

NBS: Nibrin-Mutationen als Ursache für gestörte DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur, Chromosomeninstabilität und Strahlenempfindlichkeit

André Reis, Martin Digweed

Zusammenfassung

Das Nijmegen Breakage Syndrom (NBS) zeichnet sich durch große Empfindlichkeit gegenüber ionisierenden Strahlen und ein stark erhöhtes Krebsrisiko aus. In zellbiologischer Hinsicht besteht eine nahezu vollständige Übereinstimmung mit der Ataxia telangiectatica (AT), wobei spontane und induzierbare Chromosomenbrüche und Störungen der Zellzykluskontrolle im Vordergrund stehen. NBS ist ebenso wie AT autosomal-rezessiv bedingt, das klinische Bild hingegen ist deutlich verschieden. NBS Patienten sind minderwüchsig, mikrozephal, haben eine auffällige Facies, erhöhte Infektanfälligkeit und eine extrem erhöhte Krebsdisposition. Mittels Genkartierung konnten wir zunächst das NBS Gen auf Chromosom 8q21 kartieren und dort verschiedene Mutationen in einem Gen nachweisen, das für ein neues Protein, Nibrin, kodiert. Zellbiologische Arbeiten konnten zeigen, daß Nibrin Teil des RAD-50 Protein-komplexes ist, der eine wichtige Funktion bei der Erkennung und Reparatur von DNA Doppelstrangbrüchen spielt. Das pleiotrope klinische Bild von NBS-Patienten und die zellbiologischen Veränderungen können nun einheitlich als Folgen gestörter DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur erklärt werden. Die Frage, ob auch heterozygote Genträger ein erhöhtes Krebsrisiko aufweisen, ist Gegenstand laufender Untersuchungen ebenso wie die Frage, ob bei homozygot unauffälligen Probanden somatische Mutationen der am Komplex beteiligten Gene einen Schritt in der Genese bestimmter Tumore darstellen.

Schlüsselwörter

Nijmegen Breakage Syndrom, Chromosomeninstabilität, DNA-Reparatur, Strahlenempfindlichkeit, Nibrin

Summary

NBS (Nijmegen Breakage Syndrome): Nibrin mutations as cause of abnormal DNA double-strand break repair, chromosomal instability and sensitivity to ionizing radiation

Nijmegen Breakage Syndrome (NBS) is an autosomal recessive disease characterised by elevated sensitivity against ionising radiation and a marked increase in cancer susceptibility. At the cellular level NBS is indistinguishable from ataxia-telangiectasia (AT) with increased spontaneous and induced chromosomal breaks and cell cycle aberrations. Both syndromes, though, differ in clinical presentation. NBS patients show growth retardation, are microcephalic, have a marked facial appearance, increased susceptibility to infectious diseases and a markedly increased cancer predisposition, mainly lymphoreticular malignancies. Subsequent to our mapping of the NBS gene on chromosome 8q we have now positionally cloned the gene and identified various truncating mutations therein. The great majority of patients are homozygous for the same five-base-pair deletion in exon 6. This founder mutation is the most frequent in the Slavic populations investigated. This gene codes for a novel protein which we termed nibrin and which has been shown to be a member of the RAD 50 complex of DNA double-strand break repair. The pleiotropic clinical picture and the cellular phenotype of NBS can now universally be explained on the basis of defective DNA double-strand break repair. Whether NBS heterozygotes have, similarly as in AT, an increased susceptibility to cancer and whether somatic mutations in non-carriers can also cause cancer is currently under investigation.

Keywords

Nijmegen-Breakage Syndrome, chromosomal instability, DNA repair, radiation sensitivity, nibrin

Einleitung

Das Nijmegen-Breakage-Syndrom (NBS) gehört zusammen mit dem Bloom-Syndrom, der Fanconi-Anämie und der Ataxia telangiectatica (AT) zu der Gruppe der Chromosomeninstabilitätssyndrome. Es handelt sich hierbei um autosomal rezessive Erkrankungen, bei denen die Körperzellen eine Chromosomeninstabilität und damit einhergehend eine gesteigerte Mutationsrate aufweisen. Die homozygoten Genträger zeichnet ein stark erhöhtes Krebsrisiko aus, bei AT- und NBS Patienten bevorzugt Tumore des lymphatischen Systems. Charakteristisch für NBS Patienten ist außerdem ihre besondere Empfindlichkeit gegenüber ionisierenden Strahlen. AT und NBS-Patienten sind klinisch verschieden. Bei der AT steht die progressive zerebelläre Degeneration in Verbindung mit der Ataxie im Vordergrund, bei dem NBS die Mikrozephalie mit zunehmender geistiger Behinderung. Beide zeichnet eine Immundefizienz und eine Prädisposition für Neoplasien des lymphatischen Systems aus, die bei NBS Patienten besonders ausgeprägt ist und bis zum Alter von 35 Jahren bereits mehr als die Hälfte der Patienten betroffen hat.

In zellbiologischer Hinsicht jedoch besteht eine nahezu vollständige Übereinstimmung beider Syndrome. Dies betrifft die spontane Chromosomeninstabilität, wobei in Lymphozyten bevorzugt Aberrationen der Chromosomen 7 und 14 auftreten, deren Bruchstellen in den Bereich der Immunglobulin- und T-Zell Rezeptor-Gene fallen. Die Chromosomenbrüchigkeit kann durch ionisierende Strahlen, bestimmte Radiomimetika und Inhibitoren der Topoisomerase I stark erhöht werden. Auffällig hierbei ist, daß im Gegensatz zu normalen Zellen die DNA Syntheserate kaum vermindert ist („radioresistente DNA Synthese“). Neben dem S-Phase Checkpoint sind in beiden Fällen auch die G1/S und G2/M Checkpoints betroffen (1, 2).

1995 wurde das ATM (AT-mutierte) Gen isoliert (3). Dabei zeigte sich, daß das ATM Protein starke Homologien mit den Hefe- und Säugergenprodukten für Phosphatidylinositol-3-Kinasen und den DNA abhängigen Protein-

kinasen (DNA-PK) aufweist. Es reagiert mit einer Reihe von Substraten wie Ikb-a, RPA, c-abl, chk-1 und p53 und ist offensichtlich Teil eines zellulären Kontrollsystems für DNA-Doppelstrangbrüche (4). Ebenso wie bei AT- ist auch bei NBS-Zellen die Induktion der p53 Reaktion verzögert (5). In welcher Weise das ATM Protein und Nibrin interagieren ist derzeit ungeklärt. Zellfusionsexperimente zeigen, daß es unmittelbar nach der Fusion zu keiner Komplementation der Chromosomenbrüchigkeit kommt, was am einfachsten mit einer direkten Interaktion der jeweiligen Proteinkomplexe zu deuten wäre (6).

Genkartierung und Kopplungsungleichgewicht

NBS ist eine seltene Erkrankung, die jedoch weltweit beobachtet worden ist. Die Mehrzahl der Patienten stammt allerdings aus Polen und der Tschechischen Republik. In einer Zusammenarbeit mit Chrystina Chrzanoska in Warschau und Eva Seemanova in Prag gelang es uns 1997, das NBS-Gen mit einer genomweiten Kopplungsanalyse auf ein 1 cM großes Intervall auf Chromosom 8q21 zu kartieren (7). Diese Region ist allerdings über 4 Mbp groß, zu groß für eine Positionsklonierung. Bei genauer Analyse der Kopplungsdaten zeigte der kosegregierende Mikrosatellitenmarker, D8S1811, ein deutliches Kopplungsungleichgewicht. Die meisten Normalallele wiesen die Fragmentgröße 83 bp auf (22/35), während nur ein NBS-Allel diese Größe besaß. Hingegen hatten die allermeisten NBS-Allele (30/35) die Größe 108 bp, während nur ein Normalallel diese Größe zeigte (7). Die Analyse weiterer Polymorphismen aus der Region bestätigte, daß die Mehrzahl der Patienten zugleich einen gemeinsamen Haplotyp aufwiesen. Damit war auch klar, daß diese unverwandten Patienten dieselbe Mutation gleichen Ursprungs tragen mußten. Da die Mehrzahl der Familien aus Polen und Tschechien kommen, nehmen wir an, daß „Gründer-Mutation“ slawischen Ursprungs ist (8). Wir haben dann postuliert, daß das NBS-Gen in dem Segment sein müßte, in dem alle NBS-Chromosomen den gleichen Haplotyp tragen. Abweichungen vom gemeinsamen

Haplotyp sind das Ergebnis von ancestralen Rekombinationsereignissen. Wir haben diese Hypothese durch Analyse weiterer Polymorphismen für eine Feinkartierung verfolgt. Das Segment, das allen untersuchten Haplotypen gemeinsam ist, beträgt weniger als 300 kb (8).

Positionsklonierung des NBS Gens

Grundlage sowohl für die Feinkartierung als auch für die Isolierung von Transkripten war die Erstellung eines BAC/PAC Contigs von etwa 4 Mb in Zusammenarbeit mit Pat Concannon aus Seattle. Für ausgewählte BACs und PACs wurde dann am IMB in Jena in der Arbeitsgruppe von André Rosenthal eine Sequenzierung durchgeführt und die Daten von Georg Beckmann am MDC mit den wichtigsten Transkript-, DNA- und Proteindatenbanken verglichen. Wir konnten so insgesamt 21 Transkript-Contigs als Positionskandidaten identifizieren. Sämtliche Transkript-Contigs wurden bei NBS-Patienten auf Mutationen hin untersucht. In einem Transkript, BR7, konnten wir dann bei allen Patienten mit dem gemeinsamen Haplotyp eine 5 bp Deletion nachweisen, jedoch bei keiner der untersuchten Kontrollen. Eine vollständige Charakterisierung dieses Transkriptes ergab eine cDNA von 4,4 kb, die auf 16 Exons und 51,1 kb genomischer Sequenz verteilt ist. Von insgesamt 51 nicht verwandten Patienten waren 46 homozygot für diese 657del5 benannte Mutation. Fünf weitere Mutationen fanden wir bei Patienten mit einem anderen Haplotyp. Sämtliche sechs gefundenen Mutationen führen zu einem vorzeitigen Kettenabbruch. Wir nannten das Protein Nibrin, nachdem eine Datenbankanalyse keine globale Homologie von NBS1 zu bekannten cDNAs oder Proteinen ergab (8).

NBS1-Mutationsanalyse in Berlin

Bisher konnten insgesamt 88 Patienten mit Verdacht auf NBS aus 72 Familien untersucht werden. 69 Patienten homozygot für 657del5.

Herkunft:

- 42 Polen
- 14 Tschechien
- 8 Deutschland
- 2 Jugoslawien
- 1 Österreich

- 1 Italien
- 1 Griechenland

1 Patient homozygot für 835del4.
18 Patienten ohne Mutation.

Funktionelle Klonierung des NBS-Gens

Parallel und unabhängig von unserem Positionsklonierungsansatz wurde Nibrin auf funktionellem Wege durch Untersuchung der molekularen Mechanismen der Doppelstrangbruch(DSB)-Reparatur in Hefe identifiziert (9). Durch die Analyse strahlungsempfindlicher Hefestämme konnte ein DSB-Reparaturkomplex aus den drei Proteinen Rad50, Mre11 und Xrs2 nachgewiesen werden. Die Arbeitsgruppe von Dr. John Petrini in Wisconsin hat sich mit der Identifizierung der menschlichen Homologe dieser Gene beschäftigt, was zunächst dadurch gelang, daß die Sequenzen hoch konserviert sind. Durch Immunpräzipitations-Experimente zeigten sie, daß der homologe DSB-Reparaturkomplex in menschlichen Zellen aus hRad50, hMre11 und zwei weiteren Proteinen besteht, einem 350kD Protein und einem 95kD Protein, p95, das von der Größe her als Kandidat für das menschliche Homolog des Xrs2 Proteins angesehen wurde. Das mutmaßliche Xrs2 Homolog wurde dann aber nicht, wie hRad50 und hMre11, über eine Sequenzhomologie isoliert, sondern durch die Sequenzierung des isolierten p95 Proteins und die Identifizierung eines entsprechenden ESTs. Die chromosomale Lokalisation dieses ESTs auf Chromosom 8q21 legte nahe, daß es sich möglicherweise um das bereits dort von uns kartierte NBS-Gen handelte. Tatsächlich waren die p95 cDNA Sequenz und die von uns identifizierte Nibrin cDNA identisch.

Nibrin und DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur

Daß dieser Proteinkomplex tatsächlich in der Reparatur von DSBs in menschlichen Zellen involviert ist, zeigten elegante Experimente, in denen Fibroblasten bestrahlt wurden und anschließend die Lokalisation von hMre11 bzw. hRad50 durch Immunfluoreszenz im Mikroskop sichtbar gemacht wurde. Es zeigte sich, daß bestrahlte Zellen innerhalb von 30 Minuten diskre-

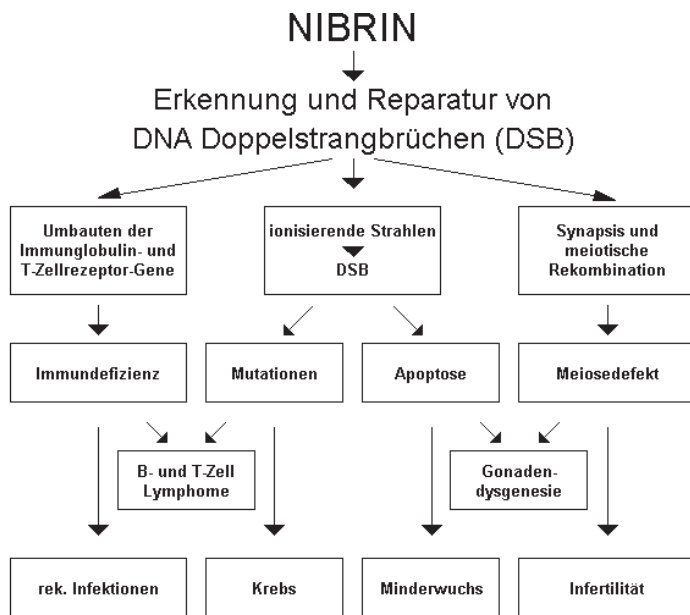


Abb 1

Stark vereinfachte schematische Darstellung, wie das pleiotrope klinische Bild bei NBS-Patienten mit einem Defekt in der Erkennung und Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen in Verbindung gebracht werden kann. (aus (28), modifiziert nach (29)).

te nukleare Foci entwickeln, sogenannte IRIF („ionising radiation induced foci“), die sowohl mit Antikörpern gegen hMre11 oder gegen hRad50 angefärbt werden konnten (9). Noch beeindruckender ist die Beobachtung, daß sich in Bereichen des Zellkerns, die durch Goldstreifen während der Bestrahlung geschützt werden, an diesen Stellen keine IRIF zeigen. Der Nachweis, daß in diesen nuklearen IRIF auch DNA-Synthese stattfindet, lieferte den letzten Beweis einer Funktion des Komplexes in der Reparatur von DSBs (10). Rad50 und Mre11 zeigen Homologie zu E.coli SbcC und SbcD Exonucleasen, und haben ebenfalls diese enzymatische Aktivität in vitro (11), so daß sie möglicherweise an der Vorbereitung von DNA-Enden für die Ligation beteiligt sind. Die direkte Ligation von DNA-Enden, sogenannte „non-homologous end joining“ ist einer von mehreren Reparaturwegen für DSBs.

Funktion von Nibrin

Immunpräzipitationen und die Kollokalisation in gesunden Fibroblasten von IRIF, detektiert entweder mit Nibrin-, hRad50- oder hMre11-Antikörpern, bewiesen, daß Nibrin analog dem Xrs2 Protein der Hefe in dem DSB-Reparaturkomplex mitwirkt. Eine Sequenzhomologie ist jedoch kaum gegeben: lediglich in den ersten 115 Aminosäuren des Proteins sind 28% Identität, bzw. 46% Ähnlichkeit zu finden. Zum Vergleich zeigen hRad50 und hMre11 über 50% Identität über weite Strecken mit den Hefe-Sequenzen. Trotz dieser nur schwachen Ähnlichkeit scheinen Xrs2 und Nibrin tatsäch-

lich funktionelle Analoge zu sein. In ersten Experimenten ist es uns gelungen, die charakteristische Empfindlichkeit von NBS Zellen gegenüber IR bzw. dem Radiomimetikum Bleomycin durch Übertragung der Hefe Xrs2 cDNA zu korrigieren (Demuth et al., Manuskript in Vorbereitung).

In dem Sequenzabschnitt der aminoterminalen 200 Aminosäuren von Nibrin, in dem Ähnlichkeit mit Xrs2 vermutet wird, sind auch Homologien zu bekannten Proteindomänen gefunden worden, nämlich die BRCT- und die FHA-Domäne. Die „breast cancer carboxy terminal“ Domäne, BRCT, wurde zunächst in dem BRCA1 Gen beschrieben. Mehrere DNA-Ligasen, XRCC1, ein Protein das DNA Ligase III bindet, und 53BP1, ein Protein welches das Tumorsuppressorprotein p53 bindet, haben alle dieses Sequenzmotiv. „Fork-head-associated“ Domänen sind aus der Familie der Fork-head-Transkriptionsfaktoren bekannt. Bestes Beispiel ist die Arabidopsis-Phosphatase, KAPP, die eine Zielkinase über diese FHA-Domäne bindet, sofern die Kinase in phosphoryliertem Zustand vorliegt. Welche Protein-Partner über diese Domäne mit Nibrin in Wechselwirkung treten ist noch unbekannt, jedoch scheint die Bindung an hMre11 nicht hier statt zu finden: in „two-hybrid“ Experimenten konnten Carney et al. ein Fragment der Nibrin cDNA isolieren, dessen Proteinprodukt hMre11 bindet und den Aminosäuren 363-754 der Nibrin-Sequenz entspricht. (9)

Fehlende Aktivität von Nibrin bei NBS-Patienten

Die überwiegende Mehrzahl der NBS-Patienten haben, wenn überhaupt, ein auf 233 Aminosäuren verkürztes Protein, dem die hMre11-Bindungsdomäne fehlt.

NBS-Zellen zeigen keinerlei IRIF nach Bestrahlung; obwohl hRad50 und hMre11 noch als Komplex in diesen Zellen vorzufinden sind, bleiben sie nach einer Bestrahlung über die Zelle verteilt und werden nicht zu den DSBs rekrutiert. Nibrin ist offensichtlich für diese Umverteilung des Komplexes (mit)verantwortlich. Interessanterweise werden in Ataxia teleangiectatica Zellen 90% weniger IRIF gebildet, dieses deutet darauf hin, daß ATM vor Nibrin in der zellulären Antwort auf eine ionisierende Bestrahlung funktioniert. Dieser Verlust der hRad50/hMre11-IRIF in AT Zellen wird kompensiert durch eine entsprechende Vermehrung anderer IRIF, die durch Antikörper gegen das RecA Homolog, hRad51, detektiert werden. Es scheint als würde die DSB-Reparatur mittels homologer Rekombination als „zweite Wahl“ in diesen Zellen verwendet. Noch wurde nicht untersucht, ob dieses bei NBS-Zellen ebenfalls zutrifft. Die Verwendung eines alternativen aber möglicherweise unpassenden Reparaturweges könnte vielleicht erklären, warum ein Defekt in der DSB-Reparatur in NBS-Zellen biochemisch nicht direkt nachweisbar ist, obwohl alles darauf hin deutet, daß DSB für den zellulären und klinischen Phänotyp verantwortlich sind.

NBS als Ursache fehlender Nibrin-Aktivität

Es ist nun möglich, das pleiotrope klinische Bild von NBS-Patienten als Ergebnis defekter DNA-Doppelstrangbruch(DSB)-Reparatur zu interpretieren (Abb 1). DSB treten gehäuft als Folge der Einwirkung ionisierender Strahlen auf und stellen zugleich die schwerwiegendsten Veränderungen der DNA auf molekularer Ebene dar, da ein DSB nicht selten bereits lethal wirkt. Ihre Reparatur ist besonders problematisch, da zwei getrennt vorliegende offene Enden wieder zusammengeführt werden müssen. Nicht selten kommt es hierbei zu fehlerhaften Rekombinationsereignissen (11, 13). DSB treten aber auch normalerweise bei den Umbauten der Immunoglobulin- und T-Zellrezeptor-Genen auf (14) sowie bei der meiotischen Rekombination (15). In all diese Prozesse ist ATM involviert, und vermutlich trifft dies auch für Nibrin zu. Die hohe Rate an Umbauten der Chromosomen 7 und 14 in den Lymphozyten sind ein deutlicher zytogenetischer Hinweis auf einen Defekt in den o.a. Rekombinationsprozessen und dürften ursächlich für die Immundefizienz und das hohe Infektionsrisiko als dessen klinischer Manifestation sein. Ebenso kann die bei AT- und NBS-Patienten beobachtete Gonadendysgenese als Zeichen der gestörten meiotischen Rekombination gesehen werden (16).

Eine Erklärung für das vorwiegende Auftreten von T- und B-Zell-Lymphomen (und Leukämien) bei AT- und NBS-Patienten muß derzeit noch spekulativ sein. Es dürfte mit den in diesen rasch proliferierenden Zellen physiologischerweise und evtl. exogen-induzierten DSB zusammenhängen. Als Folge der gestörten Reparatur sollte es zu einer Vielzahl von Bruch- und Rekombinationsereignissen kommen, von denen einige einen Schritt in der Tumorgenese darstellen könnten. Begünstigt wird dies durch die verzögerte p53 Induktion und eine entsprechend verzögerte Einleitung der Apoptose. Besonders stark geschädigte Zellen werden jedoch auf diesem Wege eliminiert, womit der IgA und IgG Mangel erklärt werden könnte (vermutlich auch der Minderwuchs und die Mikrozephalie).

Somatische Mutationen und Krebs

In Analogie zum ATM-Gen ist zu erwarten, daß auch dem NBS-Gen in bestimmten Tumoren, insbesondere Lymphomen vom B-Zell Typ, eine Rolle als Tumorsuppressor-Gen zukommen dürfte. In der Mehrzahl T-prolymphatischer Leukämien (T-PLL) wurde – bei genetisch unauffälligen Probanden – eine Deletion des ATM-Gens als somatische Mutation gefunden (30; Schaffner et al., S. 25–27). Auf dem anderen Allel fanden sich ausnahmslos Mutationen, die zum Funktionsverlust des ATM-Genproduktes führten (17, 18; Schaffner et al., S. 25–27). Jüngst konnten Stankovic und Mitarbeiter (19) ATM-Mutationen auch bei chronischer B-Zell-Leukämie nachweisen. Bei 2 von 6 Patienten wurden Keimbahnmutationen berichtet. ATM ist somit auch ein bedeutendes Tumorsuppressorgen (20). Genetisch bedingte Erkrankungen mit Mutationen in hRAD50 und in hMRE11 sind bislang nicht bekannt. Ihr vollständiger Ausfall dürfte mit dem Leben unvereinbar sein, wenn man hierfür die Befunde an knock-out Mäusen zugrunde legt (21). Nichts spricht aber gegen die Annahme, daß somatische Mutationen in diesen Genen, wie beim NBS- und AT-Gen, die spontane und die strahlenbedingte Mutabilität der Zellen erhöhen. Bei diesen Genen handelt es sich daher ebenfalls um Kandidatengene der Tumorgenese.

Von großer medizinischer Relevanz dürfte die Frage des Tumorrisikos für NBS-Heterozygote sein. Unsere epidemiologischen Untersuchungen zeigen, daß die Heterozygotenfrequenz sowohl in Tschechien als auch in Polen und der Ukraine bei etwa 1/150 Neugeborenen liegt (22). Für heterozygote AT-Genträger ist inzwischen bestätigt, daß sie ein erhöhtes Krebsrisiko aufweisen, speziell im Hinblick auf die Entwicklung von Brustkrebs. In den USA könnten ca. 6–7% aller Frauen mit Brustkrebs dazu zählen (23, 24). Es gibt ferner eine Reihe unabhängiger Hinweise, daß die AT-Heterozygoten ebenfalls eine erhöhte Strahlenempfindlichkeit besitzen (25) und möglicherweise bereits diagnostische Röntgenbestrahlung das Brustkrebsrisiko erhöht (26). Bemerkenswert ist, daß auch bei NBS-Blutver-

wandten scheinbar ein erhöhtes Krebsrisiko vorliegt (27). Dank der Identifikation des Gens und der Hauptmutation wird es nun auf medizinisch-epidemiologischem Wege möglich sein, dieser Frage sehr genau nachzugehen.

Danksagung

Die Arbeiten zur Isolierung des NBS-Gens wurden im Deutschen Humangenom Projekt (DHGP) als assoziierte Gruppe durch die DFG gefördert. Das MDC-Mikrosatellitenzentrum wird im DHGP gefördert.

Literatur

1. Shiloh Y (1997) Ataxia-telangiectatica and the Nijmegen breakage syndrome: related disorders but genes apart. *Annu Rev Genet* 31:635-62:635-662
2. Wegner RD, Chrzanowska KH, Sperling K, Stumm M (1998) Ataxia-Telangiectatica variants. In: Ochs, Smith and Puck (Eds.), *Primary Immunodeficiency Diseases, a molecular and genetic approach*. Oxford University Press, Oxford 16.
3. Savitsky K, Platzer M, Uziel T, Gilad S, Sartiel A, Rosenthal A, Elroy SO, Shiloh Y, Rotman G (1997) Ataxia-telangiectasia: structural diversity of untranslated sequences suggests complex post-transcriptional regulation of ATM gene expression. *Nucleic Acids Res* 25:1678-1684
4. Gatti R (1998) in: *The Genetic Basis of Cancer* (eds Vogelstein B and KW Kinzler). McGraw-Hill, New York
5. Jongmans W, Vuillaume M, Chrzanowska K, Smeets D, Sperling K, Hall J (1997) Nijmegen Breakage Syndrome cells fail to induce the p53-mediated DNA damage response following exposure to ionising radiation. *Mol. Cell. Biol.* 17: 5016-5022
6. Stumm M, Sperling K, Wegner RD (1997) Non-complementation of radiation-induced chromosome aberrations in ataxia-telangiectasia/ataxia-telangiectasia-variant heterodikaryons [letter]. *Am J Hum Genet* 60:1246-1251
7. Saar K, Chrzanowska KH, Stumm M, Jung M, Nurnberg G, Wienker TF, Seemanova E, Wegner RD, Reis A, Sperling K (1997) The gene for the ataxia-telangiectasia variant, Nijmegen breakage syndrome, maps to a 1-cM interval on chromosome 8q21. *Am J Hum Genet* 60:605-610
8. Varon R, Vissinga C, Platzer M, Cerosaletti KM, Chrzanowska KH, Saar K, Beckmann G, Seemanova E, Cooper PR, Nowak NJ, Stumm M, Weemaes CM, Gatti RA, Wilson RK, Digweed M, Rosenthal A, Sperling K, Concannon P, Reis A (1998) Nibrin, a novel DNA double-strand break repair protein, is mutated in Nijmegen breakage syndrome. *Cell* 93:467-476
9. Carney JP, Maser RS, Olivares H, Davis EM, Le-Beau M, Yates JR, Hays L, Morgan WF, Petrini JH (1998) The hMre11/hRad50 protein complex and Nijmegen breakage syndrome: linkage of double-strand break repair to the cellular DNA damage response. *Cell* 93:477-486

10. Nelms BE, Maser RS, MacKay JF, Lagally MG, Petrini JH (1998) In situ visualization of DNA double-strand break repair in human fibroblasts. *Science* 280: 590 – 592
11. Trujillo KM, Yuan SSF, Lee EYHP, Sung P (1998). Nuclease activities in a complex of human recombination and DNA repair factors rad50, mre11, and p95. *J Biol Chem* 273:21447-21450
12. Weaver DT (1995) What to do at an end: DNA double-strand-break repair. *TIG* 11: 388-392
13. Lieber MR, Grawunder U, Wu X, Yaneva M (1997) Tying loose ends: roles of Ku and DNA-dependent protein kinase in the repair of double-strand breaks. *Curr Opin Genet Develop* 7: 99-104
14. Hendrickson EA (1997) Insights from model systems: Cell-cycle regulation of mammalian DNA double-strand-break repair. *Am.J.Hum.Genet.* 61: 795-800
15. Hoekstra MF (1997) Responses to DNA damage and regulation of cell cycle checkpoints by the ATM protein kinase family. *Curr Opin Genet Develop* 7: 170-175
16. Digweed M, Reis A, Sperling K: Nijmegen Breakage Syndrome (1999) Consequences of defective DNA double strand break repair. *BioEssays*, in press
17. Vorechovsky I, Luo L, Dyer MJ, Catovsky D, Amlot PL, Yaxley JC, Foroni L, Hammarstrom L, Webster AD, Yuille MA (1997) Clustering of missense mutations in the ataxia-telangiectasia gene in a sporadic T-cell leukaemia. *Nat Genet* 17:96-99
18. Stilgenbauer S, Schaffner C, Litterst A, Liebisch P, Gilad S, Bar SA, James MR, Lichter P, Dohner H (1997) Biallelic mutations in the ATM gene in T-prolymphocytic leukemia. *Nat Med* 3:1155-1159
19. Stankovic T, weber P, Stewart G, Bedenham T, Murray J, Byrd PJ, Moss PAH & Taylor AMR (1999) Inactivation of ataxia telangiectasia mutated gene in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet* 353:26-29
20. Reis A (1999) Genetics and B-cell leukaemia (Commentary) *Lancet*, 353:3
21. Xiao Y, Weaver DT (1997) Conditional gene targeted deletion by Cre recombinase demonstrates the requirement for the double-strand break repair Mre11 protein in murine embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res* 25: 2985-2991
22. Varon R, Seemanova E, Chrzanowska K, Abramczuk D, Sperling K, Reis A (1999) Incidence of the major mutation for Nijmegen breakage syndrome (NBS) in Czech Republic and Poland. *Med. Genetik* 3: 210
23. Athma P, Rappaport R, Swift M (1996) Molecular genotyping shows that ataxia-telangiectatica heterozygotes are predisposed to breast cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 92: 130-134
24. Kerangueven F, Eisinger F, Noguchi T, Allione F, Wargniez V, Eng C, Padberg G, Theillet C, Jacquemier J, Longy M, Sobol H, Birnbaum D (1997) Loss of heterozygosity in human breast carcinomas in the ataxia telangiectasia, Cowden disease and BRCA1 gene regions. *Oncogene* 14:339-347
25. West CML, Elyan SAG, Berry P, Cowan R, Scott, D (1995) A comparison of the radiosensitivity of lymphocytes from normal donors, cancer patients, individuals with ataxia-telangiectatica (AT) and AT heterozygotes. *Int. J. Radiat. Biol.* 68: 197-203
26. Swift M, Reitnauer PJ, Morrell D, Chase CL (1987) Breast and other cancers in families with ataxia-telangiectatica. *N Engl J Med* 316: 1289-1294
27. Seemanova E (1990) An increased risk for malignant neoplasms in heterozygotes for a syndrome of microcephaly, normal intelligence, growth retardation, remarkable facies, immunodeficiency and chromosomal instability. *Mutat Res* 238:321-324
28. Reis A, Sperling K (1998) Wissenschaftsberichte aus dem DHGP: Nibrin Mutationen beim Nijmegen Breakage Chromosomeninstabilität, und Strahlenempfindlichkeit als Ausdruck gestörter DNA-Doppelstrang-Reparatur. *DHGP-Xpress* 4:2-5
29. Sperling K, Digweed M, Stumm M, Wegner RD, Reis A (1998) Chromosomeninstabilität, Strahlenempfindlichkeit und Krebs: Ataxia Telangiectatica und das Nijmegen Breakage Syndrom. *Medgen10*: 274-277
30. Vorechovsky I, Luo L, Lindblom A, Negrine M, Webster DB, Croce CM, Hannarstrom L (1996) ATM mutations in cancer families. *Cancer Res* 56: 4130-4133