

Universität Ulm

Institut für Transfusionsmedizin

Prof. Dr. Schrezenmeier

Sequenzierung des *DCLRE1C*-Gens in lymphozytären Neoplasien

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der Medizinischen Fakultät
der Universität Ulm

Alexandra Blender, geboren in Sigmaringen

2018

Amtierender Dekan: Prof. Dr. T. Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Schrezenmeier

2. Berichterstatter: apl. Prof. Dr. A. Schulz

Tag der Promotion: 13.12.2018

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	III
1 Einleitung.....	1
1.1 Das humane Immunsystem	1
1.2 Lymphopoiese	2
1.3 V(D)J-Rekombination	3
1.4 NHEJ (Non-Homologous End-Joining)	6
1.5 Die angeborenen schweren kombinierten Immundefizienzen (SCID).....	8
1.5.1 SCID im Allgemeinen	8
1.5.2 RS-SCID.....	9
1.6 SCID durch ARTEMIS-Defizienz	9
1.6.1 Struktur und Funktion des Proteins	9
1.6.2 Mutationen im <i>DCLRE1C</i> -Gen	11
1.7 ARTEMIS-Defizienz und Krebsentstehung.....	12
1.8 Aufgabenstellung.....	15
2 Material und Methoden.....	16
2.1 Material	16
2.1.1 Bakterien	16
2.1.2 Chemikalien.....	16
2.1.3 Gele	17
2.1.4 Genomische DNAs.....	17
2.1.5 Geräte und Programme.....	18
2.1.6 Kits	18
2.1.7 Medien.....	19
2.1.8 Primer	19
2.1.9 Puffer-Lösungen.....	20
2.1.10 Restriktionsenzyme	20

2.1.11	Vektoren	20
2.1.12	Verbrauchsmaterialien.....	21
2.2	Methoden.....	22
2.2.1	Molekularbiologie	22
3	Ergebnisse	27
3.1	Untersuchung von Leukämie-/Lymphomproben auf Mutationen in ausgewählten Exons des <i>DCLRE1C</i> -Gens (<i>ARTEMIS</i>)	27
3.1.1	Sequenzanalyse der PCRs von Leukämie-/Lymphomproben.....	27
3.1.2	Untersuchung der sechs amplifizierten Pseudogensequenzen	30
3.1.3	Analyse zur Verteilung beider Polymorphismen p.Gly153Arg und p.Pro171Arg auf die Allele in Probe H53	32
4	Diskussion	37
4.1	Untersuchung der Leukämie- und Lymphomproben auf Mutationen in <i>DCLRE1C</i>	37
5	Zusammenfassung.....	49
6	Literaturverzeichnis.....	50
7	Danksagung	61
8	Lebenslauf.....	62

Abkürzungsverzeichnis

ADA	Adenosin Desaminase
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
ARM	<i>ARTEMIS-</i> (<i>DCLRE1C-</i>) Mutante
ART	<i>ARTEMIS</i> (<i>DCLRE1C</i>)
AS	Aminosäure
ATM-Protein	Ataxia Telangiectasia Mutated-Protein
ATR-Protein	Ataxia Telangiectasia and Rad3 related-Protein
BC	Buffy Coat
β-CASP	Metallo-β-lactamase-associated CPSF ARTEMIS SNM1 PSO2
BCR	B-Zell-Rezeptor
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CLL	Chronisch Lymphatische Leukämie
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	Complementary DNA
CML	Chronisch Myeloische Leukämie
CMV	Cytomegalie-Virus
db	Data base
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
DSB	Doppelstrangbruch
<i>DCLRE1C</i> -Gen	<i>DNA Crosslink Repair 1C</i> -Gen
del	Deletion
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-LIG IV	DNA-Ligase IV
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dsDNA	double strand DNA
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
(E)GFP	(Enhanced) Green Fluorescent Protein
FCS	Fetal Bovine Serum
F-Primer	Forward-Primer

fs	Frameshift
g	Gramm
gDNA	Genomische Desoxyribonukleinsäure
ggf.	gegebenenfalls
h	Hour (Stunde)
HMGB1	High-Mobility-Group-Protein B1
Ig	Immunglobulin
IL1	Interleukin 1
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IS	Ionisierende Strahlen
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
LBamp	Luria-Bertani-Medium mit Ampicillin
LBkan	Luria-Bertani-Medium mit Kanamycin
MALT	Mucosa Associated Lymphoid Tissue
MCS	Multiple Cloning Site
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minute(n)
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
ml	Milliliter
μ m	Mikrometer
mM	Millimolar
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NBS	Nijmegen-Breakage-Syndrom
<i>NBS1</i>	<i>Nijmegen-Breakage-Syndrom-1-Gen</i>
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NHDF	Normal Human Dermal Fibroblasts
NHEJ	Non-Homologous End-Joining
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte

PBS	Phosphat-buffered-Saline
PCR	Polymerase Chain Reaktion
<i>RAG1</i> und <i>2</i>	<i>Rekombinationsaktivierendes Gen 1</i> und <i>2</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Rounds per minute
R-Primer	Reverse-Primer
RSS	Rekombinationssignal-Sequenz
RS-SCID	Radiosensitive Severe Combined Immunodeficiency
RT	Raumtemperatur
s/sec	Sekunde(n)
SCID	Severe Combined Immunodeficiency
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
STR	Short Tandem repeat
TAE	Tris-Acetat-EDTA
T-ALL	T-Zell-Akute Lymphatische Leukämie
TCR	T-Zell-Rezeptor
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
U	Units
UV	Ultraviolett
V(D)J	Variable-, Diverse-, Joining-(Segmente)
V _{L/H}	Variable _{light/ heavy} (schwerer/leichter variabler Anteil eines Ig)
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid

1 Einleitung

1.1 Das humane Immunsystem

Ein Organismus muss sich permanent mit Umwelteinflüssen und damit einhergehenden Fremdeinwirkungen auseinandersetzen. Die Aufgabe des Immunsystems ist es den Organismus vor Krankheit und Schädigung zu schützen. Beim Menschen werden das angeborene allgemeine und das erworbene spezialisierte Immunsystem differenziert. Beide Systeme übernehmen zwar verschiedene Aufgaben, sind aber in ihrer Arbeitsweise durch Botenstoffe und Interaktionen miteinander verzahnt.

Das unspezifische Immunsystem vermittelt eine schnelle Erstantwort auf „Eindringlinge“. Dies geschieht durch humorale und zelluläre Bestandteile, welche bereits ab dem frühen Lebensalter verfügbar sind. Die wichtigsten daran beteiligten Zellen sind Makrophagen, Dendritische Zellen, Neutrophile Granulozyten und Natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen), die proinflammatorische Zytokine und Effektormoleküle freisetzen können sowie zur Phagozytose befähigt sind. Das spezifische Immunsystem sorgt für eine späte und zielgerichtete Immunantwort. Es ist gedächtnisfähig. Beitragende Immunzellen sind T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und antigenpräsentierende Zellen, wie dendritische Zellen. Letztere spielen als Bindeglied zwischen den verschiedenen Immunsystemen eine Rolle. Ist die erste Phase der Immunantwort durch das unspezifische Immunsystem eingeleitet worden, folgt im Anschluss in mehreren Schritten die verzögerte Antwort des spezifischen Immunsystems.

B-Lymphozyten sezernieren Antikörper, welche äußerst spezifisch gegen Fremdmoleküle gerichtet sind. Sie werden zur humoralen Abwehr gezählt. Zytotoxische T-Zellen sind, im Gegensatz zu T-Helfer-Zellen, ebenfalls in der Lage, spezifische Teile von Antigenen auf der Oberfläche von Zellen zu identifizieren und diese direkt zu zerstören. T-Helfer-Zellen hingegen leiten nach Bindung und Erkennung eines Antigens durch ihre Oberflächenrezeptoren eine entsprechende Immunantwort ein. Dies geschieht in Zusammenarbeit mit anderen Zellen des Immunsystems. Durch die Erkennung entsprechender Antigene werden von den T-Helfer-Zellen vor allem Zytokine ausgeschüttet, welche weitere Komponenten des Immunsystems (z. B. Makrophagen und zytotoxische T-Zellen) aktivieren. Regulatorische T-Lymphozyten hingegen regulieren im Zusammenspiel mit anderen Faktoren und Kontrollmechanismen mitunter die Selbsttoleranz des Immunsystems. Eine Immunreaktion auf körpereigene Zellen oder die Abstoßung des im Mutterleib entstehenden Kindes kann mit Hilfe der regulatorischen T-Helferzellen zum Beispiel unterdrückt werden.

Die Fähigkeit, spezifische Antigene zu erkennen, ist genetisch vorgegeben. Die Vielfältigkeit der spezifischen Immunabwehr wird durch das sogenannte V(D)J-Rearrangement (siehe 1.3) gewonnen, im Falle der B-Zell-Antikörper zusätzlich durch die somatische Hypermutation.

Aufgrund der Gedächtnisfähigkeit des adaptiven Immunsystems resultiert oftmals eine lebenslang andauernde Immunität gegen einen spezifischen Krankheitserreger. Diese Fähigkeit beruht darauf, dass sich die durch ein spezifisches Antigen aktivierten B-Lymphozyten entweder in eine antikörpersezernierende Plasmazelle verwandeln oder zu einer Gedächtniszelle ausbilden. Des Weiteren spielen bei der Gedächtnisfähigkeit des Immunsystems auch die sogenannten T-Gedächtnis-Zellen, welche aus T-Helferzellen hervorgehen, eine Rolle.

1.2 Lymphopoiese

Im Prozess der Lymphopoiese entstehen aus pluripotenten Stammzellen die lymphoiden Progenitorzellen. Diese können verschiedene Wege zur Weiterreifung einschlagen. Ob sich eine Progenitorzelle zur reifen B-, T- oder NK-Zelle entwickelt, wird durch externe Stimuli gelenkt. B-Lymphozyten reifen im Knochenmark heran, die Vorläufer der T-Lymphozyten hingegen schwimmen aus dem Knochenmark aus, um im Thymus zu naiven T-Lymphozyten heranzureifen. Beide Zellarten durchlaufen verschiedene Reifungsprozesse über Pro-T- und -B-Zellen zu Prä-T- und -B-Zellen, um funktionstüchtig zu werden (siehe Abbildung 1). Erst nach den Reifungsprozessen in den jeweils primären lymphatischen Organen schwimmen die noch naiven und „lernfähigen“ (immunkompetenten) Lymphozyten in die Peripherie aus und besiedeln möglicherweise sekundäre lymphatische Organe, wie Lymphknoten oder Milz. Die Reifestadien der Lymphozyten können durch verschiedene Oberflächenmarker, die sogenannten CD-Moleküle, voneinander unterschieden werden. Nur die wenigsten B- und T-Zellen erreichen am Ende das reife Stadium. Sie unterliegen einem ständigen Selektionsdruck. Für die Reifung und das Überleben ist es wichtig, dass B- und T-Zellen an der Oberfläche antigenerkennende Rezeptoren (BCR, TCR) ausbilden.

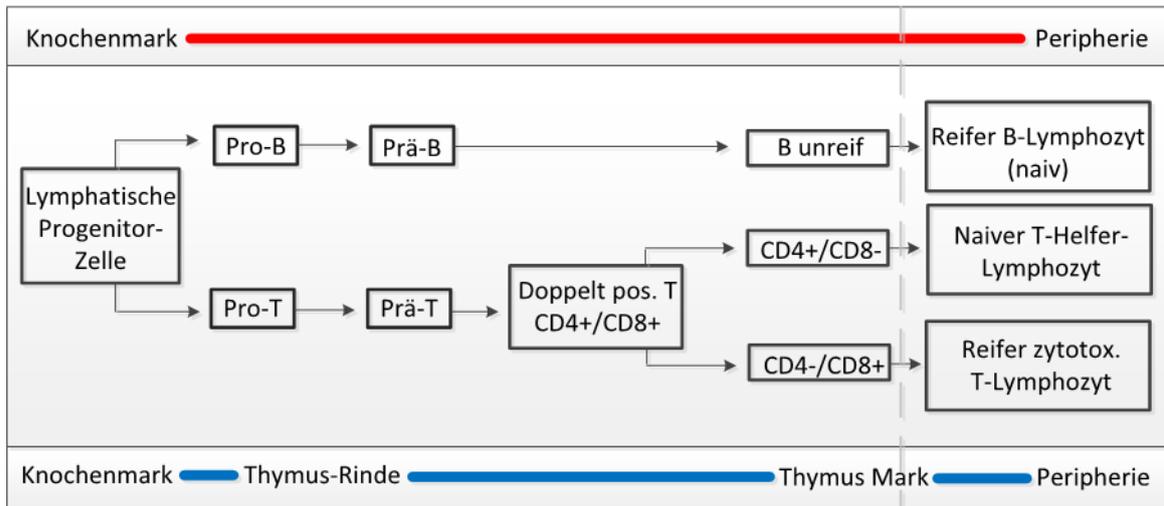


Abbildung 1: Reifung der B- und T-Lymphozyten in primären lymphatischen Organen.
Pfeil bedeutet „wird zu“. (Abbildung nach Lüllmann-Rauch R., 2003).

1.3 V(D)J-Rekombination

Die T-Zell-Rezeptoren bestehen jeweils aus zwei Untereinheiten ($\alpha + \beta$ oder seltener $\gamma + \delta$), welche wiederum aus einem konstanten Teil ($C = \text{constant}$) und einem variablen Teil ($V = \text{variable}$) zusammengesetzt werden. Die B-Zell-Rezeptoren (Immunglobuline, Igs) bestehen hingegen aus zwei identischen schweren Ketten ($H = \text{heavy}$) und aus zwei identischen leichten Ketten ($L = \text{light}$), welche wie beim TCR durch kovalente Bindungen zusammengehalten werden. Die leichten Ketten der Immunglobuline werden, ebenfalls ähnlich den TCRs, aus einer konstanten Domäne (C_L) und der variablen Domäne (V_L) gebildet. Die leichten Ketten werden dabei von zwei verschiedenen Genloci kodiert, Kappa und Lambda. Die schwere Kette besteht hingegen aus einem V-Teil und je nach Ig-Typ aus drei (IgA, IgG) bzw. vier (IgM, IgE) konstanten Teilen (V_H und $C_H 1, 2, 3, 4$). Zudem bilden die variablen Anteile der beiden leichten Ketten des Immunglobulins zusammen mit den variablen Anteilen der schweren Ketten die antigen-bindenden Domänen. In TCRs und Igs dient der konstante Teil C der Effektorfunktion des Antigenrezeptors und ist jeweils mit der Zelloberfläche der zugehörigen T- oder B-Zellen verankert. Die schematische Darstellung eines Igs ist in der Abbildung 2 zu sehen.

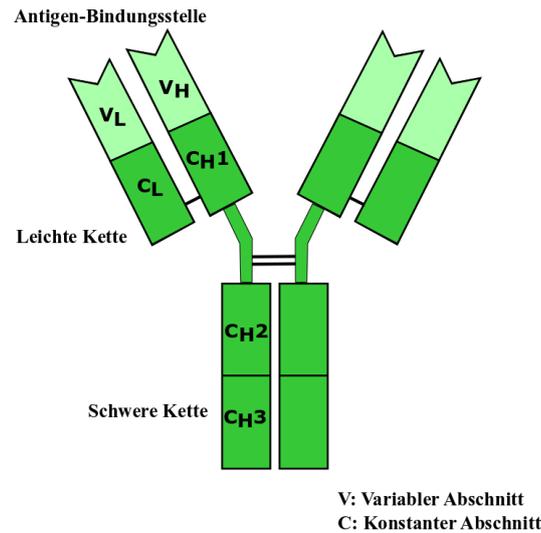


Abbildung 2: Darstellung eines Immunglobulins mit seinen Untereinheiten.

Zu sehen ist ein Immunglobulin mit Darstellung der zwei schweren und der zwei leichten Ketten. In Hellgrün sind die variablen Anteile abgebildet (V_L und V_H). Die Untereinheiten der konstanten Abschnitte sind Dunkelgrün (C_L , CH_{1-3}).

Die Zahl der möglichen verschiedenen Antikörper, die Fremdmoleküle erkennen und von einem Menschen produziert werden können, wird auf 10^{11} geschätzt. Dies wird durch die außerordentlich hohe Variabilität des V-Anteils der Rezeptoren bedingt (Löffler *et al.*, 2007). Diese Variabilität des Immunsystems ist auf die Durchführung der V(D)J-Rekombination in heranreifenden B- und T-Zellen zurückzuführen. Die variablen Anteile sind jeweils durch zahlreiche Gensegmente auf den Chromosomen repräsentiert. Diese Gensegmente können erst durch ein Genrearrangement zur funktionellen Einheit miteinander verknüpft werden. Das Rearrangement findet zunächst auf DNA-Ebene statt, woraufhin das jeweilige rearrangierte Allel in RNA umgeschrieben und exprimiert wird. Bei dieser Form der somatischen Rekombination spielen drei Typen von DNA-Segmenten eine Rolle: das V-Segment (V = variability), das aminoterminalen Abschnitte kodiert, das J-Segment (J = join), welches als Bindeglied zu den konstanten Kettenanteilen der Rezeptoren fungiert, und das zusätzlich vielfaltserhöhende D-Segment (D = diversity). D-Segmente sind nur im IgH, TCR β und TCR δ Genlocus enthalten und liegen dort zwischen den V- und J-Segmenten. Bei den leichten Ketten der Igs sowie bei den TCR α und TCR γ wird jeweils nur ein V-Segment mit einem J-Segment verknüpft. In beiden genannten Varianten läuft der Mechanismus nach dem gleichen Prinzip ab. In Abbildung 3 sind exemplarisch wesentliche Schritte auf dem Weg zur Synthese einer Ig-Kette dargestellt. Jedes der genannten Segmente liegt in vielfacher Ausgabe auf den Chromosomen vor. Anhand der sogenannten V(D)J-Rekombination, wird daher je ein einziges kodierendes V-Segment mit

nur einem einzigen D-Segment und das gewählte D-Segment mit nur einem einzigen J-Segment verknüpft.

Für die Initiierung der V(D)J-Rekombination ist relevant, dass die D-Segmente von zwei, die V- und J-Elemente je von einer Rekombinationssignal-Sequenz (RSS) flankiert werden. Die RSS besteht aus einem Heptamer, einem Zwischenstück aus 12 ± 1 bzw. 23 ± 1 Basenpaare und einem AT-reichen Nonamer. Die Heptamere der RSS flankieren stets das kodierende Segment. Um V-V-, D-D- oder J-J-Verbindungen zu verhindern, greift hier die 12/23-Regel. Nach dieser Regel werden nur Elemente verknüpft, deren Zwischenstücke der RSS unterschiedlich lang sind (Lieber M. R., 2010; Sakano *et al.*, 1981). Alle RSS der V-Elemente haben die gleiche Zwischenlänge. Dies gilt auch für alle RSS der J-Elemente und D-Elemente, wodurch die unerwünschte Gleich-zu-gleich-Verknüpfung verhindert wird.

RAG1, RAG2, die lymphozytenspezifische rekombinationsaktivierenden Gen-Proteine 1 und 2, lagern sich mit HMGB1 (High-Mobility-Group-Protein B1) zu dem RAG-Proteinkomplex zusammen, erkennen zwei RSSs, binden diese und bringen sie in räumliche Nähe zueinander (Kim *et al.*, 2018). RAG-Proteine erzeugen anhand ihrer Endonuklease-Aktivität exakt zwischen einem RSS und dem angrenzenden kodierenden Segment zunächst einen physiologischen Einzel-Strang-Bruch (Schatz *et al.*, 1989). Das überstehende Ende auf der Seite des jeweiligen V-, D- oder J-Segmentes greift durch hydrophilen Angriff eines 3'Hydroxyl (3' OH) den jeweiligen eigenen antiparallelen, noch nicht geöffneten DNA-Strang an. Dieser wird dadurch ebenfalls aufgebrochen und ermöglicht anschließend durch Zusammenlagerung der entstandenen DNA-Enden die Bildung einer kovalent verschlossenen Haarnadelstruktur (Ma *et al.*, 2002). Die beiden abgespaltenen RSS-Enden werden miteinander zu einem zirkulären DNA-Stück verbunden und verbleiben als sogenannte Signalverbindungen (= „signal-joints“) extrachromosomal (Rooney *et al.*, 2004b). Zur Verknüpfung der kodierenden Elemente (= „coding-joints“) müssen die geschaffenen Haarnadelstrukturen zunächst wieder eröffnet und die Elemente dann miteinander verbunden werden. Hierfür fällt der RAG-Proteinkomplex von der Haarnadelstruktur ab und es treten die ubiquitär exprimierten Enzyme des Non-Homologous End-Joining (NHEJ)-Pathways in Aktion.

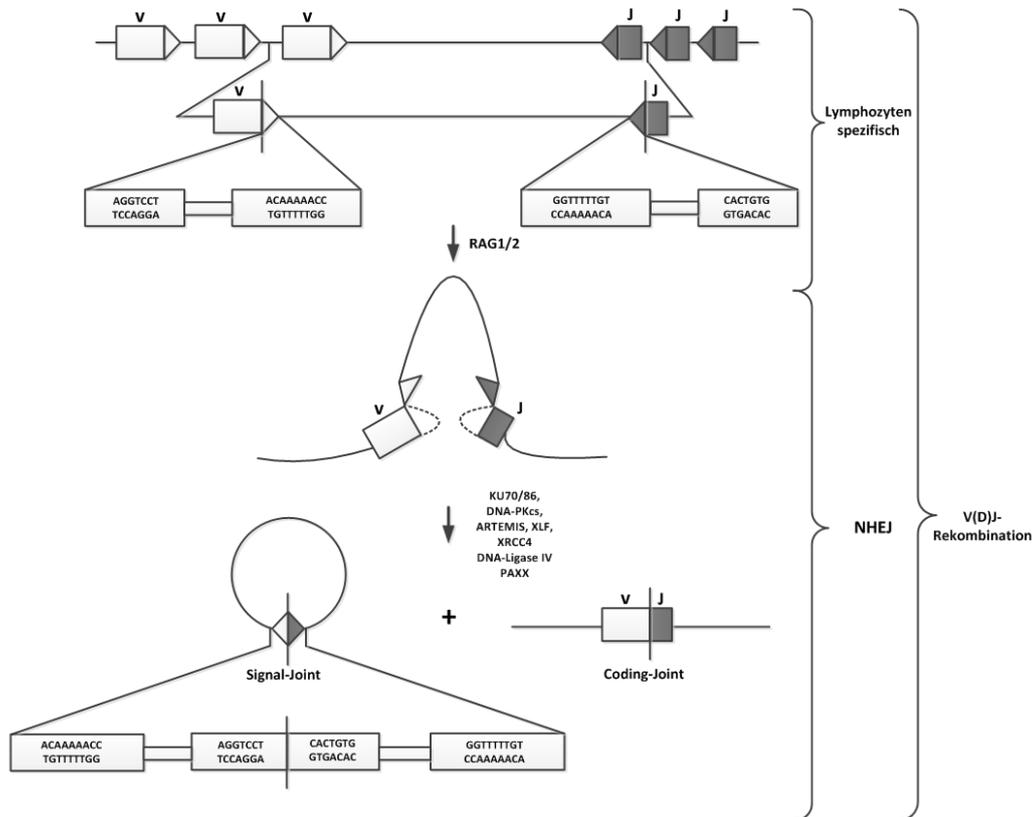


Abbildung 3: Schematische Darstellung der V(D)J-Rekombination.

Das Ziel der V(D)J-Rekombination ist das Rearrangement verschiedener Gensegmente zu einem neuen Exon, welches für einen T-Zellrezeptor (TCR) oder B-Zellrezeptor (BCR) kodiert. Zu sehen sind verschiedene V-Elemente und J-Elemente auf einem Genlocus. Die Rekombinationssignal-Sequenzen (RSS) flankieren je ein Element und sind als Dreiecke dargestellt. Die RSS bestehen, immer der gleichen Reihenfolge nach, direkt dem jeweiligen Element anschließend, aus einem palindromischen Heptamer mit einem folgenden Zwischenstück („Spacer“) aus 12 oder aus 23 bp und anschließend einem AT-reichen Nonamer. Am 5'-Ende der RSS wird im ersten Schritt zwischen dem kodierenden Element und dem Heptamer die DNA enzymatisch eröffnet. Anschließend werden sogenannte Haarnadelstrukturen (gestrichelte Linien) an Seiten der kodierenden Elemente gebildet. Diese Vorgänge bewerkstelligen die lymphozytenspezifischen RAG1/2-Proteine. Weitere Proteine übernehmen die folgenden prozessierenden Schritte. Diese Proteine gehören dem NHEJ (Non-Homologous End-Joining)-Pathway an. Nach Religation der DNA (Desoxyribonukleinsäure)-Enden entstehen ein zirkuläres DNA-Stück („signal-joint“) und das kodierende DNA-Segment („coding-joint“). Das kodierende DNA-Segment enthält hier die neu zusammengefügte V- und J-Elemente (Abbildung nach Schwarz *et al.*, 2003).

1.4 NHEJ (Non-Homologous End-Joining)

Täglich erleiden Zellen in Organismen Schäden in der Desoxyribonukleinsäure (DNA). Dies geschieht z. B. durch ionisierende Strahlen (IS) und Chemikalien, aber auch durch endogen produzierte reaktive Sauerstoff Spezies (ROS). Durch die Schäden können DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) entstehen. Fehlerhafte Reparaturen dieser Brüche können neben der Apoptose der Zelle auch zu Deletionen oder Chromosomenaberrationen und dadurch zu genomischer Instabilität führen (Mills *et al.*, 2003). Zwei DNA-Reparatur-Mechanismen stehen der eukaryontischen Zelle zur Reparatur von DSB zur Verfügung. Zu unterscheiden sind die Homologe Rekombination (HR) und das Non-Homologous End-Joining (NHEJ). HR findet nur dann Einsatz, wenn zwei identische DNA-Doppelstränge vorliegen, was im Verlauf des Zellzyklus in der S- bis M-Phase der Mitose der Fall ist.

NHEJ hingegen ist der wichtigste Mechanismus bei der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen in Eukaryonten und findet in allen Abschnitten des Zellzyklus Anwendung (Lieber *et al.*, 1999). Vorwiegend erfolgt das NHEJ aber während der G₀, G₁ und dem frühen Teil der S Phase (Takata *et al.*, 1998). Auch für die Reparatur der DSB, die auf physiologischem Wege während der V(D)J-Rekombination in die DNA eingebracht wurden, werden die Proteine des NHEJ angewandt (Lieber *et al.*, 2003).

Zu Anfang treten die hochkonservierten Proteine KU70/86 an die zu reparierenden DNA-Enden. Das ringstrukturartige Protein umschließt die DNA, gleitet an ihr entlang, erfasst so die DNA-Enden und rekrutiert anschließend das Protein DNA-PKcs (Walker *et al.*, 2001). In Einheit bilden KU und DNA-PKcs eine DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK). Durch Bindung an das DNA-Ende wird diese Kinase aktiviert (Bassing *et al.*, 2002). ARTEMIS wird rekrutiert und bildet zusammen mit der DNA-PKcs einen Komplex, in welchem DNA-PKcs sich selbst und auch ARTEMIS phosphoryliert (Ma *et al.*, 2002; Goodarzi *et al.*, 2006). Die Autophosphorylierung der DNA-PKcs und deren damit einhergehende Konformationsänderung trägt dazu bei, dass die DNA-Enden zur Prozessierung an ARTEMIS freigelegt werden; zudem, so die Hypothese, erlaubt die Phosphorylierung von ARTEMIS die Aktivierung seiner Endonukleaseaktivität, welche die bereits aktive Exonukleaseaktivität ergänzt (Goodarzi *et al.*, 2006, Ma *et al.*, 2002). ARTEMIS ist durch die Endonukleaseaktivität befähigt, die im Rahmen der V(D)J-Rekombination physiologisch eingebrachten Haarnadelschleifen zu eröffnen. Die hierbei entstehenden DNA-Überhänge können durch die exo- und endonukleolytische Aktivität von ARTEMIS prozessiert werden (Ma *et al.*, 2002). Im Unterschied hierzu entwickeln sich bei unphysiologisch entstandenen DSB keine Haarnadelschleifen. Hierbei verbleiben lediglich nicht ligierbare offene DNA-Enden. Diesen genügt es, zur Religation durch ARTEMIS exonukleolytisch zurechtgeschnitten zu werden. In beiden genannten Fällen, sowohl des physiologisch eingebrachten als auch des durch externe Stimuli entstandenen DSB, dissoziieren, nach vorausgegangener DNA-Prozessierung durch ARTEMIS, die KU-Proteine und der DNA-PKcs/ARTEMIS-Komplex von der DNA. Hierdurch wird eine Bindungsstelle freigegeben. Diese nimmt die DNA-Ligase IV zusammen mit ihren Kofaktoren XRCC4, XLF/Cernunnos und PAXX ein (Ahnese *et al.*, 2006; de Villartay J. P., 2015; Raschellà *et al.*, 2017). Der aus diesen Proteinen entstandene Komplex religiert die durch ARTEMIS vorbereiteten DNA-Enden. Der DSB ist hiermit behoben bzw. es werden anhand dieser letzten dem NHEJ zugehörigen Schritte die beim V(D)J-Rearrangement durch RAG1/2 einzeln „ausgeschnittenen“ DNA-Segmente miteinander verbunden. Die entsprechende

mRNA kann anschließend hergestellt und der neue Rezeptor aus je nur einem V-, D- und J-Segment exprimiert werden.

1.5 Die angeborenen schweren kombinierten Immundefizienzen (SCID)

1.5.1 SCID im Allgemeinen

Defekte des Immunsystems können erworben, wie z. B. durch HIV-Infektion, oder angeboren sein. Eine angeborene fehlerhafte Entwicklung oder Funktion oder gar der Ausfall des Immunsystems beruht in der Regel auf einem spontan somatisch oder in der Keimbahn aufgetretenen Gendefekt. Die schwersten Formen der angeborenen Immundefizite werden unter der Bezeichnung schwerer kombinierte Immundefekt (SCID = severe combined immunodeficiency) zusammengefasst. SCID stehen für eine Reihe angeborener Immundefekte, die durch stark gestörte oder fehlende zelluläre und humorale Immunantwort schwerste Ausfälle des Immunsystems zur Folge haben. Bei dieser Krankheitsbezeichnung steht das „kombiniert“ für die Möglichkeit der Assoziation eines B-Tell-Defekts/Mangels mit einem beim SCID in jedem Falle bestehenden T-Zell-Defekt/-Mangel. Folglich kann nach B^+T^+ -, B^+T^- -, B^-T^+ - oder B^-T^- -SCID Phänotypen eingeteilt werden. Viele der $B^-T^+NK^+$ -SCID-Varianten beruhen auf dem Ausfall der V(D)J-Rekombination.

Die Inzidenz des SCID wird auf 1 von 20 000 - 100 000 Geburten geschätzt, variiert aber geographisch und hinsichtlich der Verbreitung von Konsanguinität (Huang *et al.*, 2005; Kwan *et al.*, 2014). Als Vererbungsformen für SCIDs sind autosomal rezessive als auch X-chromosomal-gebundene (X-SCID) Erbgänge bekannt. SCID-Patienten werden in der Regel noch im Säuglingsalter durch Gedeihstörungen, rezidivierende Infektionen insbesondere der oberen Atemwege und des Gastrointestinaltraktes (oft durch opportunistische Erreger) sowie persistierendem oder rezidivierendem Soor auffällig. Insgesamt besteht jedoch eine deutliche Heterogenität dieser Krankheitsgruppe. Bereits frühzeitig werden oftmals symptomatische Therapien, wie zum Beispiel die kontinuierliche antimikrobielle Prophylaxe, Immunglobulin-Substitution und strenge Hygienemaßnahmen erforderlich. Nicht adäquat therapierte Patienten versterben in der Regel innerhalb des ersten Lebensjahres. Die einzige kausale Therapie der Erkrankung war lange Zeit die allogene Stammzelltransplantation. Gegenwärtig werden jedoch auch schon genetisch modifizierte autologe Stammzellen zur Behandlung immundefizienter Patienten eingesetzt (Booth *et al.*, 2016).

1.5.2 RS-SCID

Wird das Krankheitsbild des SCID durch erhöhte Strahlensensitivität der Körperzellen begleitet, spricht man vom radiosensitiven schweren kombinierten Immundefekt (RS-SCID). 30 % aller SCID sind dem RS-SCID zuzuteilen (Dvorak *et al.*, 2010). Die Faktoren, deren Defekt als Ursachen von RS-SCIDs entdeckt wurden, gehören dem Reparatur-Mechanismus der nicht homologen End-zu-End-Wiedervereinigung (NHEJ) an und stellen sogleich die Endstrecke der V(D)J-Rekombination dar. Ionisierende Strahlung führt zu DNA-Doppelstrangbrüchen, welche durch einen defekten DNA-Reparatur-Mechanismus nicht ausreichend repariert werden können. Dadurch kommt es unter Umständen zum Arrest der Zelle in der G₀-Phase und im schwersten Fall zur Auslösung der Zell-Apoptose. An Zellen eines RS-SCID-Patienten, lässt sich diese Tatsache nachweisen. Patienten mit einem RS-SCID zeigen zudem erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Alkylanzien-basierten Chemotherapeutika, welche traditionell zur Konditionierung bei allogenen Stammzelltransplantationen und somit auch in der Therapie dieser Erkrankung eingesetzt werden (Dvorak *et al.*, 2010; Schuetz *et al.*, 2014).

1.6 SCID durch ARTEMIS-Defizienz

1.6.1 Struktur und Funktion des Proteins

ARTEMIS-Defekte wurden zwischenzeitlich als einer der häufigsten Auslöser eines RS-SCID identifiziert. Zu finden ist das *ARTEMIS*- oder *DCLRE1C*-Gen (DNA Crosslink Repair 1C-Gen) auf dem kurzen Arm von Chromosom 10. Es setzt sich aus 14 Exons zusammen. Die Größe der einzelnen Exons reicht von 52 bis 1160 bp. Die Nuklease ARTEMIS ist im Zellkern lokalisiert (Pannicke *et al.*, 2004; Moshous *et al.*, 2001).

In Vertebraten besteht die Aufgabe der Endo- und Exonuklease ARTEMIS zum einen in der Eröffnung der durch RAG1 und RAG2 in die DNA eingebrachten Haarnadelstrukturen während des V(D)J-Rearrangements. Zum anderen dient die Nuklease beim NHEJ als prozessierendes Protein nicht ligierbarer DNA-Enden nach unphysiologischen Doppelstrangbrüchen. Jeweils wird die DNA für die Ligation vorbereitet. ARTEMIS wird ubiquitär exprimiert und spielt in allen Körperzellen eine bedeutende Rolle (Moshous *et al.*, 2001). Auch soll ARTEMIS nach Phosphorylierung durch ATM und ATR an den Mre11/Rad50/NBs1-Komplex binden und dadurch an der Regulation des Checkpoints des Zellzyklus für den Arrest der Zelle im G₂/M-Übergang nach Bestrahlung mit ionisierenden Strahlen verantwortlich sein (Kurosawa *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010). Die Strahlensensitivität der Fibroblasten sowie der Vorläuferzellen von Granulozyten und

Makrophagen (CFU-GM) aus dem Knochenmark von ARTEMIS-defizienten Patienten liegt hierin begründet (Cavazzana-Calvo *et al.*, 1993; Nicolas *et al.*, 1996; Niewolik *et al.*, 2006; Moshous *et al.*, 2001).

Bei dem ARTEMIS-Genprodukt handelt es sich um ein hoch konserviertes Protein von 692 Aminosäuren und ca. 78 kDa (Pannicke *et al.*, 2004; Moshous *et al.*, 2001). Die ersten 155 AS der N-terminalen Region gehörten dem katalytischen Zentrum an und sind der Familie der Metallo- β -Lactamasen zuzuordnen (Moshous *et al.*, 2001; Callebaut *et al.*, 2002). Um die katalytische Aktivität zu gewährleisten, ist wie bei allen Metallo- β -Lactamasen Mg^{2+} vonnöten (Ma *et al.*, 2002; Pannicke *et al.*, 2004; Rooney *et al.*, 2002). Die Aminosäuren 156 - 385 teilen mit anderen Metallo- β -Lactamasen verschiedene konservierte Merkmale und werden β -CASP Motiv (metallo- β -lactamase-associated CPSF ARTEMIS SNM1 PSO2) genannt (Callebaut *et al.*, 2002). Dem C-Terminus (Aminosäure 386 - 692) wird eine regulatorische Funktion zugeordnet. Eine DNA-PKcs Interaktionsstelle in ARTEMIS konnte den Aminosäuren Leucin an Stelle 401 und Arginin an Stelle 402 zugeordnet werden (Soubeyrand *et al.*, 2006; Niewolik *et al.*, 2006). Erklärt ist diese Interaktionsstelle anhand der Tatsache, dass ARTEMIS am regulatorischen Zentrum durch die DNA-PKcs phosphoryliert werden muss, um die katalytische Komponente der Endonuklease, nach Konformationsänderung und anschließender Aufhebung der Autoinhibition durch den C-Terminus, aktivieren zu können (Ma *et al.*, 2002; Niewolik *et al.*, 2006; Niewolik *et al.*, 2017). Um ARTEMIS die Durchführung der DNA-Prozessierung zu ermöglichen, müssen dem Protein die DNA-Enden dargelegt werden. Dies wird durch die Anlagerung der DNA-PKcs an die DNA-Enden gewährleistet. Die DNA-PKcs wird hierfür zunächst ebenfalls phosphoryliert und somit aktiviert. Erst die anschließende Konformationsänderung der DNA-PKcs befähigt sie zur Darlegung der DNA-Enden (Goodarzi *et al.*, 2006).

Die Endonuklease ARTEMIS tritt schließlich an die DNA-Enden und öffnet im Rahmen der V(D)J-Rekombination die Haarnadelschleifen. Dies geschieht zumeist zwei Nukleotide nach der Schleifenspitze, wodurch bevorzugt 3'-Überhänge entstehen (Ma *et al.*, 2002). Des Weiteren werden anschließend endo- und exonukleolytisch die Überhänge prozessiert. Nach Dissoziation des ARTEMIS/DNA-PKcs-Komplexes von der DNA werden die Enden zur Ligation an die Folge-Proteine des NHEJ-Systems, wie XRCC4, XLF, PAXX und Ligase IV, freigegeben.

Im V(D)J-rekombinationsunabhängigen NHEJ-Pathway wirkt ARTEMIS an der Reparatur von ca. 10 % der Doppelstrangbrüche mit (Rivera-Munoz *et al.*, 2007). ARTEMIS arbeitet

hier ebenfalls als Exonuklease oder schneidet im Komplex mit DNA-PKcs als Endonuklease. Dabei werden beim Prozessieren an 5'-Überhängen gerade Enden („blunt ends“) oder aber an dem 3'-Ende Überhänge mit zwei bis vier überstehenden Nukleotide gebildet (Lieber M. R., 2010).

1.6.2 Mutationen im *DCLRE1C*-Gen

In der Literatur wurde bisher von zahlreichen, mittlerweile weit über 80 Patienten mit einer SCID- oder atypischen SCID-Erkrankung mit einem zu Grunde liegenden ARTEMIS-Defekt berichtet (Darroudi *et al.*, 2007; de Villartay *et al.*, 2009; Ege *et al.*, 2005; Evans *et al.*, 2006; Felgentreff *et al.*, 2015; Ijspeert *et al.*, 2011; Kobayashi *et al.*, 2003a,b; Lagresle-Peyrou *et al.*, 2008; le Deist *et al.*, 2004; Li L. *et al.*, 2002; Moshous *et al.*, 2001; Musio *et al.*, 2005; Noordzij *et al.*, 2003; Pannicke *et al.*, 2010; Perez-Becker *et al.*, 2009; Rohr *et al.*, 2010; van der Burg *et al.*, 2007; van Zelm *et al.*, 2008; Volk *et al.*, 2015, Sundin *et al.*, 2018). Die größte Allelhäufigkeit an bisher veröffentlichten Mutationen haben Mutationen im N-Terminus und somit aktiven Zentrum von ARTEMIS (β -Lactamase- oder β -CASP-Domäne). Aus der Tatsache, dass lebende Patienten mit komplettem Verlust an Proteinaktivität diagnostiziert werden konnten, wird ersichtlich, dass ARTEMIS zwar unabdingbar für die Bildung eines intakten adaptiven Immunsystems ist, es aber keinesfalls essenziell für das Leben zu sein scheint (Moshous *et al.*, 2001; Pannicke *et al.*, 2010). Neben den in T^B-SCID resultierenden Null-Mutationen wurden auch Mutationen gefunden, die eine ARTEMIS-Protein-Restaktivität erlauben und daher zum T^{low}B^{low}-SCID oder zum sogenannten Omenn Syndrom führen (Darroudi *et al.*, 2007, Ege *et al.*, 2005; Ijspeert *et al.*, 2011; Moshous *et al.*, 2003; Volk *et al.*, 2015). Das Omenn-Syndrom besteht aus einem SCID-Phänotyp, welcher mit Erythrodermie, Hyper-IgE, Hepato-Splenomegalie, Lymphadenopathie, Alopezie und unter Umständen aberranten Zahlen an autoreaktiven T-Lymphozyten assoziiert ist.

Eine Veröffentlichung von Felgentreff *et al.*, 2015 zeigt anhand eines Experiments ein Korrelat zwischen Aktivitätsgrad des mutierten *DCLRE1C*-Gens und dem klinischen Phänotyp der betroffenen Patienten auf. Mutationen in *DCLRE1C*, welche hoch konservierte Anteile der β -Lactamase- oder β -CASP-Domäne betreffen, heben, wie in der Arbeit von Felgentreff veranschaulicht, in der Regel die ARTEMIS-Funktion völlig auf. Klinisch geht dies mit ausgeprägten SCID-Eigenschaften einher. Mutationen, die andere Anteile in diesen Domänen betreffen und Konformationsänderungen bedingen können, zeigen hingegen heterogene Aktivitätslevels von ARTEMIS und somit auch heterogene Phänotypen. Dies trifft selbst für Missense-Mutationen zu, die das gleiche Kodon involvieren

(Felgentreff *et al.*, 2015). Ähnliches berichten Volk *et al.* 2015 über eine *DCLRE1C*-Mutation (c.194C<T, p.T65I) in einem nicht hoch konservierten Anteil des Gens. Diese Mutation führt selbst in homozygoter Ausführung (insgesamt zehn betroffene Patienten) zu einer bemerkenswerten Heterogenität des Phänotypes. Eine sowohl laborchemische als auch klinische Variabilität zeigte sich selbst zwischen Patienten, die derselben Familie angehören (Volk *et al.*, 2015).

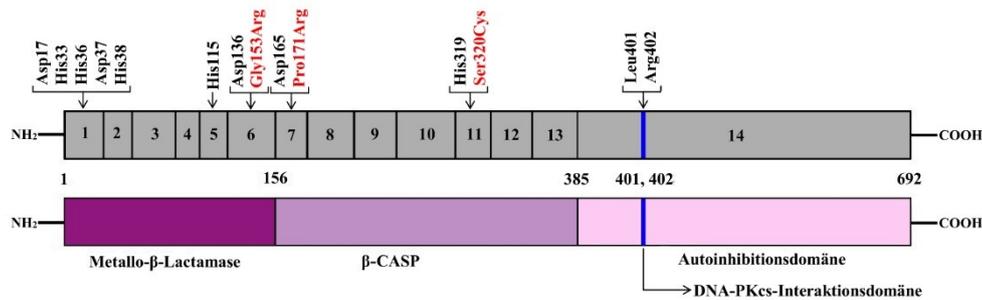


Abbildung 4: Modell des humanen ARTEMIS-Proteins.

Zu sehen ist das ARTEMIS-Protein mit der Metallo-β-Lactamase-Domäne (AS 1-156), der β-CASP-Domäne (Metallo-β-lactamase-associated CPSF ARTEMIS SNM1 PSO2-Domäne), der Autoinhibitionsdomäne und der DNA-PKcs-Interaktionsdomäne sowie die 14 kodierenden Exons. Für die Funktion des ARTEMIS-Proteins bekanntermaßen bedeutende Aminosäuren sind in Schwarz eingezeichnet. Hinzugefügt sind außerdem (in Rot) die in dieser Arbeit häufig heterozygot vorgefundenen Polymorphismen p.Pro171Arg im Exon 6 und p.Gly153Arg im Exon 7. Des Weiteren wurde (ebenfalls in Rot) die einmalig gefundene Variante p.Ser320Cys im Exon 11 aufgezeigt (Abbildung nach Pannicke *et al.*, 2004).

1.7 ARTEMIS-Defizienz und Krebsentstehung

Die Leukämie- und Lymphomentstehung ist häufig auf Chromosomentranslokationen zurückzuführen (Nussenzweig *et al.*, 2010; Rooney *et al.*, 2002). Mangelnde oder gar fehlende NHEJ-Proteine ziehen fehlerhafte oder nicht vollständig ausgeführte V(D)J-Rekombinationen oder NHEJ-Reaktionen nach sich. Dies verursacht unter Umständen sekundäre Chromosomentranslokationen und somit genetische Instabilität, die folglich zu Entartungen führen kann (Lieber M. R., 2016). Die Zunahme des Entartungsrisikos bei Mutationen in NHEJ-Faktoren wird mitunter dadurch erklärt, dass ihnen eine Funktion als genomische „Caretaker“ im Zellzyklus zugesprochen wird (de Miranda *et al.*, 2011). Gemeinsam mit „Gatekeepern“, wie z. B. p53, führen „Caretaker“ zur Kontrolle der Zellproliferation oder Apoptose durch den Zellzyklusarrest nach der G1/2- und G2/M-Phase. Beobachtet wurden diese Mechanismen bereits in Tiermodellen (Bassing *et al.*, 2002; Difilippantonio *et al.*, 2000; Difilippantonio *et al.*, 2002; Ferguson *et al.*, 2000; Rooney *et al.*, 2002; Rooney *et al.*, 2004a). Bei p53-negativen Mäusen und zeitgleicher Inaktivierung von jeweils einem NHEJ-Faktor (KU80, Ligase IV, XRCC4, DNA-PKcs oder ARTEMIS), ergab sich, neben dem entsprechenden Immundefekt, die Entwicklung einer genetischen Instabilität. Diese Instabilität kann bis hin zu aggressiven B-Zelllymphomen vom Pro-B-

Zell-Typ führen (Bassing *et al.*, 2002; Difilippantonio *et al.*, 2000; Difilippantonio *et al.*, 2002; Ferguson *et al.*, 2000; Rooney *et al.*, 2004a). Derselbe Mechanismus der Krebsentstehung ist in Malignom-Patienten nicht auszuschließen: Eine erworbene (somatische) aber auch vererbte hetero- oder homozygote Mutation in einem der relevanten Gene muss nicht zwingend im Phänotyp eines SCID münden, könnte aber zur Erkrankung an Krebs führen. Im Falle zum Beispiel einer hypomorphen *DCLRE1C*-Mutante könnten durch die reduzierte Endo- und Exonukleaseaktivität die Haarnadelstrukturen mitunter benachbarter und somit zugehöriger DNA-Stränge nicht suffizient eröffnet werden. Bezogen auf das NHEJ bei DSB könnten ggf. offene und durch ARTEMIS zu reparierende DNA-Enden nicht ausreichend für die Religation prozessiert werden. Somit verblieben teilweise offene, unpaare DNA-Enden.

Beim Entstehen einer aktivitätssteigernden Mutation von ARTEMIS ist hingegen vorstellbar, dass das Protein vermehrt und ungerichtet DNA schneidet. Hierdurch könnten ebenfalls vermehrt unpaare offene DNA-Enden, mit dem Bestreben zur erneuten Ligation, entstehen. In beiden genannten Beispielen einer ARTEMIS-Mutation könnte eine unwillkürliche und unpaare Religation der offenen DNA-Enden erfolgen. Es resultiert möglicherweise eine Chromosomentranslokation, die eine Krebsentstehung zur Folge haben könnte (Moshous *et al.*, 2003).

Das Protein ARTEMIS wurde bereits in der Vergangenheit mehrfach verdächtigt, in aberrant chromosomalen Rearrangements und somit in der Tumorgenese eine Rolle zu spielen. Mausmodelle mit einer eingebrachten bekannten humanen hypomorphen ARTEMIS-Mutation und ARTEMIS-defiziente Mausstammzellen ließen bereits Chromosomenaberrationen wie Chromosomenfragmente, Translokationen und Telomerfusionen bis hin zur Lymphomentwicklung in den Mäusen beobachten (Rooney *et al.*, 2003; Jacobs *et al.*, 2011). Eine Prädisposition für Epstein-Barr-Virus (EBV)-assoziierte Lymphome und die Entstehung chromosomaler Instabilität konnten in Patienten mit hypomorphen ARTEMIS-Mutationen nachgewiesen werden (Moshous *et al.*, 2003). Bei einem Patienten, der an einer Subklasse einer T-Zell-Akuten Lymphatischen Leukämie (T-ALL) litt, wurde neben anderen Mutationen auch eine ARTEMIS-Mutation identifiziert, sodass über eine ursächliche Beteiligung an der Entstehung der ALL spekuliert wird (Zhang *et al.*, 2012).

An der Iowa State University (USA) wurden Linien von SCID-Schweinen mit verschiedenen ARTEMIS-Varianten selektiert. Trotz Knochenmarktransplantation dieser Tiere traten bei zwei Schweinen T-Zell-Lymphome auf, wovon sich bei einem Tiere hieraus zusätzlich eine Leukämie entwickelte. Die Empfängertiere waren nach der Knochenmarktransplanta-

tion phänotypisch zwar immunkompetent, genetische jedoch noch SCID-Schweine mit ARTEMIS-Mutationen. In einem Fall konnte das T-Zell-Lymphom über Geschlechtschromosomenanalyse der autologen Empfängerlinie zugewiesen werden. Ein drittes Schwein erkrankte an einem Nephroblastom (Powell *et al.*, 2017). Leeksma *et al.* vermuteten zudem einen Zusammenhang zwischen ARTEMIS-Mutationen in der Keimbahn und der Entwicklung von diffusen großzelligen B-Zell-Lymphomen (Leeksma *et al.*, 2017).

1.8 Aufgabenstellung

Unter Berücksichtigung der Erläuterungen unter 1.6 und 1.7, widmet sich diese Arbeit der Frage, ob und in welcher Form eine Mutation im ARTEMIS-Protein zur Krebsentstehung beitragen könnte. Hierfür wurden zwei Hypothesen aufgestellt, die es zu untersuchen gilt: Die erste Hypothese vertritt die Annahme, dass durch erworbene aktivitätssteigernde Mutationen im *DCLRE1C*-Gen (*ARTEMIS*) ein vermehrtes und unreguliertes Schneiden der DNA vonstattengeht. Hieraufhin würden viele, mitunter unpaare, offene DNA-Enden entstehen. Die zweite Hypothese geht von zur Hypomorphie oder auch zum kompletten Funktionsverlust führenden Mutationen von *DCLRE1C* aus. Hierdurch würden möglicherweise nicht alle Haarnadelstrukturen eröffnet und unter Umständen nicht alle Doppelstrangbrüche suffizient repariert werden. Beide genannten Hypothesen könnten zur anschließenden unphysiologischen oder auch ausbleibenden Wiedervereinigung der DNA-Stränge führen. Durch die unpaare und somit unphysiologische oder fehlende Wiedervereinigung würde es möglicherweise zur genetischen Instabilität sowie zu Chromosomentranslokationen kommen. Dies könnte wiederum die Entstehung von Leukämien und Lymphomen begünstigen. Um eine mögliche Korrelation mit diesen beiden Thesen zu analysieren, sollten 198 genomische DNAs aus Leukämie- und Lymphomproben auf Mutationen im *DCLRE1C*-Gen untersucht werden. Die vorliegenden 198 Proben wurden bereits in der Bachelorarbeit von Frau Gitta Heinz auf Bruchpunktmutationen untersucht. Diese Bruchpunktmutationen führen durch die Rekombination zwischen dem ARTEMIS-Pseudogen und dem ARTEMIS-Wildtyp-Gen zur Deletion von Exon 1 - 3 oder Exon 1 - 4. Daraus resultiert eine funktionelle Nullallelie der betreffenden Allele mit möglicher Prädisposition für die Lymphom- oder Leukämieentstehung.

Es sollen nun weitere detaillierte Untersuchungen an den Proben vorgenommen werden. Im Rahmen dieser Arbeit werden die *DCLRE1*-Exons 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 11 und 14 sequenziert und hinsichtlich Mutationen analysiert. Diese Exons beherbergen erwiesenermaßen funktionell bedeutende Aminosäuren (siehe Abbildung 4). Hinzukommend wurden in diesen Exons bereits Mutationen beschrieben, die zur Entwicklung einer SCID-Erkrankung führten. Da diese Mutationen somit bedeutend für die Funktion von ARTEMIS sind, werden sie einer näheren Betrachtung unterzogen. Exon 8, 9, 10, 12 und 13 weisen zum Zeitpunkt der Anfertigung dieser Dissertation laut Literatur keine Aminosäuren auf, die zum aktiven Zentrum von ARTEMIS beitragen. Da jedoch für die Leukämie- und Lymphomenentstehung nach aktivitätsfördernden oder -mindernden Mutationen gesucht wurde, fanden diese Exons in dieser Arbeit keine Berücksichtigung.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Bakterien

One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli*, Invitrogen, Produkt-Nr. C4040-03

Quik Change® XL1-Blue Supercompetent Cells aus dem QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene, Produkt-Nr. 200518

2.1.2 Chemikalien

Accutase, PAA, Produkt-Nr. L11-007

Agar (Agar Kobe I) Carl Roth GmbH, Produkt.-Nr. 5210.2

Agarose (SeaKem® LE Agarose), Lonza, Produkt-Nr. 50004

Ampicillin-Natriumsalz, Sigma-Aldrich, Produkt-Nr. A9518

Borsäure, Merck, Produkt.-Nr 1.00165.5000

Bromphenolblau, Merck, Produkt-Nr. 1081220025

DMSO (Dimethylsulfoxid), Carl Roth GmbH, Produkt-Nr. 4720

100 bp DNA Ladder, Invitrogen, Produkt-Nr. 15628-019

1 kb DNA-Ladder peqGOLD, pegLab, Produkt-Nr. 25-2030

DPBS (Dubecco's Phosphate Buffered Saline), Invitrogen (GIBCO), Produkt-Nr. 14190-004 D0632

EDTA (Titrplex III), Merck, Produkt-Nr. 1.08418.1000

Essigsäure (100 % p. a.), Carl-Roth GmbH, Produkt-Nr. 3738.2

Ethanol absolut zur Analyse, Merck, Produkt-Nr. 1009832511

Ethidiumbromidlösung (0,025 %), Carl Roth GmbH, Produkt-Nr. HP47

FCS (Fetal Bovine Serum Standard Quality), PAA, Produkt-Nr. A15-101

Glycerin, Carl Roth GmbH, Produkt-Nr. 3738.1

Hefeextrakt, Carl Roth GmbH, Produkt-Nr. 2363.2

IMDM, Invitrogen (GIBCO), Produkt-Nr. 21980-065

IPTG, Fermentas, Produkt-Nr. R1171

Isopropanol (Rotipuran > 99,8 %, p. a.), Carl Roth GmbH, Produkt-Nr. 6752.2

Kanamycin sulfate, Sigma-Aldrich, Produkt-Nr. K-4000

Methanol, Merck, Produkt-Nr. 1060091011

Natriumacetat-3-hydrat für Analyse, Riedel-de Haen AG, Produkt-Nr. 32318

Natriumchlorid (Analar Normapur), VWR, Produkt-Nr. 27810.364

Natriumhydroxid Plätzchen, Carl Roth GmbH, Produkt-Nr. 6771.1

Salzsäure rauchend 37 %, Carl Roth GmbH, Produkt-Nr. 1.00317.2500

Tris (Tris-hydroxymethyl-aminomethan), Merck, Produkt-Nr. 1.08382.0500

Trypanblau (Trypan Blue Stain), Invitrogen, Produkt-Nr. 15250-061

Trypton/Pepton aus Casein, Carl Roth GmbH, Produkt-Nr. 8952.3

Wasser steril (Aqua ad iniectabilia), B. Braun Melsungen AG, Produkt-Nr. 3703452

Wasser steril (LiChrosolv water), Merck, Produkt-Nr. 1.15333.1000

X-Gal Solution, Fermentas, Produkt-Nr. R0941

2.1.3 Gele

Agarosegel zur Analyse:

1,0 - 1,2 % Agarose; 50 ml bzw. 100 ml TBE-Puffer; Ethidiumbromid 1 - 3 Tropfen

› Agarosegel zur Aufreinigung:

1 % Agarose; 50 ml bzw. 100 ml TAE-Puffer; Ethidiumbromid 1 - 3 Tropfen

2.1.4 Genomische DNAs

Die für die Versuche benötigten genomischen DNAs wurden aus humanen Lymphom- und Leukämieproben gewonnen. Insgesamt wurden in dieser Arbeit 198 DNA-Proben verwendet.

198 Proben aus leukämischen Zellen oder Lymphomen

Bentz (B): 36 x DNA aus Lymphomen, davon 4 Burkitt-Lymphome und 1 diffus großzelliges B-Zell-Lymphom (Prof. Dr. M. Bentz, damals Abteilung Innere Medizin III, Universitätsklinikum Ulm, jetzt Medizinische Klinik II, Städtisches Klinikum Karlsruhe)

Heidelberg (H): 100 x DNA aus ALLs (Prof. Dr. C.R. Bartram, Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Heidelberg)

Kiel (K): 52 x DNA aus Lymphomen und 3 Hodgkin-Lymphom-Zelllinien (Prof. Dr. R. Siebert, Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Kiel)

Möller (M): 10 x DNA aus gastrointestinalen Lymphomen (Prof. Dr. P. Möller, Pathologie, Universitätsklinikum Ulm)

Test-Kontrollen

Buffy Coat (BC): DNA einer unbekanntes Kontrollperson als Standard-Kontrolle.

2.1.5 Geräte und Programme

BioSprint15 (QIAGEN) zur Minipräparation

Elektrophoresekammer (Bio Rad)

16-Kapillarsequenzierer ABI 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystem)

Mikrotiterplatten-Lesegerät POLARaster Omega (BMG Labtech) und das Auswertungsprogramm Omega

Spectrometer, Beckman DU[®] 640 Spectrometer (Beckman Coulter)

Thermocycler GeneAmp[®] PCR System 9700 (Applied Biosystems)

UV-Transilluminator (312nm) (Phase)

Referenzsequenzen für *DCLRE1C*: <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>

Referenz-Datenbank für Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs):

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>

2.1.6 Kits

Amaya Cell Line Nucleofector Kit V, Lonza, Produkt-Nr. VCA-1003

BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems, Produkt-Nr. 4337451

Cloned Pfu DNA Polymerase Kit, Stratagene, Produkt-Nr. 600154

Expand Long Range dNT Pack, Roche, Produkt-Nr. 04829034001

Fast-Link DNA Ligation Kit, Epicentre Biozym, Produkt-Nr. LK6201H

HiSpeed Plasmid Midi Kit, Qiagen, Produkt-Nr. 12643

HotStarTaq DNA Polymerase Kit, Qiagen, Produkt-Nr. 203205

QIAprep Spin Miniprep Kit, QIAGEN, Produkt-Nr. 1014858

QIAquick PCR Purification Kit, QIAGEN, Produkt-Nr. 28106

QIAquick[®] 96 PCR Purification Kit, QIAGEN, Produkt-Nr. 28181

QIAshredder Kit, QIAGEN, Produkt-Nr. 79654

QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit, Stratagene, Produkt-Nr. 200518

REPLI-g Kit, QIAGEN, Produkt-Nr.150043

RNase-Free DNase Set, QIAGEN, Produkt-Nr. 79254

RNeasy Mini Kit, QIAGEN, Produkt-Nr. 74104

SuperScript II Reverse Transcriptase, Invitrogen, Product-Nr. 18064-014

TOPO-TA-Cloning-Kit, Invitrogen, Produkt-Nr.K4500-01

Ultrafree[®]-DA Gelextraktionskit, Carl Roth GmbH, Produkt-Nr. AE86.1

2.1.7 Medien

Zur Kultur prokaryotischer Zellen:

› LBamp oder LBkan-Medium pH 7,0 (1 l):

10 g Trypton/Pepton, 5 g Hefeextrakt, 10 g Natriumchlorid, 200 µg/ml Ampicillin oder Kanamycin 30 µl/ml, 14 g Agar, ad 1 l vollentsalztes Wasser

Die Medien werden nach Herstellung aber vor Zusatz der Antibiotika autoklaviert.

2.1.8 Primer

Hexamer-Primer:

pd(N)6 Random Hexamer, Pharmacia Biotech (GE Healthcare), Produkt- Nr. 27-2166-01

gDNA-Primer:

Für die Verfielfältigung der gDNA aus den verschiedenen Lymphom- und Leukämieproben-Proben sind die verwendeten Primer in folgender Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Verwendete gDNA (genomische Desoxyribonukleinsäure) -Primer

Primer	Exon	Annealing Temperatur	Sequenz 5'→ 3'	Produktlänge
<i>DCLRE1C</i>				
ART1F	1	58 °C	TGATTGGACGTGGCTGCGTTCGG	380 bp
ART1R	1		ACTGGGACAAGGCGTGTGCTGG	
ART2F	2	58 °C	GAAGACGACTGTTCCCTTGGGC	302 bp
ART2R	2		GAATGAGTTGGGAGGTAAGAGG	
ART3NF2	3	60 °C	TTCACCATGTTGGTCAGACTGG	404 bp
ART3NR2	3		AAGTGATCCATCCGCCAAGG	
ART4F2	4	56 °C	CTGAAACTTCTCTTTGCCCAATTTC	343 bp
ART4WT/R	4		CCCCTAAAACCCCACTCAATG	
ART5NF	5	56 °C	GGTACATAAATGTGTTCTGTGAAGGAGG	293 bp
ART5R	5		CGTCAGCCTCCCAAAGCACTGG	
ART6NF	6	56 °C	GGAACATCTATTACAACTGGGTAGC	464 bp
ART6R	6		TGGTGGCACTGACCTGTTATCC	
ART7NF2	7	58 °C	CATAATTTATATCACATTGGATGGCTAAC	375 bp
ART7NR	7		ACACAACAGGTACGGGCTCC	
ART11NF	11	56 °C	GGTCTACAACAGGTTCCACTTCTGG	351 bp
ART11R	11		GAGATGCTTCTGAGAGTCAGG	
ART14/1NF	14	56 °C	GGCACTTAAATTGTTTCAGCATATCCC	566 bp
ART14/1NR	14		AGCTTTGGTGACTGAGATCCCC	
ART14/2F	14	56 °C	GCTTCACTGCAAGGAGATCTGG	594 bp
ART14/2R	14		TCGTTTAGGTAACTCAGCTTCTGG	
ART14/3NF3	14	52 °C	CCTGGACAAAGCTGACTACAGACC	439 bp
ART14/3NR3	14		AACTCTATTGTAATATTGACTGTCATCTC	
<i>DCLRE1C</i>-Pseudogen (für Long Range-PCR)				
ARTEx3PS/F	3-6	65 °C	GCTGTTTCTGCAGAGATTCC	9379 bp
ARTEx6WT-PS/R	3-6		CTCCATTCTAGCAGCTTCTCC	

Sequenzierprimer:

Die für die Sequenzierung der verschiedenen Lymphom- und Leukämieproben-PCR-Produkte benötigten Primer sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Für Lymphom- und Leukämieproben verwendete Sequenzierprimer.

Primer	Exon	Sequenz 5'→3'
ART1F	1	TGATTGGACGTGGCTGCGTTCGG
ART1R	1	ACTGGGACAAGGCGTGTGCTGG
ART2R	2	GAATGAGTTGGGAGGTAAGAGG
ART3NF2	3	TTCACCATGTTGGTCAGACTGG
ART4WT/R	4	CCCCTAAAACCCCACTCAATG
ART5NF	5	GGTACATAAAATGTGTTCTGTGAAGGAGG
ART5R	5	CGTCAGCCTCCCAAAGCACTGG
ART6NF	6	GGAACATCTATTACAAACTGGGTAGC
ART7NR	7	ACACAACAGGTACGGGCTCC
ART11NF	11	GGTCTACAACAGGTTTCCACTTCTGG
ART14/1NR	14	AGCTTTGGTGACTGAGATCCCC
ART14/2F	14	GCTTCACTGCAAGGAGATCTGG
ART14/3NF3	14	CCTTGGACAAAGCTGACTACAGACC
ART14/3NR3	14	AACTCTATTGTAATATTGACTGTCATCTC

2.1.9 Puffer-Lösungen**Ladepuffer für Agarose-Gele:**

CoralLoad PCR Buffer 10x, QIAGEN, Produkt-Nr.1032517

Tris-acetat-EDTA-Puffer light pH 8,0 (TAE-Puffer light):

40 mM Tris-Acetat; 0,1 mM EDTA und steriles Wasser

Tris-Borat-EDTA-Puffer pH 8,0 (TBE-Puffer):

98 mM Tris-Borat; 2 mM EDTA und steriles Wasser

2.1.10 Restriktionsenzyme

KpnI (10000 U/ml), New England Biolabs, Produkt-Nr. R0142L

NotI (10000 U/ml), New England Biolabs, Produkt-Nr. R0189L

EcoRI (20000 U/ml), New England Biolabs, Produkt-Nr. R0101L

2.1.11 Vektoren**pCR® 2.1-TOPO®:**

Verwendet wurde der pCR® 2.1-TOPO®-Vektor zur Ermöglichung der Bestimmung einzelner Allel-Sequenzen. Der Vektor verfügt über eine lacZ α -Sequenz, welche die Insertionsstelle für das PCR-Produkt beherbergt und wie unter 2.2.1.8 beschrieben die Blau-Weiß-Selektion der inserthaltigen Klone ermöglicht. Durch bestehende Thymidin-Überhänge an der Multiple Cloning Site kann das PCR-Produkt anhand der typischerweise durch Taq-Polymerase generierten Adenin-Überhänge direkt ohne vorangehende Restriktion in den

Vektor ligiert werden. Das Plasmid enthält ein Ampicillin- und auch ein Kanamycin-Resistenzgen. Bezogen wurde der Vektor zusammen mit dem TOPO-TA-Cloning-Kit von Invitrogen unter der Produkt-Nr. K4500-01. (Siehe Abbildung 5).

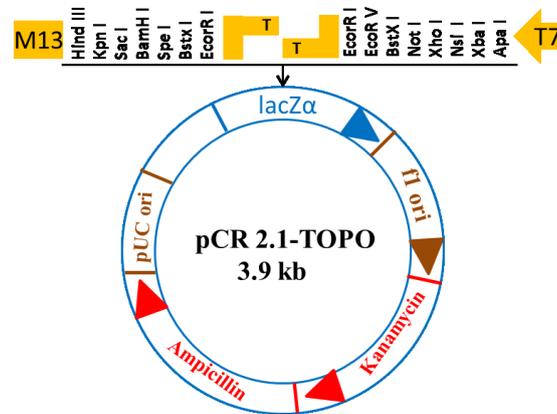


Abbildung 5: Vektorkarte des pCR[®] 2.1-TOPO[®]-Plasmids.

In Blau ist das lacZ α -Gen dargestellt, in welchem die Multiple Cloning Site des Vektors eingebracht ist. Bei Einbringen eines Inserts gerät die Sequenz „off-frame“ und die Expression des Gens unterbleibt. Die Multiple Cloning Site steht in reverser Orientierung zum T7-Promotor. Zur Sequenzierung des Inserts sind Vorwärts- und Rückwärts-Primerbindungsstellen eingebracht. Die Replikation in *Escherichia coli* (*E. coli*) ist ermöglicht durch den pUC Origin (pUC ori). Kodierende Ampicillin- und Kanamycin-Resistenzgen-cDNA (complementary Deoxyribonukleinsäure) sind zur Selektion in *E. coli* vorhanden. Eingezeichnet sind die Restriktionsschnittstellen der Multiple cloning site.

2.1.12 Verbrauchsmaterialien

Zellkulturflaschen 25 cm² (Primaria T25 Cell culture Flask, canted neck, blue vented cap)

Becton Dickinson Biosciences, Produkt-Nr. 353808

Zellkulturflaschen 75 cm² (Primaria T75 Cell culture Flask, canted neck, blue vented cap)

Becton Dickinson Biosciences, Produkt-Nr. 353810

Zellkulturflaschen 175 cm² (mit rotem Filterschraubverschluss), Greiner Bio-One, Produkt-Nr. 469914

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologie

2.2.1.1 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Probe wurde für die Konzentrationsbestimmung im Verhältnis 1:20 mit dem jeweilig verwendeten Puffer verdünnt.

Gemessen wurde die optische Dichte (OD) und somit Absorption des Lichtes bei 260 nm. Berechnet wird die Konzentration anhand der Formel: Ergebnis Netto Absorption x 40 (bei RNA; 50 bei DNA) x 20 (Verdünnungsfaktor). Es wird dadurch die Konzentration in ng/μl erhalten.

(Eine OD₂₆₀ von 1 entspricht einer DNA-Konzentration von 50 ng/μl bzw. einer RNA-Konzentration von 40 ng/μl).

Durch eine zweite OD-Messung bei 280 nm wurde die mögliche Verunreinigung durch Protein bestimmt. Das Verhältnis der Absorption bei 260 nm zur Absorption bei 280 nm ist ein Maß für die Reinheit der Probe und liegt bei proteinfreien DNA-Proben idealerweise zwischen 1,8 und 2,0 (Mülhardt, 2009) Bei RNA liegt das Verhältnis idealerweise zwischen 2,0 - 2,2 (Mülhardt, 2009).

Nur Proben, die dieses Kriterium erfüllten, wurden verwendet.

2.2.1.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Für die Amplifikation auf gDNA wurde das HotStar Taq DNA Polymerase Kit von Qiagen eingesetzt. Für Produkte, welche aus ≥ 1 kb waren, wurde das Expand Long Range dNT Pack von Roche verwendet.

2.2.1.3 Mit HotStar Taq-Polymerase Kit (Qiagen)

Für die Vervielfältigung der verschiedenen ARTEMIS-Exons wurde jeder Ansatz nach folgendem 25 μl-Ansatz Schema pipettiert (Tabelle 3):

Tabelle 3: Pipettierschema für einen 25-μl-PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion)-Ansatz für gDNA (genomische Desoxyribonukleinsäure).

Menge	Substanz
5 μl	Q-Solution
2,5 μl	Taq-Puffer 10 x
2 μl	MgCl ₂ (25 mM) (nur bei Exon 2 und 3)
0,25 μl	dNTPS (20 mM)
0,2 μl	HotStar Taq-Polymerase
1,25 μl	Vorwärts-Primer (10 pmol/μl)
1,25 μl	Rückwärts-Primer (10 pmol/μl)
5 μl	gDNA-Probe (40 ng)
ad 25 μl	Aqua

Tabelle 4: PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion)-Programm für HotStar Taq PCR-Ansatz bei variabler Annealing-Temperatur.

Temperatur	Zeit
95 °C	15 min
95 °C	1 min
X °C	1 min
72 °C	1 min
72 °C	10 min
4 °C	∞

} 35x

Im Teil Material unter 2.1.8 in Tabelle 1 sind die jeweils verwendeten Primer, Annealing-Temperaturen, Elongationszeiten und Längen der entstehenden Fragmente aufgeführt.

2.2.1.4 Long-Range-PCR

Bei der *DCLRE1C*-Pseudogen-Amplifikation wurde, auf Grund des längeren PCR-Produkts von 9379 bp, nach dem Long-Range-PCR-Protokoll verfahren. Die Ansätze wurden nach folgendem in Tabelle 5 gezeigtem 25 µl-Ansatzschema pipettiert.

Die PCR-Zyklen für die Long-Range PCR erfolgten nach dem in Tabelle 6 dargestellten Schema.

Tabelle 5: Pipettierschema für einen 25 µl-PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion) -Ansatz mit dem LongRange PCR-Kit.

Menge	Substanz
13 µl	Aqua
5 µl	P2-Puffer aus Kit
1,25 µl	P6-Puffer aus Kit
0,75 µl	Vorwärts-Primer (10 pmol/µl)
0,75 µl	Rückwärts-Primer (10 pmol/µl)
0,35 µl	P1-Puffer aus Kit
3 µl	gDNA (genomische Desoxyribonukleinsäure)-Probe (24 ng)

Tabelle 6: PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion) -Programm für die Long-Range-PCR.

Temperatur	Zeit
92 °C	5 min
92 °C	15 sec
65 °C	30 sec
68 °C	4 min
68 °C	7 min
8 °C	Unendlich

} 10X
dann + 20sec für jeden Zyklus bei 68 °C } 25x

Im Teil Material unter 2.1.8 in Tabelle 1 sind die jeweiligen variablen PCR-Bedingungen der verschiedenen PCRs wie Annealing-Temperatur, Elongationszeit und Länge der entstehenden Fragmente aufgeführt.

2.2.1.5 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von PCR-Produkten und Plasmiden wurden Gele mit einer Agarosekonzentration von 1,0 - 1,2 % verwendet. Als Gelelektrophoresepuffer diente 1 x TBE-Puffer. Sollte das Produkt aus dem Gel ausgeschnitten werden, wurde 1 x TAE-Puffer als Gelelektrophoresepuffer verwendet, da dieser mit dem zur Aufreinigung verwendeten Ultrafree[®]-DA-Gelextraktionskit kompatibel war.

Für die Herstellung des Gels wurde die benötigte Menge an Agarose durch Aufkochen in 1 x TBE- (oder TAE-) Puffer gelöst. Nach leichtem Abkühlen wurde 1 - 3 Tropfen Ethidiumbromid (0,025%ig) hinzugegeben und zügig ein Gel in erforderter Größe gegossen. Zur Analyse wurden ca. 10 - 20 % des PCR-Ansatzes mit 1/5 Volumen 10 x Ladepuffer *CoralLoad* von QIAGEN versetzt und auf das Gel aufgetragen. Zur Aufreinigung von PCR-Produkten nach einem Restriktionsverdau und bei einem Plasmid-Kontrollverdau wurde die Probe vollständig mit 10 x PCR-Puffer *CoralLoad* versetzt und vollständig auf das Gel aufgetragen.

Um die Proben aufzutrennen, wurde eine Spannung von 80 V an die Gele mit TBE-Puffer und 65 V an die Gele mit TAE-Puffer gelegt.

Anschließend wurde das Ergebnis der Elektrophorese mit einem Geldokumentationsgerät festgehalten.

2.2.1.6 Aufreinigung von Nukleinsäuren

Vor der Sequenzierung wurden die PCR-Produkte unter Einsatz des *PCR Purification Kit* von QIAGEN oder dem *PCR 96 Purification Kit* von QIAGEN aufgereinigt.

Bei der Aufreinigung mit dem *PCR Purification Kit* von QIAGEN wurde gemäß dem Protokoll des Herstellers verfahren, allerdings wurde zuletzt je nach Bandenstärke der Probe auf dem Gel mit 40 - 75 µl dest. Aqua oder Elutionspuffer eluiert.

Bei der Aufreinigung mit dem *PCR 96 Purification Kit* von QIAGEN wurde nach dem Protokoll des Herstellers verfahren. Die aufgereinigten Produkte wurden bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.1.7 DNA-Sequenzierung

Um die verschiedenen PCR-Fragmente/Produkte zu sequenzieren, wurde die Kettenabbruch-Methode nach Sanger (Sanger, 1977) angewandt. Hierfür wurde das *BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit* verwendet.

Eingesetzt wurden 4 - 5 µl des aufgereinigten PCR-Produktes bzw. 500 ng Plasmid-DNA. Die weiteren Reagenzien des 20-µl-Ansatzes wurden wie in Tabelle 7 hinzugegeben.

Anschließend wurde für die Sequenzierreaktion das in Tabelle 8 aufgeführte PCR-Programm Cycle Seq verwendet. Die verwendeten Primer sind unter 2.1.8 in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 7: Pipettierschema für einen 20 µl-Sequenzier-Ansatz.

Menge	Substanz
4 µl	BigDye Reaktionsmix
2 µl	5 x Sequenzierpuffer
0,5 µl	Sequenzierprimer (10 pmol/µl)
X µl	PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion) -Produkt (4-5 µl)/Plasmid (500 ng)
ad 20 µl	Aqua

Tabelle 8: PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion) -Programm Cycle Seq.

Temperatur	Zeit
95 °C	2 min
95 °C	10 sec
60 °C	5 sec
60 °C	2 min
12 °C	∞

} 25x

Diese Proben wurden danach von Mitarbeiterinnen des Routinediagnoselabors der Abteilung Molekulare Diagnostik weiterverarbeitet und mit Hilfe eines 16-Kapillarsequenzierers (ABIPRISM[®]3130xl) sequenziert. Die Sequenzen wurden anschließend manuell mit Referenzsequenzen aus der *Datenbank Human Genome Browser Gateway of the University of California aus Santa Cruz* verglichen.

2.2.1.8 Klonierung in den pCR2.1- TOPO[®] -Vektor unter Blau-Weiß-Selektion

Für die Blau-Weiß-Selektion wurde das *TOPO-TA-Cloning-Kit* von Invitrogen verwendet und nach dem Protokoll des Herstellers verfahren.

Das zu klonierende Produkt musste zunächst anhand einer PCR amplifiziert werden. Die verwendete *HotStar Taq-Polymerase* weist die hierfür nötige hohe Präzision auf. Diese Polymerase generiert allerdings keine für die Insertion in das zu verwendende Plasmid pCR[®]2.1-TOPO benötigten Adenin-Überhänge. Zur Einführung dieser gewünschten Adenin-Überhänge wurde das PCR-Produkt deshalb erneut nach in Tabelle 9 aufgeführtem PCR-Ansatz mit einer herkömmlichen *Taq-Polymerase* prozessiert. Dieser Ansatz wurde für 10 min auf 72 °C erhitzt.

Tabelle 9: 40 µl-Pipettieransatz zur Generierung der Adenin-Überhänge des Inserts.

Menge	Substanz
35 µl	Eluat
4 µl	PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion) -Buffer (10x)
1 µl	dNTPs (2,5 mM)
0,5 µl	Taq-Polymerase

Für die Ligation des Inserts in den TOPO[®] Vektor wurde anschließend nach folgendem Pipettieransatz verfahren (Tabelle 10).

Tabelle 10: 6 µl-Pipettieransatz für Ligation des Inserts.

Menge	Substanz
4 µl	PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion) -Produkt
1 µl	Salzlösung
1 µl	TOPO [®] Vektor

Für die Transformation eines Plasmids in kompetente *E.coli*-Bakterien (*One Shot[®] Chemically Competent E. coli*) wurden nach 5 minütiger Inkubation bei RT 2 µl des Klonierungsansatzes in ein Gefäß mit den vorgelegten *E. coli*-Bakterien (50 µl Suspension) überführt. Die Transformation erfolgte gemäß Herstellerprotokoll.

Zwei LB-Platten wurden mit der in Tabelle 11 aufgeführten Suspension bestrichen und für 30 min getrocknet. Anschließend wurde der Transformationsansatz ungleich aufgeteilt (1/6 und 5/6), auf die beiden LB_{kan}-Platten ausplattiert und bei 37 °C über Nacht im Brutschrank inkubiert.

Tabelle 11: 200 µl-Pipettieransatz für die Substratlösung für die Blau-Weiß-Selektion zur Beimpfung.

Menge	Substanz
100 µl	20 % X-Gal
90 µl	LB-Medium (Kanamycin 30µl/ml)
10 µl	IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) (100mM)

Durch die Insertion des PCR-Produktes in das im Plasmid befindliche LacZ α -Gen, welches die Insertstelle für die zu klonierenden Fragmente beherbergt, gerät dies in ein „Off-Frame“-Leseraster. Daraufhin unterbleiben die Translation des LacZ α -Produktes und die Umsetzung eines auf den Agar hinzugegebenen Substrats X-Gal; die Blaufärbung der betroffenen Bakterienkolonie bleibt aus. Bakterienkolonien mit Insert erscheinen somit weiß. Nach Inkubation bei 37 °C über Nacht im Brutschrank wurden unter den gewachsenen weißen Klonen je Ansatz 15 - 25 der erfolgreich transformierten weißen Klone gepickt.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung von Leukämie-/Lymphomproben auf Mutationen in ausgewählten Exons des *DCLRE1C*-Gens (*ARTEMIS*)

3.1.1 Sequenzanalyse der PCRs von Leukämie-/Lymphomproben

Um Aussagen bezüglich einer möglichen *DCLRE1C*-Mutation als Ursache für die Leukämie-/Lymphomentstehung machen zu können, wurde genomische DNA aus 198 Lymphom-/Leukämieproben mittels PCR amplifiziert und sequenziert. Mit ausgewählten Primer wurden die Exons 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 11 sowie 14 des *DCLRE1C*-Gens vervielfältigt, zur Kontrolle gelelektrophoretisch aufgetrennt und nach anschließender Aufreinigung der Produkte sequenziert. Die genannten Exons kamen für die Analyse zur Verwendung, da für die Funktion des ARTEMIS-Proteins bekanntermaßen relevante Aminosäuren hierin kodiert werden (Pannicke *et al.*, 2004). In diesen Exons befinden sich zudem der überwiegende Teil aller bisher bekannten gesundheitsbeeinflussenden ARTEMIS-Varianten (Pannicke *et al.*, 2010).

Nach Amplifikation der zu untersuchenden Exons in der genomischen DNA der Leukämie-/Lymphomproben, wurden in der Gelelektrophorese die Stärke der Bande und die Banden-Laufhöhe der jeweiligen PCR-Produkte untersucht. Dies geschah, um die erfolgreiche oder unterbliebene Entstehung eines PCR-Produkts sowie die entstandene Produktgröße zu ermitteln. Es ist hierfür in Abbildung 6 ein Gelelektrophorese-Gel als Beispiel zu sehen. Zu erkennen sind hier die Proben H1 - H12, amplifiziert mit den Primern für Exon 3. Aufgetragen sind zudem Negativkontrolle (Wasser) und Positivkontrolle (BC = DNA einer unbekanntem Kontrollperson). Die PCR-Produkte aller Proben wiesen gleichmäßig starke Banden auf der erwarteten Höhe von 404 bp auf.

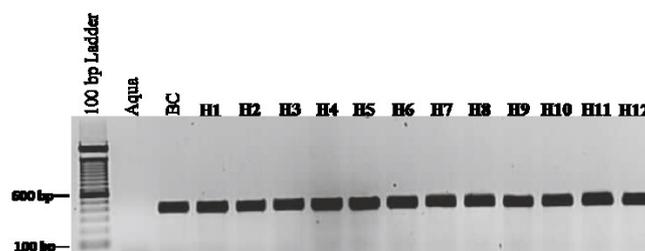


Abbildung 6: PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion) der Proben H1-H12 des *DCLRE1C*-Exons 3.

Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte jeweils nach Amplifikation des entsprechenden *DCLRE1C*-Exons. In der Negativkontrolle (Aqua) ist keine Bande sichtbar, bei der Positivkontrolle (BC = Buffy-Coat) ist wie erwartet eine Bande auf Höhe von ca. 404 bp zu sehen. In den Spuren H1 - H12 sind gleichmäßige Banden auf erwarteter Höhe und entsprechend der Positivkontrolle (BC) auszumachen.

Die Wasserkontrollen waren in allen PCRs stets negativ. Bei Fehlen der Bande einer Probe auf dem ausgewerteten Gel unterlief diese Probe gezielt eine erneute PCR unter gleichen Bedingungen. Bei keiner der Proben erschienen Doppelbanden oder Auffälligkeiten. Musste eine Probe wiederholt amplifiziert werden, bei zuvor ausbleibender Bande, kam stets ein Banden-Signal beim zweiten Versuch zum Vorschein. Alle Banden zeigten das erwartete Laufverhalten.

Zur Sequenzanalyse der einzelnen Proben wurde jeweils einer der Partner des zuvor für die PCR verwendeten Primerpaares eingesetzt. Die Sequenzier-Primer sind bei den Materialien unter 2.1.8 in Tabelle 2 aufgeführt. Waren Wiederholungen aufgrund von Verunreinigungen oder zu geringer Signalstärke der Sequenzen notwendig, wurde der zweite Primer zum erneuten Sequenzieransatz des gleichen PCR-Produktes eingesetzt (unter 2.1.8 Tabelle 1). War die Sequenz weiterhin unlesbar, wurde die PCR der betreffenden Probe wiederholt und erneut mit einem der Primer sequenziert. Bei Auffälligkeiten in der Sequenz wurde die PCR ebenfalls wiederholt und eine erneute Sequenzanalyse angesetzt, jedoch hier mit vor- und rückläufigem Primer.

Keine der Proben schied aufgrund methodischer Komplikationen aus. Alle Proben waren amplifizier- und sequenzierbar.

In Tabelle 12 sind alle Proben, welche Abweichungen relativ zu der Referenzsequenz NM 001033855.1 aufweisen, aufgeführt.

Tabelle 12: Darstellung der Proben, die Abweichungen von der DCLRE1C Referenzsequenz NM 001033855.1 aufwiesen, Art der Veränderung sowie betreffendes Exon und Allelstatus. Die hellrot unterlegten Proben wurden zu weiteren Analysen herangezogen. Die verschiedenen Mutationen sind jeweils farblich voneinander unterschieden.

Probe	Exon	Mutation	Allelstatus
M1	7	c.512C>G p.Pro171Arg	Heterozygot
M5	14/3	c.1884 A>G p.Pro631Pro	Heterozygot
M8	7	c.512C>G p.Pro171Arg	Heterozygot
B4	4	Pseudogen amplifiziert	Heterozygot
B5	7	c.512C>G p.Pro171Arg	Heterozygot
B6	7	c.512C>G p.Pro171Arg	Heterozygot
B12	7	c.512C>G p.Pro171Arg	Heterozygot
B13	6	c.457G>A p.Gly153Arg	Heterozygot
B22	7	c.512C>G p.Pro171Arg	Heterozygot
B30	4	Pseudogen amplifiziert	Heterozygot
K4	4	Pseudogen amplifiziert	Heterozygot
K6	6	c.457G>A p.Gly153Arg	Heterozygot
K9	14/2	c.2001A>G p.Leu667Leu	Heterozygot
K11	7	c.512C>G p.Pro171Arg	Heterozygot
K21	7	c.512C>G p.Pro171Arg	Heterozygot
K24	7	c.512C>G p.Pro171Arg	Heterozygot
K30	7	c.512C>G p.Pro171Arg	Heterozygot
K32	6	c.457G>A p.Gly153Arg	Heterozygot
K33	7	c.512C>G p.Pro171Arg	Heterozygot
K34	7	c.512C>G p.Pro171Arg	Heterozygot
K41	6	c.457G>A p.Gly153Arg	Heterozygot
K42	4	Pseudogen amplifiziert	Heterozygot
	6	c.457G>A p.Gly153Arg	Heterozygot
K45	7	c.512C>G p.Pro171Arg	Heterozygot
K53	7	c.512C>G p.Pro171Arg	Heterozygot
K58	6	c.457G>A p.Gly153Arg	Heterozygot
H3	6	c.457G>A p.Gly153Arg	Heterozygot
H5	14/2	c.2001A>G p.Leu667Leu	Heterozygot
H6	4	Pseudogen amplifiziert	Heterozygot
	7	c.512C>G p.Pro171Arg	Heterozygot
H11	7	c.512C>G p.Pro171Arg	Heterozygot
H20	7	c.512C>G p.Pro171Arg	Heterozygot
H21	7	c.512C>G p.Pro171Arg	Heterozygot
H32	7	c.512C>G p.Pro171Arg	Heterozygot
H45	7	c.512C>G p.Pro171Arg	Heterozygot
H47	14/3	c.1884 A>G p.Pro631Pro	Heterozygot
H48	7	c.512C>G p.Pro171Arg	Heterozygot
H50	6	c.457G>A p.Gly153Arg	Heterozygot
H53	6	c.457G>A p.Gly153Arg	Heterozygot
	7	c.512C>G p.Pro171Arg	Heterozygot
H56	11	c.959C>G p.Ser320Cys	Heterozygot
H58	6	c.457G>A p.Gly153Arg	Heterozygot
H63	7	c.512C>G p.Pro171Arg	Heterozygot
H77	4	Pseudogen amplifiziert	Heterozygot
H81	7	c.512C>G p.Pro171Arg	Heterozygot
H84	7	c.512C>G p.Pro171Arg	Heterozygot
H89	7	c.512C>G p.Pro171Arg	Heterozygot
H92	7	c.512C>G p.Pro171Arg	Heterozygot

Insgesamt hatten 45 der 198 Proben Abweichungen zur *DCLRE1C* -Wildtyp-Sequenz. Aus Tabelle 12 ist zu entnehmen, dass vier Proben (M5, K9, H5, H47) Einzelnukleotid-Polymorphismen aufwiesen, welche keinen Aminosäureaustausch bedingen und daher nicht weiter berücksichtigt wurden. Der SNP p.Pro171Arg wurde 27-mal detektiert und macht somit ca. 6,82 % der insgesamt 396 Allele aus. Der SNP p.Gly153Arg war 10-mal

nachzuweisen und hat somit einen Prozentanteil von ca. 2,53 % aller untersuchten Allele. Beide SNPs bedingen einen Aminosäureaustausch. Diese wurden bereits in der Arbeit von Frau Kristin Gebauer auf Effizienzveränderung im V(D)J-Rekombinations-Assay untersucht (Gebauer, K. 2011). Anders als von Woodbine *et al.*, 2010, vermutet, wurde bezüglich *p.Pro171Arg* keine Aktivitätsreduktion festgestellt. Auch *p.Gly153Arg* zeigte normale Aktivitäten in der V(D)J-Rekombination.

Die Probe H53 beinhaltet beide Polymorphismen, *p.Pro171Arg* und *p.Gly153Arg* zugleich. Diese liegen jeweils heterozygot vor. Auf diese Konstellation sowie die Verteilung der Polymorphismen auf die jeweiligen Allele in Probe H53 wird in Kapitel 3.1.3 noch näher eingegangen.

In Probe H56 ist der SNP *p.Ser320Cys* auffällig geworden (ca. 0,25 % aller untersuchten Allele). Dieser SNP wurde bisher noch nicht auf Aktivitätsänderung in der V(D)J-Rekombination überprüft.

Aus der Tabelle geht des Weiteren hervor, dass das funktionslose ARTEMIS-Pseudogen, welches im Bereich Exon 4 neben dem ARTEMIS-Wildtyp vorliegt, sechsmalig amplifiziert wurde (ca. 1,52 % aller untersuchten Allele). Dies ist nahezu deckungsgleich mit den Ergebnissen in der Arbeit von Gitta Heinz (Heinz, 2007). Hierbei wurde bei der Durchführung spezifizierter PCR zur Suche nach Deletionen von Exon 1 - 3 und 1 - 4 in den gleichen vorliegenden Leukämie-/Lymphomproben ebenfalls fünfmalig heterozygot das Pseudogen koamplifiziert. Eine Ausnahme bildet die Probe K4, bei welcher von Frau Heinz das Exon 4 des Pseudogens nicht koamplifiziert wurde.

3.1.2 Untersuchung der sechs amplifizierten Pseudogensequenzen

Für die sechs Proben B4, B30, K4, K42, H6, H77 wurde bei der Untersuchung des *DCLRE1* Exon 4 der Lymphom-/Leukämieproben das *DCLRE1C*-Pseudogen mitamplifiziert. Frau Heinz konnte ebenfalls bei fünf dieser sechs Proben das Pseudogen mitamplifizieren (B4, B30, K42, H6, H77). Dieses Phänomen wurde an den von Frau Heinz im Rahmen ihrer Bachelorarbeit untersuchten fünf Proben zusammen mit der sechsten Probe K4 nochmals eingehend untersucht (Heinz, 2007). In der Region der Primerbindungsstelle ART4WT/R unterscheidet sich die Wildtyp-*DCLRE1C*-Sequenz von der in der Pseudogen-*DCLRE1C*-Sequenz in nur einem Nukleotid. Im Pseudogen handelt es sich hierbei um die Nukleotid-Stelle -67631 und repräsentiert ein Adenin. In der Wildtyp-Sequenz geht es um die Nukleotid-Stelle +14365 und diese repräsentiert ein Cytosin. Die Zahlenangaben beziehen sich auf die Referenzsequenz NM_001033855 aus der „GenBank“ und auf das ATG im ARTEMIS-Exon 1 der cDNA als Nukleotid +1.

Es wird vermutet, dass es an besagter Stelle des Pseudogens zum Auftreten eines Polymorphismus (rs59986095) gekommen ist, der zum Austausch des Adenins gegen ein Cytosin führt. Wäre ein derartiger Polymorphismus in den sechs Proben vertreten, wäre das Binden des Primers ART4WT/R auch im Pseudogen ermöglicht und würde, neben der Amplifikation des *DCLRE1C*-Wildtyps, auch zur Amplifikation des Pseudogens führen.

Die Primerbindungsstelle ART4WT/R im Pseudogen wurde in diesen Proben auf die Möglichkeit eines vorliegenden Polymorphismus untersucht. Hierfür wurden zwei Primer entworfen, die die fragliche Sequenzstelle im Pseudogen umspannen (ART3PS/F<>ART6WT_PS/R). Damit wurden K4 und die weiteren fünf Proben mittels PCR amplifiziert. Erwartet wurde ein 9379 bp langes Produkt, was für alle Proben bestätigt werden konnte. (Methode: Die Amplifikate wurden aufgereinigt und sequenziert.) In Abbildung 7 sind Ausschnitte aus den Ergebnissen der Sequenzanalyse sowie die Bindungsstelle für den ART4WT/R-Primer im *DCLRE1C*-Wildtyp beispielhaft dargestellt. Die Stellen, an denen sich die Sequenzen um ein Nukleotid unterscheiden, sind markiert. Die Primerbindungsstellen für den Primer ART4WT/R sind eingezeichnet. In der Pseudogen-Sequenz konnte eine Heterozygotie detektiert werden, welche sich an oben beschriebener und von der Wildtyp-Sequenz zu unterscheidender Stelle befindet (Nukleotid-Stelle 67631 in Bezug auf die Referenzsequenz NM_001033855). Neben dem im Pseudogen für gewöhnlich vorkommenden Adenin befand sich hier zudem ein Cytosin. Dadurch entsprach diese Sequenzabfolge der Primerbindungsstelle ART4WT/R im ARTEMIS-Wildtyp. Dies ermöglichte die Bindung dieses Primers und erlaubte somit die zusätzliche Amplifikation des Pseudogens in den sechs Proben. Diese Konstellation bestätigte sich für alle sechs untersuchten Proben in heterozygoter Ausführung.

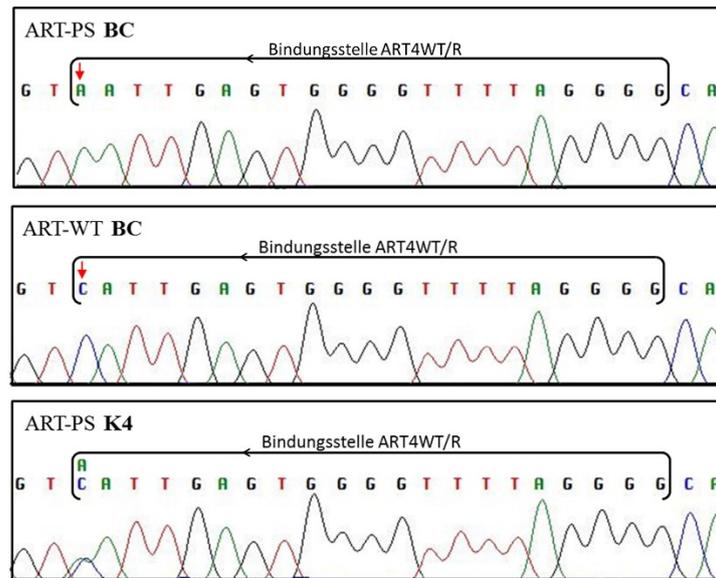


Abbildung 7: Ausschnitte der *DCLRE1C*-WT (Wildtyp) -, *DCLRE1C*-PS (Pseudogen) -Sequenz sowie des Vergleichs-Pseudogen-Ausschnittes der Probe K4 mit eingezeichneten Primerbindungsstellen.

Vergleichende Darstellung eines Ausschnittes der ARTEMIS-Wildtyp- und ARTEMIS-Pseudogen-Sequenz in Referenzsequenzen (BC = Buffy-Coat) (Sequenz mit Vorwärts-Primer ARTE_x3PS/F sequenziert). Zudem ist derselbe Ausschnitt der ARTEMIS-Pseudogen-Sequenz in Probe K4 dargestellt. Die Bindungsstellen für den Primer ART4WT/R sind eingezeichnet. Zudem ist das Nukleotid, welches in der ART4WT/R-Bindungsstelle die Wildtyp- von der Pseudogen-Sequenz unterscheidet, mit einem roten Pfeil markiert. In der Pseudogen-Sequenz der Probe K4 ist die Heterozygotie für die Nukleotide Adenin und Cytosin an besagter Stelle zu sehen. Dadurch ist die zusätzliche Bindung des Primers ART4WT/R an entsprechender Stelle ermöglicht.

3.1.3 Analyse zur Verteilung beider Polymorphismen p.Gly153Arg und p.Pro171Arg auf die Allele in Probe H53

Die beiden SNPs p.Gly153Arg und p.Pro171Arg werden bisher nur einzeln auf ihre Funktionalität geprüft. Das gemeinsame Vorkommen der beiden SNPs in einem Protein könnte die Funktionalität der Nuklease ARTEMIS beeinträchtigen, weshalb zunächst das Verteilungsmuster der beiden SNPs auf die Allele überprüft werden sollte.

3.1.3.1 Klonierung der DNA-Probe H53 in *E. coli*-Bakterien

Zunächst wurde hierfür die Probe H53 anhand einer PCR amplifiziert, bei der die Primer (ART6NF und ART7NR) die beiden SNPs umfassen. Das PCR-Produkt hatte eine erwartete Länge von 1341 bp. Die Sequenzen des Produktes wurden auf Übereinstimmung mit der Referenzsequenz überprüft. Die für die Polymorphismen heterozygoten Stellen konnten bestätigt werden. Anschließend konnte das überprüfte PCR-Produkt in Plasmide ligiert werden, um die Allele einzeln in den Plasmiden zu klonieren. Die Allele wurden durch Transformation in Bakterien voneinander separiert.

3.1.3.2 Auswertungen der Analyse zur Verteilung der SNPs auf die Allele in Probe H53

Für die Durchführung der Klonierung wurde das TOPO-TA-Cloning-Kit von Invitrogen verwendet und anhand der Blau-Weiß-Selektion verfahren. Durchgeführt wurde das Experiment zweimalig.

In beiden Versuchen waren stets neben wenigen blauen auch weiße und somit inserttragende Kolonien gewachsen. Daher wurden beim ersten Versuch 15 und beim zweiten Versuch 25 Kolonien gepickt, angeimpft und vermehrt. Die aus den Klonen, anhand Minipräparation, gewonnene DNA wurde anhand eines Restriktionsverdau und anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung auf das Vorhandensein des Inserts sowie auf Verunreinigungen überprüft. Bei beiden Versuchen waren Banden in Höhe von ca. 1,3 kb, welche der Produktlänge des Inserts entsprachen, sowie Banden auf Höhe des Plasmids von 3,9 kb zu detektieren. Es bestanden des Weiteren keine Verunreinigungen. Die DNA aus den gewonnenen Minipräparaten, welche jeweils nur ein Allel aus Probe H53 beinhalten sollten, wurden je mit beiden für die zur PCR-Anfertigung verwendeten Primer sequenziert und ausgewertet. Die Ergebnisse hierzu sind in Tabelle 13 zusammengefasst. Zudem ist in Abbildung 8 eine schematische Darstellung der möglichen vermuteten Allel-Zusammensetzungen und ebenfalls deren vorkommende Anzahl zu sehen.

Tabelle 13: Verteilung der ARTEMIS-SNPs p.Glu153Arg und p.Pro171Arg auf die jeweiligen Klone.

	Exon 6		Exon 7	
Versuch 1				
Klon	Wildtyp (GGG)	SNP p.Gly153Arg (AGG)	Wildtyp (TGG)	SNP p.Pro171Arg (TCG)
1	X			X
2		X	X	
3	X			X
4		X	X	
5	X			X
6		X	X	
7	X			X
8		X	X	
9		X	X	
10		X	X	
11	X			X
12	X			X
13	X			X
14		X	X	
15		X	X	
Versuch 2				
1	X			X
2	X		X	
3		X	X	
4	X			X
5		X	X	
6	X			X
7	X			X
8	X		X	
9	Sequenz nicht lesbar			X
10		X	X	
11		X	X	
12		X	X	
13		X	X	
14		X	Sequenz zu kurz	
15	Sequenz nicht lesbar		X	
16	Sequenz nicht lesbar		X	
17	X			X
18		X	Sequenz zu kurz	
19	X		X	
20	X			X
21		X	X	
22		X	X	
23		X	X	
24	X		Sequenz zu kurz	
25		X	X	

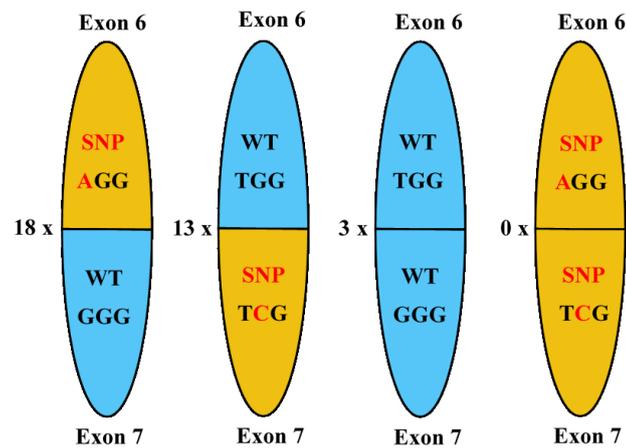


Abbildung 8: Schematische Darstellung der möglichen Allel-Verteilung in Probe H53.
(SNP = Single Nucleotide Polymorphism, WT = Wildtyp)

Aus Tabelle 13 geht die Verteilung der *DCLREIC*-SNPs p.Glu153Arg und p.Pro171Arg auf die jeweiligen Klone hervor. Die Verteilung der Wildtyp-*DCLREIC*-Sequenz des Exons 6 konnte in Assoziation mit dem den SNP p.Pro171Arg (rs35441642) bedingenden Nukleotid-Austausch des *DCLREIC*-Gens (Guanin zu Cytosin, an Stelle 512 im Exon 7) 13-mal nachgewiesen werden. Andersherum konnte der SNP p.Gly153Arg, bedingt durch den Nukleotid-Austausch Guanin zu Adenin an Stelle 457 in der *DCLREIC*-Sequenz des Exon 6 assoziiert mit der Wildtyp-*DCLREIC*-Sequenz in Exon 7, 18-mal nachgewiesen werden. 3-mal erschien die Allel-Variante, in der die *DCLREIC*-Wildtyp-Sequenz sowohl in Exon 6, als auch in Exon 7 vorkommt. 6-mal waren die Sequenzen unlesbar bzw. zu kurz, um eine gewissenhafte Auswertung vornehmen zu können. Aus diesen Ergebnissen konnte insgesamt geschlossen werden, dass die vorliegenden SNPs auf getrennten Allelen lokalisiert waren. Somit war es nicht notwendig, die Kombination SNP1 + SNP2 im selben ARTEMIS-Protein auf eine mögliche Beeinflussung der ARTEMIS-Aktivität zu prüfen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass in der Untersuchung der 198 Leukämie-/Lymphomproben auf mögliche Mutationen in Exon 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 11 und 14 des *DCLREIC*-Gens, als Ursache für die Malignomenstehung, die beiden SNPs p.Pro171Arg in 27 Proben und p.Gly153Arg in zehn Proben nachgewiesen wurden. Die aus den Polymorphismen resultierenden Protein-Varianten rufen bekanntermaßen keine Aktivitätsänderungen der Nuklease ARTEMIS im Mechanismus der V(D)J-Rekombination hervor. In einer Probe wurden beide Polymorphismen zugleich vorgefunden, was zunächst die Frage der Verteilung auf die jeweiligen Allele aufwarf. Es zeigte sich, dass die beiden SNPs auf getrennten Allelen vorlagen. Daher wurde die Prüfung einer möglichen Änderung der V(D)J-Rekombinations-Aktivität aufgrund eines ARTEMIS-Proteins mit beiden beinhaltenden Polymorphismen obsolet.

In sechs Fällen wurde im Bereich des Exons 4 neben der *DCLRE1C*-Wildtyp-Sequenz auch die *DCLRE1C* Pseudogensequenz amplifiziert. Hier konnte anhand spezifischer PCRs eine heterozygote Stelle in der *DCLRE1C*-Pseudogensequenz ausgemacht werden, die durch den bestehenden Nukleotid austausch identisch mit der Bindungsstelle für den Primer ART4WT/R in der *DCLRE1C*-Wildtyp-Sequenz war. Der Primer konnte folglich auch in der Pseudogen-Sequenz an besagter Stelle binden und ermöglichte neben der Amplifikation der *DCLRE1C*-Wildtyp-Sequenz auch die Amplifikation der *DCLRE1C*-Pseudogen-Sequenz.

4 Diskussion

4.1 Untersuchung der Leukämie- und Lymphomproben auf Mutationen in *DCLRE1C*

Untersucht werden sollten in diesem Teil der Arbeit 198 humane Leukämie- und Lymphomproben. Gesucht werden sollten in diesen Proben mögliche Malignom assoziierte *DCLRE1C*-Mutationen. Hierzu wurden verschiedene *DCLRE1C*-Exons der Proben per PCR amplifiziert und anschließend sequenziert.

Zu berücksichtigen war, dass das vorhandene Material sowohl bereits stark verdünnt als auch in geringer Volumenmenge vorlag, sodass sich die Untersuchungen auf speziell hierfür ausgewählte und besonders relevante Exons beschränken musste.

In der Auswahl der zu analysierenden Exons des *DCLRE1C*-Gens wurde darauf Wert gelegt, dass besonders Exons berücksichtigt wurden, in denen bereits funktionsbeeinträchtigende Mutationen in der gängigen Literatur beschrieben waren (Pannicke *et al.*, 2010). Zudem sollten die zu untersuchenden Exons erwiesenermaßen wichtige, für die endonukleolytische Aktivität benötigte Aminosäuren beherbergen (Pannicke *et al.*, 2004). Diese Kriterien trafen laut Literatur für Exon 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 sowie Exon 11 zu, weshalb ihre Sequenzen in den vorliegenden Leukämie-/Lymphom-Proben analysiert wurden (Moshous *et al.*, 2010; Pannicke *et al.*, 2004; Pannicke *et al.*, 2010). In Exon 14 wurde bereits eine Mutation beschrieben, auf welche die Entstehung einer hypomorphen ARTEMIS-Variante zurückzuführen ist und die mit der Entstehung von Lymphomen assoziiert ist (Jacobs *et al.*, 2011; Moshous *et al.*, 2003). Exon 14 kodiert Aminosäuren des C-Terminus. Mutationen können hier eine Rolle in der Krebsentstehung spielen, da der C-Terminus regulatorische Aufgaben im ARTEMIS-Protein zu erfüllen hat. Es wurde daher der Entschluss gefasst, auch Exon 14 zu analysieren.

Dennoch ist anzumerken, dass ebenso in anderen, nicht im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Exons relevante Mutationen für die Lymphom- und Leukämieentstehung vorhanden sein könnten. An der Iowa State University (USA) wurden Zuchtlinien von Schweinen mit zwei verschiedenen ARTEMIS-Varianten selektiert. Diese Schweine durchliefen eine Knochenmarktransplantation mit Wildtyp Zellen, um genetische SCID-Schweine mit phänotypischer Immunkompetenz zu erhalten. Vier von neun Tieren wurden erfolgreich transplantiert. Bei zweien dieser Schweinen trat im Verlauf ein T-Zell Lymphom auf. Eines dieser Schweine erkrankte zusätzlich an Leukämie. Da die neoplastischen Zellen eines der Schweine jeweils vornehmlich männlich waren, konnte gezeigt werden, dass die Lymphomzellen nicht von dem weiblichen Spendertier, sondern tatsächlich von dem männlichen

ARTEMIS defizienten Empfängertier selber stammen musste (Powell *et al.*, 2017). Beide Schweine trugen die gleiche homozygote ARTEMIS-Variante mit einer Mutation im Intron 8. Die Mutation führt zur Deletion von 141 Nukleotiden sowie Exon 8. Es resultiert hieraus vermutlich ein partieller und kein kompletter Funktionsausfall des ARTEMIS-Proteins (Powell *et al.*, 2017). Folglich könnte es von Interesse sein, auch die hier nicht untersuchten Exons für weitere Sequenzanalysen heranzuziehen. Aufgrund der reduzierten Materialmenge ist dies jedoch möglicherweise nicht mehr für alle Proben umsetzbar

Die Grundlage dieser Untersuchungen stützte sich auf die Hypothese eines aktivitätsveränderten ARTEMIS-Proteins und die dadurch bedingte Malignomentstehung. Es bestanden zwei verschiedene Hypothesen bezüglich der Aktivitätsänderung:

Auf der einen Seite könnte es sein, dass durch Mutationen im *DCLRE1C*-Gen Aktivitätsminderungen (= "down"-Mutante) des Proteins verursacht werden. Hierbei würde es sich um sogenannte „hypomorphe Mutationen“ handeln. Auf der anderen Seite existierte gleichfalls die Vorstellung einer funktionssteigernden *DCLRE1C*-Mutation (= "up"-Mutation). Beide Mechanismen könnten zur Entstehung von chromosomalen Aberrationen und zur Auslösung von Neoplasien führen.

In vivo würde eine hypomorphe ARTEMIS-Aktivität bedeuten, dass nicht alle bei der V(D)J-Rekombination auftretenden Haarnadelstrukturen geöffnet werden könnten. Diese Haarnadelstrukturen sind im Stande, in Lymphozyten zu akkumulieren, und könnten durch alternative Reparaturmechanismen wieder miteinander verknüpft werden, wobei diese Religatur jedoch fehlerhaft vonstattengehen könnte. Denkbar wäre zudem, dass DSB-Intermediate der V(D)J-Rekombination mit den noch geschlossenen Gegenstücken ligiert und dabei unphysiologisch mit anderen Genabschnitten rekombiniert werden. Eine analoge Argumentation kann für Enden, die im Rahmen von NHEJ durch ARTEMIS prozessiert werden müssen, vorgebracht werden. Insgesamt könnten hierdurch genetische Instabilitäten und Chromosomentranslokationen verursacht werden. Eine bereits beschriebene Ursache für eine Translokation von Chromosomen durch Fehlleitung ist die falsche Nutzung RSS-ähnlicher Sequenzen (Küppers *et al.*, 2001, Murga Penas *et al.*, 2010). Durch das Schneiden korrekter RSS an Genen für BCR- und TCR-Loci und das irrtümliche Erkennen illegitimer kryptischer RSS an Protoonkogenloci besteht die Möglichkeit einer Translokation zwischen diesen beiden Genloki. Beispielhaft für diesen Vorgang seien hier die t(14;18)(q32;q21)/IGH-BCL2 Translokation in FL und die t(11;14)/CCND1-IGH in MCL genannt (Jäger *et al.*, 2000; Küppers *et al.*, 2001; Welzel *et al.* 2001).

Laut der zweiten aufgestellten Hypothese könnte bei ARTEMIS die vermutete Autoinhibition des Enzyms verändert und dadurch ein Funktionsgewinn des Proteins bedingt sein:

Der endonukleolytische Anteil des ARTEMIS-Proteins unterliegt der Kontrolle durch die proteineigene C-Terminale Domäne (Niewolik *et al.*, 2017). Durch die Phosphorylierung sowie Bindung der DNA-PK_{CS} am C-Terminus wird laut der bisherigen Literatur die Autoinhibition des ARTEMIS-Proteins aufgehoben. Für die Endonuklease-Aktivität von ARTEMIS ist diese Aktivierung vermutlich unabdingbar. Die Ursache für den Verlust dieser Eigenkontrolle könnte in einer mutationsbedingten Konformationsänderung des C-Terminus liegen, die zu dessen Funktionsänderung oder -verlust führt und eine Bindung am C-Terminus und eine Phosphorylierung des ARTEMIS-Proteins durch die DNA-PK_{CS} obsolet macht.

Hierdurch entstandene hyperaktive ARTEMIS-Varianten könnten unreguliert im Genom endo- und exonukleolytisch schneiden, wodurch gehäuft DSB entstehen würden. Diese könnten zu onkogenetischen Translokationen im gesamten Genom führen. Dadurch entstehenden Entartungen könnten sich molekulargenetisch von denen unterscheiden, die durch hypomorphe ARTEMIS-Varianten ausgelöst werden. So würden sich die Translokationen, die durch hypermorphe ARTEMIS-Varianten entstanden sind, weniger bevorzugt in den TCR- und BCR-Loci abspielen, sondern ganz ohne Präferenzen im ganzen Genom und an Überhängen, Einzel- als auch an Doppelsträngen der DNA stattfinden. Das vermehrte Schneiden der DNA könnte das gesamte Chromatin betreffen. Dies ließe sich durch die struktur-, aber nicht sequenzspezifischen Erkennungen von Schnittstellen durch ARTEMIS erklären. Insbesondere Mutationen im Exon 14 von *DCLRE1C* könnten an dieser Tumorentstehung beteiligt sein (Moshous *et al.*, 2003; Jacobs *et al.*, 2011). Es wird vermutet, dass die C-terminale Domäne für die Modulation der ARTEMIS-Aktivität von großer Bedeutung ist (Niewolik *et al.*, 2006; Jacobs *et al.*, 2011).

Der Zusammenhang zwischen ARTEMIS-Mutationen und Krebsentstehung liegt in der Relevanz des Vorhandenseins von intakten NHEJ-Faktoren zur Prävention von Translokationen. Fallen NHEJ-Faktoren aus, kommen alternative Non-Homologous End-Joining Wege wie zum Beispiel das Microhomology-mediated end-joining (MMEJ), der alternative NHEJ (A-NHEJ oder Alt-NHEJ) oder das backup NHEJ (B-NHEJ) und deren Faktoren zum Einsatz. Diese führen zur vermehrten Prädisposition gegenüber Chromosomentranslokationen im Menschen (Lieber *et al.*, 2008; Zhang and Rowley, 2006). Vermutet wird, dass unvereinte DNA-Enden in Lymphozyten akkumulieren und durch die alternativen Reparatur-Mechanismen fehlerrepariert werden (Brandt und Roth, 2009). Die Relevanz von NHEJ-Faktoren in der Suppression von onkogenetischen Translokationen in Mäusen ist bereits gut etabliert. So konnte in Mäusen mit Artemis-, Xrcc4-, Ku80- als auch Lig IV-Defizienz im Laufe der Zeit eine Pro-B-Zell-Lymphomentwicklung

beobachtet werden. Diese Pro-B-Zell-Lymphome weisen Chromosomen-Translokationen auf, welche den *IgH* und *c-myc* Locus oder im Falle der ARTEMIS-Defizienz die *N-Myc*-Gene involvieren (Difilippantonio *et al.*, 2000; Difilippantonio *et al.*, 2002; Gao *et al.*, 2000; Rooney *et al.*, 2004a; Zhu *et al.*, 2002). In einem Mausmodell konnte ebenfalls die Entstehung von genetischer Instabilität sowie Chromosomentranslokationen bis hin zur Pro-B-Zell-Lymphomentwicklung auf Basis einer hypomorphen ARTEMIS-Variante aufgezeigt werden (Jacobs *et al.*, 2011). Diese Publikation untermauert eine der Hypothesen dieser Arbeit. Aufgezeigt wurde in der Arbeit von Jacobs *et al.*, dass eine inkomplette Aktivität von ARTEMIS zur Tumorentstehung beigetragen hat. Für komplette ARTEMIS-Defekte konnte dies bisher noch nicht beschrieben werden. Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit vor allem nach hypomorphen bzw. aktivitätssteigernden Mutationen in *DCLRE1C* gesucht. Die Hypothese, dass aktivitätsvermindernde Mutationen zur Anhäufung unpaarer, offener und geschnittener 5'- oder 3'-DNA-Enden führten, kann nicht mehr uneingeschränkt vertreten werden. In Untersuchungen mit Mausmodellen konnte zwischenzeitlich gezeigt werden, dass in den Lymphozyten mit der hypomorphen ARTEMIS-Variante eben nicht die unpaaren, offenen DNA-Enden, sondern durch Hairpin verschlossene Coding-Enden akkumulieren (Jacobs *et al.*, 2011). Da von einer undetektierbaren Menge an offenstehenden Überhängen die Sprache ist, kann jedoch davon ausgegangen werden, dass die wenigen, unter Umständen nicht detektierten Überhänge bereits ausreichen, um die krebsauslösenden Chromosomen-Translokationen zu bewerkstelligen. Die im Rahmen dieser Arbeit aufgestellte Hypothese zum Mechanismus der Leukämie-/Lymphomentstehung durch hypomorphe ARTEMIS-Varianten wird damit durch die Untersuchungen in dieser Arbeit nicht widerlegt.

In der Analyse der vorliegenden Leukämie-/Lymphomproben wurden lediglich heterozygot auftretende SNPs auffällig. Weitere bisher unbeschriebene Mutationen, die zum Beispiel zur Verkürzung des Proteins, zur funktionellen oder generellen Null-Allelie führen, waren nicht auffindbar. Den SNPs, bei welchen ein Aminosäureaustausch stattfindet, wurde erhöhte Aufmerksamkeit zuteil, da eine Aktivitätsänderung von ARTEMIS erwartet werden könnte. SNPs, welche keinen Aminosäureaustausch mit sich zogen, wurden nicht weiter beachtet, obgleich diese z. B. Einfluss auf die Prozessierung der mRNA haben könnten (Hunt *et al.*, 2014). Der SNP p.Pro171Arg wurde 27-mal detektiert und macht somit 6,82 % der insgesamt 396 Allele aus. Dies entspricht ungefähr den Angaben der Datenbank dbSNP (NCBI), nach welcher eine durchschnittliche Allelhäufigkeit von 1,3 % - 17,4 % in verschiedenen Bevölkerungsgruppen zu verzeichnen ist. Der SNP p.Pro171Arg musste trotz seines häufigen Vorkommens in den DNA-Proben in den vorliegenden Leu-

kämie-/Lymphomproben nicht weiter untersucht werden. Frau Kristin Gebauer hatte bereits Analysen bezüglich deren Funktionalität durchgeführt und in ihrer Diplomarbeit mit dem Ergebnis veröffentlicht und diskutiert (Gebauer, K. 2011).

Woodbine *et al.* stellten die Behauptung auf, dass die ARTEMIS-Variante p.Pro171Arg *in vitro* zur Beeinträchtigung der ARTEMIS-Aktivität führt (Woodbine *et al.*, 2010). Dieser SNP kam heterozygot in einem SCID-Patienten zum Vorschein. In Zellen des Patienten zeigten sich Defekte in der DSB-Reparatur, zudem war eine erhöhte Strahlensensitivität der Fibroblasten nachweisbar. Im Vergleich zum WT-ARTEMIS zeigte sich eine um das dreifach verringerte Nukleaseaktivität im *in vitro* Nuklease-Assay. Transparent wurde, dass diese ARTEMIS-Variante daher bei monoallelischer Expression zum Immundefekt im Erwachsenenalter führt.

Die von Woodbine *et al.* vermutete hypomorphe Aktivität des Polymorphismus wurde von Frau Gebauer in Bezug auf einen möglichen Einfluss auf die V(D)J-Rekombinationseffizienz widerlegt. Bezüglich der in dieser Arbeit ausserdem vorgefundenen ARTEMIS-Variante p.Gly153Arg konnte Frau Gebauer ebenfalls eine Normaleffizienz im V(D)J-Rekombinations-Assay ermitteln. Der SNP p.Gly153Arg war 10-mal jeweils heterozygot nachzuweisen und hat somit einen Prozentanteil von ca. 2,52 % an allen hier vorliegenden Proben. In der Datenbank dbSNP (NCBI) war dieser SNP mit einer Allelhäufigkeit von 0,0 - 4,5 % in verschiedenen Bevölkerungsgruppen angegeben.

Es wurden in dieser Arbeit für alle SNPs stets heterozygote Vererbungssituationen vorgefunden. Dies bedeutet, dass selbst bei einer hypomorphen Aktivität der jeweiligen ARTEMIS-Variante in der Regel neben dem betroffenen Allel auch ein gesundes exprimiert werden würde. Es müsste durch molekulare Mechanismus die Ausschaltung des gesunden Partner-Allels anfallen, um zum Beispiel die Grundlage der in der Literatur beschriebenen Reduktion der V(D)J-Rekombinationseffizienz geltend zu machen (Jacobs *et al.*, 2011). Eine Möglichkeit wäre eine zu den Polymorphismen in derselben Probe hinzukommende weitere Mutation, wie zum Beispiel bei einer Compound Heterozygotie.

In Probe H53 liegt neben dem heterozygot erscheinenden SNP p.Pro171Arg auch heterozygot der SNP p.Gly153Arg vor. An dieser Stelle sind, abhängig von der Verteilungsart der SNPs auf die beiden Allele, zwei verschiedene Ausgangssituationen zu überdenken. Würde der Fall eintreten, dass sich beide SNPs auf einem Allel befänden, wären zwei ausgetauschte Aminosäuren im selben Protein vorzufinden. Dabei kann von einer möglichen veränderten Interaktion aller Aminosäuren im Protein ausgegangen werden, was eine Tertiärstrukturveränderung zur Folge haben könnte. Beide Aminosäuren sind phylogenetisch konserviert und in der Nähe zueinander lokalisiert. Bei beiden SNPs werden Aminosäuren

mit unpolaren Seitenketten durch die basische Aminosäure Arginin ersetzt. Diese reagiert hingegen hydrophil. Beispielfhaft können hierdurch neue Wasserstoffbrücken oder durch Ladungsverschiebungen veränderte Interaktionen entstehen, welche eine zunehmende Aktivitätsänderung dieses ARTEMIS-Proteins bedingen. Dies könnte die Hypothese dieser Arbeit bestätigen und ursächlich für vorliegende Krebserkrankung in der betreffenden Probe sein.

Eine veränderte Tertiärstruktur kann jedoch zu den verschiedensten Ausprägungsformen - von keiner Veränderungsmanifestation in der V(D)J-Rekombinationseffizienz bis hin zum völligen Funktionsverlust - führen. Die daraus resultierende Konsequenz ist zudem abhängig von der Qualität des ARTEMIS-Proteins, welches durch das zweite Allel exprimiert wird. Bei einer Aktivitätseinschränkung des veränderten Proteins könnte dies durch das zweite Allel und daraus exprimierte intakte ARTEMIS-Protein kompensiert werden. Dies trifft natürlich nur dann zu, wenn das gesunde Allel exprimiert werden kann.

Führen die ausgetauschten Aminosäuren zu keinem Effekt im Protein selbst, sollte dennoch auch an eine mögliche veränderte Interaktionsfähigkeit dieser ARTEMIS-Varianten auf Inter-Protein-Ebene gedacht werden. ARTEMIS liegt, nach neuen Erkenntnissen, in Dimeren vor (mündliche Übermittlung durch Frau Dr. Doris Niewolik, Abteilung Dr. Schwarz des Instituts für Transfusionsmedizin). Unbekannt ist, inwiefern sich eine fehlerhafte Dimerisierung auf die Aktivität in der V(D)J-Rekombinationseffizienz auswirken würde. Es wäre jedoch möglich, dass auch hieraus Veränderungen resultieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die beiden SNPs auf zwei verschiedenen Allelen verteilt zu finden sind. Folglich liegen zwei verschiedene ARTEMIS-Varianten nebeneinander vor. Der im Falle der beiden SNPs p.Gly153Arg und p.Pro171Arg jeweils getrennt durchgeführte V(D)J-Rekombinations-Assay sagt nichts über den Zustand der Dimerisierungsfähigkeit der beiden verschiedenen ARTEMIS-Varianten untereinander aus. Bezüglich der intermolekularen Interaktionsfähigkeit bedeutet dies unter Umständen eine bisher unbekannte Einflussnahme. Hierzu müssten die für die Interaktion bedeutenden Aminosäuren genau identifiziert werden. Zudem wären weitere Untersuchungen bezüglich der Funktionalität beider ARTEMIS-Varianten nebeneinander vorliegend durchzuführen.

Eine tatsächliche Aussage, inwiefern die V(D)J-Rekombinationseffizienz unter Umständen in dieser Probe beeinflusst sein könnte, wäre durch ein V(D)J-Rekombinations-Assay möglich. Hierfür müsste allerdings ein V(D)J-Rekombinations-Assay zum Einsatz kommen, in dem beide ARTEMIS-Varianten nebeneinander vorliegen würden. Im Falle einer fehlerhaften Interaktion zwischen den zwei Mutantenproteinen würde dies gegebenenfalls

als Aktivitätsänderung im V(D)J-Rekombinations-Assay, mit beiden ARTEMIS-Varianten gleichzeitig im gleichen Versuchsansatz vorliegend, detektierbar sein.

Insgesamt ist diese Fragestellung auf alle bisher einzeln untersuchten heterozygot vorliegenden SNPs anzuwenden. Stets finden sich hierbei zwei verschiedene ARTEMIS-Varianten nebeneinander vor. Das Dimerisierungsverhalten könnte dadurch von dem Fall zu unterscheiden sein, in dem ausschließlich der ARTEMIS-WT in einem Individuum anzutreffen ist.

Außer in Probe H53 konnte keine weitere Compound Heterozygotie-Konstellationen auffindig gemacht werden. Neben der Begründung, dass tatsächlich keine weiteren Mutationen existieren, seien hier verschiedene Optionen der fehlenden Auffindung von Mutationen zu diskutieren:

Zum einen könnten sich, wie bereits erwähnt, zusätzliche Mutationen in einem der nicht im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Exons befinden. Die Relevanz von möglichen Mutationen in den anderen Exons wurde bisher noch nicht untersucht und schien in den bisher untersuchten Erkrankungsfällen, in denen jeweils alle Exons von ARTEMIS untersucht wurden, keine krankheitsauslösende Mutation zu beherbergen. Wie es sich hierbei mit der Karzinomentwicklung verhält, konnte ebenfalls noch nicht postuliert werden.

Weitere unentdeckte Mutationen könnten sich zudem in den Introns befinden, die unter Umständen zu anschließenden Spleißaberrationen führen würden. In dieser Arbeit wurden jeweils nur die ersten zehn Nukleotide des Introns zu beiden Flanken des jeweiligen Exons auf ihre Korrektheit überprüft.

Eine weitere Option wären ebenfalls hier nicht untersuchte Promotormutationen, die zu reduzierten, fehlenden oder einem Übermaß an ARTEMIS-Proteinen führen könnten.

Insgesamt besteht die Möglichkeit, in Zukunft noch weitere Untersuchungen an vorliegenden Proben vorzunehmen, vorausgesetzt, dass ausreichend Probenmaterial vorliegt.

In der Probe H56 wurde der Polymorphismus p.Ser320Cys heterozygot aufgefunden. Dieser SNP wurde im 1000-Genom-Projekt untersucht (afrikanische, gemischt amerikanische, ostasiatische, europäische und südasiatische Bevölkerungsgruppen) und ergab eine 28-malige Registration des SNPs in insgesamt 2154 Allelen, was einen Prozentanteil in der dort verwendeten Population von etwa 1,3 % ausmacht (Ergebnis auch aufgeführt in der dbSNP, NCBI Datenbank). In der Phylogenese wurde die Konservierung der Aminosäure Serin an Stelle 320 im ARTEMIS-Protein betrachtet, um einen ersten Hinweis auf die Bedeutung der Aminosäure Serin an dieser Position zu erhalten. Hieraus ist auch ein Rückschluss auf eine mögliche wichtige Funktionalität dieser Aminosäure im ARTEMIS-Protein möglich. Anhand des Vergleiches der Aminosäuresequenzen verschiedener Ver-

tebraten ist festzustellen, dass der Bereich um Aminosäure 320 in der Phylogenese hoch konserviert ist. So ist die Aminosäure 320 in beispielhaft acht miteinander verglichenen Vertebraten (Mensch, Schimpanse, Wolf, Hausrind, Hausmaus, Wanderratte, Haushuhn und Zebrafisch) ebenfalls ein Serin, weshalb diese Aminosäure an dieser Position für die Struktur sowie Funktion vom ARTEMIS-Protein von Bedeutung sein könnte. Diese ARTEMIS-Variante wurde bezüglich einer Aktivitätsänderung im ARTEMIS-Protein in der Literatur bisher noch nicht beschrieben. Die Frage, inwiefern ein Cystein an Position 320 zu einem möglichen Aktivitätszuwachs oder -verlust der vorliegenden ARTEMIS-Variante führt und dadurch an der Tumorentstehung im betreffenden Patienten beteiligt sein könnte, muss in weiterführenden Untersuchungen, wie z.B. V(D)J-Rekombinationsassays geklärt werden.

Die Aminosäurestelle 320 in ARTEMIS befindet sich im β -CASP-Motif, welches für die Bindung des ARTEMIS-Proteins an die Nukleinsäure von Relevanz ist. Ein Austausch einer Aminosäure an dieser Stelle könnte daher durch Tertiärstrukturveränderung des Proteins zu einer veränderten Interaktion zwischen ARTEMIS und der Nukleinsäure führen. Durch die verringerte Bindungskapazität ist eine reduzierte V(D)J-Rekombinationseffizienz sowie Kapazität zur Reparatur von DSB denkbar. Ein hingegen erhöhtes Bindungsbestreben von ARTEMIS an die Nukleinsäure könnte bewerkstelligen, dass ARTEMIS nicht nur an DNA-Enden in Nähe von DSB, sondern unspezifisch an DNA-Stränge bindet. Folge wäre möglicherweise ein vermehrtes und auch ungerichtetes Schneiden der DNA. Beide Fälle würden die in dieser Arbeit bearbeitete Hypothese für den Mechanismus der Malignomentstehung durch *DCLRE1C*-Mutationen stützen.

Bekanntermaßen ist der hier untersuchte Patient für den Polymorphismus p.Ser320Cys heterozygot. Dies führt daher lediglich zu einer 50%igen Anteil des Proteins mit dem betreffenden SNP. Das bedeutet, dass neben dem betroffenen Protein mit eingeschränkter Funktionalität vermutlich zum gleichen Anteil das ARTEMIS-WT-Protein exprimiert wird. Der von Woodbine *et al.* entdeckte heterozygot vorliegende Polymorphismus p.Pro171Arg führt zum Beispiel lediglich bei monoallelischer Expression zur Reduktion der V(D)J-Rekombinationseffizienz, die die Erkrankung auslöst. Bezüglich der Auswirkung auf die Aktivität einer heterozygoten Expression der ARTEMIS-Variante p.Pro171Arg, bestehen in der Literatur bisher noch keine Aussagen. Ein Verlust zum Beispiel von ca. 10 % der V(D)J-Rekombinationseffizienz scheint, unabhängig von der ursächlichen ARTEMIS-Mutation, ohne Konsequenz für die gesunde B- und T-Zellentwicklung zu sein. Diese Aussage kann angesichts gesunder Eltern bei SCID-betroffenen Patienten getroffen werden, die nur heterozygote Träger der jeweiligen AR-

TEMIS-Mutation sind. Sichere Angaben bezüglich dieser Annahme können jedoch erst vorgenommen werden, nachdem Langzeitdaten über den Gesundheitszustand betroffener Eltern vorliegen und wenn sich auch nach längerer Zeit in diesen keine Malignome entwickelt haben.

Als Ausblick wäre zunächst zu überprüfen, ob in der vorliegenden und untersuchten Probe H56 nur das Polymorphismus-tragende Allel abgelesen und in Protein umgesetzt wird oder ob beide Allele zur Protein-Expression befähigt sind. Dies ist aus methodischen Gründen allerdings nicht möglich, da keine RNA aus dieser Probe verfügbar ist.

Desweiteren wäre die Überprüfung der Aktivität des Polymorphismus p.Ser320Cys anhand zum Beispiel des V(D)J-Rekombinations-Assays von Interesse.

Bei den durch den V(D)J-Rekombinations-Assays analysierten Aktivitäten handelt es sich allerdings stets nur um Näherungswerte. Eine genaue Aussage über die *in vivo* V(D)J-Rekombinationseffizienzen und vor allem über die Qualität der V(D)J-Rekombination ließe sich aus dieser Untersuchung nicht treffen:

Während eines *in vitro* durchgeführten V(D)J-Rekombination-Assays käme eine Situation zustande, in der eine absolute Überexpression der notwendigen RAG- und ARTEMIS-Proteine durch das Einbringen von Expressionsplasmiden in die Zellen induziert wird. Im Vergleich hierzu liegt *in vivo* eine geringere Protein-Konzentration vor. Demzufolge ist *in vivo* von einer zusätzlich geringeren V(D)J-Rekombinationsaktivität auszugehen als im V(D)J-Rekombinations-Assay detektiert werden könnte. Die genaue Restaktivität der untersuchten ARTEMIS-Variante ließe sich daher nur abschätzen. Hinzu kommt, dass durch den *in vitro* durchgeführten V(D)J-Rekombinations-Assay eine quantitative, aber nicht qualitative Aussage über die Situation während der V(D)J-Rekombinationsaktivität gemacht werden kann. Auf dem Stand eines durchgeführten V(D)J-Rekombinations-Assays können molekulare Vorgänge, wie zum Beispiel möglicherweise unsauberes Schneiden der DNA-Überhänge, ein funktionelles „gain of function“ der untersuchten ARTEMIS-Variante p.Ser320Cys oder ein verändertes Dimerisierungsverhalten dieser ARTEMIS-Varianten, nicht sicher beurteilt oder ausgeschlossen werden. Weitere Analysen, wie zum Beispiel eine Betrachtung der Haarnadelstrukturen nach Prozessierung durch die vorliegende ARTEMIS-Variante p.Ser320Cys, würde mehr Einblick in die möglichen qualitativen molekularen Veränderungen bei Expression dieser ARTEMIS-Variante ergeben. Die verknüpften DNA-Enden könnten auf dem Substratvektor durch Sequenzierung in ihrer Qualität analysiert werden.

Ein weiteres molekulares Kriterium, welches Einfluss auf die Funktionalität dieser ARTEMIS-Variante haben könnte, zeigt sich dahingehend, inwiefern das veränderte Protein *in vivo* befähigt ist, in den Zellkern einzudringen. Die V(D)J-Rekombination fände im Zellkern der Progenitoren der B- und T-Lymphozyten statt, weshalb auch ARTEMIS dort vorliegen muss. Mögliche Konformationsänderungen durch den Aminosäureaustausch könnten bei der Migration in den Zellkern hinderlich oder auch förderlich werden. Auch hierzu wären weitere Untersuchungen anzudenken. Die einfachste Form der subzellulären Lokalisierung von ARTEMIS ist bisher aufgrund noch fehlender einsetzbarer ARTEMIS-Antikörper nicht durchführbar. Zur Detektion *in vivo* sind die Produktion eines ARTEMIS-(E)GFP-Fusionsproteins und die anschließende Detektion und Lokalisation des (E)GFPs denkbar. Auch hier ist allerdings zu berücksichtigen, dass die Aussage über das tatsächliche Verhaltensmuster bezüglich der Kernmigration durch die Fusion zweier Proteine und die daraus resultierende Interaktion beeinflusst sein könnte.

Diese und weitere Betrachtungen zur Einschätzung der Aktivität beziehen sich nicht nur auf den Polymorphismus p.Ser320Cys, sondern sind auf alle in dieser Arbeit erwähnten Polymorphismen (p.Gly153Arg, p.Pro171Arg) anwendbar. Eine im V(D)J-Rekombinations-Assay detektierte nur geringe Aktivitätsänderung ist im Hinblick auf die daraus resultierende tatsächliche Auswirkung auf eine mögliche Krebsentstehung nicht aussagekräftig genug. Die aufgeführten molekularen Vorgänge könnten größere Auswirkungen auf die *in vivo* V(D)J-Rekombinationseffizienz und somit Krebsentstehung haben, als durch die *in vitro* gemessene V(D)J-Rekombinationseffizienz detektiert wird.

Es konnte in den 198 Leukämien und Lymphomen keine Veränderung im *DCLRE1C*-Gen detektiert werden, die eine eindeutige Aussage bezüglich der Beteiligung an der Leukämie-/Lymphom-Entstehung zulässt. Erklärungsansätze für die in dieser Arbeit vorliegenden Resultate wären zum einen die fehlende Beteiligung von ARTEMIS-Mutationen an der Krebsentstehung. Zum anderen könnten die zur Analyse verwendeten Tumor-Subklassen nicht passend gewählt worden sein.

Ergebnisse verschiedenster Arbeitsgruppen konnten bereits eine mögliche fehlende Beteiligung von ARTEMIS-Mutationen an der Leukämie-/Lymphomentstehung widerlegen. Demnach kann durchaus mit einer Beteiligung von ARTEMIS bei der Entstehung mancher Malignome gerechnet werden (Jacobs *et al.*, 2011, Moshous *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2012; Leeksma *et al.*, 2017).

Bezüglich der Tumor-Subklassen ist zu beachten, dass es sich bei den hier verwendeten Proben um eine Zusammenstellung verschiedener Tumoren handelt. Bisher wurden im

Mausmodell hypomorphe ARTEMIS-Mutationen mit Pro-B-Zell-Lymphomen und T-Lymphome assoziiert. In Patienten mit hypomorphen ARTEMIS-Mutationen und einer $T^{\text{low}}B^{\text{low}}$ -Zell-Konstellation wurden hingegen Epstein-Barr-Virus (EBV)-assoziierte B-Lymphome gefunden. Zhang et al. identifizierten eine somatische ARTEMIS-Mutation in einer T-ALL und Leeksma et al. vermuteten einen Zusammenhang zwischen ARTEMIS-Mutationen in der Keimbahn und der Entwicklung von diffusen großzelligen B-Zell-Lymphomen (Zhang *et al.*, 2012; Leeksma *et al.*, 2017). Zudem konnte in SCID-Schweinemodellen, die auf ARTEMIS-Mutationen beruhen, die Entstehung von T-Lymphomen, einer Leukämie sowie eines Nephroblastoms in den Empfängertieren beobachtet werden (s.o., Powell *et al.*, 2017).

Die 198 Proben dieser Arbeit entstammen ebenfalls einer heterogenen Gruppe an Leukämien bzw. Lymphomen. So sind MALT- und diffus großzellige B-Zell-Lymphome, Burkitt-Lymphome, ALL und Hodgkin-Lymphome enthalten. Des Weiteren waren Proben mit der Bezeichnung „Lymphom“ vorhanden, die nicht weiter spezifiziert sind und bei denen nicht ausgeschlossen werden kann, dass es sich um die selteneren T-Lymphome sowie Pro-B-Zell-Lymphome handelt. In Anbetracht der für die Entstehung zu Grunde liegenden Pathophysiologie der hier vorliegenden Leukämie-/Lymphomproben war eine genaue Untersuchung auf ARTEMIS-Mutationen in den vorliegenden Proben durchaus gerechtfertigt:

Die ALL (Prä-B-Zell-Leukämie) repräsentiert 70 % aller ALL. Die Translokationen $t(12;21)(p13;q22)$, $t(9;22)(q34;q11)$ BCR-ABL und $t(1;19)(q23;p13)$ sowie mitunter die Translokationen von $8q24$ MYC-IgH, $14q11$ TCR $\alpha\delta$ und $7q35$ TCR β , führen zu deren Entstehung.

In MALT-Lymphomen konnten bereits die Translokationen $t(1;14)$, $t(3;14)$, $t(11;18)$ sowie $t(14;18)$ analysiert werden (Murga Penas *et al.*, 2003; Streubel *et al.*, 2003; Willis *et al.*, 1999). Murga Penas *et al.* konnten in MALT-Lymphomen mit genannter Translokation $t(14;18)$ beweisen, dass bezüglich des Bruchpunktes im *IGH*-Lokus fehlerhafte Vorgänge in der V(D)J-Rekombination verantwortlich zu machen sind (Murga Penas *et al.*, 2010). Dies impliziert, dass dieser Vorgang auch für die Translokationen $t(3;14)$ und $t(1;14)$ bezüglich Chromosom 14 zutreffend sein könnte. In einer Analyse der genauen Translokationen in Mäusen, die durch eingebrachte hypomorphe ARTEMIS-Mutation P70 (\pm p53^{-/-}) ein Pro-B-Zell-Lymphom entwickelten, konnten ebenfalls mitunter Translokationen zwischen Chromosom 1 und 14 ausgemacht werden (Jacobs *et al.*, 2011). Nachdem die *IGH*-Lokus-Bruchpunkte möglicherweise durch einen NHEJ-Defekt innerhalb der V(D)J-

Rekombination ausgelöst wurden, ist nicht auszuschließen, dass ein defektes oder fehlendes ARTEMIS-Protein die Ursache hierfür sein könnte.

30 % der Burkitt-Lymphome sind mit dem EBV assoziiert. Moshous *et al.* berichteten 2003 ebenfalls über eine EBV-Assoziation der Lymphome in zwei Patienten mit den hypomorphen ARTEMIS-Varianten p.Pro171Arg. Den in Burkitt-Lymphomen am häufigsten gefundenen drei Translokationen t(8;14)(q24;q32) - in ca. 85 % der Fälle, t(8,22)(q24;q11) - in ca. 10 % der Fälle - und t(2;8)(p11;q24) - in ca. 5 % der Fälle - ist zudem gemeinsam, dass dabei das *MYC*-Gen in die Nähe von Immunglobulin-Genen gelangt. Diese befinden sich in der schweren Immunglobulin-Kette auf Chromosom 14 oder der Leichtkette kappa auf Chromosom 2 oder lambda auf Chromosom 22.

In großzelligen follikulären B-Lymphomen ist ebenfalls zu 90 % eine Translokation ausfindig zu machen, die zu der Translokation t(14;18) und somit der Fusion des *IGH*-Lokus und dem *BCL2*-Lokus führt. Diese Tumorsubklassen lassen sich daher möglicherweise ursächlich auf Fehlfunktionen innerhalb des Mechanismus der V(D)J-Rekombination zurückführen.

Insgesamt sind in den meisten Leukämie- und Lymphomsubklassen Translokationen ein Erklärungsansatz für die Entstehung der Erkrankung, da auch Translokationen und genetische Instabilität als Folge von ARTEMIS-Mutationen und somit Krebsauslöser angesehen werden (Moshous *et al.*, 2003).

Im Rahmen dessen ist es denkbar, weitere Untersuchungen an anderen Leukämie- und vor allem Lymphomklassen auf ARTEMIS-Mutationen durchzuführen. Eine Stichprobe von 198 Proben erscheint ausreichend groß, um Aussagen bezüglich der in dieser Arbeit aufgestellten Hypothesen treffen zu können. Dennoch könnte unter Umständen eine zusätzliche Anzahl an Leukämie-/Lymphomproben untersucht werden, um die Stichprobenzahl und somit die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, die vermuteten Auffälligkeiten im *DCLRE1C*-Gen ausfindig zu machen.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit sollten 198 genomische DNAs (Desoxyribonukleinsäuren) aus Leukämie-/Lymphomproben auf Mutationen im *DCLRE1C*-Gen (*ARTEMIS*) untersucht werden. Der Hintergrund dieser Untersuchung liegt in der bedeutenden Rolle, die ARTEMIS in der V(D)J-Rekombination sowie dem Non-Homologous End-Joining (NHEJ) beim Menschen als Endo- und Exonuklease einnimmt.

Es wurden zwei verschiedene Hypothesen aufgestellt, auf die das Augenmerk in den durchgeführten Untersuchungen gerichtet wurde. Die erste Hypothese vertritt die Annahme, dass aufgrund einer erworbenen aktivitätssteigernden Mutation im Gen vermehrtes Schneiden genomischer DNA-Stränge vonstattengeht und dadurch unphysiologisch DNA-Stränge aneinander ligiert werden. Die zweite Hypothese geht vom Vorliegen zur Hypomorphie führenden Mutationen aus, die ein unvollständiges Öffnen von DNA-Hairpins im Prozess der V(D)J-Rekombination nach sich ziehen und in der Konsequenz ebenfalls in unphysiologischen Ligationen von DNA-Enden resultieren könnten. Beide Fälle könnten somit chromosomale Veränderungen zur Folge haben, die an der Genese der vorliegenden Lymphome und Leukämien beteiligt sein könnten. Aus diesem Grund wurden die Amplifizierung und Sequenzierung ausgewählter Exons des *DCLRE1C*-Gens (*ARTEMIS*) aller vorliegenden 198 Proben durchgeführt und auf Mutationen untersucht:

In dieser Arbeit wurden fast ausschließlich SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) vorgefunden, die in der Literatur bereits beschrieben wurden. Zudem lagen die SNPs stets nur heterozygot vor. Die am häufigsten repräsentierten SNPs p.Pro171Arg und p.Gly153Arg zeigten in der Vergangenheit bereits Normaleffizienz in der überprüften V(D)J-Rekombination. Die SNPs, die keinen Aminosäureaustausch bedingten, fanden im Rahmen dieser Arbeit keine weitere Beachtung. Einmalig konnten zwei verschiedene SNPs in einer Probe vorliegend verzeichnet werden, die jeweils zu einem Aminosäureaustausch im Protein führen. Mit Plasmiden wurden die SNP-beinhaltenen Sequenzen beider Allele in *Escherichia coli*-Bakterien transformiert, kloniert, amplifiziert und sequenziert. Dabei zeigte sich, dass sich die SNPs nicht gemeinsam auf einem Allel befinden. Weitere Untersuchungen wurden somit obsolet. Einmalig wurde der SNP p.Ser320Cys vorgefunden. In der vorliegenden Probe lag diese ARTEMIS-Variante nur heterozygot vor. Überprüfenswert wäre, ob das zweite gesunde Allel in der vorliegenden Probe abgelesen wird oder ob eine funktionelle Monoallelie vorliegen könnte. Ausserdem erscheint die Aminosäure Serin an Stelle 320 hoch konserviert, weshalb weiterführende Testungen, wie zum Beispiel die Überprüfung der Funktionalität dieses SNPs, interessant sein würden.

6 Literaturverzeichnis

- 1) Ahnesorg, P., P. Smith, and S. P. Jackson: XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining. *Cell* 124: 301-313 (2006)
- 2) Bassing, C. H., W. Swat, and F. W. Alt: The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination. *Cell* 109: 45-55 (2002)
- 3) Booth, G., H. A. Gaspar, A. J. Thrasher: Treating Immunodeficiency through HSC Gene Therapy. *Trends in Molecular Medicine* 22: 317-327 (2016)
- 4) Brandt, V.L. and D.B. Roth: Recent insights into the formation of RAG-induced chromosomal translocations. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 650: 32-45 (2009)
- 5) Callebaut, I., D. Moshous, J. P. Mornon, and J. P. de Villartay: Metallo-beta-lactamase fold within nucleic acids processing enzymes: The beta-CASP family. *Nucleic Acids Research* 30: 3592-3601 (2002)
- 6) Cavazzana-Calvo, M., F. Le Deist, G. De Saint Basile, D. Papadopoulo, J. P. de Villartay, and A. Fischer: Increased radiosensitivity of granulocyte macrophage colony-forming units and skin fibroblasts in human autosomal recessive severe combined immunodeficiency. *The Journal of Clinical Investigation* 91: 1214-1218 (1993)
- 7) Darroudi, F., W. Wiegant, M. Meijers, A. A. Friedl, M. van der Burg, J. Fomina, J. J. van Dongen, D. C. van Gent, and M. Z. Zdzienicka: Role of artemis in DSB repair and guarding chromosomal stability following exposure to ionizing radiation at different stages of cell cycle. *Mutation Research* 615: 111-124 (2007)
- 8) de Miranda, N. F., A. Bjorkman, and Q. Pan-Hammarstrom: DNA repair: The link between primary immunodeficiency and cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1246: 50-63 (2011)
- 9) de Villartay, J. P., N. Shimazaki, J. B. Charbonnier, A. Fischer, J. P. Mornon, M. R. Lieber, and I. Callebaut: A histidine in the beta-CASP domain of artemis is critical for its full in vitro and in vivo functions. *DNA Repair* 8: 202-208 (2009)

- 10) de Villartay, J. P.: Congenital defects in V(D)J recombination. *British Medical Bulletin* 114: 157-167 (2015)
- 11) Difilippantonio, M. J., J. Zhu, H. T. Chen, E. Meffre, M. C. Nussenzweig, E. E. Max, T. Ried, and A. Nussenzweig: DNA repair protein Ku80 suppresses chromosomal aberrations and malignant transformation. *Nature* 404: 510-514 (2000)
- 12) Difilippantonio, M.J., S. Petersen, H.T. Chen, R. Johnson, M. Jasin, R. Kanaar, T. Ried and A. Nussenzweig: Evidence for replicative repair of DNA double-strand breaks leading to oncogenic translocation and gene nonhomologous. *Journal of Experimental Medicine* 196: 469–480 (2002)
- 13) Dvorak, C. C., and M. J. Cowan: Radiosensitive severe combined immunodeficiency disease. *Immunology and Allergy Clinics of North America* 30: 125-142 (2010)
- 14) Ege, M., Y. Ma, B. Manfras, K. Kalwak, H. Lu, M. R. Lieber, K. Schwarz, and U. Pannicke: Omenn syndrome due to ARTEMIS mutations. *Blood* 105: 4179-4186 (2005)
- 15) Evans, P. M., L. Woodbine, E. Riballo, A. R. Gennery, M. Hubank, and P. A. Jeggo: Radiation-induced delayed cell death in a hypomorphic artemis cell line. *Human Molecular Genetics* 15: 1303-1311 (2006)
- 16) Felgentreff, K., Y. N. Lee, F. Frugoni, L. Du, M. van der Burg., S. Giliani, I. Tezcan: Functional analysis of naturally occurring DCLRE1C mutations and correlation with the clinical phenotype of ARTEMIS deficiency. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 136: 140-150 (2015)
- 17) Ferguson, D. O., J. M. Sekiguchi, K. M. Frank, Y. Gao, N. E. Sharpless, Y. Gu, J. Manis, R. A. DePinho, and F. W. Alt: The interplay between nonhomologous end-joining and cell cycle checkpoint factors in development, genomic stability, and tumorigenesis. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 65: 395-403 (2000)
- 18) Gao, Y., D. O. Ferguson, W. Xie, J. P. Manis, J. Sekiguchi, K. M. Frank, J. Chaudhuri, J. Horner, R. A. DePinho, and F. W. Alt: Interplay of p53 and DNA-repair protein XRCC4 in tumorigenesis, genomic stability and development. *Nature* 404: 897-900 (2000)

- 19) Gebauer, K.: Molekularbiologische Untersuchungen zu Varianten von Non-Homologous End-Joining Faktoren beim Menschen. Biologische Diplomarbeit, Universität Ulm (2011)
- 20) Goodarzi, A. A., Y. Yu, E. Riballo, P. Douglas, S. A. Walker, R. Ye, C. Harer, C. Marchetti, N. Morrice, P. A. Jeggo, S. P. Lees-Miller: DNA-PK autophosphorylation facilitates artemis endonuclease activity. *The European Molecular Biology Organization (EMBO) Journal* 25: 3880-3889 (2006)
- 21) Heinz, G.: Allelhäufigkeit des Non-homologous-end joining Faktors Artemis bei humanen Leukämien/Lymphomen und Kontrollen. Bachelorarbeit im Fach Molekulare Medizin, Universität Ulm (2007)
- 22) Huang H., K.G. Manton: Newborn screening for severe combined immunodeficiency (SCID): a review. *Frontiers Bioscience* 10: 1024–1039 (2005)
- 23) Hunt, R. C., V. L. Simhadri, M. Landoli, Z.E. Sauna, C. Kimchi-Sarfaty: Exposing synonymous mutations. *Trends in Genetics* 30: 308-321 (2014)
- 24) Ijspeert, H., A. C. Lankester, J. M. van den Berg, W. Wiegant, C. M. van Zelm, Weemaes, A. Warris, Q. Pan-Hammarstrom, A. Pastink, M.J. van Tol, J. J. van Dongen, D. C. van Gent, M. van der Burg: Artemis splice defects cause atypical SCID and can be restored invitro by an antisense oligonucleotide. *Genes and Immunity* 12: 434-44 (2011)
- 25) Jacobs, C., Y. Huang, T. Masud, W. Lu, G. Westfield, W. Giblin, and J. M. Sekiguchi: A hypomorphic artemis human disease allele causes aberrant chromosomal rearrangements and tumorigenesis. *Human Molecular Genetics* 20: 806-19 (2011)
- 26) Jäger, U., S. Böcskör, T. Le,G. Mitterbauer,I. Bolz, A. Chott, M. Kneba, C. Mannhalter, B. Nadel: Follicular lymphomas‘ BCL-2/IgH junctions contain templated nucleotide insertions: nove insights into the mechanism of t(14;18) translocation. *Blood* 95: 3520-3529 (2000)
- 27) Kim, M. S., W. Chuenchor, X. Chen, Y. Cui, X. Zhang, Z. H. Zhou, M. Gellert, W. Yang: Cracking the DNA Code for V(D)J Recombination. *Molecular Cell* 2: 358-370 (2018)

- 28) Kobayashi, N., K. Agematsu, H. Nagumo, K. Yasui, Y. Katsuyama, K. Yoshizawa, M. Ota, A. Yachie, A. Komiyama: Expansion of clonotype-restricted HLA-identical maternal CD4⁺ T cells in a patient with severe combined immunodeficiency and a homozygous mutation in the artemis gene. *Clinical Immunology (Orlando, Florida)* 186: 159-166 (2003a)
- 29) Kobayashi, N., K. Agematsu, K. Sugita, M. Sako, S. Nonoyama, A. Yachie, S. Kumaki, S. Tsuchiya, H. D. Ochs, K. Sugita, Y. Fukushima, A. Komiyama: Novel artemis gene mutations of radiosensitive severe combined immunodeficiency in Japanese families. *Human Genetics* 112: 348-352 (2003b)
- 30) Küppers R, R. Dalla-Favera: Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas. *Oncogene* 20: 5580-5559 (2001)
- 31) Kurosawa, A., and N. Adachi: Functions and regulation of artemis: A goddess in the maintenance of genome integrity. *Journal of Radiation Research* 51: 503-509 (2010)
- 32) Kwan, A., R. S. Abraham, R. Currier, A. Brower, K. Andruszewski, J. K. Abbott, M. Baker et al: Newborn screening for severe combined immunodeficiency in 11 screening programs in the United States. *Journal of the American Medical Association* 312: 729-738 (2014)
- 33) Lagresle-Peyrou, C., F. Benjelloun, C. Hue, I. Andre-Schmutz, D. Bonhomme, M. Forveille, K. Beldjord, S. Hacein-Bey-Abina, J. P. de Villartay, P. Charneau, A. Durandy, A. Fischer, M. Cavazzana-Calvo: Restoration of human B-cell differentiation into NOD-SCID mice engrafted with gene-corrected CD34⁺ cells isolated from artemis or RAG1-deficient patients. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 16: 396-403 (2008)
- 34) Le Deist, F., C. Poinsignon, D. Moshous, A. Fischer, and J. P. de Villartay: Artemis sheds new light on V(D)J recombination. *Immunological Reviews* 200: 142-155 (2004)
- 35) Leeksa, O. C., N. F. de Miranda, and H. Veelken: Germline mutations predisposing to diffuse large B-cell lymphoma. *Blood Cancer Journal* 7: e532 (2017)

- 36) Li, L., D. Moshous, Y. Zhou, J. Wang, G. Xie, E. Salido, D. Hu, J. P. de Villartay, and M. J. Cowan: A founder mutation in artemis, an SNM1-like protein, causes SCID in athabaskan-speaking native americans. *Journal of Immunology* 168: 6323-6329 (2002)
- 37) Lieber, M. R.: The biochemistry and biological significance of nonhomologous DNA end joining: An essential repair process in multicellular eukaryotes. *Genes to Cells : Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms* 4: 77-85 (1999)
- 38) Lieber, M. R., Y. Ma, U. Pannicke, K. Schwarz: Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4: 712-720 (2003)
- 39) Lieber, M. R., H. Lu, J. Gu, and K. Schwarz: Flexibility in the order of action and in the enzymology of the nuclease, polymerases, and ligase of vertebrate non-homologous DNA end joining: Relevance to cancer, aging, and the immune system. *Cell Research* 18: 125-33 (2008)
- 40) Lieber, M. R.: The mechanism of double-strand DNA break repair by the non-homologous DNA end-joining pathway. *Annual Review of Biochemistry* 79: 181-211 (2010)
- 41) Lieber, M. R.: Mechanisms of human lymphoid chromosomal translocations. *Nature Reviews Cancer* 16: 387-398 (2016)
- 42) Löffler, G., P. E. Petrides, P. C. Heinrich: 34.3.4. B-Lymphozyten. *Biochemie & Pathobiochemie* 8. Aufl., Springer Verlag Berlin, S. 1118-1129 (2007)
- 43) Lu, H., U. Pannicke, K. Schwarz, and M. R. Lieber: Length-dependent binding of human XLF to DNA and stimulation of XRCC4.DNA ligase IV activity. *The Journal of Biological Chemistry* 282: 11155-11162 (2007)
- 44) Lüllmann-Rauch, R.: Abb. 13.5 Reifung der B- und T-Lymphozyten in den primären lymphatischen Organen. *Histologie. Verstehen-Lernen-Nachschießen*. 1. Aufl., Georg Thieme Verlag Stuttgart, S. 253 (2003)
- 45) Ma, Y., U. Pannicke, K. Schwarz, and M. R. Lieber: Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in non-homologous end joining and V(D)J recombination. *Cell* 108: 781-794 (2002)

- 46) Mills, K. D., D. O. Ferguson, and F. W. Alt: The role of DNA breaks in genomic instability and tumorigenesis. *Immunological Reviews* 194: 77-95 (2003)
- 47) Moshous, D., I. Callebaut, R. de Chasseval, B. Corneo, M. Cavazzana-Calvo, F. Le Deist, I. Tezcan, O. Sanal, Y. Bertrand, N. Philippe, A. Fischer, J.P. de Villartay: Artemis, a novel DNA double-strand break repair/V(D)J recombination protein, is mutated in human severe combined immune deficiency. *Cell* 105: 177-186 (2001)
- 48) Moshous, D., C. Pannetier, R. Chasseval Rd, F. Deist Fl, M. Cavazzana-Calvo, S. Romana, E. Macintyre, D. Canioni, N. Brousse, A. Fischer, J. L. Casanova, and J. P. de Villartay: Partial T and B lymphocyte immunodeficiency and predisposition to lymphoma in patients with hypomorphic mutations in artemis. *The Journal of Clinical Investigation* 111: 381-387 (2003)
- 49) Murga Penas, E. M., K. Hinz, K. Roser, C. Copie-Bergman, I. Wlodarska, P. Marynen, A. Hagemeijer, P. Gaulard, T. Löning, D. K. Hossfeld, J. Dierlamm: Translocations t(11;18)(q21;q21) and t(14;18)(q32;q21) are the main chromosomal abnormalities involving MLT/MALT1 in MALT lymphomas. *Leukemia : Official Journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* 17: 2225-2229 (2003)
- 50) Murga Penas, E. M., E. Callet-Bauchu, H. Ye, S. Gazzo, F. Berger, G. Schilling, N. Albert-Konetzny, E. Vettorazzi, G. Salles, I. Wlodarska, M. Q. Du, C. Bokemeyer, J. Dierlamm: The t(14;18)(q32;q21)/IGH-MALT1 translocation in MALT lymphomas contains templated nucleotide insertions and a major break-point region similar to follicular and mantle cell lymphoma. *Blood* 115: 2214-2219 (2010)
- 51) Musio, A., V. Marrella, C. Sobacchi, F. Rucci, L. Fariselli, S. Giliani, G. Lanzi, L. D. Notarangelo, D. Delia, R. Colombo, P. Vezzoni, A. Villa: Damaging-agent sensitivity of artemis-deficient cell lines. *European Journal of Immunology* 35: 1250-1256 (2005)

-
- 52) Nicolas, N., N. J. Finnie, M. Cavazzana-Calvo, D. Papadopoulo, F. Le Deist, A. Fischer, S. P. Jackson, and J. P. de Villartay: Lack of detectable defect in DNA double-strand break repair and DNA-dependent protein kinase activity in radio-sensitive human severe combined immunodeficiency fibroblasts. *European Journal of Immunology* 26: 1118-1122 (1996)
- 53) Niewolik, D., U. Pannicke, H. Lu, Y. Ma, L. C. Wang, P. Kulesza, E. Zandi, M. R. Lieber, and K. Schwarz: DNA-PKcs dependence of artemis endonucleolytic activity, differences between hairpins and 5' or 3' overhangs. *The Journal of Biological Chemistry* 281: 33900-33909 (2006)
- 54) Niewolik, D. (mündliche Mitteilung 2012)
- 55) Niewolik, D., I. Peter, C. Butscher, and K. Schwarz: Autoinhibition of the Nuclease ARTEMIS Is Mediated by a Physical Interaction between Its Catalytic and C-terminal Domains. *Journal of Biological Chemistry* 292: 3351-3365 (2017)
- 56) Noordzij, J. G., N. S. Verkaik, M. van der Burg, L. R. van Veelen, S. de Bruin-Versteeg, W. Wiegant, J. M. Vossen: Radiosensitive SCID patients with artemis gene mutations show a complete B-cell differentiation arrest at the pre-B-cell receptor checkpoint in bone marrow. *Blood* 101: 1446-1452 (2003)
- 57) Nussenzweig, A., and M. C. Nussenzweig: Origin of chromosomal translocations in lymphoid cancer. *Cell* 141: 27-38 (2010)
- 58) Pannicke, U., Y. Ma, K. P. Hopfner, D. Niewolik, M. R. Lieber, and K. Schwarz: Functional and biochemical dissection of the structure-specific nuclease ARTEMIS. *The European Molecular Biology Organization (EMBO) Journal*: 1987-1997 (2004)
- 59) Pannicke, U., M. Honig, I. Schulze, J. Rohr, G. A. Heinz, S. Braun, I. Janz, E. M. Rump, M. G. Seidel, S. Matthes-Martin, J. Soerensen, J. Greil, D. K. Stachel, B. H. Belohradsky, M. H. Albert, A. Schulz, S. Ehl, W. Friedrich, K. Schwarz: The most frequent DCLRE1C (ARTEMIS) mutations are based on homologous recombination events. *Human Mutation* 31: 197-207 (2010)
- 60) Perez-Becker, R., T. Nirhues, K. Siepermann, U. Pannicke and K. Schwarz: Hypomorpher Artemis-Defekt. Abstract D.2. 26th annual meeting of the Arbeitsgemeinschaft Pädiatrische Immunologie (API). Ittingen. (2009)

- 61) Raschellà, G., G. Melino, and M. Malewicz: New factors in mammalian DNA repair-the chromatin connection. *Oncogene* 36: 4673-4681 (2017)
- 62) Rivera-Munoz, P., L. Malivert, S. Derdouch, C. Azerrad, V. Abramowski, P. Revy, and J. P. Villartay: DNA repair and the immune system: From V(D)J recombination to aging lymphocytes. *European Journal of Immunology* 37: 71-82 (2007)
- 63) Powell, E. J., J. Graham, N. M. Ellinwood, J. Hostetter, M. Yaeger, C.-S. Ho, L. Gault, V. Norlin, E. N. Snella, J. Jens, E. H. Waide, A. N. Boettcher, M. Kerri-gan, R. R. R. Rowland, J. W. Ross, J. C. M. Dekkers and C. K. Tuggle: T Cell Lymphoma and Leukemia in Severe Combined Immunodeficiency Pigs following Bone Marrow Transplantation: A Case Report. *Frontiers in Immunology* 8: 813 (2017)
- 64) Rohr, J., U. Pannicke, M. Doring, A. Schmitt-Graeff, E. Wiech, A. Busch, C. Speckmann, I. Müller, P. Lang, R. Handgretinger, P. Fisch, K. Schwarz, S. Ehl: Chronic inflammatory bowel disease as key manifestation of atypical ARTEMIS deficiency. *Journal of Clinical Immunology* 30: 314-320 (2010)
- 65) Rooney, S., J. Sekiguchi, C. Zhu, H. L. Cheng, J. Manis, S. Whitlow, J. DeVido, D. Foy, J. Chaudhuri, D. Lombard, F. W. Alt: Leaky scid phenotype associated with defective V(D)J coding end processing in artemis-deficient mice. *Molecular Cell* 10: 1379-1390 (2002)
- 66) Rooney, S., F. W. Alt, D. Lombard, S. Whitlow, M. Eckersdorff, J. Fleming, S. Fugmann, D. O. Ferguson, D. G. Schatz, and J. Sekiguchi: Defective DNA repair and increased genomic instability in artemis-deficient murine cells. *The Journal of Experimental Medicine* 197: 553-565 (2003)
- 67) Rooney, S., J. Sekiguchi, S. Whitlow, M. Eckersdorff, J. P. Manis, C. Lee, D. O. Ferguson, and F. W. Alt.: Artemis and p53 cooperate to suppress oncogenic N-myc amplification in progenitor B cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 2410-2415 (2004a)
- 68) Rooney, S., J. Chaudhuri, and F. W. Alt.: The role of the non-homologous end-joining pathway in lymphocyte development. *Immunological Reviews* 200: 115-131 (2004b)

- 69) Sakano, H., Y. Kurosawa, M. Weigert, and S. Tonegawa: Identification and nucleotide sequence of a diversity DNA segment (D) of immunoglobulin heavy-chain genes. *Nature* 290: 562-565 (1981)
- 70) Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74: 5463-5467 (1977)
- 71) Schatz, D. G., M. A. Oettinger, and D. Baltimore: The V(D)J recombination activating gene, RAG-1. *Cell* 59: 1035-1048 (1989)
- 72) Schuetz, C., B. Neven, C. C. Dvorak, S. Leroy, M. J. Ege, U. Pannicke, K. Schwarz, A. S. Schulz, M. Hoenig, M. Sparber-Sauer, S. A. Gatz, C. Denzer, S. Blanche, D. Moshous, C. Picard, B. N. Horn, J. P. de Villartay, M. Cavazzana, K. M. Debatin, W. Friedrich, A. Fischer and M. J. Cowan: SCID patients with ARTEMIS vs RAG deficiencies following HCT: increased risk of late toxicity in ARTEMIS-deficient SCID. *Blood* 123: 281-289 (2014)
- 73) Schwarz, K., Y. Ma, U. Pannicke, and M. R. Lieber: Human severe combined immune deficiency and DNA repair. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 25: 1061-1070 (2003)
- 74) Soubeyrand, S., L. Pope, R. De Chasseval, D. Gosselin, F. Dong, J. P. de Villartay and R. J. Hache: Artemis phosphorylated by DNA-dependent protein kinase associates preferentially with discrete regions of chromatin. *Journal of Molecular Biology* 358: 1200-1211 (2006)
- 75) Streubel, B., A. Lamprecht, J. Dierlamm, L. Cerroni, M. Stolte, G. Ott, M. Raderer, and A. Chott.: T(14;18)(q32;q21) involving IGH and MALT1 is a frequent chromosomal aberration in MALT lymphoma. *Blood* 101: 2335-2339 (2003)
- 76) Sundin M., M. Uhlin, A. Gaballa, K. Ramme, A.G. Kolios, P. Marits, J. Nilsson: Late presenting atypical severe combined immunodeficiency (SCID) associated with a novel missense mutation in DCLRE1C. *Pediatric Allergy and Immunology* 29: 108-111 (2018)

- 77) Takata, M., M. S. Sasaki, E. Sonoda, C. Morrison, M. Hashimoto, H. Utsumi, Y. Yamaguchi-Iwai, A. Shinohara, and S. Takeda: Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *The European Molecular Biology Organization (EMBO) Journal* 17: 5497-5508 (1998)
- 78) Van der Burg, M., N. S. Verkaik, A. T. den Dekker, B. H. Barendregt, I. Pico-Knijnenburg, I. Tezcan, J. J. van Dongen, and D. C. van Gent: Defective artemis nuclease is characterized by coding joints with microhomology in long palindromic-nucleotide stretches. *European Journal of Immunology* 37: 3522-3528 (2007)
- 79) Van Zelm, M. C., C. Geertsema, N. Nieuwenhuis, D. de Ridder, M. E. Conley, C. Schiff, I. Tezcan: Gross deletions involving IGHM, BTK, or artemis: A model for genomic lesions mediated by transposable elements. *American Journal of Human Genetics* 82: 320-332 (2008)
- 80) Volk T., U. Pannicke, I. Reisli, A. Bulashevskaya, J. Ritter, A. Björkman, A. A. Schäffer, M. Fliegau, E. H. Sayar, U. Salzer, P. Fisch, D. Pfeifer, M. Di Virgilio, H. Cao, F. Yang, K. Zimmermann, S. Keles, Z. Caliskaner, S. Ü. Güner, D. Schindler, L. Hammarström, M. Rizzi, M. Hummel, Q. Pan-Hammarström, K. Schwarz, B. Grimbacher: DCLRE1C (ARTEMIS) mutations causing phenotypes ranging from atypical severe combined immunodeficiency to mere antibody deficiency. *Human Molecular Genetics* 24: 7361-7372 (2015)
- 81) Walker, J. R., R. A. Corpina, and J. Goldberg: Structure of the ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature* 412: 607-614 (2001)
- 82) Welzel N, T. Le, R. Marculescu, G. Mitterbauer, A. Chott, C. Pott, M. Kneba, M.Q. Du, R. Kusec, J. Drach, M. Raderer, C. Mannhalter, K. Lechner, B. Nadel, U. Jaeger: Templated nucleotide addition and immunoglobulin JH-gene utilization in t(11;14) junctions: implications for the mechanism of translocation and the origin of mantle cell lymphoma. *Cancer Research* 61: 1629-1636 (2001)
- 83) Willis, T. G., D. M. Jadayel, M. Q. Du, H. Peng, A. R. Perry, M. Abdul-Rauf, H. Price: Bcl10 is involved in t(1;14)(p22;q32) of MALT B cell lymphoma and mutated in multiple tumor types. *Cell* 96: 35-45 (1999)

- 84) Woodbine, L., S. Grigoriadou, A. A. Goodarzi, E. Riballo, C. Tape, A. W. Oliver, M. C. van Zelm, M. S. Buckland, E. G. Davies, L. H. Pearl: An artemis polymorphic variant reduces artemis activity and confers cellular radiosensitivity. *DNA Repair* 9: 1003-1010 (2010)
- 85) Zhang, Y., M. Gostissa, D. G. Hildebrand, M. S. Becker, C. Boboila, R. Chiarle, S. Lewis, and F. W. Alt: The role of mechanistic factors in promoting chromosomal translocations found in lymphoid and other cancers. *Advances in Immunology* 106: 93-133 (2010)
- 86) Zhang, Y. and J. D. Rowley: Chromatin structural elements and chromosomal translocations in leukemia. *DNA Repair* 5: 1282-1297 (2006)
- 87) Zhang, J, L. Ding, L. Holmfeldt, G. Wu, S. L. Heatley, D. Payne-Turner, J. Easton et al.: The genetic basis of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 481: 157–163 (2012)
- 88) Zhu, C., K. D. Mills, D.O. Ferguson, C. Lee, J. Manis, J. Fleming, Y. Gao, C. C. Morton and F.W. Alt: Unrepaired DNA breaks in p53-deficient cells lead to oncogenic gene amplification subsequent to translocations. *Cell* 109: 811-821 (2002)

7 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Schrezenmeier dafür bedanken, dass mir die Durchführung dieser medizinischen Dissertation in seinem Institut für Transfusionsmedizin ermöglicht wurde. Ich bekam hierdurch Einblick in ein sehr interessantes Thema.

Zudem danke ich meinem Betreuer Herrn Dr. Klaus Schwarz, dass ich meine Dissertation in seiner Abteilung anfertigen durfte.

Besonderer Dank geht an meinen Betreuer PD Dr. Ulrich Pannicke. Herr PD Dr. Pannicke hat mir viel Geduld und Unterstützung hinsichtlich der Anfertigung dieser Dissertation gewährt. Hierfür möchte ich mich besonders bedanken.

Meinem Zweitgutachter Herrn Prof. Dr. Ansgar Schulz danke ich für die Bereiterklärung, sich der Begutachtung meiner Dissertation anzunehmen.

Ich bedanke mich herzlichst bei den Mitarbeiterinnen der Abteilung Dr. Schwarz. In einem sehr schönen Arbeitsklima durfte ich die nötigen Handgriffe zur Durchführung meiner Experimente im Labor erlernen. Sie ließen mich an ihrem Erfahrungsschatz stets bereitwillig teilhaben und unterstützten mich, wo immer nötig. Danke Sylvia Braun, Eva-Maria Rump, Tatjana, Katja, Ingrid und Constanze.

Meinen lieben Eltern möchte ich auch meinen ergebensten Dank aussprechen. Zu keiner Zeit hatten sie den Glauben an mich verloren. Sie standen mir stets unterstützend und auf-fangend während meines gesamten medizinischen Werdegangs zur Seite. Dies reichte von der Approbation zur Ärztin bis hin zur Anfertigung dieser Arbeit. Sie hörten stets meine Sorgen an und respektierten nicht nur jede meiner Entscheidungen, sondern unterstützten mich auch vorbehaltlos darin.

Des Weiteren danke ich Thomas Blender, Julian Winter, Jenny Blender, Sissi Blender, Patrick Broer, Alexandra Nagy, Christoph Hausmanninger, Andrea Wohnhaas, K. N. und Sabine Schlee sowie allen anderen hier nicht Genannten, die mir während der Anfertigung meiner Dissertation motivierend, „ertragend“ und hilfreich zur Seite standen.

Lebenslauf aus Datenschutzgründen entfernt.

