

---

Aus dem Institut für Humangenetik der Medizinischen Fakultät der Charite-  
Universitätsmedizin Berlin

## **Dissertation**

### **Mutationsanalyse im *NBS1*-Gen bei Patientinnen mit *BRCA1/2* negativem familiären und *BRCA1/2* negativem sporadischen Mammakarzinom**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charite  
Universitätsmedizin Berlin

von Frank Oliver Henes  
aus Leverkusen

---

Gutachter:

1. Prof. Dr. K. Sperling
2. Prof. Dr. D. Schindler
3. Priv.-Doz. Dr. med. Dr. rer. nat. K. Seeger

Datum der Promotion: 15.05.2009

---

**Inhaltsverzeichnis:**

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Das Mammakarzinom	1
1.1.1. Epidemiologie	1
1.1.2. Ätiologie	1
1.1.3. Klassifikation und Stadieneinteilung des Mammakarzinoms	3
1.1.4. Prognosefaktoren	7
1.1.5. Präventionsmaßnahmen	7
1.2. Die Tumorpathologie und die zellulären Mechanismen des Organismus zur Gewährleistung der genomischen Stabilität	8
1.2.1. Allgemeine Tumorpathologie	8
1.2.2. DNA-Doppelstrangbruch (DSB)-Reparatursysteme	9
1.2.3. Zellzykluskontrolle	11
1.3. Das Nijmegen Breakage Syndrom (NBS)	13
1.3.1. Das klinische Bild des Nijmegen Breakage Syndroms	13
1.3.2. Der molekulargenetische Hintergrund- das <i>NBS1</i> -Gen	14
1.3.3. Das Krebserkrankungsrisiko bei <i>NBS1</i> -Heterozygotie	16
1.3.4. Korrelation von Polymorphismen im <i>NBS1</i> -Gen mit einem erhöhtem Brustkrebsrisiko	18
<b>2. Fragestellung der Arbeit</b>	<b>19</b>
<b>3. Materialien</b>	<b>20</b>
3.1. Patienten	20
3.2. Geräte	21
3.3. Computersoftware	22
3.4. Datenbanken	22
3.5. Chemikalien und Biochemikalien	22
3.6. Puffer	23

---

3.7.	Verwendete Kits	24
3.8.	Verbrauchsmaterialien	24
3.9.	Primer	24
3.10.	Statistik	26
<b>4.</b>	<b>Methoden</b>	<b>27</b>
4.1.	Polymerasekettenreaktion (PCR)	27
4.2.	Agarose-Elektrophorese	29
4.3.	Exonuklease-Verdau zur Reinigung von PCR-Produkten für die Sequenzierung	29
4.4.	Sequenzierreaktion der gereinigten PCR-Produkte	30
<b>5.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>32</b>
5.1.	PCR-Etablierung	32
5.2.	Ergebnisse der Sequenzierung	33
5.2.1.	Mutationen im <i>NBS1</i> -Gen	33
5.2.2.	Tabellarische Übersicht und schematische Darstellung der nachgewiesenen Mutationen im <i>NBS1</i> -Gen	41
5.2.3.	Polymorphismen im <i>NBS1</i> -Gen	42
5.2.3.1.	Bekannte Polymorphismen im <i>NBS1</i> -Gen	42
5.2.3.2.	IVS3-85- neue Sequenzvariante im <i>NBS1</i> -Gen	44
5.3.	Klinische und tumorpathologische Ergebnisse	45
5.3.1.	Tumorpathologische Befunde der Patientinnen mit familiärem Mammakarzinom	45
5.3.2.	Tumorpathologische Befunde der Patientinnen mit sporadischem Mammakarzinom	47
5.3.3.	Anamnestic Angaben und Segregationsanalyse der familiären Brustkrebspatientinnen mit heterozygoten Mutationen im <i>NBS1</i> -Gen	49

---

<b>6.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>52</b>
6.1.	Das Mammakarzinom und Defekte der zellulären Antwort auf DNA-Doppelstrangbrüche	52
6.2.	Das <i>NBS1</i> -Gen und die Tumorgenese des Mammakarzinoms	54
6.3.	Mutationen im <i>NBS1</i> -Gen und ihr Einfluß auf das Brustkrebsrisiko	55
6.4.	Brustkrebsrisiko bei Trägerinnen der Polymorphismen 553 G/C und 2016 A/G	66
6.5.	<i>NBS1</i> im Zusammenhang mit der Histopathologie des Mammakarzinoms	67
<b>7.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>69</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>72</b>
<b>9.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>80</b>
<b>10.</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>82</b>
<b>11.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>83</b>

# **1. Einleitung**

## **1.1 Das Mammakarzinom**

### **1.1.1 Epidemiologie**

In Deutschland erkrankt etwa jede 10. Frau im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs. Mit jährlich über 45.000 Neuerkrankungen steht das Mammakarzinom an erster Stelle der weiblichen Krebsinzidenzen und bildet einen Anteil von 25,9 % aller malignen Erkrankungen der Frau. Allein in Deutschland bedingt das Brustkrebsleiden jährlich über 17.000 Todesfälle und zählt vor dem Kolon- und Bronchialkarzinom als häufigste Krebstodesursache des weiblichen Geschlechts [1, 2]. Eine Zunahme der Inzidenz des Mammakarzinoms ist weltweit zu verzeichnen. Zwischen 1973 und 1990 stieg die Anzahl der jährlichen Neuerkrankungen um etwa 21%. Sowohl eine Veränderung des Risikoprofils der Frau (frühere Menarche, spätere Erstgeburt, fettreichere Ernährung, höhere Lebenserwartung) als auch eine verbesserte Diagnostik in der Früherkennung könnten diese Entwicklung erklären. Anhand klinischer Daten aus einer Feldstudie und des Tumorregisters München wurde eine Altersverteilung für das Mammakarzinom ermittelt. 27,8% der Frauen erkrankten mit über 70 Jahren, 52% im Alter zwischen 50 und 69 Jahren und 20,2% im Alter unter 50 Jahren [3].

### **1.1.2. Ätiologie**

#### **Allgemeine Risikofaktoren**

Die Ätiologie des Mammakarzinoms ist noch weitgehend ungeklärt. Man geht von einem multifaktoriellen Geschehen aus. Mittels klinischer, epidemiologischer und genetischer Studien gelang es jedoch eine Anzahl sozialer und biologischer Risikofaktoren für die Entstehung des Brustkrebs auszumachen [4, 5]:

Risikofaktor	Hohe Risikogruppe	Relatives Risiko
Alter bei Menarche	Alter bei Menarche <11.Lj.	3,0
Alter bei Menopause	Alter bei Menopause >54 Lj.	2,0
Alter bei Erstgeburt	1. Geburt nach dem 30. Lj.	1,9
Anzahl der Geburten	Nulliparität	1,5
Vorausgegangene gutartige Brusterkrankung	Mastopathia cystica fibrosa (Schweregrad 3) / atypische Hyperplasie	4-5
Orale Kontrazeptiva	Während der Einnahme bis 10 Jahre später	1,24
Hormonersatztherapie	Einnahme > 10 Jahre	1.35
Postmenopausales Körpergewicht	BMI>35	2,0
Exposition mit ionisierender Strahlung	Abnormal hohe Exposition bei jungen Frauen ab dem 10.Lj.	3
Familiäre Brustkrebsanamnese	1 Fall in der Verwandtschaft 1.Grades	1,8
	2 Fälle in der Verwandtschaft 1.Grades	2,9
	3 Fälle in der Verwandtschaft 1.Grades	3,9
Geographische Lage	Afrika, Südamerika oder Südostasien	5

Tab. 1: Risikofaktoren für die Entstehung des Mammakarzinoms [4, 5]

### Familiäre Disposition - das familiäre Mammakarzinom

Schätzungsweise 5 bis 10% aller Brustkrebserkrankungen entstehen aufgrund von Keimbahnmutationen in prädisponierenden Genen. Die betroffenen Familien weisen sowohl eine erhöhte Anzahl von Erkrankungsfällen als auch ein relativ frühes Erkrankungsalter auf. Man vermutet, dass autosomal dominant oder rezessive Syndrome wie z.B. das Cowden-, Li-Fraumeni-, Peutz-Jeghers-, Bloom- und Werner-Syndrom oder die Ataxia telangiectasia mit erhöhter Prädisposition für eine maligne Erkrankung für weniger als 1% aller Brustkrebsfälle verantwortlich sind [6]. Durch Kopplungsanalysen konnten die zwei Brustkrebssuszeptibilitätsgene *BRCA1* und *BRCA2* identifiziert werden. Mutationen dieser Gene können für etwa die Hälfte aller familiären Mammakarzinome verantwortlich gemacht werden [7, 8]. Die Wahrscheinlichkeit für *BRCA1*- oder *BRCA2*- Mutationsträgerinnen, bis zu ihrem 80.Lebendsjahr an

Brustkrebs zu erkranken, kann bis zu 80% betragen. Zusätzlich ist für diese Frauen das Risiko für ein Ovarialkarzinom signifikant erhöht [9].

Bei vielen Familien mit gehäuften Brustkrebsfällen kann *BRCA1* oder *BRCA2* als genetische Ursache ausgeschlossen werden [10]. Anstatt eines weiteren hochpenetranten Brustkrebs-suszeptibilitätsgen, das für den nicht *BRCA1*- oder *BRCA2*-assoziierten Anteil familiär gehäuft auftretender Mammakarzinome verantwortlich gemacht werden kann, führen Segregationsanalysen zu der Vermutung, dass ein Großteil der Erkrankungen auf einem polygenen Hintergrund mit Mutationen in mehreren niedrigpenetranten Prädispositionsgenen beruht [11].

### 1.1.3. Klassifikation und Stadieneinteilung des Mammakarzinoms

#### Histologische Klassifikation

Das Mammakarzinom lässt sich formal in nichtinvasive (Cis= Carcinom in situ) und invasive Formen unterteilen [12]. Laut WHO besteht ein Carcinoma in situ (Cis) aus einem ausschließlich intraepithelialen Tumoranteil mit intakter Basalmembran und fehlender Stromainvasion [13]. Das Invasive Mammakarzinom, das wie das präinvasive Cis histologisch in das Milchgangs- (duktales Karzinom) und Lappchenkarzinom (lobuläres Karzinom) unterteilt wird, stellt mit über 80% den Großteil der diagnostizierten Brustkrebsfälle dar. Folgende Tabelle zeigt die Unterteilung des invasiven Mammakarzinoms mit dem jeweiligen prozentualen Häufigkeitsanteil.

Histologischer Typ invasiver Karzinome	Anteil
Invasiv duktales Karzinom (NOS)	65-80%
Invasiv lobuläres Karzinom	6-15%
Invasiv medulläres Karzinom	3%
Invasiv tubulären Karzinom	1-15%
Invasiv papilläres Karzinom	1-7%
Invasiv muzinöses Karzinom	1-2%
sonstige	< 1%

Tab. 2: Histologische Unterteilung und Häufigkeit der invasiven Mammakarzinome [14]



Als häufigster Tumortyp gilt das invasive duktales Mammakarzinom. Da es sich in keine andere Kategorie einordnen lässt, wird es auch als „not otherwise specified (NOS)“ bezeichnet. Weitere Differenzierungsformen stellen das lobuläre, tubuläre, papilläre, muzinöse und medulläre Karzinom dar.

Das invasiv medulläre Mammakarzinom besitzt zytologisch hochmaligne Eigenschaften, weist jedoch ein niedriges Metastasierungsrisiko auf und hat prinzipiell eine günstigere Prognose als der NOS-Tumortyp [15].

Spezialformen sind das meist nicht invasive intraduktales Paget-Karzinom der Mamille oder Areola und das gering differenzierte invasive duktales inflammatorische Karzinom mit meist ausgeprägter Lymphangiosis carcinomatosa (Krebszellwachstum entlang von Lymphkapillaren) [14].

### **Hormonrezeptorbestimmung/ Immunhistochemie**

Im Rahmen der Primärdiagnostik wird derzeit die Bestimmung des Hormonrezeptorstatus obligat durchgeführt. Das Vorliegen eines Östrogenrezeptors in Tumorgewebe gilt als wichtiger Prognosefaktor und korreliert mit höherer Überlebenszeit sowie niedrigerem Risiko eines Tumorrezidivs [16]. Ca. 60% aller primären Mammakarzinome zeigen einen positiven Östrogenrezeptorstatus und 2/3 der fortgeschrittenen ER- (Östrogenrezeptor-) positiven Brustkrebsfälle sprechen auf eine antiöstrogene Therapie an [17]. Für den Expressionsverlust dieses Rezeptors, der während der Tumorprogression häufig beobachtet wird, werden epigenetische Mechanismen wie z.B. die Hypermethylierung der Promoterregionen des Rezeptorgens verantwortlich gemacht [18]. Es gelten Karzinome als hormonrezeptorpositiv, bei denen mindestens 10% der Tumorzellkerne für ER und/oder PgR (Progesteronrezeptor) immunhistochemisch positiv reagieren. Mit Hilfe des sog. Immunreaktiven Scores (IRS) nach Remmele und Stegner, der sowohl den Prozentsatz rezeptorpositiver Zellkerne als auch deren immunhistochemische Färbintensität berücksichtigt, wird der Hormonrezeptorstatus in einer Skala von 0 bis 12 eingeteilt (0-1=negativ) [3, 16].

### **Das Grading**

Neben der primären Tumorgroße, dem Ausmaß des axillären Lymphknotenbefalls, dem Alter der Patientin und dem Östrogen- und Progesteronstatus ist die zelluläre

Differenzierung des Tumors von großer prognostischer Bedeutung. Anhand der Ausprägung der Entwicklung tubulärer Strukturen, der Kernmorphologie und Mitoserate der Tumorzellen kann der Malignitätsgrad bestimmt werden [19]. Krebszellen mit geringer Tubulusausbildung, starker Kernpolymorphie und hoher Mitoserate gelten als gering differenziert und besitzen einen hohen Malignitätsgrad (Grading 3). Eine schwächere Kernpolymorphie, niedrigere Mitoserate sowie stärkere Tubulusausbildung sprechen für eine höhere Differenzierung und folglich niedrigeren Malignitätsgrad. (Grading 2 = mäßig differenziert = mäßiger Malignitätsgrad; Grading 1 = hoch differenziert = niedrigerer Malignitätsgrad).

### **Histopathologische Unterschiede in Abhängigkeit von Mutationen in den Suszeptibilitätsgenen *BRCA-1*, *BRCA-2* und *ATM***

Die Tumore bei Patientinnen mit Mutationen im *BRCA1*-Gen zeichnen sich im Vergleich mit denen von sporadischen Fällen und *BRCA1*- negativen familiären Fällen durch ein höheres Grading aus [20, 21]. Darüber hinaus liegt der Anteil des medullären Tumortyps bei *BRCA1*-positiven mit 11% deutlich über dem der *BRCA2*- positiven und sporadischen Brustkrebspatientinnen (mit 2% bzw. 1%) [20]. Auch bezüglich des Östrogenrezeptorstatus weisen *BRCA1*-positive Karzinome Besonderheiten auf. Während sie in 63-90% der Fälle rezeptornegativ sind, weisen sporadische Tumoren in 60-90% der Fälle einen positiven Östrogenrezeptorstatus auf [22].

Obwohl in früheren epidemiologischen Studien eine Assoziation zwischen dem lobulären Mammakarzinom und einem erhöhten familiären Risiko aufgestellt wurde [23], konnte bislang weder bei *BRCA1*-, noch bei *BRCA2*- positiven Brustkrebspatientinnen eine Häufung dieses Tumortyps beobachtet werden [20]. Es wird angenommen, daß andere Suszeptibilitätsgene für eine familiäre Häufung des lobulären Mammakarzinoms verantwortlich sind.

Bei familiären Brustkrebspatientinnen mit Mutationen im *ATM*- (Ataxia teleangiectasia mutated) Gen konnte im Vergleich zu einer Kontrollgruppe ein erhöhter Anteil an Tumoren mit Grading 1 festgestellt werden (44% vs. 25%). Das Brustkrebsgewebe der heterozygoten Mutationsträgerinnen im *ATM*-Gen zeigten keine der typischen tumorpathologischen Eigenschaften der *BRCA1*-Tumoren [24].

## Das TNM-System

Das TNM-System dient der Gruppierung maligner Tumoren anhand ihrer anatomischen Ausdehnung in Bezug auf den Primärtumor (T), die regionären Lymphknoten (N) sowie die Fernmetastasen (M). Die Ausbreitung des Mammakarzinoms kann mit einer klinischen (c) oder histopathologischen (p) TNM-Klassifikation beschrieben werden. Während die klinische TNM-Klassifikation mit Hilfe von präoperativ palpabel, mammographisch oder sonographisch erhobenen Befunden erstellt wird, erfolgt die histopathologische Klassifikation anhand von operativ gewonnenen Gewebeproben [14].

Einteilung	Beschreibung
pT	Primärtumor
pT X	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
pT 0	Kein Anhalt für Primärtumor
pTis	Carcinoma in situ
pT1	Tumor $\leq 2$ cm in größter Ausdehnung
pT1mic	Mikroinvasion $\leq 0,1$ cm in größter Ausdehnung
pT2	Tumor $>2,0$ cm aber $\leq 5,0$ cm
pT3	Tumor $>5,0$ cm in größter Ausdehnung
pT4	Tumor jeder Größe mit direkter Ausdehnung auf Brustwand oder Haut
pN	Regionäre Lymphknoten
pNX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
pN0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
pN1	Metastasen in beweglichen ipsilateralen axillären Lymphknoten
pN2	Ipsilaterale axilläre Lymphknoten untereinander oder mit anderen Strukturen fixiert
pN3	Metastasen in Lymphknoten entlang der A. mammaria int.
	Metastasen
pMX	Vorliegen einer Fernmetastase kann nicht beurteilt werden
pM0	Keine Fernmetastasen
pM1	Fernmetastasen

Tab.3: Postoperative histopathologische Klassifikation des Mammakarzinoms [nach [14]]

#### 1.1.4. Prognosefaktoren

Knapp über der Hälfte der in Deutschland diagnostizierten Brustkrebsfälle befinden sich im pT1-Stadium. Bei diesen Patienten liegen in 74,7% der Fälle kein Lymphknotenbefall und bei 97,6% der Fälle keine Fernmetastasen vor [3, 14]. Der Befall axillärer Lymphknoten, der die Möglichkeit einer systemischen Streuung von Tumorzellen signalisiert, gilt als wichtigster Prognosefaktor. Sind die Lymphknoten nicht befallen liegt das relative Fünf- und Zehnjahresüberleben bei 94,8% bzw. 86,4%, während von Patientinnen mit zehn oder mehr befallenen Lymphknoten nur 48,1% bzw. 27,3% die nächsten 5 bzw. 10 Jahre überleben [3, 14].

Die prognostische Rolle des Hormonrezeptorstatus (60-70% der Mammakarzinome exprimieren Östrogen- und/oder Progesteronrezeptoren) ist vor allem in den ersten fünf bis sieben Jahren nach Diagnosestellung relevant. Die relative Fünfjahresüberlebenschance beläuft sich bei Östrogen-/ Progesteron-negativen Tumoren auf ca. 70%, während sie bei den rezeptorpositiven Tumoren bei knapp 90% liegt. [3, 25, 26].

#### 1.1.5. Prävention des Mammakarzinoms

Mit Hilfe der direkten Gentestung durch Mutationsanalysen in den Genen *BRCA1/2* und der indirekten Diagnostik über Kopplungsanalysen in den betroffenen Familien können Frauen mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko erfasst und ihr Erkrankungsrisiko durch den frühzeitigen Einsatz gezielter präventiver Maßnahmen gesenkt werden. Neben einer gesundheitsbewussten Lebensführung (regelmäßige körperliche Aktivität, Reduktion des Alkohol- und Steigerung des Obst- und Gemüsekonsums, Vermeidung von Übergewicht) und dem Einsatz medikamentöser Maßnahmen (Tamoxifen und GnRH-Analoga) kann speziell für Anlageträgerinnen der Hochrisikogene *BRCA1* und *BRCA2* als primär präventive Maßnahme eine chirurgische Intervention vorgenommen werden. Untersuchungen zeigten, dass das Brustkrebsrisiko bei *BRCA*-Mutationsträgerinnen durch eine prophylaktische Ovariectomie halbiert werden kann und eine beidseitige Mastektomie das Erkrankungsrisiko um 90% mindert [27-29].

Im Rahmen der sekundären Prävention wird Angehörigen von Brustkrebsfamilien eine jährliche Mammographie ab dem 30. Lebensjahr bzw. 5 Jahre vor Erkrankungsbeginn der jüngsten Verwandten empfohlen [30].

## 1.2. Die Tumorpathologie und die zellulären Mechanismen des Organismus zur Gewährleistung der genomischen Stabilität

### 1.2.1. Allgemeine Tumorpathologie

Die Kanzerogenese beruht auf einem Funktionsausfall von Genen, deren Genprodukte Wachstumsvorgänge, Differenzierung und Lebensdauer der Zelle steuern und somit ihre funktionelle und strukturelle Integrität in einem Gesamtorganismus ermöglichen. Hierbei werden drei Genklassen, die Onkogene, die Tumorsuppressorgene und die sog. Suszeptibilitätsgene/Mutatorgene unterschieden [31]. Onkogene entstehen aus Protoonkogenen, die physiologische Aufgaben erfüllen und in Phasen des embryologischen, regenerativen oder adaptativen Wachstums exprimiert werden. Durch Mechanismen wie Genamplifikation, Punktmutation, chromosomale Umlagerung (Translokation, Inversion) und Insertionsmutation können Protoonkogene zu Onkogenen aktiviert werden. Über ihre Genprodukte, die Wachstumsfaktoren, Wachstumsrezeptoren, Signalübertragungsproteine, zyklinabhängige Kinasen oder Apoptoseregulationsproteine darstellen, kann ein unkontrolliertes und autonomes Zellwachstum gefördert werden. Während für den proliferativen Effekt der Onkogene eine Genkopie ausreicht, setzt die antiproliferative Wirkung der Tumorsuppressorgene erst aus, wenn beide Allele des Gens betroffen sind (rezessive Mutation). Nach der sog. „two-Hit-Hypothese“ nach Knudson bedarf es dazu zweier Mutationsereignisse. Bereits bei Geburt liegt eine Keimbahnmutation in einem Allel des Tumorsuppressorgens vor. Eine Inaktivierung des zweiten Allels führt schließlich zum vollständigen Ausfall des Gens. Sie geht häufig auf chromosomale Deletionen zurück und kann mit Hilfe einer LOH-Untersuchung (loss of heterozygosity) nachgewiesen werden [32]. Tumorsuppressorgene schützen die Zellen vor unreguliertem Wachstum. Sie können wie das *RB*-Gen, *p53*-Gen und *BRCA1/ BRCA2*- Gen in die Zellzyklus-/Transkriptionsregulation involviert sein oder gehören wie das *APC*- oder *NF1*-Gen der Gruppe der Signaltransduktionsregulatoren an. Mutator- bzw. Suszeptibilitätsgene stellen die dritte Gruppe von Genen dar, die in Tumorzellen häufig mutiert vorliegen. Sie spielen eine allgemeine Rolle beim Schutz der Integrität genetischer Information und werden in zwei Hauptklassen unterteilt: Die „caretaker-genes“ sind an der DNA-

Reparatur beteiligt und die „gatekeeper-genes“ verhindern eine Weitergabe fehlerhafter Erbinformation auf die Tochterzellen bei der Zellteilung [33].

### **1.2.2. DNA-Doppelstrangbruch (DSB)-Reparatursysteme**

Die DNA (Desoxyribonukleinsäure) ist lebenslang schädigenden Einflüssen ausgesetzt. Sowohl exogene Faktoren wie ionisierende Strahlung, Radioaktivität oder Chemikalien, als auch endogene Sauerstoffradikale, die im oxidativen Zellstoffwechsel anfallen, können Defekte der chromosomalen DNA in Form von Doppelstrangbrüchen, Einzelstrangbrüchen, Basendeletionen und Basenquervernetzung induzieren [34]. Die eukaryotische Zelle verfügt daher über DNA-Reparaturmechanismen und die Möglichkeit der Einleitung des programmierten Zelltodes (Apoptose) um genetisch intakte Zellen des Organismus auf längere Sicht zu gewährleisten [34].

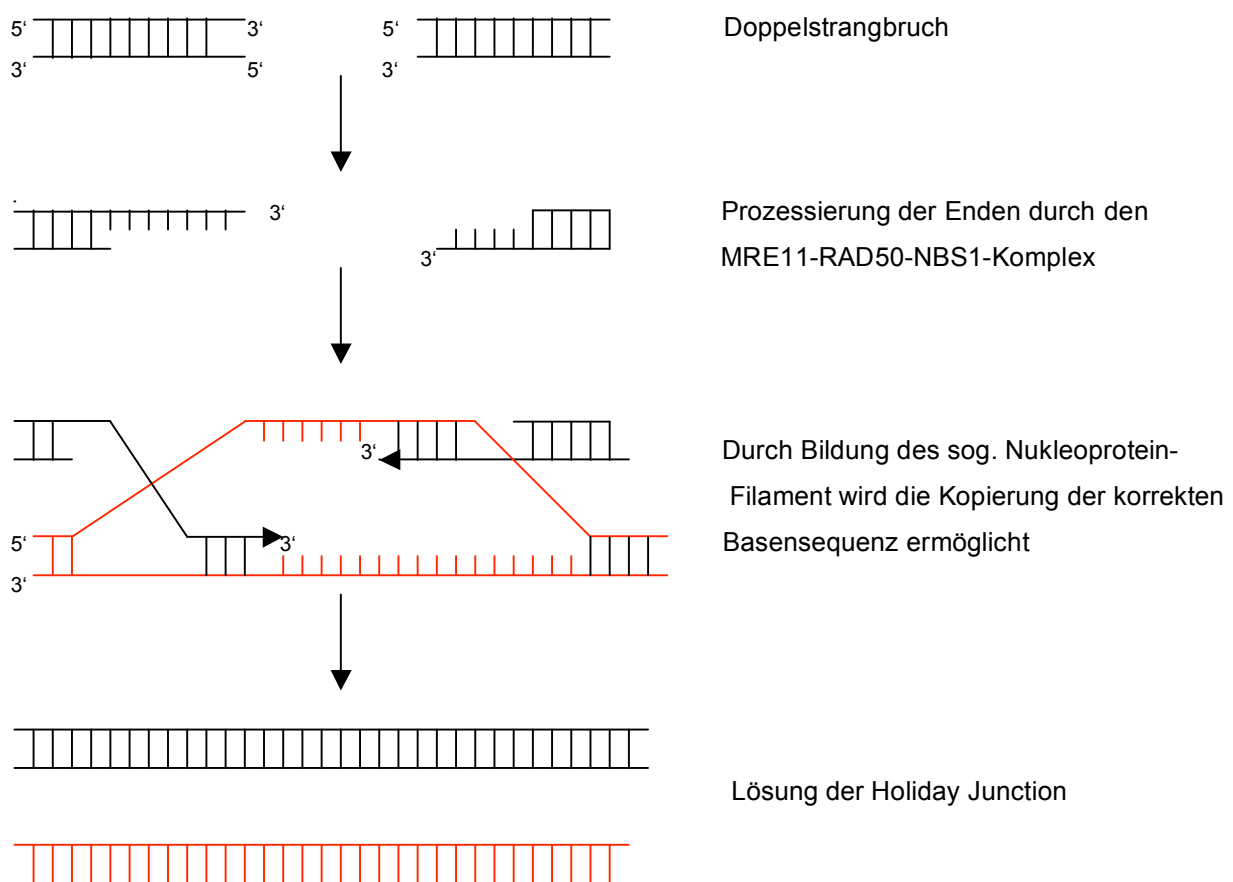
DNA–Doppelstrangbrüche sind die häufigsten durch ionisierende Strahlung hervorgerufenen DNA-Defekte. Bereits einzelne können chromosomale Imbalancen [35] und den Zelltod bedingen [36].

Jedoch sind auch physiologische Vorgänge wie das crossing-over während der Meiose, die V(D)J-Rekombination der Immunglobulin- und T-Zell-Rezeptorgene sowie auch die Aufrechterhaltung der Telomere auf kontrolliert ablaufende Doppelstrangbrüche mit anschließender Reparatur angewiesen [37-39].

Der eukaryotischen Zelle stehen zwei Reparaturmechanismen für Doppelstrangbrüche zur Verfügung: Die homologe Rekombination (HR) ist auf einen homologen Chromosomenabschnitt des Schwesterchromatids angewiesen und findet in der späten S-Phase oder G2-Phase des Zellzyklus statt, während eine Verknüpfung freier DNA-Enden, das so genannte Non-Homologous End Joining (NHEJ), vorwiegend in der G1- und frühen S-Phase erfolgt. Letztere stellt die Hauptform der Doppelstrangreparatur dar und dient im Rahmen der VDJ-Rekombination zur Ausreifung des Immunsystems. Im Vergleich zur homologen Rekombination arbeitet das NHEJ ungenauer, da durch Prozessierung der zu verknüpfenden DNA-Enden kleinste Mikrodeletionen entstehen, die die Sequenz der DNS verändern [40-42].

## Molekularbiologischer Mechanismus der homologen Rekombination

Der homologe Rekombinationsreparaturkomplex besteht aus einer Vielzahl von Proteinen, die an folgendem Reparaturmechanismus beteiligt sind (Abbildung 1). Zunächst werden die Enden des DSB durch die Endo- und Exonukleasefunktion des heterotrimeren Mre11/Rad50/Nibrin (MRN) -Komplexes zu einem Einzelstrang mit 3'-Überhang prozessiert [43]. Daraufhin bindet Rad52 daran, schützt somit die DNA vor einer weiteren Degradierung und stimuliert die Bildung eines Nukleoprotein-Filaments aus Rad51, dem replication protein A (RPA) und dem MRN-Komplex. Rad51 ermöglicht eine Anlagerung der entstandenen 3`-Enden an die intakte homologe Doppelhelix des Schwesterchromatids, so dass eine DNA-Polymerase die korrekte Basensequenz kopieren kann. Zuletzt wird das Zucker-Phosphat-Grundgerüst durch eine Ligase verbunden und die entstandene Überkreuzungsstruktur („Holiday-Junction“) durch eine Resolvase aufgelöst [40-42].



**Abb. 1: Homologe Rekombination [44]**

### **Molekularbiologischer Mechanismus des NHEJ**

Der Non-Homologous End Joining (NHEJ) -Reparaturkomplex besteht aus zwei Untereinheiten des Ku Proteins (Ku70, Ku80), der Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PKcs), der DNA Ligase 4 und dem XRCC4 [45]. Während die Untereinheiten des Ku Proteins und die DNA-PKcs für die initiale Erkennung der gebrochenen DNA-Enden zuständig sind [46], katalysiert der Komplex aus DNA Ligase 4 und XRCC4 die Phosphodiesterverknüpfung der freien DNA-Enden [47].

An dem Reparaturprozess des NHEJ sind eine Anzahl weiterer Proteine beteiligt. Die Histon-Isoform gamma-H2AX wird durch Phosphorylierung aktiviert und verändert die Chromatinstruktur in der Nähe von DSB. Hierdurch wird die Anlagerung von Reparaturproteinen begünstigt [48]. Weiterhin wird vermutet, dass der MRN-Komplex mit seiner Exo- und Endonukleasefunktion die freien DNA-Enden vor deren Ligation prozessiert und sie mit Hilfe seines trimeren Proteingerüsts zangenartig zusammenführt [49-51].

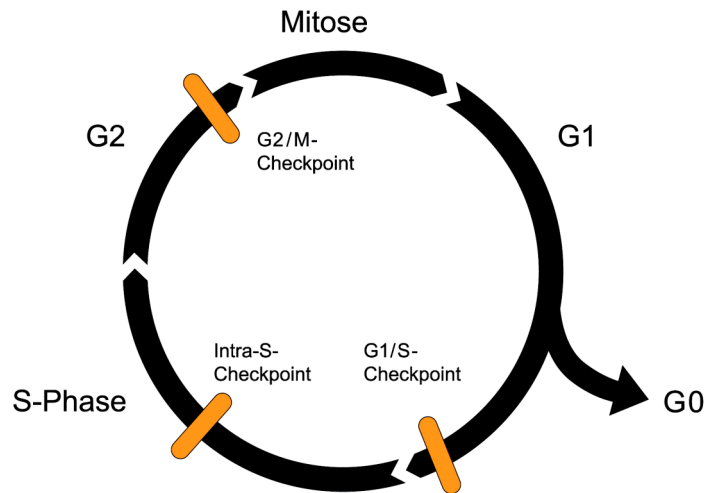
Die genaue Funktion des Mre11-Rad50-NBS-Komplexes im Zusammenhang mit den verschiedenen DSB-Reparaturmechanismen ist nicht vollständig geklärt.

Der Nachweis einer defizienten homologen Rekombination (HR) bei normaler Funktion des NHEJ sowohl bei Hühnerzelllinien mit mutiertem NBS-Gen, als auch Fibroblasten von NBS-Patienten lassen vermuten, dass der MRN-Komplex eine größere Rolle beim HR als beim NHEJ einnimmt [52, 53].

### **1.2.3. Zellzykluskontrolle**

Als Zellzyklus wird die Periode zwischen zwei Zellteilungen bezeichnet. Er wird in eine M-Phase (Mitose-Phase), S-Phase (Synthese-Phase) und die zwei Zwischenphasen G1 und G2 eingeteilt. An bestimmten Kontrollpunkten, den Checkpoints, können „Gatekeeper- Gene“ DNA-Schäden detektieren und einen Zyklusarrest einleiten. Dieser ermöglicht der Zelle einen Zeitgewinn, um den entstandenen Schaden zu reparieren, bevor er an die Tochterzelle weitergegeben wird.





**Abb. 2: Die Phasen des Zellzyklus und Zeitpunkte der verschiedenen Checkpoints (Kontrollpunkte).**

Eine Vielzahl von Proteinen ist an der Regulation des Zellzyklus beteiligt, die hier in stark vereinfachter Weise wiedergegeben wird. Nach einer Zellschädigung durch ionisierende Strahlung wird die Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase des ATM (Ataxia telangiectasia mutated) durch Autophosphorylierung aktiviert [54]. ATM, das durch seine Kinaseaktivität weitere Proteine wie p53, BRCA, CHK2 und Nibrin phosphoryliert, nimmt eine Schlüsselfunktion in der Zellzykluskontrolle ein [55]. Das Tumorsuppressorgen p53 und sein Reaktionspartner p21 spielen für den G1-Phase-Arrest eine wichtige Rolle, während CHK2 an der Einleitung der Zellzyklusblockade am G2/M-Checkpoint beteiligt ist [56, 57]. Das phosphorylierte Nibrin, Bestandteil des trimeren Rad50-Mre11-Nibrin-Komplexes, ist u.a. bei der Blockierung der S-Phase involviert. Führt ionisierende Strahlung zu DNA-Defekten wie Doppelstrangbrüchen wird bei funktionstüchtigem Reparatursystem die DNA-Synthese unterbrochen. Bei Ausfall dieses Kontrollmechanismus schreitet die Synthesephase weiter fort, man spricht dann von radioresistenter DNA-Synthese (RDS) [54, 55, 58-60].

### 1.3. Das Nijmegen Breakage Syndrom (NBS)

Das Nijmegen Breakage Syndrom wurde erstmals im Jahre 1981 an der Universität von Nijmegen in Holland beschrieben und gehört mit dem Bloom-Syndrom, der Fanconi-Anämie und der Ataxia Telangiectasia zu der Gruppe der Chromosomeninstabilitätssyndrome [61]. Es handelt sich um eine seltene autosomal rezessive Krankheit mit der höchsten Prävalenz in Osteuropa [62]. Aufgrund von Übereinstimmungen immunologischer, zytogenetischer und zellbiologischer Untersuchungsergebnisse wurde NBS anfangs für eine Variante der Ataxia telangiectasia (AT) gehalten. Beide Erkrankungen zeichnen sich durch eine erhöhte Strahlensensibilität, einen Immundefekt und ein erhöhtes Krebsrisiko aus [63]. Schließlich wurde das *ATM*-Gen auf Chromosom 11q22-23 lokalisiert [64] und diese Region als NBS-Genort ausgeschlossen [65]. Daraufhin konnten Saar et al. bei 14 NBS-Familien durch eine genomweite Kopplungsanalyse das *NBS1*-Gen auf ein 1cM Intervall zwischen den Markern D8S271 und D8S270 auf Chromosom 8q21 eingrenzen [66]. Ungefähr ein Jahr später wurde es von zwei Arbeitsgruppen etwa zeitgleich kloniert [67, 68]. Parallel und unabhängig von der Positionsklonierung konnte das Produkt des *NBS1*-Gens, Nibrin, auf funktionellem Wege durch Untersuchung der molekularen Mechanismen der Doppelstrangbruch(DSB)-Reparatur identifiziert werden [69]. Nach einer Exposition von Fibroblasten mit ionisierender Strahlung wurden durch Immunpräzipitationverfahren Proteinkomplexe (sog. Foci) im Zellkern nachgewiesen. Es handelte sich dabei um Reparaturkomplexe, die aus den hochkonservierten Proteinen Rad50, Mre11 sowie der Untereinheit p95 (Molekulargewicht: 95 kDa) aufgebaut sind [69]. Bei Zellen von NBS-Patienten blieb eine durch Bestrahlung induzierte Bildung dieser Foci aus. Die Vermutung, dass es sich bei Nibrin um p95 handelt, wurde durch einen Sequenzvergleich der jeweiligen DNA bestätigt [69].

#### 1.3.1. Das klinische Bild des Nijmegen Breakage Syndrom

Als Krankheitsmerkmale, die bei fast allen NBS-Patienten beobachtet werden, gelten Mikrozephalie mit kraniofazialer Dysmorphie, Wachstumsretardierung, Immundefizienz, Chromosomenbrüchigkeit mit erhöhter Strahlensensibilität sowie eine Prädisposition für maligne Tumoren [61, 70]. Bis auf etwa 10% der NBS-Patienten, die bezüglich des

Immunsystems unauffällig sind, finden sich bei den Betroffenen Defekte der humoralen und zellulären Immunität [71-73].

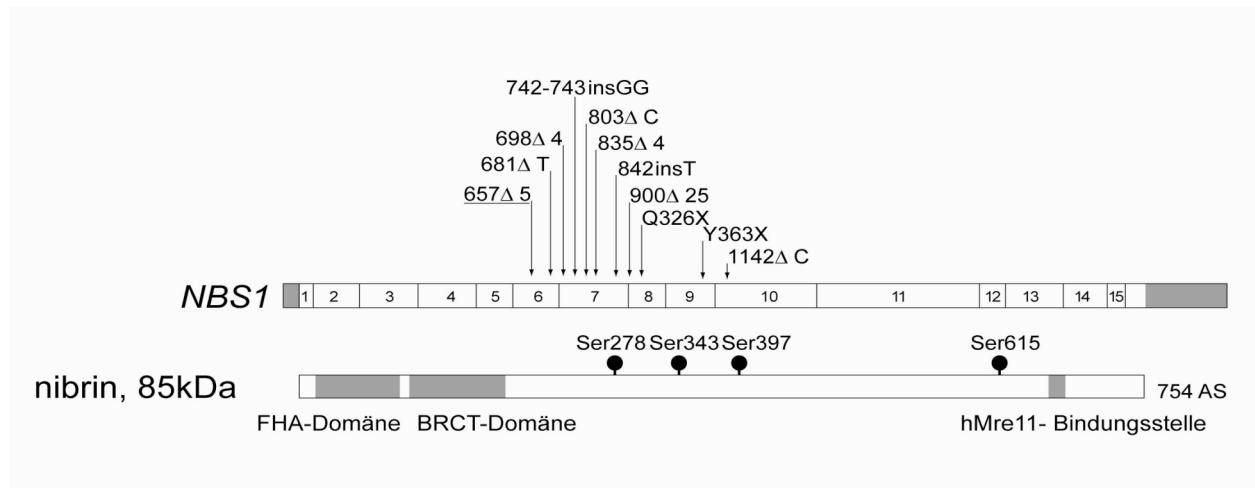
Die charakteristische Chromosomeninstabilität führt sowohl zu Chromatidbrüchen als auch zu chromosomalen Reunionsfiguren in somatischen Zellen. Am häufigsten beobachtet wird eine Translokation zwischen den Chromosomen 7 und 14, deren Bruchpunkte die Regionen der Immunoglobulin- und T-Zellrezeptorgene betreffen [74]. NBS-Patienten weisen eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber ionisierender Strahlung auf. Diese führt bei Fibroblasten und Lymphozyten betroffener Patienten im Vergleich zu gesunden Zellen zu einer mindestens doppelt so hohen Letalität [73, 75]. Die Lebenserwartung von NBS-Patienten liegt deutlich unterhalb der des Bevölkerungsdurchschnitts. Ca. 40% der Betroffenen entwickeln bereits während ihrer Kindheit einen Tumor. Die Non-Hodgkin B-Zell-Lymphome gehören mit rund 80% zu der am häufigsten diagnostizierten Tumorart [76, 77]. Eine adäquate Behandlung der Krebserkrankung bei NBS-Patienten wird durch die bestehende Hypersensibilität gegenüber ionisierender Strahlung und Chemotherapeutika erschwert [73, 78].

### **1.3.2. Der molekulargenetische Hintergrund – das *NBS1*-Gen**

Das *NBS1*-Gen, bestehend aus 16 Exons, erstreckt sich auf Chromosom 8q21 über einen 50 Kilobasen großen genomischen DNA-Abschnitt. In der 3`untranslatierten Region liegen zwei Poly(A)-Signale vor, so dass zwei unterschiedliche mRNAs gebildet werden, von denen das größere Transkriptionsprodukt (4,4 kb) in den meisten Geweben überwiegt [68]. Das Genprodukt Nibrin hat eine Länge von 754 Aminosäuren und weist keine globale Homologie zu anderen bereits bekannten Proteinen auf. Umfassende Sequenzvergleiche zeigten jedoch zwei benachbarte Domänen im aminoterminalen Bereich des *NBS1*-Gens, die forkhead-associated domain (FHA-Domäne) und die breast cancer carboxyterminal domain (BRCT-Domäne). Beide wurden bereits einzeln auch in anderen Proteinen des Zellzyklus und des DNA-Reparatursystems nachgewiesen [79, 80]. Der C-terminale Abschnitt von Nibrin, der die Aminosäuren 363 bis 754 umfasst, dient als Bindungsstelle für das Protein Mre11 und ist für die Lokalisation des Rad50/Mre11/Nibrin-Reparaturkomplexes an Doppelstrangbrüchen der DNA im Zellkern verantwortlich [81, 82]. Durch die Bindung seiner FHA/BRCT-Domäne an das zuvor durch ATM phosphorylierte gamma-

Histon2AX führt Nibrin die Reparaturproteine Rad50 und Mre11 mit ihrer Endo- und Exonukleaseaktivität zu den Doppelstrangbrüchen [83].

Von den insgesamt 11 bekannten Mutationen bei NBS-Patienten kommt die slawische Mutation 657del5 mit über 90% am häufigsten vor [62]. Durch diese wird eine interne Initiationsstelle der *NBS1* mRNA aktiviert, so dass neben dem amino-terminalen Proteinfragment (26kDa) ein zweites, größeres (70kDa) Fragment mit einer Restfunktion gebildet wird. Aufgrund dieses hypomorphen Defekts (Restfunktion des Genprodukts) sind NBS-Patienten im Vergleich zu „knock-out“ –Mäusen, die eine Nullmutation im *NBS1*-Gen aufweisen und bereits im Embryonalstadium versterben, lebensfähig [84, 85]. Ebenso konnte für die beiden Abbruchmutationen 834del4 und 900del25, die ihren ethnischen Ursprung in Italien bzw. Marokko haben, der Mechanismus der alternativen Translation nachgewiesen werden [84, 86]. Die Mutation, 742insGG im Exon 7 führt über einen noch unbekanntem Mechanismus zu einer verstärkten Expression eines alternativen Spliceprodukts des *NBS1*-Gens. Dieses wird in Wildtyp- Zellen nur in 100-fach niedrigeren Mengen nachgewiesen [87]. Neben dem konstitutiven Spleißvorgang, bei dem mit Hilfe der Konsensus Spleiß Donor-(GT) Seite, Konsensus Spleiß Akzeptor -(AG)-Seite, Branching-Seite (20-50 Bp vor dem Spleiß-Akzeptor) sowie einer pyrimidinreichen Region (unmittelbar vor dem der Spleiß-Akzeptor Site) Intronbereiche erkannt und aus der prä-mRNA herausgeschnitten werden, existiert ein alternativer Spleißvorgang [88-90]. Über einen in weiten Strecken noch unbekanntem Mechanismus, der durch Sequenzbereiche außerhalb der Konsensus Spleißstellen reguliert wird, entstehen aus einer prä-mRNA durch Ein- oder Ausschluss einzelner Exons bzw. Introns verschiedene mRNA-Isoformen [91]. Auch bei dem *NBS1*-Gen sind mehrere alternative Spleißprodukte bekannt, die in der Wildtyp-Zelle in nur sehr geringen Mengen nachgewiesen werden können [87, 92, 93]. Über ihre Funktion liegen derzeit noch keine genauen Erkenntnisse vor.



**Abb. 3: Das *NBS1*-Gen und sein Genprodukt, das Nibrin. Dargestellt sind alle bisher bekannten 11 Mutationen [94]**

### 1.3.3. Das Krebsrisiko bei heterozygoten *NBS1*-Mutationen

Im Falle des *ATM*-Gens, das ebenso wie das *NBS1* an der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen und der Zellzykluskontrolle beteiligt ist, konnte bereits bei heterozygoten Mutationsträgerinnen ein erhöhtes Auftreten von Brustkrebs nachgewiesen werden [95, 96]. Es wird vermutet, daß Missensemutationen, die überwiegend bei betroffenen Frauen vorliegen, durch den so genannten „dominant negative effect“ das Brustkrebsrisiko der Mutationsträgerinnen erhöhen. Dieser ist eine Blockierung der Proteinfunktion durch ein verändertes Genprodukt des mutierten Allels, welches in Konkurrenz zu dem Protein des gesunden Allels steht [97-99]. Ein weiterer potentieller Mechanismus zur Erklärung einer phänotypischen Auswirkung der Heterozygotie stellt die Haploinsuffizienz dar. Die Tumorgenese wird hierbei durch eine Reduktion der Proteinmenge erklärt, die bei dem Ausfall eines Allels des Gens entsteht [100, 101]. Neben dem erhöhten Krebsrisiko für lymphatische Neoplasien bei homozygoten Trägern der Mutation 657del5 bei NBS-Patienten konnte in verschiedenen Studien ein statistisch erhöhter Anteil an Trägern der Gründermutation 657del5 unter Patienten mit verschiedenen Tumorleiden festgestellt werden, so dass eine erhöhte Krebsprädisposition bei Heterozygoten dieser Mutation angenommen werden muss [102, 103]. Des Weiteren konnten in Arbeiten die Missense-Mutationen I171V, R215W, D95N bei verschiedenen Tumorarten gehäuft beobachtet werden, so dass auch hier möglicherweise ein erhöhtes Krebsrisiko bei Trägerinnen und Trägern besteht.

Studie	Krebsart	Ex	Mutation	Häufigkeit (Kontrollen)
Roznowski, K., et al., 2007 (135)	Mammakarzinom	5	I171V	5/270 (1/500)
Bogdanova, N., et al., 2007 (136)	Mammakarzinom	6	657del5	Weißrussland: 15/1588 (1/1014) Deutschland: 1/1076 (1/1017)
	Mammakarzinom	5	R215W	Weißrussland: 9/1588 (5/1014) Deutschland: 9/1076 (2/1017)
Steffen, J., et al., 2006 (137)	Mammakarzinom	6	657del5	11/562
Buslov, K.G., et al., 2005 (130)	Mammakarzinom	6	657del5	11/562
Gorski, B., et al., 2003 (129)	Mammakarzinom	6	657del5	5/230 (3/530)
Carlomagno, F., et al., 1999 (131)	Mammakarzinom	6	657del5	1/477 (1/866)
Ziolkowska, I., et al., 2007 (141)	Larynxkarzinom	5	I171V	9/268 (1/500)
Mosor, M., et al., 2006 (140)	ALL	5	I171V	5/135 (1/500)
Varon, R., et al., 2001 (134)	ALL	3	S93L	1/47 (0/55)
		3	D95N	1/47 (0/55)
		5	I171V	4/47 (0/110)
		6	R215W	1/47
Tessitore, A., et al., 2003 (92)	Mammakarzinom	2	R43X	1/20
	Ovarialkarzinom	2/3	Ins 50 bp von Intron 2	1/20
	Colonkarzinom	13	Del aa 639-690	1/20
Debniak, T., et al., 2003 (146)	Mammakarzinom	6	657del5	7/873 (2/692)
Steffen, J., et al., 2004 (121)	Mammakarzinom	6	657del5	4/224 (10/1620)
	Melanom			4/105 (10/1620)
	Lymphom			2/42 (10/1620)
	Kolonkarzinom			3/234 (10/1620)
	Kolonkarzinom			3/234 (4/1620)
Cybulski, C., et al., 2004 (132)	Prostatakarzinom	6	657del5	12/361 (9/1500)
Resnick, I.B., et al., 2003 (103)	ALL/NHL	6	657del5	2/68 (0/548)
Seemanova E, et al., 2006 (149)	Lymphome im Kindesalter	6	657del5	5/565 (42/6984)
Stanulla, M. et al., 2000 (126)	NHL im Kindesalter	6	657del5	2/68 (0/548)
Meyer, P. et al., 2007 (148)	Melanom	6	657del5	2/80 (3/530)

Tabelle 4: Übersicht der bereits nachgewiesenen Sequenzveränderungen der heterozygoten Mutationsträger/-innen im NBS1-Gen im Zusammenhang mit einer Krebserkrankung.

#### **1.3.4. Korrelation zwischen Polymorphismen im *NBS1*-Gen und einem erhöhten Krebsrisiko.**

In verschiedenen Assoziationsstudien konnte ein Zusammenhang zwischen Polymorphismen in DNA-Reparaturgenen und einem erhöhten Krebsrisiko dargestellt werden. Bei Trägerinnen bestimmter Sequenzvarianten in den Genen *XRCC1*, *XRCC3* oder *BRCA2* wurde ein erhöhtes Brustkrebsrisiko nachgewiesen [104-107]. In einer weiteren Untersuchung zeigte sich ein Zusammenhang zwischen dem Polymorphismus 553 G/C in Exon 5 des *NBS1*-Gen und einem erhöhten Lungenkrebsrisiko [108, 109].

In einem polygenen Modell, bei dem die Karzinogenese des Mammakarzinoms auf einer Kombination von Veränderungen verschiedener Suszeptibilitätsgenen beruht, könnten einzelne Polymorphismen unterschiedlicher Reparaturgene einen synergistischen Effekt ausüben und in Verbindung mit Umweltfaktoren zu einer erhöhten Disposition für eine Krebserkrankung führen. Andererseits besteht die Möglichkeit, daß ein Polymorphismus über Linkage Disequilibrium (LD) mit einer Mutation in einem benachbarten Genomabschnitt in Verbindung steht [110].

## 2. Fragestellung der Arbeit

Neben den Genen *BRCA1* und *BRCA2*, die mit jeweils hoher Penetranz für etwa die Hälfte aller familiären Mammakarzinome verantwortlich sind, werden weitere Kandidatengene vermutet, die mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko einhergehen. Es besteht die Annahme, dass es sich um niedrig penetrante Gene handelt, deren Defekte einen synergistischen Effekt auf das Erkrankungsrisiko ausüben. Die Beobachtung, dass eine vorausgegangene Exposition mit ionisierender Strahlung einen besonderen Risikofaktor für das Mammakarzinom darstellt, führt zu der Annahme, dass es sich bei den Kandidatengenen um Gene des Chromosomenbruchreparatursystems handelt. Ein erhöhtes Brustkrebsrisiko für heterozygote Mutationsträgerinnen des *ATM*-Gens konnte bereits nachgewiesen werden. Für die vorliegende Arbeit ergeben sich folgende Fragestellungen:

1. Liegen bei sporadischen oder familiären Brustkrebspatientinnen, die auf Mutationen in *BRCA1* und *BRCA2* negativ getestet wurden, Mutationen im *NBS1*-Gen vor und stellt das *NBS1*-Gen ein Suszeptibilitätsgen für das Mammakarzinom dar?
2. Kann eine Assoziation zwischen bekannten Polymorphismen im *NBS1*-Gen und einem erhöhten Brustkrebsrisiko nachgewiesen werden?
3. Besteht ein Zusammenhang zwischen der Tumorpathologie und den Polymorphismen bzw. Mutationen im *NBS1*-Gen?



### 3. Materialien

#### 3.1. Patienten

Das in dieser Arbeit untersuchte Patientenkollektiv umfasst insgesamt 64 Patientinnen mit familiären und 64 Patientinnen mit sporadischem Brustkrebs. Die Arbeitsgruppe Tumorgenetik des Max-Delbrück-Zentrums (MDC) in Berlin-Buch stellte mir freundlicherweise aus EDTA-Blut extrahierte DNA zur Verfügung. Bei allen Proben wurden zuvor durch Sequenzierung Mutationen in den Tumorsuppressorgenen *BRCA1* und *BRCA2* ausgeschlossen. Die familiären Brustkrebsfälle erfüllten jeweils mindestens eines der folgenden sieben Einschlusskriterien.

Einschlusskriterium: Familie mit...	
1	mind. zwei leiblich verwandten Frauen, die an einem Mammakarzinom und/oder Ovarialkarzinom erkrankt sind. Erkrankungsalter bei mind. einer Frau vor dem 50 Lj.
2	mind. drei leiblich verwandten Frauen, die an einem Mammakarzinom und/oder Ovarialkarzinom erkrankt sind.
3	mind. einem Mann, der an einem Mammakarzinom erkrankt ist
4	mind. einer Frau, die vor dem 30. Lj. an einem Mammakarzinom erkrankt ist.
5	mind. einer Frau, die vor dem 40. Lj. an einem Ovarialkarzinom erkrankt ist.
6	mind. einer Frau, die bilateral an einem Mammakarzinom erkrankt ist, wobei die Ersterkrankung vor dem 40. Lj. liegt.
7	mind. einer Frau, die sowohl an einem Mammakarzinom als auch an einem Ovarialkarzinom erkrankt ist.

**Tab. 5: Einschlusskriterien der familiären Brustkrebspatientinnen**

Während das Kriterium 1 bei 67% (43 von 64 Patientinnen) und Kriterium 2 bei 44% (28 von 64 Patientinnen) der familiären Brustkrebspatientinnen vorlag, wurden die übrigen Punkte nur vereinzelt erfüllt. Für alle untersuchten Patientinnen wurden mir freundlicherweise histologische Befunde der Mammakarzinome vom pathologischen Institut- Robert- Rössle- Klinik, Medizinische Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin zur Verfügung gestellt. Als Kontrollkollektiv diente die DNA von 93 gesunden

Blutspendern mit 50 Frauen und 43 Männern. Für drei der Patientinnen mit jeweils einer heterozygoten Mutation im *NBS1*-Gen (I171V, 657del5 und 803delC) war DNA vorhanden, welche vom Institut für Pathologie (Robert- Rössle- Klinikum, Berlin Buch) bereitgestellt wurde. Für diese drei Proben wurde ein „loss of heterozygosity“ im *NBS1*-Gen durch direkte Sequenzierung in unserer Arbeitsgruppe ausgeschlossen.

### 3.2. Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Elektrophoresekammer	BRL HORIZON 11.14	Gibco, jetzt Invitrogen, Karlsruhe, D
	BLR HORIZON 58	Gibco, jetzt Invitrogen, Karlsruhe, D
Spannungsgenerator für die Elektrophoresekammer	Electrophoresis Power Supply ST606T	Gibco, jetzt Invitrogen, Karlsruhe, D
Mikrowelle		Bosch, Gerlingen-Schlierhöhe, D
Pipetten	1µl, 2µl, 20µl, 100µl	Eppendorf, Hamburg, D
	200µl, 1000µl	Abimed, Langenfeld, D
Sequenzierer	ABI-PRISM 310 bzw. 3100 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Foster City, USA
Thermocycler	GeneAmp PCR System 9600	Perkin Elmer Wellesley, USA
	GeneAmp PCR System 2400	Applied Biosystems Foster City, USA
UV-Flächenstrahler		Herolab, Wiesloch, D
Videokamera (Agarosegel-Auswertung)		Herolab, Wiesloch, D
Drucker für Gelfotos		Mitsubishi, Tokio, Japan
Fluoreszenzdetektor	Fluor Imager SI	Molecular, Dynamics, Sunnyval, USA

Gerät	Typ	Hersteller
Vortex	Vibrofix VF 1 Electronic	Jahnke&Kunkel, Staufen, D
Waage	BP 3100 S	Satorius, Göttingen, D
Zentrifugen	Labofuge 400 R	Heraeus Instruments, Osterode, D
	Centrifuge 5415c	Eppendorf, Hamburg, D

### 3.3. Computer-Software

Programm	Verwendung
EASY Plus	Darstellung von Agarosegelen
ABI Prism sequencing analysis (Version 3.7 und 5.1.1) Perkin Elmer; Norwalk USA	Sequenzauswertung

### 3.4. Datenbanken

- Genecards: <http://nciarray.nci.nih.gov/cards/>
- Genatlas: <http://www.dsi.univ-paris5.fr/genatlas/>
- NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Fishers Exact Test: <http://www.graphpad.com/quickcalcs/contingency1.cfm>
- BDGP: [http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/splice.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html)

### 3.5. Chemikalien und Biochemikalien

Bezeichnung	Bezugsquelle:
Agarose 1404	Serva, Heidelberg, D
Big Dye Terminator Mix	Applied Biosystems, Foster City, USA
Big Dye Puffer	Applied Biosystems, Foster City, USA
Borsäure	Merck, Whitehouse Station, USA
Dephosphorylation buffer (10%)	Roche, Mannheim, D

Bezeichnung	Bezugsquelle:
dNTP-Set	InViTek, Berlin, D
EDTA (ethylenediamine tetraacetic solution)	Merck, Whitehouse Station, USA
Ethanol	Merck, Whitehouse Station, USA
Ethidiumbromid	Boehinger, Mannheim, D
Exonuclease I Enzyme (10U/μl)	New England BioLabs, Beverly, USA
Exonuclease I Buffer	New England BioLabs, Beverly, USA
HPLC-Wasser	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
1-kb-DNA-Marker	Gibco, jetzt Invitrogen, Karlsruhe, D
Na-Acetat	Merck, Whitehouse Station, USA
Orange G (Ladepuffer)	Merck, Whitehouse Station, USA
SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase; 1U/μl)	Roche, Mannheim, D
Taq-DNA-Polymerase (50U/μl)	Eppendorf, Hamburg, D
Taq-Polymerase-Puffer (10x)	Eppendorf, Hamburg, D
Tris	Carl Roth GmbH und Co., Hamburg, D

### 3.6. Puffer

<b>10 x TBE-Puffer:</b>	540 g	Tris-Base
	257 g	Borsäure
	46,5 g	EDTA
	Ad 5 l	H <sub>2</sub> O

<b>Präzipitationsmix:</b>	4,0 ml	EDTA 0,1 mM
	0,5 ml	Na-Acetat (3 M, pH 5,3)
	Ad 50 ml	Ethanol (100%)

### 3.7. verwendete Kits

Kit	Hersteller
DyEx 2,0 Spin Kit zur Reinigung der Sequenzier-PCR	Qiagen, Hilden, D
ABI Prism BigDYE Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, V1	Applied Biosystems, Foster City, USA

### 3.8. Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Blue Cap Röhren (50ml)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Eppendorf Cups (0,5 und 1,5ml)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Pasteur-Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht, D
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, D
PCR-Tubes ultra thin 0,2ml	Biozym, Oldendorf, D
96-Well-Platten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D

### 3.9. Primer

Alle Primer wurden bei den Firmen Thermo Hybaid und MWG Biotech AG bestellt und hatten eine ursprüngliche Konzentration von 100pmol/µl. Für die weitere Verwendung bei der PCR und Sequenzierung wurden sie mit HPLC-Wasser auf eine Konzentration von 10pmol/µl verdünnt.

Für das relativ große Exon 11 (448 bp) wurden die zwei Primerpaare 11a (F+R) und 11b (F+R) verwendet. Das Exon 16, das aus 2114 bp besteht, wurde nur in seinem ersten Abschnitt 16.1 untersucht, da dort alle bisher bekannten genetischen Variationen vorkommen.

Exon	F (Forward) R (Reverse)	Sequenz von 5' in 3' Richtung	Größe des PCR Produkts
1	F R	TCA TCC AAG GCA GCC TGC GTG TGC CAT ACA GCG TAC TCG CC	323bp
2	F R	CTT TGA TAG CCT TCA GTG AG CTC TCT CTC ACA TAC AAA CC	414bp
3	F R	CAG TAA TTG TTG TTG TCT GCC GT AGG ATT TGG CTG AAA CAA AG	332bp
4	F R	CTT AAT GAT GAG GAA CTG CTT AAA TGG TAT ACA AAG GG	477bp
5	F R	TTA TGG ATG TAA ACA GCC TC TAC CGA ACT ATA ACA CAG CA	328bp
6	F R	CAG ATA GTC ACT CCG TTT ACA A CAA AAT GAA ATA CGT TAA CA	291bp
7	F R	CCA AAT CAA ATT CTT ATG TGT TC CAT AAA ATC TCC TAC TTG CAG	315bp
8	F R	GAG GTT GCT TTA TCT TGA CA CCC TAG CAA GTA TAT GAG AT	270bp
9	F R	CTC AGC ATG GTA TAG TCT AA CTC AAG AGA CAA CCT GAT AA	320bp
10	F R	TGC TTT CTT GGG ATG GTA AA GCA GCA GAA GCA TAC TTA ATC AG	540bp
11	aF aR	CTA AAT GGT TAC TTA GCT GTG TTC TAT GGC CAC ATC ATC CA	576bp (Größe bezieht sich von 11aF- 11bR)
11	bF bR	CTG CCA GTA AAT CTC ATG CT CGA AAG TAC CTG TTA GCA TTC	
12	F R	ATG CCT GGT CAT ACA TAA CA AAT TGA TGA GAT GAC AGT CC	278bp
13	F R	AGA TTC CCA AAT GAC AAG TG AGT TCA TAT CCT TCC TAG AG	325bp
14	F R	AAA CAT CTT TGG CAC TTA TGC AGA AGA ATT TGC TTG AAG GC	296bp
15	F R	CTA TTG GTT GTC TTT GAG TG GTT TCC ATG TAC TCT TTC C	332bp
16	F R	TCA TTC CCA TCC TAT TTG CC TGG AAG GGT GAC TTT AGT CT	447bp

Tab. 6: Nukleotidsequenzen der verwendeten Primer und Basenpaarlängen der Amplifikate einzelner Exons.

### 3.10. Statistik

Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse wurden folgende Tests verwendet:

1. Mit dem Vierfeldertest ( $\chi^2$ -Test) lassen sich bei zwei unabhängigen Stichproben mit dichotomen Variablen Aussagen über den Zusammenhang zwischen der Zugehörigkeit zu einer Stichprobe und dem Vorhandensein eines Merkmals treffen. Die erwartete Häufigkeit sollte mindestens bei 5 liegen. Zumindest aber sollte der Anteil mit geringerer Häufigkeit bei unter 20 % liegen.
2. Fishers „exact test“: Er wird anstelle des  $\chi^2$ -Tests durchgeführt, wenn die Häufigkeiten zu gering sind.

## 4. Methoden

### 4.1. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (engl. polymerase chain reaction) wurde von Mullis et al. 1985 entwickelt und ermöglicht eine exponentielle Vervielfältigung (Amplifikation) gewünschter DNS-Abschnitte in vitro [111]. Als Reagenzien sind bidest. Wasser, Desoxynukleotidtriphosphate (Baussteine der zu synthetisierenden DNA), eine DNA-Polymerase, Puffer sowie zwei Primer (Oligonukleotide bestehend aus ca.20 Basen, die zu den 3`-Enden des zu amplifizierenden DNA-Bereichs komplementär sind) erforderlich.

Nach Zugabe der zu untersuchenden DNA wird der Reaktionsansatz für 5 Minuten auf 96°C erhitzt, so dass die DNA denaturiert. Daraufhin folgt ein aus drei Temperaturen bestehender Zyklus, der 30-35-mal wiederholt wird: Zunächst erfolgt eine weitere Denaturierungsphase bei 95°C, bevor durch Erreichen der Annealingtemperatur (diese ist für jeden Primer individuell zu ermitteln) eine Anlagerung der Primer an die Einzelstränge stattfindet. Mit Hilfe der thermostabilen DNA-Polymerase (Taq.-Polymerase), die aus dem Bakterium *Thermophilus aquaticus* gewonnen wird, wird bei 72°C, ausgehend vom 3`-Ende der Primer, ein neuer, zum Einzelstrang der Ausgangs-DNA komplementärer, DNA-Strang synthetisiert (engl. elongation). Mit jedem einzelnen Zyklus verdoppelt sich die Anzahl der Matrizenstränge, so dass die Vervielfältigung der DNA exponentiell verläuft. Nach Abschluss des letzten Zyklus erfolgt eine letzte 10min. Elongation bei 72°C.

Für die Amplifikation des *NBS1*-Gen wurde folgender Standard-PCR-Ansatz und folgendes PCR-Programm etabliert:



<b><u>PCR-Ansatz</u></b>		<b><u>PCR-Programm</u></b>		
10 x PCR-Puffer	3 $\mu$ l	96	$^{\circ}$ C	2 min.
Primer F (10 pmol)	0,5 $\mu$ l	95	$^{\circ}$ C	20 sec.
Primer R (10 pmol)	0,5 $\mu$ l	AT	$^{\circ}$ C	30 sec. (35 Zyklen)
dNTPs (10 mM)	0,3 $\mu$ l	72	$^{\circ}$ C	40 sec.
Taq-Polymerase (5 U/ $\mu$ l)	0,1 $\mu$ l	72	$^{\circ}$ C	10 min.
dH <sub>2</sub> O	25 $\mu$ l	4	$^{\circ}$ C	Hold
DNA	1 $\mu$ l			
Gesamtvolumen	30 $\mu$ l			

Die für das PCR-Programm verwendeten Annealingtemperaturen variieren abhängig von dem GC- bzw. AT- Gehalt der Primer und der damit verbundenen Schmelztemperatur. Die verwendeten Annealingtemperaturen des jeweiligen Exons können der Tabelle 3 entnommen werden. Zur Steigerung der Spezifität der PCR wurde für die Exons 7, 9, 10, 11, 15 und 16 eine „Touch Down“- PCR etabliert. Bei diesem Verfahren wird die Hybridisierungstemperatur, die 10 $^{\circ}$ C über der des Primers liegt, sukzessiv in 1 $^{\circ}$ C-Schritten bis zum optimalen Temperaturniveau abgesenkt. Diesen 10 „Vorzyklen“ schlossen sich 30 „Hauptzyklen“ mit der Annealingtemperatur von 55 $^{\circ}$ C an.

#### **Touch Down-PCR**

96	$^{\circ}$ C	2	min	
96	$^{\circ}$ C	10	s.	
65-55	$^{\circ}$ C	15	s	(10 Zyklen)
72	$^{\circ}$ C	30	s.	
96	$^{\circ}$ C	20	s	
55	$^{\circ}$ C	30	s	(30 Zyklen)
72	$^{\circ}$ C	40	s	
72	$^{\circ}$ C	10	min	

## 4.2. Agarosegelelektrophorese

Nach der Amplifikation wurde das PCR-Produkt elektrophoretisch aufgetrennt und konnte somit hinsichtlich seiner Spezifität und Menge untersucht werden. Hierzu wurden 2g Agarose mit 100ml 1x TBE-Puffer (2%) versetzt, in der Mikrowelle aufgeköcht. Anschließend erfolgte die Zugabe von 15µl Ethidiumbromid, ein Fluoreszenzfarbstoff, der zwischen GC-Paare der DNA interkaliert und somit diese im UV-Durchlicht sichtbar macht. Nach kurzer Abkühlung wurde das Gemisch in eine Gelkammer ausgegossen.

Nach der Polymerisation stand das Gel für die Elektrophorese bereit. Vor der Überführung der Proben auf das Agarosegel wurden 5µl des PCR-Amplifikats mit gleicher Menge Ladepuffer (Orange G) versetzt, um ein besseres Absinken der PCR-Produkte in die Geltaschen zu ermöglichen.

Die anschließende Auftrennung erfolgte durch Anlegen eines elektrischen Feldes (100V für ca. 20min). Aufgrund negativ geladener Phosphatreste bewegen sich die PCR-Fragmente in Richtung Anode und trennen sich ihrer Größe nach auf (kürzere Fragmente wandern schneller als längere).

Als DNA-Längenstandard wurde ein 1 kb-Marker verwendet. Nach der Elektrophorese wurden die PCR-Produkte mit Hilfe eines UV-Flächenstrahlers sichtbar gemacht und konnten per Videokamera und der Easy-Plus Software fotografisch dokumentiert werden.

## 4.3. Exonukleaseverdau zur Reinigung von PCR-Produkten für die Sequenzierung

Um die PCR-Produkte als Ausgangsprodukt für die Sequenzierreaktion verwenden zu können, mussten sie mittels Exonuclease-SAP-Verdau gereinigt werden. Dafür dienten die Enzyme Exo I und SAP (shrimp alkaline phosphatase). Diese bauen die überschüssigen Primer, die eine Sequenzierreaktion stören würden, ab.

Der Exonucleaseverdau wurde nach folgendem Ansatz durchgeführt:

Komponenten	Volumen	Bedingungen für den Exonuklease-Verdau	
dH <sub>2</sub> O	2,5µl	37°C	30 min
ExoI	0,1µl	80°C	15 min
SAP	0,4µl		
	8µl		
+ PCR-Produkt	3µl		
	11µl		

#### 4.4. Sequenzierreaktion der gereinigten PCR-Produkte

Als Sequenzierungsverfahren diente die auf den Arbeiten von Sanger beruhende Kettenabbruch-Methode, bei der basenspezifisch terminierte DNA-Fragmente entstehen und anschließend elektrophoretisch ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Die in dem Sequenzieransatz enthaltenden fluoreszenzmarkierten Didesoxy-Nukleotide (ddNTPs aus ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) führen zu einem Abbruch der DNA-Synthese, wobei ihre basenspezifischen Fluoreszenzsignale mit Hilfe der Sequenzierautomaten detektiert werden können. Die Sequenzierreaktion wurde mit dem Sequenzierung Kit (ABI Prism DNA-Sequenzierung Kit; Applied Biosystems) nach folgendem Ansatz durchgeführt:

Komponenten	Volumen	Bedingungen für Sequenzierungs-PCR		
BigDye	1,0µl			
Primer	0,5µl	96°C	10 s	
Puffer	0,8µl	AT°C	15 s	25 Zyklen
dH <sub>2</sub> O	0,7µl	60°C	4 min	
	3µl			
+ aufgereinigte PCR	2µl			
	5µl			

Im Anschluss an die Sequenzierreaktion erfolgte ein weiterer Aufreinigungsschritt, um nicht verbrauchte fluoreszenzmarkierte ddNTPs, die die nachfolgende kapillarelektrophoretische Auftrennung der Produkte stören würden, zu eliminieren. Hierzu wurden folgende Schritte durchgeführt:

- Je 100µl Präzipitationsmix (bestehend aus 4ml 0,1mM EDTA + 0,5ml 3M Natriumacetat ad 50ml 100% Ethanol) wurden zum PCR-Produkt gegeben, 30min bei 735g zentrifugiert und anschließend der Überstand verworfen.
- Nach erfolgter Fällung wurden dem Pellet 200µl 70% Ethanol zugegeben und eine erneute Zentrifugation für 8min bei 735g angeschlossen.
- Wiederum wurde der Überstand verworfen und die verbleibende Reste bei 95°C im offenen Thermocycler für 5 min getrocknet. Anschließend wurde das Sequenzierungsprodukt in 20 µl bidest. Wasser resuspendiert.

Nach Analyse der Proben in dem Kapillarsequenziergeräte 310 oder 3100 der Firma Applied Biosystems erfolgte die Auswertung der Analyseergebnisse mittels der Software „Sequencing Analysis 3.4.1.“ (Applied Biosystems). Jeder Nachweis einer Mutation wurde durch eine wiederholte Sequenzierung eines neusynthetisierten PCR-Produkts bestätigt.

## 5. Ergebnisse

### 5.1. PCR-Etablierung

Zur Etablierung der optimalen PCR-Bedingungen wurden zunächst mit Hilfe der „2+4“-Regel ( $2(A+T)+4(G+C)=\text{Temperatur}-5$ ) die jeweiligen Annealing- (Hybridisierungs-) Temperaturen für die Primer der 16 verschiedenen Exons des *NBS1*-Gen bestimmt. Anhand anschließend durchgeführter Test-PCRs mit dem vorgegebenen PCR-Ansatz (siehe Methodenteil) und den jeweils berechneten Hybridisierungstemperaturen konnten die Amplifikate hinsichtlich ihrer Quantität und Qualität beurteilt werden. Bei unzureichender Spezifität wurden die PCR-Bedingungen durch Veränderung der Annealingtemperaturen weiter optimiert. Folgende Tabelle zeigt die etablierten PCR-Hybridisierungstemperaturen der jeweiligen Exons.

Exon	1	2	3	4	5	6	7	8
Annealingtemperatur in °C	53	53	52	52	52	53	TD 65-55	53
Exon	9	10	11	12	13	14	15	16
Annealingtemperatur in °C	TD 65-55	TD 65-55	TD 65-55	53	52	52	TD 65-55	TD 65-55

Tab. 7: PCR-Annealingtemperaturen der einzelnen Exonabschnitte in Grad Celsius

Die ermittelten Standardbedingungen für die Amplifikation der einzelnen Exons ergaben folgende PCR-Produkte:

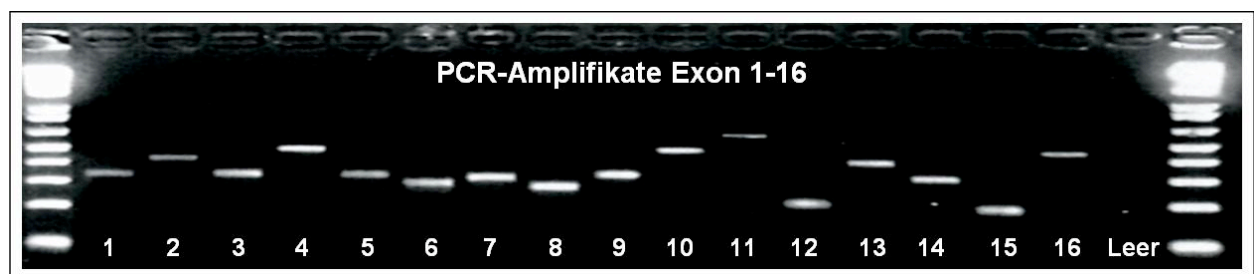


Abb. 4: PCR-Produkte aller Exonabschnitte nach Gelelektrophorese mit Leerprobe (PCR-Ansatz ohne DNA) als Kontrolle.

## 5.2. Ergebnisse der Sequenzierung

Bei allen 128 DNA-Proben der Brustkrebspatientinnen wurde das *NBS1*-Gen komplett untersucht. Bis auf Exon 11, das aufgrund seiner Größe zusätzlich rückwärts sequenziert wurde, reichte eine Sequenzierung mit dem Vorwärtsprimer aus, um die kodierenden Abschnitte sowie die angrenzenden Intronbereiche darzustellen.

### 5.2.1. Mutationen im *NBS1*-Gen

Insgesamt konnte bei 7 der 128 untersuchten Brustkrebspatientinnen (5,5%) eine heterozygote Sequenzvariation im *NBS1*-Gen nachgewiesen werden. Drei dieser Veränderungen (657del5, 803delC und I171V) bei den sporadischen Brustkrebspatientinnen (4,7%) und vier (R215W, D95N, R169H und IVS6+12 A/T) bei den familiären Brustkrebspatientinnen (6,3%).

Die Veränderung IVS 6+12 A/T, wurde im Rahmen dieser Untersuchung erstmals gefunden. Die übrigen Sequenzvarianten sind bereits beschrieben worden. In 186 Kontrollchromosomen wurden keine der sieben oben beschriebenen Veränderungen nachgewiesen.

#### Frameshift-Mutation 803delC in Exon 7

Bei der sporadischen Brustkrebspatientin N203 befindet sich auf einem Allel von Exon 7 eine Deletion der Base Cytosin in Position 803. Diese Veränderung führt über eine Leserasterverschiebung zu einem verfrühten Translationsabbruch. Wie bei anderen bekannten Frameshift-Mutationen im *NBS1*-Gen resultiert neben einem verkürzten Proteinfragment vermutlich ein zusätzliches zweites größeres Genprodukt aufgrund eines alternativen Startcodons [84].

Es handelt sich hierbei um eine erst kürzlich neu beschriebene Mutation. Bei einem NBS-Patienten konnte 803delC in Compound Heterozygotie mit der Mutation 657del5 nachgewiesen werden (Varon, pers. Mitteilung). Funktionelle Untersuchungen zu dieser Mutation wurden bisher nicht durchgeführt. Untersuchungen des Tumorgewebes zum Nachweis eines Verlustes der Heterozygotie (loss of heterozygosity; LOH) erwiesen sich als negativ. Das Elektropherogramm sowie eine Wildtypsequenz zum Vergleich sind in der Abbildung 5 dargestellt:

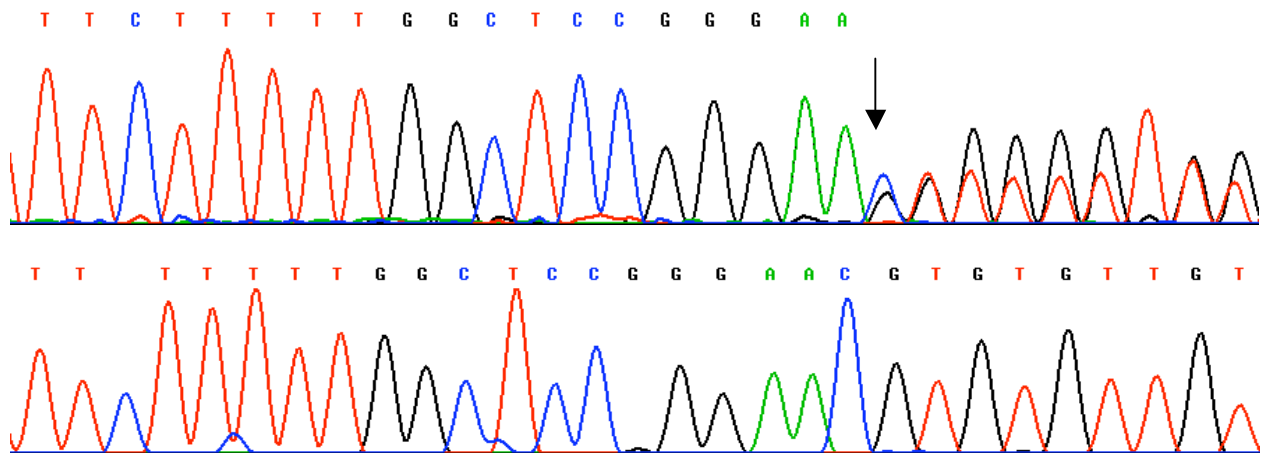


Abb. 5: Elektropherogramm Exon 7 des *NBS1*-Gens: Oberes Bild – heterozygote Deletion von Cytosin an Position 803 (Pfeil) mit nachfolgender Leserasterverschiebung (Probe N203), unteres Bild - Wildtypsequenz des entsprechenden Abschnitts.

#### Frameshift-Mutation 657del5 in Exon 6

Bei der sporadischen Brustkrebspatientin N200 konnte die Gründermutation 657del5 auf einem Allel des *NBS1*-Gens nachgewiesen werden. Das Elektropherogramm sowie eine Wildtypsequenz zum Vergleich sind in der Abbildung 6 dargestellt:

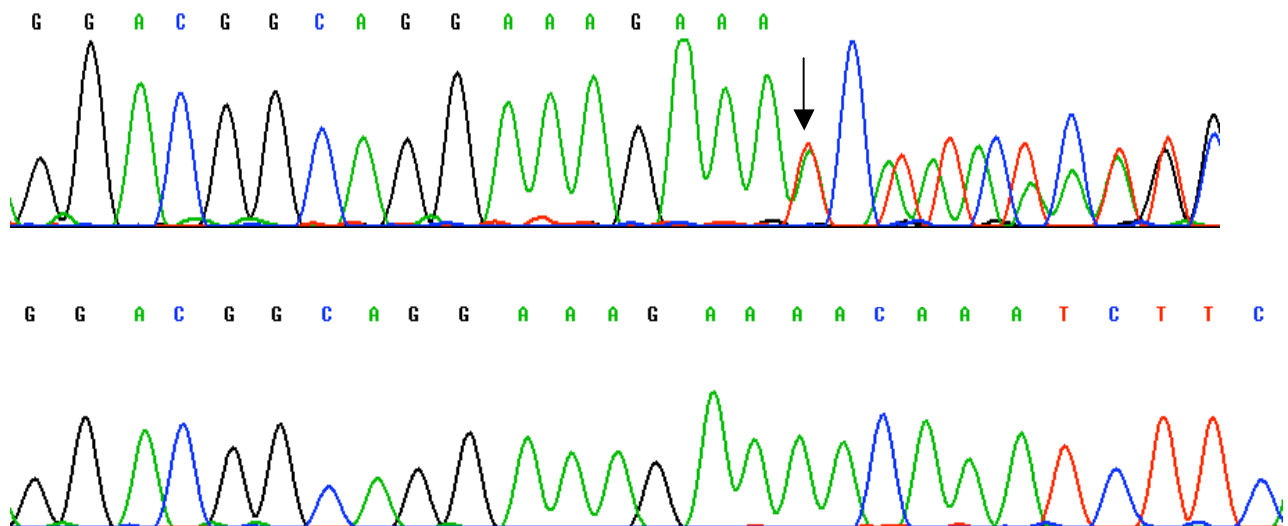


Abb. 6: Elektropherogramm Exon 6 des *NBS1*-Gens: Oberes Bild – heterozygote Deletion von ACAA an Position 657 (Pfeil) mit nachfolgender Leserasterverschiebung (Probe N200), unteres Bild - Wildtypsequenz des entsprechenden Abschnitts

Die Deletion der fünf Basenpaare ACAAA (Adenin-Cytosin-Adenin-Adenin-Adenin) führt durch eine Leserasterverschiebung zu einem vorzeitigen Abbruch der Translation, so daß ein verkürztes 26kDa Proteinfolegment resultiert. Ein weiteres größeres Genprodukt (70kDa) entsteht durch ein alternatives Startcodon stromaufwärts der Deletion [84]. Untersuchungen des Tumorgewebes zum Nachweis eines Verlustes der Heterozygotität (loss of heterozygotität; LOH) erwiesen sich als negativ.

### Missense-Mutation D95N in Exon 3

Bei der familiären Brustkrebspatientin B286/300 befindet sich im Exon 3 auf einem Allel eine Punktmutation mit dem Basenaustausch von G nach A (Position 283) an der ersten Stelle des Kodons. Diese Veränderung führt zu einem Aminosäureaustausch des polar geladenen Aspartat gegen das polar ungeladene Asparagin. Der Vergleich der Proteinsequenz orthologer Proteine zeigt die Konservierung von Aspartat mit Ausnahme des Zebrafisches (Abbildung 7). Die Missense-Mutation D95N liegt in der so genannten „Forkhead associated-Domain“ (FHA-Domain), einem konservierten N-terminalen Proteinabschnitt von Nibrin, der auch bei einer Vielzahl anderer Reparaturgene konserviert vorliegt. [79, 80].

Spezies	AS-Sequenz										
D. rerio	S	T	K	T	L	Q	T	G	Y	K	I
G. gallus	A	S	R	S	L	Q	S	G	D	R	V
H. sapiens	F	S	R	T	L	K	S	G	D	G	I
P. pygmaeus	F	S	R	T	L	K	S	G	D	S	I
R. rattus	L	S	S	T	L	K	T	G	D	R	V
M. musculus	L	S	C	T	L	K	T	G	D	R	V

**Abb. 7: Multiple Alignment der Missense-Veränderung 283 G→A (D95N). Aspartat ist mit Ausnahme des Zebrafisches bei den untersuchten Spezies konserviert.**

Untersuchungsergebnisse bezüglich einer LOH (loss of heterozygotität) in diesem Chromosomenabschnitt lagen nicht vor. Das Elektropherogramm sowie eine Wildtypsequenz zum Vergleich sind in den Abbildungen 8 und 9 dargestellt:



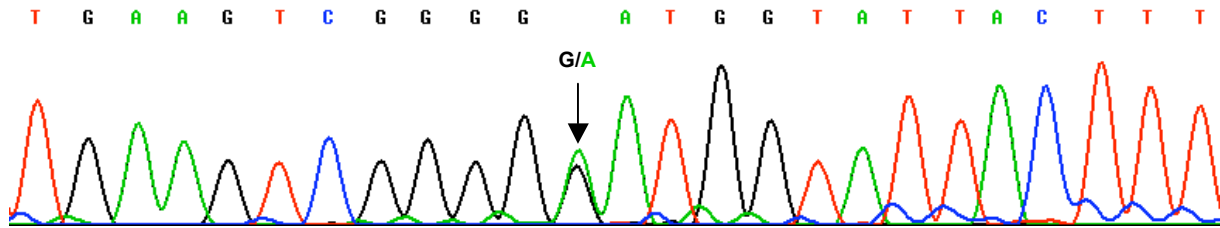


Abb. 8: Elektropherogramm Exon 3 des *NBS1*-Gens: Heterozygoter Basenaustausch an Position 283 (Pfeil) von Guanin nach Adenin der Probe B286/300.

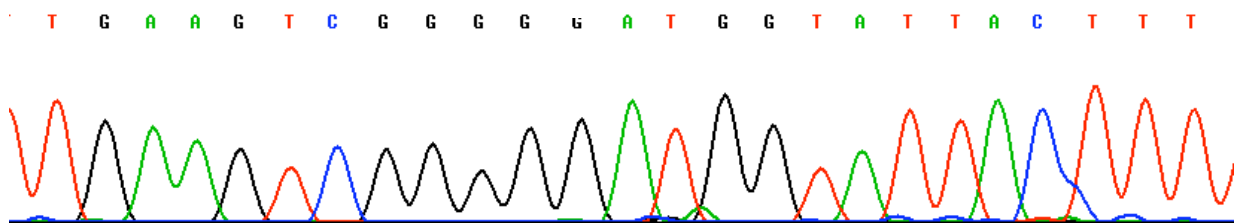


Abb. 9: Wildtypsequenz des entsprechenden Abschnitts der Mutation D95N in Exon 3

### Missense-Mutation R215W in Exon 6

Bei der familiären Brustkrebspatientin B56/200 konnte ein Basenaustausch auf Position 643 von C nach T nachgewiesen werden. Das Elektropherogramm sowie eine Wildtypsequenz zum Vergleich sind in der Abbildung 10 dargestellt:

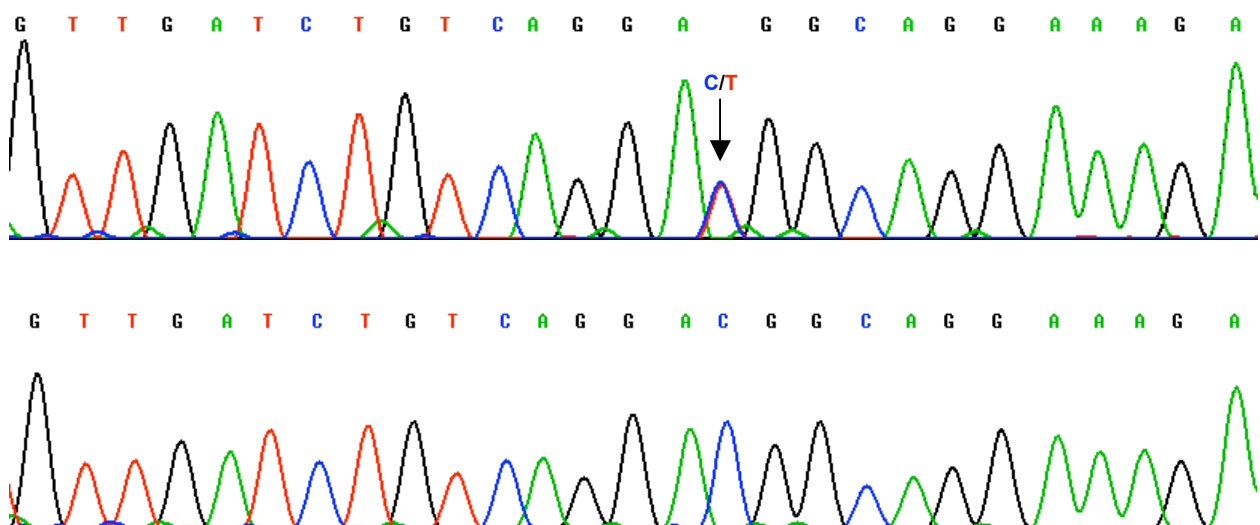


Abb. 10: Elektropherogramm Exon 6 des *NBS1*-Gens: Oberes Bild - heterozygoter Basenaustausch an Position 643 (Pfeil) von Cytosin nach Thymin der Probe B56/200, unteres Bild - Wildtypsequenz des entsprechenden Abschnitts.

Der Basenaustausch von Cytosin gegen Thymin führt zu einem Austausch der basischen Aminosäure Arginin zur unpolaren Aminosäure Tryptophan. Arginin ist an den entsprechenden Positionen homologer Proteine der untersuchten Spezies mit Ausnahme des Huhns konserviert (Abbildung 11).

Spezies	AS-Sequenz										
D. rerio	V	D	L	G	A	R	P	E	R	K	S
G. gallus	M	D	L	S	G	H	P	E	R	K	K
H. sapiens	V	D	L	S	G	R	Q	E	R	K	Q
P. pygmaeus	V	D	L	S	G	R	Q	E	R	K	Q
R. rattus	V	D	L	S	G	R	H	E	R	K	Q
M. musculus	V	D	L	S	G	R	R	E	R	K	Q

**Abb. 11: Multiples Alignment der Missense-Veränderung 643 C→T (R215W). Arginin ist phylogenetisch mit Ausnahme des Huhnes bei den untersuchten Spezies konserviert.**

Erst kürzlich konnte diese Veränderung bei zwei NBS-Patienten (monozygote Zwillinge) als Compound Heterozygotie mit der Gründermutation 657del5 auf Exon 6 nachgewiesen werden [112]. Ergebnisse einer durchgeführten Untersuchung des Tumorgewebes zum Nachweis eines Verlustes der Heterozygotie in diesem Chromosomenabschnitt (loss of heterozygosity; LOH) lagen nicht vor.

### Missense-Mutation I171V in Exon 5

Der Basenaustausch A nach G an Position 511 des Nibrins, der zu einer Substitution der unpolaren Aminosäure Isoleucin durch die polar geladene Aminosäure Valin führt, konnte bei der Patientin N221 mit sporadischem Brustkrebs im heterozygoten Zustand nachgewiesen werden. Der Aminosäureaustausch I171V liegt in der sog. BRCA-Domäne des *NBS1*-Gens, einem konservierten N-terminalen Bereich, der für eine Protein-Protein-Interaktion des Nibrin verantwortlich gemacht wird [83, 113]. Der Vergleich der Proteinsequenz orthologer Proteine zeigt eine phylogenetische Konservierung des Isoleucins (Abbildung 12).

Spezies	AS-Sequenz										
D. rerio	A	L	L	C	C	R	P	I	V	K	P
G. gallus	A	L	I	C	G	R	P	I	V	K	P
H. sapiens	A	L	I	C	G	R	P	I	V	K	P
P. pygmaeus	A	L	I	C	G	R	P	I	V	K	P
R. rattus	A	L	I	C	G	R	P	I	I	K	P
X. laevis	A	L	I	C	C	K	P	I	I	K	P
D. melano	A	M	L	E	N	K	P	I	V	T	F
M. musculus	A	L	I	C	G	R	P	I	V	K	P

Abb. 12: Multiple Alignment der Missense-Veränderungen 511 A→G (I171V) und 506 G→ A (R169H). Isoleucin ist phylogenetisch hoch konserviert. Das schwächer konservierte Arginin auf Position 169 wird bei dem Krallenfrosch und der Taufliede durch Lysin ersetzt.

Tumorproben der Patientin zur Durchführung eines Nachweises eines Verlustes der Heterozygotität (loss of heterozygotität; LOH) standen zur Verfügung. Ein LOH konnte nicht nachgewiesen werden. Das Elektropherogramm sowie eine Wildtypsequenz zum Vergleich sind in der Abbildung 13 dargestellt:

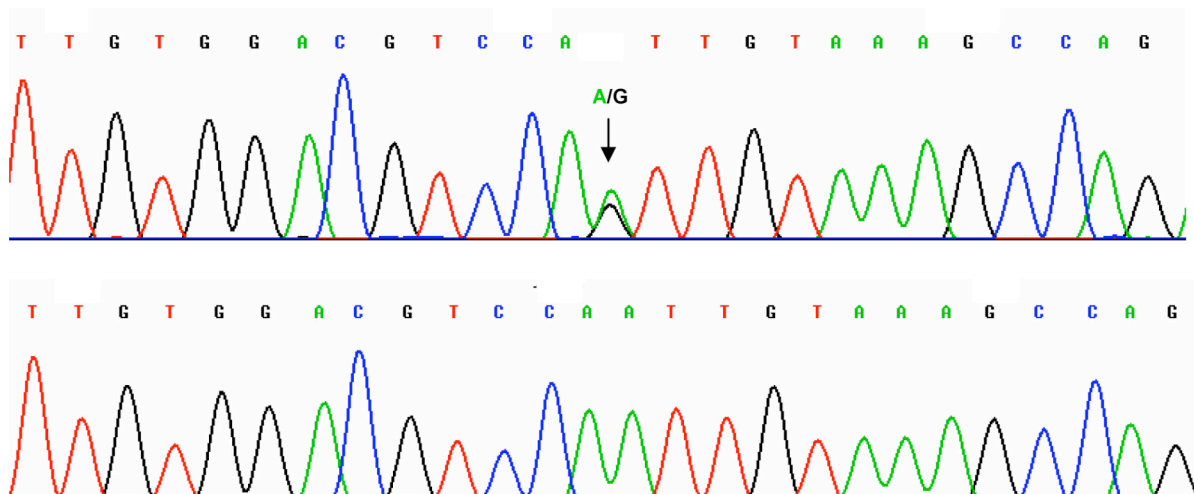


Abb. 13: Elektropherogramm Exon 5 des *NBS1*-Gens: Oberes Bild – heterozygoter Basenaustausch an Position 511 (Pfeil) von Adenin nach Guanin der Probe N221, unteres Bild Wildtypsequenz des entsprechenden Abschnitts

### Missense-Mutation R169H in Exon 5

Bei der familiären Brustkrebspatientin B108/200 konnte die Sequenzveränderung R169H im heterozygoten Zustand in Exon 5 des *NBS1*-Gens nachgewiesen werden. An Position 506 wird Guanin, die zweite Base des Kodons durch Adenin substituiert. Es resultiert ein Aminosäureaustausch von Arginin nach Histidin, der eng benachbart zu I171V in der konservierten BRCA-Domäne des *NBS1*-Gens liegt. Bei dem Vergleich der Proteinsequenz orthologer Proteine weist Arginin auf Position 169 eine hohe phylogenetische Konservierung unter den Säugetieren auf (in Abbildung 12 grün hinterlegt und schraffiert).

Ergebnisse einer durchgeführten Untersuchung des Tumorgewebes zum Nachweis eines Verlustes der Heterozygotität in diesem Chromosomenabschnitt (loss of heterozygosity; LOH) lagen nicht vor. Das Elektropherogramm sowie eine Wildtypsequenz zum Vergleich sind in der Abbildung 14 dargestellt:

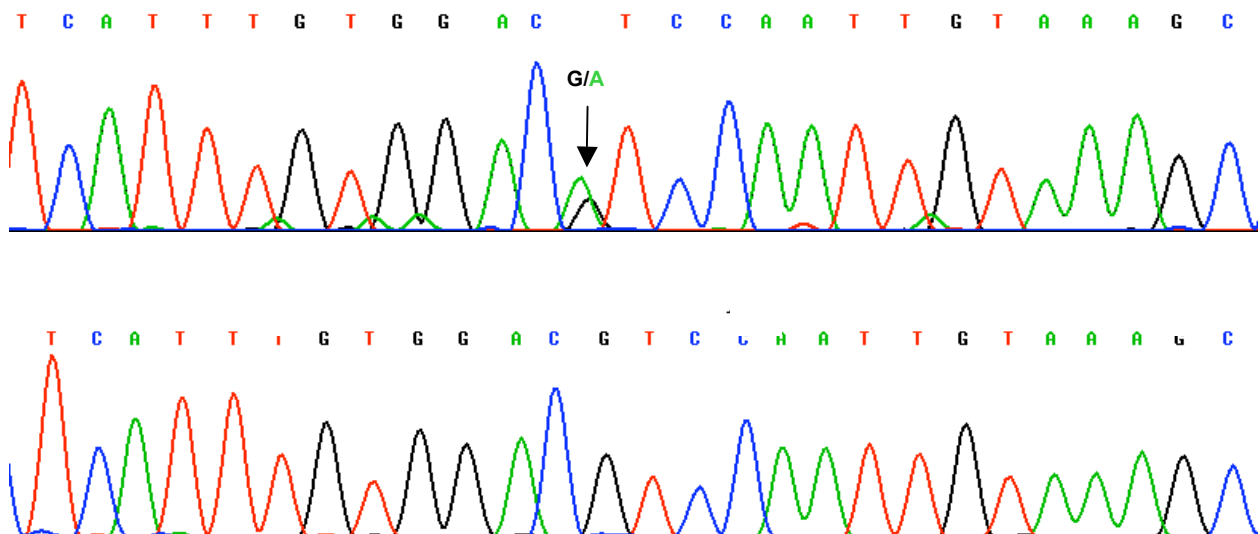
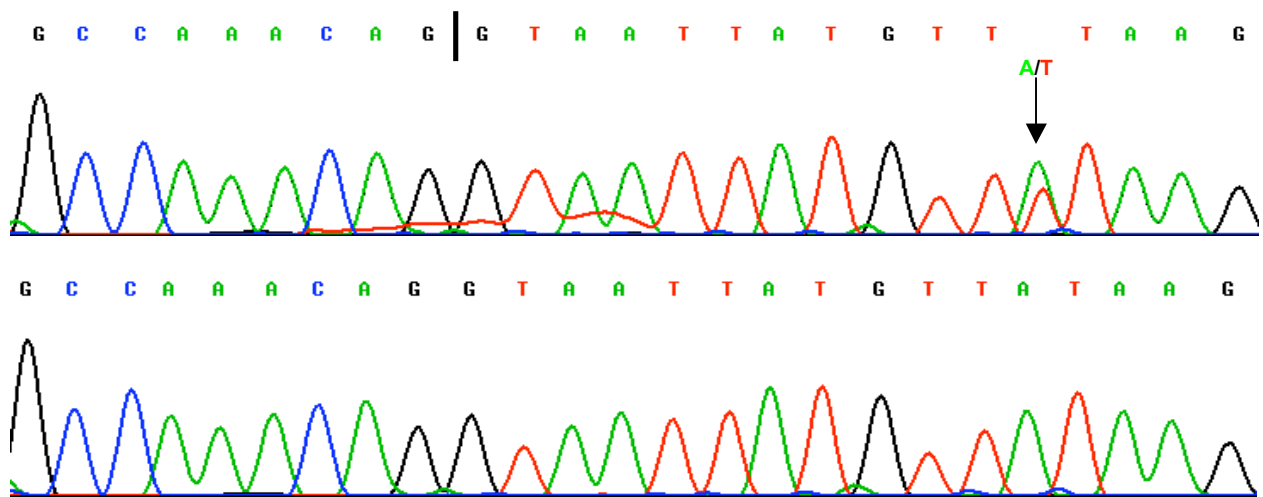


Abb. 14: Elektropherogramm Exon 5 des *NBS1*-Gens: Oberes Bild - heterozygoter Basenaustausch an Position 508 (Pfeil) von Guanin nach Adenin der Probe B108/200, unteres Bild - Wildtypsequenz des entsprechenden Abschnitts

**IVS 6+12 A/T het.**

Eine neue Sequenzveränderung konnte bei der familiären Brustkrebspatientin B70/200 nachgewiesen werden. Im Intronbereich zwischen Exon 6 und Exon 7 wird in der Position 6+12 auf einem Allel Adenin durch Thymin ersetzt. Dieser Basenaustausch liegt 10 Basenpaare hinter der Spleißdonorstelle [90] des Exons 6 und könnte sich auf den Spleißvorgang der prä-mRNA des *NBS1*-Gens auswirken. Leider stand für weitere funktionelle Untersuchungen keine RNA der Patientin zur Verfügung. Das Elektropherogramm sowie eine Wildtypsequenz zum Vergleich sind in der Abbildung 15 dargestellt:



**Abb. 15: Elektropherogramm Exon 6 mit Intronbereich (6+) im *NBS1*-Gens. Oberes Bild – heterozygoter Basenaustausch an Position 6+12 (Pfeil) von Adenin nach Thymin der Probe 70/200; Exonende: schwarze Linie, unteres Bild - Wildtypsequenz des entsprechenden Abschnitts**

Ergebnisse einer durchgeführten Untersuchung des Tumorgewebes zum Nachweis eines Verlustes der Heterozygotität in diesem Chromosomenabschnitt (loss of heterozygosity; LOH) lagen für diese Patientin nicht vor.

## 5.2.2. Tabellarische Übersicht und schematische Darstellung der nachgewiesenen Mutationen im *NBS1*-Gen

Exon	Intron	Abbruch-Mutation	Missense-Mutation	Funkt. Domäne	Häufigkeit bei Patienten	Nachweis eines LOH
3	---	---	D95N	FHA	Familiärer Brustkrebs (1)	Nicht durchgeführt
5	---	---	R169H	BRCA	Familiärer Brustkrebs (1)	Nicht durchgeführt
5	---	---	I171V	BRCA	Sporadischer Brustkrebs (1)	negativ
6	---	657del5	---	---	Sporadischer Brustkrebs (1)	negativ
6	---	---	R215W	---	Familiärer Brustkrebs (1)	Nicht durchgeführt
---	6+	---	IVS6+13 A/T	---	Familiärer Brustkrebs (1)	Nicht durchgeführt
7	---	803delC	---	---	Sporadischer Brustkrebs (1)	negativ

Tab. 8: Darstellung der nachgewiesenen Mutationen bei den untersuchten Patientinnen.

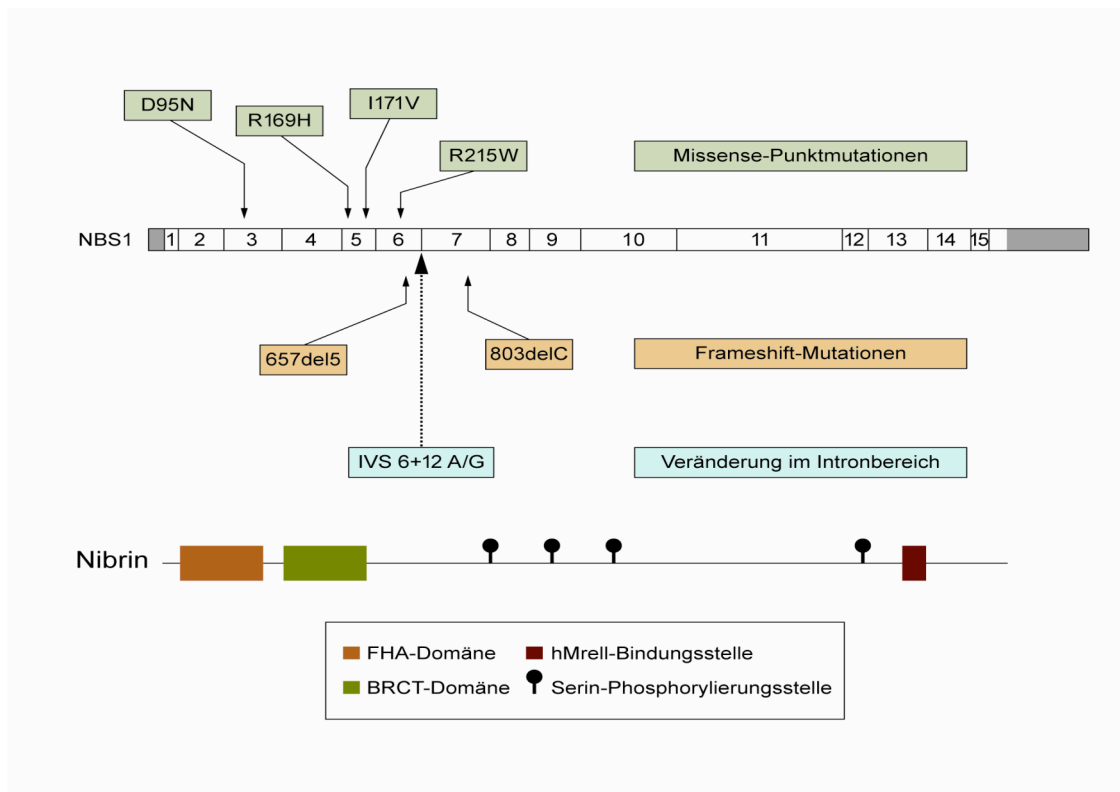


Abb. 16: *NBS1*-Gen mit Lokalisation der ermittelten Sequenzveränderungen

### 5.2.3. Polymorphismen im *NBS1*-Gen

#### 5.2.3.1. Bekannte Polymorphismen im *NBS1*-Gen

Bei beiden Patientengruppen konnten insgesamt 13 verschiedene, zum Teil gekoppelte Polymorphismen im *NBS1*-Gen nachgewiesen werden (Tabelle 9).

Exon	Polymorphismus	Häufigkeit bei familiären Brustkrebs	Häufigkeit bei sporadisch Brustkrebs
2	102G/G	34	30
2	102G/A	24	27
2	102A/A	6	7
4	381T/T	64	63
4	381T/C	0	1
5	553G/G	33	49
5	553G/C	25	12
5	553G/C	6	3
7	IVS6-29C/C	64	63
7	IVS6-29C/T	0	1
8	IVS7-42G/G	63	64
8	IVS7-42G/C	1	0
9	IVS9+18C/C	35	49
9	IVS9+18C/T	23	12
9	IVS9+18C/T	6	3
10	1197T/T	19	47
10	1197T/C	39	14
10	1197T/C	6	3
10	IVS9-79C/C	41	49
10	IVS9-79C/A	19	12
10	IVS9-79C/A	4	3
13	2016A/A	35	49
13	2016A/G	23	12
13	2016G/G	6	3
13	IVS12-7A/A	35	49
13	IVS12-7A/G	23	12
13	IVS12-7G/G	6	3
14	IVS13-30A/A	34	49
14	IVS13-30A/T	25	12
14	IVS13-30T/T	5	3
14	IVS13-62A/A	60	63
14	IVS13-62A/T	4	1
16	IVS16+273G/G	32	48
16	IVS16+273G/A	26	12
16	IVS16+273A/A	6	4

Tab. 9: Darstellung der Häufigkeitsverteilung der 13 nachgewiesenen Polymorphismen bei sporadischem und familiärem Brustkrebs.

Es besteht bezüglich der Häufigkeit dieser Veränderungen zwischen beiden Patientengruppen jeweils kein signifikanter Unterschied ( $p > 0,1$ ).

Zusätzlich wurde die Häufigkeit der zwei bereits bekannten Polymorphismen 553G/C in Exon 5 und 2016A/G in Exon 13 bei einer Kontrollgruppe von 93 Personen (50 Frauen, 43 Männer) untersucht. Ein statistisch signifikanter Unterschied der Häufigkeit dieser nicht vollständig gekoppelt vorliegenden Sequenzveränderungen konnte zwischen den Kontrollen und den beiden Brustkrebspatientinnengruppen nicht nachgewiesen werden ( $p$ -Werte alle über  $> 0,1$ ).

553G/C	2016A/G	Sporad. Brustkrebs N=64	Fam. Brustkrebs N=64	Kontrollen N=93
GG	AA	28 (43,75%)	33 (51,56%)	49 (52,69%)
GG	AG	0	0	0
GG	GG	0	0	0
GC	AA	1 (1,56%)	2 (3,13%)	1 (1,08%)
GC	AG	27 (42,19%)	23 (35,94%)	38 (40,86)
GC	GG	0	0	0
CC	AA	0	0	0
CC	AG	0	0	0
CC	GG	7 (10,94%)	6 (9,38%)	5 (5,38%)

Tab. 10: Häufigkeit der einzelnen Allele in Exon 5 und 13 bei den Patienten- und Kontrollgruppen

Auffällig, wenngleich nicht statistisch signifikant ( $p > 0,05$ ) erscheint die häufigere Beobachtung des homozygoten Polymorphismus 553 C/C und 2016 G/G unter den Patientinnen (10,94% bzw. 9,38%) im Vergleich zu den Kontrollen (5,38%). Noch stärker fällt dieser Unterschied aus, wenn nur die weiblichen Kontrollen als Vergleichsgruppe gewertet werden (Tabelle 11).

Polymorphismus	Frauen (n= 50)	Männer (n= 43)
Wildtyp	27 (54%)	22 (51%)
Heterozygot	22 (44%)	17 (40%)
Homzygot	1 (2%)	4 (9%)

Tab. 11: Geschlechtsverteilung der Träger der gekoppelten Polymorphismen 553 G/C sowie 2016 A/G im *NBS1*-Gen bei den Kontrollen.



Insgesamt ist die Aussagekraft dieser Vergleichsstudie durch die geringe Anzahl der Kontrollpersonen deutlich limitiert. Ebenfalls kann bei den untersuchten Kontrollen, zu denen keine anamnestischen Daten zur Verfügung standen, eine Tumorerkrankung, insbesondere ein Mammakarzinom, nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden.

Die Genotypen liegen bei Patienten und Kontrollpersonen im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Die Abweichungen hiervon sind statistisch nicht signifikant ( $p > 0,1$ ).

### 5.2.3.2. IVS3-85 – neue Sequenzvariante im *NBS1*-Gen

Im Exon 4 konnte bei der sporadischen Brustkrebspatientin 267N eine neue Sequenzvariante im *NBS1*-Gen nachgewiesen werden. An Position IVS3-85 kam es auf einem Allel zum Basenaustausch von Thymin gegen Adenin. Keine der 93 Kontrollproben wies diese Sequenzvariante auf. Da sich die Veränderung im Intronbereich jedoch weit außerhalb des Spleißbereichs befindet, ist eine Auswirkung dieser Variation auf den Spleißvorgang unwahrscheinlich. Vermutlich handelt es sich hierbei um eine seltene Variante im *NBS1*-Gen. Das Elektropherogramm sowie eine Wildtypsequenz zum Vergleich sind nachfolgend in der Abbildung 17 dargestellt

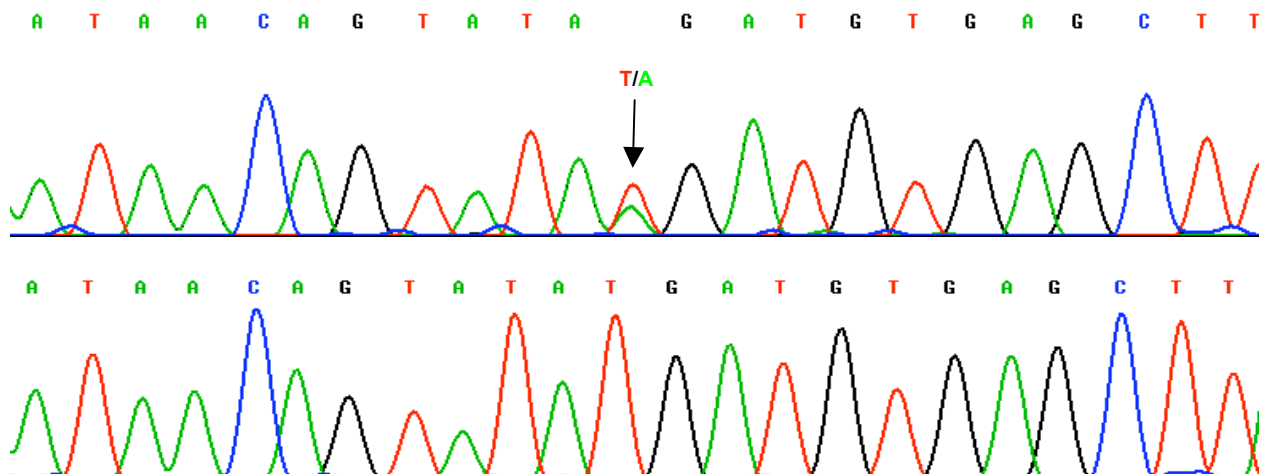


Abb. 17: Elektropherogramm Exon 4 mit Intronbereich (3-) im *NBS1*-Gens: Oberes Bild - heterozygoter Basenaustausch an Position 3-85 (Pfeil) von Thymin nach Adenin der Probe 267N, unteres Bild - Wildtypsequenz des entsprechenden Abschnitts

### 5.3. Klinische und tumorpathologische Ergebnisse

#### 5.3.1. Tumorpathologische Befunde der Patientinnen mit familiärem Mammakarzinom

Für das untersuchte Patientenkollektiv mit *BRCA1*- und *BRCA2*-negativem, familiärem Brustkrebs lagen am Pathologischen Institut der Robert-Rössle Klinik in Berlin-Buch tumorpathologische Befunde vor.

Die klinischen Daten wurden mit den genetischen Ergebnissen verglichen. Der Zusammenhang zwischen dem Trägerstatus der gekoppelten Polymorphismen 553G/C in Exon 5 und 2016A/G in Exon 13 bei familiären Brustkrebspatientinnen und Tumoreigenschaften wie Tumormorphologie, Rezeptorexpression, Grading oder Tumorausdehnung ist in Tabelle 12 dargestellt.

Kriterien	WT	Polymorphismus		
		gesamt	heterozygot	homozygot
Duktal inv. Ca. (NOS)	16/26 (61,5%)	14/25 (56,0%)	12/19 (63,2%)	2/6 (33,3%)
Lobulär inv. Ca.	3/26 (11,5%)	2/25 (8,0%)	0/19	2/6 (33,3%)
Nicht invasives DCIS.	<b>0/26</b>	4/25 (16,0%)	<b>4/19 (21,1%)</b>	0/6
Medulläres inv. Ca.	<b>0/26</b>	3/25 (12,0%)	1/19 (5,3%)	<b>2/6 (33,3%)</b>
Grading = 1	<b>5/16 (31,3%)</b>	1/16 (6,3%)	<b>0/15</b>	1/1 (100%)
Grading = 3	4/16 (25,0%)	7/16 (43,8%)	7/15 (46,7%)	0/1
pN negativ	15/24 (62,5%)	12/21 (57,1%)	9/17 (53,0)	3/4 (75,0%)
Progesteronrezeptor: Negativ (IRS: 0-1)	10/16 (62,5%)	5/12 (41,7%)	3/9 (33,3%)	2/3 (66,6%)
Östrogenrezeptor: Negativ (IRS: 0-1)	8/16 (50,0%)	6/12 (50,0%)	5/9 (55,6%)	1/3 (33,3%)

Tab. 12: Vergleich der Tumorpathologie bei *BRCA1*- und *BRCA2*-negativen, familiärem Brustkrebs unter Berücksichtigung des Trägerstatus der gekoppelten Polymorphismen 553 G/C und 2016 A/G.

Da nicht für jede der 64 Patientinnen alle einzelnen Kriterien der Tumorphologie bekannt waren, beziehen sich die Angaben auf die unterschiedlichen Fallzahlen von 51 (Tumormorphologie), 32 (Grading), 28 (Progesteronrezeptorstatus), 28 (Östrogenrezeptorstatus) und 45 (Lymphknotenbefallsstatus).

Das nicht invasive duktales Mammakarzinom (DCIS) tritt bei Patientinnen mit dem X Allel mit 16% häufiger auf als bei den Tumoren mit Wildtypsequenz (0%). Eine statistische Signifikanz kann jedoch nur für den direkten Vergleich des Wildtyps (0%) mit den Heterozygoten (21%) nachgewiesen werden ( $p=0,0260$ ; Fischer Exakt-Test). Vergleicht man hingegen das Grading der Tumorproben beider Patientengruppen, so weisen die Karzinome der Patientinnen mit Wildtypsequenz statistisch signifikant häufiger hochdifferenzierte (G1) Brusttumoren als die Gruppe der heterozygoten Polymorphismusträgerinnen auf ( $p=0,0434$ ; Fischer Exakt-Test). Bezüglich der Tumormorphologie ist bei den homozygot polymorphismustragenden Brustkrebspatientinnen der medulläre Karzinomtyp mit 33% deutlich häufiger vorgekommen als bei der Vergleichsgruppe der Patientinnen mit Wildtypsequenz, bei denen das medulläre Mammakarzinom nicht auftrat ( $p=0,0302$ ; Fischer Exakt-Test). Bei allen weiteren Kriterien konnten zwischen Patientinnen mit Wildtypsequenz und den betrachteten Polymorphismen keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Die nachfolgende Tabelle stellt die Histopathologie der familiären Brustkrebstumoren mit nachgewiesenen Mutationen im *NBS1*-Gen zusammen. Bedauerlicherweise sind die ermittelten Daten bezüglich Grading und Rezeptorstatus der jeweiligen Tumoren unvollständig. Die Patientin mit der Mutation R215W weist ein invasiv lobuläres Mammakarzinom, für das eine familiäre Disposition angenommen wird und einen Anteil von ca. 10-15% aller bösartigen Brusttumoren in der allgemeinen Bevölkerung ausmacht. Ansonsten stellen sich in der Zusammenstellung die histopathologischen Eigenschaften im Vergleich zu den Tumoren mit Wildtypsequenz als unspezifisch heraus.

Mutation	Tumortyp	Staging	Grading	IRS (PrR)	IRS (ER)
<i>D95N</i>	Invasiv duktal	pT1N0M0	unbekannt	0-1	0-1
<i>R215W</i>	Invasiv lobulär	pT1N1M0	1-2	3	12
<i>IVS6+12 A/T</i>	Invasiv duktal	pT1N0M0	unbekannt	unbekannt	unbekannt
<i>R169H</i>	Invasiv duktal	unbekannt	1	unbekannt	unbekannt

**Tab. 13: Histopathologische Eigenschaften der familiären Brustkrebstumoren mit Mutationen im *NBS1*-Gen.**

### 5.3.2. Tumorpathologische Befunde der Patientinnen mit sporadischem Mammakarzinom

Folgende Tabelle umfasst die mikroskopischen und immunhistologischen Eigenschaften der sporadischen Mammakarziomfälle zusammen.

Kriterien	WT	Polymorphismus		
		gesamt	heterozygot	homozygot
Duktal inv. Ca. (NOS)	21/28 (75,0%)	25/33 (75,8%)	18/26 (69,2%)	7/7 (100%)
Lobulär inv. Ca.	2/28 (71,2%)	4/33 (12,1%)	4/26 (15,4%)	0/7
Nicht invasives DCIS.	0/26	4/25 (16,0%)	4/19 (21,1%)	0/6
Medulläres inv. Ca.	<b>3/28</b> <b>(10,7%)</b>	<b>0/33</b>	0/26	0/7
Sonstige inv. Ca.	3/28 (10,7%)	4/33 (12,1%)	4/26 (15,4%)	0/7
Grading = 1	4/27 (14,8%)	7/33 (21,2%)	7/26 (26,9%)	1/7 (14,3%)
Grading = 3	10/27 (37,0%)	10/33 (30,3%)	8/26 (30,8%)	2/7 (28,6%)
pN negativ	<b>12/23</b> <b>(52,2%)</b>	11/30 (36,6%)	11/23 (47,8%)	<b>0/7</b>
Progesteronrezeptor: negativ (IRS: 0-1)	17/25 (68,0%)	19/31 (61,3%)	16/25 (64,0%)	3/6 (50,0%)
Östrogenrezeptor: positiv (IRS: 10-12)	<b>2/25</b> <b>(8,0%)</b>	9/31 (29,0%)	<b>9/25</b> <b>(36,0%)</b>	0/6
Östrogenrezeptor: negativ (IRS: 0-1)	12/25 (48,0%)	10/31 (32,3%)	8/25 (32,0%)	2/6 (33,3%)

**Tab. 14: Vergleich der Tumorpathologie bei sporadischem Brustkrebs unter Berücksichtigung des Trägerstatus der gekoppelten Polymorphismen 553 G/C und 2016 A/G**

Da nicht für jede der 64 Patientinnen alle einzelnen Kriterien der Tumorpathologie bekannt waren, beziehen sich die Angaben auf die unterschiedlichen Fallzahlen von 61 (Tumormorphologie), 60 (Grading), 56 (Progesteronrezeptorstatus), 56 (Östrogenrezeptorstatus) und 53 (Lymphknotenbefallsstatus).

Bei den Brustkrebspatientinnen mit der Wildtypsequenz in Exon 5 und 13 zeigten 52% (12 von 23) einen nodalnegativen Befund, während bei allen der 7 Homozygoten ein Lymphknotenbefall vorlag. Dieser Unterschied ist statistisch signifikant ( $p=0,0242$ ; Fischer Exakt-Test).

Des Weiteren konnte man eine starke Expression des Östrogenrezeptors (IRS:10-12) häufiger bei Heterozygoten-Patienten beobachten. Während der Vergleich Tumoren mit Wildtypsequenz (8% mit IRS: 10-12) mit der Gesamtgruppe der Tumoren mit homo- oder heterozygoten Polymorphismus (29% mit IRS: 10-12) keine statistische Signifikanz aufwies ( $p=0,0884$ ; Fischer Exakt-Test), konnte dieser bei einer direkten Gegenüberstellung des Wildtyps mit der Gruppe der Heterozygoten (36% mit IRS: 10-12) nachgewiesen werden ( $p=0,374$ ; Fischer Exakt-Test).

Eine weitere Auffälligkeit bestand in der Häufigkeitsverteilung des medullären Tumortyps. Während diesen 3 von 28 Patientinnen mit Wildtyp (11%) aufwiesen, kam er bei keinem der sporadischen Brustkrebsfälle mit Polymorphismen in Exon 5 und 13 vor. Eine eindeutige statistische Signifikanz besteht für diesen Unterschied allerdings nicht ( $p=0,0910$ ; Fischer Exakt-Test). Bei allen weiteren tumorpathologischen Kriterien konnten zwischen sporadischen Brustkrebspatientinnen mit Wildtypsequenz und polymorphismustragenden Patientinnen keine statistisch signifikanten Unterschiede beobachtet werden.

Die nachfolgende Tabelle stellt die Histopathologie der sporadischen Brustkrebstumoren mit nachgewiesenen Mutationen im *NBS1*-Gen zusammen.

Mutation	Tumortyp	Staging	Grading	IRS (PrR)	IRS (ER)
<i>1171V</i>	Invasiv duktal	pT3N1M0	2	0-1	0-1
<i>657del5</i>	Invasiv lobulär	pT4N2MX	3	0-1	0-1
<i>803delC</i>	Invasiv duktal	pT1N0MX	1	0-1	0-1

**Tab. 15: Histopathologische Eigenschaften der sporadischen Brustkrebstumoren mit Mutationen im *NBS1*-Gen.**

Auffällig erscheint, dass die Patientin mit der Mutation *657del5* ebenfalls wie die Trägerin der Mutation *R215W* unter den familiären Brustkrebspatientinnen ein invasiv lobuläres Mammakarzinom aufweist. Bei den Brusttumoren mit den Mutation *1171V* und

657del5 stellen sich im Vergleich zu den Tumoren mit zwei Wildtyp *NBS1*-Allelen ein relativ weit fortgeschrittenes Tumorstadium (pT3 bzw. pT4), eine niedrige Differenzierung (G2 bzw. G3) und ein negativer Rezeptorstatus als Zeichen einer erhöhten Aggressivität heraus.

Bei einem abschließenden Vergleich der sporadischen und familiären Brustkrebspatientinnen liegt eine Übereinstimmung hinsichtlich folgender Korrelation vor: Bei beiden Untersuchungsgruppen kommen die nicht invasiven duktales Karzinome häufiger bei den heterozygoten Polymorphismusträgern vor als bei denen mit dem Wildtyp (jeweils 4 von 25 versus 0 von 52).

### **5.3.3. Anamnestische Angaben und Segregationsanalyse der familiären Brustkrebspatientinnen mit heterozygoten Mutationen**

#### **Missense-Mutation D95N in Exon 3**

Die Mutation D95N konnte bei einer Patientin mit familiärem Brustkrebs (Probe 286/300) nachgewiesen werden. Es handelt sich hierbei um eine Patientin, bei der im Alter von 55 Jahren ein duktales invasives Mammakarzinom der rechten Brust diagnostiziert wurde. Ebenso erkrankten zwei jüngere Schwestern jeweils im Alter von 55 und 52 Jahren an Brustkrebs und werden ebenfalls im Rahmen des Verbundprojekts der Deutschen Krebshilfe „ Familiärer Brust- und Eierstockkrebs“ in Leipzig als Studienpatienten betreut. Bei beiden Patientinnen konnten ebenfalls *BRCA1/2* als krankheitsverursachende Gene ausgeschlossen werden. Anamnestisch konnten für die Patientin 286/300 folgende Angaben erhoben werden: 2 Schwangerschaften (2 Lebendgeburten, die 1. im Alter von 27 Jahren), Einnahme hormoneller Kontrazeptiva (über 8 Jahre), Hormonersatztherapie (über 2 Jahre), mammographische Untersuchung alle 12 Monate, Hysterektomie.

Für diese Familie konnte ein Stammbaum mit einer Segregationsanalyse der Mutation D95N erstellt werden. Die Eltern der Indexpatientin B286/300 sind im Alter von 68 Jahren (Vater) und 71 Jahren (Mutter) verstorben. Bei beiden ist der Trägerstatus für D95N unbekannt. Die zweieiige Zwillingsschwester der Mutter weist die Mutation D95N auf einem Allel auf, eine Brustkrebserkrankung ist bei beiden jedoch nicht bekannt. Von den beiden Schwestern der Indexpatientin, die ebenfalls an Brustkrebs erkrankt sind, weist eine (286/303) ebenfalls D95N heterozygot auf. Eine dritte Schwester trägt diese

Mutation nicht und hat bis dato kein Mammakarzinom entwickelt. Auch der Bruder, der ebenfalls wie die Indexpatientin heterozygoter Mutationsträger ist, ist zum Zeitpunkt der Datenerhebung nicht an Brustkrebs erkrankt.

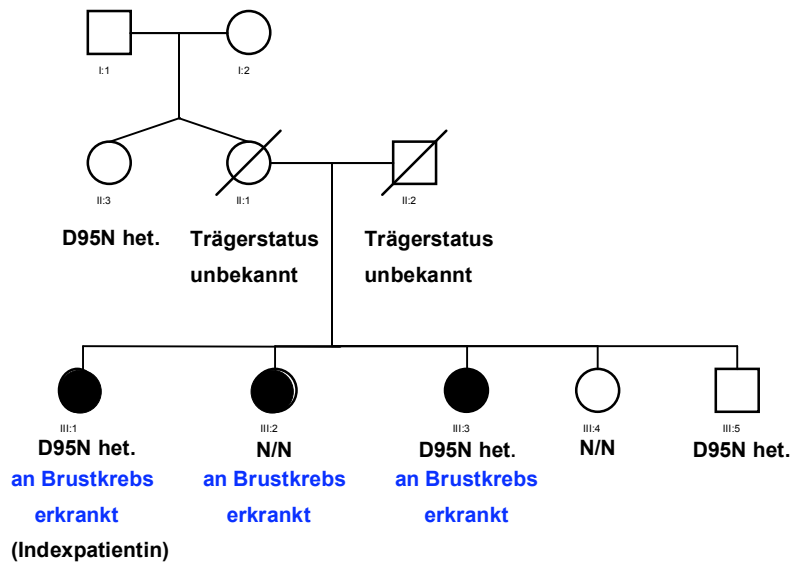


Abb. 18: Stammbaum der Indexpatientin B286/300 und Segregation der Mutation D95N.

### Missense-Mutation R215W in Exon 6

Die Brustkrebspatientin B56/200, heterozygote Trägerin der Missense-Mutation R215W, erkrankte im Alter von 78 Jahren an einem lobulären invasiven Mammakarzinom. In der Familienanamnese sind weitere Krebserkrankungen bekannt. Die Mutter der Indexpatientin verstarb im Alter von 71 Jahren an Leberkrebs, der Bruder erkrankte im Alter von 75 Jahren an Prostatakrebs und bei dessen Tochter wurde im 51. Lebensjahr ein Mammakarzinom diagnostiziert. Leider standen aus dieser Familie keine weiteren DNA-Proben zur Verfügung, so dass eine Segregationsanalyse der Mutation R215W nicht durchgeführt werden konnte.

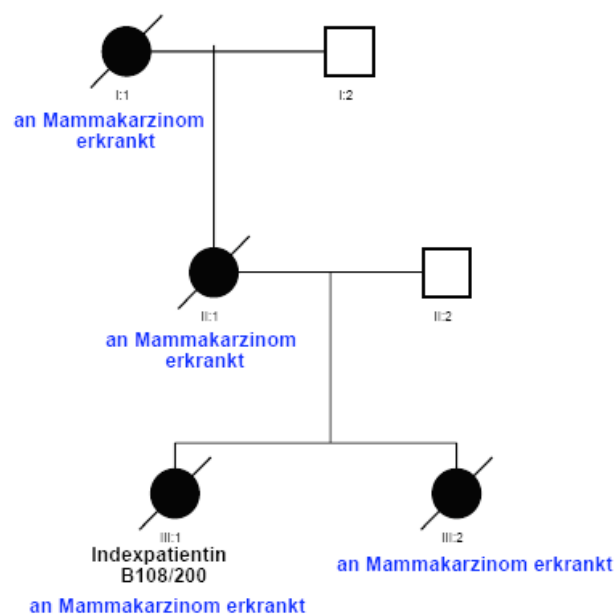
### IVS6+12 A/T des Exons 6

Die Brustkrebspatientin B70/200, heterozygote Trägerin der Sequenzveränderung IVS6+12 A/T, erkrankte im Alter von 36 Jahren an einem duktalem invasivem Brustkrebs,

ebenso ihre Großmutter im Alter von 74 Jahren. Bei ihrem Vater wurde im Alter von 84 Jahren Darmkrebs diagnostiziert. Leider standen auch aus dieser Familie keine weiteren DNA-Proben zur Verfügung, um die Segregation dieser Mutation innerhalb der Familie darzustellen.

### Missense-Mutation R169H in Exon 5

Die familiäre Brustkrebspatientin B108/200, heterozygote Trägerin der Mutation R169H im Exon 5, erkrankte im Alter von 75 Jahren an einem duktal invasiven Mammakarzinom. Innerhalb ihrer Familie sind drei weitere Fälle von Brustkrebs bekannt. Sowohl die Großmutter (erkrankt im Alter von 35 Jahren), die Mutter (erkrankt im Alter von 60 Jahren), als auch die Schwester (erkrankt im Alter von 70 Jahren) hatten ein Mammakarzinom. Leider standen aus dieser Familie keine weiteren DNA-Proben zur Verfügung, so dass eine Segregationanalyse der Mutation R169H nicht möglich war.



**Abb. 19:** Stammbaum der Indexpatientin B108/200 mit familiärer Häufung von Brustkrebs Erkrankungen.



## 6. Diskussion

### 6.1. Das Mammakarzinom und Defekte der zellulären Antwort auf DNA-Doppelstrangbrüche

Das Mammakarzinom gilt mit jährlich über 45.000 Neuerkrankungen als die häufigste Krebserkrankung der Frau in Deutschland [1].

Die Suszeptibilitätsgene und Tumorsuppressorgene *BRCA1* und *BRCA2*, beide in der Signalisierung und Reparatur von DNS-Doppelstrangbrüche involviert, sind für einen Teil der familiären Brustkrebsfälle ursächlich [7, 8]. *BRCA1* ist Teil eines Proteinkomplexes BASC (BRCA1-associated genome surveillance complex). Zusammen mit anderen DNA-Reparaturproteinen wie ATM, MRE11-NBS1-RAD50, BLM, hMSH2 und hMSH6 erkennt BASC geschädigte DNA-Bereiche und leitet die Reparatur dieser Abschnitte ein [114]. Auch bei dem sporadischen Mammakarzinom, das ca. 90-95% aller Brustkrebsfälle ausmacht, konnte eine reduzierte Expression von *BRCA1* und anderen Proteinen des DSB-Reparatursystems wie ATM, NBS1, MRE11 und RAD50 nachgewiesen werden [115]. Ein Defekt der DSB-Reparatur als Ursache für den sporadischen Brustkrebs wird demzufolge ebenfalls vermutet [115].

DNA-Doppelstrangbrüche entstehen einerseits durch Noxen wie ionisierende Strahlung, andererseits beruhen physiologische Vorgänge wie die Meiose auf Doppelstrangbrüche (DSB) [37-39]. Ein Defekt in der Detektion und Reparatur dieser DSB kann die genomische Stabilität des Organismus gefährden, so dass ein erhöhtes Entartungsrisiko der Zelle besteht.

Nibrin, das Genprodukt von *NBS1*, gilt als wichtiger Bestandteil der zellulären Signalkaskade als Antwort auf einen DNA-DSB. Es bildet mit MRE11 und RAD50 einen Proteinkomplex, der im Bereich von einem DNA-DSB zu sog. nukleären Foci aggregiert [69]. Über einen in weiten Teilen noch unbekanntem Weg mit verschiedenen Phosphorylierungsschritten vermittelt Nibrin in Interaktion mit ATM, einem Protein mit Kinaseaktivität [64, 65], die DSB-Reparatur und Zellzykluskontrolle [53, 58, 113, 116]. Während eine Beteiligung von Nibrin bei der S-Phase-Kontrolle vermutet wird [54, 55, 59], ist die Involvierung von NBS1 bei dem G1- und G2-Checkpointarrest umstritten [117-119].

Auch bei der Frage einer Beteiligung des RAD50-MRE11-NBS1-Komplexes bei den beiden Reparaturmechanismen HR und NHEJ divergieren die Meinungen [49-53]. Jedoch wird nach neuesten Erkenntnissen angenommen, dass der MRE11-Komplex stärker an der homologen Rekombination (HR) als das NHEJ beteiligt ist [52, 53]. Allgemein kann die Funktion des MRE11-Proteinkomplex, DNA-Doppelstrangbrüche zu detektieren und diese Defekte an weitere Reparaturproteine zu signalisieren, als erster Schritt beider Reparatursysteme angesehen werden [120]. Nibrin stellt somit eine wichtige Komponente im Reparatursystem von DSB dar und sein Funktionsverlust führt über eine gesteigerte genomische Instabilität zu einem erhöhten Entartungsrisiko der Zelle.

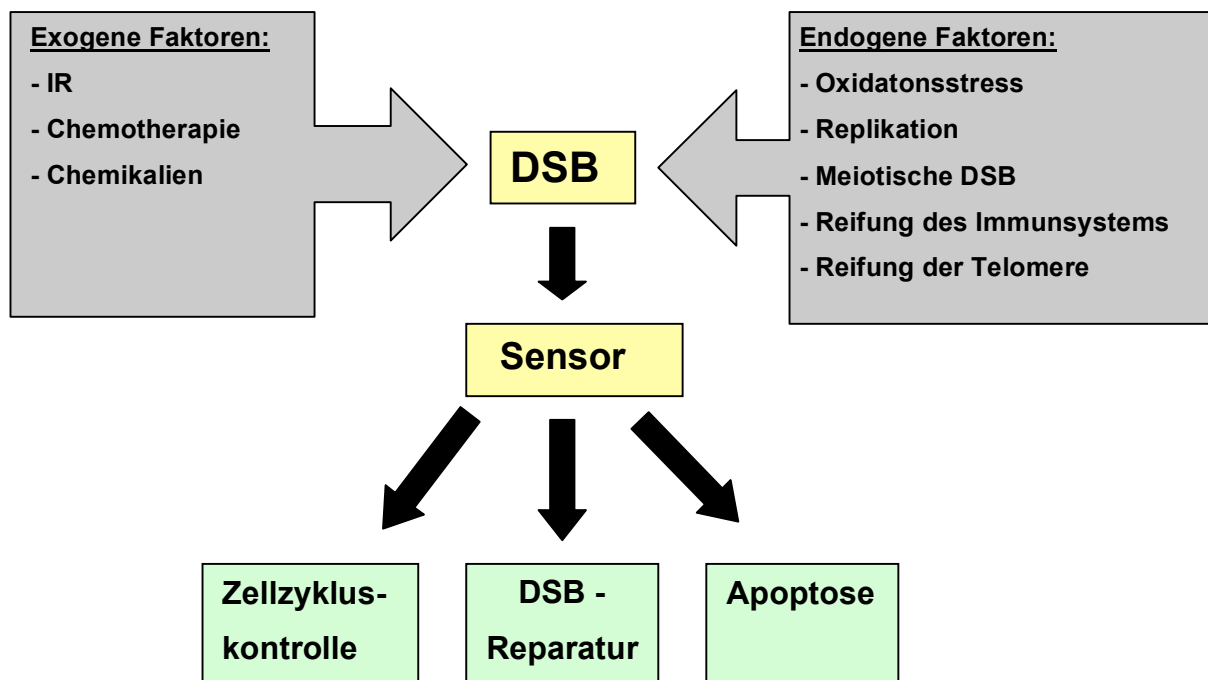


Abb. 20: Schema der unterschiedlichen Ursachen von DNA-Doppelstrangbrüchen und den Möglichkeiten der zellulären Reaktionen

## 6.2. Das *NBS1*-Gen und die Tumorgenese des Mammakarzinoms

NBS-Patienten entwickeln häufig bereits im Kindesalter maligne Erkrankungen, insbesondere das Lymphomrisiko ist extrem hoch. Defekte des zellulären DNA-DSB-Reparatursystems und Funktionsverluste der Zellzykluskontrolle werden bei den Betroffenen für die stark erhöhte Krebsdisposition verantwortlich gemacht [76, 77]. Auch bei ihren Verwandten konnte man das erhöhte Auftreten von Malignomen nachweisen [121-123]. Die Beobachtung, dass bei heterozygoten Mutationsträgern vermehrt spontane chromosomale Translokationen in Lymphoblastoiden Zelllinien (LCL) auftreten, bekräftigte die Vermutung eines erhöhten Krebsrisikos bei der heterozygoten Bevölkerung [124]. Patientengruppen unterschiedlichster Krebserkrankungen wurden daraufhin auf Mutationen im *NBS1*-Gen untersucht. Die Ergebnisse jedoch divergierten [93, 103, 121, 124-134] und die Frage, ob *NBS1* ein Suszeptibilitätsgen für eine Tumorerkrankung darstellt, blieb lange Zeit nicht eindeutig geklärt. Gestützt auf die Index-Test Methode konnte jetzt in einer Familienuntersuchung der eindeutige Nachweis erbracht werden. Das Tumorrisiko liegt höher als bei Heterozygoten aller anderen Chromosomeninstabilitätssyndrome [102].

Wie bei NBS weisen Patienten mit der autosomal rezessiven Ataxia teleangiectasia eine verstärkte Strahlensensibilität und erhöhte Krebsdisposition auf [64]. Auf zellbiologischer Ebene ließ sich eine Interaktion der beiden Protein ATM und Nibrin bei der DNA-DSB-Reparatur und der Kontrolle des Zellzyklus nachweisen [54, 55, 58, 116]. Seitdem über ein erhöhtes Brustkrebsrisiko der ATM-Heterozygoten berichtet wurde [95, 96], wird bei der Suche nach Kandidatengen für das Mammakarzinom verstärkt ein Augenmerk auch auf das *NBS1*-Gen gerichtet.

In der vorliegenden Arbeit wurden DNA-Proben von 64 Patientinnen mit sporadischem Brustkrebs sowie 64 Patientinnen mit familiärem Brustkrebs auf Mutationen und Polymorphismen im *NBS1*-Gen untersucht. Ziel der Untersuchung war es, zu klären, ob die Anzahl der Mutationsträgerinnen unter den Patientinnen erhöht ist und *NBS1* ein Kandidatengen für das Mammakarzinom darstellt.

### **6.3. Mutationen im *NBS1*-Gen und ihr Einfluss auf das Brustkrebsrisiko**

Es konnten bei den Brustkrebspatientinnen insgesamt 7 Sequenzveränderungen im *NBS1*-Gen nachgewiesen werden. Die zwei Abbruchmutationen 657del5 und 803delC sind bereits als echte Mutationen im *NBS1*-Gen bekannt [68]. Bei den Missense-Mutationen R215W und I171V wird ebenfalls eine pathologische Relevanz vermutet [134-136] und auch bei den Sequenzvarianten R169H und D95N ist diese durchaus wahrscheinlich, da sie konservierte Aminosäuren in zwei funktionellen Domänen FHA und BRCA des *NBS1*-Gens betreffen. Bei der Veränderung IVS6+12 A/T die im Rahmen dieser Arbeit erstmals nachgewiesen werden konnte, ist zurzeit ungewiss ob sie eine funktionelle Auswirkung auf die Zelle besitzt oder einen extrem seltenen Polymorphismus im *NBS1*-Gen darstellt.

#### **Mutation 657del5 in Exon 6**

Eine der 64 untersuchten Patientinnen mit sporadischer Brustkrebserkrankung wies die Gründermutation 657del5 in Exon 6 auf, die bei über 90% der NBS-Patienten anzutreffen ist [62, 68, 70]. Sie gilt als hypomorphe Mutation, da sie über Verlust von 5 Basenpaaren eine Leserasterverschiebung und folgend den verfrühten Abbruch der Translation bewirkt [84, 85, 123]. Es resultiert ein verkürztes 26kDa Proteinfsegment. Stromaufwärts der Deletion entsteht durch ein alternatives Startcodon ein größeres 70 kDa Genprodukt [68, 84], das die C-terminale Bindungsstelle für MRE11 aufweist [69, 81].

Nibrin bleibt dadurch weiterhin dazu befähigt, den Reparaturkomplex MRE11-RAD50-NBS1 in den Zellkern zu lokalisieren [81]. Die erhöhte Strahlensensibilität [73] und verringerte Chromosomenstabilität [86, 119, 124] der Zellen von NBS-Patienten, die auch bei heterozygoten Mutationsträgern beobachtet wird, kann durch das Fehlen der N-terminalen FHA und BRCT Domänen des 70kDa Fragments erklärt werden. Jene sind an intranukleärer Fokusbildung und Aktivierung des ATM maßgebend beteiligt [83, 113].

Die Gründermutation 657del5 konnte bereits in früheren Fall-Kontroll-Studien gehäuft bei Brustkrebspatientinnen nachgewiesen werden. So wurde die Mutation bei zwei von

173 russischen Patientinnen mit bilateralen Mammakarzinom (1,16%) entdeckt, während keine der 344 Frauen aus einer Kontrollgruppe diese aufwies [130]. Auch in Arbeiten aus Polen und Weißrussland konnte ein signifikant erhöhtes Brustkrebsrisiko unter Trägerinnen der Mutation 657del5 im Vergleich zu Kontrollpersonen nachgewiesen werden [129] [137] [136].

Im Rahmen einer genetischen Untersuchung von insgesamt 24 NBS-Familien in Tschechien und der Slowakei konnten Seemanova et al. bei Heterozygoten ein erhöhte Krebsprädisposition für verschiedene Malignome im Vergleich zu Familienmitgliedern mit Wildtypstatus nachweisen [102]. In weiteren Studien wurde eine gehäufte Trägerfrequenz von 657del5 unter Patienten mit Prostatakrebs und Kindern mit einer Lymphomerkkrankung beobachtet [103, 132].

Das Ergebnis dieser Arbeit, der Nachweis einer heterozygoten Probe unter 64 sporadischen Brustkrebspatientinnen weist bei einer in Deutschland vorzufindenden Trägerfrequenz der slawischen Mutation 657del5 von 1/866 [131] eine statistische Signifikanz auf ( $p = 0,0047$ ). Insgesamt muss ein erhöhtes Brustkrebsrisiko unter Mutationsträgerinnen angenommen werden. Aufgrund der niedrigen Trägerfrequenz der slawischen Mutation 657del5 in Deutschland (1/866) müssten größere Patientengruppen für eine statistisch gesicherte Aussage zum Brustkrebsrisiko heterozygoter Frauen untersucht werden.

### **Mutation 803delC in Exon 7**

Die in dieser Arbeit nachgewiesene Mutation 803del bei einer Patientin mit sporadischem Brustkrebs beschreibt eine Deletion der Base Cytosin in Position 803 im Exon 7 auf einem Allel. Sie führt zu einer Leserasterverschiebung und folglich einem verfrühten Abbruch der Translation bei der Proteinbiosynthese. Vermutlich entsteht ähnlich wie bei den Abbruchmutationen 657del5, 834del4 und 900del25 unter Einwirkung eines internen Translationsinitiations-Codons neben einem verkürzten Proteinfsegment ein zweites größeres Genprodukt [84, 86]. Diese Sequenzveränderung konnte erst kürzlich als neue Mutation bei einem NBS-Patienten in Compound Heterozygotie mit 657del5 nachgewiesen werden (Varon, pers. Mitteilung). Weitere funktionelle Untersuchungen sind derzeit nicht bekannt. Aufgrund der erwartungsgemäß ähnlichen funktionellen Auswirkungen wie durch die Abbruchmutation 657del5 kann bei Trägerinnen der Mutation 803delC von einem erhöhten Brustkrebsrisiko ausgegangen werden. Es müssen weitere Untersuchungen mit größeren Fallzahlen folgen, um eine

Assoziation der Sequenzveränderung 803delC mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko zu verifizieren.

### **Mutation R215W in Exon 6**

Die Mutation R215W beschreibt den Nukleotidaustausch von Cytosin nach Thymin auf Position 643 des *NBS1*-Gens bei einer Patientin mit familiärem Brustkrebs. Sie bedingt einen Aminosäureaustausch von Arginin nach Tryptophan und liegt stromabwärts der hochkonservierten Domänen FHA und BRCAT, in einem Proteinabschnitt, dessen Funktion noch weitgehend unbekannt ist [138]. Arginin ist an dieser Position unter Säugetieren konserviert [138]. Diese Sequenzvariante R215W konnte erst kürzlich als Compound-Heterozygotie mit der Gründermutation 657del5 bei monozygoten Zwillingen nachgewiesen werden. Diese beiden Patienten fielen durch einen besonders ausgeprägten Phänotyp des Nijmegen Breakage Syndroms auf [112].

Da es sich bei R215W um einen Austausch einer polar mit einer unpolare geladenen Aminosäure handelt, ist eine funktionelle Auswirkung dieser Veränderung auf das Nibrin wahrscheinlich. Funktionelle Untersuchungen mit ionisierender Strahlung von Zellen der Zwillinge mit der Compound Heterozygotie R215W/657del5 zeigten eine geringere Phosphorylierung von ATM im Vergleich zu Kontrollproben mit der homozygoten Gründermutation. Die Phosphorylierung von p53 durch ATM hingegen war sowohl bei den compound-heterozygoten, als auch bei den homozygoten NBS-Zellen gleich stark vermindert. Im Gegensatz hierzu zeigte sich die Phosphorylierung von Nibrin durch ATM unverändert. Bemerkenswert war, dass keine erhöhte Chromosomenbrüchigkeit in den Zellen nachgewiesen werden konnte [112].

In einer Western-Blot Analyse wiederum konnte sowohl bei compound heterozygoten Zellen als auch bei Zellen mit einfacher Heterozygotie der Veränderung R215W eine verringerte Menge an Nibrin gemessen werden [112]. Ebenso konnten Bogdanova et al. mit Hilfe eines Immunoblots eine im Vergleich zu Wildtypzellen um ca. 30% reduzierte Proteinmenge des Nibrins in lymphoblastoiden Zelllinien einer Brustkrebspatientin mit heterozygoter Substitution R215W nachweisen. Auch war bei den heterozygoten Zellen entgegen der Beobachtungen von Seemanova et al. [112] die strahleninduzierte Phosphorylierung von Nibrin um ca. 40% vermindert [136].

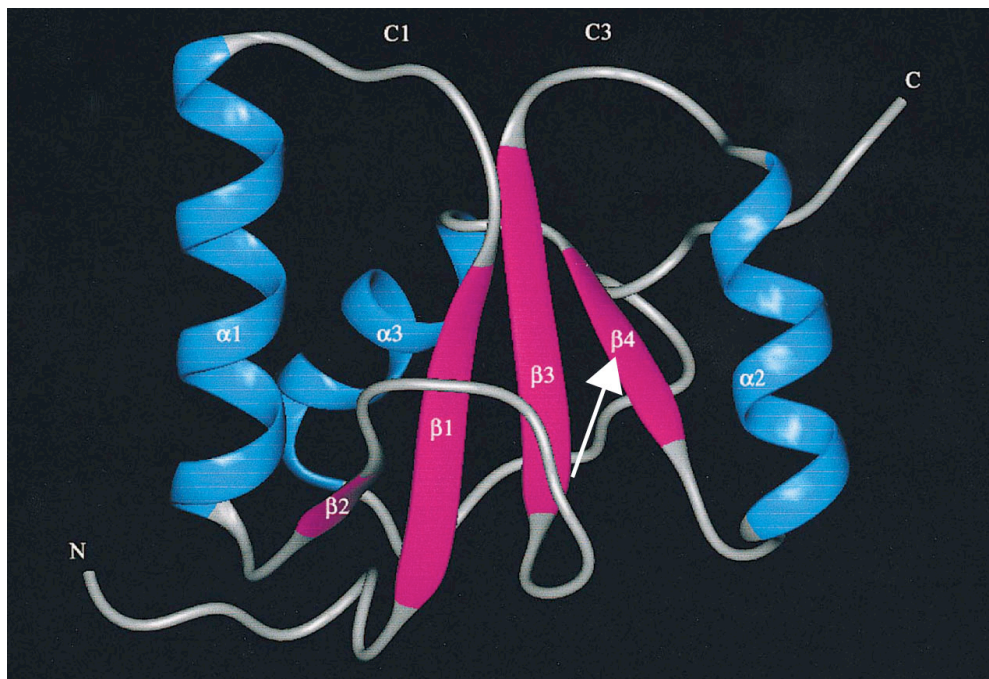
Es muss angenommen werden, dass die Mutation R215W die Proteinstabilität von Nibrin herabsetzt.

Da die Trägerfrequenz für R215W in Deutschland niedriger als 1/405 liegen dürfte [121], müssten für die Erfassung eines erhöhten Brustkrebsrisikos größere Patientengruppen untersucht werden. In Zusammenschau der beobachteten Häufung von Krebserkrankungen in der Familie der untersuchten Patientin (darunter eine Brustkrebserkrankung der Nichte) und den Ergebnissen anderer Arbeiten, in denen die Sequenzvariante R215W bei 9 von 1588 (in Weißrussland) bzw. 9 von 1076 (in Deutschland) Brustkrebspatientinnen [136], bei 3 von 234 Kolonkarzinompatienten [121] sowie bei 2 von 186 Non-Hodgkin Lymphompatienten [134] nachgewiesen werden konnte, kann ein erhöhtes Krebsrisiko bei Mutationsträgern von R215W angenommen werden.

### **Mutation I171V in Exon 5**

Die in Exon 5 des *NBS1*-Gens einer sporadischen Brustkrebspatientin nachgewiesene Sequenzveränderung I171V, ein Nukleotidaustausch von Adenin gegen Guanin an Position 511, führt zu einem Austausch der hochkonservierten Aminosäure Isoleucin gegen Valin (Aminosäure bleibt ungeladen).

Diese Mutation I171V ist in der so genannten „breast cancer C-terminal“-Domäne (BRCT-Domäne; BRCT= BRCA1 C-terminus) am N-terminalen Ende des Nibrin lokalisiert. Bei generell hoher struktureller Diversität weisen viele Proteine der Zellzykluskontrolle diese konservierte globuläre Domäne auf, die erstmals im „breast cancer tumor suppressor“ Gen *BRCA1* nachzuweisen war [79]. Funktionelle Untersuchungen von Fibroblasten, die Mutationen in hochkonservierten Aminosäuren der BRCT-Domäne des *NBS1*-Gen aufwiesen, stellten die große Bedeutung heraus, die dieser Proteinabschnitt für die Funktion des Nibrin besitzt [113]. Die BRCT-Domäne umfasst in der Regel 85 bis 95 Aminosäuren und weist Bereiche konservierter hydrophober Aminosäuren auf, die für die Proteinfaltung wichtig sind. Die erste strukturelle Information über die BRCT-Domäne stammt von dem Gerüstprotein XRCC1 des menschlichen „base excisions repair“ (BER) Signalwegs (siehe Abb. 21).



**Abb. 21: Modell der BRCT-Domäne des Reparaturproteins XRCC1 mit farblicher Abgrenzung der einzelnen Komponenten [139]. Der weiße Pfeil weist auf das Faltblatt beta 4, die Lokalisation der Sequenzveränderung I171V hin.**

BRCT besitzt einen Kern aus vier parallel liegenden beta- Faltblättern, die von drei alpha- Helices umgeben sind. Helix 1 und 3 beherbergen zwei hochkonservierte Bereiche, die vermutlich als Bindungsstellen in der BRCT-Domäne fungieren. Die Sequenzveränderung I171V, die bei der Patientin nachgewiesen werden konnte, liegt im Bereich des Faltblatts beta 4 (siehe Pfeil auf Abbildung 21). Der Austausch der Aminosäure Isoleucin durch Valin verringert durch Wegfall einer (CH)<sub>2</sub>-Gruppe die hydrophoben Eigenschaften dieser Region. Eine mögliche Veränderung der Tertiärstruktur könnte Auswirkungen auf die Funktion der Bindungsstelle haben.

I171V konnte bereits bei 4 von 47 Kindern mit ALL im heterozygoten Zustand [134], als auch bei einem Kind mit aplastischer Anämie (AA) in homozygoter Form nachgewiesen werden [127, 134]. Zusätzlich stellten zytogenetische Analysen von Lymphoblasten eine erhöhte Frequenz chromosomaler struktureller Veränderungen sowohl bei homozygoten (AA-Patient) als auch bei heterozygoten (Vater des AA-Patienten) Mutationsträgern heraus [127]. In einer weiteren Arbeit konnte eine signifikant erhöhte Trägerfrequenz von I171V unter ALL-Patienten nachgewiesen werden [140]. Ebenso konnte ein erhöhtes Erkrankungsrisiko für das Larynxkarzinom bei heterozygoten Trägern der I171V Mutation im *NBS1*-Gen festgestellt werden. Die Mutation konnte bei



9 von 268 Tumorpatienten und nur einer von 500 Kontrollproben nachgewiesen werden [141]. Hinsichtlich einer Assoziation von I171V mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko divergieren die Ergebnisse bisheriger Untersuchungen. So konnte in Studien in Polen die Mutation als signifikanter Risikofaktor für das Mammakarzinom nachgewiesen werden [135, 142], nicht dagegen in Patientenkollektiven aus Weißrussland und Deutschland [143].

Das Ergebnis dieser Untersuchung, der Nachweis eines Trägers unter 64 sporadischen Brustkrebspatientinnen und keiner Veränderung unter 186 Kontrollchromosomen spricht für einen Zusammenhang der Sequenzveränderung I171V mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko.

### **Mutation R169H in Exon 5**

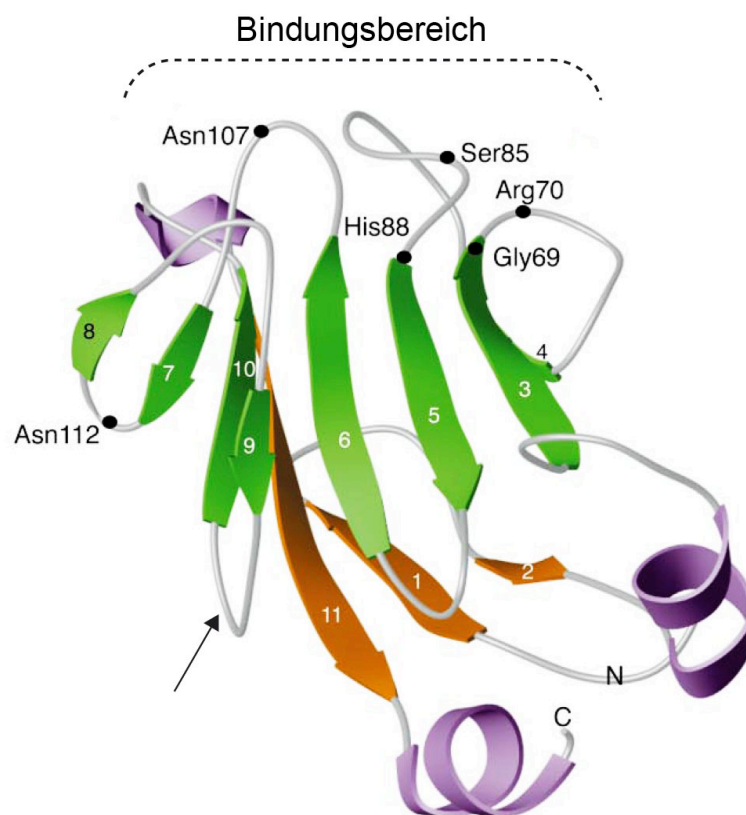
Der Nukleotidaustausch von Cytosin nach Adenin an Position 506 des *NBS1*-Gen, der bei einer Patientin mit familiärem Brustkrebs nachgewiesen werden konnte, führt zu dem Aminosäureaustausch von Arginin nach Histidin. Bisher wurde diese Veränderung in der Literatur nicht beschrieben. Laut persönlicher Mitteilung von Frau Dr. Varon konnte R169H bereits einmal bei einer Person mit Mutationen im *Rad50*-Gen nachgewiesen werden.

R169H liegt ebenso wie I171V in der BRCT-Domäne, einem hochkonservierten funktionell wichtigen Proteinabschnitt von *NBS1*. Arginin ist unter Säugetieren konserviert [138]. Eine funktionelle Auswirkung durch den Aminosäureaustausch ist möglich.

### **Mutation D95N in Exon 3**

Der Nukleotidaustausch von Guanin nach Adenin an Position 283 im Exon 3 des *NBS1*-Gens führt zu einem Aminosäureaustausch von Aspartat nach Asparagin. Dieser liegt in der „Forkhead-assoziierten Domäne“ (Forkhead-associated Domain; FHA-Domäne) am N-terminalen Ende von Nibrin. Dieser Proteinabschnitt ist hoch konserviert und auch bei einer großen Anzahl anderer DNA-Reparatur- und Zellzykluskontrollgenen vorzufinden [80, 144]. Es handelt sich um eine insgesamt 77 Aminosäuren umfassende modulare Phosphopeptid-Erkennungsdomäne, welche Bindungen mit Phosphothreonin-haltigen Liganden eingehen kann. Die Homologieregion weist acht aufeinander folgende Beta-Faltblattstrukturen (3-10) auf, die durch Insertionen von Alpha-Helices und Schleifen (loops) miteinander verbunden sind [80, 139]. Die Mutation D95N liegt zwischen Beta-

Faltblatt 9 und 10 in einer Peptidschleife, die von der eigentlichen Bindungsregion der Domäne weggerichtet ist (siehe schwarzer Pfeil auf Abbildung 22) [145]. In funktionellen Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, daß weder die Ausbildung nuklearer Foci, noch die Phosphorylierung von Nibrin durch den Aminosäureaustausch D95N eingeschränkt ist [113]. Allerdings weisen in vitro Untersuchungen auf eine verminderte Proteinmenge von Nibrin bei Zellen mit der Sequenzvariante D95N hin [113]. Diese könnte Auswirkungen auf die Effektivität des Reparaturmechanismus bei DNA-Doppelstrangbrüchen haben.



**Abb. 22:** Modell der FHA-Domäne des Rad53 Gens mit Markierung des vermutlichen Bindungsbereichs. Die Region mit größter Homologie ist grün markiert (abgeändert nach [145]). Der Pfeil zeigt auf die Lokalisation der Mutation D95N. Sie liegt in einer Schleife zwischen Beta Faltblatt 9 und 10.

Bei der Patientin B286/300 wurde die Mutation D95N gefunden. Des Weiteren fand sich diese Mutation in Untersuchungen deutscher Kinder mit Akuter Lymphatischer

Leukämie (ALL) unter 47 Proben einmal als de novo Mutation in Tumorzellen [134]. Im Rahmen anderer Studien hingegen wurde D95N auch bei Kontrollproben beobachtet [128].

### **Mutationen im Intronbereich des *NBS1*-Gens**

Die Patientin B70/200 mit familiärem Brustkrebs wies die Sequenzveränderung IVS6+12 A/T heterozygot auf. Dieser Basenaustausch von Adenin nach Thymin liegt an 12. Position stromabwärts des Endes von Exon 6, außerhalb der hochkonservierten 8 Nukleotide (AGGT A/G AGT) des 5'-Splice-Donor Bereichs [90]. Mit Hilfe eines Spleißvorhersageprogramms kann die Wahrscheinlichkeit einer Spleißveränderung berechnet werden. Dabei ergab sich ein Score von 0,99, der der Wildtypsequenz entspricht. Obwohl diese Ergebnisse eher für eine neutrale Variante sprechen, bleibt es bemerkenswert, dass die Veränderung unter den 93 Kontrollproben nicht gefunden werden konnte. Weitere Untersuchungen auf RNA-Ebene müssen folgen, um eine Auswirkung dieser Sequenzvariante auf den Spleißvorgang auszuschließen.

Bei einer weiteren Patientin zeigte sich eine Sequenzveränderung im Intronbereich, in Position IVS3-85. Diese Variante wurde bei keiner der 93 Kontrollproben nachgewiesen. Dieser Basenaustausch befindet sich jedoch weit außerhalb der Spleiß- und Branching-Stellen, so dass eine Auswirkung auf den Spleißvorgang sehr unwahrscheinlich ist.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, daß in einem Untersuchungskollektiv von insgesamt 128 Brustkrebspatientinnen (64 sporadische und 64 familiäre Fälle) 7 Sequenzveränderungen vorlagen, die in insgesamt 93 Kontrollproben (186 Kontrollchromosomen) nicht nachgewiesen werden konnten. Davon können die Mutationen 657del5, 803delC, R215W und I171V als pathogen für das Mammakarzinom angesehen werden. Auch die Veränderungen R169H und D95N, die hochkonservierte Aminosäuren in funktionellen Domänen (FHA, BRCA) des *NBS1*-Gens betreffen könnten pathologische Relevanz haben. Bezüglich der Veränderung IVS6+12 A/T müssen Untersuchungen auf RNA-Ebene folgen, um ihren Einfluß auf den Spleißvorgang zu bestimmen und eine Aussage hinsichtlich einer möglichen pathogenetischen Relevanz geben zu können.

Insgesamt fanden sich unter den 128 Patientinnen mit Brustkrebs 6 Mutationen, die als pathogenetisch relevant angesehen werden können und unter den 93 Kontrollen nicht vorkamen. Der Unterschied ist signifikant ( $P = 0,04$ ; Fishers „exact test“).

Diese Befunde sprechen dafür, dass Mutationen im *NBS1*-Gen eine Disposition für Brustkrebs bedeuten. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen andere Arbeiten in denen Mutationen im *NBS1*-Gen bei Brustkrebspatientinnen gehäuft nachgewiesen werden konnten.

In den meisten vorausgegangen Arbeiten wurde das Hauptaugenmerk auf die Mutation 657del5 gerichtet. In Fall-Kontrollstudien in Weißrussland und Russland konnte die Gründermutation unter Brustkrebspatientinnen im Vergleich zu Kontrollen signifikant häufiger nachgewiesen werden [130, 136]. Ebenfalls konnte in zwei weiteren Arbeiten eine Assoziation zwischen einem erhöhten Brustkrebsrisiko und der Mutation 657del5 bei Frauen in Polen aufgestellt werden [129, 137].

Bei Untersuchungen von Brustkrebspatientinnen in Deutschland konnte bislang keine signifikante Häufung der Mutation 657del5 unter Brustkrebspatientinnen nachgewiesen werden [131, 136]. Es muss hierbei jedoch berücksichtigt werden, dass die Trägerfrequenz der Gründermutation von der ethnischen Herkunft der Untersuchungsgruppe abhängt und diese in den nicht slawischen Bevölkerungsgruppen nur sehr niedrig ist. [62, 131]. Für eine statistisch gesicherte Aussage zum Brustkrebsrisiko heterozygoter Frauen mit der Mutation 657del5 in Deutschland müssten somit größere Patientinnengruppen in Form von Multizenterstudien untersucht werden.

Neben der Gründermutation 657del5 wurden auch die beiden Missense-Mutationen R215W und I171V in früheren Fall-Kontroll-Studien bei Patientinnen mit Mammakarzinom untersucht. Unter 1076 Brustkrebspatientinnen in Deutschland konnte die Veränderung R215W in neun Fällen nachgewiesen werden, während sie nur bei zwei der 1017 Kontrollproben vorlag. Hierbei liegt keine eindeutige statistische Signifikanz vor ( $p=0,09$ ) [136]. Unter 270 Brustkrebspatientinnen in Polen waren fünf Frauen Trägerinnen der Mutation I171V, während diese unter 500 Kontrollen nur einmal nachgewiesen werden konnte ( $p$ -Wert: 0,02; statistisch signifikant) [135]. Hingegen zeigte eine Arbeit von Bogdanova et al. keine signifikante Häufung der Missense-Mutation I171V bei Patientinnen mit Mammakarzinom in Deutschland und Weißrussland [143].

Es muss angenommen werden, dass die Mutationen I171V und R215W mit einem insgesamt nur sehr geringen Brustkrebsrisiko in Verbindung stehen, so dass große Multizenterstudien durchgeführt werden müssen, um einen Zusammenhang zwischen den Mutationen und einem erhöhten Brustkrebsrisiko eindeutig nachzuweisen. Im Hinblick auf die Prävalenz der Mutation R215W, die nicht auf die osteuropäische Bevölkerung konzentriert ist, könnte R215W ein im Vergleich zu 657del5 weitaus häufigeres Brustkrebs-Suszeptibilitätsallel darstellen.

Der Vergleich der Häufigkeiten der Mutationen bzw. seltenen Varianten im *NBS1*-Gen zwischen familiärem und sporadischem Brustkrebs zeigt keinen signifikanten Unterschied (6,3% vs. 4,7%). Eine familiäre Brustkrebshäufung kann folglich nicht allein auf Veränderungen im *NBS1*-Gen zurückgeführt werden. Dies stimmt mit den Ergebnissen anderer Arbeiten überein, in denen Mutationen im *NBS1*-Gen sowohl mit dem sporadischen als auch familiären Brustkrebs in Verbindung gebracht werden konnte [129, 137]. Vermutlich handelt sich bei *NBS1* um ein niedrig penetrantes Prädispositionsgen. Im Sinne eines polygenen Modells ist das Brustkrebsrisiko der Heterozygoten durch die Kombination von Defekten verschiedener „low penetrance“-Gene bedingt. Heterozygote Mutationen im *NBS1*-Gen stehen somit nur mit einem kleinen Anteil der Brustkrebsfälle in Verbindung, ohne zwingend an eine familiäre Häufung gekoppelt zu sein. Es wäre notwendig, in den betroffenen Familien weitere Kandidatengene zu untersuchen und Risikofaktoren, denen die einzelnen Familienmitglieder im unterschiedlichen Maße ausgesetzt waren, aufzudecken.

### **LOH (loss of heterozygosity) und alternative Wege der Tumorinitiation**

Zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit standen die Ergebnisse der LOH-Bestimmung von den Patientinnen mit den Keimbahnmutationen I171V, 657del5 und 803delC zur Verfügung. Eine LOH (loss of heterozygosity) konnte bei allen drei Proben ausgeschlossen werden. Obgleich der Verlust des Wildtyp *NBS1*-Allels bei heterozygoten Krebspatienten in anderen Studien nachgewiesen werden konnte [129, 132, 146], deuten die Ergebnisse dieser Studie sowie anderer Arbeiten, in denen ebenfalls bei Tumorproben keine LOH im *NBS1*-Gen festgestellt werden konnte, auf einen alternativen Weg der Tumorinitiation hin [130, 134, 140]. Entweder muss eine Haploinsuffizienz, bei der eine Gendosisreduktion für die Tumorentstehung verantwortlich ist und auch bei ca. 40 weiteren Tumorsuppressorgenen als

---

pathogenetischer Mechanismus vermutet wird [100, 101] oder ein so genannte dominant negative Effekt als Ursache für das erhöhte Krebsrisiko angenommen werden.

Im Falle des *ATM*-Gens konnte gezeigt werden, dass im Gegensatz zu den AT-Patienten mit überwiegend Abbruch-Mutationen im homozygoten Zustand, Brustkrebspatientinnen vor allem heterozygote Missense-Mutationen im *ATM*-Gen aufweisen. Der Einbau eines mutierten Proteins in den Reparaturkomplex von DSB führt zu einem größeren Funktionsverlust als das Fehlen einer Genkopie im Falle einer Abbruch- oder Nullmutation. Zudem kann das veränderte Protein mit dem Wildtypallel konkurrieren und so die Genfunktion zusätzlich einschränken [97-99].

Für die drei Punktmutationen R215W, D95N sowie R169H könnte das erhöhte Brustkrebsrisiko ebenso durch eine Haploinsuffizienz oder einen dominant negativen Effekt erklärt werden. Jedoch lagen für keine dieser Proben Ergebnisse einer LOH-Untersuchung vor.

#### **6.4. Brustkrebsrisiko bei Trägerinnen der Polymorphismen 553 G/C und 2016 A/G**

Ein polygenes Modell, in dem die Karzinogenese des Mammakarzinoms auf einer Kombination von Veränderungen in verschiedenen Suszeptibilitätsgenen beruht, wird zunehmend durch Assoziationsstudien mit Polymorphismen in DSB-Reparaturgenen entwickelt. Sowohl bei Enzymen der Cytochrom P450 Familie (z.B CYP1A1, CYP2D6), als auch bei der Alkoholdehydrogenase (ADH) zeigte sich eine Korrelation zwischen bestimmten Polymorphismen und erhöhtem weiblichen Brustkrebsrisiko [110]. Ebenso disponiert ein Polymorphismus im *XRCC-3* Gen zum Mammakarzinom [104].

Auch für das *NBS1*-Gen konnte bereits eine Assoziation zwischen dem häufigen Polymorphismus 553 G/C (Glu185Gln) und einem erhöhten Lungenkrebsrisiko aufgezeigt werden [108, 109].

In Übereinstimmungen mit den Ergebnissen Arbeitsgruppen von Kuschel und Zhang [104, 147] ergab sich in der vorliegenden Arbeit kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Polymorphismus Glu185Gln in Exon 5 und einem erhöhten Brustkrebsrisiko.

Jedoch fällt in der durchgeführten Fall-Kontroll Studie eine erhöhte Häufigkeit der Genotypen CC (553G/C) und GG (2016A/G) bei den Brustkrebspatientinnen im Vergleich zu den Kontrollen auf (10,94% bei familiären Brustkrebs und 9,38% bei sporadischem Brustkrebs im Gegensatz zu 5,38% bei den Kontrollen). Bezieht man den Vergleich nur auf die weiblichen Kontrollpersonen erweist sich dieser Unterschied sogar noch deutlicher (10,94%, 9,38% vs. 2,00 %).

Zwar sind die Unterschiede im Fishers exact test mit einem p-Wert > 0.05 statistisch nicht signifikant, jedoch kann eine Disposition zu einem erhöhten Brustkrebsrisiko bei homozygoten Polymorphismusträgern vermutet werden. Insgesamt ist die Aussagekraft der vorliegenden Vergleichsstudie durch die geringe Fallzahl der Kontrollpersonen deutlich limitiert. Ebenfalls kann bei den untersuchten Kontrollen, zu denen keine anamnestischen Daten zur Verfügung standen, eine Tumorerkrankung, insbesondere ein Mammakarzinom, nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden.

## 6.5. *NBS-1* im Zusammenhang mit der Histopathologie des Mammakarzinoms

Der Vergleich von histopathologischen Unterschieden zwischen Trägern der Sequenzvarianten 553 G/C und 2016 A/G im *NBS1*-Gen und den Patientinnen mit der Wildtypsequenz zeigte eine Assoziation zwischen dem Tumortyp „medulläres invasives Karzinom“ und dem Vorliegen der Polymorphismen beim familiären Brustkrebs: Zwei von sechs homozygoten familiären Brustkrebspatientinnen (33%) erkrankten an einem medullären Karzinom, während diese Tumormorphologie bei keiner der Patientinnen mit Wildtyp zu finden war ( $p=0,0302$ ; statistisch signifikant bei Anwendung des Fishers „exact test“). Dieser Tumor kommt bei 1-2% aller invasiven Brustkrebstumoren vor und zeigt sich überdurchschnittlich häufig bei *BRCA1*-positiven Frauen (11%) [20].

In Bezug auf weitere typische Tumoreigenschaften der *BRCA1*-Tumoren, wie negativer Östrogenrezeptorstatus und hohes Grading [20-22], zeigten die Tumoren der Brustkrebspatientinnen mit den homozygoten Polymorphismen 553 C/C und 2016 G/G keine weiteren Auffälligkeiten.

Unter den sporadischen Mammakarzinomen wies die Häufigkeit des negativen Lymphknotenstatus eine statistische Signifikanz auf. Während 12 von 23 Patientinnen mit Wildtyp (52%) nodalnegativ waren, zeigten alle Homozygoten der Polymorphismen 553 C/C und 2016 G/G einen Lymphknotenbefall. Inwiefern sich anhand dieser Ergebnisse Aussagen über eine prognostische Sonderstellung der homozygoten Polymorphismusträger treffen lassen, ist ungewiss. Die Ergebnisse dieser Untersuchung müssen durch weitere Studien bekräftigt werden.

Das invasive lobuläre Mammakarzinom macht einen Anteil von ca. 10-15% aller bösartigen Brusttumoren aus. Aufgrund epidemiologischer Studien wird eine familiäre Disposition für diesen Tumortyp vermutet [23]. Ein gehäuftes Auftreten des lobulären Mammakarzinoms bei *BRCA1*- und *BRCA2*-positiven Patientinnen konnte bereits ausgeschlossen werden [20]. Im Rahmen der Auswertung histopathologischer Tumorbefunde konnte sowohl bei der familiären Brustkrebspatientin mit der Sequenzveränderung R215W, als auch bei der sporadischen Brustkrebspatientin mit der Mutation 657del5 ein lobuläres Mammakarzinom nachgewiesen werden. Dies könnte auf einen Zusammenhang zwischen *NBS1*-Veränderungen und der Prädisposition für das lobuläre Mammakarzinom hinweisen.



Bei der Auswertung der Tumorpathologie der Brusttumoren mit Mutationen im *NBS1*-Gen konnte folgende Auffälligkeit beobachtet werden. Die sporadischen Mammakarzinome mit den Mutationen I171V und 657del wiesen im Vergleich zu den Brusttumoren mit zwei unveränderten *NBS1*-Allelen histopathologische Eigenschaften auf, die für eine höhere Aggressivität sowie eine schlechtere Prognose der Erkrankung sprechen. Bei beiden Fällen lag zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits eine Lymphknotenmetastasierung vor und das lokale Tumorwachstum war relativ weit fortgeschritten (pT3 bzw. pT4). Die Differenzierung der Tumorzellen erwies sich als niedrig bzw. mäßig (G2 bzw. G3) und der Hormonrezeptorstatus für Östrogen und Progesteron war jeweils negativ.

Bereits in den Arbeiten von Roznowski et al. konnte für Trägerinnen der Mutation I171V mit Brustkrebs eine niedrige Expression der Östrogen- und Progesteronrezeptoren sowie ein verhältnismäßig hohes histologisches Grading (G3) nachgewiesen werden [135].

Ob ein positiver Trägerstatus der Mutation 657del5 und I171V bei Brustkrebspatientinnen in Zusammenhang mit schlechteren Prognosefaktoren steht muss durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

## 7. Zusammenfassung

Das Mammakarzinom stellt die weitaus häufigste Krebserkrankung der Frau dar. Ca. 5-10% aller Brustkrebserkrankungen sind familiär bedingt und es können in etwa der Hälfte dieser Fälle Mutationen in den Tumorsuppressorgenen *BRCA1* oder *BRCA2* nachgewiesen werden. Veränderungen im *ATM*-Gen, das wie *BRCA1* und *BRCA2* in den Signalweg von Zellzykluskontrolle und DNA-Reparatur involviert ist, werden ebenso mit erhöhtem Brustkrebsrisiko bei Frauen in Verbindung gebracht.

Derzeit wird nach weiteren niedrig penetranten Suszeptibilitätsgenen geforscht, die einen genetischen Hintergrund für das Mammakarzinom darstellen können. Aufgrund der zu beobachtenden erhöhten Strahlensensibilität der Brustkrebspatientinnen, vermutet man Gene der DNA-Reparatur und Zellzykluskontrolle als Kandidatengene für ein erhöhtes Brustkrebsrisiko.

Nibrin als Produkt des *NBS1*-Gens bildet mit RAD50 und MRE11 einen Komplex, der unter anderem in Zellzykluskontrolle und Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen involviert ist. Biallelische Mutationen im *NBS1*-Gen führen zu dem Nijmegen Breakage Syndrom. Neben klinischen Zeichen wie Minderwuchs, Immundefizienz und kraniozephalen morphologischen Besonderheiten weisen die Patienten ein erhöhtes Malignitätsrisiko auf. Ebenso stellte sich bei heterozygoten Verwandten Betroffener eine erhöhte Häufigkeit von Krebserkrankungen heraus.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Mutationsanalyse des gesamten kodierenden Bereichs des *NBS1*-Gens bei *BRCA1/2* negativen Brustkrebspatientinnen durchgeführt. Es standen DNA Proben von 64 sporadischen und 64 familiären *BRCA1/2*- negativen Brustkrebspatientinnen zur Verfügung. Diese wurden durch direkte Sequenzierung in allen 16 Exons des *NBS1*-Gens untersucht. Insgesamt zeigte sich bei drei sporadischen und vier familiären Brustkrebspatientinnen jeweils eine heterozygote Mutation im *NBS1*-Gen. Hierbei können die Frameshift-Mutationen 657del5 in Exon 6 und 803delC in Exon 7 sowie die Missense-Mutationen I171V und R215W als pathogenetisch relevant betrachtet werden, die beiden Varianten D95N und R169H als sehr wahrscheinlich, da sie konservierte Aminosäuren in zwei funktionellen Domänen (FHA, BRCA) des *NBS1*-Gens betreffen. Die Frage nach dem Krankheitswert der intronischen Variante IVS6+12 A/T ist ungewiss. Sie wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals nachgewiesen. Ihre Auswirkung auf den Spleißvorgang könnte zu einem veränderten Genprodukt und somit

Funktionseinbuße des DNA-Reparaturkomplexes führen. Nur weitere funktionelle Untersuchungen auf RNA-Ebene können diese Frage klären.

Insgesamt fanden sich unter den 128 Patientinnen mit Brustkrebs 6 Mutationen, die als mutmaßlich pathogenetisch relevant eingestuft werden können und sich unter den 93 Kontrollen nicht fanden. Der Unterschied ist signifikant ( $P = 0,04$ ).

Demnach besitzen Mutationen im *NBS1*-Gen eine Relevanz für die Disposition von Brustkrebs bei Frauen, wobei es unerheblich scheint, ob dieser in sporadischer oder familiärer Form vorliegt. So zeigte auch der Vergleich der Mutationshäufigkeiten im *NBS1*-Gen zwischen familiärem und sporadischem Brustkrebs keinen signifikanten Unterschied (6,3% vs. 4,7%). Die inkomplette Segregation der jeweiligen Mutationen bei den familiären Brustkrebspatientinnen unterstreicht, dass heterozygote Mutationen im *NBS1*-Gen eine Disposition für Brustkrebs bedeuten, welche im Sinne eines multifaktoriellen Modells nur in Kombination mit weiteren „low penetrance“ Suszeptibilitätsgenen und einer vermehrten Exposition gegenüber exogenen Risikofaktoren zum Brustkrebs führt. Eine LOH-Untersuchung wurde bei drei der positiven sporadischen Brustkrebstumoren (I171V, 657del5 und 803delC) durchgeführt und erwies sich bei allen als negativ. Demnach muss ein alternativer Mechanismus der Tumorentstehung zum klassischen „Two-Hit-Modell“ der Tumorsuppressorgene angenommen werden. Sowohl eine Haploinsuffizienz als auch der bereits beim *ATM*-Gen beschriebene dominant negative Effekt kommt hierfür in Frage.

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit der Zusammenhang zwischen den bekannten Polymorphismen 553 G/C und 2016 A/G im *NBS1*-Gen und dem Brustkrebsrisiko untersucht. Es ließ sich ein deutlicher Unterschied in der Häufigkeit der homozygoten Sequenzveränderung zwischen den Brustkrebspatientinnen und den weiblichen Kontrollproben feststellen (11% bzw. 9% versus 2%). Auch wenn diesbezüglich keine statistische Signifikanz vorlag ( $p > 0,05$ ) könnte der Trägerstatus der Polymorphismen eine Relevanz bezüglich des Brustkrebsrisikos besitzen.

In einer histopathologischen Auswertung der Tumorproben konnte u.a. bei Mammakarzinomen mit den Mutationen I171V und 657del5 histopathologische Tumoreigenschaften nachgewiesen werden, die für eine höhere Aggressivität und eine schlechtere Prognose der Erkrankung sprechen. Bereits in einer vorherigen Studie konnte der Trägerstatus der Mutation I171V bei Brustkrebspatientinnen mit schlechten Prognosefaktoren in Verbindung gebracht werden. Ob Veränderungen im *NBS1*-Gen

durch funktionelle Auswirkungen oder ein Linkage disequilibrium mit weiteren Mutationen Einfluß auf die Tumorhistologie ausüben, muss durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

## 8. Literaturverzeichnis

1. Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland in Zusammenarbeit mit dem Robert Koch Institut: Krebs in Deutschland- Häufigkeiten und Trends, 3. erweiterte und aktualisierte Auflage, Saarbrücken 2002.
2. Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland in Zusammenarbeit mit dem Robert Koch Institut: Krebs in Deutschland: Häufigkeiten und Trends. Vol. 3. erweiterte und aktualisierte Ausgabe.
3. J. Engel, D. Hölzel, J. Kerr und G. Schubert-Fritschle. Epidemiologie des Mammakarzinoms. Tumorzentrum München: Manual Mammakarzinom. W. Zuckschwerdt Verlag München, 2003.
4. Dumitrescu, R.G. and I. Cotarla, Understanding breast cancer risk -- where do we stand in 2005? *J Cell Mol Med*, 2005. **9**(1): p. 208-21.
5. McPherson, K., C.M. Steel, and J.M. Dixon, ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *Bmj*, 2000. **321**(7261): p. 624-8.
6. Lindor, N.M. and M.H. Greene, The concise handbook of family cancer syndromes. Mayo Familial Cancer Program. *J Natl Cancer Inst*, 1998. **90**(14): p. 1039-71.
7. Wooster, R., et al., Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science*, 1994. **265**(5181): p. 2088-90.
8. Miki, Y., et al., A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*, 1994. **266**(5182): p. 66-71.
9. King, M.C., J.H. Marks, and J.B. Mandell, Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science*, 2003. **302**(5645): p. 643-6.
10. Ford, D., D.F. Easton, and J. Peto, Estimates of the gene frequency of BRCA1 and its contribution to breast and ovarian cancer incidence. *Am J Hum Genet*, 1995. **57**(6): p. 1457-62.
11. Antoniou, A.C., et al., A comprehensive model for familial breast cancer incorporating BRCA1, BRCA2 and other genes. *Br J Cancer*, 2002. **86**(1): p. 76-83.
12. Rosen PP, O.H., Tumors of the mammary gland. Vol. 3rd ser. 1993, Washington D.C: Armed Forces Institute of Pathology.
13. WHO, Histological typing of the breast tumours. Vol. 2. 1982, Geneva: Annales de pathologie. 91-105.
14. Zielinski C et al., Mammakarzinom, in: Hiddemann W et al., *Die Onkologie*, Springer: Berlin Heidelberg New York 2004, pp. 1009-1055.
15. Riede U.-N. Brustdrüse. In Riede und Schäfer: *Allgemeine und spezielle Pathologie*, 4. Auflage (2001), Thieme Verlag Stuttgart, pp. 967-980.
16. Roodi, N., et al., Estrogen receptor gene analysis in estrogen receptor-positive and receptor-negative primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 1995. **87**(6): p. 446-51.
17. Hanstein, B., et al., Insights into the molecular biology of the estrogen receptor define novel therapeutic targets for breast cancer. *Eur J Endocrinol*, 2004. **150**(3): p. 243-55.
18. Yang, X., et al., Synergistic activation of functional estrogen receptor (ER)-alpha by DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibition in human ER-alpha-negative breast cancer cells. *Cancer Res*, 2001. **61**(19): p. 7025-9.

19. Bloom, H.J. and W.W. Richardson, Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer*, 1957. **11**(3): p. 359-77.
20. Lakhani, S.R., et al., The pathology of familial breast cancer: histological features of cancers in families not attributable to mutations in BRCA1 or BRCA2. *Clin Cancer Res*, 2000. **6**(3): p. 782-9.
21. Lakhani, S.R., et al., Multifactorial analysis of differences between sporadic breast cancers and cancers involving BRCA1 and BRCA2 mutations. *J Natl Cancer Inst*, 1998. **90**(15): p. 1138-45.
22. Lakhani, S.R., et al., The pathology of familial breast cancer: predictive value of immunohistochemical markers estrogen receptor, progesterone receptor, HER-2, and p53 in patients with mutations in BRCA1 and BRCA2. *J Clin Oncol*, 2002. **20**(9): p. 2310-8.
23. Rosen, P.P., et al., Epidemiology of breast carcinoma III: relationship of family history to tumor type. *Cancer*, 1982. **50**(1): p. 171-9.
24. Balleine, R.L., et al., Histopathological features of breast cancer in carriers of ATM gene variants. *Histopathology*, 2006. **49**(5): p. 523-32.
25. Fisher, B., et al., Relative worth of estrogen or progesterone receptor and pathologic characteristics of differentiation as indicators of prognosis in node negative breast cancer patients: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-06. *J Clin Oncol*, 1988. **6**(7): p. 1076-87.
26. Bühlig K und Friedmann W. *Intensivkurs Gynäkologie und Geburtshilfe*, Urban & Fischer Verlag (2004), pp.435-450.
27. Kauff, N.D., et al., Risk-reducing salpingo-oophorectomy in women with a BRCA1 or BRCA2 mutation. *N Engl J Med*, 2002. **346**(21): p. 1609-15.
28. Hartmann, L.C., et al., Efficacy of bilateral prophylactic mastectomy in women with a family history of breast cancer. *N Engl J Med*, 1999. **340**(2): p. 77-84.
29. Meijers-Heijboer, H., et al., Breast cancer after prophylactic bilateral mastectomy in women with a BRCA1 or BRCA2 mutation. *N Engl J Med*, 2001. **345**(3): p. 159-64.
30. Kiechle M, S.R., Präventive Strategien bei familiärer Brustkrebsdisposition. *Radiologie*, 2001. **41**: p. 366-370.
31. Strachan T., R.A.P., *Molekulare Humangenetik*. 2005: Spektrum Verlag. 580-596.
32. Knudson, A.G., Jr., Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1971. **68**(4): p. 820-3.
33. Kinzler, K.W. and B. Vogelstein, Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature*, 1997. **386**(6627): p. 761, 763.
34. Friedberg, E.C., Out of the shadows and into the light: the emergence of DNA repair. *Trends Biochem Sci*, 1995. **20**(10): p. 381.
35. Richardson, C. and M. Jasin, Frequent chromosomal translocations induced by DNA double-strand breaks. *Nature*, 2000. **405**(6787): p. 697-700.
36. Blocher, D. and W. Pohlit, DNA double strand breaks in Ehrlich ascites tumour cells at low doses of x-rays. II. Can cell death be attributed to double strand breaks? *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*, 1982. **42**(3): p. 329-38.
37. Franchitto, A. and P. Pichierri, Protecting genomic integrity during DNA replication: correlation between Werner's and Bloom's syndrome gene products and the MRE11 complex. *Hum Mol Genet*, 2002. **11**(20): p. 2447-53.

38. Ward, I.M. and J. Chen, Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. *J Biol Chem*, 2001. **276**(51): p. 47759-62.
39. Chen, H.T., et al., Response to RAG-mediated VDJ cleavage by NBS1 and gamma-H2AX. *Science*, 2000. **290**(5498): p. 1962-5.
40. Weaver, D.T., What to do at an end: DNA double-strand-break repair. *Trends Genet*, 1995. **11**(10): p. 388-92.
41. Weaver, D.T., Regulation and repair of double-strand DNA breaks. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 1996. **6**(4): p. 345-75.
42. Hendrickson, E.A., Cell-cycle regulation of mammalian DNA double-strand-break repair. *Am J Hum Genet*, 1997. **61**(4): p. 795-800.
43. Hoeijmakers, J.H., Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, 2001. **411**(6835): p. 366-74.
44. Kanaar, R., J.H. Hoeijmakers, and D.C. van Gent, Molecular mechanisms of DNA double strand break repair. *Trends Cell Biol*, 1998. **8**(12): p. 483-9.
45. Haber, J.E., Partners and pathways repairing a double-strand break. *Trends Genet*, 2000. **16**(6): p. 259-64.
46. Gottlieb, T.M. and S.P. Jackson, The DNA-dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with Ku antigen. *Cell*, 1993. **72**(1): p. 131-42.
47. Critchlow, S.E., R.P. Bowater, and S.P. Jackson, Mammalian DNA double-strand break repair protein XRCC4 interacts with DNA ligase IV. *Curr Biol*, 1997. **7**(8): p. 588-98.
48. Paull, D.E., et al., Detection of occult thymoma during exercise thallium 201, technetium 99m tetrofosmin imaging for coronary artery disease. *Chest*, 2000. **118**(2): p. 550-1.
49. Huang, J. and W.S. Dynan, Reconstitution of the mammalian DNA double-strand break end-joining reaction reveals a requirement for an Mre11/Rad50/NBS1-containing fraction. *Nucleic Acids Res*, 2002. **30**(3): p. 667-74.
50. Anderson, D.E., et al., Structure of the Rad50 x Mre11 DNA repair complex from *Saccharomyces cerevisiae* by electron microscopy. *J Biol Chem*, 2001. **276**(40): p. 37027-33.
51. de Jager, M., et al., DNA-binding and strand-annealing activities of human Mre11: implications for its roles in DNA double-strand break repair pathways. *Nucleic Acids Res*, 2001. **29**(6): p. 1317-25.
52. Yeo, T.C., et al., V(D)J rearrangement in Nijmegen breakage syndrome. *Mol Immunol*, 2000. **37**(18): p. 1131-9.
53. Tauchi, H., et al., Nbs1 is essential for DNA repair by homologous recombination in higher vertebrate cells. *Nature*, 2002. **420**(6911): p. 93-8.
54. Zhao, S., et al., Functional link between ataxia-telangiectasia and Nijmegen breakage syndrome gene products. *Nature*, 2000. **405**(6785): p. 473-7.
55. Lim, D.S., et al., ATM phosphorylates p95/nbs1 in an S-phase checkpoint pathway. *Nature*, 2000. **404**(6778): p. 613-7.
56. Canman, C.E., et al., Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science*, 1998. **281**(5383): p. 1677-9.
57. Banin, S., et al., Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science*, 1998. **281**(5383): p. 1674-7.
58. Gatei, M., et al., ATM-dependent phosphorylation of nibrin in response to radiation exposure. *Nat Genet*, 2000. **25**(1): p. 115-9.

59. Sullivan, K.E., et al., Cell cycle checkpoints and DNA repair in Nijmegen breakage syndrome. *Clin Immunol Immunopathol*, 1997. **82**(1): p. 43-8.
60. Falck, J., et al., The DNA damage-dependent intra-S phase checkpoint is regulated by parallel pathways. *Nat Genet*, 2002. **30**(3): p. 290-4.
61. Weemaes, C.M., et al., A new chromosomal instability disorder: the Nijmegen breakage syndrome. *Acta Paediatr Scand*, 1981. **70**(4): p. 557-64.
62. Varon, R., et al., Clinical ascertainment of Nijmegen breakage syndrome (NBS) and prevalence of the major mutation, 657del5, in three Slav populations. *Eur J Hum Genet*, 2000. **8**(11): p. 900-2.
63. Jaspers, N.G., R.D. Taalman, and C. Baan, Patients with an inherited syndrome characterized by immunodeficiency, microcephaly, and chromosomal instability: genetic relationship to ataxia telangiectasia. *Am J Hum Genet*, 1988. **42**(1): p. 66-73.
64. Savitsky, K., et al., A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science*, 1995. **268**(5218): p. 1749-53.
65. Stumm, M., et al., The ataxia-telangiectasia-variant genes 1 and 2 are distinct from the ataxia-telangiectasia gene on chromosome 11q23.1. *Am J Hum Genet*, 1995. **57**(4): p. 960-2.
66. Saar, K., et al., The gene for the ataxia-telangiectasia variant, Nijmegen breakage syndrome, maps to a 1-cM interval on chromosome 8q21. *Am J Hum Genet*, 1997. **60**(3): p. 605-10.
67. Matsuura, S., et al., Positional cloning of the gene for Nijmegen breakage syndrome. *Nat Genet*, 1998. **19**(2): p. 179-81.
68. Varon, R., et al., Nibrin, a novel DNA double-strand break repair protein, is mutated in Nijmegen breakage syndrome. *Cell*, 1998. **93**(3): p. 467-76.
69. Carney, J.P., et al., The hMre11/hRad50 protein complex and Nijmegen breakage syndrome: linkage of double-strand break repair to the cellular DNA damage response. *Cell*, 1998. **93**(3): p. 477-86.
70. Nijmegen breakage syndrome. The International Nijmegen Breakage Syndrome Study Group. *Arch Dis Child*, 2000. **82**(5): p. 400-6.
71. Weemaes, C.M., D.F. Smeets, and C.J. van der Burgt, Nijmegen Breakage syndrome: a progress report. *Int J Radiat Biol*, 1994. **66**(6 Suppl): p. S185-8.
72. van Engelen, B.G., et al., Decreased immunoglobulin class switching in Nijmegen Breakage syndrome due to the DNA repair defect. *Hum Immunol*, 2001. **62**(12): p. 1324-7.
73. van der Burgt, I., et al., Nijmegen breakage syndrome. *J Med Genet*, 1996. **33**(2): p. 153-6.
74. Chrzanowska, K.H., et al., Eleven Polish patients with microcephaly, immunodeficiency, and chromosomal instability: the Nijmegen breakage syndrome. *Am J Med Genet*, 1995. **57**(3): p. 462-71.
75. Taalman, R.D., et al., Hypersensitivity to ionizing radiation, in vitro, in a new chromosomal breakage disorder, the Nijmegen Breakage Syndrome. *Mutat Res*, 1983. **112**(1): p. 23-32.
76. Seemanova, E., et al., Familial microcephaly with normal intelligence, immunodeficiency, and risk for lymphoreticular malignancies: a new autosomal recessive disorder. *Am J Med Genet*, 1985. **20**(4): p. 639-48.
77. Seidemann, K., et al., Non-Hodgkin's lymphoma in pediatric patients with chromosomal breakage syndromes (AT and NBS): experience from the BFM trials. *Ann Oncol*, 2000. **11 Suppl 1**: p. 141-5.



78. Hart, R.M., et al., Radiotherapeutic management of medulloblastoma in a pediatric patient with ataxia telangiectasia. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1987. **13**(8): p. 1237-40.
79. Bork, P., et al., A superfamily of conserved domains in DNA damage-responsive cell cycle checkpoint proteins. *Faseb J*, 1997. **11**(1): p. 68-76.
80. Hofmann, K. and P. Bucher, The FHA domain: a putative nuclear signalling domain found in protein kinases and transcription factors. *Trends Biochem Sci*, 1995. **20**(9): p. 347-9.
81. Desai-Mehta, A., K.M. Cerosaletti, and P. Concannon, Distinct functional domains of nibrin mediate Mre11 binding, focus formation, and nuclear localization. *Mol Cell Biol*, 2001. **21**(6): p. 2184-91.
82. Tauchi, H., et al., The forkhead-associated domain of NBS1 is essential for nuclear foci formation after irradiation but not essential for hRAD50[middle dot]hMRE11[middle dot]NBS1 complex DNA repair activity. *J Biol Chem*, 2001. **276**(1): p. 12-5.
83. Kobayashi, J., et al., NBS1 localizes to gamma-H2AX foci through interaction with the FHA/BRCT domain. *Curr Biol*, 2002. **12**(21): p. 1846-51.
84. Maser, R.S., R. Zinkel, and J.H. Petrini, An alternative mode of translation permits production of a variant NBS1 protein from the common Nijmegen breakage syndrome allele. *Nat Genet*, 2001. **27**(4): p. 417-21.
85. Zhu, J., et al., Targeted disruption of the Nijmegen breakage syndrome gene NBS1 leads to early embryonic lethality in mice. *Curr Biol*, 2001. **11**(2): p. 105-9.
86. Tanzanella, C., et al., Chromosome instability and nibrin protein variants in NBS heterozygotes. *Eur J Hum Genet*, 2003. **11**(4): p. 297-303.
87. Varon, R., et al., Mild Nijmegen breakage syndrome phenotype due to alternative splicing. *Hum Mol Genet*, 2006. **15**(5): p. 679-89.
88. Venables, J.P., Aberrant and alternative splicing in cancer. *Cancer Res*, 2004. **64**(21): p. 7647-54.
89. Berget, S.M. and P.A. Sharp, A spliced sequence at the 5'-terminus of adenovirus late mRNA. *Brookhaven Symp Biol*, 1977(29): p. 332-44.
90. Shapiro, M.B. and P. Senapathy, RNA splice junctions of different classes of eukaryotes: sequence statistics and functional implications in gene expression. *Nucleic Acids Res*, 1987. **15**(17): p. 7155-74.
91. Wang, J. and J.P. Jin, Primary structure and developmental acidic to basic transition of 13 alternatively spliced mouse fast skeletal muscle troponin T isoforms. *Gene*, 1997. **193**(1): p. 105-14.
92. Tessitore, A., et al., New mutations and protein variants of NBS1 are identified in cancer cell lines. *Genes Chromosomes Cancer*, 2003. **36**(2): p. 198-204.
93. Varon, R., et al., Mutation analysis of the Nijmegen breakage syndrome gene (NBS1) in nineteen patients with acute myeloid leukemia with complex karyotypes. *Leuk Lymphoma*, 2003. **44**(11): p. 1931-4.
94. Digweed, M. and K. Sperling, Nijmegen breakage syndrome: clinical manifestation of defective response to DNA double-strand breaks. *DNA Repair (Amst)*, 2004. **3**(8-9): p. 1207-17.
95. Athma, P., R. Rappaport, and M. Swift, Molecular genotyping shows that ataxia-telangiectasia heterozygotes are predisposed to breast cancer. *Cancer Genet Cytogenet*, 1996. **92**(2): p. 130-4.
96. Maillet, P., et al., Constitutional alterations of the ATM gene in early onset sporadic breast cancer. *J Med Genet*, 2002. **39**(10): p. 751-3.

97. Gatti, R.A., A. Tward, and P. Concannon, Cancer risk in ATM heterozygotes: a model of phenotypic and mechanistic differences between missense and truncating mutations. *Mol Genet Metab*, 1999. **68**(4): p. 419-23.
98. Meyn, M.S., Ataxia-telangiectasia, cancer and the pathobiology of the ATM gene. *Clin Genet*, 1999. **55**(5): p. 289-304.
99. Teraoka, S.N., et al., Increased frequency of ATM mutations in breast carcinoma patients with early onset disease and positive family history. *Cancer*, 2001. **92**(3): p. 479-87.
100. Quon K.C., B.A., et al., Haplo-insufficiency? Let me count the ways. *Genes Dev.*, 2001. **15**: p. 2917-2921.
101. Santarosa, M., Haploinsufficiency for tumour suppressor genes: when you do not need to go all the way. *Biochim Biophys Acta*, 2004. **1654**: p. 105-122.
102. Seemanova, E., Cancer risk of heterozygotes with the NBN founder mutation. *J Natl Cancer Inst*, 2007. **99**: p. 1875-80.
103. Resnick, I.B., et al., 657del5 mutation in the gene for Nijmegen breakage syndrome (NBS1) in a cohort of Russian children with lymphoid tissue malignancies and controls. *Am J Med Genet A*, 2003. **120**(2): p. 174-9.
104. Kuschel, B., et al., Variants in DNA double-strand break repair genes and breast cancer susceptibility. *Hum Mol Genet*, 2002. **11**(12): p. 1399-407.
105. Duell, E.J., et al., Polymorphisms in the DNA repair gene XRCC1 and breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2001. **10**(3): p. 217-22.
106. Smith, T.R., et al., DNA-repair genetic polymorphisms and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2003. **12**(11 Pt 1): p. 1200-4.
107. Goode, E.L., et al., Effect of germ-line genetic variation on breast cancer survival in a population-based study. *Cancer Res*, 2002. **62**(11): p. 3052-7.
108. Lan, Q., et al., Smoky coal exposure, NBS1 polymorphisms, p53 protein accumulation, and lung cancer risk in Xuan Wei, China. *Lung Cancer*, 2005.
109. Medina, P.P., et al., Screening of homologous recombination gene polymorphisms in lung cancer patients reveals an association of the NBS1-185Gln variant and p53 gene mutations. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2003. **12**(8): p. 699-704.
110. Rothman, N., et al., The use of common genetic polymorphisms to enhance the epidemiologic study of environmental carcinogens. *Biochim Biophys Acta*, 2001. **1471**(2): p. C1-10.
111. Mullis, K.B. and F.A. Faloona, Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, 1987. **155**: p. 335-50.
112. Seemanova, E., et al., Nijmegen breakage syndrome (NBS) with neurological abnormalities and without chromosomal instability. *J Med Genet*, 2006. **43**(3): p. 218-24.
113. Cerosaletti, K.M. and P. Concannon, Nibrin forkhead-associated domain and breast cancer C-terminal domain are both required for nuclear focus formation and phosphorylation. *J Biol Chem*, 2003. **278**(24): p. 21944-51.
114. Wang, Y., et al., BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes Dev*, 2000. **14**(8): p. 927-39.
115. Angele, S., et al., Altered expression of DNA double-strand break detection and repair proteins in breast carcinomas. *Histopathology*, 2003. **43**(4): p. 347-53.
116. Cerosaletti, K. and P. Concannon, Independent roles for nibrin and Mre11-Rad50 in the activation and function of Atm. *J Biol Chem*, 2004. **279**(37): p. 38813-9.

117. Jongmans, W., et al., Nijmegen breakage syndrome cells fail to induce the p53-mediated DNA damage response following exposure to ionizing radiation. *Mol Cell Biol*, 1997. **17**(9): p. 5016-22.
118. Girard, P.M., et al., Radiosensitivity in Nijmegen Breakage Syndrome cells is attributable to a repair defect and not cell cycle checkpoint defects. *Cancer Res*, 2000. **60**(17): p. 4881-8.
119. Kang, J., R.T. Bronson, and Y. Xu, Targeted disruption of NBS1 reveals its roles in mouse development and DNA repair. *Embo J*, 2002. **21**(6): p. 1447-55.
120. Featherstone, C. and S.P. Jackson, DNA repair: the Nijmegen breakage syndrome protein. *Curr Biol*, 1998. **8**(17): p. R622-5.
121. Steffen, J., et al., Increased cancer risk of heterozygotes with NBS1 germline mutations in Poland. *Int J Cancer*, 2004. **111**(1): p. 67-71.
122. Seemanova, E., et al., [Increased risk of malignancies in heterozygotes in families of patients with Nijmegen breakage syndrome]. *Cas Lek Cesk*, 2006. **145**(2): p. 138-43.
123. Dumon-Jones, V., et al., Nbn heterozygosity renders mice susceptible to tumor formation and ionizing radiation-induced tumorigenesis. *Cancer Res*, 2003. **63**(21): p. 7263-9.
124. Stumm, M., et al., High frequency of spontaneous translocations revealed by FISH in cells from patients with the cancer-prone syndromes ataxia telangiectasia and Nijmegen breakage syndrome. *Cytogenet Cell Genet*, 2001. **92**(3-4): p. 186-91.
125. Seemanova, E., 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*, 1990. **238**(3): p. 321-4.
126. Stanulla, M., et al., No evidence for a major role of heterozygous deletion 657del5 within the NBS1 gene in the pathogenesis of non-Hodgkin's lymphoma of childhood and adolescence. *Br J Haematol*, 2000. **109**(1): p. 117-20.
127. Shimada, H., et al., First case of aplastic anemia in a Japanese child with a homozygous missense mutation in the NBS1 gene (I171V) associated with genomic instability. *Hum Genet*, 2004. **115**(5): p. 372-6.
128. Cerosaletti, K.M., et al., Mutations and molecular variants of the NBS1 gene in non-Hodgkin lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer*, 2002. **35**(3): p. 282-6.
129. Gorski, B., et al., Germline 657del5 mutation in the NBS1 gene in breast cancer patients. *Int J Cancer*, 2003. **106**(3): p. 379-81.
130. Buslov, K.G., et al., NBS1 657del5 mutation may contribute only to a limited fraction of breast cancer cases in Russia. *Int J Cancer*, 2005. **114**(4): p. 585-9.
131. Carlomagno, F., et al., Determination of the frequency of the common 657Del5 Nijmegen breakage syndrome mutation in the German population: no association with risk of breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, 1999. **25**(4): p. 393-5.
132. Cybulski, C., et al., NBS1 is a prostate cancer susceptibility gene. *Cancer Res*, 2004. **64**(4): p. 1215-9.
133. Steffen, J., et al., Increased risk of gastrointestinal lymphoma in carriers of the 657del5 NBS1 gene mutation. *Int J Cancer*, 2006. **119**(12): p. 2970-3.
134. Varon, R., et al., Mutations in the Nijmegen Breakage Syndrome gene (NBS1) in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Cancer Res*, 2001. **61**(9): p. 3570-2.
135. Roznowski, K.e.a., I171V germline mutation in the NBS1 gene significantly increases risk of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 2007.

136. Bogdanova, N., Nijmegen breakage syndrome mutations and risk of breast cancer. *Int J Cancer*, 2007. **122**: p. 802-806.
137. Steffen, J., Germline mutations 657del5 of the NBS1 gene contribute significantly to the incidence of breast cancer in central poland. *Int J Cancer*, 2006. **119**: p. 472-475.
138. Becker, E., et al., Detection of a tandem BRCT in Nbs1 and Xrs2 with functional implications in the DNA damage response. *Bioinformatics*, 2006. **22**(11): p. 1289-92.
139. Huyton, T., et al., The BRCA1 C-terminal domain: structure and function. *Mutat Res*, 2000. **460**(3-4): p. 319-32.
140. Mosor, M., et al., Association of the heterozygous germline I171V mutation of the NBS1 gene with childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 2006. **20**(8): p. 1454-6.
141. Ziolkowska, I., Increased risk of larynx cancer in heterozygous carriers of the I171V mutation of the NBS1 gene. *cancer science*, 2007. **98**(11): p. 1701-1705.
142. Nowak, J., et al., Heterozygous carriers of the I171V mutation of the NBS1 gene have a significantly increased risk of solid malignant tumours. *Eur J Cancer*, 2008. **44**(4): p. 627-30.
143. Bogdanova, N., NBS1 variant I171V and breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat*, 2007.
144. Durocher, D., et al., The FHA domain in DNA repair and checkpoint signaling. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2000. **65**: p. 423-31.
145. Durocher, D. and S.P. Jackson, The FHA domain. *FEBS Lett*, 2002. **513**(1): p. 58-66.
146. Debniak, T., et al., Germline 657del5 mutation in the NBS1 gene in patients with malignant melanoma of the skin. *Melanoma Res*, 2003. **13**(4): p. 365-70.
147. Zhang, L., Z. Zhang, and W. Yan, Single nucleotide polymorphisms for DNA repair genes in breast cancer patients. *Clin Chim Acta*, 2005. **359**(1-2): p. 150-5.
148. Meyer, P., et al., Molecular genetic analysis of NBS1 in German melanoma patients. *Melanoma Res.*, 2007. **17**(2): p.109-116.
149. Seemanova, E., et al., Mutations in tumor suppressor gene NBS1 in adult patients with malignancies. *Cas lek Cesk*, 2006. **145**(3): p. 201-203

## 9. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AA	Aplastische Anämie
ALL	Akute lymphatische Anämie
APC	Adenomatöse Polyposis des Colons
AT	ataxia telangiectasia
ATM	ataxia telangiectasia mutated
BASC	BRCA1-associated genome surveillance complex
BER	base excisions repair
BLM	Bloom Syndrom
BMI	body mass index
bp	base pair
BRCA1	breast cancer susceptibility gene
BRCA2	breast cancer susceptibility gene
BRCT	breast cancer carboxyterminal domain
C	Cytosin
CHK2	checkpoint 2
Cis	Carcinom in situ
cM	centi-Morgan
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DNA	desoxyribonucleic acid
DSB	Doppelstrangbruch
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid
ER	Estrogen receptor
F	Primerbezeichnung: Forward (vorwärts)
FHA	forkhead-associated domain
G	Guanin
G (in G0,G1,G2)	gap (Lücke)
GnRH	Gonadotropin releasing hormon
het.	Heterozygot
hMSH2	human mutS homolog-2

---

hMSH6	human mutS homolog-6
hom.	Homozygot
HR	Homologe Rekombination
Ig	Immunglobulin
IRS	Immunreaktiver Score
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LD	Linkage Disequilibrium
LOH	Loss of heterozygosity
MRE	Meiotic recombination
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
NBS	Nijmegen Breakage Syndrom
NF1	Neurofibromatose1
NHEJ	Non-Homologous End Joining
NOS	not otherwise specified
PCR	polymerase chain reaction
PgR	Progesteron receptor
R	Primerbezeichnung: Reverse (rückwärts)
RB	Retinoblastom
RDS	radioresistente DNA-Synthese
RNA	Ribonucleic Acid
RPA	replication protein A
T	Thymin
Taq-Polymerase	Thermus aquaticus-Polymerase
TBE	Tris-Borast-EDTA-Puffer
cTNM	klinische TNM-Klassifikation
pTNM	histopathologische TNM-Klassifikation
UV	Ultraviolett
V(D)J	variable (division) joining
WHO	World Health Organisation
WT	Wildtyp
XRCC1	X-ray repair cross-complementing group 1
XRCC2	X-ray repair cross-complementing group 2

## **10. Lebenslauf**

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

## 11. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. rer. nat. Karl Sperling für die Überlassung des Promotionsthemas und die freundliche Unterstützung während der Fertigstellung meiner Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Raymonda Varon, die maßgeblich die Versuchsdurchführung, Datenerhebung und -auswertung dieser Dissertation betreut hat. Sie zeigte uneingeschränkte Unterstützung und ständige Bereitschaft sämtliche mir aufkommende Fragen zu diskutieren.

Ein herzlicher Dank geht an alle Mitarbeiter des Instituts für Humangenetik der Charite, Campus Virchow-Klinikum, insbesondere an Emeli Bektas, Veronique Dutrannoy, Ralf Eckhardt, Katrin Janetzki und Mohsen Karbasiyan.

Alexander Volk möchte ich nicht nur für seine technische und fachliche Unterstützung während dieser Arbeit danken.

Weiter danke ich Herrn Dr. med. Jörg Pelz für seine Unterstützung bei der statistischen Auswertung meiner Arbeit.

Darüber hinaus gilt mein besonderer Dank meiner Familie und meinen Freunden.



---

### **Erklärung an Eides statt**

Ich, Frank Oliver Gerhard Henes, erkläre an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Mutationsanalyse im *NBS1*-Gen bei Patientinnen mit *BRCA1/2* negativem familiären und *BRCA1/2* negativem sporadischen Mammakarzinom“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe

Frank Oliver Henes