

4 Diskussion

Die im Rahmen dieser Studie ermittelten Ergebnisse zur Häufigkeit verschiedener Mutationen im Exon 6 des *NBS1*-Gen einerseits innerhalb der beiden untersuchten Neugeborenenkollektive aus Berlin und Bayreuth und andererseits unter den polnischen Tumorpatienten sollen auch unter Beachtung von bereits verfügbaren Literaturdaten zu verschiedenen Studien diskutiert werden. Darüber hinaus sollen die ermittelten Unterschiede in den Anteilen an Wildtyp- und 657del5-Allelen in den Blut- und Tumorgewebe-DNA-Proben der einzelnen heterozygoten 657del5-Merkmalsträger erörtert sowie die zugehörigen Daten der FISH-Analyse interpretiert werden. Hierzu werden in Kapitel 4.1 zunächst die Prävalenzraten heterozygoter Merkmalsträger der Mutationen 657del5 und R215W innerhalb der untersuchten deutschen Neugeborenenkollektive verglichen und sodann eine Einordnung in die zuvor in der Literatur beschriebenen Mutationsfrequenzen innerhalb von Studienkollektiven aus verschiedenen europäischen Ländern vorgenommen. In Kapitel 4.2 erfolgt eine Beurteilung der Häufigkeiten heterozygoter Mutationsträger unter den polnischen Tumorpatienten unter Berücksichtigung einer Kontrollgruppe sowie auch im Hinblick auf die zuvor in der Literatur beschriebenen Frequenzdaten. Schließlich wird in Kapitel 4.3 die Bedeutung der unterschiedlichen Anteile an Wildtyp- und 657del5-Allelen in den Blutproben im Vergleich mit den Anteilen in den Tumorgewebeproben diskutiert, wobei auch die zur Verfügung stehenden FISH-Daten berücksichtigt werden.

4.1 Vergleich der Prävalenzrate heterozygoter Merkmalsträger der Mutationen 657del5 und R215W innerhalb der untersuchten deutschen Neugeborenenkollektive

Insgesamt waren 2046 auf Guthrie-Cards fixierte Blutproben von Neugeborenen aus den Studienzentren in Berlin und Bayreuth untersucht worden. Die innerhalb dieser beiden Probandengruppen ermittelten Frequenzen heterozygoter Merkmalsträger sollen zunächst miteinander verglichen und im Folgenden im Hinblick auf die in der Literatur beschriebenen Frequenzergebnisse in anderen Studienpopulationen diskutiert und bewertet werden.

Werden die ermittelten Frequenzen heterozygoter Merkmalsträger der Mutation R215W miteinander verglichen, so bleibt festzustellen, dass unter den gescreenten 990 Berliner Neugeborenen 1 heterozygoter Merkmalsträger der Mutation R215W und unter den 1056 Bayreuther Neugeborenen 2 heterozygote Merkmalsträger dieser Mutation identifiziert werden konnten. Somit ergab

sich für die Berliner Neugeborenen eine Frequenz von 1:990, für die Bayreuther Neugeborenen eine Frequenz von 1:528 für die Mutation R215W, sodass sich bei einem direkten Vergleich der Frequenzen in den beiden Studienkollektiven die Frequenz der heterozygoten R215W-Merkmalsträger unter den Neugeborenen aus Bayreuth insgesamt höher als unter den Neugeborenen aus Berlin darstellte. Strebt man darüber hinaus einen statistischen Vergleich mit Hilfe von „Fishers exaktem Test“ an, so war die Frequenz der Individuen mit einer Mutation R215W unter den Bayreuther Neugeborenen zwar höher als unter den Berliner Neugeborenen, allerdings nicht auf einem statistisch signifikanten Niveau ($p = 1,00 > 0,05$; statistische Signifikanz wurde für $p < 0,05$ angenommen).

Ein wesentlich deutlicherer Unterschied der Mutationsfrequenzen ist bei einem Vergleich der Häufigkeit heterozygoter Merkmalsträger einer Gründer-Mutation 657del5 im Exon 6 des *NBS1*-Gens unter den gescreenten Neugeborenen beider Studienkollektive auszumachen. Ergab die ermittelte Heterozygoten-Frequenz innerhalb des Berliner Neugeborenenkollektivs aufgrund der Identifizierung eines 657del5-Heterozygoten einen Wert in Höhe von 1:990, lag sie unter den Bayreuther Neugeborenen bei sechs entdeckten heterozygoten Mutationsträgern mit 1:176 um ein Vielfaches darüber, wenngleich auch dieser Frequenzunterschied statistisch nicht signifikant war ($p = 0,1257 > 0,05$).

Neben einem Frequenzvergleich der Mutationen 657del5 und R215W innerhalb der untersuchten Neugeborenenkollektive aus Berlin und Bayreuth erscheint auch ein Vergleich der ermittelten Frequenzen mit denjenigen Mutationsfrequenzen sinnvoll, wie sie in zahlreichen Publikationen für verschiedene Neugeborenen- und Patientenkollektive beschrieben wurden.

Aufgrund der Häufung der Fälle von Kindern, die klinisch die für ein Nijmegen Breakage Syndrom charakteristischen Symptome – wie eine Mikrozephalie, ein typisches kraniofaziales Erscheinungsbild und eine Entwicklungsverzögerung – aufwiesen, insbesondere in verschiedenen osteuropäischen Staaten, hierunter vor allem in Polen und in der Tschechischen Republik, wurden nach der Identifizierung einer Vielzahl pathologischer Mutationen im *NBS1*-Gen verschiedene Untersuchungen zur Bestimmung der Frequenz heterozygoter Merkmalsträger pathologischer Allelvarianten innerhalb der Bevölkerung in diesen Ländern durchgeführt. Da die „slawische Mutation“ 657del5 für über 90 % der weltweit diagnostizierten NBS-Fälle verantwortlich gemacht wird, konzentrierten sich die Studien dabei insbesondere auf diese pathologische Mutation (Seemanova et al. 1985, Wegner et al. 1988, Chrzanowska et al. 1995, van der Burgt et al. 1996, Hiel et al. 2000, Seemanova et al. 2004).

Darunter befanden sich Studien, die sich ausschließlich auf die Erforschung der Frequenz dieser Mutation innerhalb von Neugeborenenkollektiven aus verschiedenen osteuropäischen Ländern konzentrierten (Varon et al. 2000, Seemanova et al. 2004). Daneben wurden die Frequenzen von Merkmalsträgern „slawischer Mutationen“ jedoch auch in Kollektiven bestehend aus gesunden erwachsenen Probanden ermittelt, die als Kontrollgruppen in verschiedenen osteuropäischen Studien zur Beurteilung eines möglichen Zusammenhangs einer Heterozygotie für die Mutation 657del5 und der Prädisposition zur Entwicklung verschiedener maligner Tumorerkrankungen dienten (siehe hierzu auch die Diskussion zu 4.2).

Die bisher umfassendste Untersuchung zur Bestimmung der Frequenz von 657del5-Mutation unter Neugeborenen wurde im Jahr 2000 von Varon et al. veröffentlicht, im Rahmen derer die vorhandene Frequenz der Mutation 657del5 in drei slawischen Neugeborenenpopulationen aus Polen, der Tschechischen Republik und der Ukraine ermittelt wurde. Insgesamt konnten unter 4416 zufällig ausgewählten Neugeborenen aus diesen drei Ländern 25 heterozygote Merkmalsträger der Mutation 657del5 identifiziert werden, dies entsprach einer Gesamtfrequenz von einem heterozygoten 657del5-Merkmalsträger unter 177 Neugeborenen (Frequenz 1:177). Regional konnten hierbei jedoch zum Teil erhebliche Unterschiede beobachtet werden. Bei einer Gesamtfrequenz von 1:190 in Polen schwankten die Mutationsprävalenzen unter den polnischen Neugeborenen zwischen 1:90 in der Region um Nowy Sacz, 1:189 in der Region um Krosno und 1:314 in Krakau. Dies war insbesondere deswegen erstaunlich, da diese drei in Südpolen gelegenen Städte geographisch nah beieinander liegen. Für die Neugeborenen in der Tschechischen Republik ergab sich eine Prävalenz der heterozygoten 657del5-Merkmalsträger von 1:154, in der Ukraine eine Frequenz von 1:182 (Varon et al. 2000, vgl. Tabelle 12).

Eine ähnliche Studie wurde von Seemanova et al. (2004) vorgestellt. Da zahlreiche Kinder in der Slowakei mit einem Nijmegen Breakage Syndroms diagnostiziert worden waren, sollte mit dieser Studie das Vorkommen heterozygoter Merkmalsträger der Mutation 657del5 in der Bevölkerung der Slowakei quantifiziert werden. Unter den insgesamt 2996 untersuchten Neugeborenen, die in den Jahren 2002 und 2003 in der Slowakei geboren worden waren, ließen sich jedoch lediglich drei heterozygote Merkmalsträger der Gründer-Mutation 657del5 ausmachen, sodass eine Frequenz von 1:999 ermittelt wurde (Seemanova et al. 2004, vgl. Tabelle 12).

Weitere Daten zu den Mutationsfrequenzen unter Neugeborenen konnten auch im Rahmen der breit angelegten Studie von Steffen et al. (2004) generiert werden, bei der für eine Kontrollgruppe die Blutproben von insgesamt 1620 Individuen des Neugeborenen-Screening-Programms der Woiwodschaft Masowien – einem in Zentralpolen gelegenen Verwaltungsbezirk, der auch die

Stadt Warschau mit einbezieht – hinsichtlich des Vorhandenseins von Merkmalsträgern der heterozygoten 657del5-Mutation untersucht wurden. Dabei ergab sich innerhalb dieses Neugeborenenkollektivs eine Frequenz von 1:162 für das Vorliegen einer 657del5-Mutation (Steffen et al. 2004, vgl. Tabelle 13).

Werden nun die innerhalb der deutschen Neugeborenenkollektive ermittelten Mutationsfrequenzen mit den Daten der vorgestellten Studien verglichen, so lässt sich feststellen, dass sich die unter den Bayreuther Neugeborenen ermittelte Prävalenz der heterozygoten 657del5-Merkmalsträger (1:176) als nahezu gleich hoch darstellt wie die Mutationsfrequenzen unter den Neugeborenen in den Studien von Varon et al. (2000, jeweilige Frequenzen in Polen 1:190, in der Ukraine 1:182, in der Tschechischen Republik 1:154; Gesamtfrequenz 1:177) und Steffen et al. (2004, Gesamtfrequenz 1:162).

Hingegen war die Mutationsfrequenz unter den Berliner Neugeborenen mit einem heterozygoten Merkmalsträger unter 990 Neugeborenen (1:990) wesentlich geringer als unter den Bayreuther Neugeborenen und war damit etwa vergleichbar mit dem Ergebnis der Studie von Seemanova et al. (Gesamtfrequenz 1:999).

Fragt man nun nach den möglichen Ursachen dafür, dass sich die unter den Bayreuther Neugeborenen ermittelte Frequenz heterozygoter 657del5-Mutationsträger in Höhe von 1:176 einerseits so deutlich von der Heterozygotenfrequenz unter den Berliner Neugeborenen unterscheidet, sich andererseits jedoch ähnlich hoch darstellt wie in verschiedenen gescreenten Neugeborenenkollektiven insbesondere aus Polen, der Ukraine und der Tschechischen Republik, so ist vor allem die historische Migration slawischer Bevölkerungsgruppen in das heutige Nordostbayern zu berücksichtigen. Dieses in der historischen Forschung als *Bavaria Slavica* bezeichnete Gebiet umfasst im Wesentlichen die Gebiete Oberfranken und die Oberpfalz.

Hierhin waren zwischen dem 6. und 9. Jahrhundert slawisch-stämmige Bevölkerungsgruppen aus dem Donaugebiet und dem böhmischen Raum eingewandert. In schriftlichen Quellen finden die Slawen in der Oberpfalz erstmals im Jahre 863 Erwähnung. In Orts- und Gewässernamen in Oberfranken und der Oberpfalz sind häufig auch heute noch slawische Namen oder Namensbestandteile erkennbar. Besonders deutlich ist dies bei einer Gruppe von Ortsnamen, die mit „Windisch-“, beginnen oder mit „-winden“ oder „-wind“ enden. Mit dieser Benennung wurde auf die als „Winden“ oder „Wenden“ bezeichneten Slawen hingewiesen, die in diesen Orten lebten (siehe Abbildung 29). Daneben weisen archäologische Funde, insbesondere Keramikgefäße mit typischen Wellenverzierungen, auf eine slawische Bevölkerung in diesen Regionen hin. Neben

diesen slawisch-stämmigen Bevölkerungsanteilen in Oberfranken und der Oberpfalz weist auch die Bevölkerung des Volksstammes der Sorben eine slawische Abstammung auf. Die schätzungsweise 60.000 Sorben leben heute überwiegend in der weiter nördlich gelegenen sächsischen Oberlausitz.

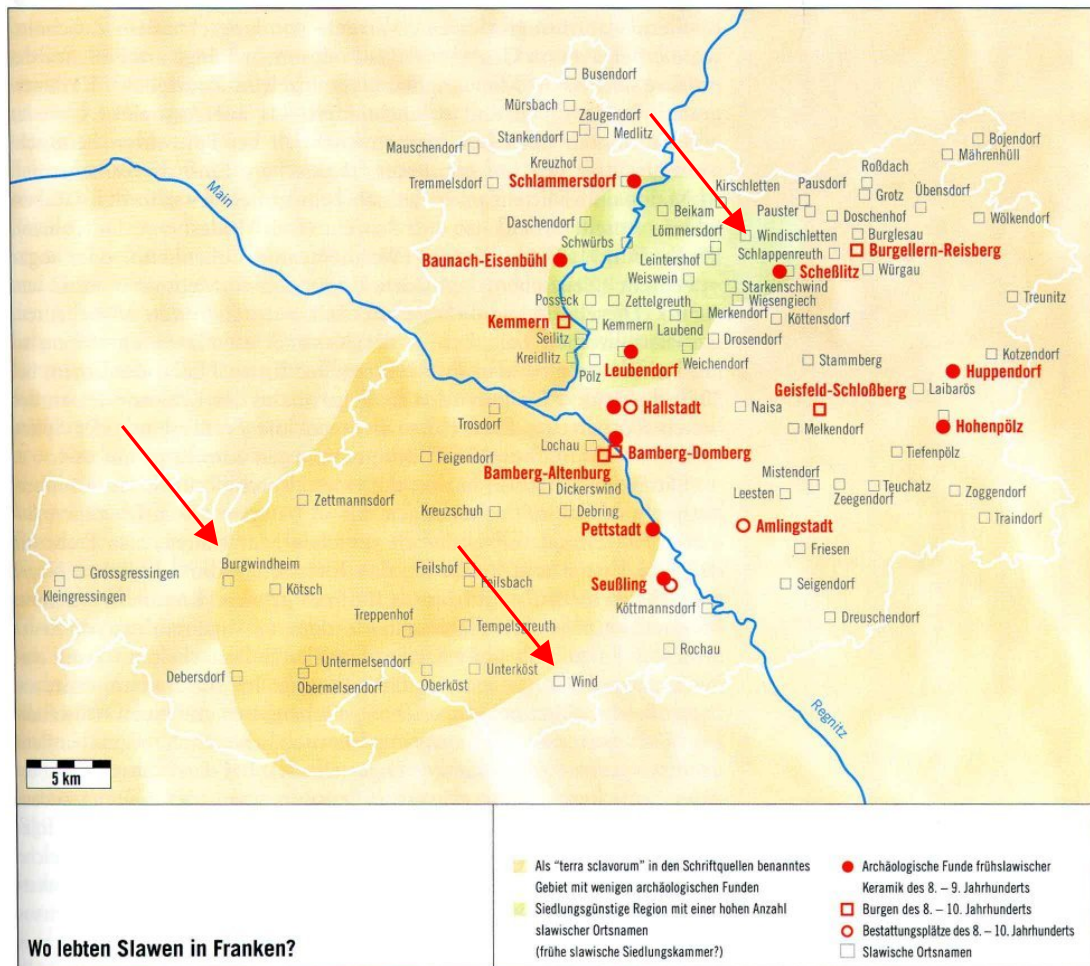


Abbildung 29: Karte mit slawischen Ortsnamen in der Region Bamberg in Oberfranken. Typisch sind Ortsnamen, die mit „Windisch-“, beginnen oder auf „-wind“ oder „-winden“ enden (siehe Pfeile, aus: Jahn et al.: Katalog zur Landesausstellung „Edel und Frei“ – Franken im Mittelalter).

Die in dieser Studie untersuchten Guthrie-Cards stammten von Neugeborenen aus der Region Bayreuth, dem Verwaltungssitz des Regierungsbezirks Oberfranken. Der hohe Anteil der Bevölkerung mit einer slawischen Abstammung in dieser Region kann durchaus als Erklärung dafür dienen, dass – vor dem Hintergrund einer ungewöhnlich hohen Anzahl von mit dem Nijmegen Breakage Syndrom diagnostizierter Kinder – unter den Neugeborenen aus dieser Region im Ver-

gleich zu den gescreenten Berliner Neugeborenen eine solch hohe Frequenz heterozygoter Merkmalsträger der Mutation 657del5 gefunden wurde.

Neben diesen vorgestellten Untersuchungen zur Erforschung der Mutationsprävalenz unter Neugeborenen waren auch die Frequenzen heterozygoter 657del5-Merkmalsträger innerhalb von Kontrollgruppen verschiedener Tumorstudien, in die gesunde Erwachsene eingeschlossen wurden, ermittelt worden.

Im Jahr 1999 veröffentlichten Carlomagno et al. eine Fall-Kontroll-Studie zur Abschätzung der Frequenz 657del5-heterozygoter Merkmalsträgerinnen innerhalb einer Gruppe deutscher Frauen mit einem zuvor diagnostizierten Mammakarzinom. Im Rahmen dieser Studie, in der erstmalig die deutsche Bevölkerung eine Berücksichtigung fand, wurde eine Kontrollgruppe bestehend aus 866 gesunden deutschen Probandinnen im Alter von unter 51 Lebensjahren untersucht, innerhalb derer sich aufgrund der Identifizierung einer heterozygoten 657del5-Merkmalsträgerin eine Frequenz von 1:866 ergab (vgl. Tabelle 12).

Weitere Studien zur Abschätzung der Prävalenz heterozygoter Merkmalsträger innerhalb von Patientenkollektiven mit einem bereits diagnostisch gesichertem Malignom verschiedener Entitäten wurden in den Jahren 2003 bis 2005 angestrebt. Als vergleichende Kontrollgruppen dienten jeweils Kollektive erwachsener gesunder Probanden, bei denen bisher noch keine Tumorerkrankung nachgewiesen worden war.

So publizierten Gorski et al. (2003) eine Studie zum Brustkrebsrisiko heterozygoter 657del5-Merkmalsträgerinnen, bei der sich innerhalb einer Kontrollgruppe von 530 polnischen Probanden aus der Region Stettin insgesamt 3 Heterozygote finden ließen, was einer Prävalenz von 1:177 für diese Mutation entsprach (vgl. Tabelle 12). Zu einem sehr ähnlichen Ergebnis kamen auch Cybulski et al. (2004) bei einer Untersuchung der Prädisposition heterozygoter 657del5-Merkmalsträger zur Entwicklung von Prostatakarzinomen. Unter den 1500 gesunden polnischen Probanden aus der Region um Stettin, die im Rahmen dieser Studie eine Kontrollgruppe darstellten, waren insgesamt 9 heterozygote 657del5-Merkmalsträger, sodass damit eine Frequenz von 1:167 für das Vorliegen einer „slawischen Mutation“ 657del5 in einem der beiden *NBS1*-Gene der Probanden ermittelt wurde (vgl. Tabelle 12). Auch Buslov et al. (2005) fanden eine ähnliche Prävalenz innerhalb einer in ihrer Studie beschriebenen Kontrollgruppe. Im Rahmen ihrer Untersuchung eines möglichen Zusammenhangs der 657del5-Heterozygotie und einer erhöhten Prädisposition für die Entwicklung eines Mammakarzinoms – im Gegensatz zur Studie

von Carlomagno et al. (1999) diesmal eine Patientinnengruppe aus St. Petersburg in Russland untersuchend – konnten die Autoren in der Kontrollgruppe unter 348 gesunden russischen Probandinnen 2 heterozygote 657del5-Merkmalsträgerinnen finden, woraus sich eine Frequenz von 1:174 ergab (vgl. Tabelle 12).

Dennoch war nicht in allen Studien unter den gesunden Probanden der Kontrollgruppen eine Frequenz heterozygoter Merkmalsträger in dieser Größenordnung bestätigt worden. So konnten Buslov et al. (2005) im Rahmen ihrer Studie innerhalb einer zweiten Kontrollgruppe, bestehend aus 344 gesunden älteren Frauen mit einem wesentlich höheren Durchschnittsalter als desjenigen der gesunden Frauen aus der ersten Kontrollgruppe, keine heterozygote Merkmalsträgerin ausmachen (vgl. Tabelle 12). Ebenso fanden Resnick et al. (2003) in einer insgesamt 548 gesunde Probanden umfassenden Kontrollgruppe aus Moskau in Russland keinen heterozygoten 657del5-Merkmalsträger. Darüber hinaus war auch innerhalb einer Kontrollgruppe der von Soucek et al. (2003) initiierten Studie zur Mutationsfrequenzbestimmung unter an einem Hodgkin- oder Non-Hodgkin-Lymphom erkrankten Tumorpatienten kein heterozygoter 657del5-Merkmalsträger zu finden. Dies steht im Gegensatz zu den Daten von Varon et al. (2000), die unter 1234 Neugeborenen aus der Tschechischen Republik eine Mutationsfrequenz von 1:154 ermittelt hatten.

Somit lassen sich auf der Grundlage der hier kurz vorgestellten Studien für die Frequenzen unter den gesunden erwachsenen Probanden der Kontrollgruppen insgesamt zwei Ergebnistrends feststellen. Entweder konnten gar keine für die Mutation 657del5 heterozygoten Merkmalsträger gefunden werden (Soucek et al. 2003, Resnik et al. 2003, Buslov et al. 2005), oder aber die in mehreren Studien ermittelten Mutationsfrequenzen stellten sich als etwa gleichgroß dar (Górski et al. 2003, 1:177; Cybulski et al. 2004, 1:167; Buslov et al. 2005, 1:174).

Strebt man nun nach einem Vergleich der ermittelten Mutationsfrequenzen unter den Berliner und Bayreuther Neugeborenen mit den Frequenzen in den Neugeborenenkollektiven anderer Studien (Varon et al. 2000, Seemanova et al. 2004, Steffen et al. 2004) auch einen Vergleich mit denjenigen Frequenzen, wie sie sich innerhalb der aus erwachsenen Probanden bestehenden Kontrollgruppen der kurz vorgestellten Studien darstellten, so lassen sich auch hierbei zwei Trendrichtungen unter den Ergebnissen ausmachen: Das unter den Bayreuther Neugeborenen ermittelte Ergebnis für das Vorliegen heterozygoter Merkmalsträger der 657del5-Mutation (1:176) ist nahezu identisch mit den Ergebnissen für die Kontrollgruppen insbesondere in den Studien von Górski et al. (2003; 1:177), Cybulski et al. (2004; 1:167) und Buslov et al. (2005; 1:174). Hingegen war das für die Berliner Neugeborenen ermittelte Ergebnis (1:990) durchaus

vergleichbar mit dem schon zuvor von Carlomagno et al. (1999) innerhalb einer Kontrollgruppe aus Deutschland beschriebenen Ergebnis (1:866).

Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass die ermittelte Prävalenz heterozygoter 657del5-Merkmalsträger unter den gescreenten Neugeborenen der beiden deutschen Studienkollektive aus Berlin und Bayreuth stark differierte.

Einerseits entsprach die Frequenz unter den Berliner Neugeborenen mit 1:990 etwa der aufgrund der Studie von Carlomagno et al. (1999) erwarteten Frequenz innerhalb der deutschen Bevölkerung. Andererseits war die sehr viel höhere Frequenz von heterozygoten Merkmalsträgern einer 657del5-Mutation innerhalb des untersuchten Neugeborenenkollektivs aus der Region Bayreuth vollkommen vereinbar mit der auffällig hohen Anzahl von Kindern aus dieser Region, bei denen ein Nijmegen Breakage Syndrom diagnostiziert werden konnte. Ein Grund hierfür ist der in Oberfranken und der Oberpfalz vorhandene höhere Anteil der Bevölkerung, der einen slawischen Ursprung aufweist. Dabei war die unter den Neugeborenen aus der Region Bayreuth ermittelte Frequenz heterozygoter 657del5-Merkmalsträger mit 1:176 ähnlich hoch wie in verschiedenen Neugeborenen- und gesunden Probandenkontrollgruppen aus solchen osteuropäischen Ländern, die einen hohen slawischen Bevölkerungsanteil und eine hohe Anzahl an vom Nijmegen Breakage Syndrom betroffenen Kindern aufweisen.

Literatur	Herkunft der untersuchten Individuen	Anzahl der untersuchten Individuen	Bekannter Tumor in der Vorgeschichte	Heterozygote Merkmals-träger der Mutation <i>657del5</i>	Frequenz
Carlomagno et al. (1999)	Deutschland	477	Ja, Mammakarzinom, Patientinnen jünger als 51 Jahre	1	1:477
	Deutschland	866	Nein, gesunde Kontrollgruppe bestehend aus Frauen unter 51 Jahren	1	1:866
Varon et al. (2000)	Tschechische Republik	1234	Nein, Neugeborenenkollektiv	8	1:154
	Ukraine (Region Lvov)	908	Nein, Neugeborenenkollektiv	5	1:182
	Polen (gesamt)	2274	Nein, Neugeborenenkollektiv	12	1:190
	Polen (Nowy Sacz)	452	Nein, Neugeborenenkollektiv	5	1:90
	Polen (Krakau)	1254	Nein, Neugeborenenkollektiv	4	1:314
	Polen (Krosno)	568	Nein, Neugeborenenkollektiv	3	1:189
	Gesamt	4416		25	1 :177
Górski et al. (2003)	Polen (Stettin)	150	Ja, histologisch gesichertes Mammakarzinom	2	1:75
	Polen (Stettin)	80	Ja, histologisch gesichertes Mammakarzinom, dieses zusätzlich auch bei Verwandten ersten Grades vorkommend	3	1:27
	Polen (Stettin)	530	Nein, Kontrollgruppe mit Individuen, die zufällig in der Region Stettin ausgesucht wurden	3	1:177
Soucek et al. (2003)	Tschechische Republik (Prag)	119	Ja, Patienten mit bekanntem Hodgkin- oder Non-Hodgkin-Lymphom	1	1:119
	Tschechische Republik	177	Nein, Kontrollgruppe bestehend aus Mitarbeitern des National Institute of Public Health, Medizinische Fakultät, Prag	0	–

Resnick et al. (2003)	Russland (Moskau)	68	Ja, nachgewiesenes malignes Lymphom	2	1:34
	Russland (Moskau)	548	Nein, gesunde Kontrollgruppe	0	–
Seemanova et al. (2004)	Slowakei	2996	Nein, Neugeborenenkollektiv	3	1:999
Buslov et al. (2005)	Russland (St. Petersburg)	173	Ja, bilaterales Mammakarzinom	2	1:87
	Russland (St. Petersburg)	700	Ja, unilaterales Mammakarzinom	5	1:140
	Russland (St. Petersburg)	348	Nein, Kontrollgruppe mit gesunden Frauen (Durchschnittsalter 38,6 Jahre)	2	1:174
	Russland (St. Petersburg)	344	Nein, Kontrollgruppe mit gesunden älteren Frauen (Durchschnittsalter 80,5 Jahre)	0	–
Cybulski et al. (2004)	Polen (Szcecin)	56	Ja, Prostatakarzinom; in der Familie zuvor bekannt	5	1:12
	Polen (Szcecin)	305	Ja, Prostatakarzinom; in der Familie zuvor nicht bekannt	7	1:44
	Polen (Szcecin)	1500	Nein, gesunde Kontrollen	9	1:167
Dębniak et al. (2003)	Polen (Stettin)	80	Ja, Malignes Melanom	2	1:40
	Polen (Stettin)*	530	Nein, gesunde Kontrollen	3	1:177
Diese Studie	Berlin	990	Neugeborenenkollektiv	1	1:990
	Bayreuth	1056	Neugeborenenkollektiv	6	1:176

*dieselbe Kontrollgruppe wie bei Górski et al. (2003)

Tabelle 12: Prävalenzen heterozygoter **657del5**-Mutationsträger: Ergebnisse verschiedener Screening- und Fall-Kontrollstudien (Literaturzusammenstellung 1999 bis 2005).

4.2 Beurteilung der Häufigkeiten heterozygoter Mutationsträger unter den polnischen Tumorpatienten unter Berücksichtigung einer Kontrollgruppe

Neben dem zuvor beschriebenen Screening der beiden Neugeborenenkollektive aus den Studienzentren Berlin und Bayreuth wurde eine zweite Probandengruppe von insgesamt 589 polnischen Patienten auf vorliegende Mutationen im *NBS1*-Gen untersucht. Bei allen Patienten war zuvor ein Malignom unterschiedlicher Entitäten nachgewiesen worden.

Bei insgesamt 9 dieser Patienten mit einem in der Krankengeschichte vorhandenen Tumorleiden konnte eine Mutation im *NBS1*-Gen bestätigt werden. Hierbei handelte es sich bei 5 Patienten um eine 657del5-Mutation, in 4 Fällen um die Mutation R215W. Dabei waren unter 123 Patienten mit einem bekannten kolorektalen Karzinom 2 heterozygote Merkmalsträger der Mutation 657del5 und 3 mit der Mutation R215W (Frequenzen 1:62 und 1:41). Eine heterozygote 657del5-Merkmalsträgerin fand sich unter 103 Probandinnen mit einem bekannten Mammakarzinom (Frequenz 1:103) und 2 Merkmalsträger für diese Mutation waren innerhalb einer Studiengruppe von 43 Patienten mit einem bekannten malignen Melanom (Frequenz 1:22) auszumachen. Schließlich war einer von insgesamt 16 untersuchten Probanden mit einem Hodgkin-Lymphom heterozygoter Merkmalsträger der Mutation R215W (siehe zusammenfassend Tabelle 13).

Bildet man zunächst die durchschnittliche Frequenz der Träger einer heterozygoten *NBS1*-Genmutation unter allen untersuchten 589 Tumorpatienten, so beträgt diese Frequenz für die „slawische Mutation“ 657del5 insgesamt 1:118, für die Mutation R215W hingegen 1:148 (vgl. Tabelle 13).

Um eine Bewertung der ermittelten Ergebnisse vornehmen zu können, ist auch die Frequenz verschiedener Mutationen im *NBS1*-Gen unter den Probanden einer Kontrollgruppe zu berücksichtigen. Die hier vorgestellten Untersuchungen an den Blutproben der polnischen Tumorpatienten waren Teil einer sehr breit angelegten Studie von Steffen et al. (2004), im Rahmen derer die Prävalenzen verschiedener *NBS1*-Genmutationen innerhalb verschiedener Patientengruppierungen mit unterschiedlichen Tumorerkrankungen in der Krankenvorgeschichte untersucht werden sollten. Eine Kontrollgruppe bestand aus 1620 Individuen des Neugeborenen-Screening-Programms der Woiwodschaft Masowien in Zentralpolen. Innerhalb dieser Kontrollgruppe konnte bei 10 Probanden die Mutation 657del5 festgestellt werden (Frequenz 1:162), die Mutation R215W hingegen bei 4 Individuen (Frequenz 1:405, siehe Tabelle 13).

Konnte unter allen polnischen Tumorpatienten für das Vorliegen einer heterozygoten 657del5-Mutation insgesamt eine Frequenz von 1:118 festgestellt werden, so betrug diese für die gesunden Neugeborenen der Kontrollgruppe lediglich 1:162. Hinsichtlich der Mutation R215W war in der Kontrollgruppe eines von je 405 Neugeborenen betroffen (1:405), von den Tumorpatienten jedoch einer unter 148 Patienten (1:148).

Vergleicht man die unter allen polnischen Tumorpatienten ermittelten Mutationsfrequenzen mit denjenigen innerhalb der Kontrollgruppe, so zeigten sich diese unter Verwendung von „Fishers exaktem Test“ statistisch nicht signifikant erhöht ($p = 0,5625 > 0,05$ für die Mutation 657del5 und $p = 0,2210 > 0,05$ für die Mutation R215W, siehe Tabelle 14 und Tabelle 15; statistische Signifikanz wurde für $p < 0,05$ angenommen). Dennoch ließ sich unter den gescreenten Tumorpatienten mit der Frequenz von 1:118 für das Vorliegen einer heterozygoten 657del5-Mutation eine leicht höhere Frequenz als in der Kontrollgruppe (1:162) feststellen. Die unter den Tumorpatienten ermittelte Mutationsfrequenz für die Mutation R215W war hingegen mit 1:148 deutlich höher als in der gesunden Kontrollgruppe (1:405; vgl. Tabelle 13, Tabelle 14 und Tabelle 15).

Zur Einschätzung der Bedeutung einer Heterozygotie für eine der beiden vorgestellten Mutationen und der Prädisposition für die Entwicklung maligner Tumoren soll im Folgenden auch ein weiterführender Vergleich der Frequenzen für die Mutationen 657del5 und R215W, die sich innerhalb der einzelnen Patientengruppen mit jeweils unterschiedlichen Tumoren in der Krankengeschichte finden ließen, mit denjenigen Frequenzen für beide Mutationen innerhalb der Kontrollgruppe nach Steffen et al. (2004) vorgenommen werden. Bei diesem statistischen Vergleich einzelner Gruppen von Tumorpatienten mit der Kontrollgruppe wurde wegen der geringen erwarteten Anzahl heterozygoter Merkmalsträger innerhalb der Probandengruppen „Fishers exakter Test“ verwendet. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beobachteten und erwarteten heterozygoten Merkmalsträgern beider Mutationen innerhalb der verschiedenen Probandengruppen mit unterschiedlichen Tumorleiden wurde jeweils für $p < 0,05$ angenommen.

So werden zunächst die verschiedenen Probandengruppen im Hinblick auf das Vorliegen heterozygoter Merkmalsträger mit der „slawischen“ 657del5-Mutation untersucht und mit der Kontrollgruppe verglichen (vgl. Tabelle 13 und Tabelle 14).

Unter den 123 Patienten mit einem zuvor diagnostizierten kolorektalen Karzinom befanden sich 2 nachweisbare heterozygote Merkmalsträger mit der Mutation 657del5 (Frequenz 1:62). Vergli-

chen mit der Mutationsfrequenz innerhalb der Kontrollgruppe (1:162) war diese zwar größer, jedoch nicht auf dem gewählten statistisch signifikanten Niveau ($p = 0,2056 > 0,05$).

Ein ebensolches Ergebnis ließ sich bei einem Vergleich der Gruppe der Patientinnen mit einem Mammakarzinom mit der Kontrollgruppe ermitteln. Da unter den 103 Patientinnen nur eine heterozygote Merkmalsträgerin der Mutation 657del5 beobachtet werden konnte (Frequenz 1:103), war dieses Ergebnis verglichen mit den erwarteten Merkmalsträgerinnen in dieser Patientinnengruppe nicht signifikant erhöht ($p = 0,4933 > 0,05$).

Statistisch signifikant erhöht war allerdings die Häufigkeit der Mutation 657del5 unter den 43 untersuchten Patienten mit einem malignen Melanom. Da 2 heterozygote Merkmalsträger mit dieser Mutation beobachtet werden konnten (Frequenz 1:22), war die Anzahl heterozygoter Merkmalsträger im Vergleich zu der Anzahl der erwarteten heterozygoten Merkmalsträger – basierend auf der Häufigkeit für diese „slawische Mutation“ innerhalb der Kontrollgruppe – signifikant erhöht ($p = 0,0366 < 0,05$, vgl. Tabelle 14).

Statistisch signifikant erhöhte Häufigkeiten heterozygoter Merkmalsträger der Mutation R215W konnten auch innerhalb beider Tumorpatientengruppen, in denen Merkmalsträger mit dieser Mutation beobachtet worden waren, festgestellt werden (vgl. Tabelle 13 und Tabelle 15).

So waren unter den 123 untersuchten Patienten mit einem kolorektalen Karzinom in der Krankengeschichte insgesamt 3 heterozygote Merkmalsträger der Mutation R215W ermittelt worden (Frequenz 1:41). Damit war die Häufigkeit in dieser Patientengruppe im Vergleich mit der Kontrollgruppe hinsichtlich des Vorliegens heterozygoter Merkmalsträger der Mutation R215W signifikant erhöht ($p = 0,0097 < 0,05$).

Darüber hinaus zeigte sich auch die Häufigkeit heterozygoter Merkmalsträger der Mutation R215W innerhalb der Gruppe bestehend aus 16 polnischen Patienten mit einem Hodgkin-Lymphom im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht ($p = 0,0480 < 0,05$), da unter diesen 16 Patienten mit einem Hodgkin-Lymphom ein heterozygoter Merkmalsträger der Mutation R215W identifiziert werden konnte (Frequenz 1:16, vgl. Tabelle 15).

Neben der Beurteilung des Vorliegens einer signifikant erhöhten Häufigkeit heterozygoter Merkmalsträger einer der beiden beschriebenen Mutationen innerhalb einzelner Tumorpatientengruppen ist auch eine Beurteilung der aufsummierten Anzahl beider Mutationsarten innerhalb einer Gruppe von Tumorpatienten im Vergleich mit der Kontrollgruppe denkbar. Werden also für die Gruppe der insgesamt 123 polnischen Patienten mit einem zuvor diagnostizierten kolorektalen Karzinom, innerhalb derer sich heterozygote Merkmalsträger sowohl für die Mutation

657del5 als auch für die Mutation R215W identifizieren ließen, die Anzahlen der Merkmalsträger addiert, so liegt verglichen mit der Kontrollgruppe eine statistisch signifikante Häufung „gepoolter“ heterozygoter Merkmalsträger innerhalb dieser Patientengruppe vor ($p = 0,0084 < 0,05$, beobachtete / erwartete Merkmalsträger: 5 / 1,063, Odds ratio 0,9821, 95 % Konfidenzintervall 0,3522-2,7387).

Studien- gruppen	Anzahl der unter- suchten Pro- banden	Anzahl hetero- zygoter Merk- mals-träger der Mutation <i>657del5</i>	Frequenz der Mutation <i>657del5</i>	Anzahl hete- rozygoter Merkmals- träger der Mutati- on <i>R215W</i>	Frequenz der Mutation <i>R215W</i>
Tumorpatienten	589	5	1:118	4	1:148
davon:					
kolorektales Karzinom	123	2	1:62	3	1:41
Mamma- karzinom	103	1	1:103	–	–
Hodentumor	100	–	–	–	–
Weichteil- sarkom	64	–	–	–	–
Malignes Mela- nom	43	2	1:22	–	–
Non-Hodgkin- Lymphom	24	–	–	–	–
Hodgkin- Lymphom	16	–	–	1	1:16
weitere Tumor- arten mit jeweils <15 Patienten	50	–	–	–	–
Kontroll- gruppe (Steffen et al. 2004)	1620	10	1:162	4	1:405

Bemerkung: Bei der Berechnung der Frequenzen wurde jeweils auf ganzzahlige Werte aufgerundet.

Tabelle 13: Häufigkeiten heterozygoter Mutationsträger unter den polnischen Tumorpatienten und innerhalb der Kontrollgruppe von Steffen et al. (2004).

Studien- gruppen	Anzahl der un- tersuchten Pro- banden insge- samt	Heterozygote Merkmalsträger der Mutation <i>657del5</i> beobacht / erwartet	Odds ratio (95 % Konfidenz- Intervall)	P-Wert ¹
Tumorpatienten	589	5 / 3,636	1,3784 (0,492 - 4,0497)	0,5625
davon Tumorarten mit > 1 nach- gewiesenen Mutationen:				
kolorektales Karzinom	123	2 / 0,759	2,6612 (0,5766 - 12,2824)	0,2056
Mamma- karzinom	103	1 / 0,636	1,5784 (0,2001 - 12,4512)	0,4934
Malignes Mela- nom	43	2 / 0,265	7,8537 (1,6677 - 36,9849)	0,0366
Kontrollgruppe (Steffen et al. 2004)	1620	10		

¹Fishers exakter Test, zweiseitig

Tabelle 14: Beobachtete und erwartete Häufigkeiten heterozygoter Merkmalsträger der **Mutation 657del5** im *NBS1*-Gen innerhalb der Patientengruppen mit unterschiedlichen Tumorerkrankungen.

Studien- gruppen	Anzahl der untersuchten Probanden insgesamt	Heterozygote Merk- malsträger der Mu- tation <i>R215 W</i> beobacht / erwartet	Odds ratio (95 % Konfidenz- Intervall)	P-Wert ¹
Tumorpatienten	589	4 / 1,454	2,7624 (0,6886 - 11,0812)	0,2210
davon Tumorarten mit > 1 nachgewiesenen Mutationen:				
kolorektales Karzinom	123	3 / 0,304	10,1 (2,2347 - 45,6477)	0,0097
Hodgkin- Lymphom	16	1 / 0,040	26,9333 (2,8400 - 255,4219)	0,0480
Kontrollgruppe (Steffen et al. 2004)	1620	4		

¹Fischers exakter Test, zweiseitig

Tabelle 15: Beobachtete und erwartete Häufigkeiten heterozygoter Merkmalsträger der **Mutation R215W** im *NBS1*-Gen innerhalb der Patientengruppen mit unterschiedlichen Tumorerkrankungen.

Neben einem Vergleich der Mutationsfrequenzen innerhalb der verschiedenen Patientengruppen (mit jeweils einer der unterschiedlichen Tumorarten) und innerhalb der Kontrollgruppe nach Steffen et al. (2004), erscheint es zudem sinnvoll, auch einen Vergleich mit denjenigen Mutationsfrequenzen vorzunehmen, wie sie für verschiedene Tumorpatientengruppen der in der Literatur beschriebenen Fall-Kontroll-Studien ermittelt worden waren (siehe skizzierte Studien weiter oben sowie jeweils Tabelle 12).

Drei verschiedene Studien hatten sich zuvor mit der Frequenz heterozygoter 657del5-Merkmalsträgerinnen innerhalb von Patientinnengruppen mit einer bekannten Mammakarzinom-Erkrankung befasst. Während Carlomagno et al. (1999) unter 477 deutschen Mammakarzinom-Patientinnen eine Frequenz von 1:477 heterozygoten Merkmalsträgerinnen für die Mutation 657del5 entdecken konnten, fanden Górski et al. (2003) bei 150 polnischen Patientinnen mit einem unilateralen Mammakarzinom aus der Region um Stettin eine Heterozygoten-Frequenz von

1:75, bei 80 Patientinnen mit einem Mammakarzinom, in deren Familien darüber hinaus diese Erkrankung zuvor bereits schon einmal diagnostiziert worden war, sogar eine Frequenz von 1:27. Im Rahmen einer ähnlich differenzierten Studie von Buslov et al. (2005) konnte unter 700 russischen Patientinnen aus der Region St. Petersburg mit einem nachgewiesenen unilateralen Mammakarzinom eine 657del5-Mutationsfrequenz von 1:140 beschrieben werden, unter 173 russischen Patientinnen mit einem bilateralen Mammakarzinom sogar eine Frequenz in Höhe von 1:87. Die im Rahmen der hier vorgestellten Untersuchung ermittelte Frequenz unter den insgesamt 103 polnischen Tumorpatientinnen mit einem gesicherten Mammakarzinom betrug 1:103, da eine für die Mutation 657del5 heterozygote Merkmalsträgerin identifiziert werden konnte.

Zwar stellen sich die Studienbedingungen bei der Untersuchung dieser sechs Patientinnen-Kollektive in vier verschiedenen Studien nicht vollkommen homogen dar, dennoch kann ein Frequenzvergleich der ermittelten heterozygoten 657del5-Merkmalsträgerinnen unter diesen Patientinnen mit einem Mammakarzinom angestrebt werden. Die unter den polnischen Mammakarzinom-Patientinnen ermittelte Frequenz in Höhe von 1:103 kann als etwa vergleichbar zu denjenigen Frequenzen aus den Studien von Górski et al. (2003, 1:75) und Buslov et al. (2005, unilaterales Mammakarzinom 1:87, bilaterales Mammakarzinom 1:140) angesehen werden, jedoch als sehr viel höher als die von Carlomagno et al. (1999) ermittelte Frequenz unter deutschen Brustkrebs-Patientinnen (1:477).

War unter den 103 gescreenten polnischen Patientinnen keine statistisch signifikante Häufung heterozygoter Merkmalsträgerinnen im Vergleich zur Kontrollgruppe vorhanden, so zeigte sich innerhalb der Studie von Górski et al. (2003) nur für die Gruppe der Patientinnen mit familiär gehäuft vorkommenden Mammakarzinomen ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Vorliegen einer 657del5-Mutation im Exon 6 des *NBS1*-Gens und solchen familiär gehäuft vorkommenden Brustkrebserkrankungen. Dieser statistisch signifikante Zusammenhang war hingegen jedoch nicht für die Gruppe der Patientinnen mit einem gesicherten Karzinom ohne familiäre Häufung nachweisbar.

Auch Buslov et al. (2005) stellten ein inhomogenes Ergebnis hinsichtlich der Signifikanz einer Häufung von Merkmalsträgerinnen mit einer 657del5-Mutation innerhalb der beiden untersuchten Patientinnenkollektive verglichen mit zwei verschiedenen Kontrollgruppen vor, sodass die Autoren lediglich einen geringen Einfluss von 657del5-Mutationen im *NBS1*-Gen und dem Auftreten von Brustkrebsfällen innerhalb der russischen Bevölkerung postulierten.

Neben diesen Studien stellten Dębniak et al. (2003) eine Studie zur Evaluierung eines Zusammenhangs zwischen dem Vorliegen von 657del5-Mutationen und der Entwicklung maligner Melanome vor. Die Autoren konnten innerhalb eines Patientenkollektivs von 80 Patienten aus der Region Stettin in Polen insgesamt 2 heterozygote 657del5-Merkmalsträger identifizieren und hieraus eine Frequenz von 1:40 berechnen.

Eine nahezu doppelt so hohe Frequenz von 1:22 konnte unter den hier untersuchten 43 von einem malignen Melanom betroffenen polnischen Patienten entdeckt werden. Hierbei konnte – unter Berücksichtigung der Limitation bei einer Beurteilung, die sich aufgrund der nur kleinen untersuchten Patientengruppe ergibt – eine statistische Signifikanz zwischen einer Heterozygotie für die 657del5-Mutation und der Prädisposition für die Entwicklung eines malignen Melanoms bestätigt werden, die im Rahmen der Studie von Dębniak et al. (2003) nicht nachgewiesen werden konnte.

Schließlich ist neben dem dargestellten Risiko der Entwicklung maligner Tumoren bei Heterozygoten von *NBS1*-Genmutationen auch das Tumorrisiko von Heterozygoten anderer Erkrankungen aus der Gruppe der Chromosomeninstabilitätssyndrome – wie beispielsweise der Ataxia Teleangiectasia (TA), der Fanconi-Anämie (FA) und des Bloom-Syndroms – zu diskutieren. Dies erscheint insofern als eine wichtige Fragestellung, da die verschiedenen Syndrome Gemeinsamkeiten in ihrer Pathogenese aufweisen (Shiloh et al. 1997, Zhao et al. 2000, Wu et al. 2000, Gatei et al. 2000) und in der Allgemeinbevölkerung von einem relevanten Anteil an heterozygoten Merkmalsträgern auszugehen ist.

Im Fall der Fanconi-Anämie und des Bloom-Syndroms stellt sich die Datenlage insgesamt einheitlich dar: Hatte Swift (1971) zunächst auf ein gehäuftes Auftreten von Tumorerkrankungen in Familien mit der Fanconi-Anämie hingewiesen, so konnte in einer späteren Untersuchung ein solches erhöhtes Krebsrisiko jedoch nicht mehr beobachtet werden (Swift et al. 1980). Für BS-Heterozygote konnte einerseits ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung kolorektaler Tumoren festgestellt werden (Gruber et al. 2002), was sich jedoch andererseits in einer weiteren Untersuchung nicht bestätigte (Cleary et al. 2003).

Daneben zeigten auch die Studien zur Beurteilung des Tumorrisikos von AT-Heterozygoten einheitliche Ergebnisse. In Familienuntersuchungen konnte für AT-Heterozygote vor allem ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Brustkrebs nachgewiesen werden (Swift et al. 1987, Swift et al. 1991, Inskip et al. 1999, Janin et al. 1999), bisher jedoch keine statistisch signifikante Assoziation von AT-Heterozygoten mit weiteren Tumorarten (Thompson et al. 2005).

Dabei unterscheiden sich die bei heterozygoten Trägern der die Chromosomeninstabilitätssyndrome verursachenden Mutationen zu diagnostizierenden Tumorarten von denjenigen, die bei homozygot betroffenen Patienten aufzufinden sind. Während bei den heterozygoten Merkmalsträgern vor allem solide Tumoren dominieren, sind bei NBS-Kindern insbesondere verschiedene Arten von Lymphomen diagnostizierbar, die auch bei AT-Patienten überwiegend im Kindesalter zu finden sind (Meyn 1997). Auch FA-Patienten haben eine Prädisposition für bösartige Neoplasien, wobei etwa 10 % der Patienten eine Leukämie entwickeln, bevor sie das 25. Lebensjahr erreichen (Tischkowitz et al. 2004).

4.3 Vergleich der Anteile an Wildtyp- und 657del5-Allelen in Blutproben und Tumorgeweben

Zuvor war das erhöhte Krebsrisiko heterozygoter Merkmalsträger von *NBS1*-Genmutationen sowie von heterozygoten Merkmalsträgern weiterer Erkrankungen aus der Reihe der Chromosomeninstabilitätssyndrome diskutiert worden. Abschließend soll nun unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen und der „real time PCR“ erörtert werden, inwieweit durch eine Verminderung des Anteils an Wildtyp-Allelen bzw. die Erhöhung des Anteils an 657del5-Allelen eine Entstehung von Tumoren erklärt werden kann.

Während im Rahmen der FISH-Analysen in einem Teil der Tumorgewebeproben ausgeprägte Polysomien nachgewiesen werden konnten (vgl. Patienten 1, 4, 5, 6, 7 und 8 in Tabelle 16), wurde in anderen Tumorgeweben das Vorliegen von Monosomien dokumentiert (vgl. Patienten 2, 3, 7 und 8 in Tabelle 16). Bei der im Folgenden durchgeführten „real time PCR“ waren bei 8 Patienten die Anteile der Wildtyp- und der 657del5-Allele sowohl in Proben des peripheren Blutes als auch in den Tumor-DNA-Proben bestimmt worden. Stellten sich innerhalb der Blutproben die Anteile der beiden Allele als annähernd gleich hoch dar (Unterschied höchstens 6 %, siehe Patienten 4 und 5), so zeigten sich für die Allelanteile in der Tumor-DNA zum Teil ganz erhebliche Unterschiede (siehe in Tabelle 16 beispielsweise Patient 4: 20 %, Patient 6: 28 %, Patient 8: 62 %). Damit konnte festgestellt werden, dass sich in der DNA der Tumorgewebe durchweg eine Verschiebung hin zu einem teilweise sehr deutlichen Überwiegen des 657del5-Allels ereignet hat.

Allerdings spiegeln diese mit Hilfe der RT-PCR ermittelten Anteile lediglich die durchschnittliche Kopienanzahl der Wildtyp- und 657del5-Allele in den DNA-Proben des Blutes und der Tu-

morgewebe wider. Es ist auch zu berücksichtigen, dass die Anteile an Tumorgewebe in den Gewebeproben zwischen 50 und 100 % betragen, jedoch mittels Makrodissektion möglichst nur Zellen des tatsächlichen Tumorgewebes entnommen und der weiteren Untersuchung zugeführt wurden. Dennoch ist davon auszugehen, dass bei der Bestimmung der Allelanteile in der TumordNA auch ein geringer Anteil an Nicht-Tumorgewebe Eingang gefunden hatte.

Es stellt sich die Frage, ob bei den heterozygoten 657del5-Merkmalsträgern die Tumoren dadurch entstanden sein könnten, dass durch eine zweite Mutation (engl. second hit) auch das *NBS1*-Wildtyp-Allel verloren gegangen ist, sich somit ein Verlust der ursprünglichen Heterozygotie (LOH = engl. Loss of Heterozygosity) ereignet hat. Da in solchen Zellen kein intaktes Nibrin mehr gebildet werden kann, ist es angesichts dessen Rolle bei der Aufrechterhaltung der genomischen Integrität nachvollziehbar, dass von solchen Zellen ein unkontrolliertes Wachstum und folglich eine Tumorentstehung ausgehen könnten.

Die Grundlage für solche Überlegungen stellt die 2-Treffer-Hypothese (engl. two-hit-hypothesis) nach Knudson (1971) dar. Ausgehend von Untersuchungen an Kindern mit einem Retinoblastom beschrieb Knudson die Bedeutung spontaner somatischer Mutationen in Tumorsuppressorgenen bei der Tumorentstehung. Dabei werden Tumorsuppressorgene als solche Gene bezeichnet, die für Proteine kodieren, welche den Zellzyklus kontrollieren oder bei irreversiblen DNA-Schädigungen den „programmierten Zelltod“ einleiten. Somit können diese Gene die Transformation einer Zelle in eine Tumorzelle verhindern. Mutationen in Tumorsuppressorgenen erhöhen hingegen die Wahrscheinlichkeit einer Tumorbildung. Dabei gilt für zahlreiche Tumorsuppressorgene die „two-hit“-Hypothese, welche impliziert, dass beide homologen Allele von einer inaktivierenden Mutation betroffen sein müssen, bevor die tumorsuppressive Wirkung verloren geht.

Ist beispielsweise in einem der homologen Allele eines Tumorsuppressorgens bereits eine inaktivierende Mutation vorhanden (weil diese entweder in der Keimbahn oder in einer Vorläuferzelle der späteren Tumorzelle entstanden ist), und ist diese Zelle später von einer zweiten Mutation betroffen, die auch die Funktion des zweiten bisher noch intakten Gens ausschaltet, so könnte diese Zelle maligne entarten. In diesem Fall liegt ein Verlust der ursprünglichen Heterozygotie vor (Knudson 1971, siehe Abbildung 30).

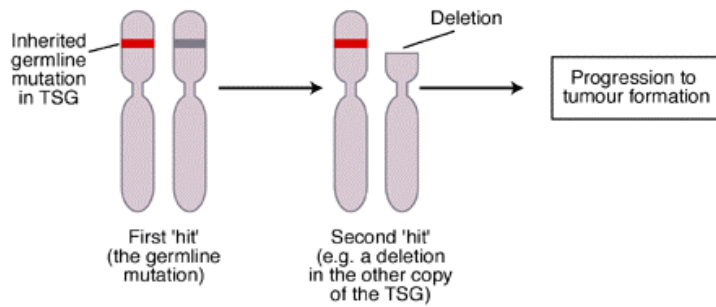


Abbildung 30: „Second-hit“-Theorie nach Knudson: In einer Zelle liegt bereits eine ererbte Mutation in einem der beiden homologen Tumorsuppressorgene (TSG) vor, sodass nur noch ein intaktes

Tumorsuppressorgen vorhanden ist. Durch ein zweites „Ereignis“ – beispielsweise durch das Einwirken von Umwelteinflüssen wie ionisierender Strahlung auf die Zelle – geht das zweite TSG verloren und die Zelle wird zu einer unkontrolliert wachsenden Tumorzelle (Abbildung: expert reviews in molecular medicine, <http://www.ermm.cbcu.cam.ac.uk>).

Ein Zusammenhang zwischen einem Verlust der Heterozygotie des *NBS1*-Wildtyp-Allels und der Entstehung von Tumoren konnte bisher für verschiedene Tumorentitäten gezeigt werden. So fanden zunächst Górski et al. (2003) in Tumor-DNA-Proben von insgesamt 5 Patienten mit einem Mammakarzinom einen „Loss of Heterozygotie“ in allen fünf Proben, wobei die Verminderung des Wildtyp-Allels um mindestens 75 % als Schwellenwert für einen LOH gewählt wurde. In einer weiteren Studie zeigte sich in 3 von 5 Mammakarzinom-DNA-Proben eine Reduzierung des *NBS1*-Wildtyp-Allels, wobei in einer dieser Tumor-DNA-Proben ein vollständiger Verlust des Wildtyp-Allels feststellbar war (Buslov et al. 2005). In zwei weiteren Studien war ein solcher Verlust der ursprünglichen Heterozygotie in 7 von 8 DNA-Proben aus Prostata Tumoren (Cybulski et al. 2004) und in der Tumor-DNA zweier maligner Melanome nachweisbar (Dębniak et al. 2003).

Auch in den hier untersuchten Tumor-DNA-Proben soll ein möglicher Verlust der ursprünglichen Heterozygotie für das *NBS1*-Wildtyp-Allel diskutiert werden. Hierzu werden unter Berücksichtigung der Ergebnisse der FISH-Untersuchungen modellhaft die Anzahlen der Wildtyp-Allele denen der 657del5-Allele gegenüber gestellt und das Allelanteilsverhältnis berechnet. Dabei soll angenommen werden, dass die überzähligen Chromosomen in den untersuchten Zellen stets ein 657del5-Allel tragen.

Zunächst werden beispielhaft die Ergebnisse von Patient 4 betrachtet (siehe hierzu Tabelle 16): Insgesamt wurden bei den Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen 46 % diploide Zellen mit je einem Wildtyp- und einem 657del5-Allel festgestellt, sodass bei einer Untersuchung von

100 Zellen davon auszugehen wäre, dass jeweils 46 Kopien beider Allele vorlägen. Ferner wiesen 27 % der untersuchten Zellen eine Tetrasomie 8 auf, wobei in 100 Zellen theoretisch 27 Wildtyp- und 81 Allele mit der Mutation 657del5 vorhanden wären, wenn alle weiteren Chromosomen jeweils 657del5-Allele aufweisen würden. Entsprechend wären in den 26 % pentasomen Zellen 26 Wildtyp- und 104 657del5-Allel-Kopien enthalten. Insgesamt kann damit auf der Grundlage der FISH-Untersuchungen ein Anteil von 30 % Wildtyp-Allelen und 70 % 657del5-Allelen berechnet werden (siehe Tabelle 16). Entsprechende Berechnungen wurden auch für die Tumorgewebe aller weiteren Patienten vorgenommen.

Um einen möglichen „Loss of heterozygosity“ in den Tumorgeweben beurteilen zu können, sind die berechneten Allelanteile mit denjenigen zu vergleichen, wie sie mittels der RT-PCR in den Tumor-DNA-Proben tatsächlich ermittelt wurden. Hierbei sollen zunächst wieder die Ergebnisse von Patient 4 betrachtet werden. Es war angenommen worden, dass in den polysomen Zellen alle überzähligen Chromosomen 657del5-Allele aufweisen. Da die RT-PCR für die Tumor-DNA von Patient 4 einen Anteil von 40 % Wildtyp-Allelen ergab, war deren Anteil insgesamt noch um 10 % höher als auf der Basis der FISH-Analysen errechnet worden war. Hieraus kann gefolgert werden, dass, anders als zunächst angenommen, die überzähligen Chromosomen in den Tumorzellen offenbar nicht nur 657del5-Allele enthalten, sondern dass vielmehr hierunter auch Chromosomen zu finden sind, die ein Wildtyp-Allel aufweisen. Dies bedeutet zugleich, dass sich für diese Tumorprobe kein Hinweis auf einen LOH ergibt. Dieser Mechanismus dürfte daher im Tumorgewebe von Patient 4 nicht die Ursache für die maligne Entartung darstellen.

Entsprechende Berechnungen wurden auch für die Tumorgewebe aller weiteren Patienten durchgeführt (vgl. Tabelle 16). Dabei ließ sich in 5 weiteren Proben ein ähnliches Ergebnis ermitteln, wie es beispielhaft für den Patienten 4 beschrieben wurde. Auch für diese 5 Patienten stellte sich der Anteil an Wildtyp-Allelen in der RT-PCR jeweils höher dar als aufgrund der FISH-Ergebnisse theoretisch berechnet, wobei der Wildtyp-Anteil bei Patient 2 um 3 %, bei den Patienten 3 und 5 jeweils um 5 %, bei Patient 1 um 7 % und bei Patient 7 um insgesamt 10 % höher lag. Somit war auch bei diesen 5 Patienten kein Hinweis auf einen LOH als Ursache für die unterschiedlichen Allelanteile in der Tumor-DNA festzustellen. Damit stehen die Ergebnisse der bislang vorgestellten Patienten insgesamt im Gegensatz zu bisherigen Untersuchungen an Tumorpatienten (Górski et al. 2003, Dębniak et al. 2003, Cybulski et al. 2004 und Buslov et al. 2005), bei denen stets ein „Loss of Heterozygosity“ als Ursache für die Entstehung von Tumoren gewertet wurde.

Daneben lagen jedoch zwei Proben vor, bei denen sich die mittels der RT-PCR untersuchten Wildtyp-Allelanteile niedriger darstellten als die Wildtyp-Anteile in den Modellberechnungen auf der Grundlage der FISH-Analysen. Stellte sich diese Differenz bei Patient 6 mit 1 % vernachlässigbar gering dar, war der Wildtyp-Allelanteil bei Patient 8 um insgesamt 19 % niedriger als aufgrund der Modellannahmen berechnet (siehe jeweils Tabelle 16). Damit ist zumindest bei diesem Patienten davon auszugehen, dass der deutliche Unterschied in den Allelanteilen, wie durch die RT-PCR ermittelt, wohl nicht ausschließlich dadurch zu erklären ist, dass die überzähligen Chromosomen jeweils 657del5-Allele enthalten. Vielmehr muss hier auch ein Verlust des Wildtyp-Allels in den entsprechenden Tumorzellen (z. B. in den dokumentierten monosomen Zellen) in Betracht gezogen werden, wodurch letztlich der Anteil an Wildtyp-Allelen verringert worden wäre.

Patient Nr.	Tumorart	FISH-Analyse	Anzahl / Anteil Wildtyp-Allele	Anzahl / Anteil 657del5-Allele
1	Melanom	Trisomie 8 ~25 %	25	50
		Tetrasomie 8 ~18 %	18	54
		Diploide Zellen 57 %	57	57
		Σ	100	161
		%	38 %	62 %
		RT PCR	45 %	55 %
		Δ	7 %	
2	Kolorektales Karzinom	Monosomie 8 ~23 %	–	23
		Diploide Zellen 77 %	77	77
		Σ	77	100
		%	43 %	57 %
		RT PCR	46 %	54 %
		Δ	3 %	
3	Melanom	Monosomie 8 ~24 %	–	24
		Diploide Zellen 76 %	76	76
		Σ	76	100
		%	43 %	57 %
		RT PCR	48 %	52 %
		Δ	5 %	
4	Kolorektales Karzinom	Tetrasomie 8 ~27 %	27	81
		Pentasomie 8 ~26 %	26	104
		Diploide Zellen 47 %	47	47
		Σ	100	232
		%	30 %	70 %
		RT PCR	40 %	60 %
		Δ	10 %	

5	Leiomyosarkom	Trisomie 8 ~28 %	28	56
		Tetrasomie 8 ~16 %	16	48
		Diploide Zellen 56 %	56	56
		Σ	100	160
		%	38 %	62 %
		RT PCR	43 %	57 %
		Δ	5 %	
6	Mammakarzinom	Trisomie 8 ~26 %	26	52
		Tetrasomie 8 ~21 %	21	63
		Diploide Zellen 53 %	53	53
		Σ	100	168
		%	37 %	63 %
		RT PCR	36 %	64 %
		Δ	1 %	
7	Mammakarzinom	Monosomie 8 ~37 %	–	37
		Polysomie 8 ~14 %	14	70*
		Diploide Zellen 49 %	49	49
		Σ	63	156
		%	29 %	71 %
		RT PCR	39 %	61 %
		Δ	10 %	
8	Mammakarzinom	Monosomie 8 ~10 %	–	10
		Trisomie 8 ~44 %	44	88
		Diploide Zellen 46 %	46	46
		Σ	90	144
		%	38 %	62 %
		RT PCR	19 %	81 %
		Δ	19 %	

*in polysomen Zellen wurde von je einem Wildtyp-Allel und fünf weiteren 657del5-Allelen ausgegangen.

Tabelle 16: Gegenüberstellung der Wildtyp- und 657del5-Allelanteilsverhältnisse, wie sie für die einzelnen Patienten einerseits im Rahmen der RT-PCR-Untersuchungen ermittelt und andererseits auf der Grundlage der FISH-Untersuchungen in einem Modell berechnet wurden.

Werden bei einer Bewertung der Ursachen für eine maligne Entartung zunächst die Ergebnisse der Tumorprobe von Patient 8 betrachtet, so könnte ein „Loss of Heterozygosity“ den Ausgangspunkt für eine Tumorentstehung darstellen. In Zellen von heterozygoten 657del5-Merkmalsträgern, in denen nun auch das verbleibende Wildtyp-Allel verloren gegangen ist, kann kein intaktes Nibrin mehr gebildet werden. Damit können auch dessen Funktionen im Rahmen der Zellzyklus-Kontrolle und DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur nicht mehr gewährleistet werden, sodass solche Zellen ein höheres Risiko für eine maligne Entartung aufweisen dürften.

Dagegen erschien aufgrund der vorgestellten Ergebnisse bei 6 von 8 Tumorpatienten der Verlust des Wildtyp-Allels als Ursache für eine maligne Entartung unwahrscheinlich, vielmehr waren die höheren 657del5-Allelanteile mit der erhöhten Anzahl an 657del5-Allelen innerhalb der überzähligen Chromosomen in den untersuchten Tumorzellen zu begründen. Jedoch sollte diskutiert werden, durch welchen Mechanismus gerade bei diesen Patienten die Tumorentstehung zu erklären sein könnte. Einerseits kann durch das Wildtyp-Allel die Bildung von intaktem Nibrin noch gewährleistet werden, jedoch in geringerem Ausmaß als in Zellen, die zwei Wildtyp-Allele aufweisen. Andererseits ist eine Bildung von Nibrin durch 657del5-Allele nicht möglich, jedoch ist prinzipiell eine Translation in die beiden verkürzten Proteine p26 und p70 denkbar. Dabei weist das Proteinfragment p70 eine verbleibende Restfunktion auf, die *in vitro* nachgewiesen werden konnte (Demuth et al. 2004). Durch das Vorhandensein einer solchen Restfunktion lässt sich zudem erklären, weshalb für die Mutation 657del5 homozygote Individuen lebensfähig sind, obwohl im Gegensatz hierzu *NBS1*-Nullmutationen bei Mäusen durchweg eine embryonale Letalität verursachen (Zhu et al. 2001, Dumon-Jones et al. 2003).

Da in den Tumorproben der insgesamt 6 Patienten Nibrin weiterhin vorliegt, muss geprüft werden, ob dessen Funktion eventuell beeinträchtigt sein könnte. Den Ausgangspunkt für solche Überlegungen stellen die Untersuchungsergebnisse von Lee et al. (2003) dar, die zeigen konnten, dass MRE11 und Nibrin einen Komplex im Verhältnis von 1:1 bilden. Wird zudem berücksichtigt, dass auch das Proteinfragment p70 eine MRE11-bindende Domäne enthält, ist es leicht nachvollziehbar, dass in den untersuchten Tumorzellen das intakte Nibrin und das Fragment p70 um die freien Bindungsstellen des nur im begrenzten Umfang zur Verfügung stehenden Proteins MRE11 konkurrieren. In Zellen mit je einem Wildtyp- und einem 657del5-Allel mag noch eine quantitativ ausreichende Bindung des intakten Nibrins an MRE11 gewährleistet sein. Anders stellt sich die Situation jedoch in solchen Zellen dar, in denen neben einem Wildtyp-Allel mehrere 657del5-Allele vorliegen (vgl. FISH-Ergebnisse von Patient 4 mit bis zu vier weiteren 657del5-Allelen, Tabelle 16). In diesen Zellen würde Nibrin mit einer quantitativ sehr viel größeren Menge an p70 um die freien Bindungsstellen am MRE11-Protein konkurrieren, sodass in einem solchen Fall nur noch ein Bruchteil des Nibrins einen Komplex mit MRE11 bilden kann. Der MRN(p70)-Komplex weist zwar noch eine Restfunktion auf, allerdings kann dieser im Anschluss an eine Bestrahlung keine Reparaturfoci ausbilden, sodass diese Zellen insgesamt eine erhöhte genomische Instabilität und damit eine höhere Wahrscheinlichkeit einer malignen Entartung aufweisen (Carney et al. 1998, Ito et al. 1999, Cerosaletti et al. 2000).

Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass aufgrund des vorgestellten Modells eine Funktionseinschränkung des Nibrins und eine mögliche maligne Entartung in Zellen, die zuvor je ein

Wildtyp- und ein 657del5-Allel aufwiesen, durch eine Zunahme an 657del5-Allelen in diesen Zellen erklärt werden kann. Dies steht im Gegensatz zu bisherigen Überlegungen, bei denen die Tumorentstehung jeweils mit einem Verlust des verbleibenden Wildtyp-Allels bei heterozygoten 657del5-Merkmalsträgern begründet worden war.

Abschließend sei auf die therapeutische Relevanz der dargestellten Ergebnisse verwiesen. Während noch in den 1980er Jahren in Unkenntnis der molekulargenetischen Ursache des Nijmegen Breakage Syndroms die an Lymphomen erkrankten NBS-Kinder therapeutisch bestrahlt wurden und nicht selten an den Folgen der Bestrahlung verstarben, können diese heutzutage wirkungsvoll mit reduzierten Chemotherapieprotokollen behandelt werden (Seidemann et al. 2000, Barth et al. 2003, Stockklausner et al. 2006).

Eine geringfügig erhöhte Empfindlichkeit gegenüber einer Bestrahlung konnte *in vitro* auch für Zellen von heterozygoten *NBS1*-Mutationsträgern gezeigt werden (Neubauer et al. 2002). Hieraus ist einerseits ableitbar, dass bei solchen Individuen die Verwendung von diagnostischen bildgebenden Verfahren, bei denen ionisierende Strahlung verwendet wird, möglichst vermieden werden sollte. Daneben muss die Behandlung von 657del5-Heterozygoten, die einen Tumor entwickelt haben, differenziert betrachtet werden. Würde man davon ausgehen, dass diese Tumoren regelmäßig mit einem Funktionsverlust des MRN-Komplexes einhergehen, so müssten diese Tumorzellen eine extreme Empfindlichkeit gegenüber ionisierender Strahlung aufweisen. Eine Strahlentherapie wäre dann sehr erfolgversprechend. Im Rahmen der hier vorgestellten FISH- und RT-PCR-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass bei einem Großteil der untersuchten Tumoren eine solche Situation nicht vorzuliegen scheint. Daher muss auch die Behandlung der Tumoren von 657del5-Heterozygoten durch eine Strahlentherapie überdacht werden. Sicherlich besteht hier noch ein umfangreicher Forschungsbedarf, bevor eine abschließende Therapieempfehlung, möglichst differenziert nach Tumorentität und in Abhängigkeit der genetischen Konstitution der Tumoren, vorgenommen werden kann.