

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Frequenz heterozygoter Merkmalsträger innerhalb der deutschen Neugeborenenkollektive

Innerhalb der beiden untersuchten deutschen Neugeborenenkollektive konnte bei mehreren Individuen eine der verschiedenen bekannten Allelvarianten des *NBS1*-Gens nachgewiesen werden. Hierbei handelte es sich einerseits um die in den osteuropäischen Staaten sehr häufig vorkommende „slawische Mutation“ 657del5, eine das Exon 6 im *NBS1*-Gens betreffende Deletion von insgesamt 5 Basenpaaren, andererseits um die Punktmutation R215W.

Innerhalb des Neugeborenenkollektivs aus dem Berliner Studienzentrum war unter allen 990 untersuchten Neugeborenen 1 heterozygoter Merkmalsträger der pathologischen *NBS1*-Gen-Allelvariante 657del5 nachweisbar, 1 Neugeborenes war heterozygot für die Mutation R215W (siehe Tabelle 7 und Tabelle 8). Von den 1056 untersuchten Neugeborenen aus dem Studienzentrum Bayreuth konnten insgesamt 6 als heterozygote Merkmalsträger der Mutation 657del5 und 2 als heterozygote Merkmalsträger der Mutation R215W identifiziert werden (siehe Tabelle 7 und Tabelle 8).

Studienzentrum	Anzahl untersuchter Neugeborener	Anzahl heterozygoter Merkmalsträger der Mutation 657del5	Frequenz heterozygoter Merkmalsträger der Mutation 657del5
Berlin	990	1	1:990
Bayreuth	1056	6	1:176

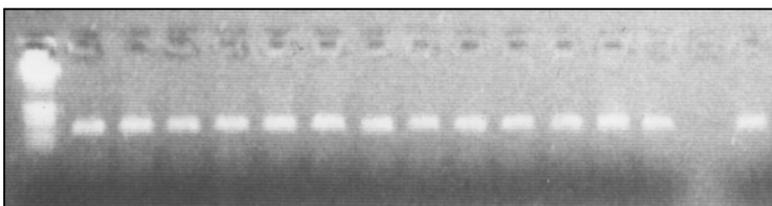
**Tabelle 7:** Frequenz heterozygoter Merkmalsträger der **Mutation 657del5** innerhalb der Neugeborenenkollektive aus den Studienzentren Berlin und Bayreuth.

Studienzentrum	Anzahl untersuchter Neugeborener	Anzahl heterozygoter Merkmalsträger der Mutation R215W	Frequenz heterozygoter Merkmalsträger der Mutation R215W
Berlin	990	1	1:990
Bayreuth	1056	2	1:528

**Tabelle 8:** Frequenz heterozygoter Merkmalsträger der **Mutation R215W** innerhalb der Neugeborenenkollektive aus den Studienzentren Berlin und Bayreuth.

### 3.1.1 PCR und SSCP-Analyse

Bei der im Anschluss an die Polymerase-Kettenreaktion durchgeführten Gelelektrophorese wurde zunächst überprüft, ob im Rahmen der PCR eine erfolgreiche Amplifizierung des gewünschten DNA-Abschnitts stattgefunden hatte. Zur Beurteilung des Amplifikationsergebnisses wurde das Gel unter einer UV-Lampe betrachtet. Zeigte sich eine kräftig fluoreszierende Bande innerhalb einer Gelbahn, so war dies ein Hinweis auf das Vorliegen eines PCR-Produktes, also einer erfolgreichen Amplifikation der zugehörigen Probe. Das Ergebnis wurde mit Hilfe einer Photokamera dokumentiert (siehe Abbildung 16).



**Abbildung 16:** Beispiel eines Agarose-Gels mit Proben der Amplifikationsprodukte: Im Anschluss an eine Polymerase-

Kettenreaktion konnte hiermit vor der Durchführung einer SSCP-Gelelektrophorese zunächst bestätigt werden, dass die Amplifizierung im Rahmen der Polymerase-Kettenreaktion erfolgreich verlaufen war und ein gewünschtes DNA-Produkt vorlag. Das Vorhandensein der Produkte ist durch deutlich fluoreszierende Banden auf dem Agarose-Gel zu erkennen. Von rechts: vorletzte Gelbahn = „Blindprobe“, letzte Gelbahn = heterozygote Kontrolle.

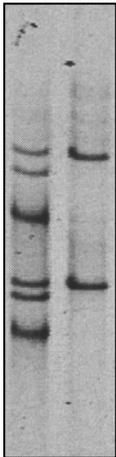
Mit Hilfe der Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus-Gelelektrophorese (engl. SSCP = single strand conformation polymorphism electrophoresis) konnten im Folgenden alle Neugeborenen identifiziert werden, bei denen mögliche harmlose oder pathologische Allelvarianten im

*NBSI*-Gen vorlagen. Das Vorhandensein solcher Allelvarianten wurde deutlich, indem sich andere als die für den Wildtyp erwarteten Elektrophorese-Banden ausbildeten.

Die Auswertung der SSCP-Gele erfolgte nach einem zuvor festgelegten Schema. Jede aufgetragene PCR-Produktprobe wurde nach Abschluss der SSCP-Gelelektrophorese untersucht (siehe Abbildung 20). Zeigten sich auf dem Gel innerhalb einer Bahn nur zwei scharf begrenzte Banden, so konnte davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei jeweils um die beiden komplementären Einzelstränge des untersuchten Genabschnitts handelte, die keine Mutation enthielten und als Wildtyp gewertet wurden (siehe Abbildung 17). Der Verdacht auf das mögliche Vorliegen einer Mutation wurde geäußert, wenn das Erscheinungsbild des Bandenmusters einer Probe auf dem Gel von demjenigen des als Wildtyp erachteten Musters abwich.

Als Vergleich dienten dabei auch Kontrollen von als heterozygot für die Mutation 657del5 bekannten Merkmalsträgern. Die DNA-Einzelstränge der Kontrollen zeigten ein typisches Bandenmuster, das sich von dem Muster der Wildtyp-Individuen unterschied. Lagen beim Wildtyp lediglich zwei scharf begrenzte Banden vor, zeigten die 657del5-heterozygoten Kontrollen ein Bandenmuster mit insgesamt sechs Banden. Davon stellten sich je zwei Banden als Doppelbanden, zwei weitere als Einzelbanden dar (siehe Abbildung 17 und Abbildung 18). Auf eine Mutation verdächtige Proben wurden nun jeweils mit dem Bandenmuster der heterozygoten Kontrollen verglichen. Wiesen sie ein den Kontrollen ähnliches Erscheinungsbild auf, so wurden sie als auf eine 657del5-Mutation verdächtige Proben markiert (siehe Abbildung 18).

In wenigen Fällen konnten Bandenmuster nachgewiesen werden, die weder für den Wildtyp noch die „slawische Mutation“ 657del5 typisch waren (siehe Abbildung 19). Diese Proben wurden ebenfalls als auf eine Mutation verdächtig markiert.



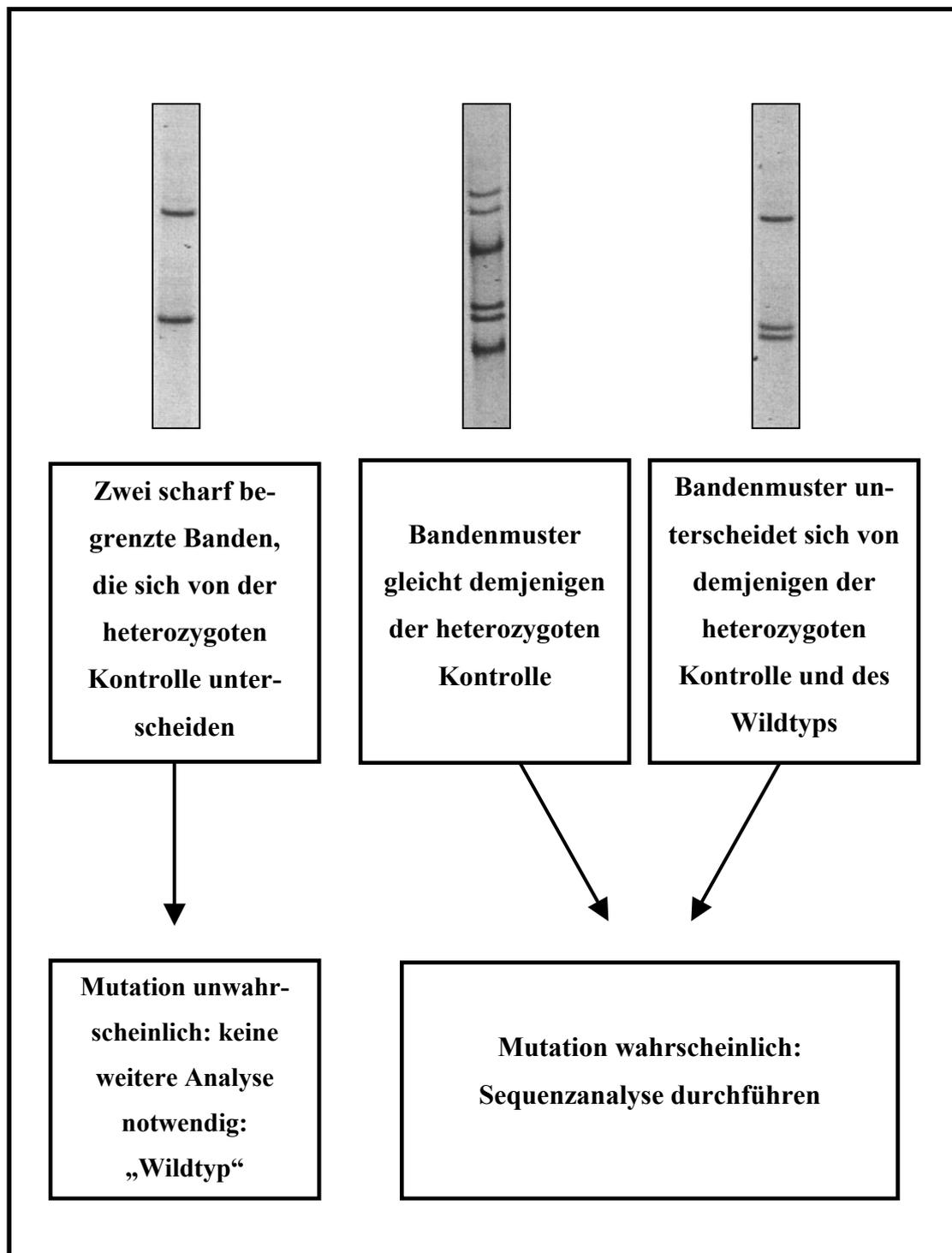
**Abbildung 17:** Auswertung der SSCP-Gele: In der rechten Bahn ist das Bandenmuster einer als Wildtyp gewerteten Probe zu erkennen: Es zeigen sich zwei scharf begrenzte Banden, die jeweils einen der komplementären DNA-Einzelstränge repräsentieren. Links: Kontrolle eines bekannten heterozygoten 657del5-Merkmalsträgers.



**Abbildung 18:** Auswertung der SSCP-Gele: Identifikation eines Probanden mit einer möglichen „slawischen Mutation“ (657del5), rechte Bahn. Verglichen mit dem Bandenmuster der 657del5-heterozygoten Kontrolle (links) ergibt sich ein sehr ähnliches Muster. Dies gilt als Hinweis darauf, dass der Proband ebenfalls heterozygot für die 657del5-Mutation ist.



**Abbildung 19:** Auswertung der SSCP-Gele: Bandenmuster, welches weder demjenigen des Wildtyps noch dem Muster der 657del5-Mutation gleicht. Die Probe ist somit verdächtig auf eine der seltener vorkommenden Mutationen und wird zur weiteren Abklärung ebenfalls der Sequenzierung zugeführt.

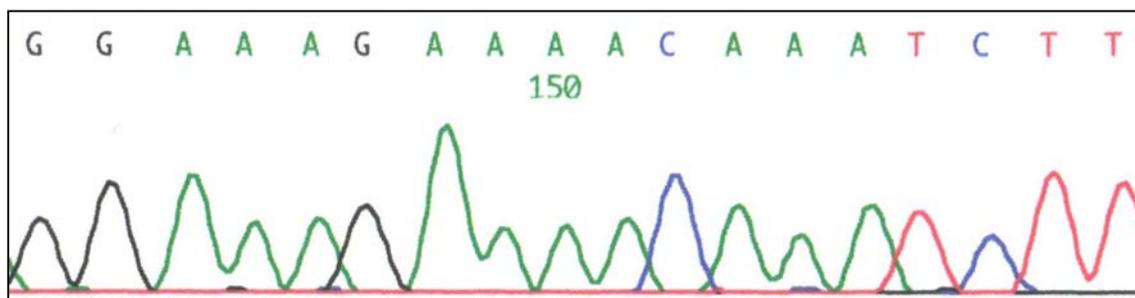
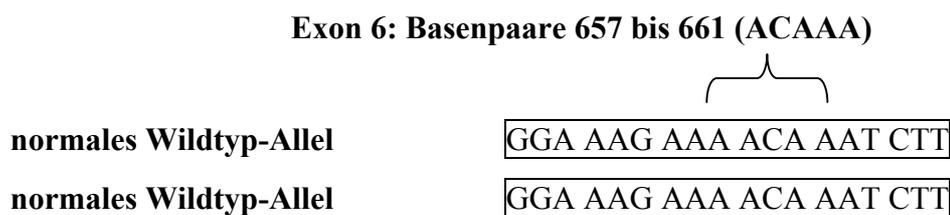


**Abbildung 20:** Strategie bei der Auswertung der SSCP-Gele: Ziel war hierbei die Identifikation von Probanden, bei denen möglicherweise die häufigste Mutation im *NBS1*-Gen, die Mutation 657del5, oder eine andere Mutation innerhalb des *NBS1*-Gens vorlag. Verdächtige Proben wurden zur genauen Bestimmung der Basenfolge einer DNA-Sequenzanalyse zugeführt.

### 3.1.2 Sequenzanalyse

Mit Hilfe der SSCP-Gelelektrophorese waren Konformations-Polymorphismen der Einzelstränge in verschiedenen Proben nachgewiesen worden. Die auf eine Mutation verdächtigen Proben wurden deswegen einer genauen DNA-Sequenzanalyse unterzogen, um die jeweils vorliegende genaue Basensequenz innerhalb des kritischen Abschnitts im Exon 6 des *NBS1*-Gens zu bestimmen.

Die in diesen Proben vorhandene DNA-Sequenz wurde mit derjenigen Sequenz für den Wildtyp verglichen. Diese als nicht mutierte Sequenz erachtete Basenabfolge, die der allergrößte Teil der Weltbevölkerung in seinem Erbgut aufweist, wurde einer Sequenzdatenbank entnommen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Bei Patienten mit einem Wildtyp konnte mit Hilfe des automatischen Sequenziergerätes ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Foster City, USA) in beiden Allelen eine identische Wildtyp-Sequenz detektiert werden (siehe Abbildung 21).

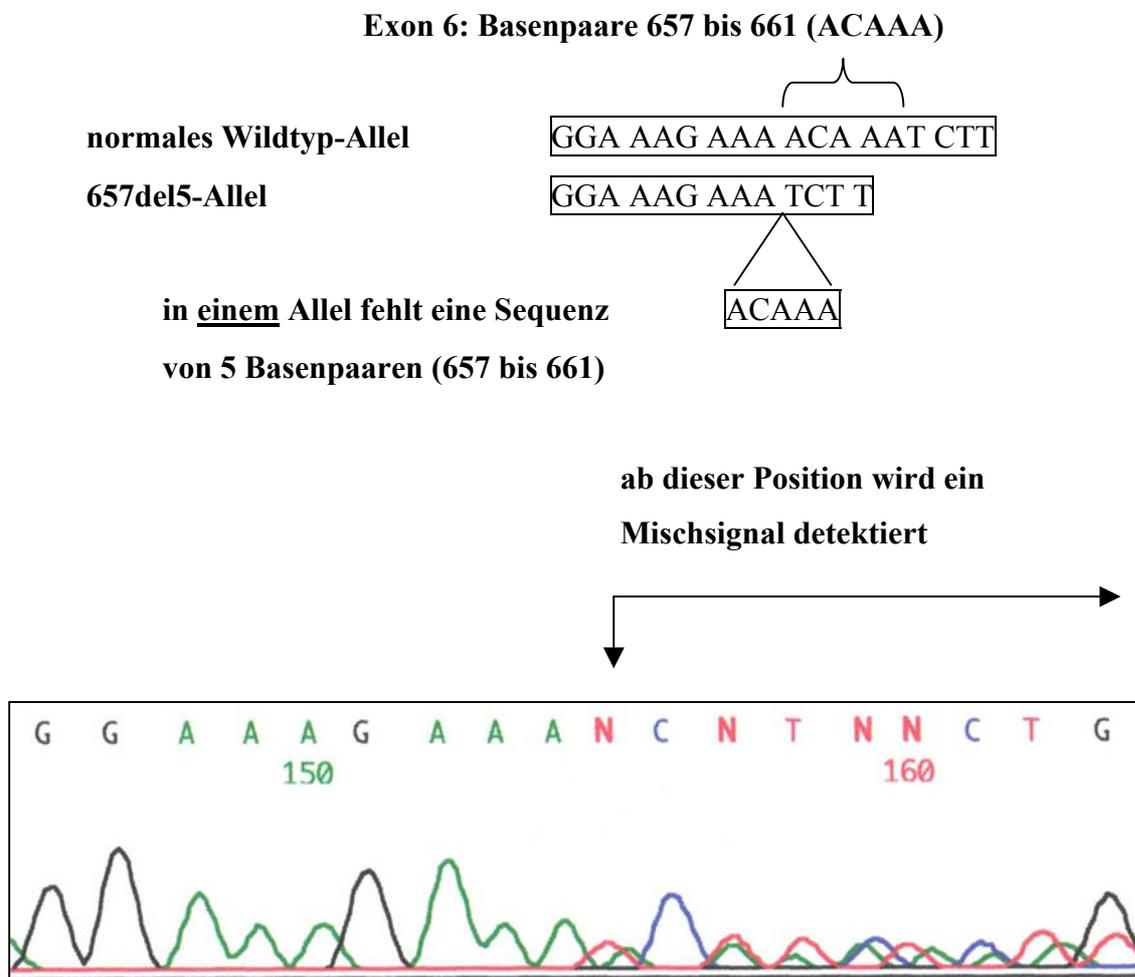


**Abbildung 21:** Ergebnis der DNA-Sequenzierung: Darstellung eines **Wildtyps** in einem Ausschnitt des Exons 6 im *NBS1*-Gen. Das Sequenziergerät detektiert bei der Fluoreszenzmessung identische Signale für die Basenabfolge auf beiden homologen Allelen, da auf beiden Allelen die gleiche Sequenz vorliegt.

Im Rahmen der Sequenzanalyse konnte die beim Nijmegen Breakage Syndrom häufigste Mutation, die „slawische Mutation“ 657del5, bei insgesamt 6 Neugeborenen aus dem Bayreuther Stu-

dienkollektiv und bei 1 Neugeborenen aus Berlin bestätigt werden. Dabei zeigte sich bei allen dieser 7 Neugeborenen auf jeweils einem Allel der Verlust von 5 Basenpaaren (ACAAA) an der Position 657-661 im Exon 6 des *NBS1*-Gens.

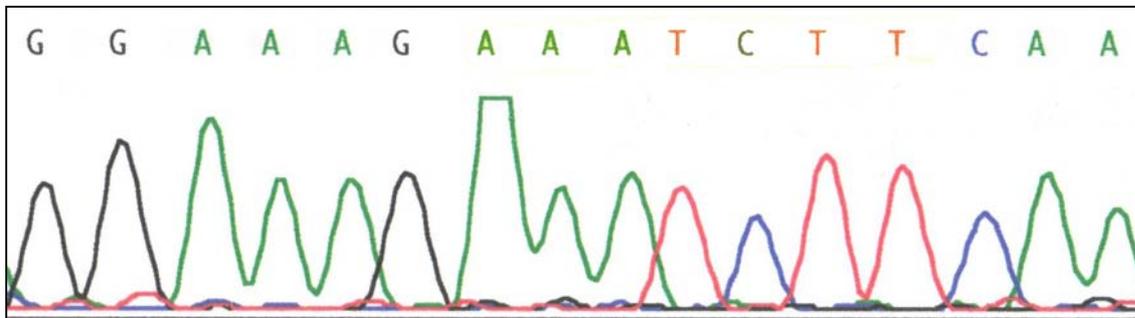
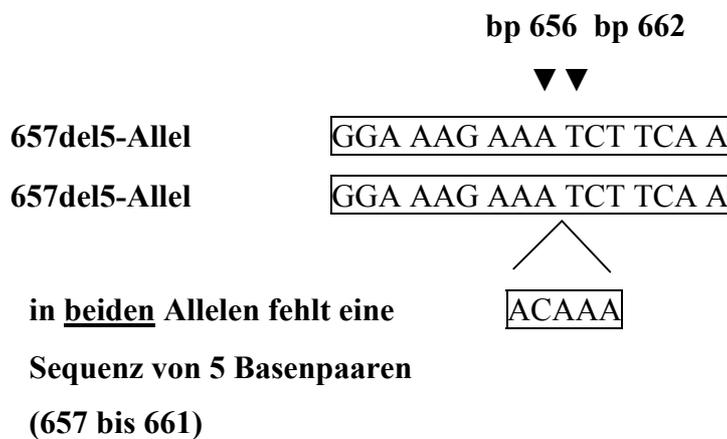
Ein solcher Mutationsnachweis war möglich, da aufgrund der 5 Basenpaare umfassenden Deletion in einem der beiden untersuchten Allele zwei verschiedene Basenfolgen in der analysierten Probe vorlagen. Die beiden verschiedenen Allele wurden bei der Sequenzierung dann jedoch gleichzeitig erfasst und stellten sich in Form eines Sequenzmischsignals ab einer bestimmten Position in der Basenabfolge dar. Vor dieser definierten Stelle im untersuchten Exon 6 des *NBS1*-Gens stimmte die detektierte Sequenz noch überein, es ergab sich bei der fluoreszenzvermittelten Messung ein jeweils übereinstimmendes Signal (siehe Abbildung 22).



**Abbildung 22:** Ergebnis der DNA-Sequenzierung: Nachweis der **heterozygoten „slawischen Mutation“ 657del5**: Eine Deletion von 5 Basenpaaren in der DNA-Sequenz eines Allels ist zu erkennen. Die Sequenzen beider Allele weisen vor der Deletion eine identische Basenfolge auf, es ergibt sich eine einzige, übereinstimmende Sequenz. Im Bereich der Deletion stimmen die

Sequenzen beider Allele nicht mehr überein. Hier und auch für alle folgenden Basen kann das Sequenziergerät keine identischen Signale empfangen, es liegt ein Mischsignal vor.

Darüber hinaus wurde auch eine DNA-Probe eines für die 657del5-Mutation bekanntermaßen *homozygoten* Merkmalsträgers sequenziert. Das Sequenziergerät ermittelte durch den Empfang eines identischen Signals für jede Base der DNA-Sequenz eine übereinstimmende Basenfolge in beiden Allelen, die jeweils eine Deletion von 5 Basenpaaren deutlich werden ließen (siehe Abbildung 23).



**Abbildung 23:** Ergebnis der DNA-Sequenzierung: Im Vergleich zu den beiden vorherigen Abbildungen ist hier die Sequenzanalyse eines **für die Mutation 657del5 homozygoten Individuums (Laborkontrolle)** dargestellt. Eine Sequenz von 5 Basenpaaren fehlt in beiden untersuchten Allelen. Das Sequenziergerät ermittelt eine in beiden Allelen übereinstimmende Sequenz, es wird kein Mischsignal empfangen. Homozygot betroffene Patienten weisen klinisch die charakteristischen Merkmale wie eine Mikrozephalie, einen Minderwuchs und ein typisches kraniofaziales Erscheinungsbild auf.

Neben den insgesamt 7 identifizierten heterozygoten Trägern der 657del5-Mutation konnte bei je einem Neugeborenen aus Bayreuth und Berlin eine heterozygote Mutation R215W festgestellt werden.

Hierbei handelt es sich um eine Punktmutation am Basenpaar 643 im Exon 6 des *NBS1*-Gens. An dieser Stelle ist die üblicherweise vorhandene Base Cytosin (=C) gegen die Base Thymin (=T) vertauscht. Dabei ist zu beachten, dass jeweils ein Tripletts aus drei Basen für eine Aminosäure innerhalb eines Proteins kodiert, wobei für die Kodierung einer Aminosäure zum Teil mehrere mögliche Basentriplets existieren.

Im Wildtyp liegt an den Basenpositionen 643-645 die Basenfolge *CGG* vor, die für die Aminosäure Arginin (mit dem Großbuchstaben R abgekürzt) kodiert. Ein Austausch von Cytosin gegen Thymin an der Position 643 führt hingegen zu dem Basen-Triplett *TGG*, welches für eine andere Aminosäure kodiert, nämlich für Tryptophan (mit dem Großbuchstaben W bezeichnet) anstelle von Arginin. Die Folge der Punktmutation an der Stelle 643 innerhalb des Exons 6 im *NBS1*-Gen ist also eine Veränderung der Aminosäuresequenz des vom *NBS1*-Gen kodierten Proteins Nibrin, die sich als ein Aminosäureaustausch an der Position 215 darstellt. Da Arginin (R) durch Tryptophan (W) an der Aminosäureposition 215 ausgetauscht wird, erhielt diese Punktmutation den Namen R215W.

Wie schon die Mutation 657del5 ließ sich auch die Punktmutation R215W im *NBS1*-Gen durch eine genaue Analyse der Basensequenz nachweisen. Hierzu wurde erneut das automatische Sequenziergerät ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Foster City, USA) verwendet und die genaue Basensequenz beider Allele in einem breiten Intervall um die Basenposition 643 ermittelt. Da an der Position 643 Signale für das Vorliegen sowohl von Cytosin als auch von Thymin in den sequenzierten Einzelsträngen gemessen wurden, konnte die hier vorliegende Punktmutation bestätigt werden (siehe Abbildung 24). Für alle Basenpositionen vor und hinter der Position 643 ließ sich wegen des Empfangs jeweils identischer Signale eine übereinstimmende Basensequenz in beiden Allelen nachweisen.

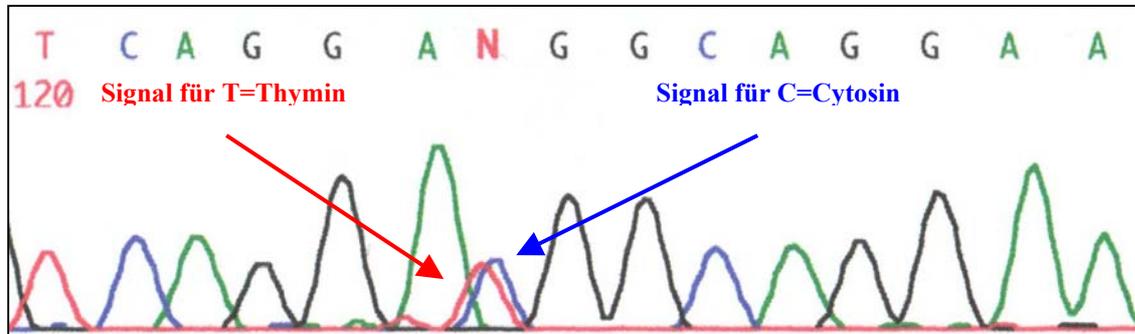
normales Wildtyp-Allel

TCA GGA **CGG** CAG GAA

R215W-Allel

TCA GGA **TGG** CAG GAA

an dieser Position (bp 643) ist C gegen T vertauscht



**Abbildung 24:** Ergebnis der DNA-Sequenzierung: Nachweis der **Punktmutation R215W**. An der Basenposition 643 ist die Base Cytosin durch Thymin vertauscht, hier wird ein Signal für beide Basen empfangen. Hingegen stimmt vor und hinter der Punktmutation die Basensequenz überein.

### 3.2 Frequenz heterozygoter Merkmalsträger in einem Patientenkollektiv mit nachgewiesener Tumorerkrankung

Zur Identifizierung verdächtiger Proben sowie dem definitiven Nachweis von Mutationen im *NBS1*-Gen waren bei der Untersuchung des polnischen Tumorpatientenkollektivs mit den Methoden der PCR, der SSCP-Gelelektrophorese und der direkten Sequenzanalyse dieselben Verfahren angewendet worden, wie sie bereits beim Screening der deutschen Neugeborenen aus Berlin und Bayreuth verwendet worden waren (siehe hierzu Abschnitt 3.1).

Insgesamt konnten unter den 589 untersuchten polnischen Tumorpatienten 9 Individuen mit einer Mutation in einem Allel ihres *NBS1*-Gens identifiziert werden. Hierbei wurde in 5 Fällen eine heterozygote 657del5-Mutation und bei 4 Patienten die Mutation R215W identifiziert (vgl. Tabelle 9 und Tabelle 10).

Unter diesen insgesamt 9 Individuen mit einer Mutation waren 2 Patienten mit einem zuvor diagnostizierten kolorektalen Karzinom und der Mutation 657del5, 3 weitere mit einem kolorektalen Karzinom und der Mutation R215W. Darüber hinaus ließen sich 2 Patienten mit einem ma-

lignen Melanom und 1 Patientin mit einem Mammakarzinom in der Krankenvorgeschichte als heterozygote Merkmalsträger der 657del5-Mutation nachweisen. 1 Patient mit einem bekannten Hodgkin-Lymphom konnte als heterozygoter Merkmalsträger der Mutation R215W bestätigt werden (vgl. Tabelle 9 und Tabelle 10).

<b>Tumorart</b>	<b>Anzahl der Patienten</b>	<b>Anzahl heterozygoter Merkmalsträger der Mutation 657del5</b>	<b>Frequenz der Merkmalsträger</b>
<b>Kolorektales Karzinom</b>	123	2	1:62
<b>Mammakarzinom</b>	103	1	1:103
<b>Hodentumor</b>	100	–	–
<b>Weichteilsarkom</b>	64	–	–
<b>Malignes Melanom</b>	43	2	1:22
<b>Osteosarkom</b>	39	–	–
<b>Bronchialkarzinom</b>	27	–	–
<b>Non-Hodgkin-Lymphom</b>	24	–	–
<b>Hodgkin-Lymphom</b>	16	–	–
<b>weitere Tumorarten mit jeweils &lt;15 Patienten</b>	50	–	–
<b>Summe</b>	589	5	1:118

**Tabelle 9:** Heterozygote Merkmalsträger der **Mutation 657del5** im *NBS1*-Gen und deren bestätigte Tumorarten.

Tumorart	Anzahl der Patienten	Anzahl heterozygoter Merkmalsträger der Mutation R215W	Frequenz der Merkmalsträger
Kolorektales Karzinom	123	3	1:41
Mammakarzinom	103	–	–
Hodentumor	100	–	–
Weichteilsarkom	64	–	–
Malignes Melanom	43	–	–
Osteosarkom	39	–	–
Bronchialkarzinom	27	–	–
Non-Hodgkin-Lymphom	24	–	–
Hodgkin-Lymphom	16	1	1:16
weitere Tumorarten mit jeweils <15 Patienten	50	–	–
<b>Summe</b>	<b>589</b>	<b>4</b>	<b>1:148</b>

**Tabelle 10:** Heterozygote Merkmalsträger der **Mutation R215W** im *NBS1*-Gen und deren bestätigte Tumorarten.

### 3.3 Ergebnisse weiterführender Untersuchungen mit der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

War es im Rahmen des Screenings der Blutproben gelungen, insgesamt 5 heterozygote 657del5-Merkmalsträger und 4 für die Mutation R215W heterozygote Individuen unter den polnischen Tumorpatienten zu identifizieren, sollte zudem der Bedeutung des *NBS1*-Gens bei der Tumorentstehung und dessen möglicher Wirkung als Tumorsuppressorgen nachgegangen werden. Da dem *NBS1*-Gen, vermittelt durch sein Genprodukt Nibrin, eine Funktion im Rahmen der DNA-Doppelstrang-Reparatur und der Zellzykluskontrolle zukommt, wurde bei der Untersuchung der

Tumorgewebebeobachten ein Nachweis einer möglicherweise entstandenen zweiten chromosomalen Mutation in einer den Tumor begründenden Zelle bei den zunächst als heterozygot für eine der Mutationen nachgewiesenen Tumorkranken angestrebt. Hierzu wurde die Methode der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) verwendet, die sich im Gegensatz zur konventionellen zytogenetischen Chromosomenuntersuchung insbesondere auch zur Darstellung kleinerer Chromosomenumlagerungen und zum Nachweis von Mikrodeletionen eignet. Grundlage dieses molekulargenetischen Verfahrens ist die Hybridisierung komplementärer DNA-Stränge, wobei einer der beiden sich verbindenden DNA-Stränge innerhalb einer zu untersuchenden Zelle, also „in situ“ vorliegt. Als Partnerstrang wird eine zu der zu untersuchenden Sequenz komplementäre DNA-Sonde verwendet, innerhalb derer modifizierte Nukleotide mit fluoreszierenden Seitengruppen eingebaut sind. Dort, wo eine Gensequenz und die zu ihr komplementäre DNA-Sonde hybridisieren, kann das entstehende Fluoreszenzsignal unter einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet und photographisch dokumentiert werden.

Die FISH-Untersuchungen an den Tumorgewebebeobachten der als heterozygote 657del5- oder R215W-Merkmalsträger identifizierten polnischen Tumorkranken wurden von Herrn Dr. Markus Stumm am Institut für Humangenetik der Universität Magdeburg vorgenommen. Die kurze Darstellung der Ergebnisse wurde freundlicherweise genehmigt.

Im Rahmen der FISH-Untersuchungen wurden die isolierten Tumorzellen mit einer für das Chromosom 8 spezifischen CEP-Sonde (CEP = engl. chromosome enumeration probe) behandelt, die durch Hybridisierung mit repetitiven DNA-Sequenzen insbesondere nahe den Centromeren der Chromosomen 8 eine Identifikation der Chromosomen ermöglichte. Im Folgenden wurden Hybridisierungen mit den für das *NBS1*-Gen spezifischen Cy3- oder Fluoreszeinkennzeichneten BAC-Sonden (BAC159I23, BAC = engl. bacterial artificial chromosome) durchgeführt. Eine Hybridisierung war nur im Falle des Vorhandenseins des *NBS1*-Gens gewährleistet, wobei jedoch nicht differenziert werden konnte, ob es sich hierbei um das Wildtyp- oder das 657del5-Allel handelte. Darüber hinaus wurde die Fluoreszeinkennzeichnete BAC-Sonde BAC293K1, die an einen DNA-Abschnitt nahe des *NBS1*-Gens bindet, als Kontrollsonde verwendet. Von jedem Tumorgewebe wurden jeweils mindestens 100 Zellen mittels der FISH untersucht.

Tumorgewebebeobachten waren von 8 der identifizierten heterozygoten 657del5-Merkmalsträger und von einem R215W-Heterozygoten verfügbar. Hierunter waren die Tumorgewebe von 4 657del5-Heterozygoten und einem R215W-Heterozygoten, die im Rahmen des zuvor durchge-

fürten Screenings identifiziert werden konnten. Das Tumorgewebe lag jeweils fixiert in Paraffinblöcken vor, wobei der Tumoranteil in den Gewebeproben zwischen ca. 50 und 100 % variierte. Die 4 weiteren Tumorgewebeproben stammten von 4 Heterozygoten der Mutation 657del5, die im Rahmen der Fortführung des Screeningprogramms bezüglich heterozygoter 657del5-Merkmalsträger unter am M. Skłodowska-Curie Memorial Cancer Center und Institut für Onkologie der Universitätsklinik Warschau behandelten Tumorpatienten identifiziert werden konnten. Die Daten wurden von Frau Dr. Raymonda Varon am Institut für Humangenetik der Charité erhoben, deren Darstellung wurde freundlicherweise genehmigt.

In insgesamt 5 der Tumorgewebeproben ließen sich Polysomien (maximal Pentasomien) des Chromosoms 8 nachweisen, die mit einer Vervielfachung des *NBS1*-Genabschnittes einhergingen (vgl. Tabelle 11, siehe auch Abbildung 25). Hierbei handelte es sich um die Tumorproben jeweils eines Patienten mit einem malignen Melanom (Patient 1), einem kolorektalen Karzinom (Patient 4) sowie einem Leiomyosarcoma coli (Patient 5). Darüber hinaus waren Polysomien in den Tumorgewebeproben von zwei Patienten mit einem Mammakarzinom (Patienten 6 und 7) nachzuweisen (siehe Abbildung 27 und Abbildung 28 im folgenden Abschnitt 3.4).

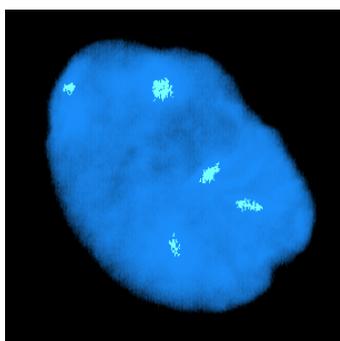
Hingegen wurden in den untersuchten Zellen der Tumorgewebeproben von 3 weiteren Patienten Monosomien des Chromosoms 8 nachgewiesen, sodass in diesen Zellen nur noch ein *NBS1*-Allel vorlag (die BAC-Sonde BAC159I23 zeigte nur ein Signal, siehe Abbildung 26). Auch diese drei Patienten waren zuvor als heterozygote 657del5-Merkmalsträger identifiziert worden, wobei es sich bei den Tumorarten um ein kolorektales Karzinom (Patient 2), ein malignes Melanom (Patient 3) und ein Mammakarzinom (Patient 8) handelte (siehe Abbildung 27 und Abbildung 28 im folgenden Abschnitt 3.4). In der Mammakarzinom-Gewebeprobe von Patient 7 waren neben den Polysomien zudem Monosomien in vielen Tumorzellen nachweisbar.

Patient Nr.	Tumorart	<i>NBS1</i> -Mutation	Anteil Tumorgewebe	FISH-Analyse
1	Melanom	657del5	ca. 50 %	Trisomie 8 ~25 % Tetrasomie 8 ~18 %
2	Kolorektales Karzinom	657del5	ca. 70 %	Monosomie 8 ~23 %
3	Melanom	657del5	ca. 80 %	Monosomie 8 ~24 %
4	Kolorektales Karzinom	657del5	ca. 100 %	Tetrasomie 8 ~27 % Pentasomie 8 ~26 %
5	Leiomyosarkom	657del5	k. A.*	Trisomie 8 ~28 % Tetrasomie 8 ~16 %
6	Mammakarzinom	657del5	k. A.*	Trisomie 8 ~26 % Tetrasomie 8 ~21 %
7	Mammakarzinom	657del5	k. A.*	Polysomie 8 ~14 % Monosomie 8 ~37 %
8	Mammakarzinom	657del5	k. A.*	Monosomie 8 ~10 % Trisomie 8 ~44 %

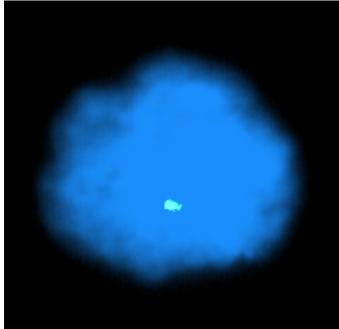
\*zu den Tumorproben der Patienten 5 bis 8 waren keine Daten bezüglich des Anteils an Tumorgewebe verfügbar. Allerdings gilt auch für diese Proben, dass im Rahmen der Makrodissektionen möglichst nur Tumorzellen Eingang in die FISH-Analyse fanden.

**Tabelle 11:** Ergebnisse der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen an Tumorzellen von 8 Patienten.

Neben den 657del5-heterozygoten Tumorpatienten war ein weiterer Proband als heterozygoter Merkmalsträger der Mutation R215W identifiziert worden. In der Tumorgewebeprobe dieses Patienten mit einem Hodgkin-Lymphom waren in nahezu der Hälfte aller untersuchten Zellen beide Chromosomen 8 vorhanden (die CEP8 und die Kontrollsonde BAC293K1 zeigten jeweils zwei Signale), jedoch konnte in diesen Zellen *kein* Fluoreszenzsignal für die spezifische *NBS1*-Sonde BAC159I23 detektiert werden, sodass hiermit auf das Fehlen von *NBS1*-Genen in diesen Zellen geschlossen werden konnte.



**Abbildung 25:** Interphase-Zellkern mit 5 detektierbaren grün fluoreszierenden Signalen der für die *NBS1*-Genregion spezifischen BAC-Sonde BAC159I23. Es kann somit auf das Vorliegen von 5 *NBS1*-Genkopien innerhalb der Zelle geschlossen werden.



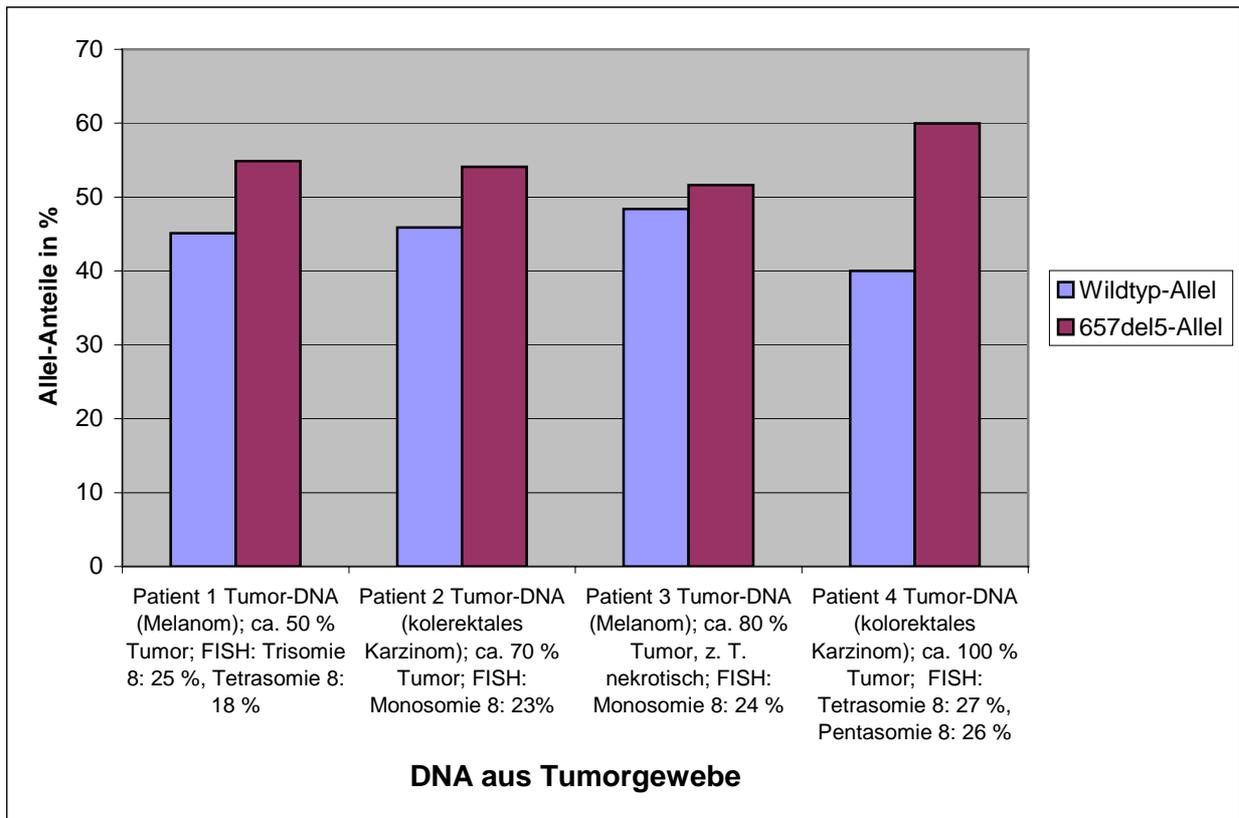
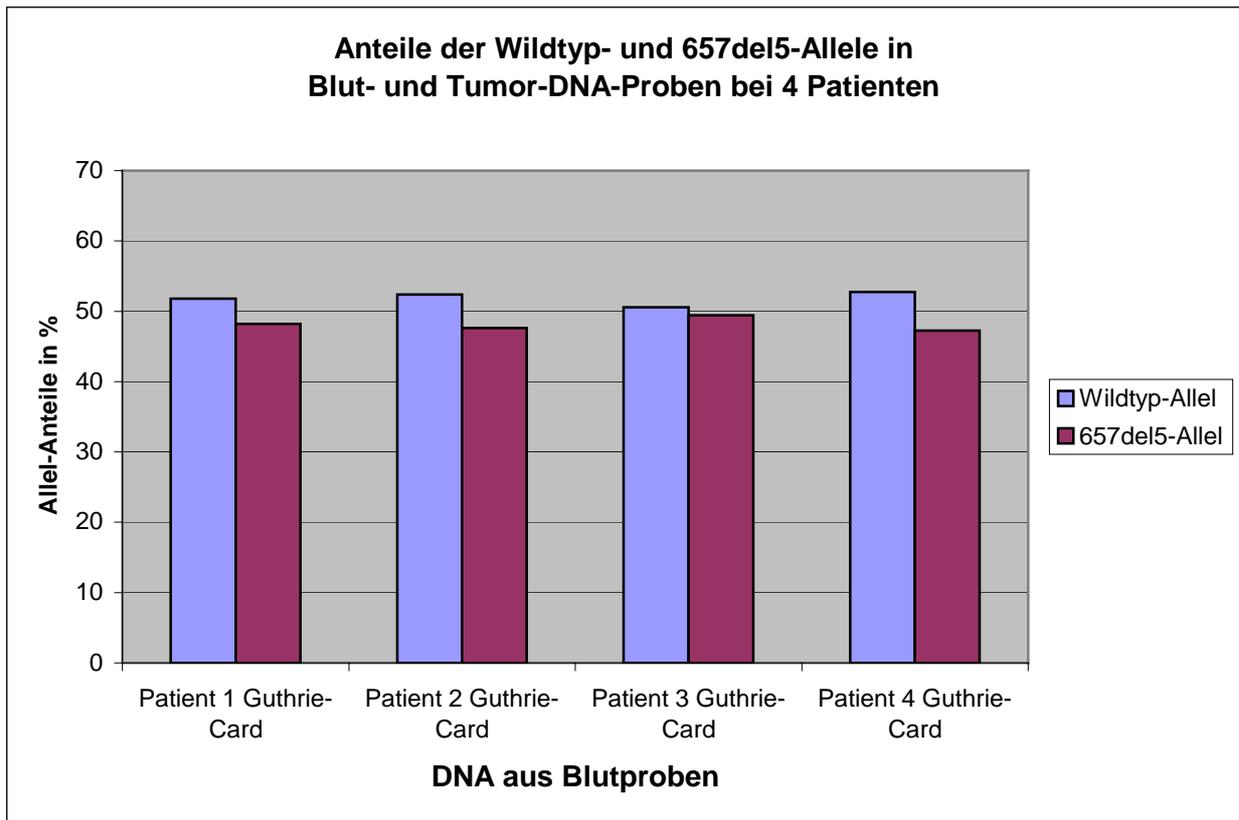
**Abbildung 26:** Lediglich ein Signal der BAC-Sonde BAC159I23 ist innerhalb dieser Tumorgewebezelle zu detektieren. Somit liegt offenbar nur eine Kopie des *NBS1*-Gens vor.

### 3.4 Quantitativer Vergleich des Anteils von Wildtyp- und deletierten *NBS1*-Allelen in Proben des peripheren Blutes und Tumorgewebeproben

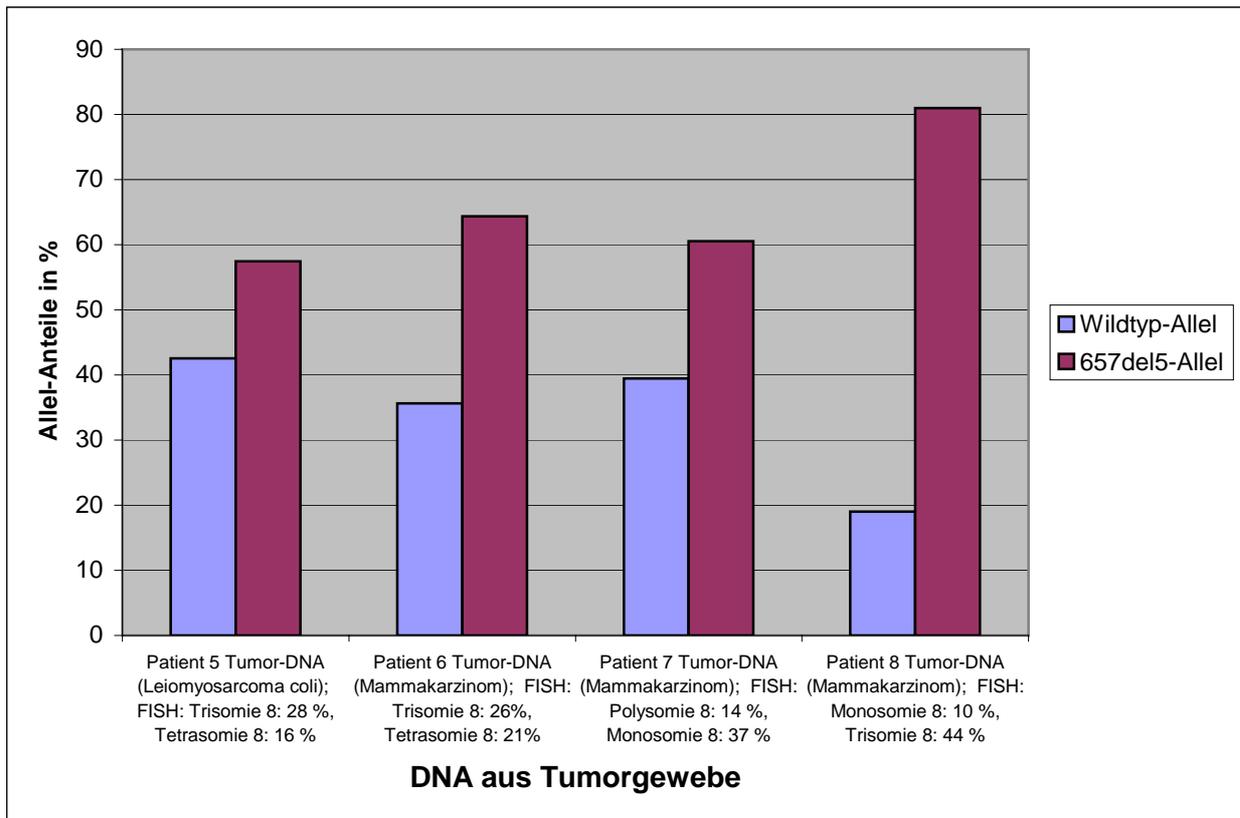
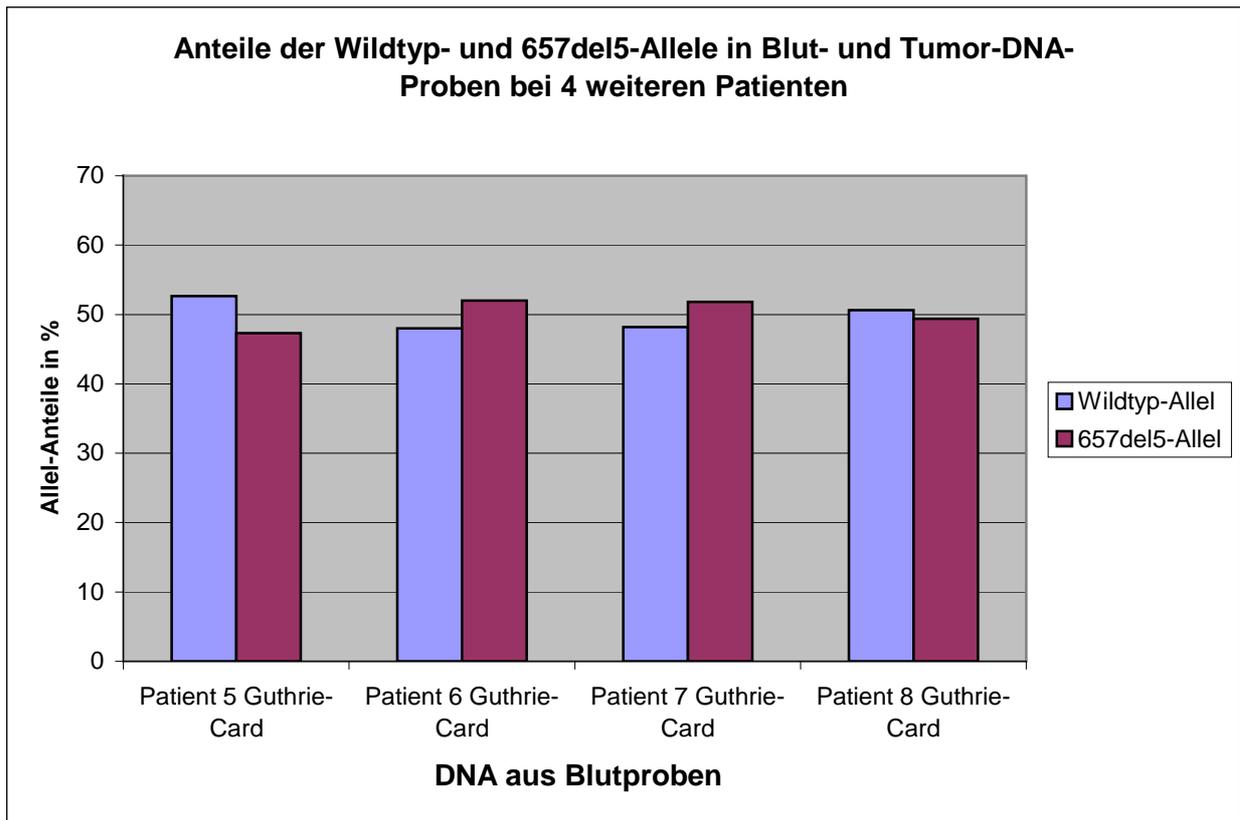
Im Rahmen der FISH-Analysen waren in den untersuchten Tumorgewebeproben einerseits Tri-, Tetra- und sogar Pentasomien, andererseits Monosomien nachweisbar gewesen. Hierbei konnte mittels der zur Verfügung stehenden und verwendeten Sonden allerdings keine Differenzierung zwischen dem Vorliegen von Wildtyp- oder 657del5-Allelen vorgenommen werden. Um jedoch die Bedeutung des *NBS1*-Gens und in diesem vorhandene 657del5-Mutationen bei der Tumorentstehung weitergehend zu evaluieren, wurden im Anschluss an die FISH-Analysen die Anteile an Wildtyp- und 657del5-Allelen in den Tumorgeweben bestimmt und mit den Anteilen in den Blutproben der jeweiligen Tumorpatienten verglichen.

Zunächst war Tumorgewebe von insgesamt 4 Patienten verfügbar, die zugleich heterozygote Merkmalsträger der Deletion 657del5 waren. Der Anteil von Wildtyp- und deletierten *NBS1*-Allelen wurde bei allen 4 Probanden jeweils in einer Probe des peripheren Blutes (Guthrie-Card) und in einer DNA-Probe des Tumorgewebes ermittelt. Während sich das Verhältnis der Wildtyp- und 657del5-Allele in den Blutproben aller 4 Patienten jeweils als nahezu gleich hoch darstellte (Patient 1: 52:48 %, Patient 2: 52:48 %, Patient 3: 51:49 %, Patient 4: 53:47 %, siehe Abbildung 27), zeigten sich in den DNA-Proben der Tumorgewebe hingegen z. T. deutliche Unterschiede in den Anteilen an Wildtyp- und 657del5-Allelen (Patient 1 (Melanom): 45:55 %, Patient 2 (kolorektales Karzinom): 46:54 %, Patient 3 (Melanom): 48:52 %, Patient 4 (kolorektales Karzinom): 40:60 % (jeweils Allelanteile Wildtyp:657del5 in %, Werte auf ganze Zahlen gerundet, siehe Abbildung 27).

Im Rahmen der Fortführung des Screeningprogramms bezüglich heterozygoter 657del5-Merkmalsträger unter Tumorpatienten am M. Skłodowska-Curie Memorial Cancer Center und Institut für Onkologie der Universitätsklinik Warschau konnten weitere 4 Patienten als solche identifiziert werden. Auch in den DNA-Proben aus dem peripheren Blut und dem Tumorgewebe dieser 4 weiteren Patienten zeigte sich der zuvor festgestellte Unterschied in den Anteilen an Wildtyp- und 657del5-Allelen. Während sich bei einem Vergleich die Anteile beider Allele in den Proben des peripheren Blutes bei allen 4 weiteren Proben erneut als ähnlich hoch darstellten (Patient 5: 53:47 %, Patient 6: 48:52 %, Patient 7: 48:52 %, Patient 8: 51:49 %, siehe Abbildung 28), waren die Unterschiede in den Allelanteilen in den Tumor-DNA-Proben noch sehr viel deutlicher ausgeprägt (Patient 5 (Leiomyosarcoma coli): 43:57 %, Patient 6 (Mammakarzinom): 36:64 %, Patient 7 (Mammakarzinom): 39:61 %, Patient 8 (Mammakarzinom): 19:81 %, (jeweils Allelanteile Wildtyp:657del5 in %, Werte auf ganze Zahlen gerundet, siehe Abbildung 28).



**Abbildung 27:** Anteile der Wildtyp- und 657del5-Allel in Blut- und Tumor-DNA-Proben bei 4 Patienten.



**Abbildung 28:** Anteile der Wildtyp- und 657del5-Allele in Blut- und Tumor-DNA-Proben bei 4 weiteren Patienten.