

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

DISSERTATION

Das Nijmegen Breakage Syndrom –
Häufigkeit und Tumorrisiko heterozygoter Individuen

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –
Universitätsmedizin Berlin

von

Martin Maurer

aus Münster

Gutachter: 1. Prof. Dr. K. Sperling
2. Prof. Dr. D. Schindler
3. Prof. Dr. P. M. Kroisel

Datum der Promotion: 22.06.2007

Meinen Eltern und Großeltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Nijmegen Breakage Syndrom – Klinisches Bild und Laborbefunde	3
1.1.1	Klinisches Erscheinungsbild	3
1.1.2	Laborbefunde und Immunologie	8
1.2	Zytogenetische Untersuchungen	9
1.3	Therapiestrategien und genetische Beratung	10
1.4	Einordnung des Nijmegen Breakage Syndroms in das vielfältige klinische Spektrum verschiedener Chromosomeninstabilitätssyndrome	12
1.5	Historischer Überblick	14
1.5.1	Die Beschreibung klinischer NBS-Fälle	14
1.5.2	Identifizierung des <i>NBS1</i> -Gens	16
1.6	Das <i>NBS1</i> -Gen und sein Genprodukt Nibrin	17
1.6.1	Das <i>NBS1</i> -Gen	17
1.6.2	Nibrin: struktureller Aufbau und Funktionen	20
1.7	Evaluation der Prädisposition heterozygoter NBS-Merkmalsträger für die Entwicklung maligner Erkrankungen	29
1.8	Frequenz der Mutation 657del5 in ausgewählten Populationen	31
1.9	Zielsetzung und Aufgabenstellung	32
2	Patienten und Methoden	34
2.1	Patienten und methodisches Vorgehen	34
2.1.1	Untersuchung deutscher Neugeborener auf Mutationen im <i>NBS1</i> -Gen	34
2.1.2	Untersuchung polnischer Tumorpatienten	34
2.2	Molekulargenetische Methoden	36
2.2.1	Geräte und Materialien	36
2.2.2	DNA-Amplifikation mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	38
2.2.3	Agarose-Gelelektrophorese	41
2.2.4	SSCP-Gelelektrophorese	43
2.2.5	DNA-Sequenzanalyse	46
2.2.6	Quantitative real-time PCR	48
2.2.7	Strategien zur Vermeidung von Kontaminationen der DNA-Proben	51

3	Ergebnisse	52
3.1	Frequenz heterozygoter Merkmalsträger innerhalb der deutschen Neugeborenenkollektive.....	52
3.1.1	PCR und SSCP-Analyse.....	53
3.1.2	Sequenzanalyse	57
3.2	Frequenz heterozygoter Merkmalsträger in einem Patientenkollektiv mit nachgewiesener Tumorerkrankung	61
3.3	Ergebnisse weiterführender Untersuchungen mit der Fluoreszenz-in-situ- Hybridisierung (FISH)	63
3.4	Quantitativer Vergleich des Anteils von Wildtyp- und deletierten <i>NBS1</i> -Allelen in Proben des peripheren Blutes und Tumorgewebeproben.....	67
4	Diskussion	71
4.1	Vergleich der Prävalenzrate heterozygoter Merkmalsträger der Mutationen 657del5 und R215W innerhalb der untersuchten deutschen Neugeborenenkollektive.....	71
4.2	Beurteilung der Häufigkeiten heterozygoter Mutationsträger unter den polnischen Tumorpatienten unter Berücksichtigung einer Kontrollgruppe	81
4.3	Vergleich der Anteile an Wildtyp- und 657del5-Allelen in Blutproben und Tumorgeweben.....	89
	Zusammenfassung.....	97
	Literaturverzeichnis.....	99
	Publikationen.....	115
	Danksagung.....	116
	Tabellarischer Lebenslauf.....	117

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Entwicklung des Kopfumfangs von NBS-Kindern	3
Abbildung 2:	Typisches kraniofaziales Erscheinungsbild eines NBS-Patienten.....	4
Abbildung 3:	18 Monate altes Mädchen mit einem Nijmegen Breakage Syndrom	4
Abbildung 4:	NBS-Patient mit „Café-au-lait“-Flecken	5
Abbildung 5:	NBS-Patient mit Polydaktylie.....	5
Abbildung 6:	Magnetresonanztomographie (MRT) des Schädels eines NBS-Patienten.....	8
Abbildung 7:	Das <i>NBS1</i> -Gen und das zugehörige exprimierte Protein Nibrin.....	21
Abbildung 8:	Funktionen des MRN-Komplexes und ATM im Rahmen der Reparatur von Doppelstrangbrüchen	24
Abbildung 9:	Wirkungen des MRN-Komplexes auf DNA-Doppelstrangbrüche und die Zellzyklus-Kontrolle.....	26
Abbildung 10:	Prinzip der Agarose-Gelelektrophorese.....	42
Abbildung 11:	Agarose-Gelelektrophorese	43
Abbildung 12:	Prinzip der SSCP-Gelelektrophorese.....	44
Abbildung 13:	Beispiel eines SSCP-Gelelektrophorese-Gels	45
Abbildung 14:	Prinzip der automatisierten DNA-Sequenzierung	47
Abbildung 15:	Beispiel einer DNA-Sequenz im Exon 6 des <i>NBS1</i> -Gens	48
Abbildung 16:	Beispiel eines Agarose-Gels mit Proben der Amplifikationsprodukte.....	53
Abbildung 17:	Auswertung der SSCP-Gele: Wildtyp-Probe.....	55
Abbildung 18:	Auswertung der SSCP-Gele: „slawische Mutation“ 657del5.....	55
Abbildung 19:	Auswertung der SSCP-Gele: weitere Mutation.....	55
Abbildung 20:	Strategie bei der Auswertung der SSCP-Gele	56
Abbildung 21:	Ergebnis der DNA-Sequenzierung: Wildtyp	57
Abbildung 22:	Ergebnis der DNA-Sequenzierung: heterozygote „slawische Mutation“ 657del5	58
Abbildung 23:	Ergebnis der DNA-Sequenzierung: homozygote Mutation 657del5.....	59
Abbildung 24:	Ergebnis der DNA-Sequenzierung: Punktmutation R215W	61
Abbildung 25:	Interphase-Zellkern mit 5 detektierbaren grün fluoreszierenden Signalen der für die <i>NBS1</i> -Genregion spezifischen BAC-Sonde BAC159I23.....	66
Abbildung 26:	Signal der BAC-Sonde BAC159I23.....	67
Abbildung 27:	Anteile der Wildtyp- und 657del5-Allel in Blut- und Tumor-DNA-Proben	

bei 4 Patienten.....	69
Abbildung 28: Anteile der Wildtyp- und 657del5-Allele in Blut- und Tumor-DNA-Proben bei 4 weiteren Patienten.....	70
Abbildung 29: Karte mit slawischen Ortsnamen in der Region Bamberg in Oberfranken	75
Abbildung 30: „Second-hit“-Theorie nach Knudson.....	91

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Maligne Erkrankungen bei 55 untersuchten Patienten mit dem Nijmegen Breakage Syndrom	6
Tabelle 2: Klinische Befunde bei 55 NBS-Patienten	7
Tabelle 3: Normale Allelvarianten des <i>NBS1</i> -Gens	17
Tabelle 4: Pathologische Allelvarianten des <i>NBS1</i> -Gens.....	18
Tabelle 5: Frequenzen heterozygoter Merkmalsträger der Mutation 657del5	32
Tabelle 6: 589 polnische Patienten und deren Tumorerkrankungen.....	35
Tabelle 7: Frequenz heterozygoter Merkmalsträger der Mutation 657del5 innerhalb der Neugeborenenkollektive aus den Studienzentren Berlin und Bayreuth.....	52
Tabelle 8: Frequenz heterozygoter Merkmalsträger der Mutation R215W innerhalb der Neugeborenenkollektive aus den Studienzentren Berlin und Bayreuth.....	53
Tabelle 9: Heterozygote Merkmalsträger der Mutation 657del5 im <i>NBS1</i> -Gen und deren bestätigte Tumorarten.....	62
Tabelle 10: Heterozygote Merkmalsträger der Mutation R215W im <i>NBS1</i> -Gen und deren bestätigte Tumorarten.....	63
Tabelle 11: Ergebnisse der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen an Tumorzellen von 8 Patienten	66
Tabelle 12: Prävalenzen heterozygoter 657del5-Mutationsträger: Ergebnisse verschiedener Screening- und Fall-Kontrollstudien.....	80
Tabelle 13: Häufigkeiten heterozygoter Mutationsträger unter den polnischen Tumorpatienten und innerhalb einer Kontrollgruppe.....	84
Tabelle 14: Beobachtete und erwartete Häufigkeiten heterozygoter Merkmalsträger der Mutation 657del5 im <i>NBS1</i> -Gen innerhalb der Patientengruppen mit unterschiedlichen Tumorerkrankungen.....	85
Tabelle 15: Beobachtete und erwartete Häufigkeiten heterozygoter Merkmalsträger der Mutation R215W im <i>NBS1</i> -Gen innerhalb der Patientengruppen mit unterschiedlichen Tumorerkrankungen.....	86
Tabelle 16: Gegenüberstellung der Wildtyp- und 657del5-Allelanteilsverhältnisse auf der Grundlage der RT-PCR und der FISH.....	94

Abkürzungsverzeichnis

ALL	Akute Lymphatische Leukämie
AS	Aminosäure
AT	Ataxia Teleangiectasia
ATM	AT-mutated
BAC	bacterial artificial chromosome
bp	Basenpaar
BS	Bloom-Syndrom
CEP	chromosome enumeration probe
cM	Centimorgan
CSR	class switch recombination
DSB	(DNA)-Doppelstrangbruch
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
FA	Fanconi-Anämie
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FHA	forkhead-associated
HR	homologous recombination
IVIG	intravenous immunoglobulin therapy
IRIF	ionizing radiation-induced foci
kbp	Kilobasenpaare
LOH	Loss of Heterozygosity
MRT	Magnetresonanztomographie
mV	Millivolt
NHEJ	non-homologous end joining
NBS	Nijmegen Breakage Syndrom
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PHA	Phytohaemagglutinin
RDS	radioresistant DNA synthesis
RT-PCR	real time Polymerase-Kettenreaktion
SMC	structure maintenance of chromosome
ssDNA	single-stranded DNA

SSCP single strand conformation polymorphism
TBE Tris-Borate EDTA (-Puffer)

Zusammenfassung

Das Nijmegen Breakage Syndrom (NBS, OMIM 251260) ist eine seltene autosomal-rezessive Krankheit aus der Gruppe der chromosomalen Instabilitätssyndrome. Das klinische Erscheinungsbild ist gekennzeichnet durch eine Mikrozephalie und einen Minderwuchs, ein „vogelkopfiges“ faziales Erscheinungsbild sowie eine Defizienz des humoralen und zellulären Immunsystems.

Krankheitsverursachend sind Mutationen im *NBS1*-Gen auf Chromosom 8q21, das für ein Protein aus 754 Aminosäuren, Nibrin genannt, kodiert. Über 90 % der Patienten sind homozygot für eine Deletion von 5 Basenpaaren, 657del5, im Exon 6. Hierbei handelt es sich um eine slawische Gründer-Mutation, der überwiegende Anteil Betroffener stammt daher aus Osteuropa. Nibrin ist Teil des MRE11/RAD50/Nibrin-(MRN)-Proteinkomplexes, der in die DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur, die Zellzykluskontrolle und die Aufrechterhaltung der Telomerstabilität einbezogen ist. NBS-Patienten weisen daher eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber ionisierender Strahlung und eine hohe Prädisposition für maligne Tumoren, insbesondere Lymphome, auf. Eine erhöhte Tumordisposition konnte auch für heterozygote Genträger nachgewiesen werden.

Gegenstand der Arbeit ist (1.) die Ermittlung der Prävalenz heterozygoter Genträger in zwei Gegenden Deutschlands mit hohem bzw. niedrigem Anteil slawischer Bevölkerung, (2.) die Ermittlung der Häufigkeit Heterozygoter unter Krebspatienten und (3.) die Bestimmung der *NBS1*-Genkonstitution in den Tumoren heterozygoter Individuen.

1. Patienten mit dem Nijmegen Breakage Syndrom finden sich in Deutschland gehäuft in Oberfranken und der Oberpfalz. Es wurde daher ein Kollektiv Neugeborener aus der Region Bayreuth in Oberfranken auf Mutationen im *NBS1*-Gen gescreent sowie als Kontrolle ein Kollektiv aus Berlin. Dabei konnten unter 1056 Neugeborenen aus dem Raum Bayreuth 6 heterozygote Träger der Mutation 657del5 (Frequenz 1:176) und 2 Individuen mit der Mutation R215W (Frequenz 1:528) identifiziert werden. Unter den 990 Neugeborenen aus Berlin fanden sich jeweils 1 heterozygoter Träger der Mutationen 657del5 und R215W (Frequenzen jeweils 1:990). Insgesamt konnte damit ein ausgeprägter Häufigkeitsunterschied Heterozygoter für die „slawische Mutation“ 657del5 in den beiden untersuchten deutschen Neugeborenenkollektiven festgestellt werden. Die hohe Frequenz dieser Mutation unter den Bayreuther Neugeborenen entsprach dabei dem hohen Bevölkerungsanteil slawischer Abstammung.

2. Um herauszufinden, ob heterozygote Träger von *NBS1*-Mutationen eine erhöhte Disposition für maligne Tumore aufweisen, wurden insgesamt 589 erwachsene polnische Tumorpatienten auf eine Heterozygotie für *NBS1*-Genmutationen im Exon 6 untersucht und mit einer Kontrollgruppe verglichen. Hierbei konnten 5 heterozygote Träger der Mutation 657del5 und 4 Heterozygote der Mutation R215 identifiziert werden. Es wurde ein signifikant erhöhtes Risiko heterozygoter 657del5-Genträger für maligne Melanome nachgewiesen. Zudem war die Anzahl heterozygoter Träger der Mutation R215W mit kolorektalem Karzinom und Hodgkin-Lymphom signifikant erhöht.

3. Um die Bedeutung der *NBS1*-Mutation 657del5 für die Carcinogenese zu untersuchen, wurden in Tumorgeweben 8 Heterozygoter die Anteile an Wildtyp- und 657del5-Allelen bestimmt. Das Vorliegen erhöhter 657del5-Allelanteile konnte durch die in der Mehrzahl der Tumoren nachgewiesenen Polysomien der Chromosomen 8 erklärt werden, die bevorzugt das 657del5-Allel tragen. Als Folge davon liegt ein höherer Anteil des verkürzten p70-Nibrin-Fragmentes vor, das zu einem funktionell eingeschränkten MRN(p70)-Proteinkomplex führt. Die betreffenden Zellen sollten eine erhöhte genomische Instabilität und damit eine höhere Wahrscheinlichkeit einer malignen Entartung aufweisen.

Publikationen

Steffen J, Varon R, Mosor M, Maneva G, Maurer M, Stumm M, Nowakowska D, Rubach M, Kosakowska E, Ruka W, Nowecki Z, Rutkowski P, Demkow T, Sadowska M, Bidzinski M, Gawrychowski K, Sperling K. Increased cancer risk of heterozygotes with NBS1 germline mutations in Poland. *Int J Cancer* 2004, 111:67-71

Danksagung

Herrn Prof. Dr. K. Sperling gilt mein herzlicher Dank für die Bereitstellung eines so interessanten Forschungsthemas und für seine stete Unterstützung und Förderung. Die hervorragende Ausstattung des Instituts und die Ermöglichung des Zugangs zu allen technischen Hilfsmitteln erleichterten die Entstehung dieser Arbeit maßgeblich. Seine Kommentare und Ratschläge bei der Erstellung und Überarbeitung des Manuskripts waren mir eine wertvolle Hilfe.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Raymonda Varon für ihre Betreuung bei der Durchführung der experimentellen Versuchsteils und für ihre Hinweise bei der Verfassung des vorliegenden Textes. Ihre ausführliche Hilfe bei der Einarbeitung in die zahlreichen molekulargenetischen Methodiken und viele anregende Diskussionen haben ganz entscheidend zum Gelingen dieser Dissertationsarbeit beigetragen.

Mein Dank gilt außerdem dem gesamten Team der Arbeitsgruppe für molekulargenetische Diagnostik und molekulare Genanalyse, insbesondere Frau Catrin Janetzki und Frau Véronique Dutrannoy für ihre praktische Anleitung während des experimentellen Arbeitsteils. Darüber hinaus danke ich Herrn Mohsen Karbasiyan für seine Unterstützung bei der DNA-Sequenzanalyse sowie Herrn Dr. Markus Stumm für die freundliche Genehmigung der Darstellung der FISH-Daten und seine hilfreichen Kommentare bei deren Interpretation.

Und natürlich möchte ich meiner Familie danken, vor allem meinen Eltern und Großeltern, die mir das Studium ermöglicht und mich immer unterstützt haben. Thank you, folks!

Tabellarischer Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

Erklärung

„Ich, Martin Maurer, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Das Nijmegen Breakage Syndrom – Häufigkeit und Tumorrisiko heterozygoter Individuen“ 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.“

Berlin, den 15. Juli 2006

