewebekultur als auch die Mäuse überleben [26]. Dies erklärt auch das Überleben der Patienten mit der hypomorphen Gründermutationen.

Trotz der Homozygotie für die Mutation weisen die NBS-Patienten eine erhebliche klinische Variabilität auf. Hierfür kommen genetische und peristatische Faktoren, aber auch epigenetische und zufällige Effekte infrage. So ist bereits bekannt, dass das p70-Fragment in verschiedenen Patienten-Zelllinien in unterschiedlich hoher Menge vorliegt und diese mit dem Krebsrisiko korreliert ist [31]. Die Analyse des Proteoms bei nullmutanten Mäusezelllinien nach mutagener Exposition zeigte, dass an der zellulären Antwort auf oxidativen Stress viele Proteine beteiligt sind, die in die DSB Reparatur und die Umsetzung von ROS (*reactive oxygen species*) einbezogen sind [32]. Die betreffenden Gene sind daher Kandidatengene für die hier geplanten Assoziationsstudien.

1.2 DNA Reparatur

1.2.1 Allgemeine Grundlagen

Der Mensch ist täglich exogenen und endogenen Noxen ausgesetzt, die zur Schädigung des Erbgutes führen können. Solche Schäden in der DNA können spontan im Verlauf der DNA-Replikation oder durch exogene Faktoren, z. B. mutagene Chemikalien oder ionisierende Strahlung, verursacht werden. Eine Vielzahl von DNA-Schäden kann unterschieden werden, z. B. Dimerisierung von Pyrimidinen, Bildung spezieller Photoprodukte, DNA-Protein Vernetzungen sowie DNA-Einzelstrang- und DNA-Doppelstrangbrüche. Diese werden durch unterschiedliche Reparaturprozesse korrigiert, wie „*Mismatch Repair*“ [33], „*Base-Excision Repair (BER)*“ [34], „*Nucleotide-Excision Repair (NER)*“ [35] oder DNA-Doppelstrangbruch (DSB) Reparatur.

Davon sind die Doppelstrangbrüche am gravierendsten, da sie zu genomischen Imbalancen führen können und sich im Prinzip ein DSB bereits lethal auswirken kann. DSBs entstehen vor allem durch ionisierende Strahlung und radiomimetische Agentien wie Bleomycin, treten aber auch unter physiologischen Bedingungen bei den Umbauten der Immunoglobulin- und T-Zell Rezeptor Gene auf. Es gibt zwei Hauptmechanismen für die Reparatur von DSBs: „*non-homologous end joining(NHEJ)*“ und „*homologous recombination(HR)*“. Säugerzellen reagieren auf

Einleitung

DSBs durch die Aktivierung vieler Proteine, die in die *Signal*-Erkennung und die DNA-Reparatur einbezogen sind. Ein Individuum, das als Folge einer genetischen Veranlagung DSBs nicht vollständig beseitigen kann, zeichnet sich durch besondere Empfindlichkeit gegenüber ionisierenden Strahlen und ein erhöhtes Krebsrisiko aus. Beispiele hierfür sind Patienten mit *Ataxia-telangiectasia* [*ataxia-telangiectasia-mutated* protein [(ATM)defizient], der „*ataxia-telangiectasia like disorder*“ (ATLD) [MRE11 Defizienz], dem Nijmegen Breakage Syndrom [NBS Defizienz], und der ATR Defizienz [36]. Fehler in Genen, wie DNA-PKcs, Ku70/80 und Ligase IV betreffen das NHEJ und gehen ebenfalls mit gestörter DSB Reparatur einher [37].

1.2.2 DNA Reparatur und MRN Komplex

Der MRN Komplex besteht aus dem Heterotetramer von MRE11 und RAD50, die mit Nibrin verbunden sind. Bei der DSB Antwort hat der MRN Komplex eine große Bedeutung für die Schadenserkennung, die Zellzyklus Checkpointkontrolle und die Reparatur der DNA Läsionen. Zudem ist der Komplex wichtig für die Telomer Erhaltung [38, 39] und die Replikation [40]. Nach einer Bestrahlung lagert sich der MRN Komplex schnell an die DSBs an, bindet und aktiviert ATM [41]. Die Verbindung der DNA Enden wird durch zwei Proteinfilamente von RAD50 bewirkt. MRE11 besetzt Exo- und Endonuklease Aktivität und wird durch andere Nukleasen wie Artemis unterstützt [42]. Funktionelle Analysen haben gezeigt, dass die FHA und BRCT Domänen von Nibrin für die Akkumulation des MRN Komplexes an die DSBs wichtig sind [43] und dass die ATM/ATR konsensus Phosphorylierungsstellen im zentralen Bereich von NBS für die ATM Interaktion verantwortlich sind [44]. Der MRN Komplex aktiviert ATM, das danach Nibrin und MRE11 phosphoryliert und zahlreiche weitere Proteine (z.B. CHK2). Nach der Inhibition von NBS durch eine „*small interfering RNA*“ werden all diese Prozesse beeinträchtigt [29, 45]. Dies unterstreicht die Bedeutung von Nibrin.

1.3 Apoptose

1.3.1 Allgemeine Grundlagen

Die Apoptose ist eine Form des programmierten Zelltods. Es ist gewissermaßen ein „Selbstmordprogramm“ einzelner Zellen. Dieses kann von außen angeregt werden (etwa durch Immunzellen) oder aufgrund von zellinternen Prozessen ausgelöst

Einleitung

werden (etwa nach starker Schädigung der Erbinformation). Im Gegensatz zum anderen bedeutenden Mechanismus des Zelltodes, der Nekrose, wird die Apoptose von der betreffenden Zelle selbst aktiv durchgeführt [46, 47]. Dadurch unterliegt diese Form des Zelltods strenger Kontrolle und es ist gewährleistet, dass die betreffende Zelle ohne Schädigung des Nachbargewebes zugrundegeht. Apoptose und Nekrose lassen sich schon optisch leicht unterscheiden. Während bei der Apoptose ein Schrumpfen der Zelle einsetzt und ein Abbau der DNA durch Endonukleasen in definierte Stücke stattfindet (als DNA-Leiter bekannt und mittels Elektrophorese und die sog. TUNEL-Methode nachweisbar), schwillt bei der Nekrose die Zelle an, wobei deren Plasmamembran zerstört wird. Als Folge kommt es zu lokalen Entzündungen, da Cytoplasma und Zellorganellen in den Extrazellularraum freigesetzt werden, welche durch Makrophagen (Fresszellen) beseitigt werden müssen. Im Vergleich zur Nekrose ist die Apoptose die häufigere Form des Zelltods [46].

Der Vorgang der Apoptose lässt sich in zwei Phasen unterteilen: Initiations- und Effektorphase. Bei der Initiationsphase unterscheidet man zwei Vorgänge: Den extrinsischen und den intrinsischen Weg. Man unterscheidet hiernach auch in Apoptose Typ I und Typ II.

Wenn vielfältige extra- oder intrazelluläre, den Zelltod auslösende Signale über verschiedene Wege in einer Kontrollstelle zusammenlaufen, setzt die Aktivierung der Caspasen ein, welche die typischen, die Apoptose begleitenden Veränderungen in der Zellstruktur hervorrufen. Die heute bekannten Mitglieder der Caspase-Familie können aufgrund ihrer Spezifitäten in drei Subfamilien eingeteilt werden. Alle Caspasen zeigen Ähnlichkeiten in ihrer Aminosäuresequenz, Struktur und Substratspezifität [48]. Sie werden als Proenzyme synthetisiert, welche über drei Domänen verfügen: eine N-terminale Prodomäne sowie zwei, für eine große (ca. 20 kDa) und eine kleine Untereinheit (ca. 10 kDa) kodierende Domänen. Bei einer Aktivierung der Enzyme werden die Domänen proteolytisch an Konsensussequenzen voneinander getrennt. Diese Tatsachen zeigen, dass die Aktivierung entweder in einem autokatalytischen Prozess oder durch Caspasen mit ähnlicher Spezifität erfolgt.

Einleitung

Sogenannte Effektorcaspasen, vornehmlich Caspasen 3, 6 und 7 führen zum apoptotischen Tod der Zelle. Sie aktivieren einerseits sekundäre Zielproteine (z. B. Caspase aktivierte DNase, CAD, oder andere Caspasen) durch limitierte Proteolyse [49]. Andererseits sind sie selbst aktiv am Abbau von Lamin (in der Zellkernmembran) und Aktin (Teil des Zytoskeletts) beteiligt. Ein weiterer Aspekt ist die caspasevermittelte Unterdrückung der DNA-Reparatur [49].

Die wichtigsten bei der Unterdrückung der Apoptose beteiligten Proteine sind die anti-apoptotischen Mitglieder der Bcl-2 Familie (Bcl-2 und Bcl-x_L) und die IAPs (Apoptose-inhibitorische Proteine, engl. *inhibitor-of-apoptosis proteins*), wie beispielsweise Survivin [49].

1.3.2 Apoptose und Nibrin

Schon lange ist bekannt, dass die Apoptose ein sehr wichtiger Mechanismus bei der zellulären Antwort auf DNA-Schäden ist: Stark geschädigte Zellen werden so eliminiert. Hierbei gibt es einen p53 abhängigen und – unabhängigen „pathway“. In lymphoblastoiden NBS Zellen (LCLs) variiert die Apoptoserate erheblich, was mit dem Tumorrisiko korreliert ist [50]. Bemerkenswert ist, dass in NBS Zellen als Folge der verringerten ATM Aktivierung die p53-abhängige Apoptose eingeschränkt ist, die p53-unabhängige aber noch durchgeführt werden kann [51]. So wird in NBS^{-/-} (657del5 homozygoten) Zellen die Caspase-8 Aktivität nach der Bestrahlung gesteigert, d.h. es müssten noch andere Apoptose-Mechanismen analysiert werden, um die klinische Variabilität bei NBS Patienten zu erklären [52].

1.4 Kopplungs- und Assoziationsstudien

1.4.1 Kopplungsanalyse

Gene, die auf verschiedenen Chromosomen gelegen sind, werden gemäß der dritten Mendelschen Regel zufällig voneinander vererbt [53]. Liegen zwei Gene jedoch auf einem Chromosom, sind sie gekoppelt. Je näher die Gene beieinander liegen, desto unwahrscheinlicher ist die Trennung durch ein Rekombinationsereignis (crossing-over) in der Meiose. Bei Tieren und Pflanzen kann man anhand von Kreuzungsexperimenten die Rekombinationsrate ermitteln. Diese gibt den relativen Abstand zwischen Genen an, der in centiMorgan (cM) gemessen wird. 1 cM entspricht dabei einer crossing-over Rate von 1%. Sind Kreuzungsexperimente nicht

Einleitung

möglich, etwa bei der Kartierung von Krankheitsgenen beim Menschen, so kann man auch anhand der Untersuchung von Stammbäumen (Stammbaumanalyse) eine Kopplungsanalyse vornehmen. Dazu sind jedoch mindestens drei Generationen nötig und möglichst große Stammbäume. Zur Kartierung verwendet man hierbei molekulare Marker wie z. B. Mikrosatelliten und SNPs („single nucleotide polymorphisms“), die in großer Zahl und nahezu gleichmäßig über das gesamte Genom verteilt sind und mittels PCR oder SNP-Chips einfach nachgewiesen werden können [54]. Die polymorphen Marker müssen in einem ausreichend großen Stammbaum typisiert werden. Wenn man Kopplung findet, ist anzunehmen, dass die „genetische Krankheitsursache“ in der Nähe der bekannten Markerposition liegt. Die Strategie zur Kartierung und Identifizierung von Krankheitsgenen nennt man Positionsklonierung [55]. Im Anschluß an die Kartierung werden die im gekoppelten Bereich (Kandidatengenregion) liegenden Gene untersucht. Der Beweis, dass man das Krankheitsgen gefunden hat, ist der Nachweis der pathogenetisch relevanten Mutation [56]. Kopplungsanalyse und Positionsklonierung sind sehr erfolgreich zur Identifizierung von Genen eingesetzt worden, die den klassischen Mendelschen Krankheiten zugrunde liegen.

1.4.2 Assoziationsanalyse

Bei der Assoziationsanalyse wird bestimmt, ob ein bestimmtes Allel mit einem Merkmal (z.B. einer Krankheit) gemeinsam auftritt. Hierbei kann das Allel selbst oder ein eng benachbarter Bereich in das Krankheitsgeschehen einbezogen sein. Diese Untersuchungen sind für den Nachweis disponierender Gene bei komplexen Krankheiten oder modifizierender Gene bei monogenen Krankheiten geeignet. In den vergangenen zehn Jahren haben sich die Methoden genomweiter Assoziationsanalysen rasant weiterentwickelt. Eine besondere Rolle kommt dabei den Beziehungen zwischen SNPs und Krankheiten zu [57]. Diese Polymorphismen einzelner Basenpaare stellen ca. 90% aller genetischen Varianten im menschlichen Genom dar. Im Folgenden werden 3 Studiendesigns für Assoziationsanalysen vorgestellt.

1.4.2.1 Fall-Kontroll Studien

Hierbei wird die Allel-Frequenz bei Patienten mit der von Gesunden verglichen. Wichtig ist eine genügend große Fallzahl und eine in ethnischer Hinsicht möglichst

Einleitung

einheitliche Population, da die SNPs oftmals erhebliche Unterschiede zwischen verschiedenen Bevölkerungsgruppen zeigen [57].

1.4.2.2 Trio Design

Das Trio Design schließt das betroffene Kind und seine Eltern ein [58]. Die apriori Wahrscheinlichkeit, mit der ein Allel heterozygoter Eltern auf ihr Kind übertragen wird, beträgt 50%, im Fall einer Assoziation ist es erhöht [58-60].

1.4.2.3 Kohorten Studie

Der Begriff „Kohortenstudie“ wurde 1935 von Frost eingeführt, um Studien zu beschreiben, die das Auftreten von Krankheit bei Personen verglichen, die zu verschiedenen Zeiten geboren waren [61]. Heute werden bevorzugt Kohorten verglichen, deren Individuen sich in einigen Merkmalen (z.B. Wohnort, Beruf oder Verhalten) unterscheiden, um herauszufinden, ob die Inzidenz- oder Mortalitätsraten in Abhängigkeit der gewählten Variablen variieren. Die Studien können prospektiv oder retrospektiv angelegt sein [62].

Ein generelles Problem genomweiter Assoziationsanalysen ist die große Anzahl falsch-positiver Befunde. Viele Studien folgen daher einem mehrstufigen Design, um die falsch-positiven Resultate zu reduzieren [57].

2. Aufgabenstellung

Das Nijmegen Breakage Syndrom (NBS) gehört zu einer Gruppe monogener Krankheiten, deren zugrundeliegenden Gene direkt oder indirekt in die DNA Reparatur einbezogen sind. Die Betroffenen weisen eine starke Empfindlichkeit gegenüber ionisierenden Strahlen und ein extremes Tumorrisiko auf. Ihre Lebenserwartung ist stark verringert. In über 90% aller NBS-Patienten findet sich die gleiche 5bp Deletion, 657del5, im *NBS*-Gen. Trotz dieser genetischen Homogenität zeigt sich eine große Variabilität im klinischen Phänotyp. Das könnte auf genetische Faktoren oder Umwelteinflüssen beruhen. Hier soll der Einfluß von Polymorphismen in solchen Genen untersucht werden, die in den NBS-Pathway einbezogen sind. Dabei ergeben sich folgende Fragestellungen

1. Durchführung von Assoziationsanalysen mit Genen, die in die DNA Reparatur, den Abbau des oxidativen Stress und die Apoptose involviert sind. Als klinische Bezugsgrößen dienen das Tumorrisiko, das Manifestationsalter der Tumoren sowie die Lebensdauer der NBS Patienten.
2. Im Falle einer positiven Assoziation: Unterscheiden sich die lymphoblastoiden Zellen beider Patientengruppen in funktioneller Hinsicht
 - im Hinblick auf ihre spontane und induzierte Chromosomeninstabilität
 - hinsichtlich der ATM Phosphorylierung nach Bleomycinbehandlung
 - bezüglich der Caspase-7 Aktivierung nach Bleomycinbehandlung und der Apoptoserate?

3. Material

3.1 DNA-Analysen

Für die Untersuchung standen DNA-Proben 37 homozygoter NBS Patienten zur Verfügung. Deren wichtigsten klinischen Daten sind in Tabelle 3.1 aufgeführt. Von einer Reihe dieser Probanden sind auch lymphoblastoide Zelllinien verfügbar, die hinsichtlich bestimmter zellulärer Parameter wie der p70 Menge (Tab. 3.2) und der Apoptoserate (Tab. 3.3) gut typisiert sind.

In Tabelle 3.4 sind die hier getesteten polymorphen Gene gelistet, wobei die Häufigkeit der einzelnen Allele angegeben und ihre klinische Relevanz (Erhöhung des Krebsrisikos) aufgeführt wurde. Tabelle 3.5 gibt die Primer zum Nachweis dieser Polymorphismen wider sowie den „pathway“, in den das jeweilige Gen einbezogen ist.

Chemikalien

Produkt	Hersteller
Tris	Merck
Titriplex(EDTA)	Merck
Nacl	Roth
Natrium Acetat	Merck
ETOH	Merck
Cloroform	J.T.Baker
Isopropanol	Merck

Enzyme

Produkt	Hersteller
RNAse A	
Proteinase K	Roche
Taq-Polymerase	Roche
Exonuclease I	New England Biolabs
Antartic Phosphatase	BioLabs
Alk.Phosphatase(CIP)	BioLabs

Material

Tabelle 3.1 Die Daten über NBS Patienten

Nr	Patienten ID	Geschlt	berechn. Alter	Krebs	Alter bei Krebsmanif-estation	Todesalter	Todursache
1	89P0319	weibl	22,6	B-NHL	7	7	Krebs
2	89P0320	männl	24,6	B-NHL	9	?	?
3	94P0112	männl	16			13,1	resp Insuff
4	94P0118	männl	22,7	TLBL/ALL	16	18,4	Krebs
5	94P0126	weibl	23,1				
6	94P0192	männl	14,9				
7	94P0195	weibl	17,7				
8	94P0196	männl	12,4				
9	94P0247	männl	28	T-NHL	24	27,4	sepsis
10	94P0248	männl	24,4				
11	94P0251	männl	18,8	HL	12	14	Krebs
12	94P0254	weibl	27				
13	94P0307	männl	24,7	B-NHL	11		
14	94P0496	männl	20,1	Thyroid Ca.	20		
15	94P0548	männl	15,7			7,5	resp Insuff
16	94P0629	weibl	17,5	B-NHL	9,0	9,3	Krebs
7	95P0182	weibl	12,2	B-NHL	8	10,8	Krebs
18	95P0185	männl	12,4				
19	95P0463	weibl	19,1	B-NHL	7	10	Krebs
20	95P0511	weibl	12,4	B-NHL	7	7,5	Krebs
21	95P0558	weibl	16,6	B-NHL	12	12,3	Krebs
22	96P0048	weibl	16,3				
23	96P0468	weibl	15,5	TLBL/ALL	8,5	10,5	Krebs
24	96P0473	männl	9,9				
25	96P0476	männl	9,4				
26	96P0551	weibl	26,3				
27	96P0616	weibl	12,3	B-NHL	8,1	8,3	Krebs
28	97P0076	weibl	27,8	B-NHL	15	20,6	Krebs
29	97P0081	weibl	17,3				
30	97P0082	weibl	15,4			12,5	resp Insuff
31	97P0229	weibl	9,5	B-NHL	4,5	6	Krebs
32	97P0610	weibl	9	B-NHL	5		
33	97P0614	männl	20,3	B-NHL, T-ALL	7	19,5	Krebs
34	98P0055	weibl	14,3				
35	JaCe	weibl	30,3	NHL	25	29	Krebs
36	PeAb	männl	24,5	ALL/HL	14		
37	RoZd	weibl	25,5	Meningeoma	11		

Material

Tabelle 3.2 p70-Nibrin Menge in NBS LCLs

Nr	Patienten ID	Geschlecht	berechn. Alter	P70-Nibrin Menge(%)	Krebs	Todursache
1	89P0319	weibl	22,6	23,33	B-NHL	Krebs
2	89P0320	männl	24,6	30,81	B-NHL	?
3	94P0112	männl	16	17,95		resp Insuff
4	94P0118	männl	22,7	10	TLBL/ALL	Krebs
5	94P0126	weibl	23,1	24,37		
6	94P0195	weibl	17,7	6,7		
7	94P0196	männl	12,4	34,17		
8	94P0247	männl	28	26,46	T-NHL	Sepsis
9	94P0248	männl	24,4	21,21		
10	94P0251	männl	18,8	23,16	HL	Krebs
11	94P0307	männl	24,7	22,58	B-NHL	
12	94P0496	männl	20,1	21,11	Thyroid Ca.	
13	94P0548	männl	15,7	28,71		resp Insuff
14	95P0182	weibl	12,2	15,24	B-NHL	Krebs
15	95P0185	männl	12,4	24,60		
16	95P0463	weibl	19,1	14,3	B-NHL	Krebs
7	95P0511	weibl	12,4	13,6	B-NHL	Krebs
18	95P0558	weibl	16,6	13,14	B-NHL	Krebs
19	96P0473	männl	9,9	49,85		
20	96P0476	männl	9,4	14,45		
21	97P0081	weibl	17,3	26,64		
22	97P0082	weibl	15,4	27,84		resp Insuff
23	97P0610	weibl	9	20,07	B-NHL	
24	97P0614	männl	20,3	16,68	B-NHL, T-ALL	Krebs
25	98P0055	weibl	14,3	25,34		
26	JaCe	weibl	30,3	11,77	NHL	Krebs
27	RoZd	weibl	25,5	13,59	Meningeoma	

Tabelle 3.3 Apoptose Kapazität in NBS LCLs

Nr	Patienten ID	Geschlecht	berechn Alter	Krebs	Apoptose Kapazität	Todursache
1	89P0319	weibl	22,6	B-NHL	defizient	Krebs
2	94P0112	männl	16		defizient	resp Insuff
3	94P0126	weibl	23,1		defizient	
4	94P0195	weibl	17,7		profizient	
5	94P0196	männl	12,4		defizient	
6	94P0247	männl	28	T-NHL	defizient	sepsis
7	94P0248	männl	24,4		profizient	
8	94P0251	männl	18,8	HL	defizient	Krebs
9	94P0307	männl	24,7	B-NHL	defizient	
10	94P0496	männl	20,1	Thyroid Ca.	defizient	
11	94P0548	männl	15,7		defizient	resp Insuff
12	95P0182	weibl	12,2	B-NHL	defizient	Krebs
13	95P0185	männl	12,4		profizient	
14	95P0463	weibl	19,1	B-NHL	profizient	Krebs
15	95P0511	weibl	12,4	B-NHL	profizient	Krebs
16	95P0558	weibl	16,6	B-NHL	profizient	Krebs
17	96P0048	weibl	16,3		defizient	
18	96P0473	männl	9,9		profizient	
19	96P0476	männl	9,4		profizient	
20	96P0616	weibl	12,3	B-NHL	defizient	Krebs
21	97P0076	weibl	27,8	B-NHL	profizient	Krebs
22	97P0081	weibl	17,3		defizient	
23	97P0082	weibl	15,4		defizient	resp Insuff
24	97P0229	weibl	9,5	B-NHL	defizient	Krebs
25	97P0610	weibl	9	B-NHL	profizient	
26	97P0614	männl	20,3	B-NHL, T-ALL	defizient	Krebs
27	98P0055	weibl	14,3		defizient	
28	JaCe	weibl	30,3	NHL	profizient	Krebs
29	PeAb	male	24,5	ALL/HL	defizient	
30	RoZd	weibl	25,5	Meningeoma	defizient	

Tabelle 3.4 SNP und Korrelation mit Krebsrisiko

No	Genname	Abkürzung	Genotypen- häufigkeit (NCBI SNP Database)	Genetische Disposition (Krebsrisiko)	Literatur
1	XPD rs1799793	Xeroderma pigmentosum complementation group D	AA:0,07 AG:0,49 GG:0,44	+,- +,- +,+	[1]
2	XRCC1 rs1799782	X-ray cross- complementing group 1	CC:0,85 CT:0,12 TT:0,03	+,- +,+ +,+	[2]
3	XRCC1 rs25489		CC:0,93 CT:0,07	+,- +,+	[3]
4	XRCC1 rs25487		GG:0,54 GA:0,4 AA:0,06	+,+ +,- +,-	[4]
5	XRCC3 rs861539	X-ray cross- complementing group 3	CC:0,45 CT:0,4 TT:0,15	+,+ +,- +,-	[5]
6	BRCA1 rs1799950	Breast cancer 1, early onset	AA:0,92 AG:0,08	+,+ +,-	[6]
7	BRCA1 rs799917		CC:0,38 CT:0,48 TT:0,12	+,- +,+ +,+	[6]
8	BRCA2 rs144848	Breast cancer 2, early onset	AA:0,45 AC:0,51 CC:0,04	+,+ +,- +,-	[7]
9	MnSOD rs4880	Manganese Superoxide dismutase	TT:0,31 TC:0,5 CC:0,19	+,+ +,+ +,-	[8]
10	GSTP1 rs1695	Glutathione S- transferase pi 1	GG:0,11 GA:0,54 AA:0,35	+,+ +,+ +,-	[9]
11	GSTO ₂ rs156697	Glutathione S-transferase omega	AA:0,37 AG:0,46 GG:0,17	+,+ +,- +,-	[10]
12	NQO1 rs1800566	NAD(P)H:Quinon Oxidoreduktase 1	CC:0,61 CT:0,36 TT:0,03	+,+ +,- +,-	[11]
13	hOGG1 rs1052133	8-Oxiguanin DNA Glycosylase	CC:0,62 CG:0,31 GG:0,07	+,- +,+ +,+	[12]
14	BCL2 rs1801018	B-cell CLL/Lymphoma 2	AA:0,27 AG:0,52 GG:0,21	+,+ +,- +,-	[13]
15	BCL2 rs1462129		GG:0,36 GA:0,48 AA:0,16		
16	p53	CG33336 Genprodukt	GG:0,62	+,+	[14]

Material

	rs1042522	aus Transkript CG33336-RB	GC:0,3 CC:0,08	+,- +,-	
17	CHK2 rs1805129	Checkpoint Kinase 2	AA:1,00 AG:0,00	+,+ +,-	[15]
18	E2F1 rs3213176	Mitglied von E2F Transkriptionsfaktoren	GG:0,93 GA:0,07	+,+ +,-	[16]

[1] : Butkiewicz, D., et al., *Genetic polymorphisms in DNA repair genes and risk of lung cancer*. Carcinogenesis, 2001. **22**(4): p. 593-7.

[2] : Hill, D.A., et al., *Risk of non-Hodgkin lymphoma (NHL) in relation to germline variation in DNA repair and related genes*. Blood, 2006. **108**(9): p. 3161-7.

[3] : Loizidou, M.A., et al., *Genetic polymorphisms in the DNA repair genes XRCC1, XRCC2 and XRCC3 and risk of breast cancer in Cyprus*. Breast Cancer Res Treat, 2008. **112**(3): p. 575-9.

[4] : Liu, J., et al., *DNA repair gene XRCC1 polymorphisms and non-Hodgkin lymphoma risk in a Chinese population*. Cancer Genet Cytogenet, 2009. **191**(2): p. 67-72.

[5] : El-Zein, R., et al., *Genetic polymorphisms in DNA repair genes as modulators of Hodgkin disease risk*. Cancer, 2009. **115**(8): p. 1651-9.

[6] : Durocher, F., et al., *Comparison of BRCA1 polymorphisms, rare sequence variants and/or missense mutations in unaffected and breast/ovarian cancer populations*. Hum Mol Genet, 1996. **5**(6): p. 835-42.

[7] : Spurdle, A.B., et al., *The BRCA2 372 HH genotype is associated with risk of breast cancer in Australian women under age 60 years*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2002. **11**(4): p. 413-6.

[8] : Mitrunen, K., et al., *Association between manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene polymorphism and breast cancer risk*. Carcinogenesis, 2001. **22**(5): p. 827-9.

[9] : Yuille, M., et al., *Relationship between glutathione S-transferase M1, T1, and P1 polymorphisms and chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 2002. **99**(11): p. 4216-8.

[10] : Marahatta, S.B., et al., *Polymorphism of glutathione S-transferase omega gene and risk of cancer*. Cancer Lett, 2006. **236**(2): p. 276-81.

[11] : Krajcinovic, M., et al., *Role of NQO1, MPO and CYP2E1 genetic polymorphisms in the susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia*. Int J Cancer, 2002. **97**(2): p. 230-6.

Material

- [12] : Farinati, F., et al., *Oxidative DNA damage in gastric cancer: CagA status and OGG1 gene polymorphism*. Int J Cancer, 2008. **123**(1): p. 51-5.
- [13] : Yeon Hee Park, et al., *Interaction between BCL2 and Interleukin-10 Gene Polymorphisms Alter Outcomes of Diffuse Large B-Cell Lymphoma following Rituximab Plus CHOP Chemotherapy*, Clin Cancer Res 2107 2009;15(6)March15, 2009
- [14] : Do, T.N., et al., *TP53 R72P and MDM2 SNP309 polymorphisms in modification of childhood acute lymphoblastic leukemia susceptibility*. Cancer Genet Cytogenet, 2009. **195**(1): p. 31-6.
- [15] : Novak, D.J., et al., *Identification of a novel CHEK2 variant and assessment of its contribution to the risk of breast cancer in French Canadian women*. BMC Cancer, 2008. **8**: p. 239.
- [16] : Gorgoulis, V.G., et al., *Transcription factor E2F-1 acts as a growth-promoting factor and is associated with adverse prognosis in non-small cell lung carcinomas*. J Pathol, 2002. **198**(2): p. 142-56.

Material

Tabelle 3.5 Verwendete Primer

No	Genname	RefSNP	Allel Häufigkeit (NCBI SNP Database)	Primer Forward-Primer Reverse-Primer Snapshot-Primer	Pathway
1	XPD	rs1799793	G:0,69 A:0,31	5`-gctcatctctccgcaggatca-3` 5`-cgccacttcacgtactccag-3`	NER
2	XRCC1	rs1799782	C:0,91 T:0,09	5`-gttccgtggaaggaggagga-3` 5`-cgagtctaggctcaaccctactcact-3`	BER
		rs25489	C:0,97 T:0,03	5`-ttgacccccagtggtgctaa-3` 5`-agtctgctggctctgggctgg-3`	
		rs25487	G:0,74 A:0,26	5`-ttgacccccagtggtgctaa-3` 5`-agtctgctggctctgggctgg-3`	
3	XRCC3	rs861539	C:0,65 T:0,35	5`-ggacttgctgaccagcatag-3` 5`-ggtaggcacaggctgctac-3`	HR
4	BRCA1	rs1799950	A:0,96 G:0,04	5`-gcaaggagccaacataacag-3` 5`-aggatcactggccagtaagt-3`	
		rs799917	C:0,62 T:0,38	5`-ggttcaaagcgccagtcac-3` 5`-cacattcctcttctgcatttct-3`	
5	BRCA2	rs144848	A:0,71 C:0,29	5`-ctgaactggaacaaatgatactga-3` 5`-agacggtacaactccttgagat-3`	
6	MnSOD	rs4880	T:0,56 C:0,44	5`-agcccagcctgcgtaga-3` 5`-ggfacttctcctcggtgacg-3`	oxidativer Stress
7	GSTP1	rs1695	G:0,37 A:0,63	5`-ctggtggacatggtgaatga-3` 5`-ggtgcagggtgtgtctgtc-3`	
8	GSTO ₂	rs156697	A:0,6 G:0,4	5`-aggcagaacaggaactggaa-3` 5`-gtagagtgaccaggtagc-3`	
9	NQO1	rs1800566	C:0,78 T:0,22	5`-ggatccaggtggcacagtt-3` 5`-ctcctcatcctgtacctct-3`	
10	OGG1	rs1052133	C:0,78 G:0,22	5`-actgtcactagtctcaccag-3` 5`-ggaaggtgctggggaat-3`	
11	BCL2	rs1801018	A:0,53 G:0,48	5`-gaatgcaaagcacatccaat-3` 5`-cctctgacagcttataat-3` 5`-gaaggatggcgacgctgggagaac-3`	Apoptose
		rs1462129	G:0,6 A:0,4	5`-gaatgcaaagcacatccaat-3` 5`-cctctgacagcttataat-3` 5`-ctaaggctactcattgtgtcttagc-3`	
12	p53	rs1042522	G:0,77 C:0,23	5`-ctggtcctctgactgctctt-3` 5`-cgtgcaagtacagacttg-3`	
13	E2F1	rs3213176	G:0,97 A:0,03	5`-tactcagcctggagcaaggt-3` 5`-cagtcgaagaggctctgat-3`	
14	CHK2	rs1805129	A:1,00 G:0,00	5`-agtcggatggtgaggctcag-3` 5`-tcagaacctccacctgga-3`	

NER= Nukleotid-Exzisionsreparatur

BER= Basen-Exzisionsreparatur

HR= Homologe Rekombination

Material

Puffer

Produkt	Hersteller oder Zusammensetzung
10xPCR-Puffer ohne Mg	Gibco-BRL
Exonuclease I Puffer 10x	BioLabs
Antartic Phosphatase Puffer10x	BioLabs
Sequez Puffer 5x	ABI
CIP Puffer 10x	BioLabs
TBE 5x	900mM Tris, 900mMBorsäure, 40mM EDTA
Gelladepuffer	20%Ficoll 400,0,005% Xylencyanol FF,0,005% Bromphenolblau 20%EDTA

Geräte

Produkt	Hersteller
Ultrospec 3100 pro	Amersham pharmacia biotech
Electrophoresegerät	PeQLab biotech
Elektrophorese Stromversorgung	Life TECHNOLOGIES
Kühlung	Eppendorf
Proben taschenkämme	Hofer
Thermocycler GeneAmp PCR System 9600	Perkin Elmer
Thermocycler GeneAmp PCR System 2400	AB Applied Biosystems
Zentrifuge Labofuge 400R	Haereus Instruments ;hanau

Kits

Kit	Hersteller
Snapshot Multiplex	AB Applied Biosystems
LIZ Standard	AB Applied Biosystems
Quick-Load 100 bp DNA Ladder	BioLabs

Verbrauchsmaterial

Produkt	Hersteller
---------	------------

Material

EppendorfggefäÙe(0,5/1,0/2,0ml)	Sarstedt,Nümbrecht
Pipettenspitzen	Sarstedt,Nümbrecht
Transferpipetten,2,5ml steril/unsteril	Sarstedt,Nümbrecht
Mikropipetten	Gilson/Eppendorfer

3.2 Chromosomenanalysen

Chemikalien

Produkt	Hersteller
Bleomycin	Merck
Colcemid	Invitrogen
KCl	Merck
Methanol	Merck
Essigsäure	Merck
Immersionsöl	Merck

Geräte

Produkt	Hersteller
Coulter Counter	Beckmann
Mikroskop	Karl-Zeiss
Mikropositioner	Berliner Glas KG

Verbrauchsmaterial

Produkt	Hersteller
Spitzbodenröhrchen	BD Biosciences
5,10 ml Pipettenspitzen	BD Biosciences
Objektträger	R.Langenbrinck

3.3 Proteinanalysen

Chemikalien

Produkt	Hersteller
FKS (fötales Kälberserum)	PAN BIOTECH GmbH
Penicillin/Streptomycin (100%)	PAA Laboratories GmbH
Mercaptoethanol	Merck
Bradford-Reagent (1fach)	Sigma-Aldrich

Material

PBS	PAN BIOTECH GmbH
Triton X100	
Complete Mini (Protease Inhibitor Tabletten)	Roche Diagnostics GmbH
Nupage Antioxidant	Invitrogen
Methanol (100% v/v)	Roth
Ponceau S	Fluka
Entwickler	Kodak GBX Developer and Replenisher
Fixierer	Kodak GBX Developer and Replenisher
Western Lightning Chemoluminescence Reagent Plus	Perkin Elmer
Supersignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo SCIENTIFIC
SDS	Sigma-Aldrich

Antikörper

Produkt	Hersteller
Anti-ATM (polyclonal,Rabbit)	Novus Biologicals
Anti-ATM pS1981 (monoclonal)	Rochland
ECl Anti-Mouse IgG horsradish Peroxidase linked whole antibody	GE Healthcare UK limited
ATM (Mouse, monoclonal)	Abcam
Cleaved Caspase-7 (Asp 198) Antikörper	Cell Signaling Technology
ECl Anti-Rabbit IgG horsradish Peroxidase linked whole antibody	GE Healthcare UK limited
beta-Actin (Mouse, monoclonal)	Abcam

Medium

Produkt	Hersteller
RPMI 1640 mit L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH

Material

Puffer

Produkt	Hersteller oder Zusammensetzung
Lysepuffer	Tris-HCl,pH 7,5 ,NaCl,EDTA,pH 8,0,Triton X100,Complete Mini
LDS-Ladepuffer,4fach	Invitrogen
TBS-T Waschpuffer	Tris-HCL,pH 7,5,NaCl,Tween 20,H ₂ O _{dd}
Novex Tris-Acetat SDS Running-Buffer	Invitrogen
Nupage Transfer-Buffer	Invitrogen
Nupage MES SDS Running-Buffer	Invitrogen

Geräte

Produkt	Hersteller
Laminair	Haereus Instruments
Sonifizierungsgerät	Branson Sonifier 450
Tecan (Photometer)	SUNRISE
Gelelektrophoresekammer	Invitrogen
Transferkammer	Invitrogen

Kits

Produkt	Hersteller
Dynabeads Protein G	Dynal Biotech ASA/Invitrogen

Verbrauchsmaterial

Produkt	Hersteller
Magermilchpulver	Sucofin
Nupage Tris-Acetat(3-8%)	Invitrogen
Gel,12well,15well	
Nitrocellulose-Membran/(0,45µm)	Amersham-Biosciences
X-ray Film	Kodak
Nupage Bis-Tris(12%) 15 well	Invitrogen

3.4 Software

BLAST (NCBI)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/
MapView	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/
SeqMan™II	DNASTAR Inc.
GraphPad	http://www.graphpad.com/quickcalcs/
Clone Manager 6	Sci Ed Central
Sequenz-Analysis	Applied Bioscience
Endnote 8	Thomson ISI ResearchSoft
Ensembl	http://www.ensembl.org/index.html
Excell	Microsoft Office

4. Methoden

4.1 Zellkultur

Alle Prozeduren der Zellkultivierung wurden unter sterilen Bedingungen mit sterilen Medien, Lösungen und Materialien unter einer Laminairflow-Werkbank durchgeführt, um so eine Kontamination mit Pilzen und Bakterien zu vermeiden. Die Zellkulturen wurden in Gewebezuchtflaschen bei 37 °C mit 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert.

4.1.1 Zellkultivierung

Die in Einfriermedium gelagerten Zellen wurden zunächst aus dem Stickstofftank (-196 °C) entnommen und aufgetaut. Danach wurden die Zellen in 9 ml Kulturmedium überführt und für 10 min. bei 800 rpm (Fa. Heraeus Megafuge 2.0) sedimentiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 5 ml frischem Kulturmedium resuspendiert, in eine Gewebezuchtflasche (50 ml) überführt und im Brutschrank inkubiert. Je nach Wachstum der Zellen wurde das verbrauchte Kulturmedium abgenommen und durch neues Medium ersetzt.

4.1.2 Zellzahlbestimmung

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

Zellzahl

- DNA-Analyse 1×10^6
- Chromosomenanalyse $1 \times 10^6 / 5 \text{ ml}$
- Protein-Analyse $1,5 \times 10^6 / 5 \text{ ml}$

4.2. Genotypisierung

4.2.1 DNA-Extraktion aus LCLs und PCR

4.2.1.1 DNA Extraktion

Das Zellpellet wurde mit 700µl Proteinase K (20mg/ml) über Nacht bei 37°C behandelt.

Danach wurde 1µl RNase A (10 mg/ml) zugegeben und 30min bei 37°C (Heizblock) inkubiert. Anschließend wurde 700µl PCA addiert, 5min bei 6000 rpm zentrifugiert.

Methoden

Dieser Vorgang wurde noch einmal wiederholt. Danach wurde mit 700µl CHCl₃ extrahiert.

Zur Fällung wurden 23µl 3M Na-Azetat (pH 6,0) und 700µl Isopropanol auf die wässrige Phase gegeben und 15min bei RT rotiert, danach für 10min bei 6000 rpm abzentrifugiert und der Isopropanol abgenommen.

Das Pellet wurde einmal mit 700µl 75% ETOH gewaschen und 10min bei 6000 rpm zentrifugiert. Der ETOH wurde abgenommen und das Pellet für 5 min bei 37°C trocknen gelassen. Danach wurde das DNA-Pellet in 200µl TE gelöst.

4.2.1.2 PCR (engl. polymerase chain reaction)

Dieses Verfahren ermöglicht es, enzymatisch von bestimmten Nukleotidsequenzen in vitro millionenfache Kopien herzustellen. Ein PCR-Zyklus beginnt mit der thermischen Denaturierung des zu amplifizierenden DNA-Doppelstranges, indem bei etwa 90-94°C die DNA aufgeschmolzen wird. Es entstehen einzelsträngige DNAs, an die die synthetischen Oligonukleotide (Primer) bei Temperaturen von $\geq 50^{\circ}\text{C}$ spezifisch binden (Hybridisierung). An diese doppelsträngigen Bereiche lagert sich die Taq-Polymerase an, die bei 72°C bevorzugt den Abschnitt zwischen den Primern repliziert. Diese hitzestabile DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* wird verwendet, weil sie die kontinuierliche Durchführung der PCR-Zyklen ohne zwischenzeitliche neue Enzymzugabe pro Zyklus erlaubt.

Typisches PCR-Thermocyclerprogramm (bei Verwendung von Taq-Polymerase)

Schritt-Nr.	Bezeichnung	Temperatur(°C)	Zeit(min)
1	Initiale Denaturierung	95	3-5
2	Denaturierung	95	0,5-1
3	Primer-Hybridisierung	T_m-5	0,5-1
4	Polymerisation	72	0,5-1
	Wiederholung der Schritte 2-4 25 bis 35mal		
5	Abschließende Polymerisation	72	5-10

In der Tabelle ist T_m die Schmelztemperatur. Sie lässt sich mit der folgenden Formel abschätzen $T_m = 2^{\circ}\text{C} \times (A+T) + 4^{\circ}\text{C} \times (G+C)$

Methoden

Manchmal wird eine Touchdown-PCR verwendet, um die Spezifität der Primerbindung zu erhöhen. Sie führt zu weniger Primerdimeren und weniger Artefakten.

Ansatz für eine PCR

Komponente	Konzentration	Menge
H ₂ O		13,05-17,55 µl
PCR-Puffer	10-fach	2,50 µl
MgCl	50 mM	0,75 µl
dNTPs	10 mM	2,00 µl
Primer_F	5 µM	0,75 µl
Primer_R	5 U/µl	0,75 µl
Taq Polymerase		0,2, µl
DNA		1,00-5,00 µl

4.2.2 Gelelektrophorese

Agarosegele werden zur Auftrennung von Molekülen über 10nm Durchmesser herangezogen. Agarose ist ein Polysaccharid und wird aus roten Meeresalgen hergestellt. Die PCR Produkte können nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Durch Anlegen eines Spannungsfeldes in der mit Elektrophoresepuffer (TBE-Laufpuffer) gefüllten Kammer wandern die Amplikons aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen durch das 1,5 %ige Agarosegel (1,5 g Agarose auf 100 ml TBE-Laufpuffer) zur positiv geladenen Anode. Hierbei durchlaufen kleinere Produkte das Gel schneller als größere. Mit Hilfe von Ethidiumbromid, welches mit der DNA interkaliert, werden die Banden unter einem UV-Flächenstrahler sichtbar gemacht. Deren Größe wird durch den Vergleich mit einem Längenstandard ermittelt.

4.2.3 PCR-Aufreinigung

Die PCR-Produkte werden aufgereinigt, um die überschüssigen Primer und dNTPs zu entfernen. Bei größeren Probenmengen wird eine enzymatische Aufreinigung mit Hilfe der Shrimp-Alkaline-Phosphatase (SAP) und der Exonuclease I für 45 min bei 37°C durchgeführt.

Der Ansatz ist wie folgt.

PCR-Produkt	5 µl
H ₂ O	3,85 µl
SAP 1U/µl	0,1 µl
SAP Puffer	0,5 µl
Exonuklease I 20U/µl	0,05 µl
Exonuklease I Puffer	0,5 µl

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

4.2.4 Sequenzierungsreaktion

Die Sequenzierung beruht auf der elektrophoretischen Auftrennung nach unterschiedlicher Länge von DNA-Fragmenten, die bei der Sequenzierung entstanden sind. In die Reaktion werden die gereinigten PCR-Produkte, das Big Dye Terminator Kit, ddNTPs und ddNTPs eingesetzt. Die ddNTPs führen zum Syntheseabbruch, weil die Pentose am 3`C-Atom statt der OH-Gruppe nur H trägt und daher kein weiteres Nukleotid anhängt werden kann. Es wurde ein Kapillarsequenziergerät der Firma Applied Biosystems genutzt und folgender Sequenzierungsansatz verwendet.

ger. PCR Produkt	3,0µl
Sequenz-Puffer	2,0µl
Big Dye	0,5 µl
Primer F oder R(µM)	1,0 µl
H ₂ O	3,5 µl

Sequenzierungsprofil

Temperatur	Dauer	Zyklen
96 °C	10 sek	25x
50 °C	5 sek	
60 °C	4 min	
4 °C	∞	

4.2.5 Fällung

Nach Ende der Sequenzierungsreaktion erfolgte die Fällung der Fragmente durch Zugabe von 100 µl Präzipitationsmix und anschließende Zentrifugation für 30 min bei 3000 rpm, der Überstand wurde verworfen. Die Reinigung erfolgte durch Zugabe von 200 µl 70 %igem Ethanol und erneute Zentrifugation für 8 min bei 3000 rpm. Die Proben wurden anschließend im offenen Thermocycler für 3 min bei 95 °C getrocknet und in je 20 µl PCR-H₂O gelöst. Kleine Probenmengen wurden nach den Vorgaben des DyeEx Spin Kits der Firma Qiagen aufgereinigt und in 20 µl H₂O gelöst. Die gefällten Proben wurden anschließend in dem Kapillarsequenziergerät 3100 oder 3730 der Firma Applied Biosystems aufgetrennt. Die Auswertung der vierfarbigen Ergebnisse wurde mittels der Software „Sequencing Analysis 3.4.1“ vorgenommen.

Methoden

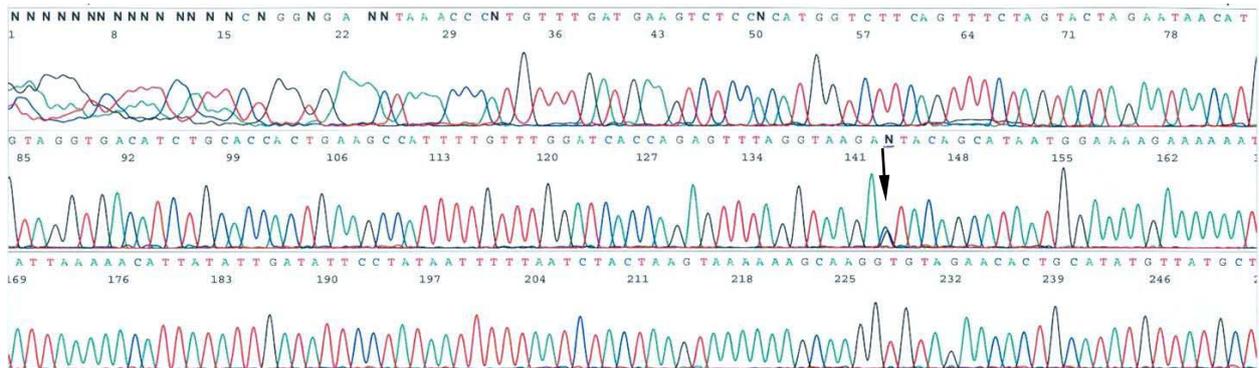


Abb. 4.2 Beispiel für eine Sequenz

Der schwarze Pfeil zeigt auf eine Heterozygotie mit Cytosin und Guanin

4.2.6 Snapshot-Analyse

Die Snapshot-Analyse ist ebenfalls eine PCR-gestützte Methode zur Detektion von SNPs. Zunächst wird ein Abschnitt, der die zu untersuchende Sequenz enthält, mittels PCR amplifiziert. Mit einem Primer, der genau vor der interessierenden Base endet, wird eine zweite PCR-Amplifikation durchgeführt. Da im PCR-Ansatz lediglich Dideoxynukleotide eingesetzt werden, erfolgt nach dem ersten Baseneinbau ein Amplifikationsstopp. Somit entstehen Produkte, die die Länge des Primers plus eine Base aufweisen. Die eingesetzten vier Dideoxynukleotide sind mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, so dass die PCR-Produkte ähnlich wie bei einer Sequenzierung mit dem ABI-Prism 310 Genetic Analyzer Version 1.0.2 durch das sequenzspezifische Farbsignal nachgewiesen werden können.

Zu den vorgelegten 8µl Snapshot Mix wurden je 2µl gereinigtes DNA-Template pipettiert. Snapshot Mix besteht aus Snapshot-Multiplex (2µl) den Snapshot Primern (1µl) und Wasser (5µl). Der Snapshot-Multiplex enthält fluoreszierende ddNTPs, Ampli-Taq Polymerase und Reaktionspuffer. Die Proben wurden im Thermocycler unter folgenden Bedingungen amplifiziert:

96°C 10 Sek
50°C 5 Sek
60°C 30 Sek
12°C
Zyklusanzahl 25

Im Post-Extensionsverfahren wurden die Proben dann von nicht gebundenen fluoreszenzmarkierten ddNTPs mit alkalischer Phosphatase gereinigt

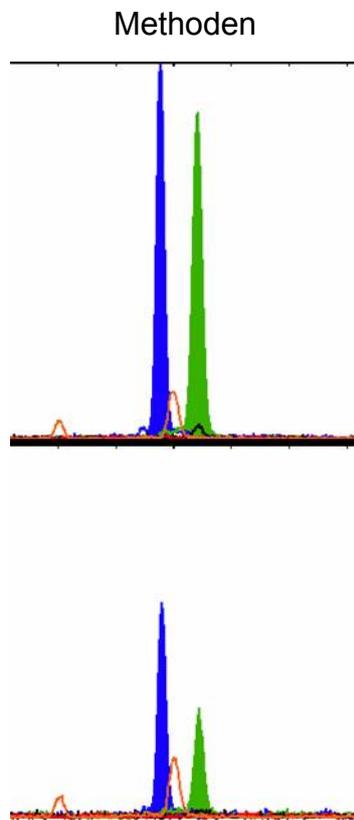


Abb.4.3 Ergebnis einer Snapshot-Analyse

Blau zeigt Guanin und Grün Adenin an.

Es liegt Heterozygotie vor.

In dem oberen Bild kommen die beiden Basen fast gleichstark vor, in dem unteren Bild ist Guanin stärker als Adenin vertreten.

4.3 Cytogenetische Analyse

Die Untersuchungen wurden an lymphoblastoiden Zellen (LCL) der NBS Patienten durchgeführt. Vor der Behandlung wurde die Zellzahl auf 2×10^5 Zellen/ml eingestellt. Die Kulturgefäße (50 ml Flaschen) enthielten 5 ml Zellsuspension (1×10^6 Zellen). Die Bestrahlung erfolgte mit einer Dosis von 0,5 Gy und 1,0 Gy. Danach wurden die Zellen für 3 Stunden im Brutschrank inkubiert.

Um die Zellen in der Metaphase zu arretieren, wurden jeweils 30 µl Colcemid (10 µg/ml) hinzugegeben und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Es folgte eine Überführung der Zellsuspension in ein Spitzbodenröhrchen und anschließend eine Zentrifugation. Alle Zentrifugationsschritte wurden für 10 min, bei 1000 rpm (Fa. Heraeus Megafuge 2.0) durchgeführt. Der Überstand wurde bis auf 1 ml abgenommen, die Zellen in 8 ml vorgewärmtem 0,4 %igen KCl resuspendiert und für 20 min bei 37 °C inkubiert (hypotoner Schock). Nach erneuter Zentrifugation und Abnahme des Überstandes wurden die Zellen erneut resuspendiert. Zur Fixierung der Zellen wurden die Röhrchen schräg gestellt, 5 ml des zuvor frisch hergestellten

Methoden

Fixativs (3:1 Methanol/Essigsäure) tropfenweise zugegeben und 5 min bei 4 °C stehen gelassen. Die Zellsuspension wurde noch einmal fixiert und über Nacht im Gefrierschrank bei – 20 °C stehen gelassen. Am folgenden Tag erfolgten zwei weitere Fixierungen. Nach dem dritten Durchgang wurde wieder zentrifugiert, der Überstand bis auf ca. 0,5 ml abgenommen und das Zellsediment gut resuspendiert. Danach wurden 2 - 3 Tropfen der Zellsuspension auf einen Objektträger getropft und auf einer Heizplatte, welche mit einem feuchtem Tuch bedeckt war, schnell getrocknet. Das feuchte Tuch wurde verwendet, um eine hohe Luftfeuchtigkeit zu erreichen. Zur Färbung wurden die Objektträger für 10 min in Giemsa-Färbelösung getaucht und mit Wasser gründlich abgespült und luftgetrocknet. Anschließend wurde das Präparat mit einem Deckglas und etwas Eindeckmittel (Entellan®) versiegelt. Nach dem Trocknen des Eindeckmittels erfolgte eine Verschlüsselung der Präparate durch eine Mitarbeiterin des Labors. Anschließend konnten die Präparate unter einem Lichtmikroskop mit einem 100er Objektiv ausgewertet werden. Die Positionen der analysierten Metaphasen auf dem Objektträger wurden mit einem Mikropositionierer festgehalten.

4.4 Nachweis des phosphoATM mittels Immunpräzipitation

4.4.1 Proteinisolation

Wenn die LCL-Zellen in exponentiellem Wachstum waren, wurden jeweils $1,5 \times 10^6$ Zellen/5ml RPMI 1640 (T25) in das Kulturgefäß überführt und anschließend jeweils Bleomycin (0, 10, 30 ug/ml zu jeder Flasche) zugegeben und für 1h bei 37°C inkubiert. Dann wurde für 10 min bei 1.000 rpm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Nachfolgend wurde das Pellet in 1 ml PBS-Puffer resuspendiert, in ein Eppendorfgefäß überführt, zentrifugiert, der Überstand bis auf 1 ml abgenommen und nochmals 4 min bei 6.000 rpm bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und mit jeweils 1 ml kaltem PBS gewaschen, 4 min bei 6.000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Danach wurde das Zellpellet in 100µl IP-Puffer resuspendiert, noch 400µl IP-Puffer hinzugegeben und 60 min bei 4°C auf dem Roller im Kühlraum inkubiert.

Anschließend wurden die Zellen aufgebrochen, indem die Eppendorfgefäße für 30 sec mit Ultraschall behandelt wurden (Branson Sonifier 450: Duty Cycle: 70%, Output Control: Stufe 4). Zur Abtrennung der Zelltrümmer wurde 10 min mit 13.000

rpm bei 4°C zentrifugiert und der proteinhaltige Überstand in ein neues 1,5ml Eppendorfgefäß überführt. Danach wurde die Proteinmenge nach Bradford quantifiziert.

4.4.2 Immunpräzipitation

Eine Immunpräzipitation (IP, auch Immunopräzipitation genannt) ist eine molekularbiologische Methode, bei der mittels eines Antikörpers ein Antigen aus einer Lösung aufkonzentriert wird.

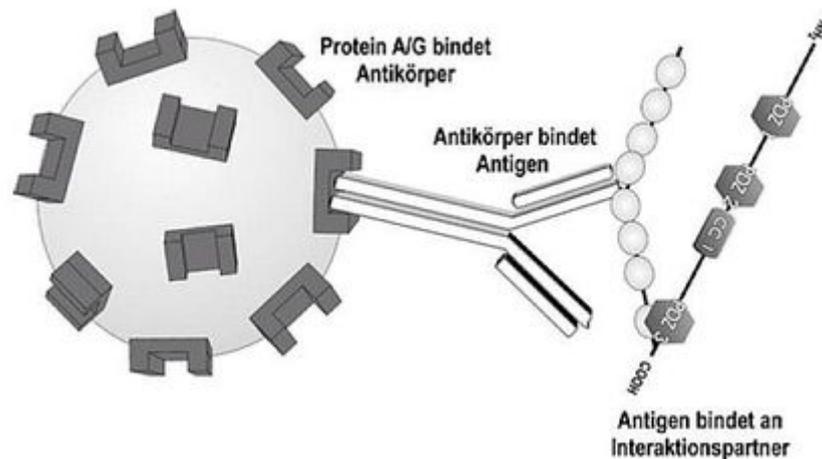


Abbildung 4.4 Schema einer Immunpräzipitation.

Ein Lysat wird zusammen mit einem spezifischen Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper bindet an sein Zielprotein und wird über Protein A/G-Beads präzipitiert. Etwaige Interaktionspartner des Zielproteins, die an dieses gebunden sind, werden mit dem Zielprotein kopräzipitiert. Der Interaktionspartner wird im Western Blot nachgewiesen (wikipedia).

Das Proteingemisch kann ein Homogenisat eines Gewebes sein oder aber Zellen aus der Zellkultur. Nachdem Zellen oder Gewebe aufgebrochen wurden, gibt man Antikörper hinzu, welche an eines der Proteine spezifisch binden. Über diese Antikörper wird dann das gesuchte Protein samt Interaktionspartner herausgezogen. Hierbei bedient man sich in der Regel der spezifischen Eigenschaften von so genanntem Protein A, das aus der Zellwand des Bakteriums *Staphylococcus aureus* stammt, und/oder Protein G, welches ein Bestandteil der Zellwand von bestimmten Streptokokken-Stämmen ist. Protein A und G binden mit hoher Spezifität an die Fc-Region der meisten Säugetier-Immunglobuline. Mit diesen Proteinen werden nun Kügelchen beschichtet (sogenannte Beads, z.B. aus Sepharose oder magnetischen

Methoden

Mikropartikeln), um in einer solchen Immunpräzipitation die Antikörper-Protein-Komplexe an sich zu binden.

Es wurde 3 µl des „Fisch-Antikörpers“ (Anti-ATM, rabbit polyclonal, Novus) pro Probe zugegeben und bei 4°C (Kühlraum) unter Rollern für 60 min inkubiert.

Für die Magnetbead-Behandlung wurde die Magnetbead-Suspension (DynaL Biotech ASA/Invitrogen) durch vorsichtiges Schwenken homogenisiert und entsprechende Mengen der Magnetbead-Suspension in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Die Magnetbeads wurden 3 mal mit jeweils 1 ml kaltem PBS gewaschen und in IP-Lysepuffer aufgenommen. Jeweils 25 µl der gewaschenen Magnetbeads wurden zur Protein-Antikörper-Lösung hinzugegeben. Dann wurden die Ansätze bei 4°C im Kühlraum über Nacht rollern gelassen. Die mit Magnetbeads versetzten Protein-Lysate wurde mit IP-Lysepuffer gewaschen, die Magnetbeads in 1ml Lysepuffer durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren aufgenommen und vollständig in je ein neues Eppendorfgefäß überführt, um eventuell vorhandene Verunreinigungen zurückzulassen.

Anschließend wurde der Überstand im Magnetständer vollständig abgenommen und wurden die Beads in 10 µl 1,1 fachem LDS-Ladepuffer von Invitrogen aufgenommen. Die Proben wurden für 5 min im Wasserbad gekocht, kurz auf Eis gestellt und anzentrifugiert. Nach Abtrennung der Beads im Magnetständer wurden sie in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

4.4.3 Elektrophorese

Die präzipitierten Proteine und Antikörper wurden mittels Gel-Elektrophorese separiert. Zuvor wurde 1 µl 10fach-reducing-agent zu 10 µl Protein-Lysat gegeben und die Proteine bei 70°C für 10 min im Thermoblock denaturiert.

Die Proteine wurden mittels Gel-Elektrophorese (NuPage Gel System) in Tris-Acetat (3-8%) bei 150 V für 2 h aufgetrennt und nach Beendigung der Elektrophorese in das Transfermodul überführt.

4.4.4 Proteintransfer

Die Spange Pads (Invitrogen), Blotting-Paper (Schleicher & Schuell) und Nitrocellulose-Membran (Amersham) wurden für mindestens 30 min in Transferpuffer getränkt und danach zusammen mit dem Gel zwischen Anode und Kathode des

Methoden

Transfermoduls eingesetzt. Dabei war es wichtig, dass sich zwischen Membran und Gel keine Luftblasen befanden. Anschließend wurde die Kammer mit Transferpuffer aufgefüllt. Die Proteine wurden aus dem Gel für 2 Stunden bei 26 V auf die Nitrocellulosemembran übertragen. Danach konnten die Proteine auf der Nitrocellulosemembran mit Ponceas S angefärbt, überprüft und dokumentiert werden. Anschließend wurde die Membran mit H_2O_{dd} entfärbt und in 10-15 ml Magermilchpulver in TBS-T über Nacht bei 4°C oder für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Antikörperbindungsstellen auf der Membran zu blockieren.

4.4.5 Proteinnachweis

Der Blot wurde mit TBS-T für jeweils 10 min bei RT 3mal gewaschen.

Der Blot wurde mit dem Primärantikörper anti-ATM p1981 (Rochland, monoklonal, Mouse) in einer Verdünnung von 1:500 über Nacht bei 4°C Inkubiert. Durch 3 x 10 min Waschen mit TBS-T Waschpuffer wurden nicht gebundene Reste des primären Antikörpers entfernt. Es folgte die Inkubation des Sekundärantikörpers-ECL (Anti-Mouse IgG Horseradish Peroxidase linked whole antibody: GE Healthcare UK limited) in einer Verdünnung von 1:2000 für 2h bei RT.

Für die Belichtungsreaktion wurden die Lösungen 1 (Enhanced Luminol Reagent; Perkin Elmer) mit Lösung 2 (Oxidizing Reagent; Perkin Elmer) im Verhältnis 1:1 (1ml+1ml) gemischt und für 1 min auf die Membran gegeben. Anschließend wurde ein Röntgenfilm (Kodak Medical X-ray Film, General Purpose Blue) auf die Membran gelegt und für verschiedene Belichtungszeiten exponiert.

4.4.6 Strippen des Blots

Um mehrere Proteine auf einer Membran nachweisen zu können, müssen die auf der Membran befindlichen Antikörper abgelöst werden. Dafür wurde die Membran in Strip-Puffer für 30 min bei 60°C im Wasserbad unter leichtem Schütteln inkubiert. Im Anschluss erfolgte zweimaliges Waschen des Blots für 10 min mit H_2O_{dd} und 1 mal mit TBS-T für 10 min bei Raumtemperatur. Weiterhin wurde die Membran mit 10-15 ml 10% Magermilchpulver in TBS-T über Nacht bei 4°C abgesättigt.

4.4.7 ATM Nachweis

Der Nachweis von gesamtem ATM wurde wie oben durchgeführt. Als erster Antikörper wurde ATM Antikörper (Abcam,UK) in einer Verdünnung von 1:4000 eingesetzt.

4.5 Caspase-7 Nachweis mittels Western Blot

4.5.1 Proteinisolation

Die LCLs wurden, wie oben, mit 10µg/ml Bleomycin behandelt und für 0h, 12h, 24h und 48h bei 37°C inkubiert.

Das Zellpellet wurde in 150µl LDS-Puffer resuspendiert und das Lysat 5min im Wasserbad gekocht. Anschließend wurden die Eppendorfgefäße für 30 sec mit Ultraschall behandelt (Branson Sonifier 450: Duty Cycle: 70%, Output Control: Stufe 4) und zur Abtrennung der Zelltrümmer für 10 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde in ein neues 1,5ml Eppendorfgefäß übergeführt. 1µl 10fach „Reducing-Agent“ wurde zu 10µl Protein-Lysat hinzugegeben und bei 70°C für 10 min im Thermoblock denaturiert. Das Proteingemisch wurde mittels Gel-Elektrophorese (NuPage Gel System) in Bis-Tris(12%) bei 110V für 2h aufgetrennt.

4.5.2 Proteintransfer

Das Gel wurde wie oben geblottet (1 Stunde bei 23V). Danach konnten die Proteine auf der Nitrocellulosemembran mit Ponceas S reversibel angefärbt, überprüft und dokumentiert werden.

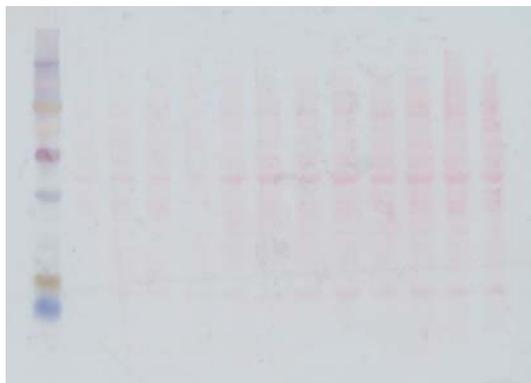


Abbildung 4.5 Western Blot (Anfärbung mit Ponceau S)

4.5.3 Proteinnachweis

Der Blot wurde mit *cleaved Caspase-7*(Asp 198) Antikörper gegen Caspase-7 in einer Verdünnung von 1:1000 für 2h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Es folgte die Inkubation des Sekundärantikörpers ECI (Anti-Mouse IgG Horseradish Peroxidase) in einer Verdünnung von 1:4000 für 2h bei RT. Danach erfolgte die Belichtung und Auswertung.

Als interne Kontrolle diente Aktin, das mittels anti-Aktin Antikörper detektiert wurde.

5. Ergebnisse

Alle hier untersuchten NBS-Patienten sind reinerbig für die Gründermutation und von daher genetisch „homogen“. Dennoch zeigen sie eine erhebliche klinische Variabilität, die sich u. a. im Zeitpunkt der Krebsmanifestation und der anschließenden Überlebenszeit äußert. Hierfür können modifizierende Gene verantwortlich sein, die in die Cancerogenese einbezogen sind und in funktionell unterschiedlichen Polymorphismen vorliegen.

5.1 Analyse von Polymorphismen in DNA Reparaturgenen bei NBS-Patienten

5.1.1 Bestimmung der einzelnen Polymorphismen bei NBS-Patienten

Die Genotypisierung wurde mittels Sequenzanalyse und Snapshot-PCR durchgeführt. Die Tabelle 5.1 gibt die 18 verschiedenen Polymorphismen aller 37 SNP Patienten wieder, von denen 16 männlich und 21 weiblich sind.

5.1.2 Allelfrequenzen und Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWG)

Für die 18 biallelischen Polymorphismen (SNPs) wurde für die 37 NBS-Patienten die Häufigkeit beider Allele (p und q) ermittelt und die nach dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht erwartete Häufigkeit der drei Genotypen mit den gefundenen Werten verglichen (Tab. 5.2). Die Berechnungsformeln für das Hardy-Weinberg Gleichgewicht lautet: $p^2+2pq+q^2=1$, $p+q=1$

Wie aus Tab 5.2 zu erkennen ist, wurden keine signifikanten Abweichungen vom Hardy-Weinberger-Gleichgewicht gefunden.

In Tab 5.3 wird die Häufigkeit der einzelnen Allele der 18 Polymorphismen bei den NBS Patienten mit denen aus der Literatur verglichen.

Für 16 der 18 Polymorphismen gibt es praktisch keine Unterschiede in den hier gefundenen Allelenfrequenzen und den publizierten Daten. Deutlich stärkere Abweichungen ergeben sich hingegen für das *MnSOD* - und das *XRCC1*-Gen.

Ergebnisse

Tabelle 5.1 Polymorphismen von Reparaturgenen bei NBS-Patienten

No	Patient ID	D312N XPD rs 1799793	BCL2 rs 1462129	BCL2 rs 801018	Ile105Val GSTP1 rs 1695	Pro72Arg TP53 rs 1042522	Ala9Val MnSOD rs 4880
1	Jace	G/A	A/G	A/G	A/G	C/G	C/C
2	PeAb	G/G	G/G	A/G	A/G	G/G	C/T
3	Rozd	G/A	A/A	A/A	A/A	G/G	T/T
4	89P0319	G/G	A/A	A/A	G/G	G/G	C/C
5	89P0320	G/G	A/A	A/A	A/G	G/G	C/C
6	94P0112	A/A	A/G	A/G	A/A	C/G	C/C
7	94P0118	A/A	G/G	A/A	A/A	G/G	C/C
8	94P0126	G/G	A/A	A/A	A/G	C/G	C/T
9	94P0192	G/A	A/G	A/G	A/A	G/G	C/C
10	94P0195	G/G	A/G	A/G	G/G	C/G	C/T
11	94P0196	G/A	A/G	A/G	A/G	G/G	C/T
12	94P0247	A/A	A/A	A/A	A/G	C/G	T/T
13	94P0248	G/G	A/G	A/G	A/G	C/G	T/T
14	94P0251	G/A	G/G	G/G	A/G	G/G	C/C
15	94P0254	G/A	G/G	G/G	A/A	C/G	C/T
16	94P0307	G/A	A/G	A/G	A/G	C/G	C/T
17	94P0496	G/G	A/G	A/G	A/A	G/G	C/T
18	94P0548	G/G	A/G	A/A	A/A	C/C	C/C
19	94P0629	G/A	A/G	A/G	A/A	C/G	T/T
20	95P0182	G/G	A/G	A/A	A/G	C/G	C/C
21	95P0185	A/A	A/G	A/G	A/G	G/G	T/T
22	95P0463	G/G	G/G	A/A	A/G	G/G	C/C
23	95P0511	G/G	A/G	A/A	A/G	C/G	C/T
24	95P0558	A/A	G/G	G/G	A/A	G/G	C/C
25	96P0048	A/A	A/G	A/G	A/A	G/G	C/T
26	96P0468	G/G	G/G	G/G	G/G	C/G	C/T
27	96P0473	G/A	G/G	A/G	A/G	G/G	C/C
28	96P0476	G/A	G/G	A/G	A/G	C/G	C/T
29	96P0551	G/G	A/G	A/G	A/A	G/G	C/T
30	96P0616	G/G	A/G	A/A	A/A	G/G	C/C
31	97P0076	G/A	G/G	G/G	A/A	G/G	T/T
32	97P0081	G/G	A/G	A/G	A/A	G/G	T/T
33	97P0082	G/G	A/G	A/G	A/G	G/G	C/T
34	97P0229	G/G	G/G	G/G	A/A	C/C	C/T
35	97P0610	G/A	G/G	G/G	A/A	G/G	T/T
36	97P0614	G/A	A/G	A/G	G/G	C/G	C/T
37	98P0055	G/G	A/G	A/G	A/G	C/G	C/T

Ergebnisse

No	Patient ID	252A>G CHK2 rs1805129	N142D GSTO2 rs156697	Gly393Ser E2F1 rs3213176	R194W XRCC1 rs1799782	R208H XRCC1 rs25489	R399Q XRCC1 rs25487
1	Jace	A/A	A/G	G/G	C/C	C/C	G/G
2	PeAb	A/A	A/A	G/G	C/C	C/C	G/G
3	Rozd	A/A	A/A	G/G	C/C	C/C	G/A
4	89P0319	A/A	A/G	G/G	C/C	C/C	A/A
5	89P0320	A/A	A/G	G/G	C/C	C/C	A/A
6	94P0112	A/A	A/G	G/G	C/C	C/C	G/A
7	94P0118	A/G	G/G	G/G	C/C	C/C	A/A
8	94P0126	A/A	A/A	G/A	C/C	C/C	G/A
9	94P0192	A/A	A/A	G/G	T/T	C/C	G/G
10	94P0195	A/A	A/G	G/G	C/C	C/C	G/A
11	94P0196	A/A	A/A	G/G	C/C	C/C	G/A
12	94P0247	A/A	A/G	G/G	C/C	C/C	G/A
13	94P0248	A/A	A/A	G/G	C/C	C/T	G/G
14	94P0251	A/A	A/A	G/G	C/C	C/C	A/A
15	94P0254	A/A	A/G	G/G	C/C	C/C	G/A
16	94P0307	A/A	A/A	G/G	C/C	C/C	A/A
17	94P0496	A/G	A/G	G/G	C/C	C/C	G/G
18	94P0548	A/A	A/G	G/G	C/C	C/C	G/G
19	94P0629	A/A	A/G	G/G	C/C	C/C	G/A
20	95P0182	A/A	A/A	G/G	C/C	C/C	G/G
21	95P0185	A/A	A/G	G/G	C/C	C/C	A/A
22	95P0463	A/A	G/G	G/G	T/T	C/C	G/G
23	95P0511	A/A	A/G	G/G	C/T	C/C	G/G
24	95P0558	A/A	A/A	G/G	C/C	C/C	G/G
25	96P0048	A/A	A/G	G/G	C/C	C/C	G/A
26	96P0468	A/A	A/G	G/G	C/C	C/C	G/G
27	96P0473	A/A	A/G	G/G	C/C	C/C	G/A
28	96P0476	A/A	A/A	G/G	C/C	C/C	G/G
29	96P0551	A/A	A/A	G/G	C/C	C/C	A/A
30	96P0616	A/A	A/G	G/G	C/C	C/C	A/A
31	97P0076	A/A	A/A	G/G	C/C	C/C	G/G
32	97P0081	A/A	G/G	G/G	C/C	C/T	G/A
33	97P0082	A/A	A/A	G/G	C/C	C/C	G/A
34	97P0229	A/A	A/G	G/G	C/T	C/C	G/G
35	97P0610	A/A	A/A	G/G	C/C	C/C	G/G
36	97P0614	A/A	A/A	G/G	C/T	C/C	G/G
37	98P0055	A/A	A/G	G/G	C/T	C/C	G/G

Ergebnisse

No	Patient ID	M241T XRCC3 rs861539	Q356R BRCA1 rs1799950	P871L BRCA1 rs799917	N372H BRCA2 rs44848	P187S NQO1 rs1800566	Ser326Cys OGG1 rs1052133
1	Jace	C/C	A/A	C/T	A/A	C/C	C/C
2	PeAb	C/T	A/A	C/T	C/C	C/C	G/C
3	Rozd	C/C	A/A	C/C	A/C	C/T	C/C
4	89P0319	C/T	A/G	C/C	A/A	C/C	C/C
5	89P0320	T/T	A/A	C/C	A/A	C/T	C/C
6	94P0112	C/C	A/A	C/T	A/A	C/C	C/C
7	94P0118	C/T	A/A	C/T	C/C	C/C	C/C
8	94P0126	C/T	A/A	C/C	A/C	C/C	C/C
9	94P0192	C/C	A/A	C/C	A/C	C/C	C/C
10	94P0195	C/C	A/A	C/T	A/A	C/C	G/C
11	94P0196	C/C	A/G	C/T	A/A	C/C	C/C
12	94P0247	C/T	A/A	C/T	C/C	C/C	C/C
13	94P0248	C/T	A/A	C/T	A/C	C/C	C/C
14	94P0251	C/T	A/A	C/T	A/A	C/C	G/C
15	94P0254	C/T	A/A	C/T	A/C	T/T	G/C
16	94P0307	C/T	A/A	C/T	A/A	C/T	C/C
17	94P0496	C/T	A/A	T/T	A/C	C/C	C/C
18	94P0548	C/C	A/A	C/C	A/A	C/C	G/C
19	94P0629	C/T	A/A	C/C	A/A	C/C	C/C
20	95P0182	C/C	A/A	C/T	A/A	C/T	G/C
21	95P0185	C/T	A/A	T/T	A/A	C/C	C/C
22	95P0463	C/C	A/A	C/T	A/A	C/C	C/C
23	95P0511	C/T	A/G	C/T	A/A	C/C	C/C
24	95P0558	T/T	A/A	T/T	C/C	C/C	C/C
25	96P0048	C/T	A/A	T/T	A/C	C/C	C/C
26	96P0468	C/C	A/A	C/T	A/A	C/C	G/C
27	96P0473	C/C	A/A	C/C	C/C	C/C	G/C
28	96P0476	C/T	A/A	C/T	A/A	C/T	G/C
29	96P0551	C/C	A/A	C/T	A/C	C/T	C/C
30	96P0616	C/C	A/A	C/T	A/A	C/T	G/C
31	97P0076	C/C	A/G	C/T	A/A	C/T	C/C
32	97P0081	C/C	A/A	C/T	A/A	C/T	C/C
33	97P0082	C/T	A/A	C/C	A/A	C/C	C/C
34	97P0229	C/T	A/A	C/T	A/C	C/C	C/C
35	97P0610	C/C	A/G	C/C	A/C	C/C	C/C
36	97P0614	C/T	A/A	C/T	A/A	C/T	C/C
37	98P0055	C/C	A/A	C/T	A/A	C/C	G/G

Ergebnisse

Tabelle 5.2 Allelfrequenzen von 18 Polymorphismen bei 37 NBS Patienten

	SNP	p	q	Homozygote		Heterozygote		P
				B	E	B	E	
1	D312N XPD rs 1799793	49/74=0,66 (G)	25/74=0,34 (A)	AA: 6 GG: 18	4,3 16,1	AG 13	16,6	ns
2	R194W XRCC1 rs1799782	66/74=0,89 (C)	8/74=0,11 (T)	CC: 31 TT: 2	29,3 0,4	CT 4	7,2	ns
3	R280H XRCC1 rs25489	72/74=0,97 (C)	2/74=0,03 (T)	CC: 35	34,5	CT 2	2,2	ns
4	R399Q XRCC1 rs25487	46/74=0,62 (G)	28/74=0,38 (A)	GG: 17 AA: 8	14,2 5,3	AG 12	17,4	ns
5	Ala9Val MnSOD rs 4880	32/74=0,43 (T)	42/74=0,57 (C)	TT: 8 CC: 13	6,8 12,0	CT 16	18,2	ns
6	Ile105Val GSTP1 rs 1695	25/74=0,34 (G)	49/74=0,66 (A)	GG: 4 AA: 16	4,3 16,1	AG 17	16,6	ns
7	N142D GSTO2 rs156697	50/74=0,68 (A)	24/74=0,32 (G)	AA: 16 GG: 3	17,1 3,8	AG 18	16,1	ns
8	P187S NQO1 rs 1800566	62/74=0,84 (C)	12/74=0,16 (T)	CC: 26 TT: 1	26,1 0,9	CT 10	10	ns
9	Ser326Cys OGG1 rs 1052133	62/74=0,84 (C)	12/74=0,16 (G)	CC: 26 GG: 1	26,1 0,9	CG 10	10	ns
10	M241T XRCC3 rs861539	52/74=0,7 (C)	22/74=0,3 (T)	CC: 17 TT: 2	18,1 3,3	CT 18	15,5	ns
11	Q356R BRCA1 rs1799950	69/74=0,93 (A)	5/74=0,07 (G)	AA: 32	32	AG 5	5	ns
12	P871L BRCA1 rs 799917	43/74=0,58 (C)	31/74=0,42 (T)	CC: 10 TT: 4	12,4 6,5	CT 23	18,1	ns
13	N372H BRCA2 rs 144848	54/74=0,73 (A)	20/74=0,27 (C)	AA: 22 CC: 5	19,7 6,5	AC 10	14,6	ns
14	BCL2 rs 1462129	44/74=0,59 (G)	30/74=0,41 (A)	GG: 12 AA: 5	12,8 6,2	AG 20	17,9	ns
15	BCL2 rs 1801018	41/74=0,55 (A)	33/74=0,45 (G)	AA: 11 GG: 7	11,2 7,5	AG 19	18,3	ns
16	Gly393Ser E2F1 rs3213176	73/74=0,99 (G)	1/74=0,01 (A)	GG: 36	36,3	AG 1	0,7	ns

Ergebnisse

17	252A>G CHK2 rs1805129	$72/74=0,97$ (A)	$2/74=0,03$ (G)	AA: 35 35,1	AG 2 2,1	ns
18	Pro72Arg TP53 rs 1042522	$55/74=0,74$ (G)	$19/74=0,26$ (C)	GG: 20 20,3 CC: 2 2,5	CG 15 14,2	ns

B= beobachtete Werte; E= erwartete Werte nach dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Ergebnisse

Tabelle 5.3 Vergleich der Allelenfrequenzen mit denen der NCBI Database bei Europäern

	SNP	Allel	Allelfrequenz	
			NBS-Patienten	NCBI
1	D312N XPD rs 1799793	G	0,66	0,69
		A	0,34	0,31
2	R194W XRCC1 rs1799782	C	0,89	0,91
		T	0,11	0,09
3	R280H XRCC1 rs25489	C	0,97	0,97
		T	0,03	0,03
4	R399Q XRCC1 rs25487	G	0,62	0,74
		A	0,38	0,26
5	Ala9Val MnSOD rs 4880	T	0,43	0,56
		C	0,57	0,44
6	Ile105Val GSTP1 rs 1695	G	0,34	0,37
		A	0,66	0,63
7	N142D GSTO2 rs156697	A	0,68	0,60
		G	0,32	0,4
8	P187S NQO1 rs 1800566	C	0,84	0,78
		T	0,16	0,22
9	Ser326Cys OGG1 rs 1052133	C	0,84	0,78
		G	0,16	0,22
10	M241T XRCC3 rs861539	C	0,7	0,65
		T	0,3	0,35
11	Q356R BRCA1 rs1799950	A	0,93	0,96
		G	0,07	0,04
12	P871L BRCA1 rs 799917	C	0,58	0,62
		T	0,42	0,38
13	N372H BRCA2 rs 144848	A	0,73	0,71
		C	0,27	0,29
14	BCL2 rs 1462129	G	0,59	0,6
		A	0,41	0,4
15	BCL2 rs 1801018	A	0,55	0,53
		G	0,45	0,48
16	Gly393Ser E2F1 rs3213176	G	0,99	0,97
		A	0,01	0,03
17	252A>G CHK2 rs1805129	A	0,97	1,00
		G	0,03	0,00
18	Pro72Arg TP53 rs 1042522	G	0,74	0,77
		C	0,26	0,23

5.1.3 Korrelationen zwischen den Genotypen der Polymorphismen und dem klinischen bzw. zellulären Phänotyp

Das Ziel ist herauszufinden, ob die hier untersuchten Polymorphismen zu dem variablen klinischen Krankheitsverlauf der NBS Patienten (Krebsmanifestation) oder den unterschiedlichen zellulären Charakteristika (p70 Menge, Apoptoserate) beitragen.

5.1.3.1 Krebsmanifestation

Zum vorliegenden Untersuchungszeitpunkt hatten 21 der 37 NBS Patienten einen Krebs entwickelt. 13 davon sind weiblich und 8 männlich. Deshalb wurde Beziehung zwischen den Allelfrequenzen und der Krebsentwicklung untersucht. In einem ersten Vergleich wurde die Häufigkeit sämtlicher Genotypen aller 18 Polymorphismen zwischen Krebspatienten und Nicht-Betroffenen verglichen. Die Auswertung ist im Anhang aufgeführt. Schon der Augenschein zeigt, dass größere Abweichungen nur selten zu finden und als Folge multiplen Testens auch zu erwarten sind. Im Folgenden werden daher nur diejenigen Allelkombination aufgeführt, die gemäß der Literatur ein erhöhtes Risiko bedingen sollten. Tabelle 5.4 zeigt die Krebsentwicklungsraten in Abhängigkeit vom SNP-Genotyp.

Ergebnisse

Tabelle 5.4 Krebsentwicklungsraten und Genotyp

Die statistische Prüfung wurde mit Hilfe des Fisher's Exakt Test durchgeführt.

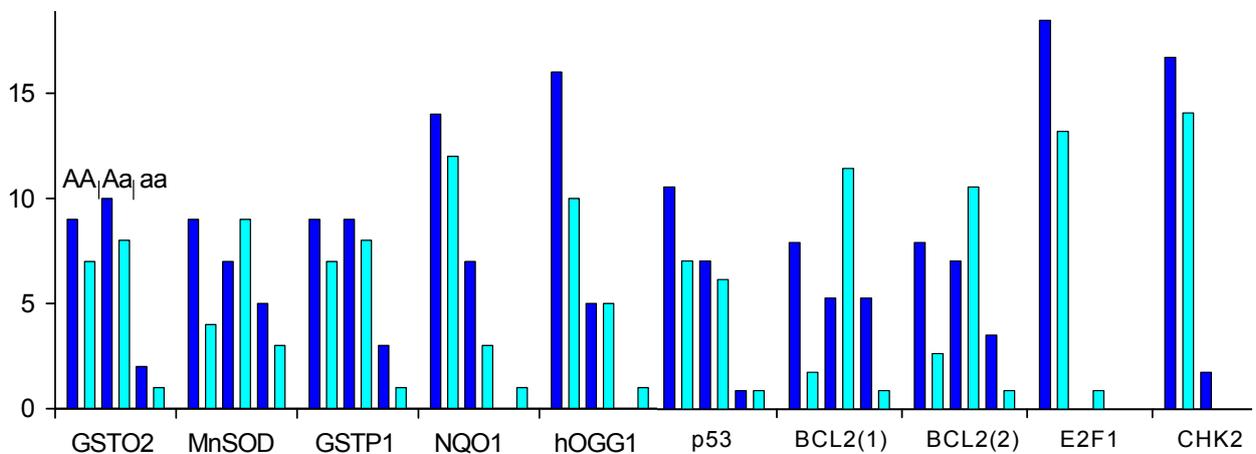
Allel	Krebsanzahl/ Patientenanzahl	P Werte
XPD D312N rs1799793 GG GA+AA	10/18 11/19	ns
XRCC1 R194W rs1799782 CC CT+TT	17/31 4/6	ns
XRCC1 R280H rs25489 CC CT	21/35 0/2	ns
XRCC1 R399Q rs25487 AA+AG GG	9/20 12/17	ns
MnSOD Ala9Val rs4880 CC CT+TT	9/13 12/24	ns
GSTP1 Ile105Val rs1695 AA GG+GA	9/16 12/21	ns
GSTO2 N142D rs156697 AA AG+GG	9/16 12/21	ns
NQO1 P187S rs 1800566 CC CT+TT	14/26 7/11	ns
OGG1 Ser326Cys rs 105233 CC GC+GG	16/26 5/11	ns
XRCC3 M241T rs861539 CC CT+TT	8/17 13/20	ns
BRCA1 Q356R rs1799950 AA AG	17/32 4/5	ns
BRCA1 P871L rs799917		ns

Ergebnisse

CC CT+TT	5/10 16/27	
BRCA2 N372H rs 144848 AA AC+CC	13/22 8/15	ns
BCL2 rs1462129 GG GA+AA	9/12 12/25	ns
BCL2 rs1801018 AA GG+GA	9/11 12/26	ns
E2F1 Gly393Ser rs3213176 GG GA	21/36 0/1	ns
CHK2 252A>G rs1805129 AA AG	20/35 1/2	ns
TP 53 Pro72Arg rs1042522 GG CG+CC	8/15 13/22	ns

In Abb. 5.1 sind für die verschiedenen Gene die Häufigkeiten der einzelnen Genotypen bei den Patienten mit und ohne Krebs graphisch dargestellt.

■ Patienten mit Krebs
■ Patienten ohne Krebs



Ergebnisse

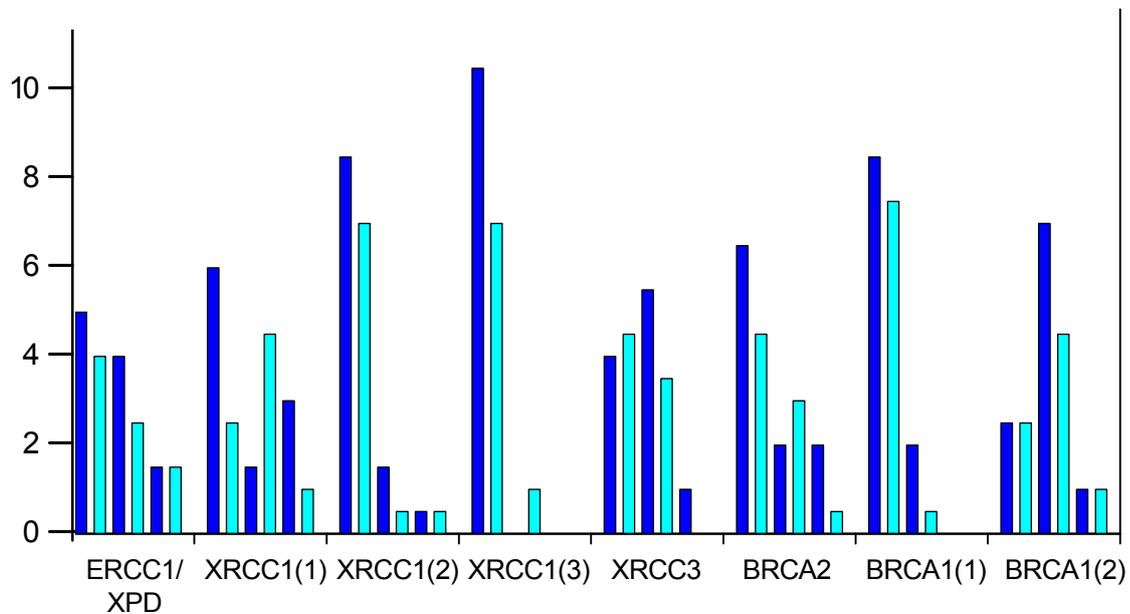


Abbildung 5.1 Graphische Darstellung der Befunde aus Anhang zur Häufigkeit der Polymorphismen bei NBS Patienten mit und ohne Krebs. Für jedes Gen ist die Anzahl der Individuen angegeben, die homozygot für das häufigste Allel, heterozygot und und homozygot für das seltenere Allel sind. Die Y-Achse zeigt die Patientenanzahl.

Die Analyse ergab keine signifikante Assoziation zwischen einem der Polymorphismen und der Krebserkrankung (Fishers t-Test).

In einer weiteren Untersuchung wurden diejenigen Patienten, die bis zum Alter von 12 Jahren an Krebs erkrankt waren (N=13), mit denen verglichen, die älter als 12 Jahre waren und keinen Krebs entwickelt hatten (N=15). Die Gesamtzahl der Patienten ist niedriger als oben, die Diskriminierung zwischen Betroffenen und Nicht-Betroffenen aber deutlicher, da diejenigen, die erst im höheren Alter ein Malignom entwickelten nicht berücksichtigt wurden.

Ergebnisse

Tabelle 5.5 Häufigkeit der Polymorphismen bei NBS Patienten mit Krebs (Alter < 12 Jahre) und ohne Krebs (Alter > 12 Jahre)

Allel	Krebspatienten	Nicht-Betroffenen	P Werte
XPD D312N rs1799793 GG GA+AA	7 6	7 8	ns
XRCC1 R194W rs1799782 CC CT+TT	9 4	13 2	ns
XRCC1 R280H rs25489 CC CT	13 0	13 2	ns
XRCC1 R399Q rs25487 AA+AG GG	8 5	11 4	ns
MnSOD Ala9Val rs4880 CC CT+TT	6 7	3 12	ns
GSTP1 Ile105Val rs1695 AA GG+GA	5 8	6 9	ns
GSTO2 N142D rs156697 AA AG+GG	7 6	7 8	ns
NQO1 P187S rs 1800566 CC CT+TT	8 5	11 4	ns
OGG1 Ser326Cys rs 105233 CC GC+GG	9 4	10 5	ns
XRCC3 M241T rs861539 CC CT+TT	6 7	8 7	ns
BRCA1 Q356R rs1799950 AA AG	10 3	14 1	ns
BRCA1 P871L rs799917			ns

Ergebnisse

CC CT+TT	3 10	4 11	
BRCA2 N372H rs 144848 AA AC+CC	9 4	8 7	ns
BCL2 rs1462129 GG GA+AA	6 7	3 12	ns
BCL2 rs1801018 AA GG+GA	6 7	1 14	0,029
E2F1 Gly393Ser rs3213176 GG GA	13 0	14 1	ns
CHK2 252A>G rs1805129 AA AG	13 0	15 0	ns
TP 53 Pro72Arg rs1042522 GG CG+CC	7 6	8 7	ns

Es wurde keine signifikante Unterschiede in der Häufigkeit der Polymorphismen zwischen Krebspatienten und Nicht-Betroffenen gefunden, mit Ausnahme von BCL2 rs1801018 ($p=0,029$).

5.1.3.2 Entwicklungsalter und Genotyp

Für 20 der 21 NBS Krebspatienten konnte der Zeitpunkt der Krebsmanifestation angegeben werden. Im Durchschnitt betrug dies 11,45 Jahre (95% CI 8,7-14,2). Es wurde überprüft, ob eine Korrelation zwischen den Polymorphismen und dem Krebs-Manifestationsalter besteht (Tab. 5.6).

Ergebnisse

Tabelle 5.6 Häufigkeit der Polymorphismen in Abhängigkeit vom Alter bei der Krebsmanifestation

Allel	SNPs	Entwicklungsalter (M±SD)(Jahre)	P-Wert
XPD D312N GG GA+AA	rs 1799793	9,3±4,7 13,8±6,5	ns
XRCC1 R194W CC CT+TT	rs 1799782	13,1±6,0 6,4±1,3	0,044
XRCC1 R280H CC CT	rs 25489	11,7±6,0	ns
XRCC1 R399Q AA+GA GG	rs 25487	12,7±5,8 11,1±6,6	ns
MnSOD Ala9Val CC CT+TT	rs 4880	11,9±6,2 11,5±6,2	ns
GSTP1 Ile105Val AA GA+GG	rs 1695	11,5±5,5 11,9±6,7	ns
GSTO2 N142D AA AG+GG	rs 156697	10,6±3,3 12,7±7,8	ns
NQO1 P187S CC CT+TT	rs 1800566	12,5±7,0 10,0±2,9	ns
OGG1 Ser326Cys CC GC+GG	rs 105233	12,3±6,8 10,1±2,7	ns
XRCC3 M241T CC CT+TT	rs 861539	10,9±6,4 12,2±5,9	ns
BRCA1 Q356R AA AG	rs 1799950	12,5±6,2 8,5±4,4	ns
BRCA1 P871L CC CT+TT	rs 799917	7,7±3,1 12,4±6,2	ns
BRCA2 N372H AA AC+CC	rs 144848	10,5±5,5 13,3±6,8	ns
BCL2 AA+ GA GG	rs 1462129	12,8±7,3 10,4±4,3	ns
BCL2 AA	rs 1801018	11,4±6,1	ns

Ergebnisse

GA+GG		12,2±6,2	
E2F1 Gly393Ser GG GA	rs 3213176	11,7±6,0	ns
CHK2 252A>G AA AG	rs 1805129	10,9±5,3 18±2,8	ns
TP 53 Pro72Arg GG CG+CC	rs 1042522	11,6±4,5 11,9±8,0	ns

In keinem Fall ergab sich eine signifikante Korrelation zwischen einem Polymorphismus und dem Zeitpunkt der Krebsmanifestation

5.1.3.3 Überleben und Genotyp

Im folgenden Vergleich wird untersucht, ob es eine Korrelation zwischen bestimmten Polymorphismen und der Überlebensdauer (länger oder kürzer als 3 Jahre) nach der Krebsmanifestation gibt.

In zwei Fällen, für das *XPD*- und das *MnSOD*-Gen, ergab sich eine signifikante Korrelationen mit dem Überleben bei den 20 Krebspatienten.

Bei dem *XPD*-Gen handelt es sich um eine Helikase. Der Polymorphismus *XPD* D312N (rs1799793) führt zum Austausch von Asparaginsäure zu Asparagin.

Es zeigte sich, dass der Genotyp AA (Asn/Asn) oder AG (Asn/Asp) häufiger bei den Patienten mit längerer Überlebenszeit auftritt ($p=0,03$, „Fishers two-tailed test“). *MnSOD*, die Mangan Superoxid Dismutase, ist an die zellulären Abwehr gegen reaktive Sauerstoffradikale beteiligt. Hier tritt das T Allel signifikant häufiger bei Patienten mit längerer Überlebenszeit auf.

Da es bei multiplen Testungen auch zufällig zu statistischen Unterschieden kommen kann, sollten diese signifikanten Befunde durch zusätzliche funktionelle Tests überprüft werden. Hierzu wurden lymphoblastoide Zelllinien von jeweils 3 NBS Patienten herangezogen, die hinsichtlich der beiden Polymorphismen die günstigste oder ungünstigste Kombination für das Überleben aufwiesen. Wie aus Tab. 5.8 hervorgeht, waren diese auch hinsichtlich der Überlebensdauer sehr weit auseinander. Dies weist daraufhin, dass beide Polymorphismen möglicherweise einen additiven Effekt ausüben.

Ergebnisse

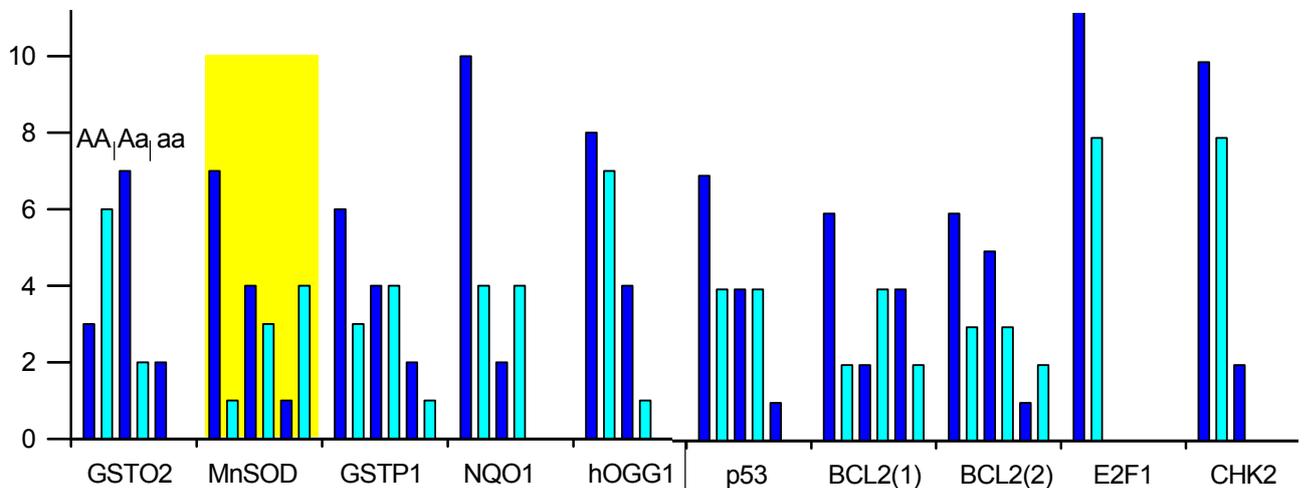
Tabelle 5.7 Überlebensvergleich nach Krebsmanifestation in Abhängigkeit von den Polymorphismen.

Polymorphismus	Überleben		P-Wert
	< 3 Jahre	> 3 Jahre	
XPD D312N rs1799793 GG GA+AA	8 4	1 7	P=0,03
XRCC1 R194W rs1799782 CC CT+TT	9 3	7 1	ns
XRCC1 R280H rs25489 CC CT	12 0	8 0	ns
XRCC1 R399Q rs25487 AA+AG GG	5 7	3 5	ns
MnSOD Ala9Val rs4880 CC CT+TT	7 5	1 7	P=0,046
GSTP1 Ile105Val rs1695 AA AG+GG	6 6	3 5	ns
GST02 N142D rs156697 AA AG+GG	3 9	6 2	ns
NQO1 P187S rs1800566 CC CT+TT	10 2	4 4	ns
OGG1 Ser326Cys rs1052133 CC GC+GG	8 4	7 1	ns
XRCC3 M241T rs861539 CC CT+TT	4 8	4 4	ns
BRCA1 Q356R rs1799950			

Ergebnisse

AA	10	6	ns
AG	2	2	
BRCA1 P871L rs799917			
CC	2	2	ns
CT+TT	10	6	
BRCA2 N372H rs144848			
AA	8	4	ns
AC+CC	4	4	
BCL2 rs1801018			
AA	6	2	ns
AG+GG	6	6	
BCL2 rs1462129			
AA+AG	6	5	ns
GG	6	3	
E2F1 Gly393Ser rs3213176			
GG	12	8	ns
GA	0	0	
CHK2 252A>G rs1805129			
AA	10	8	ns
AG	2	0	
TP53 Pro72Arg rs1042522			
GG	7	4	ns
GC+CC	5	4	

- Patienten mit kürzer als 3 Jahre Überlebensdauer
- Patienten mit länger als 3 Jahre Überlebensdauer



Ergebnisse

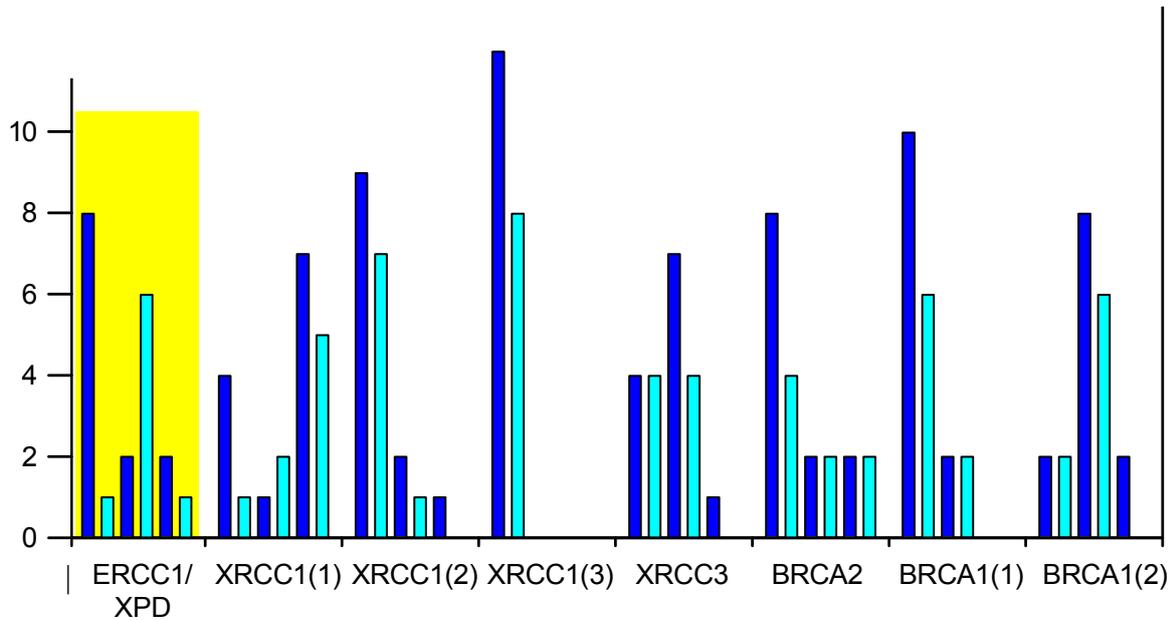


Abbildung 5.2 Graphische Darstellung der Befunde zur Häufigkeit der Polymorphismen bei NBS Krebspatienten in Abhängigkeit von der Überlebensdauer nach Manifestation (länger oder kürzer als 3 Jahre). Für jedes Gen ist die Anzahl der Individuen angegeben, die homozygot für das häufigste Allel, heterozygot und homozygot für das seltenere Allel sind. Die beiden signifikanten Assoziationen sind gelb hervorgehoben. Die Y-Achse zeigt die Patientenanzahl.

Tabelle 5.8 NBS Patienten mit Polymorphismen im *XPD*- und *MnSOD*-Gen, die jeweils die günstigste (Gruppe 2) bzw. ungünstigste Kombination (Gruppe 1) für Überleben nach Krebsmanifestation aufwiesen. Die betreffenden lymphoblastoiden Zelllinien wurden für die funktionellen Untersuchungen eingesetzt.

Gruppe 1	Überleben/Jahre	ERCC2/XPD	MnSOD	Gruppe 2	Überleben/Jahre	ERCC2/XPD	MnSOD
89P0319	0.0	GG (Asp/Asp)	CC (Ala/Ala)	94P0307	13.7	GA (Asp/Asn)	CT (Ala/Val)
96P0182	2.8	GG (Asp/Asp)	CC (Ala/Ala)	RoZd	14.5	GA (Asp/Asn)	TT (Val/Val)
96P0616	0.2	GG (Asp/Asp)	CC (Ala/Ala)	97P0614	12.5	GA (Asp/Asn)	CT (Ala/Val)

5.2 Chromosomanalyse

In dieser Untersuchung wurde analysiert, ob sich die lymphoiden Zelllinien der Gruppen 1 und 2 hinsichtlich ihrer induzierten Chromosomenbrüchigkeit nach Bestrahlung mit 0,5 Gy und 1 Gy unterscheiden. 3 Stunden danach erfolgte die Aufarbeitung. Es wurden daher Zellen ausgewertet, die sich zum Zeitpunkt der Exposition in der G₂-Phase des Zellzyklus befanden. Es wurden jeweils 50 Mitosen analysiert. Bei den Aberrationen wurden Chromatidbrüche von Chromatid-Translokationen unterschieden. Da letztere auf zwei Bruchereignisse zurückgehen wurden sie doppelt gewertet. In zwei Linien der Gruppe 2, 94P0307 und 97P0614, wurden dizentrische Chromosomen gefunden (Abb. 5.4), die offensichtlich auf Telomerfusionen beruhen. Diese treten „spontan“ auf, wenn die Telomere stark verkürzt sind und sind nicht Folge der mutagenen Exposition. Sie wurden daher bei der Analyse nicht berücksichtigt. Bestimmt wurde einmal der prozentuale Anteil aberranter Mitosen und zum anderen der Bruchindex, der sich ergibt, wenn die Gesamtzahl der Brüche durch die Gesamtzahl der untersuchten Mitosen geteilt wird.

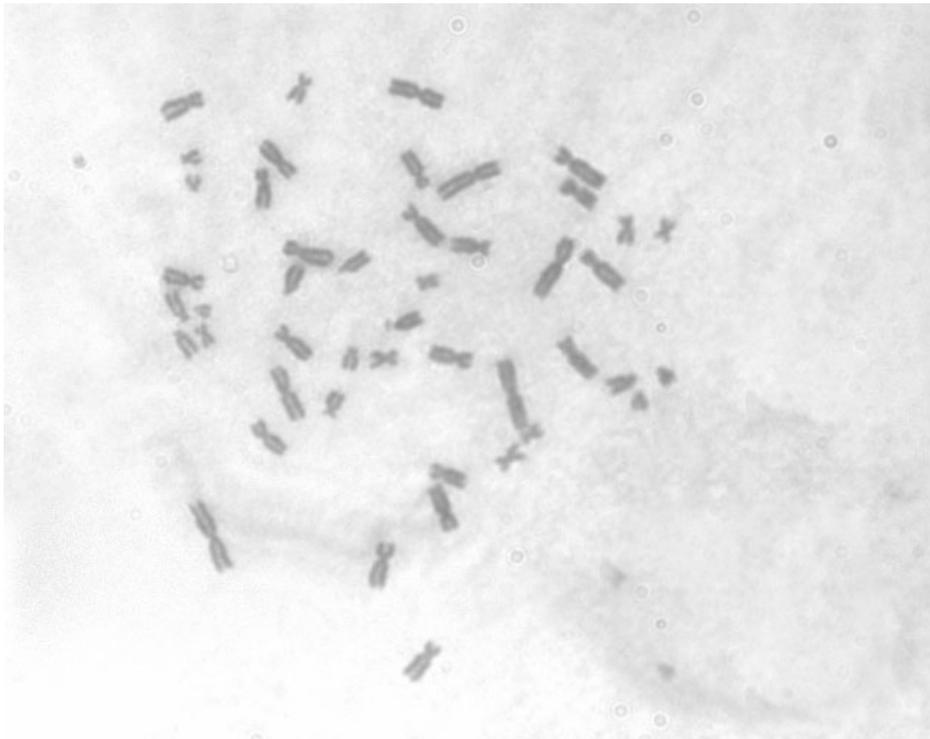


Abbildung 5.3 Unbeschädigte Metaphase
Eine Metaphase mit 46 intakten Chromosomen

Ergebnisse

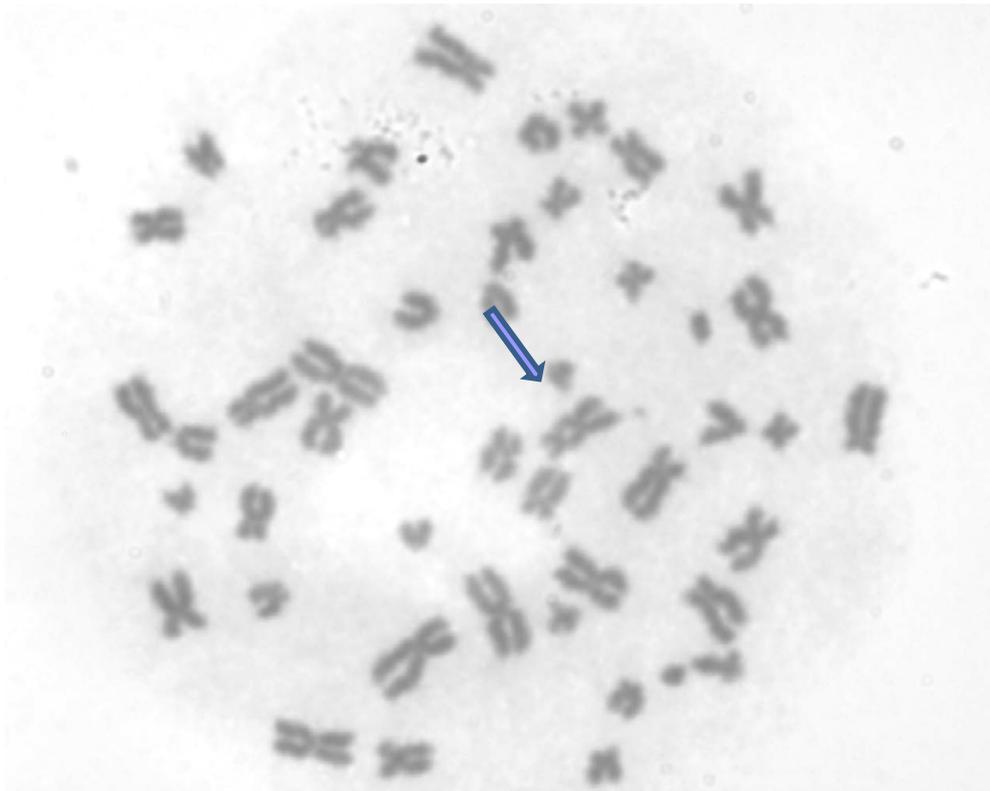


Abbildung 5.4 Metaphase mit dizentrischem Chromosom als Folge einer Telomerfusion (Zelllinie 94P0307)

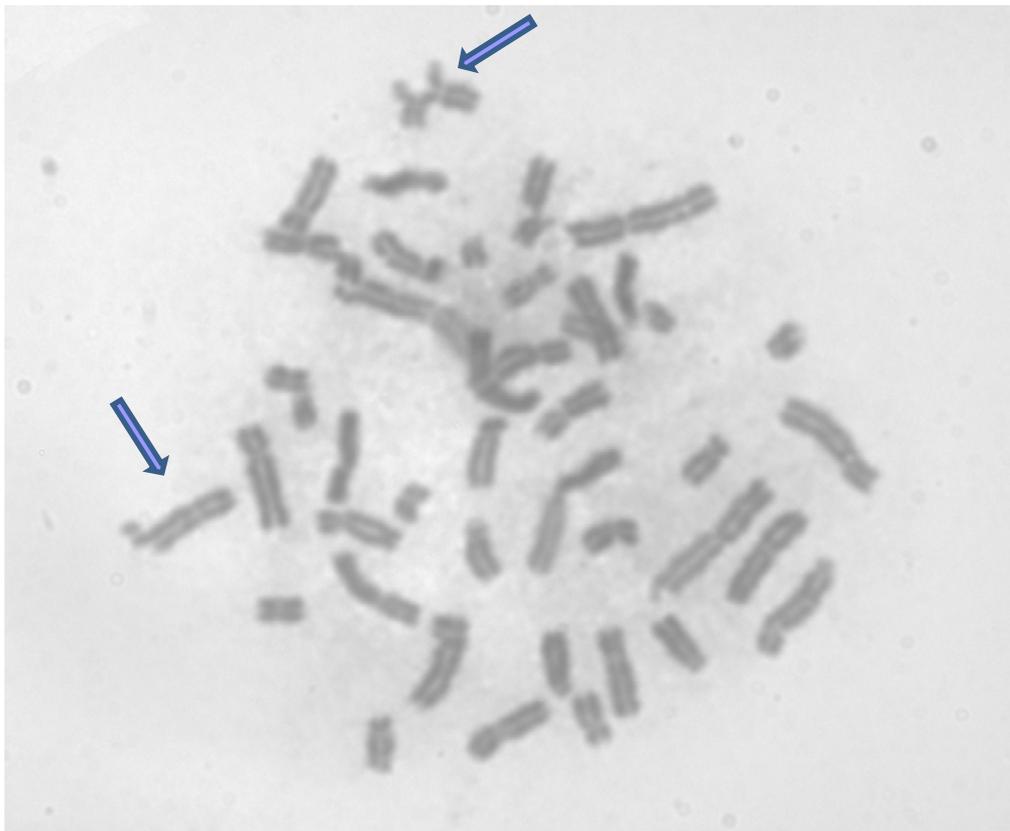


Abbildung. 5.5 Chromosomenaberrationen nach Bestrahlung (94P0307)
a) Chromatidbrüche (mittellinks); b) Chromatidtranslokation (oben)

Ergebnisse

Tabelle 5.9 Auswertung der Chromosombrüchigkeit nach Bestrahlung

	Kontrolle	Gruppe 1			Gruppe 2		
Zahl der aberranten Mitosen (%)	96P0125	95P0182	96P0616	89P0319	97P0614	94P0307	Rozd
Bestrahlung 0 Gy	0	0	2	14	2	0	0
Bestrahlung 0.5 Gy	16	42	38	69	40	42	39
Bestrahlung 1.0 Gy	10	100	42	88	42	72	59
Brüche/Mitosen	96P0125	95P0182	96P0616	89P0319	97P0614	94P0307	Rozd
Bestrahlung 0 Gy	0	0	0,02	0,16	0,04	0	0
Bestrahlung 0.5 Gy	0,2	1,18	0,54	1,42	0,52	1,16	0,48
Bestrahlung 1.0 Gy	0,14	3,5	0,68	2,2	0,66	1,58	0,71

Die Auswertung zeigt, dass sämtliche NBS-Zellen deutlich ($p < 0,05$) strahlenempfindlicher als die Kontrollzellen sind.

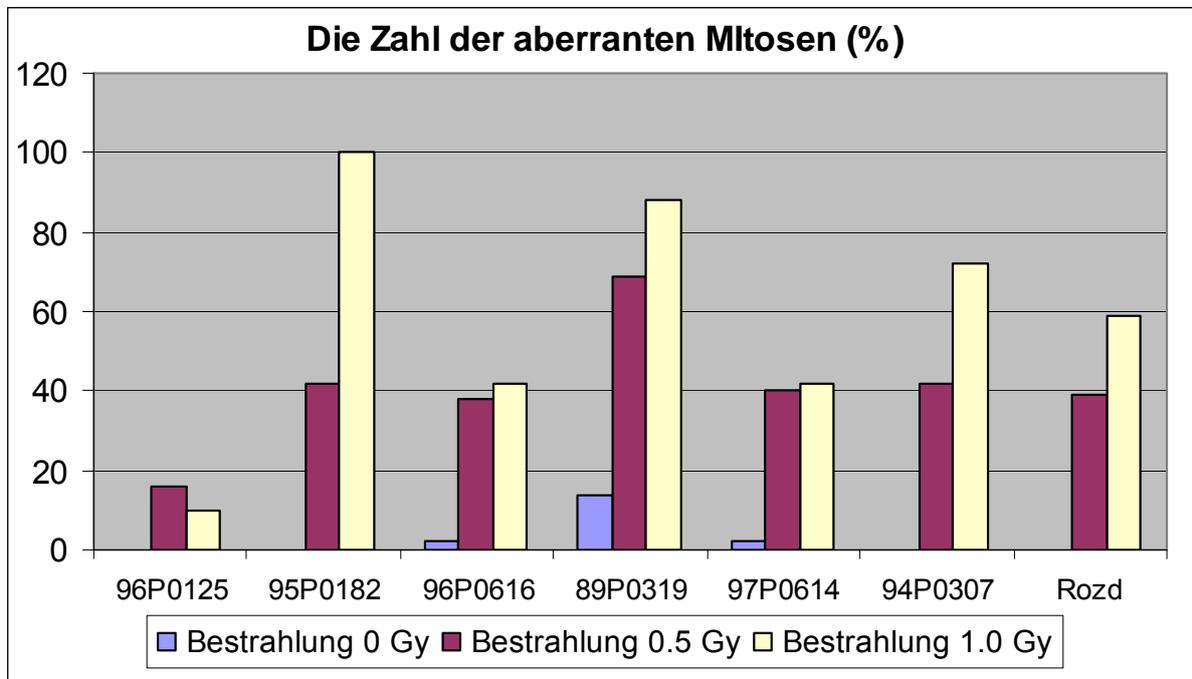


Abbildung 5.6 Häufigkeit aberranter Mitosen nach Bestrahlung

Auf der X-Achse sind die 7 verwendeten Zelllinien zu sehen. Die Y-Achse zeigt den Anteil der aberranten Mitosen in Prozent.

Ergebnisse

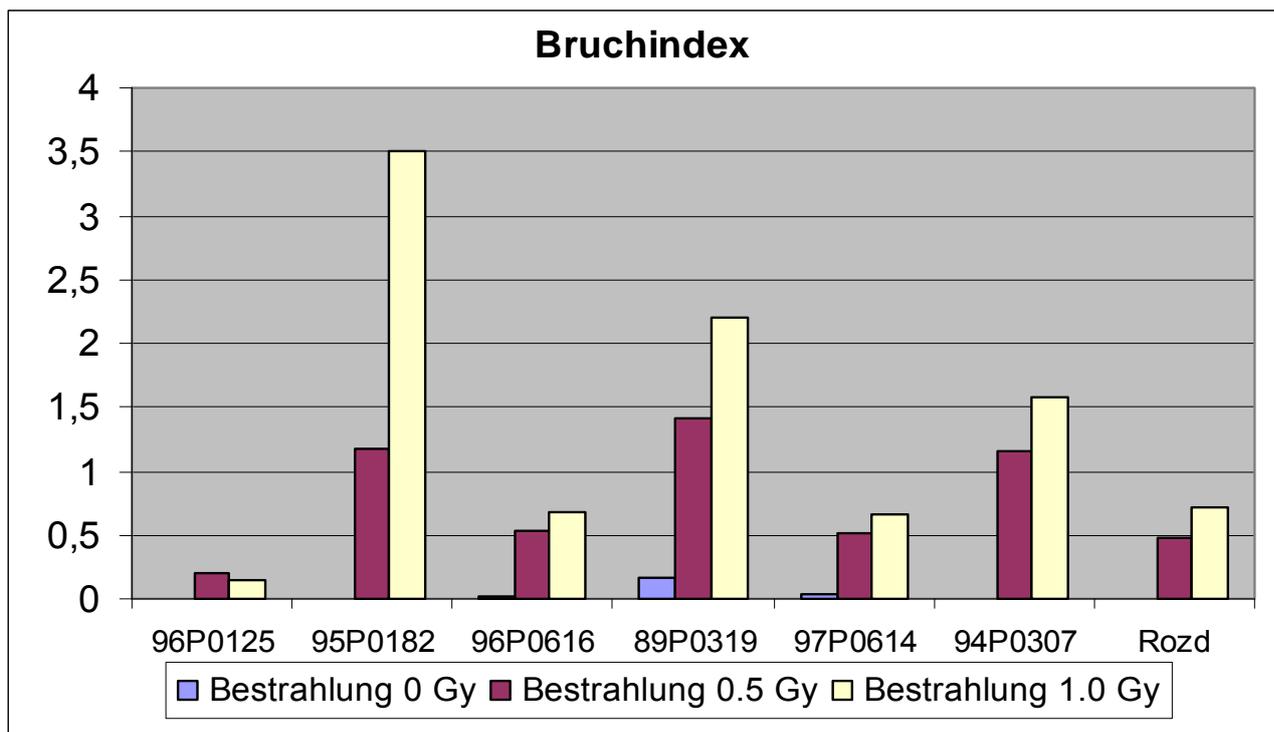


Abbildung 5.7 Darstellung des Bruchindexes nach Bestrahlung
Auf der X-Achse sind die 7 verwendeten Zelllinien zu sehen. Die Y-Achse zeigt die Chromosomenbruchrate.

Wie aus Abb. 5.7 hervorgeht, weisen die NBS Linien deutlich höhere Aberrationsraten als die Kontrolle auf. Zwei Linien von Gruppe 1 sind zudem strahlenempfindlicher als die drei Linien der Gruppe 2, die Diskriminierung ist jedoch unvollständig, da die Linie 96P616 aus Gruppe 1 die niedrigste Aberrationsrate überhaupt aufweist. Stellt man jedoch die Gesamtzahl der induzierten Chromatidbrüche nach 0.5 und 1.0 Gy Bestrahlung der Gruppen 1 und 2 gegenüber (Tab. 5.10), ist der Unterschied signifikant ($p < 0,005$).

Tabelle. 5.10 Vergleich der Gesamtzahl der strahlen-induzierten Chromatidbrüche der NBS Linien der Gruppen 1 und 2.

Die Statistische Prüfung wurde mit Hilfe des chi2 Tests durchgeführt.

Dosis (Gy)	Gruppe 1		Gruppe 2		P
	Chromatidbrüche B	Chromatidbrüche E	Chromatidbrüche B	Chromatidbrüche E	
0,5	157	132,5	108	132,5	0,003
1,0	319	233,5	148	233,5	0,0001

B= beobachtete Werte; E= erwartete Werte

5.3 ATM Phosphorylierung

ATM spielt eine entscheidende Rolle im DNA Reparatur-Pathway und in der zellulären Antwort auf DNA-Schäden. Entscheidend hierfür ist u.a. seine Aktivierung nach mutagener Exposition der Zellen durch Phosphorylierung am Serin-Rest 1981. Das Phospho-ATM kann mittels Immunpräzitation und einem spezifischen Antikörper nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde ein Antikörper eingesetzt, der das gesamte ATM nachweist. Jede Zelllinie wurde mit jeweils mit 0µg/ml, 10 µg/ml und 30 µg/ml Bleomycin für 1 Stunde behandelt (s. 4.4.). Der Nachweis von pATM und ATM wurde mittels Immunpräzitation aus dem Gesamtlisat der LCLs vorgenommen. Die präzipitierten Proteine wurden mittels Gel-Elektrophorese separiert und im Western Blot analysiert. Der Blot wurde auf X-film belichtet. Repräsentative Banden von phospho-ATM und ATM sind in Abb 5. 8 dargestellt.

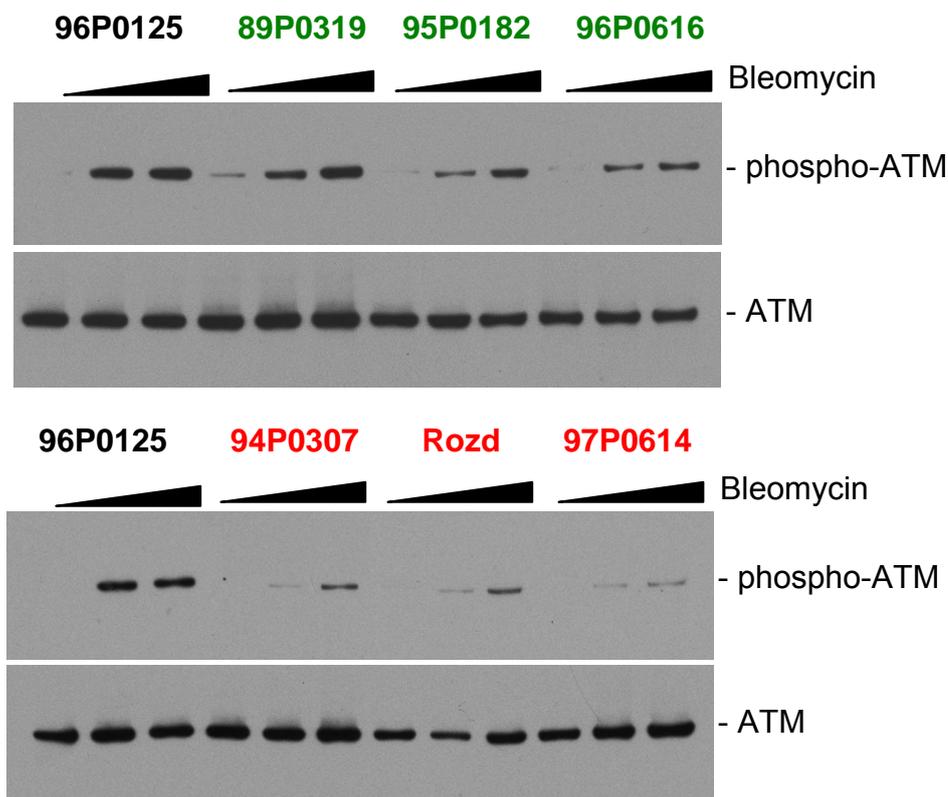


Abbildung 5.8 ATM Phosphorylierung nach Bleomycin Behandlung

Die lymphoiden NBS Zellen wurden mit 0µg/ml, 10 µg/ml und 30 µg/ml Bleomycin für 1 Stunde behandelt. Nach Immunpräzitation wurden das pATM und das ATM mittels Antikörpern im Western blot nachgewiesen. Bei 96P0125 handelt es sich um eine Kontrolle, die homozygot für das wildtyp Allel ist.

grün (rot): lymphoblastoide NBS Zellen mit geringer (langer) Überlebensdauer nach Krebsmanifestation.

Ergebnisse

Um die Menge des pATM zu quantifizieren, wurden die Banden densitometrisch ausgemessen und die einzelnen Werte in Bezug zu dem Wert der ATM Bande (gesamt ATM) der gleichen Probe gesetzt, wobei also ATM als interne Kontrolle diente. Des Weiteren wurden alle pATM/ATM-Werte in Relation zum pATM/ATM Wert der Kontrollzelllinie 96P0125 gesetzt, um einen Vergleichswert zu erhalten. Jede Patientenzelllinie wurde jeweils mindestens dreimal aufgearbeitet. In Tab 5.11 sind die prozentualen pATM Werte dargestellt.

Tabelle 5.11 pATM/ATM Werte in 6 NBS-LCLs nach Bleomycin-Exposition

Jede Untersuchungsreihe wurde mindestens 3 mal wiederholt. Es sind die Mittelwerte mit den Standardabweichungen gezeigt.

	M±SD Zelllinie-ID	Bleomycin (0µg/ml)	Bleomycin (10µg/ml)	Bleomycin (30µg/ml)
Gruppe 1	89P0319	0,17±0,05	0,56±0,01	0,74±0,03
	95P0182	0,04±0,03	0,28±0,07	0,53±0,06
	96P0616	0,07±0,05	0,24±0,06	0,47±0,06
Gruppe 2	94P0307	0,11±0,08	0,29±0,06	0,45±0,02
	Rozd	0,06±0,05	0,30±0,09	0,39±0,04
	97P0614	0,04±0,02	0,16±0,07	0,22±0,08

Ohne Bleomycinbehandlung weisen 5 LCLs keine signifikanten Unterschiede auf, dagegen zeigt die Linie 89P0319 eine signifikant erhöhte Phosphorylierungsrate ($p = 0,005$). Dieser Unterschied bleibt auch nach 10 µg/ml Bleomycinbehandlung gegenüber den Zelllinien 94P0307, Rozd und 97P0614 aus Gruppe 2 (jeweils $p=0,001$, $p=0,006$ und $p=0,0005$) bestehen, nicht jedoch gegenüber den beiden anderen Linien 95P0182 ($p=0,45$, $p=0,46$ und $p=0,23$) und 96P0616 ($p=0,95$, $p=0,84$ und $p=0,08$) aus Gruppe 1. Bei der höchsten Bleomycinkonzentration gibt es signifikante Unterschiede der beiden Zelllinien 89P0319 und 95P0182 zu drei bzw. 2 Linien der Gruppe 2 (jeweils $p < 0,005$ bzw. $p=0,09$, $p=0,02$ und $p=0,005$). Für Linie 96P0616 der Gruppe 1 sind die Werte jeweils $p=0,33$, $p=0,04$ und $p=0,008$.

Die Ergebnisse sind in Abb. 5.10 graphisch dargestellt. Daraus wird ersichtlich, dass bei allen Zellen der Gruppe 1 ATM nach Bleomycinbehandlung stärker phosphoryliert wird als denen der Gruppe 2, wenn auch der Unterschied nicht in jedem Fall signifikant ist.

Ergebnisse

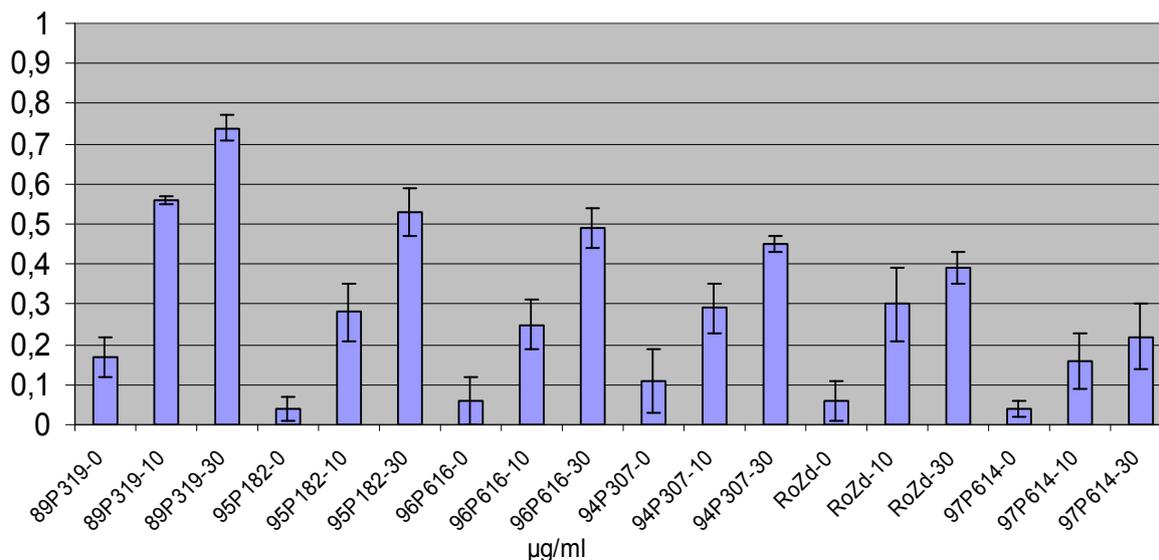


Abbildung 5.9 Phosphorylierung von ATM nach Bleomycin-Behandlung (Mittelwerte±Standardabweichung). Angegeben wird relative Werte bezogen auf die Kontrollzelllinie

5.4 Caspase Aktivierung und Apoptose

Als Maß für die Apoptose kann die Aktivierung der Caspasen angesehen werden. Hierbei werden die Proenzyme proteolytisch zerlegt. Im vorliegenden Fall wird der immunologische Nachweis des Caspase-7 Fragmentes herangezogen. Hierzu wurden die 7 Zelllinien (eine Kontrolllinie und 6 NBS Zelllinien) mit 10µg/ml Bleomycin behandelt und nach 0h, 12h, 24h und 48h aufgearbeitet. Als interne Kontrolle diente Aktin. Jedes Experiment wurde dreimal repliziert. Die Ergebnisse sind in Tab 5.12 zusammengefasst und in Abb. 5.10 graphisch dargestellt.

Tabelle 5.12 Caspase-7 Aktivität nach Bleomycinbehandlung.

Die NBS LCLs wurden mit 10µg/ml Bleomycin behandelt und nach unterschiedlichen Zeiten aufgearbeitet. Die Menge des Caspase-7 Fragmentes wurde mittels Western blot und Densitometrie bestimmt. Die angegebenen Mittelwerte und Standardabweichungen stammen von drei unabhängigen Experimenten.

		0h Bleomycin	12h Bleomycin	24h Bleomycin	48h Bleomycin
Gruppe 1	89P0319	0,65±0,26	0,77±0,22	0,78±0,17	0,90±0,13
	95P0182	0,17±0,14	0,25±0,15	0,46±0,11	0,65±0,10
	96P0616	0,17±0,01	0,24±0,01	0,41±0,05	0,90±0,08
Gruppe 2	94P0307	0,01±0,01	0,02±0,01	0,02±0,01	0,03±0,02
	RoZd	0,13±0,08	0,15±0,01	0,27±0,01	0,36±0,05
	97P0614	0,13±0,03	0,16±0,05	0,36±0,09	0,49±0,05

Ergebnisse

96P0125

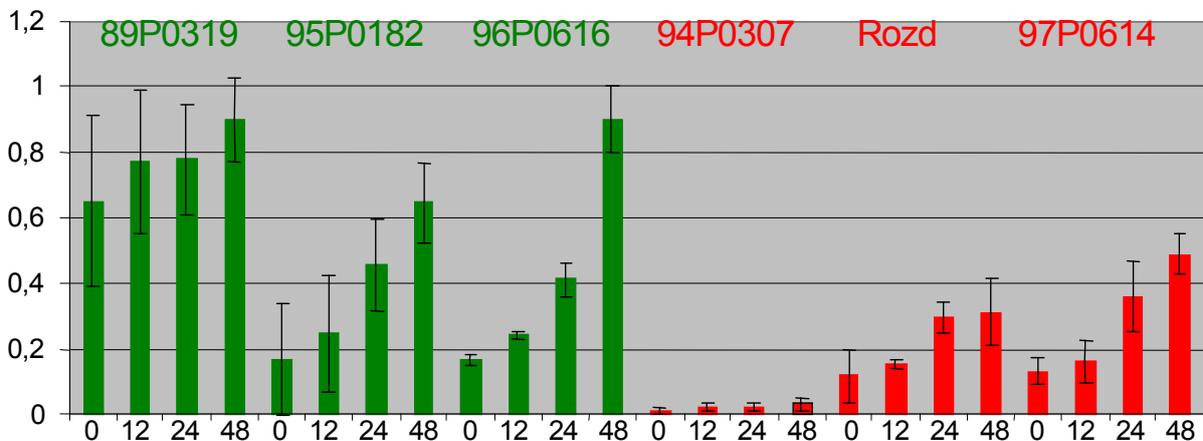
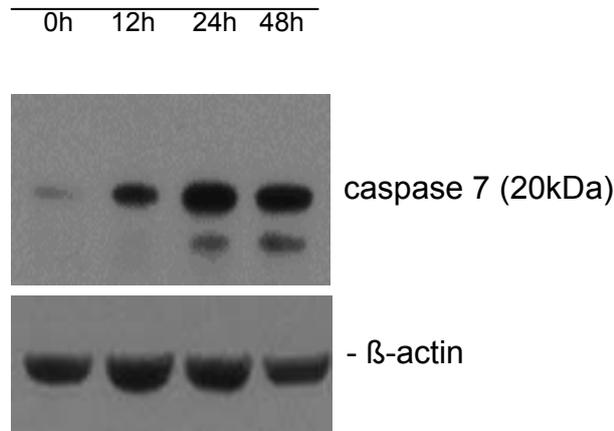


Abbildung 5.10 Caspase-7 Aktivität nach Bleomycinbehandlung.

Die NBS-LCLs wurden mit 10 μ g/ml Bleomycin behandelt und nach unterschiedlichen Zeiten aufgearbeitet. Die Menge des Caspase-7 Fragmentes wurde mittels Western blot (Abbildung oben). Diese zeigt die Caspase-Aktivierung der Kontrollzelllinie) und Densitometrie bestimmt. Die angegebenen Mittelwerte und Standardabweichungen stammen von drei unabhängigen Experimenten. Angegeben wird relative Werte bezogen auf die Kontrollzelllinie

Wie aus Tab. 5.12 und Abb. 5.10 zu erkennen ist, ist bei Linie 89P0319 der Gruppe 1 die Caspase-Aktivierung bereits ohne mutagene Exposition sehr hoch. Im Gegensatz dazu findet bei 94P0307 der Gruppe 2 praktisch keine Aktivierung statt, nicht einmal bei der höchsten Bleomycinkonzentration. Erwähnenswert ist, dass es sich hier um die Zelllinie handelt, bei der es regelmäßig zu Telomerfusionen kommt. Die anderen vier Zelllinien der Gruppen 1 und 2 haben fast gleich große Caspase-Kontrollwerte (jeweils $p=0,36$, $p=0,21$, $p=0,67$, $p=0,73$). Bei der höchsten Bleomycinbelastungszeit wiesen die Zelllinien 89P0319 und 96P0616 der Gruppe 1 hingegen gegenüber allen Zellen der Gruppe 2 signifikante Unterschiede in der Caspase-7 Menge auf ($p \leq 0,02$).

Ergebnisse

Die Abbildung zeigt deutlich, dass die Zellen der Gruppe 1 einheitlich höhere Caspase-Aktivierungswerte als die der Gruppe 2 aufweisen.

Insgesamt haben daher diese vergleichenden Untersuchungen gezeigt, dass sich die Zellen der Gruppe 1 und 2 nicht nur hinsichtlich der Polymorphismen sondern auch übereinstimmend hinsichtlich der ATM-Phosphorylierung und Caspase-Aktivierung unterscheiden. Bezüglich der Chromosomenbruchrate nach Bestrahlung sind zwei Linien der Gruppe 1 deutlich empfindlicher als die der Gruppe 2. In anderen Worten: Die lymphoiden Zellen der Patienten mit der geringsten Überlebensdauer nach Krebsmanifestation weisen mit einer Ausnahme die höchste mutagene Empfindlichkeit auf. Dies geht einher mit einer stärkeren ATM Phosphorylierung und Caspase-7 Aktivierung nach mutagener Exposition gegenüber den Zellen der Patienten mit besonders langer Überlebensdauer.

6. Diskussion

In der vorliegenden Studie wurde untersucht, ob Polymorphismen in Genen, die an verschiedenen DNA Reparaturprozessen, der Zellzykluskontrolle und der Apoptose sowie der Detoxifizierung von Sauerstoffradikalen beteiligt sind, Einfluss auf die klinische Variabilität des Nijmegen Breakage Syndroms haben. In Abb. 6.1 ist für diese Gene (mit Ausnahme von MnSOD) das komplexe Netzwerk der Protein-Protein Interaktionen wiedergegeben. Diese Darstellung ist stark vereinfacht, da die vielen anderen, mit dem MRN-Komplex interagierenden, Proteine weggelassen wurden, so wurde z. B. der enge Bezug zwischen NBS und ATM ganz ausgeklammert .

Sauerstoff Detoxifizierung

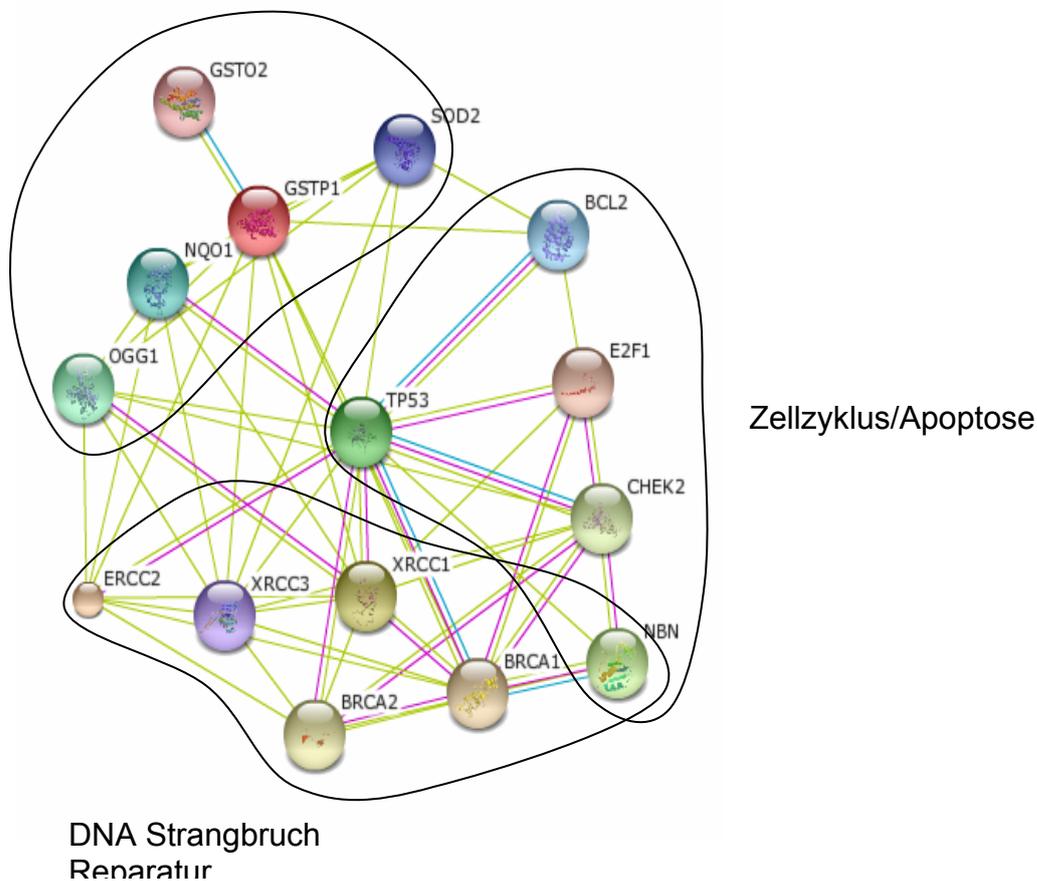


Abbildung 6.1 Bekannte und vermutete Protein-Protein Interaktionen für NBS (NBN) in der DNA Schadensantwort (<http://string.embl.de>)

Die Abbildung lässt die vielfältigen Rückkoppelungsprozesse nur erahnen, verdeutlicht aber, dass der Ausfall eines Proteins durch ein anderes zumindest teilweise kompensiert werden kann. Dies dient der Aufrechterhaltung der

Homöostase und unterstreicht, dass nicht zu erwarten ist, dass jeder Polymorphismus einen signifikanten Effekt ausübt.

6.1 Assoziationsanalysen zwischen den Polymorphismen und verschiedenen klinischen Phänotypen

Die Verteilung der Allelenkombinationen der verschiedenen Polymorphismen bei den 37 NBS Patienten zeigt keine Abweichungen von dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Ebenso stimmt die Häufigkeit der einzelnen Allele dieser osteuropäischen Individuen gut mit der bei Europäern überein. Die größten Abweichungen gibt es für den R399Q Polymorphismus des *XRCC1*-Gens sowie den Ala9Val Polymorphismus des *MnSOD*-Gens. Die Unterschiede sind jedoch nicht signifikant. Sie wären für diese Assoziationsstudie aber auch nicht relevant, da es hier nur um Unterschiede zwischen den NBS Patienten mit unterschiedlichem klinischen Phänotyp geht.

6.1.1 Auswirkung von Polymorphismen in DNA Reparaturgenen (NER)

Nukleotide-excision repair (NER) spielt eine entscheidende Rolle bei der Reparatur von DNA Schäden, wie UV-induzierten Dimeren und cross-links. Daran beteiligt ist XPD (*Xeroderma pigmentosum complementation group D*), eine Helicase und eine von 10 Untereinheiten des TFIIH (*Transcription initiation factor by RNA polymerase II*). Viele Studien haben gezeigt, dass Polymorphismen im XPD-Gen mit dem Krebsrisiko und der Apoptoserate korreliert sind [63]. Der hier untersuchte Polymorphismus, D312N, führt zum Austausch von Asparaginsäure zu Asparagin. Wie aus den Tabellen 5.4 bis 5.6 zu erkennen ist, gab es keine signifikanten Unterschiede in den Genotypenfrequenzen zwischen den Patienten mit und ohne Krebs bzw. mit dem Alter bei der Krebsmanifestation. Hingegen zeigte sich eine Korrelation mit der Überlebensdauer nach Krebsmanifestation. In der Gruppe mit kurzer Überlebenszeit nach Krebsmanifestation weisen 8 von 12 die Kombination GG (Asp/Asp) auf, in der Gruppe mit längerer Überlebenszeit hingegen nur 1 von 8 ($p=0,028$).

Die Ergebnisse zur Rolle dieses Polymorphismus für die Krebshäufigkeit ist widersprüchlich. So beschrieben Vogel et al., dass die AA und AG Genotypen ein 1,9-fach erhöhtes Risiko für ein Basalzellkarzinom aufweisen [64]. Zhou et al. fanden ein

Diskussion

1,47 fach erhöhtes Krebsrisiko für AA gegenüber GG [65]. Hingegen gaben Butkiewicz et al. an, dass der GG Genotyp ein fast 2 fach erhöhtes Risiko für Lungenkrebs gegenüber AG/AA bedingt [66]. Rybicki et al beschrieben, dass das A Allel einen günstigen Einfluss auf das Prostatakarzinom hat [67]. Einschränkend muss zu diesen Untersuchungen gesagt werden, dass die Fallzahlen recht klein sind und „recording bias“ nicht ausgeschlossen werden kann. In einer sorgfältigen Meta-Analyse, die sich auf neun Fall-Kontroll Studien mit ausreichenden Fallzahlen stützt, hat sich keine klare Assoziationen zwischen Lungenkrebs und dem XPD Polymorphismus gefunden [68].

Im Prinzip bestätigt dies die vorliegenden Ergebnisse, bei denen ebenfalls keine Korrelation mit der Krebsrate und dem Krebs-Manifestationsalter gefunden wurde. Nach Clarkson gab es zudem keinen zuverlässigen Hinweis, dass dieser Polymorphismus überhaupt einen Einfluss auf die DNA Reparatur hat [69].

Base-excision repair (BER) ist ein weiterer wichtiger DNA Reparaturprozess, bei dem geschädigte Basen ersetzt werden. Hierbei spielt XRCC1 (*X-ray cross-complementing group 1*) eine wichtige Rolle. Es bindet an die DNA Ligase III, die DNA Polymerase β und die poly (ADP-ribose) Polymerase und ist ein wichtiges *scaffold Protein* [70-73]. Hierbei sind 3 Polymorphismen R194W, R208H und R399Q in vielen Studien untersucht worden.

In der vorliegenden Arbeit konnte für keinen dieser Polymorphismen ein Einfluss auf den klinischen NBS Phänotyp gezeigt werden. Die publizierten Ergebnisse über deren Beziehung zum Krebsrisiko sind inkonsistent. Eine große populations-basierte Fall-Kontroll Studie in den USA ergab eine positive Assoziation zwischen dem R194W T-Allel (Trp) und *B-cell NHL* [74]. Dagegen konnten Zhang et al. keine Assoziationen zum Brustkrebsrisiko finden, auch nicht für den Q399R Polymorphismus [75]. Joseph et al. fanden eine Assoziation zwischen dem T-Allel des R194W Polymorphismus und ALL in einer indischen Population [76]. Hingegen scheint dieses Allel einen schützenden Effekt gegenüber kindlicher ALL in der Thaische Population aufzuweisen [77]. Ob es sich hierbei um ethnisch begründete reale Unterschiede oder um falsch positive Befunde handelt, ist schwer zu entscheiden.

Der XRCC1 R280H Polymorphismus betrifft die mit der DNA Polymerase β interagierende Domäne. In der vorliegenden Studie ist kein Bezug dieses Polymorphismus mit der Krebsmorbidity und –mortality gefunden worden. In anderen Studien zeigte die 280 His Variante ein 4-5 fach erhöhtes Risiko für Brustkrebs [78]. Auch Pachkowski et al. beschrieben eine positive Assoziation zwischen XRCC1 R280H Genotypen und Brustkrebs [79]. Shen et al. und Liu et al. hingegen haben keine Korrelation mit dem Risiko für das *non-Hodgkins Lymphom* gefunden [80, 81].

Am Beispiel des XRCC1 R399Q Polymorphismus lassen sich erhebliche ethnische Häufigkeitsunterschiede illustrieren. So lag Homozygotie für AA bei 22% der NBS Patienten, also Personen slawischer Herkunft, vor und ebenso bei einer indischen Kontrollpopulation [76], jedoch bei 25% einer thaischen [77] und 43% einer türkischen Population [82]. In unserer Studie konnte keine Korrelation mit dem NBS Phänotyp gefunden werden. Ebenso haben Kim et al. keine Assoziation zwischen dem XRCC1 R399Q Polymorphismus und DLBCL (*diffuse large B-cell lymphoma*) gefunden. Sie konnten den drei XRCC1 Polymorphismen (R194W, R280H, R399Q) aber sieben mögliche Haplotypen in der koreanischen Bevölkerung zuordnen. Haplotyp A, der alle drei wildtyp Allele (Arg-Arg-Arg) aufwies, war der häufigste in der Kontrollpopulation, hingegen nur der zweithäufigste bei Patienten mit DLBCL und ist mit einem signifikant niedrigeren Risiko für DLBCL (OR 0,6, 95% CI 0,15-0,81, P=0,001) assoziiert (protektiver Effekt). Der Haplotyp B (Arg-Arg-Gln) findet sich gehäuft unter DLBCL Patienten und ist mit erhöhtem Krebsrisiko verknüpft (OR 1,38, 95% CI 1,05-1,8, P=0,019) [83].

6.1.2 Auswirkung von Polymorphismen in DNA Reparaturgenen (HR)

Das XRCC3-Gen ist in die Reparatur mittels homologer Rekombination involviert. Der M241T Polymorphismus zeigt erhebliche ethnische Unterschiede. Hier lag der TT Genotyp bei 11% vor, was den Verhältnissen bei Kaukasiern mit 12,4% entspricht. Dagegen liegt dieser Wert bei Amerikanern afrikanischer Herkunft bei 4,6%, und bei Asiaten bei 0,2%. Ob diese Unterschiede auf unterschiedlichen Selektionskräften oder genetischer Drift beruhen, ist nicht geklärt. Im vorliegenden Fall ergab sich keine Assoziation mit dem NBS Phänotyp.

Auch für diesen Polymorphismus sind die Ergebnisse zur Krebs susceptibility unterschiedlich. So fanden El-Zein et al. in Kombination mit den XRCC1/XRCC3 Polymorphismen eine positive Assoziation zu Morbus Hodgkin [84] und Deligezer et al. für das folliculäre Lymphom [85]. Hill et al. hingegen fanden keine Assoziation mit dem Non-Hodgkin Lymphom [74].

BRCA1 ist in zahlreiche zelluläre Vorgänge eingeschlossen und interagiert mit vielen Proteinen, insbesondere auch solchen der DNA Reparatur. Es ist daher zu erwarten, dass die Polymorphismen im *BRCA1*-Gen auch viele zelluläre Prozesse und klinische Phänotypen modifizieren können. Es gibt 10 Polymorphismen im *BRCA1*-Gen mit Allelfrequenzen über 5% in Kaukasiern, von denen 5 (Q356R, P871L, E1038G, K1183R, und S1613G) zum Austausch einer Aminosäure führen. Diese Polymorphismen sind mit Ausnahme von Q356R gekoppelt und bilden einen Haplotyp. Deshalb braucht man nur 2 SNPs zu analysieren. Hier haben wir die Polymorphismen Q356R und P871L untersucht, jedoch keinen Bezug zur phänotypischen Variabilität bei den NBS Patienten gefunden.

Durocher et al. beschrieben eine Assoziation zwischen P871L und Brust/Ovarialkrebs [86], Janezic mit Ovarialkarzinom [87]. Dunning et al. hingegen fanden keine Korrelation zwischen den P871L Genotypen und dem Risiko für Brust- oder Ovarialkarzinom [88]. Ebenso beobachteten Robert et al. keine Assoziation zwischen P871L Genotypen und Ovarialkarzinom [89].

Im *BRCA2*-Gen ist N372H der einzige aminosäure-ändernde Polymorphismus. Es ergab sich keine Korrelationen mit den NBS Phänotypen.

Healey und Spurdle et al. fanden bei Homozygoten für das H Allel ein erhöhtes Risiko für Brustkrebs [90, 91], eine australische für Ovarialkarzinom [92].

6.1.3 Auswirkung von Polymorphismen in Genen gegen oxidativen Stress

Reaktionsfähige Radikale, speziell des Sauerstoffs (ROS), können das Erbgut schädigen und spielen dadurch eine wichtige Rolle in der Karzinogenese. Bei der Abwehr von oxidativem Stress werden ROS enzymatisch reduziert, z. B. durch die Superoxiddismutase, die Katalase und die Glutathion-Peroxidase. Melchers et al.

Diskussion

zeigten an *null mutanten Nbn^{ins-6/del-6}* Mauszellen, dass es nach Bleomycin Behandlung zu einer 4 fachen Steigerung der intrazelluläre ROS kommt [32]. Daraus kann man folgern, dass Faktoren, die den oxidativen Stress in NBS Zellen beeinflussen, auch Auswirkungen auf die NBS Pathologie haben können.

Die *Mangan Superoxid Dismutase* (MnSOD) ist das primäre Oxidationsschutzmittel im Mitochondrium. Clair et al. beschrieben, dass Überexpression von MnSOD in Krebszellen die Zellteilung *in vitro* sowie das Krebswachstum *in vivo* verringern [93]. Oberley et al. klassifizierten *MnSOD* sogar als Tumor-Suppressor Gen [94].

Der best-untersuchte Polymorphismus in diesem Gen ist Ala9Val. Es scheint, dass dieser Polymorphismus die Sekundärstruktur des Proteins ändert, wodurch der Transport in die mitochondriale Matrix und damit die Aktivität der MnSOD beeinflusst wird [95]. Die Allelfrequenz für das Alanin-Allel beträgt 12% bei Japanern [96], hingegen 41-55% bei Kaukasiern.

Bastaki et al. haben gezeigt, dass Personen mit TT Homozygotie (Val/Val) und TC Heterozygote (Val/Ala) eine höhere MnSOD Aktivität als Individuen mit CC Homozygotie (Ala/Ala) aufweisen [97]. Dies bestätigen Robert et al an menschlichen Hepatocyten [98]. Dieser Sachverhalt könnte eine einfache Erklärung für die hier gefundene signifikant längere Überlebenszeit nach Krebsmanifestation bei den NBS Patienten mit den TT und TC Genotypen sein.

In Übereinstimmung mit dieser Annahme weisen Homozygote für das C Allel (Ala/Ala) ein erhöhtes Prostatakrebsrisiko auf [99]. Ambrosion et al. fanden, dass homozygote Frauen für das C Allel ein 4 fach erhöhtes Brustkrebsrisiko besitzen [100], was von Mitrunen et al. im Prinzip bestätigt wurde [101]. Dagegen beschrieben Wang et al. ein statistisch signifikant erhöhtes Lungenkrebsrisiko beim Val/Val Genotyp [102].

Welche Erklärung kann es für die widersprüchlichen Befunde geben? Die Mitochondrien sind die Hauptquelle der ROS in den Zellen. Diese werden von MnSOD in H₂O₂ umgewandelt, das anschließend durch die mitochondriale Glutathion Peroxidase zu Wasser detoxifiziert wird. Hierbei ist das Gleichgewicht beider enzymatischer Reaktionen von entscheidender Bedeutung. Wenn die MnSOD

Diskussion

Aktivität zu gering ist, gibt es zu viele schädigende ROS, wenn sie zu hoch ist, wird besonders viel des reaktiven H_2O_2 gebildet. Es hängt dann von der Glutathion Peroxidase ab, was damit geschieht. Möglicherweise ist dieser doppelte Effekt bei veränderter MnSOD Aktivität die Ursache für die widersprechenden Resultate.

Die Glutathion S-Transferasen (GST) stellen eine Familie von multifunktionellen Enzymen dar, die eine zentrale Rolle in der Detoxifikation vieler Umweltkarzinogene einnehmen. Polymorphismen dieser GST Enzyme können daher die Krebs susceptibilität beeinflussen. So baut GSTP1 einige Karzinogene, wie Benzpyrene und Acrolein, ab. Das *GSTP1*- Gen weist mehrere Polymorphismen auf. Der *GSTP1* Polymorphismus des Codons 105 (A zu G) führt zum Austausch von Isoleuzin zu Valin und verändert dadurch die katalytische Kapazität.

In der vorliegenden Studie hat der Ile105Val Polymorphismus keine Assoziation mit dem klinischen Phänotyp der NBS Patienten gezeigt. Dagegen beschrieben Maja et al., dass Träger zweier Polymorphismen (sog. Variante B - Val105/Ala114) mit erhöhtem Risiko für ALL bei Kindern assoziiert ist. Dagegen scheint die Variante C (Val105Val114) einen protektiven Effekt zu haben [103]. Es gibt auch Hinweise, dass bestimmte *GSTP1* Genotypen mit soliden Tumoren assoziiert sind [104].

Von den beiden GST Omegas weist nur GSTO2 einen Polymorphismus, N142D, auf [105]. Dieser zeigte keinen Bezug zum NBS Phänotyp. Auch in anderen Untersuchungen konnten nur nicht-signifikante Assoziationen mit verschiedenen soliden Tumoren gefunden werden [106, 107].

NQO1 (NAD(P)H:Quinon Oxidoreductase 1) entgiftet Quinone durch Umwandlung in Hydroquinone und wirkt damit als Antioxidant. Es ist ubiquitär exprimiert. Bisher sind mehr als 93 SNPs in diesem Gen identifiziert worden. Der meist untersuchte Polymorphismus ist P187S, der mit einem Austausch von Prolin zu Serin einhergeht und infolge der Instabilität des Proteins mit dem Verlust der enzymatischen Aktivität verbunden ist [108]. Die enzymatische Aktivität der homozygoten Variante (T/T) ist praktisch nicht nachweisbar.

Die T Allelfrequenz ist 0,16 bei Kaukasiern und damit genau so hoch wie unter den NBS Patienten, bei Chinesen hingegen 0,49. In der vorliegenden Arbeit fand sich

Diskussion

keine Assoziation mit dem NBS Phänotyp. In einer kanadischen Studie wiesen C/T Heterozygote ein erhöhtes Risiko für kindliche ALL auf [109], in einer türkischen Population ein verringertes Risiko [110]. Wiemels et al. fanden keine Assoziation der Heterozygoten mit speziellen Unterformen kindlicher ALL [111].

Das *OGG1*- Gen kodiert für eine DNA Glykosylase, die die Läsion 7,8-Dehydro-8-Oxiguanin (8-oxoG) entfernt. Der Polymorphismus in diesem Gen, Ser326Cys, führt zur Aminosäuresubstitution von Serin zu Cystein. Die G (Cys) Allelfrequenz variiert von 23%-41% bei Kaukasiern, hier waren es nur 16% und beträgt 40%-60% in Asien [112]. In der vorliegenden Studie fand sich keine Assoziation mit dem NBS Phänotyp. Dagegen fand sich in einer Reihe von Fall-Kontroll Studien, dass das G Allel mit erhöhtem Risiko für verschiedene solide Tumore einhergeht (z.B. Lungen-, Magen und Prostatakarzinom [113-115]).

6.1.4 Auswirkung von Polymorphismen in Genen des Apoptose Pathway

BCL2 und seine Familienmitglieder sind die Schlüsselregulatoren des programmierten Zelltods (Apoptose). Rassool et al. wiesen nach, dass im Mausmodell die Überexpression mutierter menschlicher *NRAS* und *BCL2* Gene das Leukämierisiko erhöht [116]. Wir untersuchten zwei SNPs (rs1462129, rs1801018) im *BCL2*-Gen, wobei sich kein Bezug zu Krebsmorbidity und –mortalität bei den NBS Patienten ergab. Bemerkenswert ist, dass das *BCL2*-Gen bei AML Patienten oftmals hoch-reguliert wird, was auch als prognostischer Marker nach Chemotherapie diskutiert wird. Patienten mit hohen *BCL2* Proteinwerten zeigten dabei signifikant kürzere Überlebenszeiten nach AML Chemotherapie [117].

Park et al konnten keine Assoziation zwischen dem *BCL2* Polymorphismus und der Chemotherapie von diffusem B-Zell Lymphom finden [118].

Das p53 Protein nimmt eine Schlüsselstellung bei der zellulären Reaktion auf DNA Schäden durch Zellzyklusarrest und Apoptose ein. Der allgemein untersuchte Polymorphismus in p53 ist Arg72Pro (R72P), der den Spleiss-Prozess beeinflusst [119]. Er zeigt keine Assoziation mit der klinischen Variabilität bei NBS.

Ebenso findet sich keine Assoziation mit dem 252A>G Polymorphismus im *CHK2*-Gen (Checkpoint Kinase 2), das in die ATM-abhängige Apoptose einbezogen ist [120].

Diskussion

E2F1 ist ein Mitglied der E2F Familie von Transkriptionsfaktoren, die die Expression von zahlreichen Zellzyklus-Genen regulieren. E2F1 induziert die p53-abhängige Apoptose. Hier wurde der Gly393Ser Polymorphismus untersucht. Allerdings war nur ein Patient heterozygot, sodass keine Aussage möglich ist. Auch Vassilis et al. konnten keine Korrelation mit dem Lungenkrebsrisiko finden [121].

Insgesamt wurden hier 18 Polymorphismen analysiert. Wenn man die vielen, sich zum Teil widersprechenden, Literaturbefunde betrachtet und die relativ geringe Zahl hier analysierter Patienten berücksichtigt, überrascht nicht, dass 16 mal keine Assoziation zu Krebsentwicklung und Überleben bei NBS Patienten gefunden wurde. Bemerkenswert ist hingegen, dass 2 Polymorphismen (XPD D312N, MnSOD Ala9Val) statistisch signifikante Korrelationen mit dem Krebsüberleben bei den 37 NBS-Patienten aufwiesen. Bei multiplen Testungen sind falsch positive Befunde nicht auszuschliessen. Es stellte sich daher die Frage, ob diese signifikanten Befunde durch funktionelle Untersuchungen erhärtet werden können. Hierzu bieten sich Untersuchungen an lymphoblastoiden Zellen ausgewählter Patienten an. Diese Zelllinien leiten sich von Lymphozyten (B-Lymphozyten) her, wie auch die Lymphome der NBS Patienten. Zudem sollten die Linien von jeweils drei Patienten stammen, die sich hinsichtlich der Überlebensdauer nach Krebsmanifestation unterschieden und für beide Polymorphismen die günstigste bzw. ungünstigste Kombination aufwiesen.,

Bei XPD D312N hatten die Patienten mit Genotyp AA oder AG länger als mit GG überlebt, bei MnSOD , die mit TT länger als die mit CC oder T/C. Tab. 5.8 gibt die Charakteristika der 6 untersuchten lymphoiden Zelllinien wieder.

Zelllinien von Patienten mit kurzer Überlebenszeit (Gruppe 1)

89P0319 (Überleben 0 Jahre), 96P0616 (0.2 Jahre), 95P0182 (2,8 Jahre)

Zelllinien von Patienten mit langer Überlebenszeit (Gruppe 2)

97P0614 (Überleben 12.5 Jahre), 94P0307 (Überleben 13,7 Jahre), Rozd (Überleben 14,5 Jahre)

Analysiert wurde die Strahlenempfindlichkeit (Chromosomeninstabilität), die ATM Aktivierung und die Caspaseexpression in den 6 NBS Zelllinien und einer Kontrolle (96P0125).

6.2 Funktionelle Untersuchungen an NBS Zelllinien

NBS gehört zu den Chromosomeninstabilitätssyndromen. Im Prinzip liegt einem Chromatidbruch ein DNA-Doppelstrangbruch (DSB) zugrunde. Die NBS-Zellen sind daher besonders empfindlich gegenüber Agentien, die DSBs induzieren, wie ionisierende Strahlen oder Bleomycin und Camptotecin [50].

2 der 3 Linien von Gruppe 1 wiesen die höchste Strahlenempfindlichkeit auf, eine, 96P0616, hingegen ist nicht von denen der Gruppe 2 verschieden. Insgesamt kann man von einer Tendenz sprechen, wonach mit geringerer Überlebensdauer die Strahlenempfindlichkeit zunimmt. Dies würde der Erwartung entsprechen, da als Folge des Krebses ja eine Chemotherapie angewandt wird, die ihrerseits genetische Schäden verursacht.

Der ATM Phosphorylierung kommt eine entscheidende Rolle in der DSB Reparatur, der Zellzyklus-Checkpointkontrolle und der Apoptose zu. Bei der höchsten Bleomycindosis lagen sämtliche ATM Phosphorylierungswerte der Gruppe 1 über denen der Gruppe 2, auch wenn der Unterschied nicht in jedem Fall signifikant ist. Überraschenderweise ist daher längere Überlebensdauer mit geringerer ATM Phosphorylierung korreliert. Hierfür bietet sich jedoch eine einfache Erklärung an: Da die Zellen der Gruppe 1 besonders stark geschädigt werden, ist auch die ATM Aktivierung entsprechend erhöht. In Übereinstimmung damit weist die Zelllinie 96P0616 mit der geringsten Strahlenempfindlichkeit der Gruppe 1 auch die niedrigste ATM Phosphorylierung dieser Gruppe auf.

Wie in der Einführung schon vorgestellt wurde, gibt es zwei Apoptose Initiationswege, beide aktivieren die Caspase-Kaskade, welche zum apoptotischen Tod führt [122].

Thierfelder et al. zeigten, dass in lymphoblastoiden NBS Zellen bis zu 40 fache Unterschiede in der Apoptose Kapazität gefunden werden. Die hier analysierten Linien gehören alle zu denen mit geringer Apoptoserate [123]. Auch hier zeigten die Linien der Gruppe 1 übereinstimmend höhere Caspase-7 Aktivierungswerte als die der Gruppe 2. Die Erklärung kann wie bei der ATM Phosphorylierung gegeben werden: Die erhöhte Initiation der Apoptose ist Ausdruck der erhöhten Schädigungsrate. Dies erklärt jedoch nicht, weshalb bei der Linie 89P0319 die Caspase-7 Aktivierung schon ohne jede mutagene Exposition auf hohem Niveau

Diskussion

erfolgte. Diese Zelllinie zeigte auch die höchsten Werte der ATM Phosphorylierung und die höchste Bruchrate nach Bestrahlung mit 0,5 Gy. Sie zeigte aber auch ein besonders schlechtes Wachstum. Dieses schlechte Wachstum dürfte ein Hinweis auf das „spontane“ Absterben (Apoptose) der Zellen sein und könnte so die stete Caspase-7 Aktivierung verständlich machen.

Erklärungsbedürftig ist aber auch, weshalb die Linie 94P0307 aus der Gruppe 2 praktisch überhaupt keine Caspase-7 Aktivierung aufwies. Hier war die hohe Rate der Telomerfusionen auffällig, was auf stark verkürzte Telomere hinweist. Normalerweise ist dies ein Zeichen für seneszente Zellen, die durch Apoptose eliminiert werden. Die fehlende Caspase-7 Aktivierung könnte daher das „Überleben“ dieser Zellen ermöglichen. Wie es zur Abschaltung dieses an sich grundlegenden Mechanismus gekommen ist, kann im Rahmen dieser Dissertation nicht geklärt werden. Lakhani et al. stellten Caspase-7 knock-out Mäuse her, die fast den gleichen Phänotyp wie Wildtypmäuse zeigten [124]. Er vermutet, dass die nah verwandte Caspase-3 den Funktionsausfall der Caspase-7 kompensiert hat. Auch dies ist ein Beispiel für die zu Beginn der Diskussion erwähnte „Pufferung“ besonders wichtiger Stoffwechselprozesse. Zudem wird dadurch die Schwierigkeit des Wirkungsnachweises von Polymorphismen unterstrichen, wenn sogar der komplette Ausfall eines Gens funktionell recht gut kompensiert werden kann.

Die Patienten mit der längsten Überlebensdauer waren heterozygot oder homozygot für den XPD Polymorphismus Asp/Asn bzw Asn/Asn. Auch die Untersuchungen von Seker et al. ergaben, dass die Homozygoten Asn/Asn mit dem niedrigen Risiko für Krebs assoziiert sind [125]. Die Untersuchungen von Seker et al. an lymphoblastoiden Zelllinien nach UV oder IR Bestrahlung ergaben zudem, dass Homozygote für Asn/Asn die höchste apoptotische Aktivierung zeigten, bei unseren Zelllinien waren dies jedoch die Homozygoten Asp/Asp.

Möglicherweise verhalten sich NBS-Zellen anders als die von Seker et al. untersuchten Zellen. So zeigten Thierfelder et al., dass die Apoptose in NBS Zellen über den p53-unabhängigen Pathway verläuft [123].

Diskussion

Die vorliegenden Befunde zum MnSOD Polymorphismus haben, wie bereits gesagt, ergeben, dass die NBS Patienten mit längerer Überlebenszeit Homozygotie für Val/Val oder Heterozygotie Ala/Val aufweisen, was mit höherer Aktivität des Enzyms einhergeht [97] und eine Erklärung für den guten Krankheitsverlauf sein könnte.

Insgesamt sprechen die vorliegenden Befunde dafür, dass die Einteilung in Gruppe 1 und 2 mit kurzer oder langer Überlebenszeit nach Krebsmanifestation anhand der beiden signifikant assoziierten Polymorphismen auch eine Entsprechung auf zellulärer Ebene hat. Beide Gruppen liessen sich anhand der getesteten Parameter auch funktionell unterscheiden. Dabei dürfte die Korrelation zwischen höherer Strahlenempfindlichkeit und geringerer Überlebensdauer das primäre Merkmal, die stärkere ATM-Phosphorylierung und Caspase-7 Aktivierung eher die Folge davon sein.

7. Zusammenfassung

Das Nijmegen Breakage Syndrom (NBS) gehört zu den Chromosomeninstabilitätssyndromen, deren zugrunde liegenden Gene direkt oder indirekt in die DNA Reparatur einbezogen sind. Die Betroffenen weisen eine starke Empfindlichkeit gegenüber ionisierenden Strahlen und ein extremes Lymphomrisiko auf. Ihre Lebenserwartung ist stark verringert. In über 90% aller NBS-Patienten findet sich die gleiche 5bp Deletion, 657del5, im *NBS*-Gen. Dennoch zeigt sich eine erhebliche klinische Variabilität, z. B. hinsichtlich des Zeitpunktes der Tumormanifestation und der Überlebensdauer danach. Dies kann auf genetischen Faktoren oder Umwelteinflüssen beruhen.

Es wurde eine Assoziationsanalyse an 37 homozygoten, klinisch gut charakterisierten, NBS-Patienten vorgenommen und der Einfluss von 18 Polymorphismen in solchen Genen untersucht, die in die DNA Reparatur, den Abbau des oxidativen Stresses und die Apoptose involviert sind (*XPB*, *XRCC1*, *XRCC3*, *BRCA1*, *BRCA2*, *MnSOD*, *GSTP1*, *GSTO2*, *NQO1*, *OGG1*, *BCL2*, *p53*, *E2F1* und *CHK2*). Als klinische Bezugsgrößen dienten das Tumorrisiko, das Manifestationsalter der Tumoren sowie die Lebensdauer der NBS Patienten.

Für Polymorphismen zweier Gene, *XPB* und *MnSOD*, fanden sich signifikante Assoziationen mit der Überlebensdauer nach Tumormanifestation. Da bei multiplen Testungen falsch positive Befunde nicht auszuschliessen sind, wurde überprüft, ob diese signifikanten Befunde durch funktionelle Untersuchungen erhärtet werden können. Hierfür bieten sich lymphoblastoide Zelllinien an, da sich diese von Lymphozyten (B-Lymphozyten) herleiten, wie auch die Lymphome der NBS Patienten. Von jeweils drei Patienten mit kurzer (Gruppe 1) bzw. langer (Gruppe 2) Überlebensdauer, die die ungünstigste bzw. günstigste Allelenkombination zeigten, wurden die lymphoblastoiden Zellen im Hinblick auf ihre strahleninduzierte Chromosomeninstabilität, die ATM Phosphorylierung und die Caspase-7 Aktivierung nach Bleomycinbehandlung untersucht.

Zusammenfassung

2 der 3 Linien von Gruppe 1 wiesen die höchste Strahlenempfindlichkeit auf, sodass man insgesamt von einer Tendenz sprechen kann, wonach mit geringerer Überlebensdauer die Strahlenempfindlichkeit zunimmt.

Der ATM Phosphorylierung kommt eine entscheidende Rolle in der DSB Reparatur, der Zellzyklus-Checkpointkontrolle und der Apoptose zu. Bei der höchsten Bleomycindosis lagen sämtliche ATM Phosphorylierungswerte der Gruppe 1 über denen der Gruppe 2, auch wenn der Unterschied nicht in jedem Fall signifikant ist.

Als Mass für die Induktion der Apoptose wurde die Aktivierung der Caspase-7 bestimmt. Auch hier zeigten die Zellen der Gruppe 1 die höchsten Werte. Überraschenderweise ist daher längere Überlebensdauer mit geringerer ATM Phosphorylierung und niedrigerer Caspase-7 Aktivierung korreliert. Hierfür bietet sich jedoch eine einfache Erklärung an: Da die Zellen der Gruppe 1 besonders stark geschädigt werden, ist auch die ATM und Caspase-7 Aktivierung entsprechend erhöht.

Bei einer NBS Zelllinie, 89P0319, erfolgte die Caspase-7 Aktivierung schon ohne jede mutagene Exposition auf hohem Niveau. Diese Zelllinie zeigte auch die höchsten Werte der ATM Phosphorylierung und die höchste Bruchrate nach Bestrahlung mit 0,5 Gy. Sie zeigte aber auch ein besonders schlechtes Wachstum. Dieses schlechte Wachstum dürfte ein Hinweis auf das „spontane“ Absterben (Apoptose) der Zellen sein und könnte so die stete Caspase-7 Aktivierung verständlich machen.

Eine andere Linie, 94P0307, aus der Gruppe 2 wies praktisch keine Caspase-7 Aktivierung auf. Hier war die hohe Rate von Telomerfusionen auffällig, was auf stark verkürzte Telomere hinweist. Normalerweise ist dies ein Zeichen für seneszente Zellen, die durch Apoptose eliminiert werden. Die fehlende Caspase-7 Aktivierung könnte daher das „Überleben“ dieser Zellen ermöglichen. Wie es zur Abschaltung dieses an sich grundlegenden Mechanismus gekommen ist, konnte im Rahmen dieser Dissertation nicht geklärt werden.

Insgesamt sprechen die vorliegenden Befunde dafür, dass die Einteilung in Gruppe 1 und 2 mit kurzer oder langer Überlebenszeit nach Krebsmanifestation anhand der

Zusammenfassung

beiden signifikant assoziierten Polymorphismen auch eine Entsprechung auf zellulärer Ebene hat. Beide Gruppen liessen sich anhand der getesteten Parameter auch funktionell unterscheiden. Dabei dürfte die Korrelation zwischen höherer Strahlenempfindlichkeit und geringerer Überlebensdauer das primäre Merkmal, die stärkere ATM-Phosphorylierung und Caspase-7 Aktivierung eher die Folge davon sein.

Bei der vorliegenden Dissertation handelt es sich um die erste Assoziationsstudie zum klinischen Bild des Nijmegen Breakage Syndroms. Die Befunde werden im Zusammenhang mit entsprechenden Untersuchungen an anderen Krebspatienten diskutiert.

8. Anhang

Tabelle 8.1 Absolute Anzahl Patienten mit den angegebenen Genotypen an den untersuchten SNPs im Vergleich zum Krebsvorkommen.

SNP	Patienten mit Krebs	Krebsfreie Patienten	SNP	Patienten mit Krebs	Krebsfreie Patienten
GSTO2 rs156697			Chk2 rs1805129		
GG	9	7	AA	19	16
GA	10	8	AG	2	0
AA	2	1	GG	0	0
MnSOD rs4880			XPD rs1799793		
CC	9	4	GG	10	8
CT	7	9	AG	8	5
TT	5	3	AA	3	3
GSTP1 rs1695			XRCC1 rs25487		
AA	9	7	GG	12	5
AG	9	8	GA	3	9
GG	3	1	AA	6	2
NQO1 rs1800566			XRCC1 rs1799782		
CC	14	12	CC	17	14
CT	7	3	CT	3	1
TT	0	1	TT	1	1
hOGG1 rs1052133			XRCC1 rs25489		
CC	16	10	CC	21	14
GC	5	5	CT	0	2
GG	0	1	TT	0	0
TP53 rs1042522			XRCC3 rs861539		
GG	12	8	CC	8	9
CG	8	7	CT	11	7
CC	1	1	TT	2	0
BCL2 rs1801018			BRCA2 rs144848		
AA	9	2	AA	13	9
AG	6	13	AC	4	6
GG	6	1	CC	4	1
BCL2 rs1462129			BRCA1 rs1799950		
GG	9	3	AA	17	15
AG	8	12	AG	4	1
AA	4	1	GG	0	0
E2F1 rs3213176			BRCA1 rs799917		
GG	21	15	CC	5	5
GA	0	1	CT	14	9
AA	0	0	TT	2	2

9. Literaturverzeichnis

1. Sperling, K., *Sonderforschungsbereich für Humangenetik-Die molekulare Antwort auf ein vor 80 Jahren in Berlin gegründetes Krankheitskonzept*. In: Humboldt Spektrum, 2005. **2**: p. 4-9.
2. Varon, R., et al., *Clinical ascertainment of Nijmegen breakage syndrome (NBS) and prevalence of the major mutation, 657del5, in three Slav populations*. Eur J Hum Genet, 2000. **8**(11): p. 900-2.
3. *Nijmegen breakage syndrome. The International Nijmegen Breakage Syndrome Study Group*. Arch Dis Child, 2000. **82**(5): p. 400-6.
4. Kracker, S., et al., *Nibrin functions in Ig class-switch recombination*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(5): p. 1584-9.
5. Reina-San-Martin, B., et al., *Genomic instability, endoreduplication, and diminished Ig class-switch recombination in B cells lacking Nbs1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(5): p. 1590-5.
6. Dumon-Jones, V., et al., *Nbn heterozygosity renders mice susceptible to tumor formation and ionizing radiation-induced tumorigenesis*. Cancer Res, 2003. **63**(21): p. 7263-9.
7. Seemanova, E., et al., *Familial microcephaly with normal intelligence, immunodeficiency, and risk for lymphoreticular malignancies: a new autosomal recessive disorder*. Am J Med Genet, 1985. **20**(4): p. 639-48.
8. Chrzanowska, K.H., et al., *Eleven Polish patients with microcephaly, immunodeficiency, and chromosomal instability: the Nijmegen breakage syndrome*. Am J Med Genet, 1995. **57**(3): p. 462-71.
9. Taalman, R.D., et al., *Hypersensitivity to ionizing radiation, in vitro, in a new chromosomal breakage disorder, the Nijmegen Breakage Syndrome*. Mutat Res, 1983. **112**(1): p. 23-32.
10. Carney, J.P., et al., *The hMre11/hRad50 protein complex and Nijmegen breakage syndrome: linkage of double-strand break repair to the cellular DNA damage response*. Cell, 1998. **93**(3): p. 477-86.
11. Matsuura, S., et al., *Positional cloning of the gene for Nijmegen breakage syndrome*. Nat Genet, 1998. **19**(2): p. 179-81.
12. Varon, R., et al., *Nibrin, a novel DNA double-strand break repair protein, is mutated in Nijmegen breakage syndrome*. Cell, 1998. **93**(3): p. 467-76.
13. Saar, K., et al., *The gene for the ataxia-telangiectasia variant, Nijmegen breakage syndrome, maps to a 1-cM interval on chromosome 8q21*. Am J Hum Genet, 1997. **60**(3): p. 605-10.
14. Falck, J., J. Coates, and S.P. Jackson, *Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage*. Nature, 2005. **434**(7033): p. 605-11.
15. Cerosaletti, K.M. and P. Concannon, *Nibrin forkhead-associated domain and breast cancer C-terminal domain are both required for nuclear focus formation and phosphorylation*. J Biol Chem, 2003. **278**(24): p. 21944-51.
16. Difilippantonio, S., et al., *Role of Nbs1 in the activation of the Atm kinase revealed in humanized mouse models*. Nat Cell Biol, 2005. **7**(7): p. 675-85.
17. Gatei, M., et al., *ATM-dependent phosphorylation of nibrin in response to radiation exposure*. Nat Genet, 2000. **25**(1): p. 115-9.
18. Wu, X., et al., *ATM phosphorylation of Nijmegen breakage syndrome protein is required in a DNA damage response*. Nature, 2000. **405**(6785): p. 477-82.
19. Maraschio, P., et al., *A novel mutation and novel features in Nijmegen breakage syndrome*. J Med Genet, 2001. **38**(2): p. 113-7.

Literaturverzeichnis

20. Resnick, I.B., et al., *Nijmegen breakage syndrome: clinical characteristics and mutation analysis in eight unrelated Russian families*. J Pediatr, 2002. **140**(3): p. 355-61.
21. New, H.V., et al., *Nijmegen breakage syndrome diagnosed as Fanconi anaemia*. Pediatr Blood Cancer, 2005. **44**(5): p. 494-9.
22. Varon, R., et al., *Mild Nijmegen breakage syndrome phenotype due to alternative splicing*. Hum Mol Genet, 2006. **15**(5): p. 679-89.
23. Tanzanella, C., et al., *Chromosome instability and nibrin protein variants in NBS heterozygotes*. Eur J Hum Genet, 2003. **11**(4): p. 297-303.
24. Digweed, M., A. Reis, and K. Sperling, *Nijmegen breakage syndrome: consequences of defective DNA double strand break repair*. Bioessays, 1999. **21**(8): p. 649-56.
25. Maser, R.S., R. Zinkel, and J.H. Petrini, *An alternative mode of translation permits production of a variant NBS1 protein from the common Nijmegen breakage syndrome allele*. Nat Genet, 2001. **27**(4): p. 417-21.
26. Demuth, I., et al., *An inducible null mutant murine model of Nijmegen breakage syndrome proves the essential function of NBS1 in chromosomal stability and cell viability*. Hum Mol Genet, 2004. **13**(20): p. 2385-97.
27. Kobayashi, J., et al., *NBS1 localizes to gamma-H2AX foci through interaction with the FHA/BRCT domain*. Curr Biol, 2002. **12**(21): p. 1846-51.
28. Desai-Mehta, A., K.M. Cerosaletti, and P. Concannon, *Distinct functional domains of nibrin mediate Mre11 binding, focus formation, and nuclear localization*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(6): p. 2184-91.
29. Yuan, Z., et al., *SIRT1 regulates the function of the Nijmegen breakage syndrome protein*. Mol Cell, 2007. **27**(1): p. 149-62.
30. Zhu, J., et al., *Targeted disruption of the Nijmegen breakage syndrome gene NBS1 leads to early embryonic lethality in mice*. Curr Biol, 2001. **11**(2): p. 105-9.
31. Kruger, L., et al., *Cancer incidence in Nijmegen breakage syndrome is modulated by the amount of a variant NBS protein*. Carcinogenesis, 2007. **28**(1): p. 107-11.
32. Melchers, A., et al., *A systematic proteomic study of irradiated DNA repair deficient Nbn-mice*. PLoS One, 2009. **4**(5): p. e5423.
33. Jiricny, J., *The multifaceted mismatch-repair system*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(5): p. 335-46.
34. David, S.S., V.L. O'Shea, and S. Kundu, *Base-excision repair of oxidative DNA damage*. Nature, 2007. **447**(7147): p. 941-50.
35. Hoeijmakers, J.H., *Genome maintenance mechanisms for preventing cancer*. Nature, 2001. **411**(6835): p. 366-74.
36. San Filippo, J., P. Sung, and H. Klein, *Mechanism of eukaryotic homologous recombination*. Annu Rev Biochem, 2008. **77**: p. 229-57.
37. Lieber, M.R., *The mechanism of human nonhomologous DNA end joining*. J Biol Chem, 2008. **283**(1): p. 1-5.
38. Wu, Y., S. Xiao, and X.D. Zhu, *MRE11-RAD50-NBS1 and ATM function as co-mediators of TRF1 in telomere length control*. Nat Struct Mol Biol, 2007. **14**(9): p. 832-40.
39. Slijepcevic, P., *The role of DNA damage response proteins at telomeres--an "integrative" model*. DNA Repair (Amst), 2006. **5**(11): p. 1299-306.
40. Olson, E., et al., *The Mre11 complex mediates the S-phase checkpoint through an interaction with replication protein A*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(17): p. 6053-67.

Literaturverzeichnis

41. Dupre, A., L. Boyer-Chatenet, and J. Gautier, *Two-step activation of ATM by DNA and the Mre11-Rad50-Nbs1 complex*. Nat Struct Mol Biol, 2006. **13**(5): p. 451-7.
42. Lavin, M.F., *ATM and the Mre11 complex combine to recognize and signal DNA double-strand breaks*. Oncogene, 2007. **26**(56): p. 7749-58.
43. Durocher, D., et al., *The molecular basis of FHA domain:phosphopeptide binding specificity and implications for phospho-dependent signaling mechanisms*. Mol Cell, 2000. **6**(5): p. 1169-82.
44. Kobayashi, J., et al., *NBS1 and its functional role in the DNA damage response*. DNA Repair (Amst), 2004. **3**(8-9): p. 855-61.
45. Zhang, Y., et al., *NBS1 knockdown by small interfering RNA increases ionizing radiation mutagenesis and telomere association in human cells*. Cancer Res, 2005. **65**(13): p. 5544-53.
46. Majno, G. and I. Joris, *Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death*. Am J Pathol, 1995. **146**(1): p. 3-15.
47. Thompson, C.B., *Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease*. Science, 1995. **267**(5203): p. 1456-62.
48. Nicholson, D.W. and N.A. Thornberry, *Caspases: killer proteases*. Trends Biochem Sci, 1997. **22**(8): p. 299-306.
49. Cohen, G.M., *Caspases: the executioners of apoptosis*. Biochem J, 1997. **326** (Pt 1): p. 1-16.
50. Digweed, M. and K. Sperling, *Nijmegen breakage syndrome: clinical manifestation of defective response to DNA double-strand breaks*. DNA Repair (Amst), 2004. **3**(8-9): p. 1207-17.
51. Zhang, Y., et al., *The effects of NBS1 knockdown by small interfering RNA on the ionizing radiation-induced apoptosis in human lymphoblastoid cells with different p53 status*. Toxicol Lett, 2007. **171**(1-2): p. 50-9.
52. Sagan, D., et al., *Enhanced CD95-mediated apoptosis contributes to radiation hypersensitivity of NBS lymphoblasts*. Apoptosis, 2007. **12**(4): p. 753-67.
53. Collins, A., *Approaches to the identification of susceptibility genes*. Parasite Immunol, 2009. **31**(5): p. 225-33.
54. Altshuler, D., M.J. Daly, and E.S. Lander, *Genetic mapping in human disease*. Science, 2008. **322**(5903): p. 881-8.
55. Katrin., H., S. H.H., and R. A., *Genkartierung in Isolatpopulationen*. Medizinische Genetik, 2000: p. 428-437.
56. Ott, J. and A. Bhat, *Linkage analysis in heterogeneous and complex traits*. Eur Child Adolesc Psychiatry, 1999. **8 Suppl 3**: p. 43-6.
57. Pearson, T.A. and T.A. Manolio, *How to interpret a genome-wide association study*. Jama, 2008. **299**(11): p. 1335-44.
58. Spielman, R.S., R.E. McGinnis, and W.J. Ewens, *Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM)*. Am J Hum Genet, 1993. **52**(3): p. 506-16.
59. Cardon, L.R. and L.J. Palmer, *Population stratification and spurious allelic association*. Lancet, 2003. **361**(9357): p. 598-604.
60. Mitchell, A.A., D.J. Cutler, and A. Chakravarti, *Undetected genotyping errors cause apparent overtransmission of common alleles in the transmission/disequilibrium test*. Am J Hum Genet, 2003. **72**(3): p. 598-610.
61. Breslow, N.E. and N.E. Day, *Statistical methods in cancer research. Volume II--The design and analysis of cohort studies*. IARC Sci Publ, 1987(82): p. 1-406.

Literaturverzeichnis

62. Doll, R., *Cohort Studies: History of the Method 1. Prospektive cohort studies*. 2001.
63. Mohrenweiser, H.W. and I.M. Jones, *Variation in DNA repair is a factor in cancer susceptibility: a paradigm for the promises and perils of individual and population risk estimation?* *Mutat Res*, 1998. **400**(1-2): p. 15-24.
64. Vogel, U., et al., *Polymorphisms of the DNA repair gene XPD: correlations with risk of basal cell carcinoma revisited*. *Carcinogenesis*, 2001. **22**(6): p. 899-904.
65. Zhou, W., et al., *Gene-environment interaction for the ERCC2 polymorphisms and cumulative cigarette smoking exposure in lung cancer*. *Cancer Res*, 2002. **62**(5): p. 1377-81.
66. Butkiewicz, D., et al., *Genetic polymorphisms in DNA repair genes and risk of lung cancer*. *Carcinogenesis*, 2001. **22**(4): p. 593-7.
67. Rybicki, B.A., et al., *DNA repair gene XRCC1 and XPD polymorphisms and risk of prostate cancer*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2004. **13**(1): p. 23-9.
68. Benhamou, S. and A. Sarasin, *ERCC2 /XPD gene polymorphisms and lung cancer: a HuGE review*. *Am J Epidemiol*, 2005. **161**(1): p. 1-14.
69. Clarkson, S.G. and R.D. Wood, *Polymorphisms in the human XPD (ERCC2) gene, DNA repair capacity and cancer susceptibility: an appraisal*. *DNA Repair (Amst)*, 2005. **4**(10): p. 1068-74.
70. Masson, M., et al., *XRCC1 is specifically associated with poly(ADP-ribose) polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage*. *Mol Cell Biol*, 1998. **18**(6): p. 3563-71.
71. Kubota, Y., et al., *Reconstitution of DNA base excision-repair with purified human proteins: interaction between DNA polymerase beta and the XRCC1 protein*. *Embo J*, 1996. **15**(23): p. 6662-70.
72. Cappelli, E., et al., *Involvement of XRCC1 and DNA ligase III gene products in DNA base excision repair*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(38): p. 23970-5.
73. Caldecott, K.W., et al., *XRCC1 polypeptide interacts with DNA polymerase beta and possibly poly (ADP-ribose) polymerase, and DNA ligase III is a novel molecular 'nick-sensor' in vitro*. *Nucleic Acids Res*, 1996. **24**(22): p. 4387-94.
74. Hill, D.A., et al., *Risk of non-Hodgkin lymphoma (NHL) in relation to germline variation in DNA repair and related genes*. *Blood*, 2006. **108**(9): p. 3161-7.
75. Zhang, Y., et al., *Genetic polymorphisms in base-excision repair pathway genes and risk of breast cancer*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2006. **15**(2): p. 353-8.
76. Joseph, T., et al., *DNA repair gene XRCC1 polymorphisms in childhood acute lymphoblastic leukemia*. *Cancer Lett*, 2005. **217**(1): p. 17-24.
77. Pakakasama, S., et al., *Genetic polymorphisms and haplotypes of DNA repair genes in childhood acute lymphoblastic leukemia*. *Pediatr Blood Cancer*, 2007. **48**(1): p. 16-20.
78. Loizidou, M.A., et al., *Genetic polymorphisms in the DNA repair genes XRCC1, XRCC2 and XRCC3 and risk of breast cancer in Cyprus*. *Breast Cancer Res Treat*, 2008. **112**(3): p. 575-9.
79. Pachkowski, B.F., et al., *XRCC1 genotype and breast cancer: functional studies and epidemiologic data show interactions between XRCC1 codon 280 His and smoking*. *Cancer Res*, 2006. **66**(5): p. 2860-8.
80. Shen, M., et al., *Polymorphisms in DNA repair genes and risk of non-Hodgkin's lymphoma in New South Wales, Australia*. *Haematologica*, 2007. **92**(9): p. 1180-5.

Literaturverzeichnis

81. Liu, J., et al., *DNA repair gene XRCC1 polymorphisms and non-Hodgkin lymphoma risk in a Chinese population*. *Cancer Genet Cytogenet*, 2009. **191**(2): p. 67-72.
82. Batar, B., et al., *DNA repair gene XPD and XRCC1 polymorphisms and the risk of childhood acute lymphoblastic leukemia*. *Leuk Res*, 2009. **33**(6): p. 759-63.
83. Kim, I.S., et al., *DNA repair gene XRCC1 polymorphisms and haplotypes in diffuse large B-cell lymphoma in a Korean population*. *Cancer Genet Cytogenet*. **196**(1): p. 31-7.
84. El-Zein, R., et al., *Genetic polymorphisms in DNA repair genes as modulators of Hodgkin disease risk*. *Cancer*, 2009. **115**(8): p. 1651-9.
85. Deligezer, U., E.E. Akisik, and N. Dalay, *Lack of association of XRCC1 codon 399Gln polymorphism with chronic myelogenous leukemia*. *Anticancer Res*, 2007. **27**(4B): p. 2453-6.
86. Durocher, F., et al., *Comparison of BRCA1 polymorphisms, rare sequence variants and/or missense mutations in unaffected and breast/ovarian cancer populations*. *Hum Mol Genet*, 1996. **5**(6): p. 835-42.
87. Janezic, S.A., et al., *Germline BRCA1 alterations in a population-based series of ovarian cancer cases*. *Hum Mol Genet*, 1999. **8**(5): p. 889-97.
88. Dunning, A.M., et al., *Common BRCA1 variants and susceptibility to breast and ovarian cancer in the general population*. *Hum Mol Genet*, 1997. **6**(2): p. 285-9.
89. Wenham, R.M., et al., *Polymorphisms in BRCA1 and BRCA2 and risk of epithelial ovarian cancer*. *Clin Cancer Res*, 2003. **9**(12): p. 4396-403.
90. Healey, C.S., et al., *A common variant in BRCA2 is associated with both breast cancer risk and prenatal viability*. *Nat Genet*, 2000. **26**(3): p. 362-4.
91. Spurdle, A.B., et al., *The BRCA2 372 HH genotype is associated with risk of breast cancer in Australian women under age 60 years*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2002. **11**(4): p. 413-6.
92. Auranen, A., et al., *BRCA2 Arg372His polymorphism and epithelial ovarian cancer risk*. *Int J Cancer*, 2003. **103**(3): p. 427-30.
93. St. Clair, D., et al., *Suppression of tumor metastasis by manganese superoxide dismutase is associated with reduced tumorigenicity and elevated fibronectin*. *Oncol Rep*, 1997. **4**: p. 753-757.
94. Oberley, L.W. and T.D. Oberley, *The role of superoxide dismutase and gene amplification in carcinogenesis*. *J Theor Biol*, 1984. **106**(3): p. 403-22.
95. Sutton, A., et al., *The Ala16Val genetic dimorphism modulates the import of human manganese superoxide dismutase into rat liver mitochondria*. *Pharmacogenetics*, 2003. **13**(3): p. 145-57.
96. Shimoda-Matsubayashi, S., et al., *Structural dimorphism in the mitochondrial targeting sequence in the human manganese superoxide dismutase gene. A predictive evidence for conformational change to influence mitochondrial transport and a study of allelic association in Parkinson's disease*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996. **226**(2): p. 561-5.
97. Bastaki, M., et al., *Genotype-activity relationship for Mn-superoxide dismutase, glutathione peroxidase 1 and catalase in humans*. *Pharmacogenet Genomics*, 2006. **16**(4): p. 279-86.
98. Martin, R.C., et al., *Manganese Superoxide Dismutase V16A Single-Nucleotide Polymorphism in the Mitochondrial Targeting Sequence Is Associated with Reduced Enzymatic Activity in Cryopreserved Human Hepatocytes*. *DNA Cell Biol*, 2008.

Literaturverzeichnis

99. Woodson, K., et al., *Manganese superoxide dismutase (MnSOD) polymorphism, alpha-tocopherol supplementation and prostate cancer risk in the alpha-tocopherol, beta-carotene cancer prevention study (Finland)*. *Cancer Causes Control*, 2003. **14**(6): p. 513-8.
100. Ambrosone, C.B., et al., *Manganese superoxide dismutase (MnSOD) genetic polymorphisms, dietary antioxidants, and risk of breast cancer*. *Cancer Res*, 1999. **59**(3): p. 602-6.
101. Mitrunen, K., et al., *Association between manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene polymorphism and breast cancer risk*. *Carcinogenesis*, 2001. **22**(5): p. 827-9.
102. Wang, L.I., et al., *Manganese superoxide dismutase alanine-to-valine polymorphism at codon 16 and lung cancer risk*. *J Natl Cancer Inst*, 2001. **93**(23): p. 1818-21.
103. Krajcinovic, M., D. Labuda, and D. Sinnett, *Glutathione S-transferase P1 genetic polymorphisms and susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukaemia*. *Pharmacogenetics*, 2002. **12**(8): p. 655-8.
104. Harries, L.W., et al., *Identification of genetic polymorphisms at the glutathione S-transferase Pi locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer*. *Carcinogenesis*, 1997. **18**(4): p. 641-4.
105. Whitbread, A.K., et al., *Characterization of the human Omega class glutathione transferase genes and associated polymorphisms*. *Pharmacogenetics*, 2003. **13**(3): p. 131-44.
106. Marahatta, S.B., et al., *Polymorphism of glutathione S-transferase omega gene and risk of cancer*. *Cancer Lett*, 2006. **236**(2): p. 276-81.
107. Pongstaporn, W., et al., *Genetic alterations in chromosome 10q24.3 and glutathione S-transferase omega 2 gene polymorphism in ovarian cancer*. *J Exp Clin Cancer Res*, 2006. **25**(1): p. 107-14.
108. Traver, R.D., et al., *NAD(P)H:quinone oxidoreductase gene expression in human colon carcinoma cells: characterization of a mutation which modulates DT-diaphorase activity and mitomycin sensitivity*. *Cancer Res*, 1992. **52**(4): p. 797-802.
109. Krajcinovic, M., et al., *Role of NQO1, MPO and CYP2E1 genetic polymorphisms in the susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia*. *Int J Cancer*, 2002. **97**(2): p. 230-6.
110. Sirma, S., et al., *NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 null genotype is not associated with pediatric de novo acute leukemia*. *Pediatr Blood Cancer*, 2004. **43**(5): p. 568-70.
111. Wiemels, J.L., et al., *A lack of a functional NAD(P)H:quinone oxidoreductase allele is selectively associated with pediatric leukemias that have MLL fusions. United Kingdom Childhood Cancer Study Investigators*. *Cancer Res*, 1999. **59**(16): p. 4095-9.
112. Hung, R.J., et al., *Genetic polymorphisms in the base excision repair pathway and cancer risk: a HuGE review*. *Am J Epidemiol*, 2005. **162**(10): p. 925-42.
113. Chen, L., et al., *Association between polymorphism of human oxoguanine glycosylase 1 and risk of prostate cancer*. *J Urol*, 2003. **170**(6 Pt 1): p. 2471-4.
114. Farinati, F., et al., *Oxidative DNA damage in gastric cancer: CagA status and OGG1 gene polymorphism*. *Int J Cancer*, 2008. **123**(1): p. 51-5.
115. Kohno, T., et al., *Association of the OGG1-Ser326Cys polymorphism with lung adenocarcinoma risk*. *Cancer Sci*, 2006. **97**(8): p. 724-8.

Literaturverzeichnis

116. Rassool, F.V., et al., *Reactive oxygen species, DNA damage, and error-prone repair: a model for genomic instability with progression in myeloid leukemia?* Cancer Res, 2007. **67**(18): p. 8762-71.
117. Karakas, T., et al., *High expression of bcl-2 mRNA as a determinant of poor prognosis in acute myeloid leukemia.* Ann Oncol, 1998. **9**(2): p. 159-65.
118. Park, Y.H., et al., *Interaction between BCL2 and interleukin-10 gene polymorphisms alter outcomes of diffuse large B-cell lymphoma following rituximab plus CHOP chemotherapy.* Clin Cancer Res, 2009. **15**(6): p. 2107-15.
119. Do, T.N., et al., *TP53 R72P and MDM2 SNP309 polymorphisms in modification of childhood acute lymphoblastic leukemia susceptibility.* Cancer Genet Cytogenet, 2009. **195**(1): p. 31-6.
120. Novak, D.J., et al., *Identification of a novel CHEK2 variant and assessment of its contribution to the risk of breast cancer in French Canadian women.* BMC Cancer, 2008. **8**: p. 239.
121. Gorgoulis, V.G., et al., *Transcription factor E2F-1 acts as a growth-promoting factor and is associated with adverse prognosis in non-small cell lung carcinomas.* J Pathol, 2002. **198**(2): p. 142-56.
122. Degterev, A., M. Boyce, and J. Yuan, *A decade of caspases.* Oncogene, 2003. **22**(53): p. 8543-67.
123. Thierfelder, N., et al., *Extreme variation in apoptosis capacity amongst lymphoid cells of Nijmegen breakage syndrome patients.* Eur J Cell Biol, 2008. **87**(2): p. 111-21.
124. Lakhani, S.A., et al., *Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis.* Science, 2006. **311**(5762): p. 847-51.
125. Seker, H., et al., *Functional significance of XPD polymorphic variants: attenuated apoptosis in human lymphoblastoid cells with the XPD 312 Asp/Asp genotype.* Cancer Res, 2001. **61**(20): p. 7430-4.

Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Karl Sperling für die Möglichkeit, diese interessante und anspruchsvolle Arbeit am Institut für Humangenetik ausführen zu können. Außerdem bedanke ich mich insbesondere für die herzliche Aufnahme in Deutschland und für die reibungslose Organisation, die das Leben und Arbeiten erleichtert hat.

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

Ein weiterer Dank geht an Susanne Rothe, Gabriele Hildebrand, Janina Radszewski, Bastian Salewsky und Martin Markovski für die Betreuung und Bereitstellung aller erforderlichen Materialien und gewonnenen Daten, ohne die diese Promotion nicht möglich gewesen wäre. Dank gilt auch Corinna Krüger, die mir bei bürokratischen Angelegenheiten zur Seite stand.

Abschließend möchte ich mich bei der Gottlieb Daimler-und Karl Benz-Stiftung und insbesondere den Stiftungsmitarbeitern Dr. Jörg Klein, Petra Jung und Petra Körbel für die Einladung nach Deutschland und die Unterstützung vorort bedanken.

Publikationsliste

Zeitschriftenartikel

Lins S, Kim R, Krüger L, Chrzanowska KH, Seemanova E, Digweed M.

Clinical variability and expression of the NBN c.657del5 allele in Nijmegen Breakage Syndrome.

Gene. 2009 Nov 1;447(1):12-7. Epub 2009 Jul 25.

Erklärung

„Ich, Ryong Kim, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema , NBS ` selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

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