

## 1 Einleitung

Das Nijmegen Breakage Syndrom (NBS, OMIM 251260) ist eine seltene autosomal-rezessive Erkrankung, die zur Gruppe der chromosomalen Instabilitätssyndrome gehört. Das klinische Erscheinungsbild betroffener Patienten geht mit einer Vielzahl unterschiedlicher Symptome einher, hierzu zählen eine Mikrozephalie bei häufig gleichzeitig vorliegender mentaler Retardierung, ein Minderwuchs, eine charakteristische Gesichtsmorphologie, eine Immundefizienz, eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber ionisierender Strahlung sowie eine Prädisposition für maligne Erkrankungen.

Krankheitsverursachend sind Mutationen im *NBS1*-Gen, welches auf dem menschlichen Chromosom 8q21 lokalisiert ist und für ein spezifisches Protein, Nibrin genannt, kodiert. Dieses Protein nimmt verschiedene Funktionen im Rahmen der zellulären DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur und der Kontrolle des Zellzyklus wahr. Über 90 % der bisher mit dem Nijmegen Breakage Syndrom diagnostizierten Patienten sind homozygot für eine einzelne Gründer-Mutation im Exon 6 des *NBS1*-Gens. Hierbei handelt es sich um eine Deletion von 5 Basenpaaren, die auch als „slawische Mutation“ 657del5 bezeichnet wird, da der überwiegende Anteil der vom NBS betroffenen Individuen eine slawische Abstammung aufweist. Insbesondere konnte das Nijmegen Breakage Syndrom bei Kindern und Jugendlichen verschiedener osteuropäischer Länder diagnostiziert werden, hierunter vor allem in Polen und der Tschechischen Republik. Die Deletion von 5 Basenpaaren bewirkt, dass anstelle des intakten Nibrins nur verkürzte Proteinfragmente gebildet werden können, woraus weitreichende Funktionsdefizite bei der DNA-Doppelstrangbruchreparatur und der Zellzykluskontrolle resultieren. Als Folge weisen am Nijmegen Breakage Syndrom erkrankte Patienten aufgrund einer stark erhöhten Sensitivität gegenüber ionisierender Strahlung eine hohe Prädisposition für die Entwicklung maligner Tumoren auf, insbesondere für maligne Lymphome, aber auch für Gliome, Medulloblastome und Rhabdomyosarkome.

Bevor eine genaue Lokalisierung des *NBS1*-Gens und eine Charakterisierung der darin enthaltenen krankheitsverursachenden Mutationen gelang, war das Nijmegen Breakage Syndrom zunächst als eine Variante der Ataxia Teleangiectasia, einem weiteren Syndrom aus der Gruppe der chromosomalen Instabilitätssyndrome mit einer Assoziation zu DNA-Reparaturdefekten, angesehen worden. Da bei lediglich heterozygoten Merkmalsträgern der die AT verursachenden Mutation eine erhöhte Inzidenz maligner Erkrankungen festgestellt werden konnte, wurde sodann auch die Tumorinzidenz in den Familien von NBS-Patienten untersucht. Hierbei zeigte sich, dass

auch die heterozygoten Merkmalsträger der pathologischen 657del5-Mutation im *NBS1*-Gen, die sich klinisch zunächst ohne eine wesentliche Beeinträchtigung darstellten, eine erhöhte Prädisposition für die Entwicklung maligner Tumoren verschiedener Entitäten aufwiesen.

Auf der Grundlage dieser Beobachtung wurden im Folgenden zunächst Querschnittsstudien durchgeführt, die die Frequenz heterozygoter Merkmalsträger von Mutationen im *NBS1*-Gen in verschiedenen europäischen Ländern evaluieren sollten. Im Rahmen dieser Studien konnten zum Teil sehr hohe und zwischen einzelnen Ländern erheblich differierende Prävalenzen ermittelt werden. Für die deutsche Bevölkerung liegen bisher nur wenige Daten bezüglich der Frequenzen heterozygoter Merkmalsträger von *NBS1*-Genmutationen vor. Dies ist insofern als kritisch zu sehen, als dass seit dem Ende der 1990er Jahre eine Häufung zytogenetisch und später auch molekulargenetisch gesicherter NBS-Fälle insbesondere in süddeutschen Regionen, in Oberfranken und der Oberpfalz, festgestellt worden war. Somit ist auch in dieser Region von einer erhöhten Anzahl heterozygoter Merkmalsträger von *NBS1*-Genmutationen auszugehen, die einer möglichen erhöhten Prädisposition der Entwicklung von Tumorerkrankungen ausgesetzt sind.

Im Folgenden wird nach einer Darstellung der klinischen Aspekte des Nijmegen Breakage Syndroms ein kurzer historischer Überblick über die Beschreibung erster klinischer Fälle sowie über die Identifizierung des *NBS1*-Gens und verschiedener krankheitsverursachender Mutationen gegeben. Sodann werden die vielfältigen Funktionen des *NBS1*-Genprodukts Nibrin erläutert. Auf den bisherigen Forschungsstand bei der Bestimmung der Häufigkeiten heterozygoter Merkmalsträger verschiedener *NBS1*-Genmutationen und der Evaluation einer Prädisposition dieser Individuen für die Entwicklung unterschiedlicher maligner Erkrankungen wird nachfolgend eingegangen. Hieraus werden schließlich die Zielsetzung und Aufgabenstellung dieser Arbeit abgeleitet.

## 1.1 Das Nijmegen Breakage Syndrom – Klinisches Bild und Laborbefunde

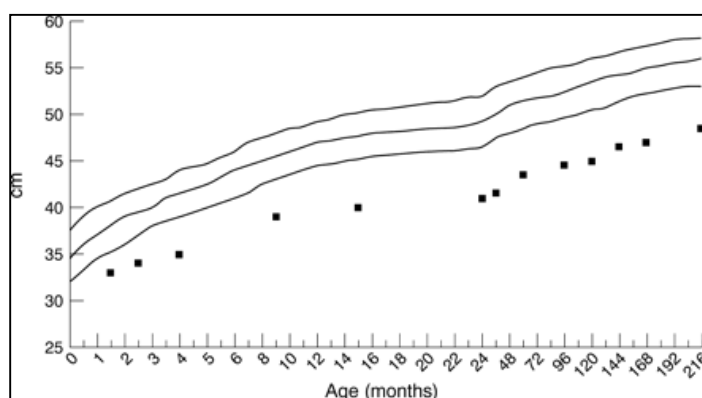
### 1.1.1 Klinisches Erscheinungsbild

#### Wachstum und Entwicklung

Alle bisher mit dem Nijmegen Breakage Syndrom diagnostizierten Patienten weisen eine Mikrocephalie auf, d. h., der Kopfumfang und das innen liegende Schädelvolumen sind verringert. Der messbare Kopfumfang liegt dabei im Vergleich zu altersentsprechenden Normwerten unterhalb der 3. Perzentile (siehe Abbildung 1). In etwa 75 % der Fälle liegt die Mikrocephalie bereits bei der Geburt vor, bei allen anderen NBS-Patienten wird diese dann im Laufe der ersten Lebensmonate klinisch auffällig (The International Nijmegen Breakage Syndrome Study Group, Hiel et al. 2000, Seeman et al. 2004).

Fast alle vom NBS betroffenen Kinder zeigen in ihrer körperlichen Entwicklung eine Wachstumsverzögerung. Durchschnittlich entwickelt sich ihre Körpergröße dabei auf den auf eine Normalpopulation bezogenen Perzentilkurven entlang der 10. Perzentile. Hierbei verhält sich die Entwicklung des Körpergewichts proportional zu derjenigen der Körpergröße (Chrzanowska et al. 1995).

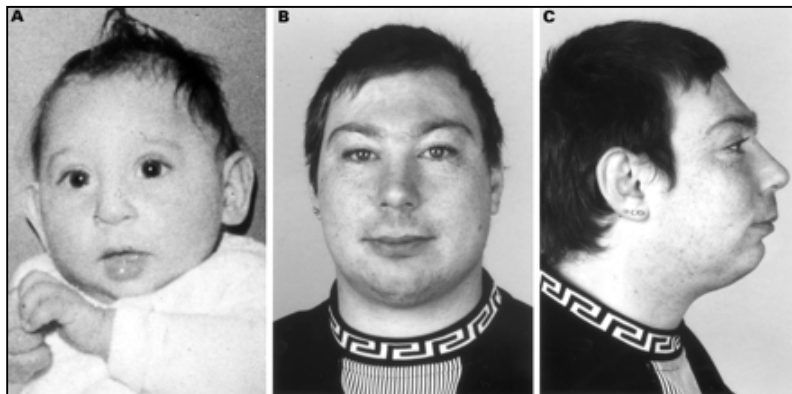
Der mentale Entwicklungsprozess der Kinder ist in unterschiedlichem Ausmaß betroffen: Dieser ist bei etwa 40 % der Kinder normal, ca. 50 % der Kinder weisen eine leichte Retardierung auf, die verbleibenden 10 % sind mittelgradig retardiert. Hierbei weisen fast alle Patienten während ihrer Kindheit IQ-Werte innerhalb eines Normalintervalls auf, eine mentale Retardierung wird dann oftmals erst im Laufe der späteren Entwicklung, meist im Einschulungsalter, spätestens jedoch mit dem Einsetzen der Pubertät, feststellbar. Schwerste mentale Beeinträchtigungen konnten bisher nicht beobachtet werden (Chrzanowska et al. 1995, Hiel et al. 2000).



**Abbildung 1:** Entwicklung des Kopfumfangs der vom Nijmegen Breakage Syndrom betroffenen Kinder während des Wachstumsprozesses (aus: The International Nijmegen Breakage Syndrome Study Group, Hiel et al. 2000).

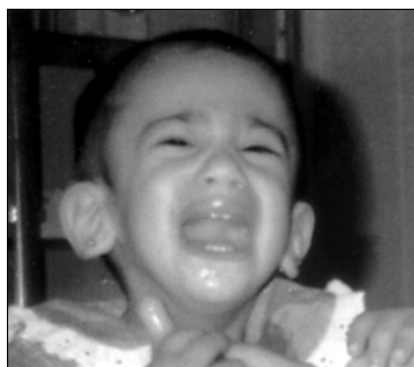
## Kraniofaziales Erscheinungsbild

Neben der beschriebenen Mikrozephalie weisen alle NBS-Patienten typische Merkmale in ihrem kraniofazialen Erscheinungsbild auf, von denen viele bereits unmittelbar nach der Geburt sichtbar sind und deren Ausprägungen mit steigendem Lebensalter zunehmend deutlich hervortreten (Seemanova et al. 1985, Chrzanowska et al. 1995). Das Erscheinungsbild zeichnet sich insbesondere aus durch ein prominentes Mittelgesicht mit langer Nase und langem Philtrum, einer Mikrognathie, Retrognathie oder Agnathie und zurücktretender Stirn sowie nach lateral oben weisenden Lidspalten, teilweise bei gleichzeitig bestehendem Epikanthus und einem Hypertelorismus. Diese Gesichtsmorphologie wurde als „vogelkopffartig“ beschrieben (Wegner et al. 1988, Shiloh 1997). Darüber hinaus konnten bei einigen Kindern übermäßig groß entwickelte, tief sitzende Ohren mit z. T. dysplastisch entwickelten Ohrmuscheln beobachtet werden (siehe Abbildung 2 und Abbildung 3).



**Abbildung 2:** Typisches kraniofaziales Erscheinungsbild eines NBS-Patienten: Auffallend ist insbesondere das prominente Mittelgesicht mit langer Nase und langem Philtrum sowie eine Retrognathie. Bild des Patienten

im Kindesalter (A), später mit den deutlicher hervortretenden Merkmalen im Erwachsenenalter (B und C; aus: The International Nijmegen Breakage Syndrome Study Group, Hiel et al. 2000).



**Abbildung 3:** 18 Monate altes Mädchen mit einem Nijmegen Breakage Syndrom. Man beachte die großen, tief stehenden Ohren mit dysplastischen Ohrmuscheln (aus: Maraschio et al. 2001).

## Haut- und Haarmanifestationen

Etwa die Hälfte aller Patienten weist Veränderungen an der Haut und den Haaren auf. Hierbei sind insbesondere Pigmentstörungen wie „Café au lait“-Flecken (meist 3-5 Stück mit irregulärer Form und Größe) oder eine Vitiligo diagnostizierbar. Darüber hinaus findet sich bei vielen Patienten eine erhöhte Sensitivität gegenüber Sonnenlicht, vor allem der Haut an den Augenlidern (Seemanova et al. 1985, Chrzanowska et al. 1995). Neben einer möglichen exzessiven Sommersprossenbildung wurden gelegentlich auch Teleangiektasien beobachtet (Barbi et al. 1991, Chrzanowska et al. 1995, Hiel et al. 2000). Ein Teil der betroffenen Kinder weist dünnes, brüchiges Haar auf, das bereits beim Erreichen der Pubertät beginnt grau zu werden.



**Abbildung 4:** NBS-Patient mit „Café-au-lait“-Flecken

(Chrzanowska KH: <http://www.emedicine.com/derm/topic725.htm>).

## Kongenitale Fehlbildungen

Die am häufigsten zu diagnostizierenden kongenitalen Fehlbildungen sind Klinodaktylien oder Syndaktylien, die in etwa 50 % der Fälle festgestellt werden konnten (Hiel et al. 2000, siehe Abbildung 5). Darüber hinaus, jedoch wesentlich seltener, konnten angeborene Fehlbildungen wie Analstenosen oder -atresien (Seemanova et al. 1985, Tekin et al. 2002) und auch Fehlbildungen des Harntraktes beobachtet werden, welche mit einer Hydronephrose oder einem Harnreflux (Taalman et al. 1989) einhergehen. Auch ovarielle Dysgenesien, Hypospadien (Green et al. 1995) und Hüft dysplasien wurden diagnostiziert. Ultraschalluntersuchungen ließen das Vorliegen von Polysplenien in etwa 20 % der Fälle erkennen (Chrzanowska et al. 1995).



**Abbildung 5:** NBS-Patient mit Polydaktylie und partieller Nichttrennung der Daumens der linken Hand (Chrzanowska KH: <http://www.emedicine.com/derm/topic725.htm>).

## Infektionen und Malignome

Fast alle vom Nijmegen Breakage Syndrom betroffenen Kinder leiden unter schwerwiegenden rezidivierenden Infektionen des Respirationstraktes (van der Burgt et al. 1996). Hierbei handelt es sich meist um ambulant erworbene Pneumonien, Bronchitiden und Sinusitiden, die oftmals auch unter einer konsequenten antibiotischen Therapie nur schwer beherrschbar sind und bereits im Kindesalter eine häufige Todesursache bei NBS-Patienten darstellen. Als Folge wiederkehrender Infektionen können großvolumige Bronchiektasien entstehen, die mit einer zunehmenden respiratorischen Insuffizienz einhergehen. Darüber hinaus wurden rezidivierende Infektionen der Harnwege in bis zu 15 % der Fälle beobachtet (van der Burgt et al. 1996).

Malignome stellen unter Patienten mit dem Nijmegen Breakage Syndrom die häufigste Todesursache dar. Es ist davon auszugehen, dass sowohl das Immundefizit als auch die Chromosomeninstabilität der NBS-Patienten für die Malignomentstehung prädisponieren (van der Burgt et al. 1996). Nach Wegner et al. (1999) wurden bei 25 der bis zu diesem Zeitpunkt bekannten 70 NBS-Patienten (35 %) Malignome festgestellt. 22 dieser 25 Malignome waren Lymphome, wobei diese bei insgesamt 19 der betroffenen Patienten bereits vor dem 15. Lebensjahr (im Mittel um das 9. Lebensjahr) auftraten. Neun dieser Lymphome waren B-Zell-Lymphome, in einem Fall handelte es sich um ein T-Zell-Lymphom (Michallet et al. 2003). Auch mehrere Fälle akuter lymphatischer Leukämien wurden dokumentiert (Wegner et al. 1999). Bei einigen Kindern entwickelten sich solide Tumoren wie Medulloblastome, Gliome oder Rhabdomyosarkome (van der Burgt et al. 1996, Hiel et al. 2001, Diestel et al. 2003, Bakhshi et al. 2003, Meyer et al. 2004, vgl. auch Tabelle 1).

<b>Maligne Tumoren bei 55 Patienten mit dem Nijmegen Breakage Syndrom</b>	
<b>Tumorart</b>	<b>Anzahl der von einem Tumor betroffenen NBS-Patienten unter den 55 untersuchten NBS-Patienten</b>
<b>Malignes Lymphom</b>	16/55
<b>Leukämien</b>	1/55
<b>Lymphoblastisches Lymphom</b>	2/55
<b>Medulloblastom</b>	1/55
<b>Rhabdomyosarkom</b>	1/55
<b>Gliom</b>	1/55

**Tabelle 1:** Maligne Erkrankungen bei 55 untersuchten Patienten mit dem Nijmegen Breakage Syndrom (aus: The International Nijmegen Breakage Syndrome Study Group, Hiel et al. 2000).

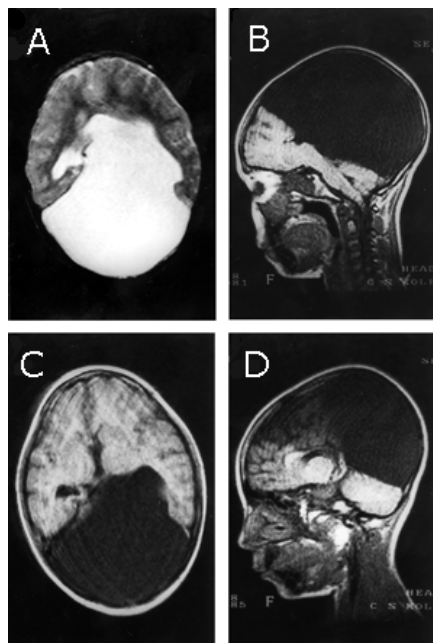
<b>Übersicht der klinischen Merkmale von Patienten mit dem Nijmegen Breakage Syndrom</b>	
<b>Merkmal</b>	<b>Anzahl der das Merkmal aufweisenden Patienten / Anzahl der Patienten, bei denen dieses Merkmal Bestandteil der klinischen Untersuchung war</b>
<i>Wachstum und Entwicklung</i>	
<b>Mikrozephalie</b>	55/55
<b>Wachstumsverzögerung</b>	55/55
<i>kraniofaziales Erscheinungsbild</i>	
<b>prominentes Mittelgesicht mit langer Nase und langem Philtrum</b>	47/47
<b>Mikro-, Retro- oder Agnathie</b>	47/47
<b>Epikanthus</b>	36/51
<b>dünnes, brüchiges Haar</b>	26/35
<b>große Ohren</b>	24/29
<b>subtile sklerale Teleangiektasien</b>	8/25
<i>Intelligenz</i>	
<b>normale Intelligenz</b>	22/55
<b>grenzwertig-normale Intelligenz bis milde Retardierung</b>	28/55
<b>mittlere Retardierung</b>	5/55
<i>Hautmanifestationen</i>	
<b>„Café-au-lait“-Flecken</b>	18/21
<b>Vitiligo-Flecken</b>	14/21
<b>hohe Sensitivität der Haut der Augenlider gegen- über Sonnenlicht</b>	10/19
<b>dermale Teleangiektasien</b>	3/32

**Tabelle 2:** Zusammenfassung der erhobenen klinischen Befunde und deren Häufigkeit bei 55 vom Nijmegen Breakage Syndrom betroffenen Patienten (aus: The International Nijmegen Breakage Syndrome Study Group, Hiel et al. 2000).

### **Bildgebende diagnostische Verfahren und Obduktionsbefunde**

Aufgrund der hohen Sensibilität der Zellen von NBS-Patienten gegenüber ionisierender Strahlung sollten nur solche bildgebenden diagnostischen Verfahren zum Einsatz kommen, die ohne Röntgenstrahlung auskommen. Die Magnetresonanztomographie (MRT) stellt somit das Mittel der Wahl dar, falls eine diagnostische Bildgebung notwendig ist. Bisher wurden bildgebende

Untersuchungen vor allem der Hirnsubstanz von NBS-Patienten durchgeführt. Bei der Untersuchung an 10 NBS-Patienten konnte die bereits morphologisch sichtbare Mikrozephalie weiter differenziert werden. Bei allen Patienten zeigte sich eine insbesondere frontal betonte Mikrozephalie, die mit einer deutlichen Volumenreduzierung des Frontalhirns einherging. 4 der 10 Patienten wiesen eine Agenesie des posterioren Anteils des Corpus callosum und eine Dilatation der Temporalhörner der Seitenventrikel auf, zwei Patienten zeigten große Zysten in ihren parietalen Hirnloben. Nebenbefundlich ließ sich bei allen untersuchten Patienten eine chronische Sinusitis feststellen (Bekiesinska-Figatowska et al. 2000).



**Abbildung 6:** Magnetresonanztomographie (MRT) des Schädels eines Patienten mit dem Nijmegen Breakage Syndrom. A: große Zyste im posterioren Gehirnanteil; B: unterentwickelte Hirnloben okzipital und parietal, ansonsten weitgehend normal entwickeltes Kleinhirn, mäßige Kompression der Fossa posterior; C: reduziertes Volumen der Frontallappen; D: partieller Defekt des Corpus callosum, Sinusitis (Chrzanowska et al. 2001).

Über eine ausführliche Autopsie eines im Alter von vier Jahren verstorbenen NBS-Patienten berichteten van de Kaa et al. (1994). Auffällig war vor allem ein sehr niedriges Hirngewicht von circa 500 Gramm (normal etwa 1200 Gramm in diesem Alter), wobei das Zerebellum eine normale Größe und gyrale Struktur aufwies. Der laterale und dritte Ventrikel stellte sich aufgrund einer Aquäduktstenose massiv erweitert dar. Der Thymus war insgesamt sehr klein und dysplastisch.

### 1.1.2 Laborbefunde und Immunologie

Labormedizinisch hatte es sich als auffällig erwiesen, dass alle von dem Nijmegen Breakage Syndrom betroffenen Patienten, bei denen umfangreiche Laboruntersuchungen vorgenommen



wurden, normale Spiegel an Alphafetoprotein zeigten. Hierin unterscheiden sie sich von Patienten mit einer Ataxia Teleangiectasia, bei denen durchweg erhöhte Alphafetoprotein-Spiegel zu messen sind (van der Burgt et al. 1996, Kleier et al. 2000).

Das Immundefizit von NBS-Patienten zeigt eine z. T. erhebliche Ausprägung und betrifft sowohl das humorale als auch das zelluläre Immunsystem. Die Störung des humoralen Systems ist charakterisiert durch ein Defizit an Immunglobulinen, insbesondere ein Mangel an Immunglobulin A oder Immunglobulin G (hierbei weisen vor allem die Subklassen IgG2 und IgG4 niedrige Spiegel auf). Eine Agammaglobulinämie konnte bei 16 von 48 untersuchten Patienten festgestellt werden (Hiel et al. 2000). Ein Mangel an humoralem IgM wurde bisher nur selten beobachtet. Lediglich eine Minderheit der Patienten, etwa 10 %, wiesen einen normalen Immunglobulin-Status auf (Weemaes et al. 1994, Gregorek et al. 2002).

Störungen der zellulären Immunität stellen sich klinisch in Form einer milden bis mittelschweren Lymphopenie dar. Bei fast allen Patienten sind verminderte T-Lymphozyten-Zahlen im peripheren Blut nachweisbar, insbesondere ist dabei die Anzahl an CD3<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen erniedrigt. Da die Anzahl an CD8<sup>+</sup> Zellen in den meisten Fällen im Normbereich liegt, ergibt sich in einer Vielzahl der Fälle ein erniedrigter CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> - Quotient. Daneben ist auch die Funktion der T-Helferzellen beeinträchtigt, was in Form einer Störung der Lymphokinproduktion und der zytotoxischen Effektormechanismen deutlich werden kann. Die Produktion spezifischer Antikörper zur Infektabwehr zeigt sich in vielen Fällen als nur unzureichend ausgeprägt (Weemaes et al. 1991).

## 1.2 Zytogenetische Untersuchungen

Chromosomenanalysen zur Bestimmung des konstitutionellen Karyotyps werden in der Regel an durch Phytohaemagglutinin (PHA) zur Mitose stimulierten T-Lymphozyten des peripheren Blutes vorgenommen. Lymphozyten von NBS-Patienten zeigen üblicherweise einen normalen Karyotyp (46,XX oder 46,XY). Da die bei NBS-Patienten entnommenen T-Lymphozyten während ihrer Kultivierung in vielen Fällen eine nur niedrige proliferative Rate aufweisen, ist die zytogenetische Analyse oftmals erschwert (van der Burgt et al. 1996). Bei allen untersuchten NBS-Patienten konnten spontane chromosomale Aberrationen in 10 bis 45 % der in der Metaphase untersuchten T-Lymphozyten nachgewiesen werden (Taalman et al. 1983 und 1989). Die meisten chromosomalen Aberrationen betreffen dabei die Chromosomen 7 und 14 an den Banden 7p13, 7q35, 14q11 und 14q32. Die Inversion inv(7)(p13q35) stellt die am häufigsten zu

beobachtende Aberration in kultivierten Zellen von NBS-Patienten dar. Daneben existieren zahlreiche verschiedene Translokationen, z. B.  $t(7;14)(p13;q11)$ ,  $t(7;14)(q35;q11)$ ,  $t(7;7)(p13;q35)$  und  $t(14;14)(q11;q32)$  (Conley et al. 1986, Taalman et al. 1989, Barbi et al. 1991, Stoppa-Lyonet et al. 1992).

Damit sind dieselben Genloci betroffen, an denen zuvor in Zellen von Ataxia Teleangiectasia-Patienten häufige Translokationen beobachtet worden waren (Aurias et al. 1980, Jaspers et al. 1982a, 1982b, 1985, 1988a und 1988b, Weemaes et al. 1994). Da es sich hierbei um Genkomplexe handelt, die für die schwere Kette der Immunglobuline kodieren und um Gene der T-Zellrezeptoren, die bei der Reifung der Lymphozyten charakteristische Umbauten auf der DNA-Ebene erfahren, wird eine Beeinträchtigung des Immunsystems von AT- und NBS-Patienten deutlich. Neben der tatsächlich nachweisbaren Immundefizienz ist unter den Patienten zudem eine erhöhte Tumorzinzidenz zu beobachten, die überwiegend das lymphatische System betrifft.

### 1.3 Therapiestrategien und genetische Beratung

Für das Nijmegen Breakage Syndrom existiert bisher keine ursächliche Therapie. Die Behandlung der Patienten konzentriert sich vielmehr einerseits auf eine prophylaktische und symptomatische Therapie der rezidivierenden Infektionserkrankungen, andererseits erfolgt eine engmaschige Beobachtung zur Früherkennung maligner Folgeerkrankungen.

Auftretende Infektionen müssen einer raschen und adäquaten Behandlung zugeführt werden. Die Frequenz bakterieller Infektionen kann zudem durch eine antiinfektiöse prophylaktische Dauertherapie (z. B. mit Cotrimoxazol), insbesondere bei wiederholten Infektionen der Harnwege, entscheidend gesenkt werden. Liegt ein Immundefizit in Form einer selektiven Hypogammaglobulinämie oder einer Agammaglobulinämie vor, so hat sich in Abstimmung mit dessen Ausprägung eine regelmäßige intravenöse Gabe spezifischer Immunglobuline (IVIG = engl. intravenous immunoglobulin therapy) bewährt. Auch erste Erfahrungen zur Behandlung des Immundefizits durch eine Knochenmarkstransplantation wurden beschrieben (New et al. 2005).

Bei dem engmaschig durchzuführenden Tumorscreening sollte malignen hämatologischen Erkrankungen eine besondere Aufmerksamkeit zu Teil werden, da diese insgesamt 85-90 % aller bei NBS-Patienten vorkommenden Malignome ausmachen (Wegner et al. 1999, Seidemann et al. 2000). Ist ein manifester Tumor nachweisbar, so stellt sich dessen Behandlung oftmals als schwierig dar, da konventionelle Dosierungen einer Chemotherapie zur Malignombehandlung

schwere toxische Komplikationen wie z. B. eine hämorrhagische Hyperemesis auslösen und somit letal sein können (Bakhshi et al. 2003, Distel et al. 2003). Eine Reduzierung der Dosierung unter Berücksichtigung der individuellen Verträglichkeit ist somit notwendig. Darüber hinaus ist zu bedenken, dass eine Chemotherapie zur Behandlung eines Ersttumors wegen der erhöhten Sensitivität der NBS-Zellen die Entstehung sekundärer Tumoren begünstigen kann. Solche Zweittumoren können wegen der stark erhöhten Radiosensitivität der Zellen von NBS-Patienten auch durch eine Strahlentherapie induziert werden. Auf diese muss jedoch bei der Behandlung des Ersttumors in den meisten Fällen verzichtet werden, da im Bereich des bestrahlten Hautareals mit schwerwiegenden Nekrosen zu rechnen ist.

Problematisch ist in diesem Zusammenhang vor allem, dass die bei NBS-Patienten häufigen malignen Lymphome schon im Kleinkindalter auftreten – oftmals innerhalb der ersten drei Lebensjahre – und sich damit als das erste Symptom eines bis dahin noch nicht diagnostizierten Nijmegen Breakage Syndroms darstellen können. Aus diesem Grunde ist die frühzeitige Diagnose des NBS vor dem Beginn einer Therapie mit einem konventionellen Therapieprotokoll von eminenter Bedeutung, um eine adäquat modifizierte Tumorbehandlung zu gewährleisten. So sollte vor dem Beginn einer Radiochemotherapie bei an einem Lymphom erkrankten Kindern, die jünger als drei Jahre sind, immer auch das mögliche Vorhandensein eines Nijmegen Breakage Syndroms in Betracht gezogen werden (Bakhshi et al. 2003, Distel et al. 2003, Meyer et al. 2004). Aufgrund der erhöhten Chromosomeninstabilität ist bei NBS-Patienten ergänzend eine dem Körpergewicht angepasste Gabe von Vitamin E und Folsäure zu empfehlen.

Insgesamt ist bei NBS-Patienten wegen des im Vergleich zur Normalbevölkerung stark erhöhten Malignomrisikos von einer verminderten Lebenserwartung auszugehen.

Da das Nijmegen Breakage Syndrom eine autosomal-rezessive Erkrankung ist, sind die Eltern eines betroffenen Kindes obligat heterozygot für eine entsprechende Mutation im *NBS1*-Gen, tragen also in jeweils einem ihrer *NBS1*-Gene eine krankheitsverursachende Mutation. Heterozygote Merkmalsträger sind klinisch weitgehend asymptomatisch, jedoch wurde vor allem bei den für die „slawische Mutation“ 657del5 heterozygoten Individuen ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung maligner Erkrankungen beschrieben (Seemanova 1990, Wegner et al. 1999).

Nachkommen von zwei heterozygoten Eltern sind in 50 % der Fälle asymptomatische heterozygote Genträger, tragen zu 25 % keine Mutation, sind jedoch in 25 % der Fälle homozygot betroffen. Neben einer genetischen Beratung vor dem Eintreten einer Schwangerschaft ist auch eine pränatale Diagnostik im Rahmen von Schwangerschaften möglich, bei denen ein erhöhtes Risiko

für das Auftreten des Nijmegen Breakage Syndroms besteht, beispielsweise wenn beide Eltern nachweislich heterozygote Merkmalsträger sind. Das benötigte Untersuchungsmaterial kann hierbei zwischen der 10. bis 12. Schwangerschaftswoche durch eine Chorionzottenbiopsie oder in der 15. bis 18. Woche durch eine Amniozentese gewonnen werden.

#### **1.4 Einordnung des Nijmegen Breakage Syndroms in das vielfältige klinische Spektrum verschiedener Chromosomeninstabilitätssyndrome**

Eine Reihe autosomal-rezessiv vererbter Krankheiten geht mit Defekten in den DNA-Reparaturmechanismen einher. Zytogenetisch kann bei allen diesen Krankheitsbildern eine erhöhte Rate an Chromosomenbrüchen beobachtet werden, die entweder spontan auftreten oder im Laborversuch an Gewebekulturen durch die Behandlung mit mutagenen Agenzien oder ionisierender Strahlung induziert werden können. Zur Gruppe dieser Chromosomeninstabilitätssyndrome gehören neben dem Nijmegen Breakage Syndrom und der Ataxia Teleangiectasia auch die Fanconi-Anämie und das Bloom-Syndrom. Im Rahmen einer erstmaligen klinischen Diagnostik eines möglichen neuen NBS-Falls sollten differenzialdiagnostisch auch alle anderen Chromosomeninstabilitätssyndrome berücksichtigt werden.

Die *Ataxia Teleangiectasia* (AT, syn. Louis-Bar-Syndrom) ist eine relativ seltene Erkrankung mit einer Inzidenz von etwa einem Krankheitsfall unter 40.000 Neugeborenen. Sie ist charakterisiert durch okulokutane Teleangiektasien, eine zerebelläre Ataxie und eine Schwächung der immunologischen Abwehr mit erhöhter Anfälligkeit für Infektionen, insbesondere bronchopulmonaler Infektionen. Diagnostisch hinweisend ist die regelmäßig vorhandene Konzentrationserhöhung an Alphafetoprotein.

Eine Mutation im *AT*-Gen, ATM (= AT mutated) genannt, wurde für diese Multisystemerkrankung verantwortlich gemacht. Das *AT*-Gen ist auf dem Chromosom 11q23 lokalisiert und dient als Regulator des Zellzyklus. Zellen, die mutierte *AT*-Gene enthalten, weisen mehr als 40fach häufiger Chromosomenbrüche und Translokationen an den Chromosomen 7 und 14 auf (Houldsworth et al. 1980, Aurias et al. 1980, Jaspers et al. 1982a, 1982b, 1985, 1988a und 1988b, Weemaes et al. 1994). Damit sind vor allem solche Genregionen betroffen, die von entscheidender Bedeutung für die Entwicklung des Immunsystems sind (Aurias et al. 1980). So befindet sich beispielsweise in der Region 14q11.2 das Gen für die  $\alpha$ -Kette des T-Zellantigenrezeptors, in der Region 7q35 das Gen für die  $\beta$ -Kette dieses Rezeptors.

Betroffene AT-Patienten weisen eine stark erhöhte Inzidenz für maligne Erkrankungen auf, insbesondere akuter oder chronischer lymphatischer Leukämien und Hodgkin-Lymphome. Heterozygote Merkmalsträger sind klinisch meist vollkommen gesund, allerdings konnte auch bei diesen eine erhöhte Sensitivität gegenüber ionisierender Strahlung und folgend ein höheres Malignitätsrisiko nachgewiesen werden (Morrell et al. 1986 und 1990, Taylor et al. 1996). Heterozygot betroffene Frauen entwickeln signifikant häufiger ein Mammakarzinom (Swift et al. 1987 und 1991, Digweed 1993, Athma et al. 1996).

Auch die *Fanconi-Anämie* (FA) ist eine autosomal-rezessive Erkrankung. Betroffene Kinder leiden unter einer Panmyelopathie, einem Mikrozephalus mit geistiger Retardierung und Störungen der Knochenentwicklung. Morphologisch auffällig sind insbesondere ein Minderwuchs, eine Hypo- oder Aplasie der Daumen oder des Radius sowie eine häufig zu beobachtende vermehrte Hautpigmentierung. Erkrankte Kinder weisen chronische normo- bis hyperchrome makrozytäre Anämien sowie Thrombozytopenien auf. Ein begleitender Immundefekt besteht aus einer Hypogammaglobulinämie sowie variablen T-zellulären Funktionsstörungen, die sich meistens zwischen dem 5. und 10. Lebensjahr in Form einer erhöhten Infektanfälligkeit manifestieren.

Das *Bloom-Syndrom* (BS) ist charakterisiert durch eine schwere Wachstumsverzögerung und eine hohe Empfindlichkeit gegenüber Sonnenlicht mit der Neigung zur Ausbildung von Teleangiektasien und Erythemen (insbesondere an sonnenlichtexponierten Hautarealen), im Gesicht oftmals mit schmetterlingsförmigem Muster. Die Häufigkeit dieses Syndroms beträgt etwa 1:100.000 Neugeborene, wobei das Bloom-Syndrom bei Ashkenasie-Juden osteuropäischer Abstammung mit 1:10.000 Neugeborenen wesentlich häufiger vorkommt. Immundefekte, die Teil des Krankheitsbildes sind, äußern sich vor allem in einer Hypogammaglobulinämie, die im Kleinkindalter meist alle Immunglobulinklassen betrifft. Im höheren Lebensalter normalisieren sich hingegen in vielen Fällen die IgA- und IgG- Spiegel bei weiterhin nahezu immer erniedrigten IgM-Spiegeln. Daneben kann durch einen möglichen Ausfall der T-Zell-Funktion auch das zelluläre Immunsystem betroffen sein. Ursache für das Bloom-Syndrom ist eine Mutation im so bezeichneten BLM-Gen, das auf dem Chromosom 15q26.1 lokalisiert werden konnte. Das normalerweise durch dieses Gen kodierte Protein unterstützt die Aufrechterhaltung der Chromosomenstabilität bei der Zellteilung. Bei betroffenen Individuen konnte zytogenetisch eine stark erhöhte Austauschrate bei Schwesterchromatiden beobachtet werden. Es besteht eine erhöhte Malignomprädisposition, vor allem für Lymphome, Leukämien und gastrointestinale Adenokarzinome.

## 1.5 Historischer Überblick

### 1.5.1 Die Beschreibung klinischer NBS-Fälle

Das Nijmegen Breakage Syndrome (NBS) wurde erstmals 1981 von Weemaes et al. beschrieben. Die Autoren präsentierten den klinischen Fall zweier 10- und 12-jähriger Brüder, bei denen eine ausgeprägte Mikrozephalie einhergehend mit einer geistigen Entwicklungsretardierung, ein verzögertes Körperwachstum, „Café-au-lait“-Flecken und ein Immundefizit festgestellt worden waren. Zytogenetische Untersuchungen zeigten eine chromosomale Instabilität mit multiplen Inversionen und Translokationen insbesondere der Chromosomen 7 und 14. Es wurde eine erbliche chromosomale Störung vermutet, da diese chromosomalen Abnormitäten auch bei den genetisch eng miteinander verwandten Eltern und drei weiteren Kindern gefunden wurden, jedoch in einer wesentlich schwächeren Ausprägung.

Im Jahre 1985 stellten Seemanova et al. insgesamt 9 Patienten aus 6 verschiedenen tschechischen Familien mit einem bis dahin unbekanntem Krankheitsbild vor, deren klinisches Erscheinungsbild mit einem geringen Geburtsgewicht, einer Mikrozephalie bei normaler Intelligenz, einer „vogelkopffartigen“ Gesichtsmorphologie, Störungen des humoralen und zellulären Immunsystems und einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von malignen Lymphomen einherging. Klinisch waren verminderte IgA- und IgG-Spiegel festgestellt worden, außerdem eine starke Prädisposition für Erkrankungen des Respirationstraktes sowie Otitiden, Mastoiditiden und Sinusitiden. Bei der postmortalen Sektion, die bei 2 der 9 Patienten durchgeführt wurde, war insbesondere die bei beiden Patienten vorliegende geringe Hirngröße und ein vermindertes Gehirngewicht (610 und 645 Gramm) auffällig.

Im darauf folgenden Jahr berichteten Conley et al. (1986) über den klinischen Fall einer 21-jährigen Frau mit schwerer Wachstumsverzögerung, Immundefiziten und einer chromosomalen Instabilität insbesondere der Chromosomen 7 und 14. Im gleichen Jahr stellten Maraschio et al. (1986) in einem Fallbericht eine 31 Jahre alte Patientin vor, bei der im Rahmen einer Chromosomenanalyse eine hohe Inzidenz an chromosomalen Aberrationen festgestellt worden war. Diese litt ebenso wie ihre drei Jahre jüngere Schwester, die im Alter von 20 Jahren an einem malignen Lymphom verstorben war, an einer primären Amenorrhoe, Mikrozephalie und einem Immundefizit. Eine Chromosomenanalyse ergab bei ca. 60 % der untersuchten Lymphozyten dieselbe unbalancierte Translokation  $t(8q;21q)$ . Die klinisch gesunden Eltern wiesen eine enge genetische Verwandtschaft auf.

Taalman et al. veröffentlichten 1989 ihre Ergebnisse einer Untersuchung zweier niederländischer und dreier tschechischer Familien, die insgesamt 8 vom NBS betroffene Kinder aufwiesen. Bei allen betroffenen Patienten waren eine Mikrozephalie, ein Minderwuchs, eine „vogelkopfähnliche“ Gesichtsmorphologie und immunologische Defekte nachweisbar. Der Karyotyp aller Patienten stellte sich zytogenetisch unauffällig dar, jedoch zeigten sich in etwa einem Fünftel der untersuchten Metaphasen Veränderungen, vorwiegend der Chromosomen 7 und 14 an den Abschnitten 7p13, 7q34 und 14q11. Weiterhin konnte eine insgesamt erhöhte Sensitivität gegenüber ionisierender Strahlung der untersuchten Zellen aller Patienten festgestellt werden.

Einige Jahre später publizierten Chrzanowska et al. (1995) einen klinischen Bericht über insgesamt 11 Patienten mit einem Nijmegen Breakage Syndrom, die 8 nicht genetisch verwandten Familien entstammten. Wiederum wurden die mittlerweile für das NBS als charakteristisch erachteten Symptome wie eine Mikrozephalie und eine Wachstumsretardierung sowie rezidivierende bronchopulmonale Infekte beobachtet. Eine junge NBS-Patientin entwickelte ein B-Zell-Lymphom. Neben ausgeprägten Störungen der humoralen und zellulären Immunabwehr offenbarten die durchgeführten Chromosomenanalysen bei allen Patienten multiple strukturelle Aberrationen, insbesondere der Chromosomen 7 und 14. Zusätzlich wurden die Alphafetoprotein-Spiegel gemessen, die bei allen Patienten innerhalb eines regelrechten Intervalls lagen. In Lymphozyten aus dem peripheren Blut wurde bei 8 Patienten eine deutliche strahlenresistente DNA-Synthese (RDS = engl. radioresistant DNA synthesis) beobachtet, nach einer ionisierenden Bestrahlung konnte dabei eine nur mäßige Reduzierung der DNA-Replikation in der S-Phase des Zellzyklus festgestellt werden.

War bisher auf der Grundlage der vergleichenden Zellanalyse von NBS- und AT-Patienten (Jaspers et al. 1988b) das Nijmegen Breakage Syndrom wegen der sich z. T. überschneidenden klinischen Merkmale als eine Variante der Ataxia Teleangiectasia angesehen worden – hierbei wurde die Variante V1 als Nijmegen Breakage Syndrom oder Czech Breakage Syndrom bezeichnet, die Variante V2 als Berlin Breakage Syndrom –, äußerten van der Burgt et al. 1996 erstmals Zweifel an dieser These. Die Grundlage hierfür bildete ein umfassender Vergleich der klinischen, immunologischen und chromosomalen Merkmale von insgesamt 42 NBS-Patienten. Zwar bestanden in immunologischer, chromosomaler und zellbiologischer Hinsicht Ähnlichkeiten bei NBS- und AT-Patienten, jedoch wurde auf die z. T. sehr verschiedenen klinischen Ausprägungen beider Krankheitsbilder hingewiesen. So merkten die Autoren insbesondere an, dass die bei der AT üblicherweise zu beobachtende zerebelläre Ataxie, die apraxischen Augenbewegungen und erniedrigten Alphafetoproteinspiegel außer bei zwei beschriebenen Patientinnen (Curry et al. 1989) bisher bei keinem der bekannten NBS-Patienten nachweisbar gewesen waren. Sie postulierten

damit ein von der AT separiertes Krankheitsbild, da ausgeschlossen werden konnte, dass derjenige Genlocus, auf dem sich die für das NBS verantwortliche Mutation befindet, mit demjenigen Genlocus, der die für die AT verantwortliche Mutation ATM enthält (Chromosom 11q22-23), übereinstimmt (Stumm et al. 1995, Green et al. 1995, Sobel et al. 1992, McConville 1994, Komatsu et al. 1996). Bei 12 der insgesamt 42 einbezogenen Patienten konnte in einem Lebensalter zwischen 1 und 22 Jahren ein malignes Lymphom festgestellt werden, jeweils ein Patient litt an einem Gliom, einem Medulloblastom oder einem Rhabdomyosarkom.

Im Jahre 1996 publizierten Der Kaloustian et al. einen klinischen Fallbericht über einen Jungen, der neben den typischen NBS-Merkmalen eine penoskrotale Hypospadie aufwies und im Alter von 4 Jahren ein Rhabdomyosarkom entwickelte. Auffällig war im Rahmen einer chromosomalen Analyse, dass neben den erwarteten Aberrationen der Chromosomen 7 und 14 in einer Vielzahl der untersuchten Zellen Monosomien gefunden wurden, was bisher nur in einem Fall publiziert worden war (Ying et al. 1981). Aufgrund ihrer Ergebnisse postulierten die Autoren eine neue Variante des Nijmegen Breakage Syndroms, die sie auch bei dem von Woods et al. im Jahre 1995 beschriebenen Jungen vermuteten, bei dem zunächst die Diagnose eines Seckel-Syndroms gestellt worden war. Tupler et al. veröffentlichten schließlich 1997 einen Bericht über den ersten italienischen Fall des Nijmegen Breakage Syndroms.

### **1.5.2 Identifizierung des *NBS1*-Gens**

Im Jahre 1998 gelang die Identifizierung desjenigen Genlocus, der die für das Nijmegen Breakage Syndrom verantwortlichen Mutationen enthält. Trotz der großen Ähnlichkeit des Nijmegen Breakage Syndroms und der Ataxia Teleangiectasia in ihrem klinischen Erscheinungsbild und auf zellulärer und chromosomaler Ebene hatten Stumm et al. (1995) und Komatsu et al. (1996) zunächst nachweisen können, dass der für das Nijmegen Breakage Syndrom verantwortliche Genlocus nicht mit demjenigen auf Chromosom 11q23, der die AT verursachende Mutation enthält, übereinstimmt. Saar et al. (1997) konnten im Folgenden durch Kopplungsanalysen an 14 vom Nijmegen Breakage Syndrom betroffenen Familien eine Lokalisation des krankheitsverursachenden Gens in einem 1cM (Centi-Morgan) umfassenden Intervall auf dem Chromosom 8q21 bestimmen. Dieser Genlocus für das *NBS1*-Gen konnte durch weitere Untersuchungen von Matsuura et al. (1997) und Cerosaletti et al. (1998) bestätigt werden.

Unabhängig voneinander gelang es 1998 zwei Forschergruppen, zum einen den für das Nijmegen Breakage Syndrom verantwortlichen genauen Genlokus auf Chromosom 8q21 sowie die genaue Basensequenz des sich über 16 Exons erstreckenden *NBS1*-Gens zu bestimmen, zum



anderen eine Vielzahl möglicher krankheitsverursachender Mutationen innerhalb des Gens zu identifizieren (Varon et al. 1998, Matsuura et al. 1998). Zeitgleich veröffentlichten Carney et al. 1998 eine biochemische Charakterisierung des Genproduktes Nibrin und erste Ergebnisse über dessen Funktionen im Zusammenhang mit der Zellzykluskontrolle und Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen.

## 1.6 Das *NBS1*-Gen und sein Genprodukt Nibrin

### 1.6.1 Das *NBS1*-Gen

Das *NBS1*-Gen ist auf dem Chromosom 8q21 lokalisiert und enthält insgesamt 16 Exons, die auf einer Länge von etwa 51 DNA-Kilobasenpaaren (kbp) verteilt sind. Das *NBS1*-Gen kodiert für ein spezifisches Protein – Nibrin, NBS1 oder p95 genannt –, welches eine Länge von 754 Aminosäuren und ein Molekulargewicht von etwa 85 Kilodalton (kDa) aufweist.

Innerhalb des *NBS1*-Gen konnten bisher zahlreiche Allele, also Variationen in der Abfolge der Basensequenz des DNA-Stranges an demselben Genlocus, entdeckt werden. Zu unterscheiden ist hierbei auf der einen Seite zwischen Allelen, die lediglich als zusätzlich vorkommende Varianten anzusehen sind, ohne dass auch bei für diese Allele homozygoten Individuen ein veränderter klinischer Phänotyp feststellbar wäre. Sie sind daher als harmlose allelische Varianten innerhalb des *NBS1*-Gens anzusehen, die in verschiedenen Exons des *NBS1*-Gens zu finden sind (siehe Tabelle 3).

Normale Allelvarianten im <i>NBS1</i> - Gen			
Polymorphismus	Veränderungen in der Basensequenz	Exon	Folgen
102 G/A	G→A Position 102	2	keine
553 G/C	G→C Position 553	5	E185Q
1197 T/C	T→C Position 1197	10	keine
21016 A/G	A→G Position 2016	13	keine

**Tabelle 3:** Normale Allelvarianten des *NBS1*-Gens.

Auf der anderen Seite ist eine Vielzahl von Allelen des *NBSI*-Gens identifiziert worden, die krankheitsverursachend sind, da sie mit z. T. erheblichen Veränderungen in dem durch das Gen kodierten Produkt, dem Protein Nibrin, einhergehen. Sie werden aus diesem Grund als pathologische *NBSI*-Allelvarianten bezeichnet. Bisher konnten verschiedene dieser Allelvarianten bei Patienten unterschiedlicher ethnischer Abstammung identifiziert werden, von denen zahlreiche wegen des vorzeitigen Abbruchs der Translation zur Bildung von nur verkürzten Nibrin-Proteinfragmenten führen (Varon et al. 1998, Digweed et al. 1999, Maraschio et al. 2001, Resnick et al. 2002, Tanzanella et al. 2003, siehe auch Tabelle 4).

<b>Pathologische Allelvarianten im <i>NBSI</i>- Gen</b>				
<b>Mutation</b>	<b>Veränderungen in der Basensequenz</b>	<b>Exon</b>	<b>Folgen</b>	<b>Abstammung der bisher mit dieser Mutation diagnostizierter Patienten</b>
<b>643C→T</b>	C→T bei 643	6	R215W	slawisch, russisch
<b>657del5</b>	657-661delACAAA	6	Leserasterverschiebung	slawisch
<b>681delT</b>	681-682delT	6	Leserasterverschiebung	russisch
<b>698del4</b>	698-701delAACA	6	Leserasterverschiebung	englisch
<b>742insGG</b>	742-743insGG	7	Leserasterverschiebung	italienisch
<b>835del4</b>	835-838delCAGA	7	Leserasterverschiebung	italienisch
<b>842insT</b>	842-842insT	7	Leserasterverschiebung	mexikanisch
<b>900del25</b>	900-924del25	8	Leserasterverschiebung	marokkanisch
<b>976C→T</b>	C→T bei 976	8	Q326X	niederländisch
<b>1089C→A</b>	C→A bei 1089	9	Y363X	pakistanisch
<b>1142delC</b>	1142-1143delC	10	Leserasterverschiebung	kanadisch

**Tabelle 4:** Pathologische Allelvarianten des *NBSI*-Gens.

Unter den pathologischen *NBSI*-Gen-Varianten dominiert vor allem die Mutation 657del5 im Exon 6 des *NBSI*-Gens, die zur Ausbildung des typischen NBS-Phänotyps bei für diese Allelvariante homozygoten Individuen führt. Die 657del5-Mutation ist für über 90 % der weltweit diag-

nostizierten NBS-Fälle verantwortlich. Da sie überwiegend bei Individuen mit slawischer Abstammung zu finden ist, wird sie auch als „slawische Mutation“ bezeichnet.

Die Mutation 657del5 geht mit einem Verlust von 5 Basenpaaren (ACAAA) an der Stelle 657-661 im Exon 6 des *NBS1*-Gens einher. Hierdurch wird eine Leserasterverschiebung (engl. frameshift) verursacht, sodass die Translation vorzeitig abgebrochen wird. Vollständiges, intaktes Nibrin kann damit in NBS-Zellen nicht gebildet werden, jedoch konnten in immortalisierten B-Zell-Linien durch Immunpräzipitation zwei Proteinfragmente nachgewiesen werden. Dabei handelt es sich einerseits um ein N-terminales Peptid (p26) mit einem Molekulargewicht von 26 kDa sowie andererseits um ein C-terminales Fragment (p70) mit einem Molekulargewicht von 70 kDa (Maser et al. 2001).

Anders als bei der Mutation 657del5, die beim überwiegenden Anteil der NBS-Patienten nachzuweisen ist, war der Krankheitswert der Mutation 643C>T (R215W) einige Zeit unklar. Bei dieser Mutation handelt es sich um einen Austausch der Base Cytosin gegen Thymin an der Position 643 im Exon 6 des *NBS1*-Gens. Bei der Translation der Basensequenz in ein Protein resultiert hieraus in der Aminosäuresequenz des Nibrins ein Austausch der basischen Aminosäure Arginin gegen die unpolare Aminosäure Tryptophan.

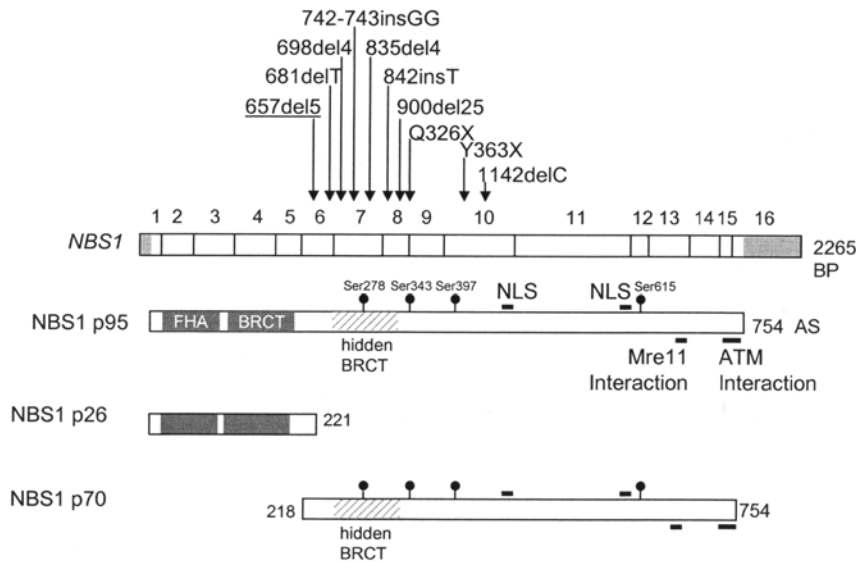
Waren zunächst innerhalb von Patientenkollektiven mit verschiedenen zuvor diagnostizierten Leukämieformen vermehrt heterozygote Merkmalsträger der Mutation R215W nachzuweisen (Varon et al. 2001, Taylor et al. 2001), zeigte sich diese Mutation auch unter Tumorpatienten mit einer slawischen Abstammung häufiger als in einer Kontrollgruppe (Steffen et al. 2004). Schließlich konnte ein dominant-negativer Effekt der Mutation R215W bei einer gleichzeitig vorliegenden heterozygoten Mutation 657del5 nachgewiesen werden (Seemanova et al. 2005). Die betroffenen Patienten zeigten dabei klinisch ein sogar noch stärker ausgeprägtes Erscheinungsbild als es bei homozygoten Merkmalsträgern der „slawischen Mutation“ 657del5 üblicherweise zu diagnostizieren ist. Somit ist auch die Mutation 643C>T (R215W) als eine pathologische Mutation im *NBS1*-Gen zu werten, deren homozygote Form wahrscheinlich so schwerwiegend ist, dass sie in der frühen embryonalen Entwicklung bereits letal wirkt (Seemanova et al. 2005).

## 1.6.2 Nibrin: struktureller Aufbau und Funktionen

### Struktureller Aufbau

Nibrin wird als das Genprodukt des *NBS1*-Gens alternativ auch als NBS1 oder p95 bezeichnet, umfasst 754 Aminosäuren und weist ein Molekulargewicht von etwa 85 Kilodalton auf. Wichtigste Strukturbestandteile des Nibrins sind verschiedene Proteindomänen, also eigenständig funktionale Proteineinheiten: Die so bezeichnete forkhead-associated (FHA)-Domäne (Aminosäuren 24 bis 108) und breast cancer carboxy-terminal (BRCT)-Domäne (AS 108 bis 196) am N-terminalen Ende und die hMRE11-bindende Domäne (AS 665 bis 693) am C-terminalen Ende. C-terminal ist darüber hinaus eine ATM-bindende Domäne vorhanden. In den zentralen Abschnitten weist Nibrin an definierten Positionen Serinmoleküle (Serin 278, 343 und 397) auf, die phosphoryliert werden können (siehe Abbildung 7).

Wegen des vorzeitigen Abbruchs der Translation führen pathologische Allelvarianten im *NBS1*-Gen zur Bildung von verkürzten Nibrinvarianten. So bedingt die häufigste Mutation im *NBS1*-Gen, die „slawische Mutation“ 657del5, die Ausbildung eines wesentlich kürzeren Proteins mit einem spezifischen Gewicht von nur etwa 26 kDa (p26). Dieses enthält lediglich die FHA- und BRCT-Domänen, nicht jedoch die C-terminalen hMRE11- und ATM-bindenden Domänen. Daneben konnte in NBS-Zellen bei Vorliegen der 657del5-Mutation auch die alternative Bildung eines etwa 70 kDa schweren C-terminalen Fragments (p70) nachgewiesen werden. Dieses Fragment geht auf die Initiation der Translation an zwei Startkodons zurück, die vor der Deletion lokalisiert sind (Maser et al. 2001, siehe Abbildung 7). Weitere verkürzte C-terminale Proteinfragmente konnten auch bei den selteneren Mutationen im *NBS1*-Gen (z. B. 835del4, 900del25) beobachtet werden (Maser et al. 2001, Tanzanella et al. 2003).



**Abbildung 7:** Das *NBS1*-Gen und das zugehörige exprimierte Protein Nibrin (bzw. NBS1 oder p95). Dargestellt sind außerdem alternativ gebildete Proteinvarianten, wie sie bei den verschiedenen Mutationen im *NBS1*-Gen vorkommen. Ein bei einer homozygot vorliegenden 657del5-Mutation gebildetes Nibrin-Fragment (p26) weist nur noch die N-terminale FHA- und BRCT-Domäne auf, nicht jedoch die C-terminale hMRE11-bindende Domäne. Diese ist jedoch im Nibrin-Fragment p70 noch vorhanden (aus: Digweed et al. 2004).

Innerhalb der Zelle ist Nibrin (NBS1) mit zwei weiteren Proteinen, MRE11 und RAD50, assoziiert, gemeinsam bilden diese drei Proteine den so genannten MRE11/RAD50/NBS1-(MRN)-Komplex (Carney et al. 1998). Im Zusammenspiel mit der Ataxia-Teleangiectasia-Mutated-(ATM)-Kinase nehmen NBS1 und der MRN-Komplex vielfältige Funktionen im Rahmen der zellulären Reaktion auf DNA-Doppelstrangbrüche sowie bei der Zellzykluskontrolle wahr. NBS1 trägt zudem zur Aufrechterhaltung der Telomerstabilität der Chromosomen bei. Diese vielfältigen Funktionen sollen im Folgenden erläutert werden.

### Funktionen des Nibrins bei der DNA-Doppelstrangbruchreparatur

Für das Genom einer Zelle stellen DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) einen schwerwiegenden Schaden dar. Doppelstrangbrüche können einerseits exogen z. B. durch ionisierende Strahlen oder Chemotherapeutika verursacht werden. Andererseits treten sie jedoch auch endogen als physiologisches zelluläres Phänomen auf, z. B. bei der Rekombination der elterlichen Chromosomen in der Meiose oder bei den Umbauten der Immunglobulin- und T-Zell-Rezeptor-Gene bei der Ausdifferenzierung des Immunsystems.

Die Reaktionen der Zelle auf Doppelstrangbrüche sind vielfältig. Meist wird zunächst eine Arretierung des Zellzyklus und eine Aktivierung der in die Reparatur einbezogenen Gene vollzogen. Bei schwerwiegenden Schädigungen kann hingegen auch eine Selbstzerstörung der Zelle durch Apoptose erfolgen.

Grundsätzlich verfügen eukaryontische Zellen über verschiedene Mechanismen zur Reparatur von Doppelstrangbrüchen. Eine Methode ist hierbei die Verknüpfung der freien nicht-homologen Enden (engl. non-homologous end joining = NHEJ) mit Hilfe von Proteinen wie Ku70, Ku80 und DNA-Ligase IV. Zwar führt dies in der Regel zu einem Verlust von einem oder mehreren Basenpaaren, da jedoch nur ein geringer Anteil des menschlichen Genoms der Proteinkodierung dient, bleibt ein Nukleotidverlust häufig ohne Auswirkungen.

Einen weiteren Mechanismus zur Doppelstrangbruch-Reparatur stellt die homologe Rekombination (engl. homologous recombination = HR) dar. Hierbei wird die Tatsache ausgenutzt, dass in diploiden Zellen jeweils zwei Chromosomen und damit zwei Kopien jeder DNA-Sequenz vorhanden sind. Die intakte Sequenz der Schwesterchromatide kann als Vorlage bei der Wiederherstellung des unterbrochenen ersten Strangs dienen. In der Regel kann damit ein Verlust von Basenpaaren vermieden werden.

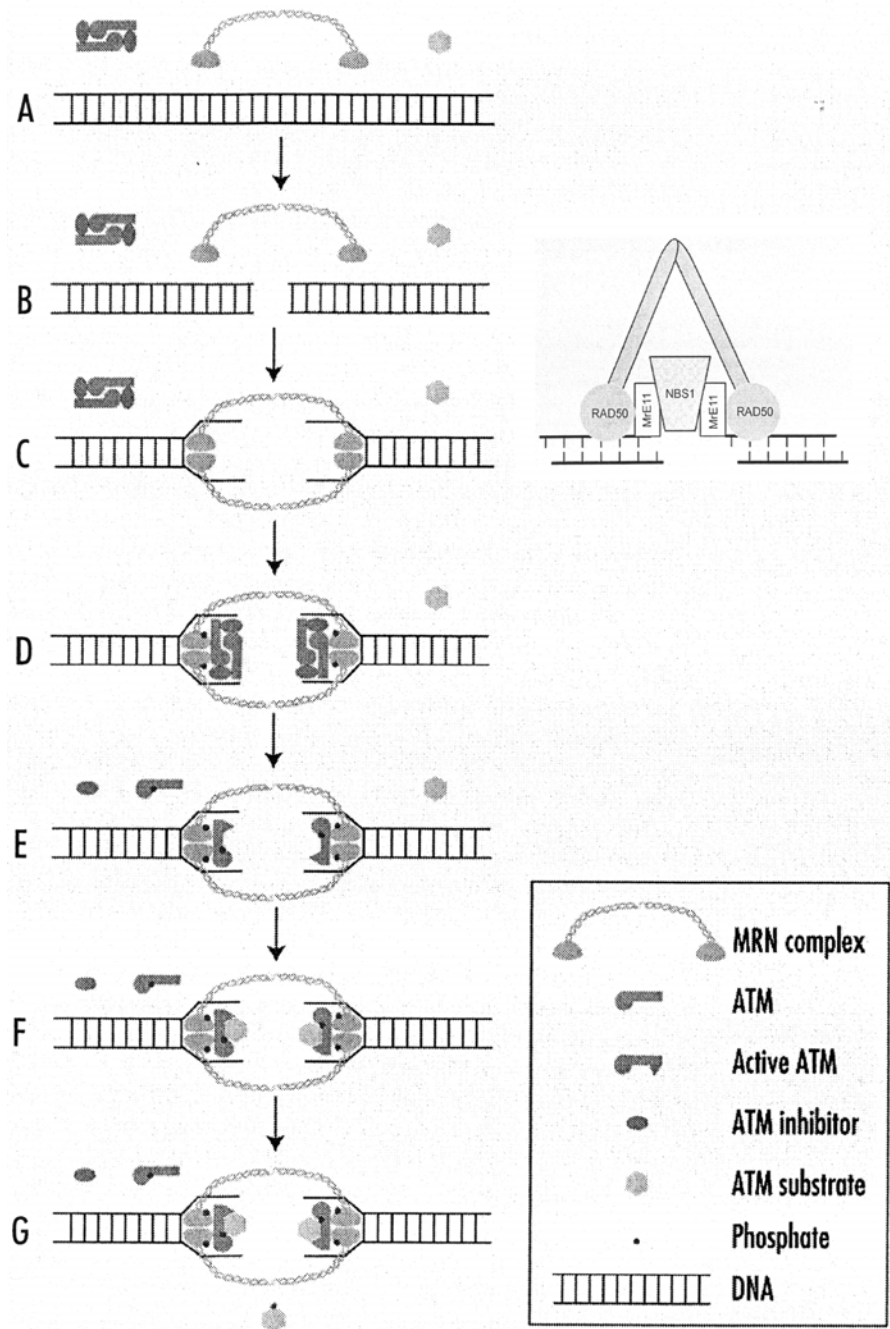
Schließlich stellt das zur HR gehörende sogenannte „single strand annealing“ eine weitere Möglichkeit der Zelle zur Behebung von Doppelstrangbrüchen dar. Liegt ein Doppelstrangbruch zwischen zwei repetitiven Sequenzen, so erfolgt in diesen Regionen eine Resektion der offenen Enden in der Form, dass aus den repetitiven Abschnitten komplementäre Einzelstränge entstehen, die wieder zu einem Doppelstrang miteinander verknüpft werden können.

Ein entscheidender Schritt bei der Reparatur von Doppelstrangbrüchen ist die Bindung verschiedener Proteine an der Stelle des Strangbruchs mit der Bildung so genannter nukleärer Foci (engl. ionizing radiation-induced foci = IRIF) und die Initiierung des Reparaturvorgangs. Zwar ist der genaue Ablauf der DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur bisher noch Gegenstand intensiver Forschungstätigkeiten, dennoch konnten bei der Analyse des Zusammenspiels der verschiedenen Proteine beachtliche Fortschritte erzielt werden. Viele der zahlreichen Eigenschaften von NBS1 bei der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen wurden dabei ursprünglich an Hefepilzen untersucht und später auf menschliche Zellen übertragen. Im Hefepilz *S. cerevisiae* ist der MRX-Proteinkomplex, der neben MRE11 und RAD50 auch das zu NBS1 funktionale Analogon XRS2 enthält, sowohl an der DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur durch NHEJ als auch durch HR betei-

ligt. Fehlt XRS2 hingegen, so folgen hieraus Störungen insbesondere des NHEJ (Haber 1998, Boulton et al. 1998, Ueno et al. 2003).

In menschlichen Zellen dient der MRN-Komplex als ein Sensor für das Vorliegen von DNA-Doppelstrangbrüchen und rekrutiert Ataxia-Teleangiectasia-Mutated-(ATM)-Kinase an die Stellen der Strangbrüche. ATM liegt in der Zelle zunächst in Form von katalytisch inaktiven Komplexen vor (Bakkenist et al. 2003). Bereits eine geringe Anzahl von Doppelstrangbrüchen ist *in vivo* ausreichend, um im Folgenden eine rasche Aktivierung von ATM durch Autophosphorylierung an Serin 1981 auszulösen (Bakkenist et al. 2003, Buscemi et al. 2004). Die Aktivierung von ATM-Kinase, die sodann in Form von Monomeren vorliegt, ist gerade in der Anwesenheit des MRN-Komplexes besonders ausgeprägt (Lee et al. 2004 und 2005, You et al. 2005). Die phosphorylierte ATM-Kinase aktiviert durch eine Phosphorylierung nachfolgend zahlreiche weitere Proteine, darunter p53, SMC, CHK2 und das Histon H2AX, denen weitreichende Funktionen im Rahmen der notwendigen Unterbrechung des Zellzyklus und der DNA-Reparatur zukommen (siehe Abbildung 9). Das vielschichtige Zusammenspiel des MRN-Komplexes und ATM wird insbesondere dadurch deutlich, dass der MRN-Komplex einerseits zur Aktivierung von ATM benötigt wird (Bakkenist et al. 2003, Uziel et al. 2003), andererseits jedoch ATM auch eine Phosphorylierung von NBS1 an mehreren Stellen verursacht (Gatei et al. 2000).

Durch die Wirkung des aktivierten ATM entsteht als eines der ersten Proteine das phosphorylierte Histon  $\gamma$ -H2AX (Rogakou et al. 1998). Hieran bindet sich NBS1 zunächst direkt über seine FHA/BRCT-Domäne und dirigiert MRE11 und RAD50 als weitere Komponenten des MRN-Komplexes in die Nähe des DNA-Doppelstrangbruchs (Tauchi et al. 2002). MRE11 besitzt verschiedene für die DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur notwendige biochemische Eigenschaften wie eine 3'-5' dsDNA-Exonuklease, eine ssDNA-Endonuklease und leistet zudem eine Entwindung des DNA-Doppelstrangs (Paull et al. 1998 und 1999). RAD50 gehört zu der Gruppe von Proteinen, die zu einer Aufrechterhaltung der Chromosomenstruktur beitragen (engl. structure maintenance of chromosome = SMC) und bildet eine V-förmige Konformation aus, die die beiden offenen Enden der DNA an der Bruchstelle überbrücken kann (D'Amours et al. 2002, siehe Abbildung 8). Die molekulare Struktur des MRN-Komplexes und seine Bindungseigenschaften an die DNA konnten mit Hilfe der Elektronenmikroskopie und Röntgenkristallographie ermittelt werden (Anderson et al. 2001, de Jager et al. 2001, Hopfner et al. 2001).



**Abbildung 8:** Funktionen des MRN-Komplexes und ATM im Rahmen der Reparatur von Doppelstrangbrüchen: Beim Vorliegen von Doppelstrangbrüchen verbindet sich zunächst der MRN-Komplex mit diesen, indem NBS1 mit seiner N-terminalen FHA/BRCT-Domäne an das Histon  $\gamma$ -H2AX bindet und MRE11 und RAD50 in die Nähe des DSB dirigiert. Während MRE11 eine Entwindung der Doppelstränge ermöglicht, bildet RAD50 eine V-förmige Struktur aus, die den DSB überbrücken kann. In Anwesenheit des MRN-Komplexes findet eine Monomerisation und Autophosphorylierung des zunächst als katalytisch inaktives Dimer vorliegenden ATM statt.



Dieses aktiviert durch eine Phosphorylierung weitere Effektoren der Zellzykluskontrolle (aus: Paull et al. 2005 und Zhang et al. 2006, siehe auch Abbildung 9).

### **Funktionen des Nibrins bei der Zellzyklus-Kontrolle**

NBS1 und der MRN-Komplex spielen nicht nur eine wichtige Rolle bei der direkten Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen, sondern sind durch ihre Aktivierung und Unterstützung von ATM zudem entscheidende Modulatoren im Rahmen der Zellzyklus-Kontrolle, die eine mögliche Reaktion der Zelle auf DNA-Schädigungen darstellt (siehe Abbildung 9).

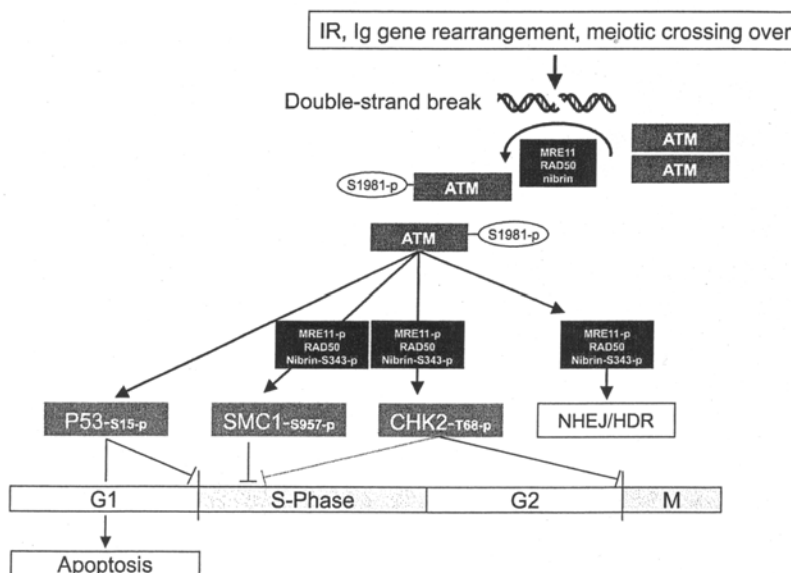
Einen wichtigen Kontrollpunkt der Zellzykluskontrolle stellt der intra-S-Phasen-Checkpoint dar, der in Zellen von NBS-Patienten Defekte aufweist. So führen Zellen von NBS-Patienten die DNA-Replikation auch dann fort, wenn durch eine Bestrahlung nachweislich DNA-Schädigungen ausgelöst wurden (engl. radioresistant DNA synthesis = RDS, Lim et al 2000, Zhao et al. 2000). Eine Modulation des intra-S-Phasen-Checkpoints ist auf mindestens zwei verschiedenen Wegen möglich. Zum einen kann eine Aktivierung des Kontrollpunkts durch eine Phosphorylierung des Proteins SMC1 am Serin 957 erfolgen, was allerdings die Phosphorylierung von NBS1 am Serin 343 durch ATM voraussetzt (Tauchi et al. 2001, Lim et al. 2000). Zum anderen ist eine solche Checkpoint-Aktivierung auch auf dem Wege der Phosphorylierung von CHK2 am Serin 68 durch ATM möglich, worauf eine Kaskade der Aktivierung weiterer Proteine wie z. B. CDC25A sowie CDK2 und damit schließlich des intra-S-Phasen-Checkpoints erfolgt.

Während in Zellen von NBS-Patienten eine vorliegende Störung des intra-S-Phasen-Kontrollpunkts unumstritten ist, stellt die Rolle von Nibrin bei der Regulation der G1- und G2-Zellzyklus-Kontrollpunkte derzeit den Gegenstand weiterer Forschungsaktivitäten dar.

Bei der Untersuchung des G1/S-Phasen-Kontrollpunktes an NBS-Fibroblasten konnte einerseits eine normale Arretierung in der G1-Phase festgestellt werden (Yamazaki et al. 1998), andererseits zeigte sich dieser in lymphoblastoiden B-Zellen abgeschwächt oder weitgehend defekt (Sullivan et al. 1997, Antoccia et al. 1999). Daneben war eine verzögerte Akkumulation von p53 zur Auslösung eines G1-Phasen-Arrestes als eine Reaktion auf eine Bestrahlung zu beobachten (Jongmans et al. 1997).

Auch die Ergebnisse der Untersuchungen bezüglich der Funktion des G2-Kontrollpunkts, der einen Übertritt von Zellen mit geschädigter DNA in die Phase der Mitose verhindert, stellen sich gegensätzlich dar. Während sich einerseits der G2-Kontrollpunkt in Fibroblasten (Yamazaki et

al. 1998) und in mit EBV immortalisierten Lymphozyten von NBS-Patienten (Xu et al. 2001) als funktionsfähig darstellte, zeigten sich in lymphoblastoiden NBS-Zellen nach einer Bestrahlung hingegen schwerwiegende G2-Kontrollpunktdefekte (Buscemi et al. 2001). Demuth et al. (2004) konnten in *NBS1*-Gen nullmutanten Mauszellen eindeutig nachweisen, dass in Abwesenheit von Nibrin der G2-Kontrollpunkt nicht funktionsfähig ist. Da sich jedoch in Zellen von NBS-Patienten der G2-Kontrollpunkt teilweise als funktionsfähig darstellte, ist dies als ein Anzeichen dafür zu werten, dass das bei 657del5-homozygoten NBS-Patienten exprimierte verkürzte Nibrin-Fragment p70 (Maser et al. 2001) dazu ausreicht, um dessen Funktion teilweise aufrecht zu erhalten.



**Abbildung 9:** Wirkungen des MRN-Komplexes auf DNA-Doppelstrangbrüche und die Zellzyklus-Kontrolle. Der MRN-Komplex bindet zur DNA-Doppelstrangbruchreparatur an die Bruchenden und verstärkt die ATM-Aktivierung auf dem Wege der Monomerisation und Autophosphorylierung. Nach seiner Phosphorylierung unterstützt der MRN-Komplex sodann ATM bei der Aktivierung von SMC und CHK2, die in die Regulation verschiedener Kontrollpunkte des Zellzyklus involviert sind (aus: Digweed 2006).

### **Funktionen des Nibrins bei der Aufrechterhaltung der Telomerenstabilität**

Telomere sind repetitive guanin- und thyminreiche Basensequenzen, die an den Chromosomenenden linearer Chromosomen lokalisiert sind und maßgeblich für deren Schutz und Aufrechterhaltung deren Stabilität verantwortlich sind. Mit jeder Zellteilung werden die Telomere leicht verkürzt, denn durch den herkömmlichen Replikationsmechanismus ist die DNA nicht bis zum letzten Basenpaar zu synthetisieren. Allerdings kann das Enzym Telomerase, ein RNA-Protein-Komplex mit einer reversen Transkriptase-Aktivität, diese Verkürzung wieder ausgleichen.

Es konnte nachgewiesen werden, dass auch eine Vielzahl von Proteinen wie beispielsweise KU70, DNA-PKcs und XRCC4, die im Rahmen des NHEJ eine Verknüpfung der DNA-Bruchenden ermöglichen, die Telomeren dadurch schützen, dass sie deren unerwünschte Verknüpfung untereinander verhindern (Bailey et al. 1999 und 2004, Hsu et al. 2000). Daneben trägt in menschlichen Zellen insbesondere auch der MRE11/RAD50/NBS1-(MRN)-Komplex zu einer Aufrechterhaltung der Telomerlänge bei. In Fibroblasten von NBS-Patienten konnte bei einer gleichzeitigen Expressierung von NBS1 und TERT, der katalytisch wirksamen Einheit der Telomerase, ein signifikanter Effekt auf die Verlängerung der Telomeren nachgewiesen werden. Somit ist davon auszugehen, dass in Anwesenheit des MRN-Komplexes eine Generierung von 3' ssDNA-Telomerenden vollzogen wird, die anschließend durch die Telomerase verlängert werden können (Bakkenist et al. 2004, Ranganathan et al. 2001, Le et al. 1999).

### **Korrelation molekulargenetischer Ergebnisse mit den klinischen Befunden des NBS**

Zwar konnte bisher noch kein abschließendes Verständnis aller zellbiologischen Phänomene, in die NBS1, MRE11, der gesamte MRN-Komplex sowie ATM involviert sind, erreicht werden, jedoch kann bereits durch die bisherigen Erkenntnisse das klinische Bild von NBS-Patienten zumindest teilweise erklärt werden.

Das stark erhöhte Krebsrisiko lässt sich dadurch erklären, dass unter Einwirkung von exogenen und endogenen Noxen DNA-Doppelstrangbrüche verursacht werden, für die die Zellen von NBS-Patienten wesentlich weniger effektiv funktionierende Reparatursysteme – wie das NHEJ oder die HR – besitzen als „Wildtyp“-Probanden. Dieses erhöhte Risiko wird zudem verstärkt durch eine nur unzureichend funktionsfähige Zellzyklus-Kontrolle. Besonders stark geschädigte Zellen leiten die Apoptose ein und sterben ab, womit der Minderwuchs und die Mikrozephalie als Ausdruck einer verringerten Zellzahl erklärt werden könnten.

Da bei der Ausdifferenzierung des Immunsystems die NHEJ physiologischerweise in Form der V(D)J-Rekombination zur Schaffung einer weitreichenden Diversität der Immunglobuline und T-Zell-Rezeptoren Verwendung findet (Chen et al. 2000, Clatworthy et al. 2005), folgt aus deren mangelnder Funktion eine mögliche Begründung für das klinisch in den meisten Fällen vorhandene Immundefizit von NBS-Patienten. Im Rahmen der weiteren Reifung von Lymphozyten ermöglicht die Klassenwechsel-Rekombination (engl. class switch recombination = CSR) einen Isotypenwechsel der Expression von IgM zu IgG und IgA, wobei auch dieser Prozess physiologischerweise mit Doppelstrangbrüchen einhergeht. Da bei NBS-Patienten beide Vorgänge gestört sind, erklären sich hierdurch die labordiagnostisch nachweisbaren niedrigen Spiegel an IgG und IgA bei unveränderten IgM-Spiegeln (van Engelen et al. 2001). Die Beteiligung von Nibrin an der Klassenwechsel-Rekombination konnte dadurch untermauert werden, dass Nibrin und  $\gamma$ -H2AX in B-Lymphozyten von Mäusen gemeinsam an den Orten des Klassenwechsels nachgewiesen werden konnten (Petersen et al. 2001). Eine direkte Untersuchung des Ig-Klassenwechsels an Lymphozyten von AT- und NBS-Patienten zeigte einen ineffizienten und fehlerhaften Klassenwechselprozess (Pan et al. 2002). Um die Rolle von Nibrin bei der CSR weitergehend zu überprüfen, wurden B-Lymphozyten von faktisch *NBS1*-nullmutanten Mäusen zu einer CSR stimuliert, die dabei eine verminderte Expression von IgG1 und IgG3 zeigten (Kracker et al. 2005). Da Mäuse ohne NBN, das homologe Protein zum menschlichen NBS1, nicht lebensfähig sind und bereits in der embryonalen Entwicklungsphase absterben (Zhu et al. 2001, Dumon-Jones et al. 2003), wurden Mäuse gezüchtet, in deren Zellen nachträglich Nullmutationen des *Nbn*-Gens erzeugt wurden (Demuth et al. 2004).

Berücksichtigt man zusammenfassend neben den Defekten der Doppelstrangbruch-Reparatursysteme, der Zellzykluskontrolle und Aufrechterhaltung der Telomerenstabilität auch die in Lymphozyten zytogenetisch nachweisbare Chromosomeninstabilität und die gehäuften Translokation und Inversionen, so wird einerseits die Immundefizienz von NBS-Patienten verständlich, da die Bruchpunkte vor allem Genloci der Immunoglobulin- und T-Zell-Rezeptor-Gene betreffen. Andererseits wird die häufigere Entstehung von Tumoren nachvollziehbar, wenn durch Translokationen hochaktive Promotoren in die Nachbarschaft von Protoonkogenen geraten können, die die Teilungsaktivität von Lymphozyten beeinflussen und somit die Entstehung von Tumoren begünstigen.

## 1.7 Evaluation der Prädisposition heterozygoter NBS-Merkmalsträger für die Entwicklung maligner Erkrankungen

Ogleich der schwerwiegenden Ausprägungen im klinischen Erscheinungsbild von Patienten, die in homozygoter Form vom Nijmegen Breakage Syndrom betroffen sind, darf dies nicht darüber hinwegtäuschen, dass es sich hierbei insgesamt um eine seltene Erkrankung handelt. Die überschaubare Anzahl an Patienten wird zumeist in speziellen Zentren diagnostiziert und die weitere Entwicklung des Krankheitsverlaufs ausführlich dokumentiert. Hingegen ist davon auszugehen, dass bis zu einem Prozent der Bevölkerung heterozygote Genträger sind, allerdings mit erheblichen regionalen und ethnischen Unterschieden (Heim et al. 1992, Varon et al. 2000). Falls auch heterozygote Merkmalsträger eine gesteigerte Empfindlichkeit gegenüber mutagen Noxen aufweisen, so wäre dies von nicht unerheblicher gesundheitspolitischer Bedeutung. So wäre bei diesen Personen beispielsweise im Rahmen einer notwendigen bildgebenden radiologischen Diagnostik auf die Verwendung von Verfahren mit ionisierender Strahlung möglichst zu verzichten, Therapiepläne einer Chemo- oder Strahlentherapie müssten modifiziert werden.

Ursprünglich war durch epidemiologische Untersuchungen innerhalb eines Patientenkollektivs bestehend aus homozygoten Individuen mit einer Ataxia Teleangiectasia ein signifikant erhöhtes Malignomrisiko festgestellt worden (Morell et al. 1986, Pippard et al. 1988). Basierend auf diesem Ergebnis wurden im Folgenden weitere Untersuchungen angestrebt, um den Verdacht eines höheren Tumorinzidenzrisikos auch bei lediglich heterozygot betroffenen AT-Merkmalsträgern zu evaluieren. Ein solches erhöhtes Malignomrisiko konnte für AT-Heterozygote eindeutig nachgewiesen werden (Morrell et al. 1990), insbesondere für die Entstehung von Mammakarzinomen (Swift et al. 1987, 1990, 1991, Athma et al. 1996), chronisch lymphatischen B-Zell-Leukämien (Stankovic et al. 1999, Reis 1999) und T-Zell-Leukämien (Vorechovsky et al. 1997).

Neben dem hohen Erkrankungsrisiko homozygoter AT-Patienten konnte auch bei homozygoten NBS-Merkmalsträgern eine signifikant erhöhte Inzidenz für Malignome, insbesondere für maligne Lymphome und Leukämien, bestätigt werden (Seemanova 1990, Wegner et al. 1999, Seidemann et al. 2000). Aufgrund ähnlicher Überlegungen wie bei der AT, der beobachteten erhöhten Empfindlichkeit gegenüber ionisierender Strahlung sowohl von AT- als auch NBS-Zellen und auch wegen der klinisch ähnlichen Erscheinungsbilder von AT- und NBS-Homozygoten war vermutet worden, dass genauso wie AT-Heterozygote auch heterozygote NBS-Merkmalsträger

ein erhöhtes Risiko für die Entstehung maligner Erkrankungen aufweisen könnten (Shiloh 1997). In einer ersten hierzu durchgeführten Studie konnten Seemanova et al. (1990) bei 142 Personen, die eine direkte Verwandtschaft zu 8 NBS-Patienten aufwiesen, eine signifikant erhöhte Inzidenz maligner Tumoren feststellen. Eine weiterführende Studie von Seemanova et al. (2006) mit Hilfe der „Index-Test-Methode“ (Swift et al. 1990), bei der bei Blutsverwandten von homozygot Betroffenen zunächst der Genträgerstatus bestimmt und danach das Krebsrisiko der Heterozygoten mit demjenigen der für das „Wildtyp“-Allel homozygoten Merkmalsträgern verglichen wird, konnte diese erste Untersuchung voll bestätigen. Bei 40 normal homozygoten Großeltern von NBS-Patienten wurden insgesamt 3 Malignome (7,4 %) retrospektiv dokumentiert, unter 39 verwandten heterozygoten Großeltern ein Malignom hingegen bei 15 Individuen (38,2 %).

Auch in Deutschland wurden erste Untersuchungen durchgeführt, um zunächst die Prävalenz heterozygoter NBS-Merkmalsträger in der deutschen Bevölkerung zu ermitteln. Wegen der Ähnlichkeit des Nijmegen Breakage Syndroms zur Ataxia Teleangiectasia und des von Swift et al. (1987) nachgewiesenen erhöhten Brustkrebsrisikos bei heterozygoten AT-Merkmalsträgerinnen wurde zugleich auch die Frage eines möglichen Zusammenhangs zwischen einer Heterozygotie für die häufigste Mutation 657del5 im *NBS1*-Gen und einem erhöhten Tumorerkrankungsrisiko für spezifische Tumorentitäten aufgeworfen.

So realisierten Carlomagno et al. (1999) eine Studie, die eine etwaig erhöhte Prävalenz heterozygoter Merkmalsträger unter Patientinnen, bei denen zuvor ein Mammakarzinom diagnostiziert worden war, aufdecken sollte. Sie untersuchten dazu eine Gruppe von 477 deutschen Frauen mit einem zuvor festgestellten Karzinom der Brustdrüse, daneben 866 weitere gesunde deutsche Probandinnen. In der Gruppe der Brustkrebspatientinnen konnten insgesamt 2 für die Mutation 657del5 heterozygote Merkmalsträgerinnen gefunden werden, unter den gesunden Probandinnen der Kontrollgruppe ließ sich 1 heterozygote Merkmalsträgerin (Frequenz 1:866, vgl. Tabelle 5) nachweisen. Insgesamt sahen Carlomagno et al. damit keinen signifikanten Zusammenhang eines erhöhten Brustkrebsrisiko und dem Vorliegen einer Heterozygotie für die Mutation 657del5. Der Anteil der zurechenbaren Brustkrebsfälle auf das Vorliegen einer heterozygoten slawischen Mutation wurde auf unter 1 % geschätzt.

## 1.8 Frequenz der Mutation 657del5 in ausgewählten Populationen

Aufgrund einer Häufung von am Nijmegen Breakage Syndrom erkrankten Kindern vor allem in Polen und der Tschechischen Republik konzentrierten sich die Forschungsaktivitäten auf Patientenkollektive in diesen Ländern. Der überwiegende Anteil der betroffenen Kinder in diesen Ländern war homozygot für die slawische Gründer-Mutation 657del5 im Exon 6 des *NBS1*-Gens.

Da wegen des autosomal-rezessiven Vererbungsmodus somit auch eine höhere Frequenz heterozygoter Merkmalsträger in diesen Staaten nahe lag, wurde die Frequenz dieser Mutation in drei slawischen Populationen – in Polen, der Tschechischen Republik und der Ukraine – bestimmt (Varon et al. 2000, vgl. Tabelle 5). Hierbei wurden Blutproben von insgesamt 4416 ausgesuchten Neugeborenen aus diesen drei Ländern auf das Vorhandensein einer 657del5-Mutation im *NBS1*-Gen gescreent. Insgesamt konnten 25 heterozygote Merkmalsträger identifiziert werden, was einer Frequenz von 1:177 entsprach, wobei jedoch regional erhebliche Unterschiede festgestellt wurden. Bei den untersuchten Neugeborenen aus drei polnischen Regionen ließ sich eine Prävalenz der heterozygoten Mutation zwischen 1:90 und 1:314, in der Tschechischen Republik eine Frequenz von 1:154 und bei den untersuchten Individuen aus der Ukraine eine Frequenz in Höhe von 1:182 ermitteln (Varon et al. 2000, vgl. Tabelle 5). Im Folgenden wurde anhand der ermittelten Daten die Inzidenz homozygoter Merkmalsträger in der Tschechischen Republik grob auf 1:95.000 geschätzt. Wie die Autoren erwartet hatten, lag die Frequenz der tatsächlich diagnostizierten NBS-Fälle deutlich unterhalb dieses Verhältnisses. Retrospektiv waren in einer Periode zwischen den Jahren 1981 und 1995 in der Tschechischen Republik alles in allem lediglich 7 NBS-Patienten als solche diagnostiziert und dokumentiert worden, was bei einer Anzahl von 1,9 Millionen Lebendgeburten in der Tschechischen Republik in diesem Zeitraum einer erheblich geringeren Frequenz von 1:271.000 entsprach, sodass von einer großen Zahl nicht diagnostizierter Krankheitsfälle auszugehen war (Varon et al. 2000).

Eine ähnliche Studie wurde für die Bevölkerung der Slowakei durchgeführt. Mit dieser sollte das Vorkommen heterozygoter Merkmalsträger der 657del5-Mutation innerhalb der dortigen Bevölkerung quantifiziert werden. Die Untersuchung der Blutproben von 2996 Neugeborenen, die in den Jahren 2002 bis 2003 in der Slowakei geboren worden waren, ergab eine sehr viel niedrigere Prävalenz (etwa 1:999) an heterozygoten Merkmalsträgern als in der polnischen und tschechischen Bevölkerung (Seemanova et al. 2004, vgl. Tabelle 5).

Literatur	Herkunft der untersuchten Individuen	Anzahl der untersuchten Individuen	Merkmale der untersuchten Probandengruppe	Heterozygote Merkmals-träger der Mutation 657del5	Frequenz
<b>Carlomagno et al. (1999)</b>	Deutschland	477	Patientinnen jünger als 51 Jahre mit histologisch gesichertem Mammakarzinom	1	1:477
	Deutschland	866	gesunde Kontrollgruppe bestehend aus Frauen unter 51 Jahren	1	1:866
<b>Varon et al. (2000)</b>	Tschechische Republik	1234	Neugeborenenkollektiv	8	1:154
	Ukraine (Region Lvov)	908	Neugeborenenkollektiv	5	1:182
	Polen (gesamt)	2274	Neugeborenenkollektiv	12	1:190
	Polen (Nowy Sacz)	452	Neugeborenenkollektiv	5	1:90
	Polen (Krakau)	1254	Neugeborenenkollektiv	4	1:314
	Polen (Krosno)	568	Neugeborenenkollektiv	3	1:189
	Gesamt	4416		25	1:177
<b>Seemanova et al. 2004</b>	Slowakei	2296	Neugeborenenkollektiv	3	1:999

**Tabelle 5:** Frequenzen heterozygoter Merkmalsträger der Mutation 657del5 im Exon 6 des *NBSI*-Gens (Zusammenstellung ausgewählter Literatur).

## 1.9 Zielsetzung und Aufgabenstellung

Bis zum Beginn des praktischen Teils dieser Arbeit lagen in der Literatur nur wenige Daten zur Prävalenz der häufigsten Mutationen im *NBSI*-Gen innerhalb der deutschen Bevölkerung vor. Da in Deutschland insbesondere in der Region um Bayreuth in Oberfranken gehäuft Fälle von Kindern mit dem Nijmegen Breakage Syndrom diagnostiziert worden waren, sollte die dortige Bevölkerung auf Mutationen im *NBSI*-Gen untersucht und die entsprechenden Mutationsfrequenzen in dieser Region ermittelt werden. Um einen innerdeutschen Frequenzvergleich vornehmen zu können, wurde daneben ein Neugeborenenkollektiv aus Berlin auf Mutationen im *NBSI*-Gen untersucht.



Zudem sollte bestimmt werden, ob heterozygote *NBS1*-Genmutationsträger ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung bestimmter Tumoren aufweisen. Da in Familien mit zahlreichen heterozygoten 657del5-Merkmalsträgern eine erhöhte Inzidenz maligner Tumorerkrankungen festgestellt wurde, sollte eine erhöhte Tumorprädisposition heterozygoter *NBS1*-Genmutationsträger differenziert nach verschiedenen Tumorarten untersucht werden. Dazu wäre ein Vorgehen notwendig, im Rahmen dessen die Frequenz heterozygoter Merkmalsträger von *NBS1*-Genmutationen unter Patienten mit einer zuvor histologisch bestätigten Tumorerkrankung mit derjenigen Mutationsfrequenz innerhalb einer gesunden Kontrollgruppe verglichen würde.

Schließlich sollte in Tumorgewebeproben dieser *NBS1*-Heterozygoten überprüft werden, ob das „Wildtyp“-Allel noch vorhanden ist. Bei dessen regelmäßigem Fehlen in Tumorgeweben wäre das *NBS1*-Gen in die Gruppe der Tumorsuppressor-Gene einzuordnen, da Zellen ohne ein intaktes Allel den Ausgangspunkt für maligne Tumoren darstellen könnten.

Auf der Grundlage dieser Ausgangslage bestehen die **Ziele** und **Aufgaben** dieser Arbeit darin, die folgenden Fragestellungen zu beantworten:

- 1.) Evaluation der Frequenz von Mutationen im Exon 6 des *NBS1*-Gens innerhalb zweier deutscher Neugeborenenkollektive (aus Berlin und Bayreuth) und der möglichen regionalen Mutationsfrequenz-Unterschiede in Deutschland,
- 2.) Untersuchung der Frequenzen heterozygoter *NBS1*-Genmutationsträger innerhalb von Patientengruppen mit unterschiedlichen Tumorarten und deren Vergleich mit einer Kontrollgruppe,
- 3.) Quantitativer individueller Vergleich des Anteils von Wildtyp- und deletierten 657del5-Allelen in Proben des peripheren Blutes und Tumorgewebeproben der jeweiligen Patienten.