Aus dem Institut für Medizinische Genetik und Humangenetik
der Medizinischen Fakultät Charite – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Nijmegen Breakage Syndrom (NBS): Krebsrisiko bei Heterozygotie für die Mutationen 657del5 und R215W

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Frau Galina Stoyanova Maneva

aus Sofia

Gutachter: 1. Prof. Dr. K. Sperling

2. Prof. Dr. R.-D. Wegner

3. Priv.-Doz. Dr. Med. U. Baumann

Datum der Promotion: 18.11.2011

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 6

1.1. Das Nijmegen Breakage Syndrom (NBS) 6

1.1.1. Klinik des NBS 7

1.2. Molekulargenetische Grundlagen des NBS 11

1.3. Funktionen des *NBN*-Gens 15

1.3.1. Reparatur von Doppelstrangbrüchen 15

1.3.1.1. Homologe Rekombination 16

1.3.1.2. Non-homologous-end-joining 16

1.3.2. Zellzykluskontrolle 16

1.3.3. Aufrechterhaltung der Telomerenstabilität 17

1.3.4. Neue Erkentnisse über andere *NBN*-Funktionen 18

1.4. NBS und das Krebsrisiko 18

1.5. Neoplasien bei NBS-Patienten 19

1.5.1. B-Zell Lymphome 20

1.5.2. T-Zell Lymphome 22

2. Ziele 24

3. Materialien und Methoden 25

3.1. Patienten und Kontrollen 25

3.1.1. Patienten mit Non-Hodgkin Lymphomen 25

3.1.2. Patienten mit verschiedenen soliden Tumoren 25

3.1.3. Neugeborene Kontrollen 26

3.1.4. Tumor Proben von Heterozygote Patienten für die *NBN*-Mutationen 657del5 und R215W 26

3.2.Chemikalien und Biochemikalien 28

3.3. Verbrauchsmaterialien 29

3.4. Primers 29

3.4.1. Primer für die Fragmentanalyse 29
3.4.2. Primer für Exon 6 des *NBN*-Gens 29
3.4.3. SnaPShot Primer für die Mutation R215W 29
3.5. Kits 29
3.6. Geräte 30
3.7. Software 31
3.8. Statistik 31
3.9. Methoden 32
3.9.1. Polymerase Ketten Reaktion 32
3.9.2. Agarosegelelektrophorese 34
3.9.3. Fragmentanalyse 34
3.9.4. SnaPShot Primer Extension Methode 35
3.9.5. DNA-Sequenzierung 38
3.9.6. Vergleich von Tumor- vs Blut-Proben von *NBN* Heterozygoten 40
3.9.7. Überprüfung der Pathogenität der *NBN*-Mutaion R215W mit Hilfe von PolyPhen, Panther und Mutation Taster 40
4. Ergebnisse 41
4.1. Patienten mit non-Hodgkin Lymphomen 41
4.1.1. *NBN*-Mutation 657del5 41
4.1.2. *NBN*-Mutation 657del5 - Sequenzierung 44
4.1.3. *NBN*-Mutation R215W 47
4.1.4. *NBN*-Mutation R215W - Sequenzierung 50
4.2. Patienten mit soliden Tumoren 51
4.3 Kontrollen 52
4.4. Überprüfung der pathogenität der *NBN*-Mutation R215W 52
4.5. Semiquantitative PCR-Analyse von heterozygoten Tumor- Proben 55
5. Diskussion 57

5.1. Prävalenz der 657del5- und R215W-Mutationen bei NHL Patienten 59
5.2. Prävalenz der R215W-Mutation bei Patienten mit diversen soliden Tumoren und Kontrollen 62
5.3 *NBN*-Gen und Tumorogenese 63
6. Zusammenfassung 65
7. Verzeichnisse 66
7.1. Literaturverzeichnis 66
7.2. Abbildungsverzeichnis 77
7.3. Tabellenverzeichnis 78
7.4. Abkürzungsverzeichnis 79
8. Danksagung 81

1 Einleitung

1.1 Das Nijmegen Breakage Syndrom

Das Nijmegen Breakage Syndrom [NBS (MIM 251260)] ist eine autosomal rezessive Krankheit, die zu einer Gruppe hereditärer Syndrome gehört, die durch chromosomale Instabilität und erhöhtes Krebsrisiko charakterisiert sind. Zu dieser Gruppe gehören unter anderem das Bloom Syndrom, die Fanconi Anämie, Ataxia teleangiectasia (AT), Ataxia teleangiectasia-like - (ATLD), das Ligase IV- (LIGIV) und das Non-homologous end joining (NHEJ1) Syndrom. Das klinische Bild des NBS wurde zum ersten Mal im Jahre 1981 bei zwei niederländischen Patienten polnischer Herkunft beschrieben [1].

Im Jahre1985 berichteten Seemanova et al. über 9 tschechische Patienten mit einem anscheinend neuen Syndrom, charakterisiert durch Immundefizienz, Neigung zur Entwicklung von Malignomen, Mikrozephalie, sowie typische faziale Merkmale. Das Syndrom wurde nach seiner Beschreiberin das Seemanova Syndrom benannt [2]. Später wurde nachgewiesen, dass es sich bei dem Seemanova-Syndrom und dem NBS um die gleiche Krankheit handelt. Die meisten heutzutage bekannten Patienten mit diesem Syndrom sind slawischer Herkunft [3]. Krankheit verursachend sind Mutationen im *NBN*-Gen (früher *NBS1*).

Das Gen wurde 1997 auf Chromosom 8q21 lokalisiert [4] und ein Jahr später identifiziert [5, 6, 7]. Das von ihm kodierte Protein, Nibrin, ist an der DNA-Doppelstrangbruchreparatur, der Zellzykluskontrolle, der homologen Rekombination und der Aufrechterhaltung der Telomerenstabilität beteiligt [8, 9]. Zusammen mit der Identifizierung des *NBN*-Gens wurde die häufigste *NBN*-Mutation, die so genannte Gründer-Mutation, 657del5, entdeckt [7]. Obwohl die Krankheit weltweit beschrieben worden ist, hat das NBS die höchste Prävalenz in Osteuropa, u.a. in der tschechischen Republik und Polen. Über 95% der weltweit bekannten NBS-Patienten sind slawischer Abstammung und tragen die Gründer-Mutation, weshalb diese als „slawische Mutation“ bekannt ist.

Die Heterozygoten-Frequenz für diese Mutation variiert von 1/40 unter den Sorben der Oberlausitz [10] über 1/154 in der Tschechei bis 1/190 in Polen [11]. Die Patienten mit NBS werden in einem zentralen Register der “International Nijmegen Breakage Syndrome Study Group” erfasst [3].

1.1.1 Klinik des Nijmegen Breakage Syndroms

Die Patienten mit dem Nijmegen Breakage Syndrom weisen typische kranio-faziale Veränderungen auf (Abb.1).

Abb. 1. NBS Patient – 6 Monate alt mit den typischen kranio-fazialen Merkmalen des NBS (Krystyna H Chrzanowska and Camila K Janniger, 2009 eMedicine Specialties)

Die Mikrozephalie, d.h. ein verringerter Schädelumfang, gehört zu den obligaten Symptomen der Krankheit. Bei ca. 75% der Patienten ist die Mikrozephalie unmittelbar postnatal nachweisbar, bei den restlichen 25% der Patienten wird sie in den ersten Lebensmonaten deutlich. Der Kopfumfang liegt unter der dritten Perzentile im Vergleich zu den altersentsprechenden Normwerten [12, 13, 14, 2]. Die Mikrozephalie ist bei den NBS-Patienten besonders frontal betont und wie MRT-Untersuchungen zeigen, mit einer deutlichen Reduktion des Frontalhirnvolumens verbunden [15, 16, 17]. Post mortem Untersuchungen an NBS-Patienten zeigten, dass die für AT typische diffuse cerebellare Degeneration bei NBS-Patienten nicht nachzuweisen ist [18]. Andere Hirnanomalien, die bei NBS-Patienten beobachtet wurden, sind Zysten, Ventrikeldilatation sowie Agenesie von Teilen des Corpus callosum [15].
Untersuchungen an Nbs-Mäusen zeigen, dass das Gehirn deutlich kleiner ist, verglichen mit dem Gehirn bei Wildtyp-Tieren. Da Mäuse mit *Nbs*-Null-Mutationen nicht lebensfähig sind [19], handelt es sich bei diesen Tieren um Mäuse mit konditionalem Knockout für Nibrin [20]. Es zeigen sich Störungen bei der Myelinbildung und der Oligodendritenentwicklung. Diese Untersuchungen sprechen dafür, dass das *NBN*-Gen eine Rolle bei der Entwicklung der weißen Gehirnmasse haben könnte [21]. Auch Lammens et al. kommen zu dem Schluss, dass *NBN* eine wichtige Rolle bei der Kortikogenese spielt [22]. Es gibt auch Hinweise für die Rolle des *NBN* bei der Entwicklung und Funktion des visuellen Systems [23].

Die Mikrozephalie stellt ein sehr breites differentialdiagnostisches Kriterium dar. Sie kann durch Deformationen des knöchernen Schädels (Kraniosynostosen), metabolisch (Alkoholembryopathie, Phenylketonurie (PKU)), hypoxisch-ischämisch, infektiös (Toxoplasmose, konnatale Röteln, Zytomegalie Virus (CMV)) usw. verursacht sein.

Eine spezielle Gruppe stellen die primordialen Mikrozephalien dar, die autosomal rezessiv vererbt werden (MCPH1-MCPH7). Die verantwortlichen Gene für die MCPH1, MCPH3, MCPH4, MCPH5 , MCPH6 und MCPH7 sind *Mikrocephalin* bzw. *„Cyclin dependent kinase 5 regulatory associated protein 2“ (CDK5RAP2), „Centrosomal protein 152kDa“ (CEP152), „Abnormal spindle-like microcephaly associated gene“ (ASPM), „Centromeric protein J“ (CENPJ) und „SCL/TAL1 interrupting locus“ (STIL)*. Für MCPH2 wurde bisher nur der Lokus 19q13.1-13.2 bestimmt [24, 25, 26, 27, 28]. Die primordialen Mikrozephalien sind differentialdiagnostisch von NBS abzugrenzen.

Ein moderater proportionierter Kleinwuchs ist auch ein typisches Symptom des NBS. Das Köpergewicht entwickelt sich proportional zu der Körpergröße. Die statomotorische und mentale Entwicklung der Kinder ist anfangs normal. Bei den meisten Patienten liegt der Intelligenzquotient (IQ) in der frühen Kindheit im Normbereich. Eine mentale Retardierung entwickelt sich erst später, meistens im Schulalter. Etwa die Hälfte der NBS-Patienten weist eine leichte Retardierung auf. Bei ca. 10% wurde eine mittelgradige Ausprägung beobachtet. Über schwerste mentale Retardierung wurde bis heute nicht berichtet [29, 3, 30]. Insofern stellt das NBS bei einem mikrozephalen, ohne neurologische Defizite Kind osteuropäischer Herkunft mit anfangs normaler oder leicht beeinträchtigter Entwicklung, Immundefizienz eine wichtige Differentialdiagnose dar.

Neben der Mikrozephalie haben die NBS-Patienten andere charakteristische kraniofaziale Merkmale, wie ein prominentes Mittelgesicht mit langer Nase und langem Philtrum (Abb. 2). Die Stirn ist zurücktretend, die Lidachsen zeigen nach oben, lateral (Abb. 3). Es sind Retro-, Mikro- und Agnathie beschrieben worden. Das Gesamtbild dieser einzelnen Merkmale wurde in der Literatur als Vogelsgesicht (birdlike) beschrieben [31].

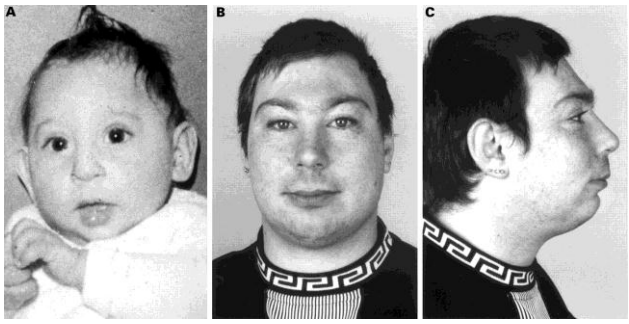
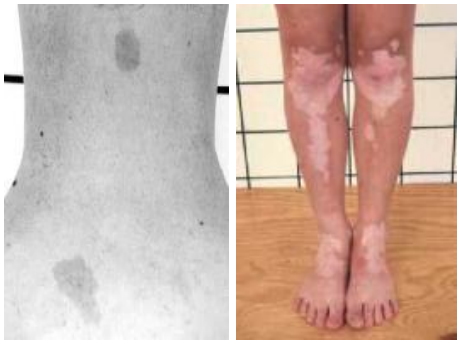


Abb.2. Patient mit NBS im Säulings- und Erwachsenenalter [3]

Abb.3. Mädchen mit NBS – Die Lidspalten zeigen deutlich nach oben lateral (Krystyna H Chrzanowska and Camila K Janniger, 2009 eMedicine Specialties)

Bei vielen NBS-Patienten kommen auch Hautveränderungen vor. Zu den häufigsten Hautmanifestationen gehören Epheliden, Café au-lait Flecken und Vitiligo.



(a) (b)

Abb. 4. Café au lait–like spots (a) und progressive vitiligo (b) bei Patienten mit NBS (Krystyna H Chrzanowska and Camila K Janniger, 2009 eMedicine Specialties).

Bei manchen NBS-Patienten wurden auch Fehlbildungen beschrieben, z. B. Hypospadien und ovariale Dysgenesien [32], Analstenosen und –atresien [2] sowie Harntraktanomalien [33]. Die

NBS-Patienten leiden an Fertilitätsstörungen [29].

Ein sehr wichtiges Merkmal der NBS-Patienten ist die humorale und zelluläre Immundefizienz. Laborchemisch zeigt sich ein Mangel an Immunglobulin G (IgG), u.a. IgG2 und IgG4, sowie IgA [34]. Es wurde auch über Patienten mit einer Agammaglobulinämie berichtet [3]. Ein normaler Immunstatus ist bei den NBS-Patienten eher die Ausnahme [13]. Die zelluläre Immundefizienz manifestiert sich durch eine erniedrigte B-Lymphozytenzahl, einen Mangel an CD3- und CD4-T-Lymphozyten sowie durch eine Beeinträchtigung der Funktion der T-Helferzellen, wodurch es zu gestörten zytotoxischen Effektormechanismen und einer verringerten Lymphokinproduktion kommt. Der CD4/CD8-Quotient ist bei Patienten mit NBS erniedrigt [29, 35, 36, 37].

Als Folge der Immundefizienz leiden die NBS-Patienten an schwere, rezidivierenden Infekte. Am häufigsten kommt es zu schweren bronchopulmonalen Infekten, Sinusitis als auch Harnwegsinfektionen [15, 3, 30]. Jedoch auch orale Läsionen, Gingivitis und Candidasis werden öfter beobachtet, verglichen zu der Häufigkeit bei nicht betroffenen Probanden [38].

Auf Chromosomenebene kommt es zu Aberrationen der Chromosomen 7 und 14 in Lymphozyten. Am häufigsten betroffen sind die Banden 7p13, 7q35, 14q11 und 14q32 ähnlich der AT [12, 33]. Die Bruchstellen betreffen die Loci der Immunglobulin- und T-Zell Rezeptor Gene.

Des Weiteren haben die NBS-Patienten, ähnlich den AT-Patienten, aufgrund einer hohen Strahlensensibilität ein sehr hohes Risiko für die Entwicklung von malignen Erkrankungen [2]. Die Mehrheit der Patienten entwickeln schon im frühen Alter Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) und hierunter u.a. B-Zell-Lymphome [39, 40, 41, 3], die sonst bei Kindern selten sind.

Es wurde auch über NBS-Patienten mit für diese Erkrankung ungewöhnlichen Symptomen, z.B. Porokeratosis oder stark eingeschränktem Sprachvermögen berichtet [42, 43].

Für das NBS gibt es derzeit keine kausale Therapie. Bei manchen Patienten wurde eine Knochenmarktransplantation durchgeführt [44]. Abgesehen von diesen ersten Schritten im Bereich der Transplantationstherapie, ist die gängige Behandlung rein prophylaktisch und symptomatisch. Der Schwerpunkt liegt bei der Vorbeugung von Infekten sowie der Früherkennung und Behandlung von Malignomen [45]. Bezüglich der Infektprophylaxe und Therapie können regelmäßig Immunglobuline i.v. sowie eine Langzeit-Antibiose verabreicht werden. Empfohlen wird eine an Anti-Oxidantien reiche Nahrung.

Vor Jahren, als die Krankheit noch wenig erforscht war, wurden die Lymphome bei NBS-Patienten nach Standardtherapie behandelt. Dabei kam es zu einer rapiden Verschlechterung des Allgemeinzustands mit Organversagen und Tod. Nachdem entdeckt wurde, dass die Zellen von

NBS-Patienten auf Bestrahlung hoch empfindlich reagieren, wurden die Behandlungsprotokolle modifiziert.

1.2 Molekulargenetische Grundlagen des NBS

Wie bereits erwähnt, wurde das NBS lange Zeit als eine Variante der Ataxia teleangiectasia (AT) betrachtet. Nachdem das Gen für AT identifiziert wurde [46], zeigten Stumm et al. 1995, dass das NBS-verursachende Gen nicht auf dem Chromosom 11 liegt. Somit wurde der Beweis geliefert, dass es sich bei AT und NBS um zwei genetisch unterschiedliche Krankheiten handelt [47]. Zwei Jahre später gelang es einer Forschungsgruppe an der Charité mittels Kopplungsanalysen das krankheitsverursachende Gen für NBS auf 1 cM Intervall auf dem Chromosom 8q zu lokalisieren [4].

Schließlich konnten zwei voneinander unabhängige Arbeitsgruppen, eine davon an der Charité, das Gen durch Positionsklonierung identifizieren [6, 7]. Das Gen wurde *NBS1* genannt. Die aktuelle Bezeichnung ist *NBN*. Zu gleichem Zeitpunkt gelang es einer Arbeitsgruppe aus den Vereinigten Staaten über Untersuchungen der DNA Doppelstrangbruch-Reparatur bei der Hefe, das *NBN*-Gen zu identifizieren [5]. Das Gen erstreckt sich über 50 kB und umfasst 16 Exons. Durch alternative Polyadenylierung entstehen zwei verschiedene mRNAs, mit jeweils 2,4 und 4,4 kB Länge. Die 2,4 kB mRNA wird vermehrt in Testes, während die 4,4 kB mRNA am stärksten in Ovarien exprimiert. Diese Tatsache spricht dafür, dass *NBN* bei der Meiose eine Rolle spielt [5, 7]. Das Proteinprodukt des Gens besteht aus 754 Aminosäuren, hat eine Masse von 95 kDa und wurde Nibrin genannt [7]. Carney et al. zeigten, dass Nibrin das funktionelle Homologe vom Hefeprotein Xrs2 ist [5]. Sowohl Nibrin als auch Xrs2 sind Bestandteile von trimerischen Komplexen, die an der DNA-Doppelstrangbruchreparatur beteiligt sind. Bei der Hefe wird der Komplex aus den Proteinen Xrs2, Mre11 und Rad50 gebildet. Der homologe Komplex beim Menschen wird aus den Proteinen der Gene *NBN*, *MRE11* und *RAD50* gebildet. Dieser Komplex beteiligt sich an der DNA-Doppelstrangbruchreparatur [48], der Aufrechterhaltung der Telomerenstabilität [49, 50], der Rekombination [5, 7, 51], der Apoptose [52] sowie der Zellzykluskontrolle [53, 54].

Das Nibrin besitzt drei funktionell wichtige Regionen: den N-terminalen-, den zentralen- und den C-terminalen Bereich [55]. In der N-terminalen Region (1-196aa) befinden sich zwei wichtige Domänen, die FHA- („fork head associated“) [56] und die BRCT-Domäne („breast cancer carboxy terminal“), die auch in dem *BRCA1*-Gen vorliegt [57, 58]. Über die FHA/BRCT-

Domäne bindet Histon γ-H2AX an Nibrin und rekrutiert damit den MRN-Komplex an die Stelle des Doppelstrangbruchs (DSB) [55]. Interessanterweise wurde vor kurzem eine zweite BRCT2 Domäne im Nibrin identifiziert (212-324aa), die unmittelbar zur ersten BRCT1 Domäne lokalisiert ist [59, 60, 61].

Die FHA/BRCT-Domänen sind konserviert in Kernproteinen, die an der Zellzyklus-Kontrolle (Checkpoints) und der DNA-Reparatur beteiligt sind. Die FHA-Region erkennt den phosphorylierten Zustand des Zielproteins und ist für die Protein-Protein-Interaktionen zuständig [62, 63]. Die beiden BRCT-Regionen des Nibrins bilden ein Motiv, das für die Interaktion mit dem phosphorylierten „Mediator of DNA damage checkpoint protein 1“ (MDC1) verantwortlich ist und dadurch den gesamten MRN-Komplex an die DSBs rekrutiert [59, 64]. Lloyd et al. zeigen die Rolle von konservierten diphosphoryllierten pSer-Asp-pThr-Asp Sequenzen von MDC1 für die Anheftung an die FHA/BRCT-Domäne des MRN-Komplexes [65].

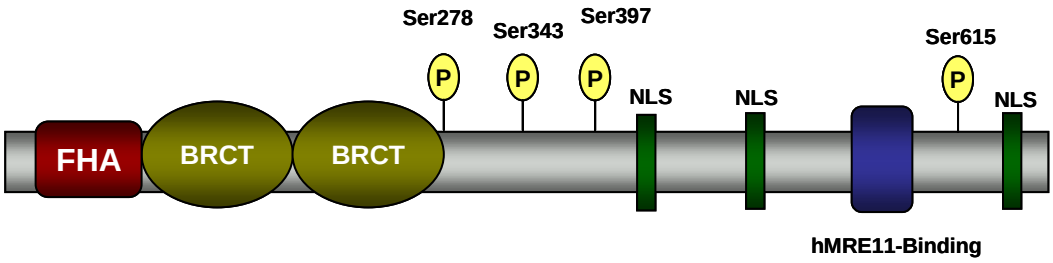


Abb. 5. Struktur des Nibrin [55] DNA-Repair – modifiziert. Die FHA- und die zwei BRCT Domänen, sowie die Phosphorylierungsstellen und die MRE11-Bindungsdomäne sind dargestellt. NLS –Kernlokalisierungssignal.

Die C-terminale (665-693aa) Region des Nibrins ist wichtig für die Bindung des Proteins an das Protein MRE11. Diese Region ist nicht konserviert mit Ausnahme von den 10 Aminosäuren über die die Bindung an MRE11 erfolgt [66]. In der zentralen (278-343aa) Region des Nibrins befinden sich Sequenzen, die nach Bestrahlung durch die ATM-Kinase phosphoryliert werden, z.B. Serin in den Positionen 278, 343, 397 und 615. Es wird angenommen, dass diese Phosphorylierung wichtig für die *NBN*-Rolle während der S-Phase des Zellzyklus ist [67, 54, 68, 69]. Aminosäurensubstitutionen in den FHA- und/oder BRCT-Domänen führen dazu, dass eine Phosphorylierung des Proteins durch ATM unterbleibt.

Zusammen mit der Identifizierung des *NBN* wurde die häufigste *NBN*-Mutation gefunden – 657del5 [7]. Über 95% der weltweit bekannten NBS-Patienten sind homozygot für diese Mutation [3]. Fast alle bis heute identifizierten *NBN*-Mutationen befinden sich in den Exons 6-10

und führen zu einem verkürzten Protein [13, 7].

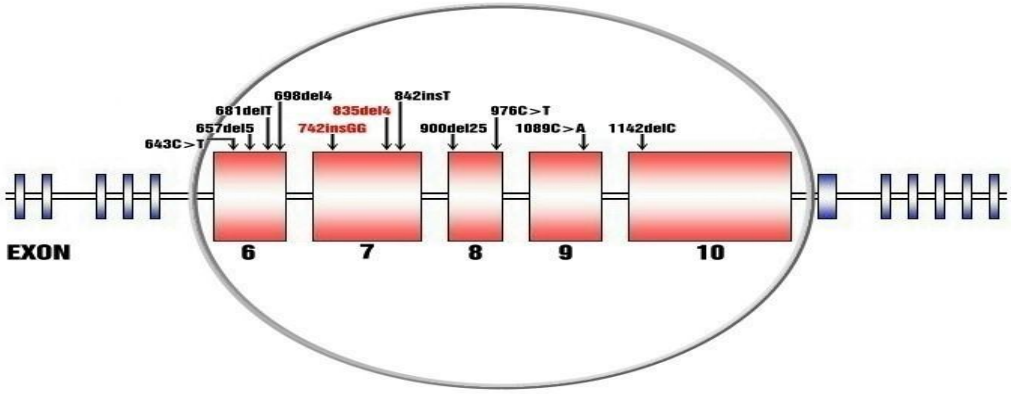


Abb. 6. Dargestellt ist die Lokalisation der bis jetzt bekannten *NBN*-Mutationen zwischen Exon 6-10 (http://www.nijmegenbreakagesyndrome.net/diseasedescriptionMain.htm)

Anfangs wurde vermutet, dass die Mutation 657del5 eine Nullmutation ist [7]. Dies wurde jedoch durch Versuche an Knock-out Mäusen in Frage gestellt. Eine vollständige Nibrin-Inaktivierung hat sich als letal erwiesen, genauso wie die Inaktivierung der anderen zwei Proteine des MRN-Komplexes, MRE11 und RAD50 [70, 71]. Eine induzierte Null-Mutation in murinen Zellen führte zu dem Verlust des G2/M-Checkpoint, erhöhter Radiosensivität und Zelltod. In immortalisierten B-Zellen von NBS-Patienten mit der Mutation 657del5 wurden ein 26 kDa aminoterminales und ein 70 kDa carboxyterminales Fragment nachgewiesen. Die Mutation 657del5 führt zu einer Leserrasterverschiebung. Das 26 kDa Protein entsteht dadurch, dass die Translation 15 Kodons nach der Deletion an einem Stoppkodon endet. Das 70 kDa Fragment (555 AS) entsteht durch eine alternative Translation, die an einem neuen Startkodon vor der Deletion beginnt, sich im Leseraster befindet und eine Restaktivität aufweist, die das Leben der Betroffenen überhaupt ermöglicht [72, 73].

Auch für die *NBN*-Mutationen 900del25 und 835del4 wurde gezeigt, dass sie ein alternatives Initiationskodon nutzen und zu Protein-Fragmenten mit einer Masse von 55 kDa bzw. 60 kDa führen [73, 74].

Die klassischen NBS Patienten sind homozygot oder compound heterozygot für trunkierende *NBN*-Mutationen [75, 7]. Interessanterweise wurde auch über compound heterozygote NBS-Patienten berichtet, die ein sehr unterschiedliches klinisches Bild im Vergleich zu den klassischen Patienten aufwiesen. Seemanova et al. beschrieben im Jahr 2006 Zwillinge mit NBS, die compound heterozygot für die slawische Mutation 657del5 und eine Punkt-Mutation, R215W, waren und einen sehr schweren Verlauf der Krankheit im Vergleich zu den klassischen

Patienten aufwiesen [76]. Compound Heterozygotie für Mutationen im *NBN*-Gen kann nicht nur zu einem schweren klinischen Verlauf führen [77], sondern auch zu einem milderen Phänotyp. So wurde über zwei Geschwister berichtet, die compound heterozygot für 2 Mutationen in den Exons 4 und 10, c.330>G (p.Y110X) bzw. c.1125G>A(p.W375X), waren und abgesehen von Fertilitätsstörungen keine weiteren klinischen Symptome aufwiesen [78].
Wie schon erwähnt, übt Nibrin, seine Funktionen nicht allein sondern im Rahmen eines trimerischen Komplexes aus, dessen andere Komponenten die Proteine MRE11 und RAD50 sind.

Das *MRE11* Gen

Das *MRE11* Gen liegt auf dem Chromosom 11q12 und umfasst 20 Exons. Das Protein ist ein Zellkern-Protein, MRE11, das zusammen mit Nibrin und RAD50 den MRN-Komplex bildet. Mutationen in diesem Gen verursachen die AT-ähnliche Krankheit (ATLD). Null-Mutationen sind nicht mit dem Leben vereinbar, wie Experimente mit Mäusen gezeigt haben [79]. Weltweit sind nur wenige Patienten mit ATLD bekannt. Die bei ihnen vorliegenden Mutationen sind hypomorph [80, 81].
Das MRE11 besitzt u.a. eine 3’5’-dDNA-Exonuklease- und sDNA-Endonuklease Aktivität [82]. Diese werden durch RAD50 gesteigert. Nibrin, im Gegensatz dazu, erhöht ausschließlich die Exonuklease-Funktion. MRE 11 bindet an den C-terminalen Bereich des Nibrins. Der C-terminale Bereich ist notwendig für die MRE11-Bindung an die DNA [83].

Das *RAD50* Gen

Das *RAD50* Gen liegt auf dem Chromosom 5q31 und umfasst 25 Exons. Sowohl RAD50 als auch MRE11 sind hoch konservierte Proteine der Eukaryonten [84]. Das RAD50-Protein besitzt Walker A & B Motive, notwendig für die Nukleotidbindung. Die Walker Motive sind durch coiled-coil Bereiche getrennt, die für die intramolekularen Interaktionen wichtig sind [85, 86]. Mit Hilfe von diesen coiled-coil Regionen kann der RAD50-MRE11-Komplex DNA-Enden, womöglich sogar Schwesterchromatiden überbrücken. Dabei bilden zwei Moleküle von RAD50 ein Homodimer mit einer flexiblen Hinge-Region, die eine V-ähnliche Form annehmen kann [87]. RAD50 erhöht zudem die enzymatische Aktivität von MRE11. Weltweit ist nur eine Patientin mit Mutationen im *RAD50*-Gen bekannt. Das klinische Bild ähnelt dem des NBS [88].
Der MRE11-RAD50-Komplex bleibt in Abwesenheit von Nibrin im Zytoplasma lokalisiert. Nach DSB-induzierter Phosphorylierung durch die ATM-Kinase bindet Nibrin über die 10 hoch konservierten Aminosäuren in seinem C-terminalen Bereich an MRE11. Tauchi et al. haben ein

zwei Schritt-Modell vorgeschlagen für die Erkennung und Reparatur von DSBs [89]. Erstens bindet Nibrin über die FHA- und BRCT-Domäne an das phosphorylierte Histone H2AX und bindet so den MRN-Komplex an den DSB. Zweitens bindet RAD50 an die DNA-Enden und hält sie nah aneinander. MRE11 bindet an die Enden des RAD50-Dimers und initiiert die Prozessierung der Bruchenden. Dupre et al. haben gezeigt, dass der MRN-Komplex wichtig bei der Atm-Aktivierung durch DSB ist [90].

1.3 Funktionen von *NBN*

1.3.1 Reparatur von DNA Doppelstrangbrüchen

DNA-Doppelstrangbrüche sind die schwerwiegendste Form der DNA-Schädigung, da bereits ein Bruch als Folge ungleicher Aufteilung des Erbgutes nach der Zellteilung zum Untergang der Zelle führen kann. Doppelstrangbrüche können durch Produkte des Zellmetabolismus (freie Radikale), durch Umwelteinflüsse (radioaktive Strahlung, chemische Substanzen) verursacht werden. Sie entstehen jedoch auch im Rahmen von physiologischen Prozessen (V(D)J-Rekombination, Meiose). Unabdingbar mit dem Leben ist, dass die Zelle diese Doppelstrangbrüche (DSB) erkennt und effektiv behebt, damit die genetische Information intakt an die Tochterzellen weitergegeben wird.

Nach Schädigung der DNA wird der Zellzyklus arretiert. Gleichzeitig werden verschiedene Gene, unter anderem die ATM-Kinase, aktiviert, die für die Reparatur der Schädigung notwendig sind. Können die Schäden nicht behoben werden, wird der Selbstzerstörungsmechanismus der Zelle, die so genannte Apoptose, initiiert. Sind jedoch die Proteine, die an der DSB-Reparatur oder Zellzyklus-Kontrollpunkte beteiligt sind, defekt oder sogar nicht vorhanden, kann zum einen der Zellzyklus nicht arretiert werden und es zum anderen über genomische Instabilität und chromosomale Umbauten zur malignen Entartung kommen [91].

Doppelstrangbrüche können auf zwei verschiedenen Reparaturwegen behoben werden, die homologe Rekombination (HR) und das nichthomologe „end joining“ (NHEJ) [92].

1.3.1.1. Homologe Rekombination

Bei der homologen Rekombination werden die Doppelstrangbrüche mit Hilfe der intakten Schwesterchromatide, die als Matrize dient, behoben. Es werden zunächst die DNA-Enden in 5'-3'-Richtung durch Nukleasen reseziert, sodass überhängende 3'-Einzelstränge entstehen. Bei der Prozessierung der Bruchenden beteiligt sich der MRN-Komplex [93, 94]. Diese Reparatur von Doppelstrangbrüchen findet nicht während des gesamten Zellzyklus, sondern in der G2-Phase statt [95]. Proteine, die bei der HR notwendig sind, sind RAD51, RAD52, RAD54 und RPA („replication protein A") [96, 97]. Die Modellvorstellung dazu wurde 1964 von Robin Holliday vorgeschlagen. Danach führt die HR zu einer exakten Reparatur von Doppelstrangbrüchen ohne Verlust von DNA.

1.3.1.2. Non - homologous end joining (NHEJ)

Im Gegensatz zu der homologen Rekombination benötigt das nicht homologe Endjoining (NHEJ) keine oder nur sehr kleine DNA-Homologien (Mikrohomologie) für die Reparatur des Doppelstrangbruchs. Diese Reparatur findet bevorzugt in der G1-Phase des Zellzyklus statt [95]. Bei diesem Vorgang kommt es zu einer Prozessierung beider Enden, die danach direkt miteinander ligiert werden. Das NHEJ ist in sofern keine exakte Reparatur, da hierbei DNA verlorengeht. In diesem Reparaturweg involvierte Proteine sind die DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK), XRCC4, DNA-Ligase IV und NHEJ1. Es wurde kürzlich gezeigt, dass Mutationen im NHEJ1-Gen ein NBS-ähnliches klinisches Bild verursachen [98, 99].
Es wurde gezeigt, dass der trimerische Hefekomplex, Mre11/Rad50/Xrs2, sich an beiden Prozessen der DSB-Reparatur, HR und NHEJ, beteiligt [100]. Dies führte zu der Annahme, dass der homologe Komplex beim Menschen, MRE11/RAD50/Nibrin, auch in beide Prozesse involviert ist. Allerdings sprechen Untersuchungen aus dem Jahre 2004 dafür, dass *NBN* wichtig für die HR, jedoch nicht für die NHEJ ist [55, 101].

1.3.2 Zellzykluskontrolle

Der Ablauf der einzelnen Phasen des Zellzyklus wird durch die Cycline und die cyclin-abhängigen Kinasen (Cdks) gesteuert.

In der G1-Phase liegen die 46 Chromosomen in Form von einzelnen Chromatiden vor. Während der S-Phase verdoppeln sich die Chromatiden, sodass in der G2-Phase die 46 Chromosomen aus zwei Schwesterchromatiden bestehen, die in der M-Phase auf die Tochterzellen verteilt werden.
Die Zelle verfügt über Mechanismen, den Zellzyklus zu arretieren, falls dies notwendig sein sollte, wie z.B. bei einer DNA-Schädigung. Die Kontrollpunkte während des Zellzyklus, die zur Aktivierung dieser Stoppmechanismen führen, werden als "Checkpoints" bezeichnet. Es gibt u.a. G1/S, intraphase-S und G2/M-Checkpoints.
Der intra-S-phase-Checkpoint ist bei NBS-Patienten defekt. Eine DNA-Replikation findet auch bei DNA-Schädigung statt [54, 69]. Eine Aktivierung des intra-S-phase-Checkpoints wäre durch Phosphorylierung des Proteins DMC1 am Serin 957 möglich. Dessen Phosphorylierung setzt jedoch die Phosphorylierung von Nibrin am Serin 343 durch die aktivierte ATM-Kinase voraus [54, 102]. Die Beteiligung des Nibrins in der Kontrolle des G1/S-Checkpointarrestes ist nicht eindeutig geklärt. Untersuchungen an B-lymphoblastoide NBS-Zellen zeigten eine Störung in der G1 Checkpoint-Kontrolle [72]. Andererseits wurde eine normale Kontrolle des G1 Checkpoints in NBS fibroblastoiden Zelllinien beobachtet [103, 104]. Die Bedeutung von Nibrin beim G2/M-Checkpointarrest ist auch umstritten. Manche Autoren konnten keine G2/M-Störung weder in primären Fibroblasten noch in transformierten Lymphozyten von NBS Patienten nachweisen [105, 106], während andere Arbeiten einen G2/M -Defekt [53, 70, 107, 108, 109] belegten.

1.3.3 Aufrechterhaltung der Telomerenstabilität

Die Telomere befinden sich an den Chromosomenenden und stellen repetitive Sequenzen dar, die reich an Guanin und Thymin sind. Die Telomere funktionieren als Schutz für die Chromosomenenden, die ja im Prinzip DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) darstellen [110, 111]. Bei der DNA-Replikation kommt es zur Verkürzung eines DNA Stranges, wenn die Länge der Telomere nicht durch die Telomerase aufrecht erhalten wird. Es konnte gezeigt werden, dass die gleichzeitige Expression von *NBN* und der katalytisch wirksamen Einheit der Telomerase, TERT, wichtig für die Verlängerung der Telomeren ist [112, 113, 114].

1.3.4 Andere *NBN*-Funktionen

Interessanterweise spielt Nibrin offensichtlich eine Rolle bei der Wirkung der Statine. Die Statine (Hydroxymethylglutaryl-Koenzym A Reduktase Inhibitoren) bewirken eine Reduktion des Cholesterins im Serum, haben jedoch weitere, so genannte pleiotrope Wirkungen, u. a. einen direkten Effekt auf die Zellen der Gefäßwand. Bei der Atherosklerose kommt es durch oxidativen Stress zu DNA-Schädigung und Telomerverkürzung in den Zellen der glatten Gefäßmuskulatur. Es wurde gezeigt, dass die Statine den oxidativen Stress nicht reduzieren, jedoch die DNA-Reparatur deutlich beschleunigen, für die Nibrin erforderlich ist [115]. Zusätzlich wurde gezeigt, dass Nibrin eine wichtige Rolle bei der Differenzierung der Zellen der Augenlinse hat und Störungen im *Nbn*-Gen bei Mäusen zur Entstehung von Katarakt führen [116].

1.4 *NBN* und Krebsrisiko

Aufgrund der Chromosomeninstabilität haben NBS-Patienten ein stark erhöhtes Risiko, Malignitäten zu entwickeln, die auch die häufigste Todesursache bei diesen Patienten darstellen. Die *NBN*-Homozygoten entwickeln am häufigsten Non-Hodgkin-Lymphome, vor allem B-Zell-Lymphome. Des Weiteren wurden, jedoch viel seltener, akute lymphatische Leukämien, Glioblastome, Meduloblastome und Rhabdomyosarkome beobachtet [117, 118, 3]. Bei NBS-Patienten ist das Krebsrisiko wesentlich höher als bei Patienten mit Ataxia teleangiektasia, für deren Krankheitsgen, ATM, eine Tumorsuppressorgen-Funktion nachgewiesen wurde [119]. Aufgrund der Ähnlichkeiten zwischen AT und NBS stellte sich die Frage, ob *NBN*-Heterozygote analog zu heterozygoten Trägern von *ATM*-Mutationen ebenfalls ein erhöhtes Krebsrisiko haben [120]. Diese Vermutung wurde bereits 1990 von Seemanova aufgrund der familiären Krebshäufigkeit geäußert [121] und inzwischen bestätigt [122]. In vielen Studien wurde inzwischen das erhöhte Krebsrisiko der *NBN*-Heterozygoten für unterschiedliche Tumore gezeigt.

Eine erhöhte Frequenz von *NBN*-Mutationen wurde bei Kindern mit akuter lymphoblastischer Leukämie gefunden [123]. Resnik et al. zeigten, dass Heterozygote für die *NBN*-Mutation 657del5 ein erhöhtes Risiko für NHL und ALL haben [124]. Des Weiteren konnten wir in einer großen polnischen Studie zeigen, dass die Heterozygotenfrequenz bei Krebspatienten mit verschiedenen Tumoren doppelt so hoch wie bei den Kontrollen ist [125]. Vor allem fanden sich

deutlich mehr Träger für die Mutation 657del5 unter den Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL), sowie Träger für die *NBN*-Mutation R215W unter Patienten mit kolorektalem Karzinom.

Weiterhin zeigten Studien aus Russland und Polen [126, 127], dass Heterozygote für die Mutation 657del5 ein erhöhtes Risiko für Brustkrebs haben. Untersuchungen an Brustkrebspatientinnen aus Norddeutschland und Belarus ergaben für Trägerinnen der *NBN*-Mutationen 657del5 und R215W ein 3-fach erhöhtes Risiko [128]. Zusätzlich haben Roznowski et al. unter 270 polnischen Brustkrebs-Patientinnen die Mutation I171V 7-mal gefunden. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass auch diese Mutation das Risiko für Brustkrebs erhöht [129]. Die Mutation I171V wurde auch bei Kindern mit ALL nachgewiesen [123]. Eine deutlich höhere Frequenz der Mutation 657del5 wurde zudem bei Patienten mit Prostatakrebs gefunden [130].

Im Gegensatz dazu fanden Carlomagno et al. keine Assoziation zwischen dem heterozygoten Status für die *NBN*-Mutation 657del5 und der Entwicklung von Brustkrebs an 477 Patientinnen [131].

Aufgrund der Tatsache, dass die NBS Patienten am häufigsten ein NHL entwickeln, wurde erwartet, dass die *NBN*-Heterozygoten auch besonders häufig von dieser Form der lymphoretikulären Malignität betroffen sind. Eine Reihe von Studien belegen jedoch keine Korrelation zwischen dem heterozygoten *NBN*-Status und der Entstehung von NHL. Cerosaletti et al. untersuchten Tumorproben von 91 Patienten mit sporadischen NHL und konnten keine Rolle des *NBN*-Gens bei der Entstehung von sporadischem NHL in den USA belegen. Auch die Arbeitsgruppen von Stanulla et al. und Rischewski et al. fanden die Mutation 657del5 in den von ihnen untersuchten deutschen Patienten mit NHL nicht [132, 133]. Allerdings sind diese Ergebnisse nicht verwunderlich, da die Frequenz der Mutation 657del5 in der deutschen Population nur 0,12 % beträgt [131]. Auch in der Studie von Hama et al. an japanischen Patienten mit Lymphomen fanden sich keine Mutationen im *NBN*-Gen [134]. All diese Studien sprechen dafür, dass das *NBN*-Gen keine wesentliche Rolle bei der Cancerogenese in Patienten nicht-slawischer Herkunft spielt.

1.5 Lymphomtypen bei NBS-Patienten

Wie oben bereits erwähnt, sind die am häufigsten vorkommenden Malignitäten bei den NBS Patienten die Non-Hodgkin-Lymphome (NHL). Es handelt sich dabei um maligne, klonale Neoplasien, die sich von B- oder T-Lymphozyten herleiten. Da im Rahmen dieser Arbeit

Patienten mit NHL untersucht wurden, wird an dieser Stelle ein Überblick über die Formen der Non-Hodgkin-Lymphome gegeben.

1.5.1 B-Zell-Lymphome

a) Großzellige diffuse B-Zell-Lymphome

Diese Lymphome stellen etwa 30-40% aller Non-Hodgkin-Lymphome dar. Es gibt verschiedene Faktoren, die das Risiko für die Entwicklung eines diffusen großzelligen B-Zell-Lymphoms erhöhen. Zu diesen Faktoren zählen Immunsuppression (nach Transplantation, HIV), Exposition gegenüber kanzerogenen Substanzen sowie genetische Ursachen.
Nach der WHO werden folgende klinische Subtypen des diffusen großzelligen B-Zell-Lymphoms unterschieden:
* Primäres Körperhöhlenlymphom - dieser Subtyp entwickelt sich in mit serösen Häuten ausgekleideten Körperhöhlen.
* Das intravaskuläre großzellige B-Zell-Lymphom - dieser Subtyp entwickelt sich in kleinen Blutgefässen. Am häufigsten betroffen sind die Haut, das Knochenmark, das ZNS, die Nieren und Lungen.
* Das primäre mediastinale B-Zell-Lymphom - Dieser Subtyp kommt am häufigsten vor. Meistens entwickelt er sich im Thymus. Oft bleibt das Lymphom bei der Erstmanifestation auf das Mediastinum beschränkt und erst bei Rezidiven kommt es zu einer Metastasierung im ZNS, der Leber oder den Nieren.

b) Das Burkitt Lymphom

Das Burkitt Lymphom ist ein klinisch aggressives, jedoch sehr chemotherapie-sensitives B-Zell-Lymphom, das sich in drei klinischen Formen manifestiert:
* Das sporadische Burkitt-Lymphom, das ca. 30% aller Lymphome ausmacht.
* Das endemische Burkitt-Lymphom, fast immer mit einer Epstein-Barr-Virus (EBV) Infektion assoziiert.
* Das Immunodefizienz-assoziierte Burkitt-Lymphom, z.B. bei HIV-Patienten, oder infolge einer Immunsuppression nach Transplantation. Bei HIV-Kranken tritt das Burkitt-Lymphom u.a. in Fällen auf, die durch eine hohe Zahl CD4 positiver T-Lymphozyten im peripheren Blut

charakterisiert sind.
Das histologische Bild wird durch monomorphe, mittelgroße, dicht aneinander liegende Zellen mit schmalem basophilem Zytoplasmasaum und rundlichen Kernen bestimmt.

c) Follikuläres Lymphom (FL)

Das follikuläre Lymphom, nach der Kiel-Klassifikation auch als zentroblastisch-zentrozytisches Lymphom bezeichnet, ist das häufigste indolente nodale B-Zell-Lymphom und macht ca. 25-30% aller Non-Hodgkin-Lymphome aus. Das klinische Bild ist durch eine langsam progrediente Lymphknotenvergrößerung, sowie durch eine langsam fortschreitende Splenomegalie geprägt. Im Verlauf kommt es oft zu Infektanfälligkeit und Blutungsneigung. Etwa 30% der Patienten weisen auch die B-Symptomatik (Fieber, Gewichtsverlust, Nachtschweiß) auf.
In etwa 40% der Fälle kommt es zu einer Aggressivitätssteigerung, wobei das indolente follikuläre Lymphom (Stadium I & II) in ein hochmalignes Lymphom transformiert wird, meistens ein diffus großzelliges B-Zell-Lymphom. In ca. 20% der Fälle mit follikulärem Lymphom kommt es zu einer spontanen Regression.

d) MALT-Lymphom

Das MALT-Lymphom entwickelt sich aus dem Mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebe (MALT) des gastrointestinalen Traktes. Das Mukosa-assoziierte lymphatische Gewebe kann physiologisch vorhanden sein, z.B. im Dünndarm oder im Rahmen von chronischen entzündlichen Prozessen erworben werden (Magen, Speicheldrüsen). Die MALT-Lymphome stellen ca. 7-8% aller B-Zell-Lymphome dar. Es handelt sich um ein extranodales Lymphom. Der häufigste Manifestationsort ist der Magen (40-50%). Jeweils 10% der Fälle entwickeln sich in der Schilddrüse (z.B. im Rahmen einer Hashimoto Thyreoiditis), in den Speicheldrüsen (z.B. beim Sjögren-Syndrom), in den Lungen und der Orbita.
Eine chronische Infektion mit Helicobacter pylori ist ein entscheidender Faktor für die Entstehung des MALT-Lymphoms. Dementsprechend entwickelt sich das MALT-Lymphom bevorzugt im Antrum ventriculi. Histologisch zeigt sich ein monomorphes Infiltrat reifzelliger monozytoider bzw. zentrozyten-ähnlicher B-Zell-Lymphozyten innerhalb von interfollikulären konfluierenden Marginalzonenarealen.

e) Mantelzelllymphom

Es handelt es sich um ein nodales Lymphom der naiven Follikelmantelzelle. Es liegt eine männliche Präponderanz vor. Die Lymphknoten sind diffus infiltriert mit kleinen bis mittelgroßen Lymphozyten. Ein Zytoplasmasaum ist kaum vorhanden. Die nodalen Gefäße sind hyalinisiert.

1.5.2 T-Zell Lymphome

T-Zell Lymphome machen ca. 5-15% aller Non-Hodgkin Lymphome aus. Es handelt sich um eine sehr heterogene Gruppe, zu der auch Neoplasien der „Natural Killer“ (NK) Zellen gehören. Die T-Zell Lymphome werden in zwei große Gruppen eingeteilt:

a) Unreife Vorläuferzelllymphome (lymphoblastische Lymphome)

Die Unterscheidung zu den lymphoblastischen Leukämien beruht auf dem Ausmaß der Knochenmarkinfiltration (>25% Blasten definiert die akute lymphatische Leukämie).
Diese Lymphome kommen vor allem bei Kindern oder jungen Erwachsenen vor. Neben einer Leukozytose und Lymphadenopathie ist in ca. 50% der Fälle ein großer Mediastinaltumor vorhanden, der nicht selten zu einem Vena cava superior-Syndrom führt, charakterisiert durch obere Einflussstauung und Dyspnoe.

b) Reife, „periphere“ T-Zell-Lymphome

Diese Lymphome entstehen aus Zellen, die ihre Differenzierung im Thymus abgeschlossen haben.
* Angioimmunoblastisches T-Zell-Lymphom (AILD)
Es handelt es sich um eine klonale T-Zell Erkrankung, die zu einer Destruktion der B-Zell Areale des Lymphknotens führt. Die Patienten weisen eine generalisierte Lymphadenopathie, B-Symtomatik (subfebrile Temperaturen, Nachtschweiß, Gewichtsabnahme) und eine Hepatosplenomegalie auf. Häufig kommt es zu Pruritus und Exanthemen. Charakteristisch ist auch das gehäufte Auftreten von Infektionen.

* Anaplastisch großzelliges Lymphom vom T-Zell Typ (ALCL)

Diese Lymphomform macht ca. 3% aller NHL des Erwachsenen aus. Es existieren drei Subtypen:

**Primär systemisches Lymphom- Kinase Fusionsprotein (ALK) positives ALC, das durch die Translokation t(2:5) entsteht. Diese Form ist vor allem bei jüngeren Patienten zu beobachten und hat eine günstige Prognose.

**Primär systemisches ALK negatives ALC. Diese Form kommt vor allem bei älteren Patienten vor.

**Primär kutane Variante

* T-Zell Lymphom vom Enteropathietyp

Das Lymphom ist mit der glutensensitiven Enteropathie assoziiert. Die Patienten weisen Diarrhöen, abdominelle Schmerzen und B-Symptomatik auf.

* T-Zell Lymphom vom nasalen Typ

Das Lymphom manifestiert sich im Gesicht und hat einen destruierenden Charakter. Es kommt vor allem in Asien vor und ist mit einer EBV-Infektion assoziiert.

* Das hepatosplenische T-Zell Lymphom

Das Lymphom kommt vor allem bei jüngeren Patienten oder bei Patienten nach einer Transplantation vor.

* Das subkutane pannikulitis ähnliche Lymphom

Das Lymphom manifestiert sich im subkutanen Fettgewebe in Form von Knoten und Plaques und ist durch eine rasche Progredienz und meistens durch eine infauste Prognose charakterisiert. [I, II, III].

2 Ziele

Die bisherigen Ausführungen haben gezeigt, dass die Datenlage hinsichtlich des Risikos heterozygoter Träger von *NBN*-Mutationen ein NHL zu entwickeln, widersprüchlich ist. Ziel dieser Arbeit ist es, eine größere Gruppe polnischer NHL-Patienten hinsichtlich der Mutationen 657del5 und R215W zu untersuchen und zu einer möglichst gesicherten Aussage zu gelangen.

Zusätzlich wurden polnischen Patienten mit soliden Tumoren und Neugeborenen-Kontrollen bezüglich der Mutation R215W getestet. Alle Ergebnisse dieser Arbeit sind schon publiziert (siehe Literatur).

Des Weiteren wurde Tumormaterial von *NBN* -Heterozygoten untersucht, um festzustellen, ob der Verlust des Wildtyp-Allels („Loss of heterozygosity“) vorliegt und bei der Tumorentstehung eine Rolle spielen könnte.

3 Materialien und Methoden

3.1 Patienten und Kontrollen

In dieser Arbeit wurden Kohorten von polnischen Tumorpatienten für die Mutationen 657del5 und R215W im *NBN*-Gen untersucht. Um die Mutationsfrequenzen vergleichen zu können, wurde auch eine Kontrollgruppe von 1620 polnischen Neugeborenen mituntersucht. Als Ausgangsmaterial dienten Blut-Proben von Guthrie-Cards. Von allen Tumorpatienten liegt ein schriftliches Einverständnis vor.

3.1.1 Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL)

Es wurden 186 Patienten mit der Diagnose Non-Hodgkin-Lymphom [mittleres Alter 59,5 Jahre (17-91 Jahre)] für die *NBN*-Mutationen 657del5 und R215W untersucht. Alle Patienten stammen aus der Mazovian Woivodschaft, einer der 16 administrativen Bezirke Polens, zu der auch die Hauptstadt Warschau gehört. Alle Patienten wurden diagnostiziert und behandelt am „M. Sklodowska-Curie Memorial Cancer Center and Institute of Oncology“ der Universitätsklinik Warschau.

In Tabelle 1 sind die jeweiligen Formen der Non Hodgkin Lymphome dieser Patienten dargestellt.

3.1.2 Patienten mit verschiedenen soliden Tumoren

Zusätzlich wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit auch 641 polnische Patienten mit verschiedenen soliden Tumoren untersucht. Alle Patienten stammen auch aus der Mazovian Woivodschaft und waren Teil unserer großen Studie aus dem Jahre 2004, in die insgesamt 1289 Patienten eingeschlossen waren [125]. Die Proben der 641 Patienten wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit nur für die Mutation R215W analysiert, da die Frequenz der 657del5-Mutation bereits ermittelt worden war. Die Ergebnisse für beide Mutationen wurden in unserem Artikel „Increased cancer risk of heterozygotes with NBS1 germline mutations in Poland“, Int. J. Cancer, 2004 publiziert. Alle Patienten wurden an dem „M. Sklodowska-Curie Memorial Cancer Center and Institute of Oncology“ der Universitätsklinik Warschau behandelt.

3.1.3 Neugeborenen-Kontrollen

Die Kontrollgruppe wurde aus 1620 anonymen Neugeborenen-Blutproben gebildet, die im Rahmen des Neugeborenen-Screenings gesammelt worden waren. Die Proben lagen in Form von Guthrie-Cards vor. Alle Proben stammen aus der Mazovian Woivodschaft. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden die Proben nur für die *NBN*-Mutation R215W untersucht, da die Frequenz der 657del5-Mutation zuvor ermittelt worden war.
Sowohl die Proben der Patienten-Gruppen als auch die der Kontrollen wurden freundlicherweise von Herrn Professor Dr. med. Jan Steffen†, ehemaliger Direktor des Instituts für Immunologie (Maria Sklodowska-Curie Memorial Cancer Center and Institute fror Oncology), Warschau, Polen zur Verfügung gestellt.

3.1.4 Tumor- Proben von heterozygoten Patienten für die *NBN*-Mutationen 657del5 und R215W

Leider stand uns von keinem der hier untersuchten NHL - Patienten Tumormaterial zur Verfügung. Wir erhielten jedoch Tumormaterial von zwei anderen *NBN*-heterozygoten Patienten und verglichen den Anteil des normalen und des mutierten Alleles in den Blutproben und den entsprechenden Tumorproben. Die eine Tumorprobe, in Form von Parafin-Block stammt von einem 657del5-Mutation heterozygoten Patienten (54 Jahre alt) mit Melanom und wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Steffen† zur Verfügung gestellt. 10 µm dicke Schnitte des Tumors wurden auf Objektträgern fixiert und histopathologisch bezüglich des Tumoranteils beurteilt. In diesem Fall war der Tumoranteil ca. 50%. Die DNA-Extraktion erfolgte direkt aus den Schnitten (freundlicherweise von Herrn Dr. Markus Stumm zur Verfügung gestellt). Die zweite Tumorprobe stammt von einer 5 jährigen für die R215W-Mutation heterozygoten Patientin mit pilozytistischem Astrozytom, und wurde freundlicherweise von Frau Dr. Krystyna Chrzanowska zur Verfügung gestellt. In diesem Fall, wurde die Tumor-DNA aus mikrodisseziertem Material isoliert. Der Tumoranteil war 100%.

NHL-Form	Gesamtzahl
Burkitt- und Burkitt-ähnliches Lymphom	9
Lymphom vom Typ des Mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebes (MALT)	12
Diffuses großzelligs B-Zell Lymphom (DLBCL)	71
Mantelzell Lymphom (MCL)	21
Follikuläres Lymphom (FL)	18
Vorläufer B-Zell Lymphom	3
Chronisch lymphozytische Leukämie (CLL)/ Lymphozytisches B-Zell Lymphom	19
Lymphoplasmozytisches Lymphom	1
Plasmozytom	1
Vorläufer T-Zell Neoplasien	6
Periphere T-Zell Neoplasien	22
Marginalzone B Lymphom	2
Nicht klassifiziert	1

Tabelle 1. Non-Hodgkin-Lymphome bei 186 Patienten

3.2 Chemikalien und Biochemikalien

Materialien	Hersteller
Agarose 1404	Serva
Big Dye Terminator Mix	Applied Biosystems
Big Dye Puffer	Applied Biosystems
dNTPs	InVitek
Ethidiumbromid	Böhringer Mannheim
Exonuklease I	New England BioLabs
Exo I Buffer	New England BioLabs
SAP	Roche
Taq DNA-Polymerase	Eppendorf
Taq Polymerase Buffer	Eppendorf
1 kB DNA-Marker	Invitrogen
Orange G	Merck
Dest. H2O	J. T. Baker
Ethanol 100%	Merck
ROX Dye, 500	Applied Biosystems
Formamid	

Tabelle 2. Chemikalien und Biochemikalien

3.3 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
PCR Tubes 0.2ml	Biozym
PCR Platten (96 wells)	Greiner
Pippetenspitzen (0.1 bis 1000 µl)	Biozyme
Eppendorf-Cups (0.5 und 1.5 ml)	Sarstedt
BlueCap Tubes (50 ml)	Falcon
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging

Tabelle 3. Verbrauchsmaterialien

3.4 Primer

3.4.1. Primer für die Fragmentanalyse – mit FAM Markierung

Fam-Forward-Primer: *NBN*- Ex 6 FAM-5'- CCCACCTCTTGATGAACCAT-3'

Reverse-Primer: *NBN*-Ex 6-R 5'- CTGTTTGGCATTCAAAAATATAAA-3'

3.4.2. Primer für Exon 6 des *NBN*-Gens

Forward-Primer: *NBN*-Ex 6-F 5' - TGGAAATTATGCCTTTTGAGTG-3'

Reverse-Primer: *NBN*-Ex 6-R 5'- CAAAATGAAATACGTTAACA-3'

3.4.3. SnaPShot Primer für die R215W-Mutation

NBN - R215W-F: 5"- GGAAGTAAAAATGTTGATCTGTCAGGA - 3"

3.5 Kits

* ABI Prim BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, V.3.1 von Applied Biosystem

* SnaPShot Multiplex Kit von Applied Biosystems

3.6 Geräte

Geräte	Typ	Hersteller
DNA-Sequenzierautomat	ABI Prism 3100	Applied Biosystems
Labofuge Zentrifuge	400R	Heraeus
Megafuge Zentrifuge	2. OR	Heraeus
Elektrophoresekammer	Horizon 11.14 und Sunrise 96	Gibco BRL Life Technologies
Elektrophorese Spannungsgerät	ST 606 T	Gibco BRL Life Technologies
Thermocycler	GeneAmp PCR System 9600 and 2400	Applied Biosystems
Vortex	Vibrofix VF1 Electronic	Jahnke & Kunkel
Microwellengerät		Bosch
Pipetten		Eppendorf
Multikanal Pipetten	Finnpipette	Labsystems
UV-Illuminator und Kamera		Herolab, Wiesloch
Waage		Sartorius
Aquadestanlage		Millipore

Tabelle 4. Geräte

3.7 Software

Name	Hersteller
Primer design	Primer.3
Gene Mapper	Applied Biosystems
Sequence Analysis	Applied Biosystems
Chromas	Technelysium
Polyphen	http://coot.embl.de/PolyPhen/
Panther	http://www.pantherdb.org
Mutation Tester	http://www.mutationtaster.org

Tabelle 5. Software

3.8 Statistik

Der Vergleich der Genfrequenzen bei Tumor-Patienten vs Kontrollen wurde mit dem Fischer Exakt Test und dem Chi² Test durchgeführt

3.9 Methoden

3.9.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) wurde von Kary Mullis im 1983 entwickelt. Dieses Verfahren ermöglicht die exponentielle Vervielfältigung kleiner DNA-Fragmente. Für die Reaktion werden Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs), destilliertes Wasser, Polymerase, die die Reaktion katalysiert, Puffer und zwei Primer benötigt. Primer sind Oligonukleotide, die aus 15-20 Basen bestehen, die zu den 3'-Enden des DNA-Fragmentes komplementär sind. Die Polymerase ist hitzestabil und wird aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* gewonnen. Die Taq-Polymerase hat ihr Aktivitätsoptimum bei einem pH-Wert über 8 und einer Temperatur von etwa 74°C. Die Polymerase hat eine 5'-3'-DNA-Polymerase~ und eine 5'-3'-Exonukleaseaktivität. Die Syntheserate der Taq-Polymerase liegt bei etwa 2800 Nukleotiden/min. Die Taq-Polymerase besitzt nicht nur eine template-abhängige sondern auch eine template-unabhängige Aktivität, die dazu führt, dass am Ende des Repliaktionsvorgangs eine zusätzliche Base, meistens Adenosin, eingebaut wird.

Es werden verschiedene Polymerasen mit unterschiedlichen Eigenschaften angeboten. So besitzen Tli (*Thermococcus litoralis*), Tgo (*Thermococcus gorgonarius*), Tma (*Thermotoga maritima*) zusätzlich eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität, die der Korrekturlesung des neuen Stranges dient. So kommt es bei der Anwendung dieser Polymerasen zu glatten Enden der synthetisierten Stränge. Diese Polymerasen sind außerdem hitzestabiler als die Taq-Polymerase, jedoch ist die Synthesegeschwindigkeit deutlich langsamer.

Der Reaktionsansatz wird zunächst für 5 Min. Auf 96C° erhitzt, damit die DNA denaturiert wird, d.h. der DNA-Doppelstrang wird in zwei Einzelstränge aufgetrennt. Danach beginnt die eigentliche Kettenreaktion. Ein aus drei Schritten bestehender Zyklus wird im Durchschnitt 35 Mal wiederholt.

Die einzelnen Schritte dieses Zyklus sind:

* Denaturierung bei 96°C - Die Denaturierungszeiten müssen so kurz wie möglich gehalten werden, denn bei hohen Temperaturen leiden alle Komponente des PCR-Mix.

* Annealing bei einer für jedes Primerpaar individuell ermittelten Temperatur - Während dieses Schrittes binden die Primer an die 3'-Enden der DNA-Einzelstränge.

* Synthese der komplementären Stränge bei 72°C.

Auf den letzten vorgegebenen Zyklus folgt die Elongation, die ca. 5-10 Min. dauert. Für jede

PCR wird ein Protokoll und Programm erstellt, in denen die einzelnen Mengen und die Dauer der einzelnen Schritte angegeben werden.

Berechnen der Annealing –Temperatur einer PCR-Reaktion

Für jeden Primer wurde die Annealing-Temperatur nach der Formel

2x(A+T) + 4x(G+C) – 5 = Annealing-Temperatur bestimmt. Falls die Annealing-Temperaturen beider für die PCR notwendigen Primer unterschiedlich sind, wird die niedrigere Temperatur benutzt.

Amplifikation der Guthrie-Card-Proben

Die hier benutzten Blutproben waren auf Guthrie-Cards fixiert. Es wurde auf eine DNA Extraktion verzichtet und die Guthrie-Card direkt als Template benutzt. Daher wurde ein größeres PCR- Ansatzvolumen (35 µl) als üblich genommen, damit die Polymerase durch das freigesetzte Hämoglobin nicht gehemmt wird.

Von jeder Guthrie-Card wurde jeweils ein ca. 2 mm großes Stück entnommen und in ein PCR-Gefäß platziert. Um die DNA von den Guthrie-Cards zu lösen, wurden am Anfang die Proben für 45 min bei 98°C gekocht. Erst danach wurde die Polymerase dazu gegeben.

In dieser Arbeit wurde folgendes PCR-Protokol benutzt, um das Exon 6 des *NBN*-Gens zu amplifizieren.

Komponente	Volumen
10xPuffer	3.5 µl
dNTPs	0.6 µl
Taq-Polymerase*	0.2 µl (5U/ml)
Primer F	2.0 µl (10pmol/µl)
Primer R	2.0 µl (10pmol/µl)
dH2O	27 µl
Gesamtvolumen	35 µl

Tabelle 6. PCR-Protokol

*Die Taq Polymerase wurde erst nach der 45 minütigen Denaturierung zugegeben

3.9.2 Agarosegelelektrophorese

DNA-Fragmente können mit Hilfe der Agarosagelelektrophorese aufgetrennt und dargestellt werden. Es können Agarose-Gele verschiedener Konzentrationen, abhängig von der Größe der zu untersuchenden PCR-Produkte, eingesetzt werden. Die hier benutzten Agarose-Gele waren 2%-ig. Um die Größe der einzelnen PCR-Produkte zu bestimmen, wurde eine 1kb Leiter benutzt. Eine solche Leiter ist ein Gemisch aus DNA-Fragmenten bekannter Größen. Zu der Agarose-Lösung wird eine geringe Menge an Ethidiumbromid und TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA-Puffer) dazugegeben. Die Mischung wird in speziellen Kammern mit einem Kamm an einem Ende, der die Taschen bilden soll, gegossen und wird nach Abkühlung zum Gel. Ca. 5 µl des PCR-Produktes werden mit 4 µl Orange G-Ladepuffer gemischt und in die Taschen pipettiert. Das Gel wird in die mit TBE-Puffer gefüllte Laufkammer platziert und eine entsprechende Spannung von z.B. 120 Volt angelegt. Die einzelnen Fragmente wandern aufgrund ihrer negativen Ladung in Richtung der Anode. Kleinere Fragmente wandern schneller als größere. Das dazugegebene Ethidiumbromid ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der mit den Basenparen interkaliert. Die DNA wird dadurch unter UV-Licht auf dem Gel als Bande sichtbar.

3.9.3 Fragmentanalyse

Mit Hilfe einer Fragmentanalyse können DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe aufgetrennt werden. Dafür muss mindestens ein Primer mit einem Fluorochrom markiert werden. Die Fragmentanalyse ist zum Screening einer großen Zahl von Proben und unterschiedlicher Mutationen geeignet, wenn sich die Längen der jeweiligen Allee deutlich unterscheiden. Für die Fragmentanalyse wurden die unter 3.4.1 aufgeführten Primer benutzt.

<u>PCR-Bedingungen für die Exon 6 - Fragment- Analyse</u>

98°C – 45 min

↓

96°C – 15 sei ←

53°C - 20 sek ↑ 35 Zyklen

72°C – 30 sek →

↓

72° - 10 min

Nach der Amplifikation und Kontrolle der PCR-Produkte auf einem Agarosengel werden 0.3-0.5 µl der PCR-Produkte mit 9 µl HiDi-Formamid und 0.2 µl Standard GeneScan 500 HD (ROX) gemischt und bei 95°C denaturiert. Danach werden die Proben in die Kapillaren des 3100 (ABI) DNA-Sequenator gefüllt und aufgetrennt. Die Ergebnisse werden mittels des GeneMapper 3.7. Software analysiert.

3.9.4 SnaPShot Analyse

Diese Methode findet Anwendung bei der Analyse bekannter Veränderungen, wie Polymorphismen oder Mutationen in der DNA. Hierfür wird ein Kit benutzt (Applied Biosystems), welches ein Mix von Enzym, Puffer und den vier mit unterschiedlichen Fluoreszensfarbstoffen markierten ddDNTP's beinhaltet (die Farben sind in Tabelle 7 angegeben). In dem Kit sind keine dNTP's enthalten. Zusätzlich wird ein speziell konstruierter Primer benötigt, der direkt vor der Veränderung, die analysiert werden soll, bindet und dann um eine der markierten Basen verlängert wird. Dadurch wird die Reaktion zugleich terminiert.

ddNTPs	A	C	G	T
Farbstoff	dRGG	dTAMRA	dR110	dROX
Farbsignal	grün	schwarz	blau	rot

Tabelle 7. Fluoreszenzfarbstoffe mit denen die Nukleotide markiert sind und die entsprechenden Farbsignale

Zuerst wird eine PCR-Reaktion durchgeführt, bei der der jeweilige DNA-Abschnitt amplifiziert wird. Danach findet eine enzymatische Reinigung statt, wobei eine Exonuklease (ExoI) die restlichen Primer abbaut. Die dNTPs werden durch die alkalische Phosphatase (SAP) dephosphoryliert und damit inaktiviert.
Die Snap-Shot Reaktion wurde hier benutzt, um die Mutation R215W im Exon 6 des *NBN*-Gens zu analysieren.

PCR-Bedingungen für die Exon 6 - Fragment- Analyse

98°C – 45 min

↓

96°C – 15 sek

55°C - 20 sek 35 Zyklen

72°C – 30 sek

↓

72° - 10 min

Reinigungsprotokoll – SnapShot Reaktion

ExoI/Schrimp Alkalische Phosphatase (SAP)

Komponente	Volumen (µl)
10x ExoI Puffer	0,50
10 U/µl ExoI Enzym	0,05
1 U/µl SAP	0,50
dH2O	3,50
Dephosphoryl. Puffer	0,45
Gesamtvolumen	5,00 µl

Dieser Reinigungsmix wird zu 5 µl PCR-Produkt dazugegeben.

Die Aufreinigung findet durch Inkubation des Reinigungsansatzes bei 37°C für 30 min statt, gefolgt von einer Inkubation bei 80°C für 15 min, die die Reaktion terminiert.
Nachdem die PCR-Produkte gereinigt worden sind, kann die SnaPShot Reaktion mit den spezifischen Primern für die R215W Mutation angesetzt werden.

TCTAGAAAACGCGATTAGATGCTTTTTGTCATTTTGTCCCAGATAAAATTCTTACTTAAA

AAAAATACTATAAAGGTATTATGGAAATTATGCCTTTTGAGTGTCAGATAGTCACTCCGT

TTACAATTTAATAGCAAACATAGTAGTATATAATTAGAATATACTTTAATTATTTTTACA

GTTTTTACCCACCTCTTGATGAACCATCTATTGGAAGTAAAAATGTTGATCTGTCAGGACGG

CAGGAAAGAAAACAAATCTTCAAAGGGAAAACATTTATATTTTTGAATGCCAAACAGG

TAATTATGTTATAAGCTAAATTTTCCTAAAGAATACATTACAAACTAGGATACATTATTA

ACTCTTATCAGTAGTTGTTAACGTATTTCATTTTGGGATTTTGTGTAAAAGTGTGAAGTA

GAATAAAAAAACCCCAGGCACCAGACCTGCCCAGTGATCATGGCTGTGATTACGGGGTTT

CTTAAAATCTGTGATAACTGGCCTATTCATAAATATGCAAGTGAGAAGGACAGGAAACTT

Abb. 7. Exon 6 des *NBN*-Gens (mit gelb markiert) mit intronischen Sequenzen (mit grau markiert). Der spezifische SnapShot Primer für die R215W-Mutation ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

1,5 µl Aliquot von dem gereinigten PCR-Produkt werden zu 3,5 µl Reaktionsmix dazugegeben.

SNap Shot Protokoll

Komponente	Volumen (µl)
SnaPShot Reaktionsmix	0,60
Primer R215W–F (10pmol/µl)	0,50
dH2O	2,80
PCR-Produkt	1,50
Gesamtvolumen	5,00 µl

SnapShot Reaktionsbedingungen

96ºC	10 sek	
50ºC	5 sek	25 Zyklen
60ºC	30 sek	
4ºC	15 min	

Nach der SnapShot Reaktion werden zu dem Reanktionsansatz 1,0 µl alkalische Phosphatase

dazugegeben und das Gemisch für 60 min bei 37°C inkubiert, gefolgt von 15 min bei 80°C. Diese erneute Reinigung wird durchgeführt, um die Snap-Shot Produkte von den übriggebliebenen ddNTPs zu befreien, die aufgrund ihrer Fluoreszenzmarkierung die Auswertung der Proben stören würden.

3.9.5 DNA-Sequenzierung

Die genaue Basenfolge eines DNA-Fragmentes kann mit Hilfe der so genannten DNA-Sequenzanalyse bestimmt werden. Hierbei handelt es sich um einen PCR- ähnlichen Vorgang. Die Sequenzmethode basiert auf der von Sanger im 1975 entwickelten enzymatischen Sequenzierung. Das mittels PCR amplifizierte DNA-Fragment dient als Matrize. Bei der Sequenzierung wird im Unterschied zu der PCR nur ein Primer benutzt, der als Vorwärts- oder Rückwärtsprimer kreiert werden kann. Weiterhin werden nicht nur dNTPs sondern auch 2',3'-Didesoxynukleotide (ddNTPs) verwendet.
Die Didesoxynukleotide haben keine Hydroxylgruppe (-OH) in Position C3 der Ribose und können dadurch keine Phosphodiester-Bindung mit dem nächsten Desoxynukleotid einhergehen. Die DNA-Verlängerung wird dadurch terminiert.
Es entstehen Fragmente, deren Längen sich um ein Nukleotid unterscheiden. Das Gemisch dieser einzelnen DNA-Stückchen kann mittels Elektrophorese oder eines Kapillarsystems aufgetrennt werden. Wir benutzten ein Kapillar ABI 3100 System. Da jeder der vier ddNTPs eine eigene Fluoreszenzmarkierung hat, kann man anhand des Fluoreszenzsignals und der Position jeden einzelnen Fragmentes die Basenfolge bestimmen.
Voraussetzung für eine erfolgreiche Sequenzierung ist ein hochgereinigtes PCR-Produkt. Die PCR-Produkte von den positiven Proben, sowohl von der Fragments-Analyse, als auch von den SnapShot Analyse wurden mit den Primer (3.4.2) amplifiziert und danach mittels einer enzymatischen Reinigung nach dem folgenden Protokoll aufgearbeitet:

Reinigungsprotokoll - Sequenzierung

Komponente	Volumen (µl)
Alkalische Phosphatase –SAP (1 U/µl)	0,50
10x ExoI Puffer	0,50
ExoI Enzym (10U/µl)	0,05
Dephosphoryl. Puffer (10x)	0,45
dH2O	3,50
PCR-Produkt	5,00
Gesamtvolumen	10, 00

Der Ansatz wird für 60 min bei 37ºC und für 15 min bei 80ºC inkubiert.

Für die Sequenzierung wurde das folgende Protokoll benutzt:

Sequenzprotokoll

Komponente	Volumen (µl)
PCR-Produkt	1,50
Big Dye Puffer	1,00
Big Dye Mix	1,00
Primer F (10pmol/µl)	0,50
dH2O	1,00
Gesamtvolumen	5,00 µl

Bedingungen für die Sequenzreaktion

96ºC	5 sek	25 Zyklen
50ºC	15 sek	
60ºC	4 min	

Nach der Sequenzierung müssen die Proben gereinigt werden. Dafür wurde zu dem Reaktionsansatz 100 µl Präzipitationsmix (EDTA 0, 1 mM, NaAcetat 3 M, pH 5, 2, Ethanol 100%) gegeben und das Gemisch für 30 min bei 1500 x g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wird der Überstand verworfen und zu dem Rest 200 µl 70% Ethanol gegeben und das Gemisch erneut bei 1500 x g für 8 min zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wird der Überstand verworfen, die Probe bei 94°C in einem offenen Thermocycler für 1 min getrocknet und anschließend in 20µl dest. Wasser aufgelöst. Das Reaktionsgemisch wird auf dem ABI-3100 Sequenator getrennt und die Ergebnisse mittels Sequencing Analysis V.5.2 Software ausgewertet.

3.9.6 Analyse der Tumorproben von *NBN* heterozygoten Patienten

Um zu überprüfen, ob die Tumorentstehung bei Trägern einer *NBN*-Mutation durch Verlust des Wildtyp Allels (Loss of heterozygosity) bedingt ist, haben wir die Tumorproben (3.1.4) mittels der Fragmentanalyse (3.9.3) für die 657del5 Mutation und durch SnapShot Analyse (3.9.4) für die R215W Mutation untersucht.

3.9.7 Überprüfung der *NBN*-Mutation R215W auf Pathogenität mit Hilfe von PolyPhen, Panther und Mutation Tester Programmen.

Die potenzielle Pathogenität von DNA-Veränderungen, die, mit einem Aminosäureaustausch verbunden sind, kann mit Hilfe verschiedener Software-Programme beurteilt werden. Hier haben wir drei solcher Programme, nämlich *PolyPhen (http://*coot.embl.de/PolyPhen*)*, *Panther (http://www.pantherdb.org)* und *Mutation Tester (http://www.mutationtaster.org/)* benutzt, um die Mutation R215W zu analysieren.

4 Ergebnisse

Schwerpunkt dieser Arbeit ist die Untersuchung polnischer Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphomen auf das Vorhandensein der *NBN*-Mutationen 657del5 und R215W und der Vergleich der erhaltenen Frequenzen mit entsprechenden Kontrollen.

4.1 Screening der NHL-Patienten zum Nachweis der *NBN*- Mutationen 657del5 und R215W

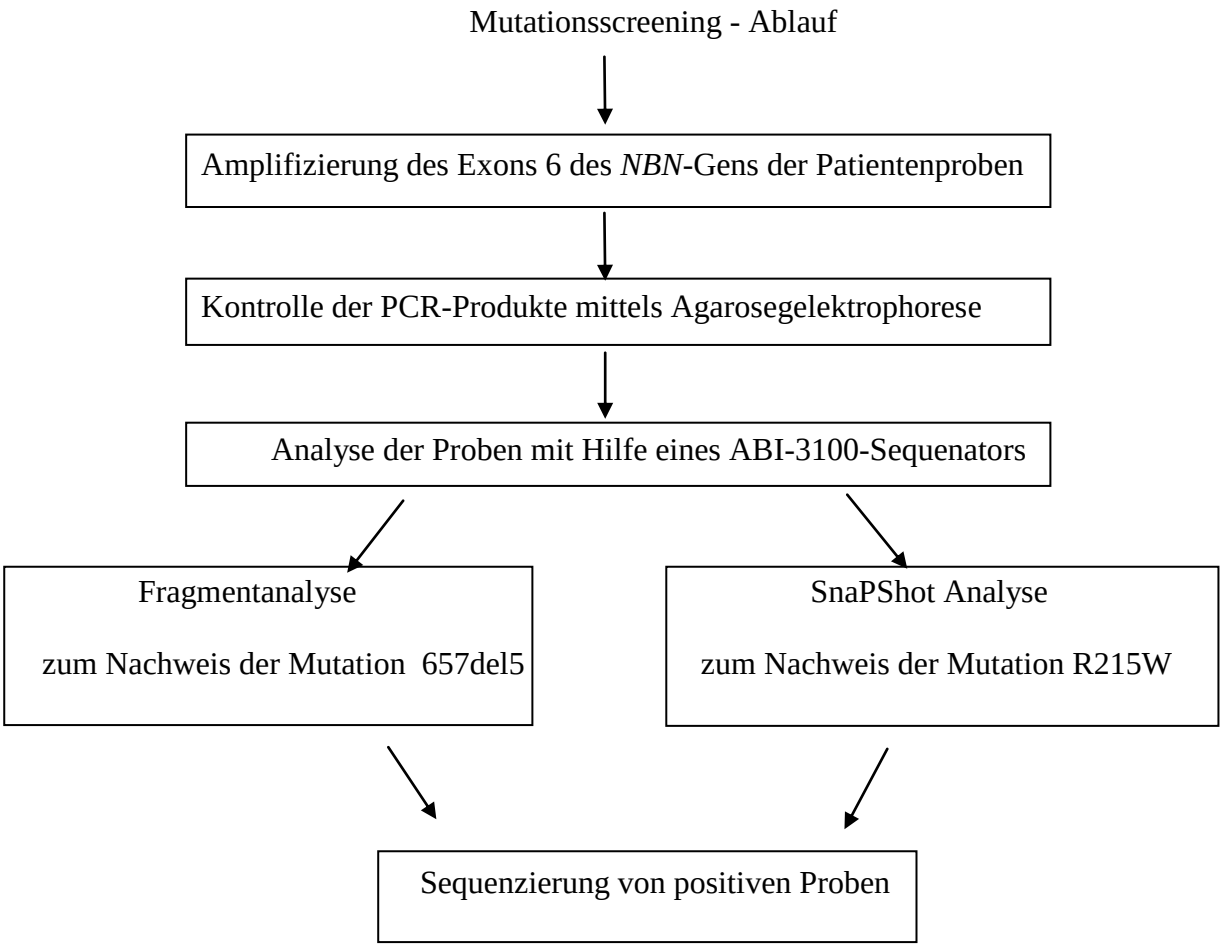


Abb. 8. Schematische Darstellung des Ablaufs des Mutationsscreenings

4.1.1 Fragmentanalyse zum Nachweis der Mutation 657del5 bei NHL-Patienten

Es wurden insgesamt 186 Proben von Patienten mit NHL zur Verfügung gestellt. Alle Patienten stammten aus der Woiwodschaft Mazowien, eines der 16 administrativen Bezirke Polens, und

sind in der Tabelle 1 dargestellt.

Bekanntlich unterscheiden sich die 657del5 Mutationsfrequenzen in Polen deutlich von Region zur Region [123]. Insofern ist ein Vergleich der Frequenzen der heterozygoten Tumorpatienten nur dann sinnvoll und aussagekräftig, wenn die Kontrollen aus derselben Region stammen. Deshalb werden hier nur Patienten und Kontrollen aus der Woiwodschaft Mazowien verglichen.

Zunächst wurde das zu untersuchende Exon 6 für jede Probe mittels PCR amplifiziert und das Ergebnis der Amplifizierung auf einem Agarose-Gel dargestellt (Abb. 8).

Alle Proben, die für den Nachweis der Mutation 657del 5 untersucht werden sollten, wurden mit den Primern (wie in 3.4.1. gezeigt), amplifiziert. Das PCR-Produkt, ist, wie erwartet, 112 bp groß.

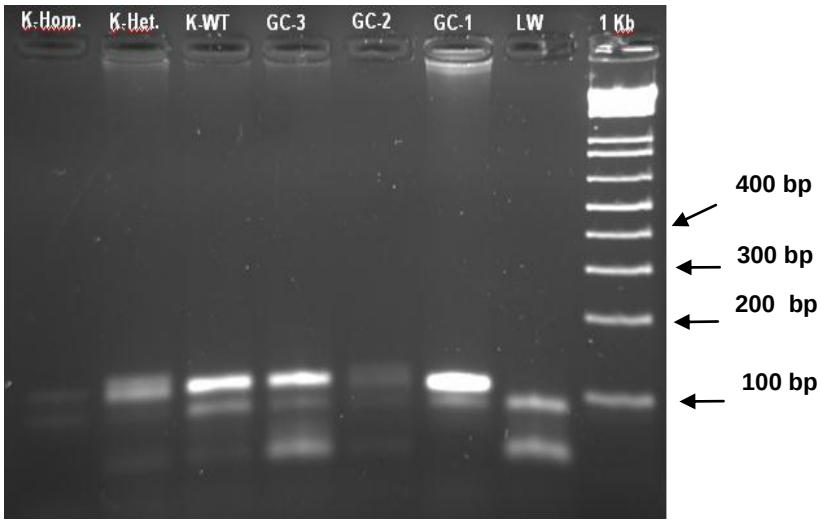


Abb. 9 Beispiel für die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte des Exons 6. GC1; GC2; GC3 –Patienten-Proben amplifiziert aus Guthrie Cards; K-Hom. - Kontrolle, homozygot für 657del5; K-Het. - Kontrolle, heterozygot für 657del5; K-WT – Wildtypkontrolle; LW – Leerwert; 1Kb – Leiter

Aufgrund der hohen Zahl der Proben haben wir die Fragmentanalyse eingesetzt. Diese ermöglicht die Differenzierung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Länge. Bei der Mutation 657del5 handelt es sich um eine Deletion von 5 Basenpaaren (ACAAA). Infolge dessen haben heterozygote Träger dieser Mutation zwei Allele mit verschiedenen Längen, ein Wildtyp Allel und ein Allel, das um die Sequenz ACAAA kürzer ist. Um die Allele visualisieren zu können, haben wir einen Fam-markierten Vorwärtsprimer benutzt. Als Referenz wurden bei jedem Lauf 3 Kontrollproben mitanalysiert – eine homozygote Probe, eine Probe - heterozygot für die

657del5-Mutation, sowie eine homozygote Probe für den Wildtyp. Unter den 186 Patienten mit NHL fanden wir mit Hilfe der Fragmentanalyse 6 Personen, die heterozygot für die Mutation 657del5 waren.

Im nachfolgenden Bild sind die Ergebnisse der Fragmentanalyse von 4 Patienten mit NHL sowie drei Kontrollen und ein Leerwert gezeigt.

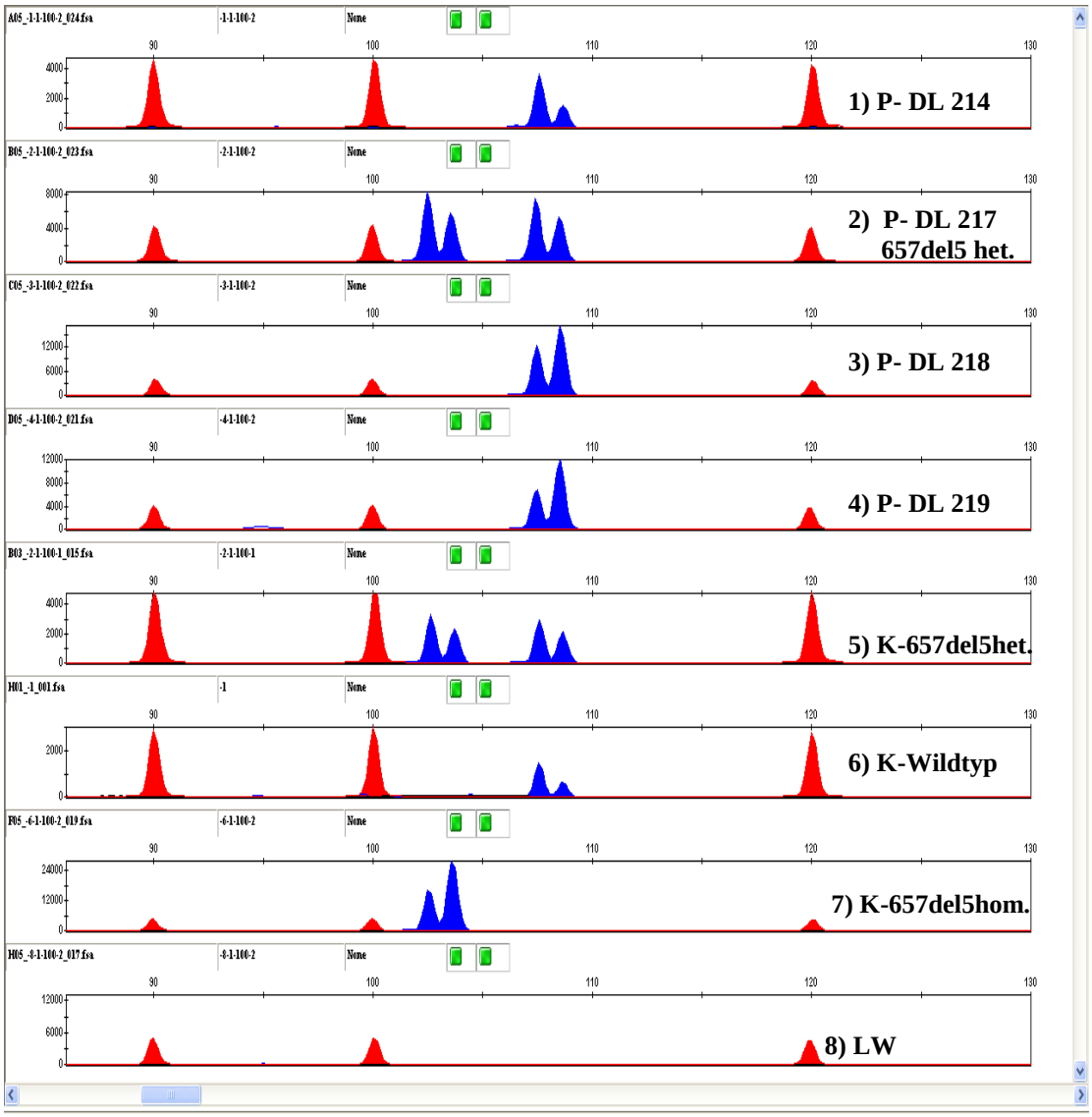


Abb. 10. Fragment Analyse für den Nachweis der Mutation 657del5: Probe 1) P- DL 214, homozygot, Wildtyp; Probe 2) P- DL 217-heterozygot; Probe 3) & 4) P- DL 218 und P- DL 219-homozygot, Wildtyp; Probe 5) K-657del5het – heterozygote Kontrolle; Probe 6) K-Wildtyp-Kontrolle - homozygot für den Wildtyp; Probe 7) K-657del5hom - Kontrolle, homozygot für 657del5; Probe 8) LW – Leerwert. Blau sind die PCR-Produkte und rot ist der Standard dargestellt.

Wie in der Abb. 10 zu sehen ist, sind die Wildtyp-homozygote Probe als auch die 657del5-

homozygote Probe durch einen Peak gegenzeichnet. Bei den heterozygoten Proben sind im Gegensatz dazu zwei Peaks zu sehen. Alle Peaks, sowohl bei den homozygoten als auch bei den heterozygoten Proben, sind „aufgesplittert“. Das lässt sich durch das Anheften eines Adenin-Nukleotides am 3’-Ende der amplifizierten DNA-Sequenz erklären [135].

4.1.2 Bestätigung von 657del5-heterozygoten Proben mittels Sequenzierung

Alle Proben, die sich bei der Fragmentanalyse als heterozygot erwiesen, wurden anschließend sequenziert, um deren heterozygoten Status zu bestätigen.

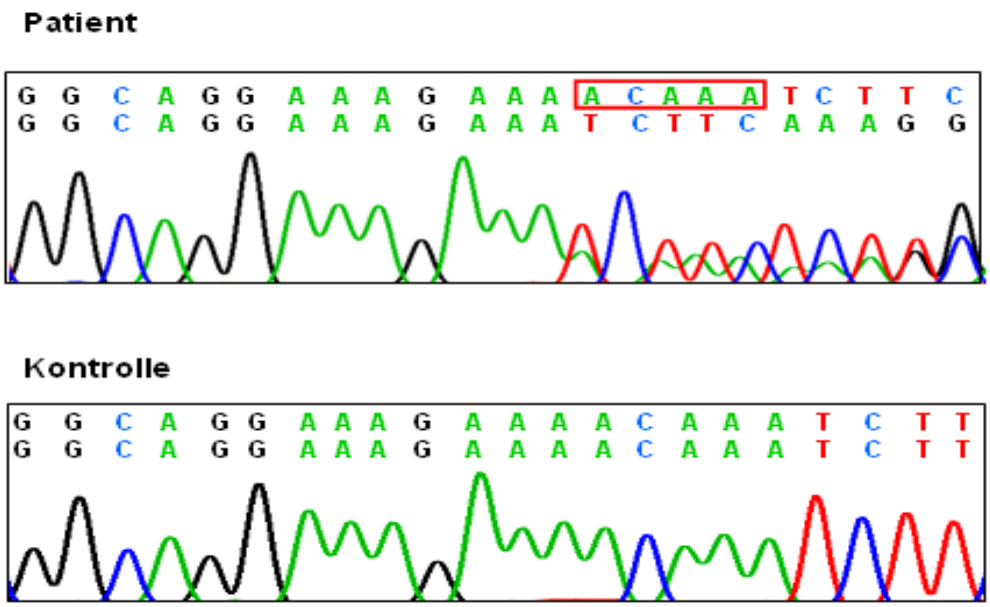


Abb. 11. Sequenzanalyse des Exons 6 des *NBN*-Gens. Dargestellt ist ein Abschnitt des Exons: oben die Probe des Patienten DL217 mit der 5 bp-Deletion – 657del5, unten eine Kontrollsequenz. Das rote Kästchen markiert die 5-bp-Deletion.

Wie bereits gesagt, haben wir unter den 186 NHL-Patienten 6 Heterozygote für die 657del5 Mutation gefunden. Ausgehend von der von uns ermittelten Mutationsfrequenz bei den 1620 Kontrollen (1/162) waren nur 1,15 heterozygote Proben zu erwarten. Die Zahl der gefundenen heterozygoten Proben ist statistisch signifikant erhöht (OR: 5,34; 95%CI: 1,92-14,86; p=0,015). Bei allen 6 heterozygoten Patienten waren Non-Hodgkin-Lymphome der B-Zell-Gruppe diagnostiziert worden. Die Lymphomentitäten können der Tabelle 8 entnommen werden.

Lymphom-Typ	Patientenalter
MALT (Magen)	71
MALT (Kolon)	49
GC-DLBCL	75
Nodales FL	25
Nodales Burkitt-Lymphom	35
Burkitt-like-Lymphom (Magen)	27

Tabelle 8. NHL-Patienten, heterozygot für die *NBN*-Mutation 657del5 aus der Gruppe von 186 NHL-Patienten. Lymphomentitäten und Patientenalter sind dargestellt.

Zusätzlich zu den 186 NHL-Patienten hatten wir früher, im Rahmen unserer Studie aus dem Jahr 2004, eine Gruppe von 42 NHL-Patienten auch für die *NBN*-Mutationen 657del5 und R215W untersucht und dabei 2 heterozygote für die slawische Mutation gefunden: einen 63-jährigen Patienten mit MCL des Gaumens und einen 53-jährigen Patienten mit peripherem T-Zell-Lymphom des Magens [125]. Auch diese Patienten stammen aus der Voivodschaft Mazovien. Wir führten eine gemeinsame Auswertung der Ergebnisse aller von uns untersuchten NHL-Patienten. Dabei ergab sich eine Gesamtgruppe von 228 Patienten mit NHL, davon 8 heterozygote Personen für die Mutation 657del5 (OR 5,85; 95%CI: 2,29-15,00; p=0,0001). Die Lymphom-Formen der 228 Patienten sind in der Tabelle 10 dargestellt. Für jede Lymphomentität sind auch die Zahl der extranodalen und darunter der GIT-Vorkommnisse angegeben.

Typ des NHL	Alter des Patienten
MCL des Gaumens	63
T-Zell-Lymphom des Magens	53

Tabelle 9. 2 NHL-Patienten, heterozygot für die *NBN*-Mutation 657del5 unter 42 NHL-Patienten. Lymphomentität und Patientenalter sind dargestellt [125].

Patienten	Gesamtzahl	Extranodale	GIT
Vorläufer B-Zell-Neoplasie	3	1	0
Peripheres „reifes“ B-Zell-Lymphom	24	3	0
Marginalzonen Lymphom	5	1	0
MALT	12	12	10
Follikuläres Lymphom	24	6	0
Mantelzell Lymphom	24	10	4
Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom	95	43	17
Burkitt- & Burkitt-ähnliches-Lymphom	9	4	3
Vorläufer T-Zell-Neoplasie	8	2	0
Reifes T-Zell-Lymphom	23	10	3
Nicht klassifiziert	1	0	0

Tabelle 10. Formen der Non-Hodgkin-Lymphome unter den 228 NHL-Patienten

Es fiel auf, dass viele der 657del5-heterozygoten Träger an gastrointestinalen Lymphomen (GIT-Lymphomen) erkrankt waren. In der Gesamtgruppe der NHL-Patienten (n=228) gab es 37 Personen, bei denen Lymphome des gastrointestinalen Traktes diagnostiziert wurden, 4 davon waren Träger der slawischen Mutation (OR 19,52; 95%CI: 5,82-65,42; p=0,0002).

Proben	Patientenzahl	657del5-Heterozygote	OR(95%CI)	p-Wert
Kum. Gruppe	228	8	5.85 (2.29-15.00)	0.0001
GIT-Lymphome	37	4	19.52 (5.82-65.42)	0.0002
Kontrollen	1620	10		

Tabelle 11. Verteilung der heterozygoten 657del5-Träger: *unter allen NHL-Patienten; *der Gruppe von Patienten mit GIT-Lymphomen und *der Kontrollen sowie die statistische Auswertung der Ergebnisse.

Der Vergleich des Alters der 8 657del5-heterozygoten Patienten (mittleres Alter: 51 Jahre) und der anderen Patienten (mittleres Alter: 61 Jahre) sowie des Alters der 657del5-Heterozygoten mit gastrointestinalen Lymphomen (mittleres Alter: 51 Jahre) mit dem Alter der anderen Probanden mit GIT-Lymphomen (mittleres Alter: 64 Jahre) zeigte, dass das durchschnittliche Alter der heterozygoten Patienten geringer als das Alter der Wildtyp-homozygoten Patienten war. Es konnte jedoch keine statistische Signifikanz (p=0,327 bzw. p=0,091) nachgewiesen werden.
Beide 657del5-heterozygoten Patienten, die an einem MALT-Lymphom erkrankt waren, haben über das Vorkommen von malignen Erkrankungen bei Verwandten berichtet. Der Patient mit einem MALT des Magens hatte 2 Verwandte zweiten Grades, die ebenfalls an Malignomen des Magens litten. Der Patient mit einem Colon-MALT hatte einen Verwandten zweiten Grades mit Malignomen des Magens und einen Verwandten dritten Grades, der an einem Dünndarm-Tumor erkrankt war.
Information über das Vorkommen von malignen Erkrankungen bei Verwandten der anderen heterozygoten Patienten standen leider nicht zur Verfügung.

4.1.3 Screening der NHL-Patienten auf Vorhandensein der R215W-*NBN*-Mutation mittels SnapShot Analyse

Die Proben der 186 NHL-Patienten wurden auch auf das Vorhandensein der Mutation R215W analysiert. Nach der DNA-Amplifikation mit den Primern (Abschnitt 3.4.2), die ein Produkt von 314bp ergaben, wurden die Proben mittels der SnapShot Reaktion (siehe Methoden) analysiert.

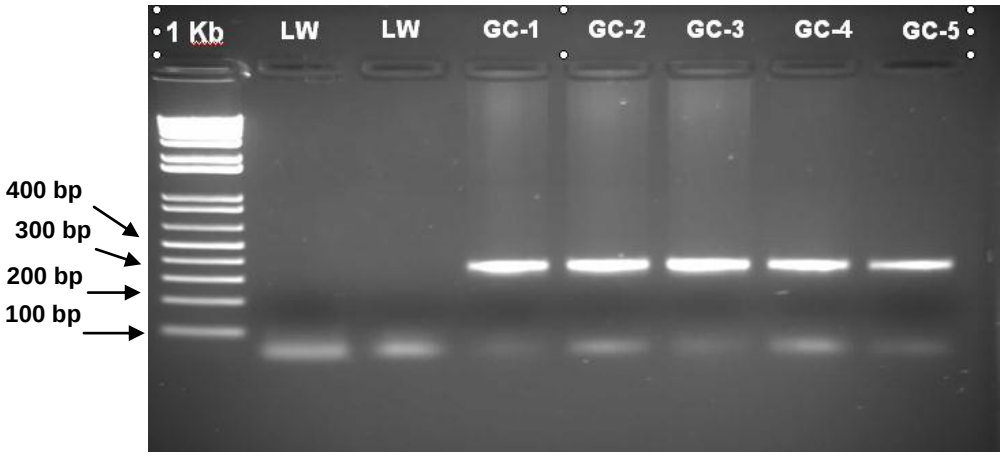


Abb. 12. Gelelektrophorese der PCR-Produkte des Exons 6, welches für die R215W–Mutationsanalyse amplifiziert wurde. GC1; GC2; GC3; GC4 und GC5 –Patienten-Proben amplifiziert aus Guthrie Cards; LW – Leerwert; 1Kb – Leiter.

Bei der Wildtyp-*NBN*-Sequenz ist die Base Cytosin an Position 643 Teil des Codons CGG, das die Aminosäure Arginin 215 kodiert. Bei der c.643C>T-Substitution entsteht das Triplett TGG. Dadurch wird Arginin in der Position 215 durch Tryptophan ersetzt - Arg215Try (R215W).

Bei der SnapShot Analyse (siehe die Beschreibung der Methode in 3.9.4) von Proben, homozygot für das Wildtyp-Allel ist bei der Auswertung nur ein Peak zu sehen. Im Gegensatz dazu zeigen sich bei heterozygoten Proben aufgrund der zwei unterschiedlichen Allele zwei Peaks.

Unter den 186 Proben wurden 2 Proben gefunden, die heterozygot für die R215W-Mutation waren. In Abbildung 13 sind die Ergebnisse der SnapShot Analyse für drei Patientenproben-darunter eine der zwei heterozygoten Proben, eine bekannte heterozygote Kontrolle, eine Wildtyp-Kontrolle sowie ein Leerwert gezeigt. Die Leerwert-Probe dient zum Ausschluss einer Verunreinigung.

Proben 1. und 3. zeigen nur ein Peak (schwarz), der dem endmarkierten Snapshot Wildtyp-Nukleotid C entspricht und in derselben Position ist wie der Peak bei der Wildtyp-Kontrolle 4. Das bedeutet, dass die zwei Proben homozygot für das Wildtyp-Allel sind. Bei Probe 2. sind zwei Peaks (schwarz und rot) zu sehen, die übereinstimmend mit den Peaks der heterozygoten R215W-Kontrolle sind. Es sind zwei Peaks zu sehen, weil die Probe und die Kontrolle zwei verschiedene Allele (Wildtyp und Träger der Mutation R215W) aufweisen. Auf dem Fluorogramm sind außerdem noch orangene Peaks zu sehen, die dem Standardmix entsprechen und zur Fragmentgrößenbestimmung dienen.

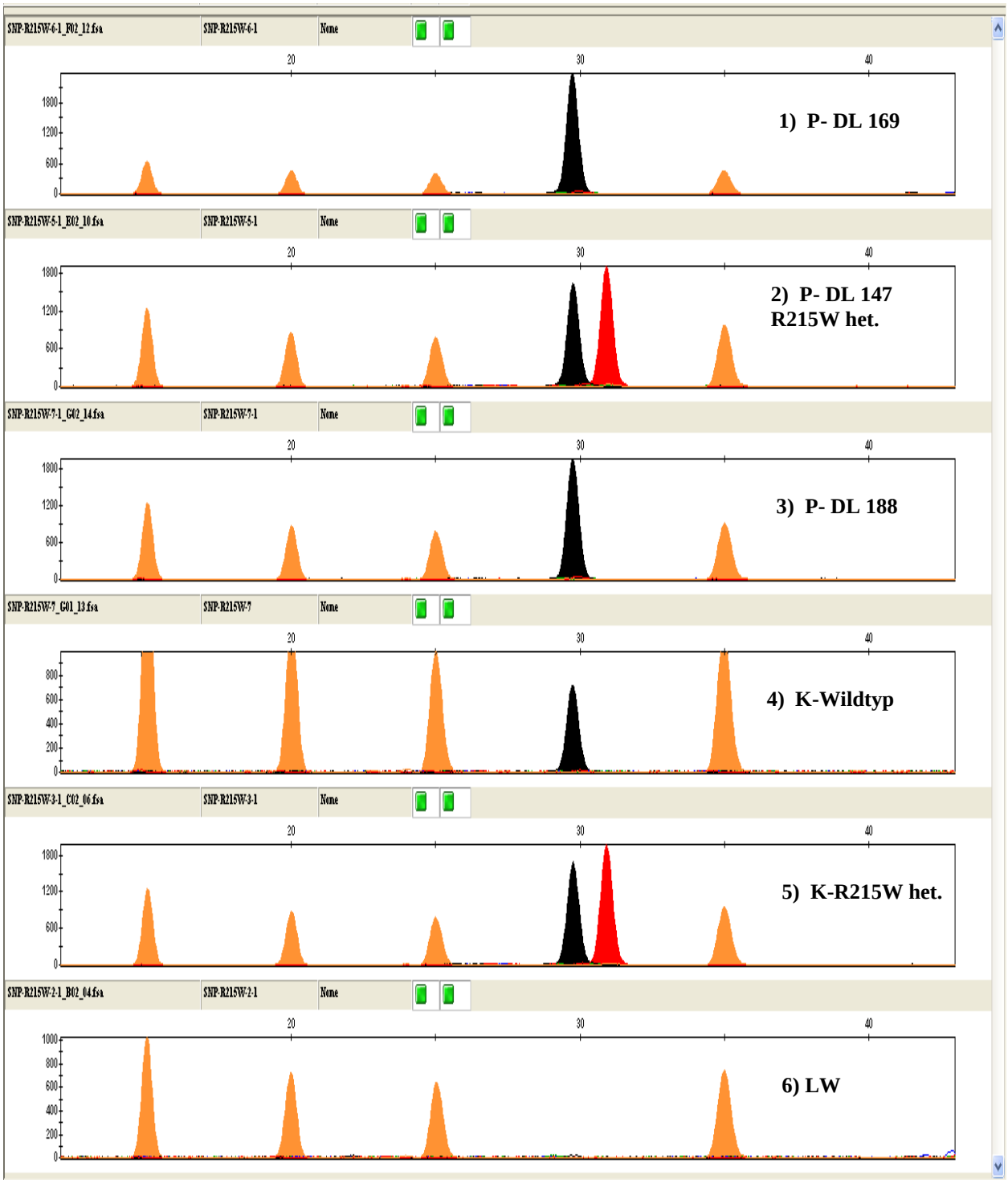


Abb. 13. SnapShot Reaktion für den Nachweis der *NBN*-Mutation R215W: Proben 1) & 3): P-DL 169 und P- DL 188-Wildtyp; Probe 2): P- DL 147-het für R215W; Probe 4): K-Wildtyp – bekannte Wildtyp-Kontrolle; Probe 5): K-R215Whet. – bekannte Probe, heterozygot für R215W; Probe 6): LW-Leerwert

4.1.4 Bestätigung von R215W-heterozygoten Proben mittels Sequenzierung

Die zwei Proben, die laut der SnapShot Analyse heterozygot waren, wurden sequenziert und die Ergebnisse verifiziert.

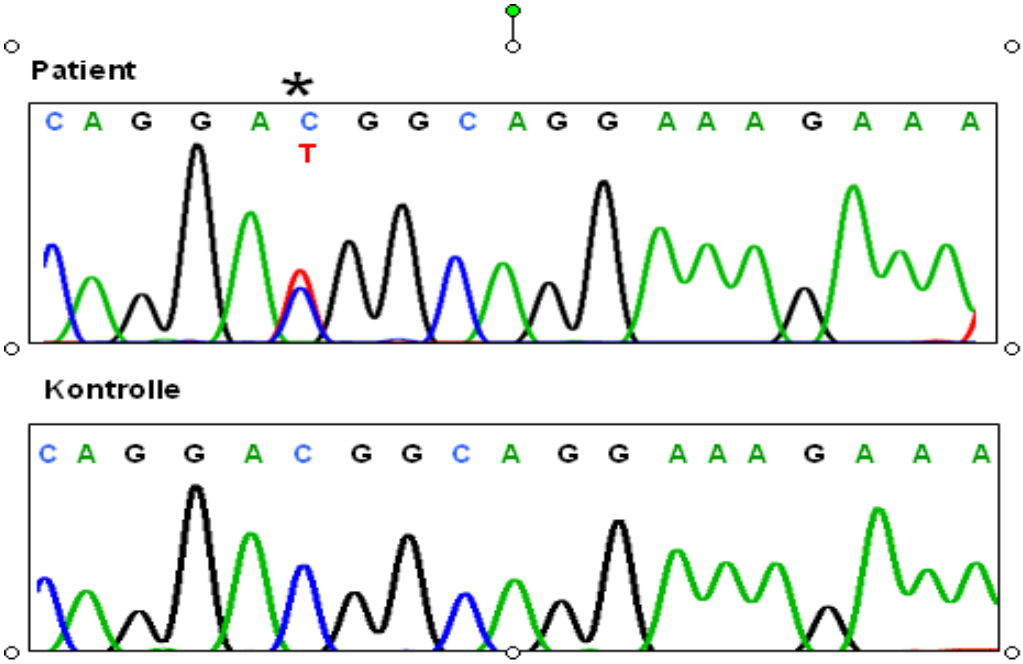


Abb. 14. Sequenzanalyse des Exons 6 des *NBN*-Gens. Dargestellt ist ein Abschnitt des Exons: – oben die Probe des Patienten DL147 mit einer R215W-Mutation, unten eine Kontrollsequenz. Mit einem Asterix ist die C>T-Transition markiert.

Der eine Patient, der sich als heterozygot für die R215W-Mutation erwies, war 74 Jahre alt und hatte ein nodales Marginal Zone-Lymphom. Bei dem zweiten heterozygoten Patienten, 53 Jahre alt, wurde ein nodales T-Zell/histiozytenreiches DLBCL diagnostiziert.

Die Zahl der heterozygoten R215W-Träger unter den 186 NHL-Patienten liegt über dem Erwartungswert – 2/186 gegenüber 4/1620 bei den Kontrollen (p=0,0176). Da unter den von uns früher untersuchten 42 NHL-Patienten keine R215W-Heterozygoten gefunden wurden, ergab sich für die Gesamtgruppe von NHL-Patienten (n=228) keine Signifikanz für die Zahl der Patienten mit einem R215W-heterozygoten Status (2/228 gegenüber 4/1620 bei den Kontrollen, OR:3,56; p=0,1627).

Fasst man alle heterozygoten Patienten (567del5 + R215W) zusammen, gab es in der Gesamtgruppe der NHL-Patienten (n=228) insgesamt 10 Heterozygote und damit eine hoch signifikante Erhöhung gegenüber der Kontrollgruppe (p=0,0003).

Patienten	657del5+R215W het.	Negativ	Gesamt	p-Wert
NHL-Patienten	10	218	228	0,0003
Kontrollen	14	1606	1620	
Gesamt	24	1824	1848	

Tabelle 12. Fishers Exact Test für alle 657del5- und R215W-Heterozygote

4.2 Patienten mit soliden Tumoren

Zusätzlich zu den Patienten mit NHL wurden im Rahmen dieser Arbeit insgesamt 641 Blutproben von polnischen Patienten mit verschiedenen soliden Tumoren mittels einer SnapShot Analyse (die Methode ist im Abschnitt 3.9.4 beschrieben) auf das Vorhandensein der *NBN*-Mutation R215W analysiert. Diese Proben waren bereits für die Mutation 657del5 untersucht worden Die Ergebnisse für beide Mutationen wurden in dem Artikel „Increased cancer risk of heterozygotes with *NBS1* germline mutations in Poland“ [125] veröffentlicht. Wir haben 2 R215W-heterozygote Träger unter den 641 Patienten gefunden. Die 2 Proben wurden anschließend sequenziert und deren heterozygoter Status bestätigt.
Die zwei heterozygoten Patienten wiesen unterschiedliche Krebsformen auf, wie in Tabelle 13 dargestellt wird.

Tumor-Probe	Tumor
DU 107	Testes CA
DGO 128	Ovarien CA

Tabelle 13. Krebsformen bei den R215W-heterozygoten Patienten mit soliden Tumoren.

Die Frequenz der Heterozygoten mit der R215W-Mutation – 2/ 641 – ist nur unwesentlich erhöht im Vergleich zu der von uns ermittelten Frequenz dieser Mutation für die Kontrollgruppe.

4.3 Kontrollen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 1620 anonyme Neugeborenen-Blutproben aus der Woiwodschaft Mazowien für die R215W-Mutation analysiert.
Die Proben wurden zunächst amplifiziert und mittels Agarosegel-Elektrophorese überprüft. Die gereinigten Proben wurden dann mittels der SnapShot Reaktion untersucht. Es wurden 4 heterozygote Proben ermittelt, die dann mittels Sequenzierung bestätigt wurden. Da die hier angewandten Methoden – SnapShot und Sequenzierung – dieselben wie bei der Analyse der NHL-Patienten sind, werden sie hier nicht erläutert.

4.4 Überprüfung der Pathogenität der *NBN*-Mutation R215W mit Hilfe der Programme PolyPhen, Panther und Mutation taster

Die potenzielle Pathogenität von DNA-Veränderungen, die zum Aminosäurenaustausch führen, kann mit Hilfe von verschiedenen Software-Programmen beurteilt werden.
Obwohl in der Literatur Hinweise auf den pathogenen Charakter der Mutation R215W bereits vorhanden sind [136, 137], haben wir zusätzlich drei Programme, nämlich PolyPhen (http://coot.embl.de/PolyPhen/), Panther (http://www.pantherdb.org) und Mutation Taster (http://www.mutationtaster.org) benutzt um die Auswirkung der R215W - Mutation auf die Proteinfunktion zu analysieren.
PolyPhen (Polymorphismus Phänotypisierung) nutzt einfache empirische Regeln zur Vorhersage, ob ein non-synonymer SNP pathogen ist und die Funktion des Proteins beeinflussen könnte. Diese Vorhersage basiert auf dem Vergleich der Ausgangsequenz mit Sequenzen aus der Datenbank. Mit Hilfe der PSIC Software wird den PSIC-Wert (Position-Specific Independent Counts) berechnet und die Sequenzveränderung in eine von drei Gruppen eingestuft. Ist der PSIC-Wert unter 0,5 wird die Aminosäuresubstitution als „gutartig“ beurteilt. Bei einem PSIC-Wert zwischen 0,5 – 1,5 ist die Auswirkung „eventuell schädlich“ und „wahrscheinlich schädlich“, wenn der PSIC-Wert über 2,0 liegt [138]. Das PolyPhen Programm hat für die R215W Mutation einen PSIC-Wert von 2,335 berechnet und somit die Mutation als „wahrscheinlich schädlich“ eingestuft.
Panther (Protein analysis through evolutionary relationships) ist ein Sofware-Programm zur Ableitung der Funktion von unbekannten Genen bzw. zur Beurteilung von Sequenzänderungen und ihrer Auswirkung auf die Proteinfunktion, basierend auf dem Vergleich mit bekannten

Sequenzen und evolutionären Beziehungen. Auch bei diesem Programm existiert ein Scoring-System, das einen Wert (SubPSEC) zwischen –12 und 0 errechnet. Ein Wert von 0 bedeutet, dass die Sequenzänderung keinen Effekt hat. Je negativer der Wert, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass es sich um eine pathogene Mutation handelt. Die Auswertung der Mutation R215W Mutation ergab einen Wert von – 4.73327.

Das dritte Programm - MutationTaster - ist eine web-basierte Anwendung für die schnelle Auswertung von Veränderungen in der DNA-Sequenz. Dabei integriert MutationTaster Informationen aus verschiedenen biomedizinischen Datenbanken und nutzt etablierte Analysemethoden. Je nach Art der Sequenzänderung, wählt MutationTaster unter drei verschiedenen Prognosemodellen: a) intronische Veränderungen, b) Änderungen, die eine einzige Aminosäure betreffen oder c) Veränderungen, die komplexe Veränderungen in der Aminosäuresequenz verursachen [139]. Das Mutation Tester Programm beurteilte die R215W Mutation als pathogen mit einem Wert von 2.75.

Die folgenden drei Abbildungen geben die Ergebnisse der R215W- Mutationsanalyse mittels der o. g. Programme wider.

A)

PolyPhen: prediction of functional effect of human nsSNP http://coot.embl.de/PolyPhen/ *NBN* Gene R215W Mutation

Query

Acc number	Position	AA_1	AA_2	Description
B2RNC5	215	R	W	SubName: Full=Nibrin; SubName: Full=Nibrin, isoform CRA_a; LENGTH: 754 AA

Prediction

This variant is predicted to be probably damaging

Prediction	Available data	Prediction basis	Substitution effect	Prediction data
probably damaging	alignment	alignment	N/A	PSIC score difference: 2.335

B)

Evolutionary analysis of coding SNPs http://www.pantherdb.org/tools/csnpScore.do ***NBN* Gene R215W Mutation**

PANTHER
Classification System

PANTHER HMM: NIBRIN-RELATED (PTHR12162)
HMM E-value score: 0

subPSEC	$P_{deleterious}$	substitution	MSA position	P_{wt}	$P_{substituted}$	NIC
-4.73327	0.84983	R215W	223	0.27992	0.00365	2.493

The probability that a given variant will cause a deleterious effect on protein function is estimated by $P_{deleterious}$, such that a subPSEC score of -3 corresponds to a $P_{deleterious}$ of 0.5. For more details, please see Brunham et al., 2005.

C)

Mutation Taster: *http://www.mutationtaster.org* ***NBN* Gene R215W Mutation**

Mutation Taster

mutation t@sting

Bayes prediction (genomewide) **disease causing** **(p=0.999999999999899)** (explain)
Bayes prediction (aae model) **disease causing** **(p=0.809780576947847)** (explain)
Summary
- **amino acid sequence changed**
- **listed as SNP**

analysed issue	analysis result
name of alteration	no title
HGNC symbol	NBN
Ensembl transcript ID	ENST00000265433
UniProt peptide	O60934
alteration type	single base exchange
alteration region	CDS
alteration on nucleotide level	C>T
coding sequence (CDS) position	643
AA changes	Substitution: R215W Score: 2.75 explain
frameshift	no
SNPs	Reference ID: rs34767364; Chromosome: 8; Position on chromosome: 90983460

conservation
protein level for non-synonymous changes

species	match	aa	alignment
Human		215	IGSKNVDLSG R QERKQIFKGK
Chimp	all identical	215	IGSKNVDLSG R QERKQIFKGK
Rhesus	all identical	215	IGSKNVDLSG R QERKQIFKGK

Abb. 15. A) - PolyPhen; B) - Panther; C)- Mutation Taster. Alle drei Programme beurteilen die R215W-Mutation als pathogen.

4.5 Semiquantitative PCR-Analyse von heterozygoten Tumor-Proben

Leider stand von keinem der hier untersuchten Patienten Tumormaterial zur Verfügung. Wir hatten jedoch Tumormaterial von zwei anderen Patienten. Die erste Tumorprobe stammte von einem für die 657del5-Mutation heterozygoten Patienten mit Melanom, die zweite Tumorprobe von einer Patientin mit pilozystischem Astrozytom, die heterozygot für die R215W-Mutation war. Der Tumoranteil der Probe, die von dem Melanom-Patienten stammte, betrug 50%. Die Tumor-DNA wurde nach Beurteilung des Tumorgewebes, ohne Mikrodissektion gewonnen. Bei der zweiten Tumorprobe wurde die Tumor-DNA aus mikrodisseziertem Material isoliert. Der Tumoranteil war 100%.

Wir führten eine semiquantitative Fragment- bzw. SnapShot Analyse durch, um den Anteil des mutierten und des Wildtyp-Allels der jeweiligen Tumorprobe mit der entsprechenden Blutprobe zu vergleichen. So ein Vergleich kann am besten mit einer quantitativen Analyse durchgeführt werden. Da wir jedoch nur über eine sehr begrenzte Menge an DNA verfügten, haben wir die semiquantitative Fragment- und Snapshot-Analyse durchgeführt, die sehr wenig DNA beanspruchen.

Abbildung 16 zeigt die Ergebnisse der semiquantitativen Fragment-Analyse der Tumor- und Blut-DNA von dem Patienten mit Melanom sowie der DNA einer Wildtyp - Kontrolle. Bei der heterzygoten Probe (Tumor und Blut) sind 2 Peaks zu sehen, während bei der Wildtyp - Probe nur ein Peak. Der Vergleich der Tumor- und Blut-DNA zeigte, dass der Anteil des Wildtyp- und des 657del5- Allells in beiden Proben jeweils 50% ist, was gegen einen Verlust des Wildtyp-Allels in der Tumor-DNA spricht.

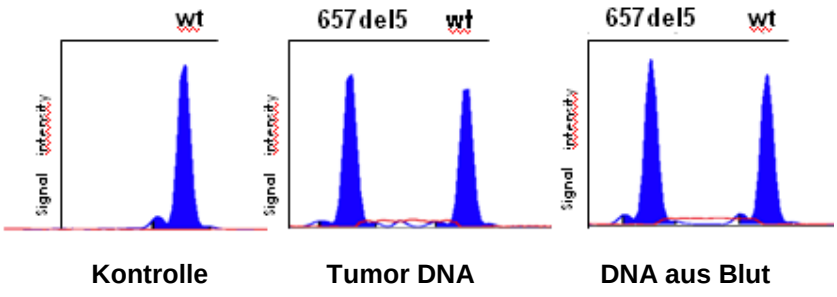


Abb. 16. Semiquantitative PCR in Tumor- und Blut-DNA von einem Patienten mit Melanomen, heterozygot für die 657del5-Mutation.

Abbildung 17 zeigt die Ergebnisse der semiquantitativen SnapShot-Analyse der Tumor- und

Blut-DNA von der Patientin mit pilozystischem Astrozytom, die heterozygot für die R215W-Mutation ist. Gezeigt sind die Tumor- und Blut-DNA der Patientin sowie die DNA einer Wildtyp Kontrolle. Bei den heterozygoten Proben sind 2 Peaks zu sehen (blau für Cytosin und grün für Timidin). Die Wildtyp-Probe ist nur durch einen Peak (blau) gekennzeichnet. Der Vergleich der Tumor- und Blut-DNA zeigte, dass der Anteil des Wildtyp- und Mutanten- Allells in beiden Proben 50% ist, was gegen einen Verlust des Wildtypsallels in der Tumor-Probe spricht.

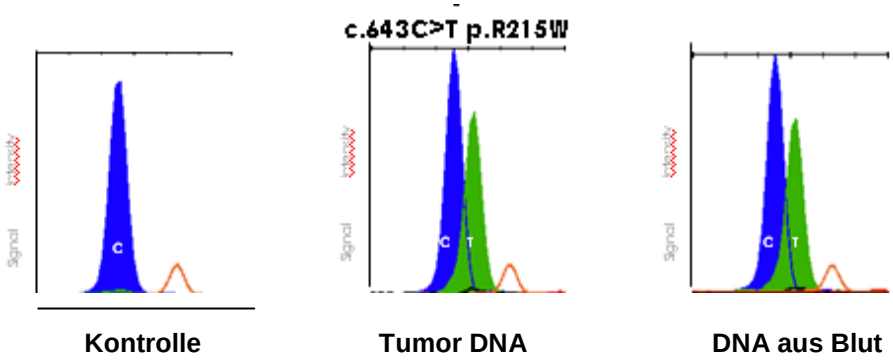


Abb. 17. Semiquantitative PCR in Tumor- und Blut-DNA von einer Patientin mit pilozystischem Astrozytom, heterozygot für die R215W-Mutation.

5 Diskussion

Das Nijmegen Breakage Syndrom (NBS) ist eine seltene autosomal rezessive Krankheit aus der Gruppe der Chromosomeninstabilitätssyndrome. Diesen gemeinsam ist eine gesteigerte Mutabilität, insbesondere unter dem Einfluss von ionisierenden Strahlen sowie ein stark erhöhtes Risiko für Neoplasien, insbesondere Lymphome und Leukämien.

Die Zellen des lymphoproliferativen Gewebes sind durch eine sehr hohe Rekombination der T-Zell Rezeptor- und der Immunoglobulin-kodierenden Gene charakterisiert. Im Rahmen dessen entstehen DNA Doppelstrangbrüche, die bei NBS und AT Patienten nur unvollständig repariert werden können, woraus ein hohes Risiko für die Entwicklung lymphoproliferativer Malignome resultiert. Die Aufklärung der Pathomechanismen derartiger Gendefekten haben auch neue Einsichten in die Carcinogenese geliefert [140].

Es wurde in den letzten Jahren gezeigt, dass nicht nur Patienten mit AT sondern auch Heterozygote für ATM-Mutationen ein deutlich erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Neoplasien haben, speziell für Mammakarzinome [141, 142, 143].

Aufgrund der Ähnlichkeit zwischen NBS und AT bezüglich der klinischen Bilder und des Risikos für Malignitäten hat sich die Frage gestellt, ob Heterozygote für *NBN*-Mutationen – genauso wie Heterozygote für *ATM*-Mutationen – ein erhöhtes Krebsrisiko aufweisen. Bereits 1990 wurde von Seemanova et al. ein signifikant gehäuftes Auftreten von Malignitäten bei 142 Verwandten von NBS-Patienten beobachtet [121]. Die Identifizierung des *NBN*-Gens ermöglichte die Ermittlung des Trägerstatus in NBS-Familien. Die Beobachtungen von Seemanova et al. aus dem Jahr 1990 wurden durch deren Studie aus dem Jahre 2007 bestätigt [122]. Sie untersuchten 344 Verwandte von NBS-Patienten (insgesamt 14 Familien) und fanden 13 Personen mit malignen Erkrankungen, von denen 11 heterozygote Träger für die Mutation 657del5 waren (erwartet wurden 6; p=0,05). Des Weiteren stellten die Autoren fest, dass unter den 56 Großeltern 10 der 28 Träger der 657del5-Mutation, aber nur 1 der 28 Nichtträger Krebs entwickelten [122].

Allerdings ist das Hauptproblem bei solchen Studien die geringe Zahl an geeigneten Familien, die analysiert werden können, besonders bei seltenen Krankheiten wie NBS. Bis heute sind nur etwa über 120 Familien mit NBS weltweit bekannt.

Eine andere Möglichkeit, um festzustellen, ob die *NBN*-Mutationsträger ein erhöhtes Krebsrisiko haben, ist die Häufigkeit von *NBN*-Mutationen bei Krebspatienten und bei geeigneten Kontrollen zu vergleichen. Der Vorteil dieser Vorgehensweise liegt darin, dass es viel leichter ist, große

Zahlen von Krebspatienten und Kontrollen zu rekrutieren. In den letzten Jahren haben viele Arbeitsgruppen weltweit solche Untersuchungen unternommen. In den meisten Studien wurden Patienten slawischer Herkunft untersucht. Dies hat den Vorteil, dass die Untersuchung auf die Gründer-Mutation 657del5 beschränkt werden kann, wodurch ein Mutationsscreening sehr erleichtert wird. Allerdings muss bei der Evaluierung und dem Vergleich der Ergebnisse der einzelnen Studien immer berücksichtigt werden, dass die Frequenz der *NBN*-Mutation 657del5 nicht nur von Population zu Population, sondern auch innerhalb eines Landes variieren kann. Während die Frequenz der 657del5-Mutation z. B. in der Tschechischen Republik 1/154, in der Ukraine (Lvov Region) 1/182 und in Bulgarien 1/180 beträgt, reicht sie in Polen von 1/90 bis 1/314 [11].

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, wurde ein erhöhtes Krebsrisiko für 657del5-Heterozygote z. B. bei Patienten mit ALL, Brustkrebs, Prostatakrebs und Melanomen gefunden [123, 124, 126, 130].

Im Jahre 2004 wurde in einer großen Studie an polnischen Krebs-Patienten eine signifikant erhöhte Frequenz der Mutation 657del5 gegenüber den Kontrollen, besonders bei Patienten mit NHL, gezeigt [125]. Gleichzeitig fand sich eine erhöhte Frequenz bei den Tumor-Patienten auch für die *NBN*-Mutation R215W. Allerdings ist diese Mutation im Unterschied zu der Gründer-Mutation nicht nur bei der slawischen Population zu finden [144, 145, 146].

Obwohl in vielen Studien ein allgemein erhöhtes Krebsrisiko bei *NBN*-Heterozygoten gefunden wurde, gibt es auch solche, die dagegen sprechen. Besonders widersprüchlich sind die Angaben bezüglich der Mutation 657del5 bei Patienten mit NHL. Keine erhöhte Frequenz für den 657del5 heterozygoten Status unter Erwachsenen und pädiatrischen NHL-Patienten fanden Stanulla et al., Cerossaleti et al., Rischewski et al. [144, 132, 133]. Eine mögliche Assoziation zwischen dem heterozygoten *NBN*-Status und der Entstehung von NHL fanden dagegen die Arbeitsgruppen von Resnick und Steffen [124,125]. Um dieser Frage noch einmal nachzugehen, haben wir eine größere Kohorte von polnischen Patienten mit NHL untersucht. Insgesamt wurden186 Patienten für die *NBN*-Mutationen 657del5 und R215W analysiert. Zusätzlich wurden als Teil dieser Arbeit und im Rahmen unserer Studie aus dem Jahr 2004 641 Patienten mit verschiedenen soliden Tumoren und 1620 Kontrollen auf das Vorliegen der R215W-Mutation untersucht [125]. Im Rahmen der Studie wurden diese Proben auch für die Mutation 657del5 analysiert.

5.1 Prävalenz der 657del5- und R215W-Mutationen bei NHL- Patienten

Wie bereits bei den Ergebnissen gezeigt, wurden unter den 186 analysierten NHL-Patienten 6 Heterozygote für die Mutation 657del5 (1/31) gefunden, dagegen 10 unter den 1620 Kontrollen (Trägerhäufigkeit 1/162). Der Unterschied ist statistisch signifikant (p=0,0015). Bei allen heterozygoten Patienten wurden B-Zell-Lymphome diagnostiziert: bei 2 Patienten MALT, bei einem Patienten -follikuläres Lymphom, bei einem Patienten - diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom, bei einem Patienten das Burkitt- und bei einem Patienten das Burkitt-like-Lymphom.
Hier könnte die Frage gestellt werden „ Ist es reiner Zufall, dass alle gefundene 657del5 – heterozygote Patienten an B-Zell Lymphomen erkrankt waren oder könnte der heterozygote *NBN*-Status eventuell einen Einfluss darauf haben, ob sich ein B-Zell- oder T-Zell-Lymphom entwickelt?
B-Zell-Lymphome kommen generell viel häufiger in der Bevölkerung vor als T-Zell-Lymphome, deren Häufigkeit mit 5-15% angegeben wird [III].
Die B- und T-Lymphozyten entstehen aus den pluripotenten hämatopoietischen Zellen des Knochenmarks im Rahmen von Differenzierungsprozessen. Die Entwicklung der B-Lymphozyten findet größtenteils im Knochenmark statt, während die Differenzierung der T-Lymphozyten im Thymus erfolgt, nachdem die Vorläuferzellen aus dem Knochenmark in den Thymus eingewandert sind. Bei Erwachsenen verlangsamt sich die Entwicklung von neuen T-Lymphozyten aus Vorläufern und die Zahl wird durch die Teilung von reifen T-Lymphozyten aufrechterhalten. Im Gegensatz dazu werden B-Lymphozyten auch im Erwachsenalter immer noch im Knochenmark neugebildet. Das könnte eine Erklärung sein, weshalb B-Zell Lymphome viel häufiger vorkommen als T-Zell-Lymphome, sowohl in der allgemeinen Bevölkerung als auch bei den NBS Heterozygoten.
Die in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse aus der Untersuchung der 186 NHL-Patienten wurden auch zusammen mit den Ergebnissen der im Rahmen einer früheren Studie [125] untersuchten 42 polnischen NHL-Patienten ausgewertet. Unter diesen 42 Patienten waren – im Vergleich zu den erwarteten 0,26 (p=0,05) – 2 Träger der Mutation 657del5 gefunden worden: ein Patient mit MCL des Gaumens und eine Patientin mit T-Lymphom des Magens. Die Häufigkeit des heterozygoten Status für die Mutation 657del5 war sowohl unter den 186 Patienten (p=0,015) als auch bei der kumulativen Auswertung (186+42) signifikant höher als erwartet (p=0,0001).
Interessanterweise waren von den 8 für die Mutation 657del5 heterozygoten Patienten vier an gastrointestinalen Lymphomen erkrankt. Unter allen 228 Patienten mit NHL gab es 37 mit Lymphomen des gastrointestinalen Traktes (GIT). Die Frequenz der Mutation 657del5 war bei

den Patienten mit GIT-Lymphomen statistisch signifikant erhöht: 4/37 (Fishers Exakt Test p=0,0002) [147]. Wir stellten auch eine erhöhte Frequenz für die 657del5-Mutation bei Patienten mit MALT (2/12) fest. Ein Patient hatte ein ventrikuläres MALT, der andere Patient ein kolorektales MALT. Beide Patienten berichteten über Verwandte zweiten und dritten Grades, die gastrointestinale Lymphome aufwiesen. Von den 10 Patienten mit Burkitt-Lymphom waren 2 heterozygot für die 657del5-Mutation. Leider standen keine Informationen darüber zur Verfügung, ob auch diese Patienten Verwandte mit malignen Erkrankungen hatten. Die genannten Ergebnisse sprechen dafür, dass der heterozygote *NBN*-Status das Risiko für NHL, besonders im Bereich des gastrointestinalen Traktes, erhöht. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von Resnik [124]. Er untersuchte 68 russische, pädiatrische Patienten mit lymphoretikulären Malignomen und 548 Kontrollen auf das Vorliegen der Mutation 657del5. Es wurden zwei heterozygote Patienten (ALL und Burkitt-Lymphom) und keine heterozygoten Träger bei den Kontrollen gefunden. Die heterozygote Patientin mit Burkitt-Lymphom hatte mehrere Verwandte, bei denen maligne Erkrankungen diagnostiziert worden waren.

Im Unterschied zu den oben erwähnten Studien fanden Stanula et al. keine heterozygoten Träger für die Mutation 657del5 unter 109 pädiatrischen Patienten mit NHL [133]. Auch Rischewski fand die Mutation unter 62 Patienten mit NHL nicht [132]. Chrzanowska macht anhand ihrer Studie die Schlussfolgerung, dass der *NBN*-heterozygote Status kein wesentlicher Risikofaktor für die Entwicklung von lymphoiden Malignitäten bei Kindern und Heranwachsenden darstellt [148]. Cerosaletti et al. kommen zu dem Schluss, dass *NBN*-Mutationen keine wesentliche Rolle bei der Entstehung von NHL in den Vereinigten Staaten spielen [144]. In ihrem Artikel geben Cerosaletti et al. keine Information über die ethnische Herkunft der 91 Patienten und der 154 Kontrollen. Auch bei japanischen Patienten mit extrakraniellen Lymphomen und Lymphomen des ZNS wurden keine *NBN*-Mutationen gefunden [134].

Die ethnische Zusammensetzung der untersuchten Kohorten ist jedoch von zentraler Bedeutung, wenn es um die Rolle der *NBN*-Mutationen und besonders der Founder-Mutation bei der Entstehung von Malignitäten geht. In den Studien von Cerosaletti, Hama, Rischewski and Stanula wurden Patienten nicht slawischer Abstammung untersucht [144, 134, 132, 133]. Es dürfte bekannt sein, dass die *NBN*-Mutation 657del5 nur unter Patienten slawischer Abstammung zu finden ist. Die Ergebnisse von Seemanova et al. sprechen dafür, dass *NBN*-Heterozygoten in den osteuropäischen Ländern, darunter besonders Träger der Founder-Mutation, ein deutlich erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Malignitäten haben [122].

Auffällig bei den hier gewonnenen Ergebnissen war die erhöhte Zahl an 657del5-heterozygoten Patienten, die an gastrointestinalen Lymphomen erkrankt waren. Der Darm stellt das größte

Immunorgan des Körpers dar. Es könnte diskutiert werden, ob der heterozygote Status für *NBN* – Mutationen über eine induzierte Immunsuppression das Risiko für die Entstehung von lymphoretikulären Malignomen, besonders von Lymphomen des gastrointestinalen Traktes, steigern könnte. So weisen NBS-Patienten eine Hypogammaglobulinämie auf, sogar manchmal eine Agammaglobulinämie. Von der Hypogammaglobulinämie besonders betroffen sind IgG und IgA, welche eine sehr wichtige Rolle bei der Darmimmunabwehr spielen. Um die Rolle von *NBN*-Heterozygotie bei der Entstehung von Malignomen des GITs zu klären, ist es notwendig, eine viel größere Zahl an Patienten zu untersuchen.

Auch Untersuchungen an *Nbs1*-heterozygoten Mäusen zeigen eine erhöhte Häufigkeit von chromosomalen Abberationen und das Auftreten von verschiedenen Neoplasien, darunter Lymphomen. Die Tumorgenese scheint jedoch mit der Haploinsuffizienz und nicht einem Verlust der Heterozygotie (LOH) zusammenzuhängen [19].

Unter den 186 Patienten mit NHL wurden auch 2 heterozygote Träger für die *NBN*-Mutation R215W nachgewiesen. Die vorgefundene Häufigkeit dieser Mutation war höher als erwartet (p-Wert 0,017). Obwohl das Ergebnis statistisch signifikant ist, sollten aufgrund der deutlich niedrigeren Frequenz der Mutation im Vergleich zu der Frequenz der Founder-Mutation größere Kohorten untersucht werden, um die Relevanz des R215W-heterozygoten Status bei der Krebsentstehung abzusichern.

Zum ersten Mal wurde die R215W-Mutation bei Kindern mit ALL [123] und später auch bei Patienten mit NHL [146] beschrieben. Des Weiteren wurde 2004 über das gehäufte Auftreten der Mutation R215W bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen berichtet. Steffen et al. wiesen unter 234 Patienten mit kolorektalen Karzinomen 3 Personen als heterozygot für die Founder-Mutation und 3 Probanden als heterozygot für die Mutation R215W nach. Die Frequenz der Mutation R215W war statistisch signifikant erhöht (p-Wert 0,0472) [125]. Diese Ergebnisse zeigen, dass es sich bei dieser Veränderung höchstwahrscheinlich um eine pathogenetisch relevante Mutation und keine neutrale Variante handelt. Dafür sprechen auch NBS-Patienten, die compound heterozygot für die Mutationen 657del5 und R215W waren und ein schwerwiegenderes klinisches Bild im Vergleich zu den „klassischen“ NBS-Patienten zeigten. Als Erklärung wurde ein dominant negativer Effekt der R215W-Mutation angenommen [137]. Später wurde gezeigt, dass diese Mutation zu einer Beeinträchtigung der Bindung der Histone H2AX führt, die Konformation der BRCT- Domainen verändert und dadurch die DSB Reparatur beeinflusst [136, 61].

Zusätzlich zu epidemiologischen und funktionellen Studien kann die Pathogenität einer DNA-Veränderung mit Hilfe von Software-Programmen beurteilt werden. Mit Hilfe dreier solcher

Programme, Polyphen, Panther und MutationTaster, haben wir R215W analysiert. Alle drei Programme gaben eine wahrscheinlich pathogene Wirkung der Veränderung an. Das Ergebnis des PolyPhen-Programms lautete „probably damaging“, mit einem Wert PSIC von 2,335 d.h. die Veränderung hat mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Auswirkung auf die Proteinstruktur und -funktion. Polyphen berechnet den so genannten PSIC Score (Position Specific Independent Count). Ein Wert über 1 ist mit einer negativen Auswirkung der analysierten DNA-Veränderung verbunden.

Das Panther Programm arbeitet mit Hilfe des evolutionären Vergleichs der bekannten Gene unter Berücksichtigung ihrer funktionellen Domänen und der betroffenen biologischen Prozesse. Es wird ein sogenannter aa (amino acid) PSEC Score (position specific evolutionary conservation) ermittelt, der die Wahrscheinlichkeit für eine Aminosäure in einer bestimmten Position angibt.

So bedeutet ein aa PSEC von 0, dass es sich um das evolutionär häufigste Allel handelt, und je negativer der Wert ausfällt (max -12), desto wahrscheinlicher ist, dass eine bestimmte Mutation pathogen ist. [149]. Eine Mutation mit SubPSEC von -3 bedeutet eine Wahrscheinlichkeit von 50% pathogen zu sein, ein Wert von -12 von 100% [150, 151]. Die SubPSEC Auswertung für die R215W Mutation ergab – 4.7332, die eine Wahrscheinlichkeit für Pathogenität von ca. 78% voraussagt.

Die Analyse der Mutation R215W mittels des Programms MutationTaster hat ebenfalls die Pathogenität dieser Mutation bestätigt (Score 2,75). Für jede Sequenzänderung erfolgt eine Wertung mit Hilfe der Aminosäureaustausch Matrix (Matrix Grantham). Die Werte variieren zwischen 0,0 (keine Pathogenität) und 6,0 (pathogen).

5.2 Prävalenz der R215W-Mutation bei Patienten mit soliden Tumoren

NBN-Heterozygote haben ein hohes Risiko nicht nur für NHL, sondern auch für diverse andere Tumoren, wie z. B. Melanome, Prostata- und Brustkrebs [126, 130, 124, 122].

Im Rahmen dieser Doktorarbeit und als Teil einer groß angelegten Studie über polnische Patienten aus dem Jahr 2004 wurden zusätzlich 641 Patienten mit verschiedenen Tumoren sowie eine Gruppe von 1620 geeigneten Kontrollen auf das Vorliegen der *NBN*-Mutation R215W untersucht [125]. Zwei von den hier analysierten Patientenblutproben waren heterozygot für die R215W-Mutation (1/320) – ein Patient hatte einen Hodentumor und eine Patientin ein ovariales Carcinom. Für die Kontrollgruppe lautete die Frequenz der R215W-Mutation 1/405. Unter allen in der Studie eingeschlossenen Proben (n=1289) wurden insgesamt 8 Heterozygote für diese

Mutation gefunden (1/161). Obwohl die Frequenz der Mutation bei den Tumorpatienten nicht statistisch signifikant erhöht war, war sie um das 2,5-Fache höher als in der Kontrollgruppe. Eine vergleichbare Erhöhung der R215W-Frequenz stellten auch Taylor et al. 2003 bei Patienten mit NHL fest [146].

Bis heute existieren keine aussagekräftigen Studien zur Prävalenz von *NBN*-Mutationen bei Patienten mit Testes- oder Ovarialcarcinom. Ein erhöhtes Risiko wäre jedoch plausibel, da beide Organe mit einer hohen Expression des *NBN*-Gens einhergehen [7]. Es gibt zudem experimentelle Untersuchungen an Mäusen, wonach *Nbs1*- Heterozygote gehäuft Tumoren in den Testes und Ovarien aufweisen [19].

5.3 *NBN*-Gen und Tumorogenese

Es gibt verschiedene Modelle der Tumorgenese bei Heterozygotie für Gene, die mit der Entstehung von Krebs assoziiert sind. Bei manchen Genen und Krebsarten ist der Verlust oder die Mutation eines Allels ausreichend, um die Tumorgenese zu befördern. Dieser Effekt kann entweder durch Funktionsverlust-Mutationen verursacht werden, die über eine Happloinsuffizienz oder einen dominant negativen Effekt wirken, oder durch Funktionsgewinn-Mutationen, die zu einer anormalen Genaktivierung führen [152]. Auf der anderen Seite gibt es Funktionsverlust-Mutationen, die erst nach dem Verlust des Wildtyp-Allels (LOH) eine Tumorgene auslösen – wie es das Two-Hit-Model nach Knudson aus dem Jahr 1971 beschreibt.

Nachdem deutlich wurde, dass heterozygote *NBN*-Träger, ähnlich den ATM-Heterozygoten, ein erhöhtes Krebsrisiko aufweisen, stellte sich die Frage, über welches der o. g. Modelle das *NBN*-Gen an der Tumorogenese beteiligt ist. Die Ergebnisse einiger Studien über NBN sprechen für LOH bei der Krebsentstehung [130, 127]. In Gegensatz dazu lassen Untersuchungen an Tumormaterial von ALL-Patienten, die heterozygot für *NBN*-Mutationen sind, einen dominant negativen Effekt der Mutation als möglichen Mechanismus vermuten [35, 123]. Tumormaterial von zwei Patienten untersucht. Der eine Patient war heterozygot für die Mutation 657del5 und wies Melanome auf, die andere Patienten war für R215W-heterozygot und hatte ein Astrozytom. Wie bereits gesagt wurde, der Tumoranteil der DNA-Probe, die von dem Melanom-Patienten stamm, betrug 50%. Nach Beurteilung des Tumorgewebes wurde die DNA ohne Mikrodissektion gewonnen. Die zweite Tumor-DNA, die von einer für die R215W-Mutation heterozygoten Patientin stammt, wurde aus mikrodisseziertem Material mit einem Tumoranteil von 100% isoliert.

Die Tumorproben wurden mittels semiquantitativer Fragment- bzw. SnapShot Analyse untersucht um den Anteil des mutierten und des Wildtyp-Allels der jeweiligen Tumorprobe mit der entsprechenden Blutprobe zu vergleichen. Wie in den Abbildungen 16 und 17 gezeigt, wurden bei beiden Tumorproben gleiche Anteile des Wildtyp-Allels und des mutierten Allels gefunden, was gegen den Verlust des Wildtyp-Allels in den Tumorzellen spricht.

Die Untersuchungen von Dumon-Jones an *Nbs1*-heterozygoten Mäusen (Nbn+/-) zeigten ebenso, dass die Tumorzellen das Wildtyp-Allel aufweisen, was darauf hindeutet, dass die Haploinsuffizienz und nicht ein Verlust der Heterozygotie (LOH) der zugrundeliegende Mechanismus der Tumorentstehung ist. [19]

Die Befunde dieser Arbeit sprechen dafür, dass der heterozygote Status für die Mutation 657del5 des *NBN*-Gens zu einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von Non-Hodgkin-Lymphomen führt, besonders zu NHL vom B-Zell Typ und speziell für gastrointestinale Lymphome. Eine eindeutige Assoziation zwischen der R215W-Mutation und NHL sowie soliden Tumoren konnte nicht belegt werden.

Des Weiteren konnten wir mit Hilfe der semiquantitativen Analyse an zwei Fällen zeigen, dass der Tumorentstehungsmechnismus bei heterozygoten *NBN*-Mutationsträgern (657del5 und R215W) nicht mit einem Verlust des Wildtyp Allels (loss of heterozygosity) verbunden war.

Dies ist für die Menschen in Osteuropa, die Träger der Gründermutation sind, von erheblicher Bedeutung. Unklar ist, auf welchem Mechanismus diese genetisch bedingte Disposition beruht. Die Antwort auf diese Frage könnte die Option für präventive Maßnahmen eröffnen.

6 Zusammenfassung

Das Nijmegen Breakage Syndrom (NBS) gehört zur Gruppe der Chromosomeninstabilitätssyndrome und wird durch typische kraniofaziale Veränderungen, milde bis moderate mentale Retardierung, Immundefizienz, chromosomale Instabilität und ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung maligner Erkrankungen, v. a. von B-Zell-Lymphomen charakterisiert. Das Syndrom wird durch hypomorphe Mutationen im *NBN*-Gen verursacht. Über 90% der NBS-Patienten weisen die Mutation 657del5 auf, die auch als Gründer-Mutation oder slawische Mutation bekannt ist. Die meisten Patienten sind slawischer Herkunft. In anderen ethnischen Gruppen ist das Syndrom sehr selten.

Aufgrund vieler Ähnlichkeiten wurde das NBS lange Zeit als eine Variante der Ataxia telangiectasia (AT), einer anderen Krankheit aus der Gruppe der chromosomalen Instabilitätssyndrome, betrachtet. Es ist bekannt, dass nicht nur AT-Homozygote sondern auch Heterozygote ein erhöhtes Risiko für maligne Erkrankungen haben. Anhand dieser Parallelen zwischen beiden Syndromen wurde postuliert, dass auch heterozygote Träger für *NBN*-Mutationen ein erhöhtes Krebsrisiko haben könnten. Die bisherigen Studien hierzu an Patienten mit verschiedenen malignen Erkrankungen ergaben jedoch widersprüchliche Ergebnisse hinsichtlich der Bedeutung von *NBN* -Mutationen.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) und verschiedenen soliden Tumoren auf das Vorliegen der *NBN*-Mutationen 657del5 und R215W untersucht und mit 1620 Kontrollen verglichen.

Für die Gruppe der NHL-Patienten wurde eine statistisch signifikante Erhöhung der Zahl der 657del5-Heterozygoten als auch aller Heterozygoten (657del5 + R215W) festgestellt. Des Weiteren fanden wir ein statistisch erhöhtes Risiko bei 657del5-Heterozygoten für Lymphome des gastrointestinalen Traktes.

Darüber hinaus untersuchten wir Tumorproben von zwei *NBN*-Heterozygoten und fanden keinen Hinweis auf den Verlust des Wildtypallels („loss of heterozygosity“).

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen den Rückschluss zu, dass der heterozygote *NBN*-Status mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von NHL und v. a. NHL des gastrointestinalen Traktes einhergeht. Angesichts der großen Häufigkeit der 657del5 Mutation (slawische Gründermutation) in Osteuropa kommt diesem Befund eine erhebliche medizinische Bedeutung zu.

7 Verzeichnisse

7.1 Literaturverzeichnis

1. Weemaes CM, Hustinx TW, Scheres JM et al. A new chromosomal instability disorder: the Nijmegen breakage syndrome. Acta Paediatr Scand 1981. 70: 557-64
2. Seemanova E, Passarge E, Beneskova D et al. Familial microcephaly with normal intelligence, immunodeficiency, and risk for lymphoreticular malignancies: a new autosomal recessive disorder. Am J Med Genet 1985. 20: 639-48
3. The International Nijmegen Breakage Syndrome Study Group. Nijmegen breakage syndrome Arch Dis Child 2000. 82: 400-6
4. Saar K, Chrzanowska KH, Stumm M et al. The gene for the ataxia-telangiectasia variant, Nijmegen breakage syndrome, maps to a 1-cM interval on chromosome 8q21. Am J Hum Genet 1997. 60(3):605-10.
5. Carney JP, Maser RS, Olivares H et al. The hMre11/hRad50 protein complex and Nijmegen breakage syndrome: linkage of double-strand break repair to the cellular DNA damage response. Cell 1998. 93: 477-86
6. Matsuura S, Tauchi H, Nakamura A et al. Positional cloning of the gene for Nijmegen breakage syndrome. Nat Genet 1998. 19: 179-81
7. Varon R, Vissinga C, Platzer M et al. Nibrin, a novel DNA double-strand break repair protein, is mutated in Nijmegen breakage syndrome. Cell 1998. 93: 467-76
8. Wu PY, Frit P, Malivert L et al. Interplay between Cernunnos-XLF and nonhomologous end-joining proteins at DNA ends in the cell. J Biol Chem 2007. 282: 31937-43
9. Zhang Y, Zhou J, Lim CU The role of NBS1 in DNA double strand break repair, telomere stability, and cell cycle checkpoint control. Cell Res 2006. 16: 45-54
10. Maurer MH, Hoffmann K, Sperling K et al. High prevalence of the NBN gene mutation c.657-661del5 in Southeast Germany. J Appl Genet 2010. 51: 211-4
11. Varon R, Seemanova E, Chrzanowska K et al. Clinical ascertainment of Nijmegen breakage syndrome (NBS) and prevalence of the major mutation, 657del5, in three Slav populations. Eur J Hum Genet 2000. 8: 900-2
12. Barbi G, Scheres JM, Schindler D et al. Chromosome instability and X-ray hypersensitivity in a microcephalic and growth-retarded child. Am J Med Genet 1991. 40: 44-50
13. Digweed M, Sperling K Nijmegen breakage syndrome: clinical manifestation of defective

response to DNA double-strand breaks. DNA Repair (Amst) 2004. 3: 1207-17

14. Dunin-Wasowicz D, Krajewska-Walasek M, Rowecka-Trzebicka K et al. [Diagnosis of Edwards syndrome in newborns]. Pediatr Pol 1995. 70: 865-74

15. Bekiesińska-Figatowska M, Chrzanowska KH, Sikorska J et al. Cranial MRI in the Nijmegen breakage syndrome. Neuroradiology 2000. 42(1):43-7.

16. Chrzanowska KH, Stumm M, Bekiesiska-Figatowska M et al. Atypical clinical picture of the Nijmegen breakage syndrome associated with developmental abnormalities of the brain. J Med Genet 2001. 38: E3

17. Chrzanowska KH, Bekiesinska-Figatowska M, Józwiak S. Corpus callosum hypoplasia and associated brain anomalies in Nijmegen breakage syndrome. J Med Genet 2002. 39(5):E25.

18. Van de Kaa CA, Weemaes CM, Wesseling P et al. Postmortem findings in the Nijmegen breakage syndrome. Pediatr Pathol 1994. 14(5):787-96.

19. Dumon-Jones V, Frappart PO, Tong WM et al. Nbn heterozygosity renders mice susceptible to tumor formation and ionizing radiation-induced tumorigenesis. Cancer Res 2003. 63: 7263-9

20. Frappart PO, Tong WM, Demuth I et al. An essential function for NBS1 in the prevention of ataxia and cerebellar defects. Nat Med 2005. 11: 538-44

21.Assaf Y, Galron R, Shapira I et al. MRI evidence of white matter damage in a mouse model of Nijmegen breakage syndrome. Exp Neurol 2008. 209: 181-91

22. Lammens M, Hiel JA, Gabreëls FJ et al. Nijmegen breakage syndrome: a neuropathological study. Neuropediatrics 2003. 34(4):189-93.

23. Baranes K, Raz-Prag D, Nitzan A et al. Conditional inactivation of the NBS1 gene in the mouse central nervous system leads to neurodegeneration and disorganization of the visual system. Exp Neurol 2009. 218: 24-32

24. Bond J, Roberts E, Mochida GH et al. ASPM is a major determinant of cerebral cortical size. Nat Genet 2002. 32: 316-20

25. Bond J, Roberts E, Springell K et al. A centrosomal mechanism involving CDK5RAP2 and CENPJ controls brain size. Nat Genet 2005. 37: 353-5

26. Guernsey DL, Jiang H, Hussin J et al. Mutations in centrosomal protein CEP152 in primary microcephaly families linked to MCPH4. Am J Hum Genet 2010. 87: 40-51

27. Jackson AP, McHale DP, Campbell DA et al. Primary autosomal recessive microcephaly (MCPH1) maps to chromosome 8p22-pter. Am J Hum Genet 1998. 63: 541-6

28. Moynihan L, Jackson AP, Roberts E et al. A third novel locus for primary autosomal

recessive microcephaly maps to chromosome 9q34. Am J Hum Genet 2000. 66: 724-7

29. Chrzanowska KH [Microcephaly with chromosomal instability and immunodeficiency-Nijmegen syndrome]. Pediatr Pol 1996. 71: 223-34
30. Van der Burgt I, Chrzanowska KH, Smeets D et al. Nijmegen breakage syndrome. J Med Genet 1996. 33: 153-6
31. Shiloh Y Ataxia-telangiectasia and the Nijmegen breakage syndrome: related disorders but genes apart. Annu Rev Genet 1997. 31: 635-62
32. Green AJ, Yates JR, Taylor AM et al. Severe microcephaly with normal intellectual development: the Nijmegen breakage syndrome. Arch Dis Child 1995. 73(5):431-4
33. Taalman RD, Hustinx TW, Weemaes CM et al. Further delineation of the Nijmegen breakage syndrome. Am J Med Genet 1989. 32(3):425-31.
34. van Engelen BG, Hiel JA, Gabreëls FJ et al. Decreased immunoglobulin class switching in Nijmegen Breakage syndrome due to the DNA repair defect. Hum Immunol 2001 62(12):1324-7.
35. Demuth I, Digweed M The clinical manifestation of a defective response to DNA double-strand breaks as exemplified by Nijmegen breakage syndrome. Oncogene 2007. 26: 7792-8
36. García-Pérez MA, Allende LM, Corell A et al. Role of Nijmegen breakage syndrome protein in specific T-lymphocyte activation pathways. Role of Nijmegen breakage syndrome protein in specific T-lymphocyte activation pathways. Clin Diagn Lab Immunol 2001. 8(4):757-61
37. Michałkiewicz J, Barth C, Chrzanowska K et al. Abnormalities in the T and NK lymphocyte phenotype in patients with Nijmegen breakage syndrome. Clin Exp Immunol 2003. 134(3):482-90.
38. Gregorek H, Olczak-Kowalczyk D, Dembowska-Bagińska B et al. Oral findings in patients with Nijmegen breakage syndrome: a preliminary study. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2009. 108(5):e39-45.
39. Gładkowska-Dura M, Dzierzanowska-Fangrat K, Dura WT et al. Unique morphological spectrum of lymphomas in Nijmegen breakage syndrome (NBS) patients with high frequency of consecutive lymphoma formation. J Pathol 2008. 216(3):337-44.
40. Seemanová E, Seeman P, Jarolím P. [Chromosome instability syndromes]. [Chromosome instability syndromes]. Cas Lek Cesk 2002. 141(1):16-22.
41. Seidemann K, Henze G, Beck JD et al. Non-Hodgkin's lymphoma in pediatric patients with chromosomal breakage syndromes (AT and NBS): experience from the BFM trials. Ann

Oncol 2000. 11 Suppl 1:141-5.

42. Gupta D, Nagarkar A. Speech impairment in Nijmegen breakage syndrome: a rare anomaly. Intern J Pediatr Otorhinolaryngol 2009. 73(6):873-5

43. Wolf EK, Shwayder TA. Nijmegen breakage syndrome associated with porokeratosis. Pediatr Dermatol 2009. 26(1):106-

44. Albert, Gennery AR, Greil J et al. Successful SCT for Nijmegen breakage syndrome. Bone Marrow Transplant 2010. 45(4):622-6.

45. Dembowska-Baginska B, Perek D, Brozyna A et al. Non-Hodgkin lymphoma (NHL) in children with Nijmegen Breakage syndrome (NBS). Pediatr Blood Cancer 2009. 52(2):186-90.

46. Savitsky K, Bar-Shira A, Gilad S et al. A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. Science 1995. 268(5218):1749-53.

47. Stumm M, Gatti RA, Reis A et al. The ataxia-telangiectasia-variant genes 1 and 2 are distinct from the ataxia-telangiectasia gene on chromosome 11q23.1. Am J Hum Genet 1995. 57(4):960-2.

48. van Gent DC, Hoeijmakers JH, Kanaar R. Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. Nat Rev Genet 2001. 2(3):196-206.

49. Dimitrova N, de Lange T. Cell cycle-dependent role of MRN at dysfunctional telomeres: ATM signaling-dependent induction of nonhomologous end joining (NHEJ) in G1 and resection-mediated inhibition of NHEJ in G2. Mol Cell Biol 2009. 29(20):5552-63. .

50. Lombard DB, Guarente L. Nijmegen breakage syndrome disease protein and MRE11 at PML nuclear bodies and meiotic telomeres. Cancer Res. 2000. 60(9):2331-4.

51. Ranganathan V, Heine WF, Ciccone DN et al. Rescue of a telomere length defect of Nijmegen breakage syndrome cells requires NBS and telomerase catalytic subunit. Curr Biol 2001. 11(12):962-6.

52. Iijima K, Komatsu K, Matsuura S et al. The Nijmegen breakage syndrome gene and its role in genome stability. Chromosoma 2004. 113(2):53-61

53. Buscemi G, Savio C, Zannini L et al. Chk2 activation dependence on Nbs1 after DNA damage. Mol Cell Biol 2001. 21(15):5214-22.

54. Lim DS, Kim ST, Xu B et al. ATM phosphorylates p95/nbs1 in an S-phase checkpoint pathway. Nature 2000. 404(6778):613-7.

55. Kobayashi J, Antoccia A, Tauchi H et al. NBS1 and its functional role in the DNA damage response. DNA repair 2004. 3(8-9):855-61.

56. Featherstone C, Jackson SP. DNA repair: the Nijmegen breakage syndrome protein. Curr

Biol 1998. 8(17):R622-5.
57. Bork P, Hofmann K, Bucher P et al. A superfamily of conserved domains in DNA damage-responsive cell cycle checkpoint proteins. FASEB J 1997. 11(1):68-76.
58. Callebaut I, Mornon JP From BRCA1 to RAP1: a widespread BRCT module closely associated with DNA repair. FEBS Lett 1997. 400(1):25-30.
59. Chen L, Nievera CJ, Lee AY et al. Cell cycle-dependent complex formation of BRCA1.CtIP.MRN is important for DNA double-strand break repair J Biol Chem 2008. 283(12):7713-20.
60. di Masi A, Antoccia A. NBS1 Heterozygosity and Cancer Risk. Curr Genomics 2008. 9(4):275-81.
61. Williams RS, Dodson GE, Limbo O et al. Nbs1 flexibly tethers Ctp1 and Mre11-Rad50 to coordinate DNA double-strand break processing and repair. Cell 2009. 139(1):87-99.
62. Durocher D, Henckel J, Fersht AR et al. The FHA domain is a modular phosphopeptide recognition motif. Mol Cell 1999. 4(3):387-94.
63. Durocher D, Taylor IA, Sarbassova D et al. The molecular basis of FHA domain:phosphopeptide binding specificity and implications for phospho-dependent signaling mechanisms. Mol Cell 2000. 6(5):1169-82.
64. Kobayashi J, Tauchi H, Sakamoto S et al. NBS1 localizes to gamma-H2AX foci through interaction with the FHA/BRCT domain. Curr Biol 2002. 12(21):1846-51.
65. Lloyd J, Chapman JR, Clapperton JA et al. A supramodular FHA/BRCT-repeat architecture mediates Nbs1 adaptor function in response to DNA damage. Cell 2009. 139(1):100-11.
66. Cerosaletti K, Concannon P. Independent roles for nibrin and Mre11-Rad50 in the activation and function of Atm. J Biol Chem 2004. 279(37):38813-9.
67. Gatei M, Young D, Cerosaletti KM et al. ATM-dependent phosphorylation of nibrin in response to radiation exposure. Nat Genet 2000. 25(1):115-9.
68. Wu X, Ranganathan V, Weisman DS et al. ATM phosphorylation of Nijmegen breakage syndrome protein is required in a DNA damage response. Nature 2000. 405(6785):477-82.
69. Zhao S, Weng YC, Yuan SS et al. Functional link between ataxia-telangiectasia and Nijmegen breakage syndrome gene products. Nature 2000. 405(6785):473-7.
70. Demuth I, Frappart PO, Hildebrand G et al. An inducible null mutant murine model of Nijmegen breakage syndrome proves the essential function of NBS1 in chromosomal stability and cell viability. Hum Mol genet 2004. 13(20):2385-97.
71. Zhu J, Petersen S, Tessarollo L et al. Targeted disruption of the Nijmegen breakage

syndrome gene NBS1 leads to early embryonic lethality in mice. Curr Biol 2001. 11(2):105-9.

72. Lee JH, Ghirlando R, Bhaskara V et al. Regulation of Mre11/Rad50 by Nbs1: effects on nucleotide-dependent DNA binding and association with ataxia-telangiectasia-like disorder mutant complexes. J Biol Chem 2003. 278(46):45171-81

73. Maser RS, Zinkel R, Petrini JH. An alternative mode of translation permits production of a variant NBS1 protein from the common Nijmegen breakage syndrome allele. Nat Genet 2001. 27(4):417-21

74. Tanzanella C, Antoccia A, Spadoni E et al. Chromosome instability and nibrin protein variants in NBS heterozygotes. Eur J Hum genet 2003. 11(4):297-303.

75. Resnick IB, Kondratenko I, Togoev O et al. Nijmegen breakage syndrome: clinical characteristics and mutation analysis in eight unrelated Russian families. J Pediatr 2002. 140(3):355-61.

76. Seemanová E, Jarolím P, Seeman P et al. [Increased risk of malignancies in heterozygotes in families of patients with Nijmegen breakage syndrome Cas Lek Cesk 2006. 145(2):138-43. 145(2):138-43.

77. Seemanová E, Sperling K, Neitzel H et al. Nijmegen breakage syndrome (NBS) with neurological abnormalities and without chromosomal instability.J Med Genet 2006. 43(3):218-24.

78. Warcoin M, Lespinasse J, Despouy G et al. Fertility defects revealing germline biallelic nonsense NBN mutations. Hum Mutat 2009. 30(3):424-30.

79. Xiao Y, Weaver DT. Conditional gene targeted deletion by Cre recombinase demonstrates the requirement for the double-strand break repair Mre11 protein in murine embryonic stem cells. Nucleic Acids Res 1997. 25(15):2985-91.

80. Pitts SA, Kullar HS, Stankovic T et al. hMRE11: genomic structure and a null mutation identified in a transcript protected from nonsense-mediated mRNA decay. Hum Mol Genet 2001. 10(11):1155-62.

81. Stewart GS, Maser RS, Stankovic T et al. The DNA double-strand break repair gene hMRE11 is mutated in individuals with an ataxia-telangiectasia-like disorder. Cell 1999. 99(6):577-87.

82. Paull TT, Gellert M. Nbs1 potentiates ATP-driven DNA unwinding and endonuclease cleavage by the Mre11/Rad50 complex. Genes Dev 1999. 13(10):1276-88.

83. Fukuda T, Sumiyoshi T, Takahashi M et al. Alterations of the double-strand break repair gene MRE11 in cancer. Cancer Res 2001. 61(1):23-6.

84. Connely JC, Leach DR Tethering on the brink: the evolutionarily conserver Mre 11-Rad50 complex. Trends Biochem Sci 2002. 27 (8):410-8

85. de Jager M, van Noort J, van Gent DC et al. Human Rad50/Mre11 is a flexible complex that can tether DNA ends. Mol Cell 2001. 8(5): 1129-35

86. Hopfner KP, Karcher A, Craig L et al. Structural biochemistry and interaction architecture of the DNA double-strand break repair Mre11 nuclease and Rad50-ATPase. Cell 2001. 105(4):473-85

87. Hopfner KP, Craig L, Moncalian G et al. The Rad50 zinc-hook is a structure joining Mre11 complexes in DNA recombination and repair. Nature 2002. 418(6897): 562-6

88. Waltes R, Kalb R, Gatei M et al. Human RAD50 deficiency in a Nijmegen breakage syndrome-like disorder. Am J Hum Genet 2009. 84(5):605-16.

89. Tauchi H, Matsuura S, Kobayashi J et al. Nijmegen breakage syndrome gene, NBS1, and molecular links to factors for genome stability. Oncogene 2002. 21(58):8967-80

90. Dupré A, Boyer-Chatenet L, Gautier J. Two-step activation of ATM by DNA and the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. Nat Struct Mol Biol 2006. 13(5):451-7.

91. Khanna KK, Lavin MF, Jackson SP et al. ATM, a central controller of cellular responses to DNA damage. Cell Death Differ. 2001. 8(11):1052-65

92. Ferguson DO, Alt FW. DNA double strand break repair and chromosomal translocation: lessons from animal models. Oncogene 2001. 20(40):5572-9.

93. Haber JE. DNA recombination: the replication connection. Trends Biochem Sci 1999. 24(7):271-5.

94. Paull TT, Gellert M. The 3' to 5' exonuclease activity of Mre 11 facilitates repair of DNA double-strand breaks. Moll Cell 1998. 1(7):969-79

95. Hoeijmakers JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. Nature 2001. 411(6835): 366-74

96. Tan TL, Essers J, Citterio E et al. Mouse Rad54 affects DNA conformation and DNA-damage-induced Rad51 foci formation. Curr Biol 1999. 9(6):325-8.

97. Van Dyck E, Stasiak AZ, Stasiak A et al. Binding of double-strand breaks in DNA by human Rad52 protein. Nature 1999. 398(6729): 728-31

98. Buck D, Malivert L, de Chasseval R et al Cernunnos, a novel nonhomologous end-joining factor, is mutated in human immunodeficiency with microcephaly. Cell 2006. 124(2):287-99.

99. Callebaut I, Malivert L, Fischer A et al. Cernunnos interacts with the XRCC4 x DNA-ligase IV complex and is homologous to the yeast nonhomologous end-joining factor Nej1.

2006. 281(20):13857-60.

100. Kim JS, Krasieva TB, Kurumizaka H et al. Independent and sequential recruitment of NHEJ and HR factors to DNA damage sites in mammalian cells. J Cell Biol 2005. 170(3):341-7.

101. Matsuura S, Kobayashi J, Tauchi H et al. Nijmegen breakage syndrome and DNA double strand break repair by NBS1 complex. Adv Biophys 2004. 38:65-80.

102. Tauchi H, Kobayashi J, Morishima K et al. The forkhead-associated domain of NBS1 is essential for nuclear foci formation after irradiation but not essential for hRAD50/hMRE11/NBS1 complex DNA repair activity. J Biol Chem 2001. 276(1):12-5.

103. Gatei M, Sloper K, Sorensen C et al. Ataxia-telangiectasia-mutated (ATM) and NBS1-dependent phosphorylation of Chk1 on Ser-317 in response to ionizing radiation. J Biol Chem 2003. 278(17):14806-11.

104. Girard PM, Riballo E, Begg AC et al. Nbs1 promotes ATM dependent phosphorylation events including those required for G1/S arrest. Oncogene 2002. 21(27):4191-9.

105. Girard PM, Foray N, Stumm M et al. Radiosensitivity in Nijmegen Breakage Syndrome cells is attributable to a repair defect and not cell cycle checkpoint defects. Cancer Res 2000. 60(17):4881-8.

106. Yamazaki V, Wegner RD, Kirchgessner CU. Characterization of cell cycle checkpoint responses after ionizing radiation in Nijmegen breakage syndrome cells. Cancer Res 1998. 58(11):2316-22.

107. Dong Z, Zhong Q, Chen PL. The Nijmegen breakage syndrome protein is essential for Mre11 phosphorylation upon DNA damage. J Biol Chem 1999. 274(28):19513-6.

108. Stiff T, Reis C, Alderton GK et al. Nbs1 is required for ATR-dependent phosphorylation events. EMBO J 2005. 24(1):199-208.

109. Williams BR, Mirzoeva OK, Morgan WF et al. A murine model of Nijmegen breakage syndrome. Curr Biol 2002. 12(8):648-53

110. Bai Y, Murnane JP Telomere instability in a human tumor cell line expressing NBS1 with mutations at sites phosphorylated by ATM. Mol Cancer Res 2003. (14):1058-69.

111. Slijepcevic P, Al-Wahiby S. Telomere biology: integrating chromosomal end protection with DNA damage response. Chromosoma 2005. 114(4):275-85. Epub 2005 Oct 15

112. Artandi SE, DePinho RA Xrcc3 and Nbs1 are required for the production of extrachromosomal telomeric circles in human alternative lengthening of telomere cells. Carcinogenesis 2010. 67(4):1513-9.

113. Bakkenist CJ, Kastan MB. Initiating cellular stress responses. Cell 2004. 118(1):9-17

114. Compton SA, Choi JH, Cesare AJ et al. Xrcc3 and Nbs1 are required for the production of extrachromosomal telomeric circles in human alternative lengthening of telomere cells. Cancer Res. 2007. 67(4):1513-9.

115. Mahmoudi M, Gorenne I, Mercer J et al. Statins use a novel Nijmegen breakage syndrome-1-dependent pathway to accelerate DNA repair in vascular smooth muscle cells. Circ Res2008. 103(7):717-25.

116. Yang YG, Frappart PO, Frappart L et al. A novel function of DNA repair molecule Nbs1 in terminal differentiation of the lens fibre cells and cataractogenesis. International Agency for Research on Cancer 2006. 5(8):885-93.

117. Bakhshi S, Cerosaletti KM, Concannon P et al. Medulloblastoma with adverse reaction to radiation therapy in Nijmegen breakage syndrome. J Pediatr Hematol 2003. 25(3):248-51

118. Meyer S, Kingston H, Taylor AM et al. Rhabdomyosarcoma in Nijmegen breakage syndrome: strong association with perianal primary site. Cancer Genet Cytogenet 2004. 154(2):169-74.

119. Lavin MF. Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signalling and cancer. Nat rev Mol Cell Biol 2008. 9(10):759-69.

120. Concannon P. ATM heterozygosity and cancer risk. Nat Genet 2002. 32(1):89-90.

121. Seemanova E An increased risk for malignant neoplasms in heterozygotes for a syndrome of microcephaly, normal intelligence, growth retardation, remarkable facies, immunodeficiency and chromosomal instability. Mutat Res 1990. 238: 321-4

122. Seemanova E, Jarolim P, Seeman P et al. Cancer risk of heterozygotes with the NBN founder mutation. J Natl Cancer Inst 2007. 99: 1875-80

123. Varon R, Reis A, Henze G et al. Mutations in the Nijmegen Breakage Syndrome gene (NBS1) in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL). Cancer Res 2001. 61(9):3570-2.

124. Resnick IB, Kondratenko I, Pashanov E et al. 657del5 mutation in the gene for Nijmegen breakage syndrome (NBS1) in a cohort of Russian children with lymphoid tissue malignancies and controls. Am J Med Genet A 2003. 120A(2):174-9.

125. Steffen J, Varon R, Mosor M et al. Increased cancer risk of heterozygotes with NBS1 germline mutations in Poland. Int J Cancer 2004. 111: 67-71

126. Buslov KG, Iyevleva AG, Chekmariova EV et al. NBS1 657del5 mutation may contribute only to a limited fraction of breast cancer cases in Russia. Int J Cancer 2005. 114: 585-9

127. Gorski B, Debniak T, Masojc B et al. Germline 657del5 mutation in the NBS1 gene in breast cancer patients. Int J Cancer 2003. 106: 379-81

128. Bogdanova N, Feshchenko S, Schurmann P et al. Nijmegen Breakage Syndrome mutations and risk of breast cancer. Int J Cancer 2008. 122: 802-6

129. Roznowski K, Januszkiewicz-Lewandowska D, Mosor M et al. I171V germline mutation in the NBS1 gene significantly increases risk of breast cancer. Breast Cancer Res Treat 2008. 110: 343-8

130. Cybulski C, Gorski B, Debniak T et al. NBS1 is a prostate cancer susceptibility gene. Cancer Res 2004. 64: 1215-9

131. Carlomagno F, Chang-Claude J, Dunning AM Determination of the frequency of the common 657Del5 Nijmegen breakage syndrome mutation in the German population: no association with risk of breast cancer. Genes Chromosomes Cancer 1999. 25: 393-5

132. Rischewski J, Bismarck P, Kabisch H et al. The common deletion 657del5 in the Nibrin gene is not a major risk factor for B or T cell non-Hodgkin lymphoma in a pediatric population. Leukemia 2000. 14(8):1528-9.

133. Stanulla M, Stümm M, Dieckvoss BO et al. No evidence for a major role of heterozygous deletion 657del5 within the NBS1 gene in the pathogenesis of non-Hodgkin's lymphoma of childhood and adolescence. Br J Haematol 2000. 109(1):117-20.

134. Hama S, Matsuura S, Tauchi H et al. Absence of mutations in the NBS1 gene in B-cell malignant lymphoma patients. Anticancer Res 2000. 20(3B):1897-900.

135. Hu G. DNA polymerase-catalyzed addition of nontemplated extra nucleotides to the 3' end of a DNA fragment. DNA Cell Biol 1993. 12(8):763-70.

136. di Masi A, Viganotti M, Polticelli F et al. The R215W mutation in NBS1 impairs gamma-H2AX binding and affects DNA repair: molecular bases for the severe phenotype of 657del5/R215W Nijmegen breakage syndrome patients. Biochem Biophys res Commun 2008. 369(3):835-40.

137. Seemanová E, Hoch J, Herzogová J et al. [Mutations in tumor suppressor gene NBS1 in adult patients with malignancies]. Cas Lek Cesk 2006. 145(3):201-3.

138. Nakken S, Alseth I, Rognes T. Computational prediction of the effects of non-synonymous single nucleotide polymorphisms in human DNA repair genes. Neuroscience 2007. 145(4):1273-9..

139. Schwarz JM, Rödelsperger C, Schuelke M et al. MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. Nat Methods 2010. 7(8):575-6.

140. Chrzanowska KH, Digweed M, Sperling K et al. DNA-Repair deficiency and Cancer: Lessons from Lymphoma, 2007

141. Athma P, Rappaport R, Swift M. Molecular genotyping shows that ataxia-telangiectasia

heterozygotes are predisposed to breast cancer. Cancer Genet Cytogenet 1996. 92(2):130-4.

142. Bay JO, Uhrhammer N, Pernin D et al. High incidence of cancer in a family segregating a mutation of the ATM gene: possible role of ATM heterozygosity in cancer. Hum Mutat 1999. 14(6):485-92.

143. Broeks A, Urbanus JH, Floore AN et al. ATM-heterozygous germline mutations contribute to breast cancer-susceptibility. Am J Hum Genet 2000. 66(2):494-500.

144. Cerosaletti KM, Morrison VA, Sabath DE et al. Mutations and molecular variants of the NBS1 gene in non-Hodgkin lymphoma. Genes Chromosomes Cancer 2002. 35(3):282-6.

145. Hebbring SJ, Fredriksson H, White KA et al. Role of the Nijmegen breakage syndrome 1 gene in familial and sporadic prostate cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2006. 15(5):935-8.

146. Taylor GM, O'Brien HP, Greaves MF et al. Correspondence re: R. Varon et al., Mutations in the Nijmegen breakage syndrome gene (NBS1) in childhood acute lymphoblastic leukemia. Cancer Res., 61: 3570-3572, 2001. Cancer Res 2003. 63(19):6563-4; author reply 6565

147. Steffen J, Maneva G, Popławska L et al. Increased risk of gastrointestinal lymphoma in carriers of the 657del5 NBS1 gene mutation. Int J cancer 2006. 119(12):2970-3.

148. Chrzanowska KH, Piekutowska-Abramczuk D, Popowska E et al. Carrier frequency of mutation 657del5 in the NBS1 gene in a population of Polish pediatric patients with sporadic lymphoid malignancies. Int J cancer 2006. 118(5):1269-74.

149. Thomas PD, Campbell MJ, Kejariwal A et al. PANTHER: a library of protein families and subfamilies indexed by function. Genome Res 2003. 13(9):2129-41.

150. Mi H, Thomas P. PANTHER pathway: an ontology-based pathway database coupled with data analysis tools. Methods Mol Biol 2009. 563:123-40.

151. Mi H, Lazareva-Ulitsky B, Loo R et al. The PANTHER database of protein families, subfamilies, functions and pathways. Nucleic Acids Res., 2005. 33(Database issue):D284-8.

152. Santarosa M, Ashworth A. Haploinsufficiency for tumour suppressor genes: when you don't need to go all the way. Biochim Biophys Acta, 2004. 1654(2):105-22.

I. Harrison's Innere Medizin

II. Lymphome, Georg Thieme Verlag, 2005

III. MANUAL Maligne Lymphome Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge , Tumorzentrum München und Zuckschwerdt Verlag München 2004

7.2 Abbildungsverzeichnis

		Seite
Abb. 1	NBS-Patient - 6 Monate alt	7
Abb. 2	Patient mit NBS im Säuglings- und Erwachsenenalter	9
Abb. 3	Mädchen mit NBS	9
Abb. 4	Cafe-au-lait ähnliche Flecken und progressive Vitiligo bei Patienten mit NBS	9
Abb. 5	Struktur des Nibrins	12
Abb. 6	Dargestellt ist die Lokalisation der bis jetzt bekannten *NBN*-Mutationen zwischen Exon 6-10	13
Abb. 7	Exon 6 des *NBN*-Gens mit intronischen Sequenzen	37
Abb. 8	Schematische Darstellung des Ablaufs des Mutationsscreenings	41
Abb. 9	Beispiel für die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte des Exons 6	42
Abb. 10	Fragment Analyse für den Nachweis der Mutation 657del5	43
Abb. 11	Sequenzanalyse des Exons 6 des *NBN*-Gens	44
Abb. 12	Gelelektrophorese der PCR-Produkte des Exons 6, amplifiziert für die Mutation R215W	48
Abb. 13	SnapShot Reaktion für den Nachweis der *NBN*-Mutation R215W	49
Abb. 14	Sequenzanalyse des Exons 6 des *NBN*-Gens	50
Abb. 15	A) Polyphen, B) Panther, C) Mutation Taster	53/54
Abb. 16	Semiquantitative PCR im Tumor- und Blut-DNA : 657del5	55
Abb. 17	Semiquantitative PCR im Tumor- und Blut-DNA : R215W	56

7.3 Tabellenverzeichnis

		Seite
Tabelle 1	Non-Hodgkin-Lymphome bei 186 Patienten	27
Tabelle 2	Chemikalien und Biochemikalien	28
Tabelle 3	Verbrauchsmaterialien	29
Tabelle 4	Geräte	30
Tabelle 5	Software	31
Tabelle 6	PCR Protokol	33
Tabelle 7	Fluoreszenzfarbstoffe mit denen die Nukleotide markiert sind und die entsprechenden Farbsignale	35
Tabelle 8	NHL-Patienten, heterozygot für die *NBN*-Mutation 657del5 aus der Gruppe von 186 NHL-Patienten. Lymphomentitäten und Patientenalter sind dargestellt.	45
Tabelle 9	2 NHL-Patienten, heterozygot für die *NBN*-Mutation 657del5 unter 42 NHL-Patienten. Lymphomentität und Patientenalter sind dargestellt	45
Tabelle 10	Formen des Non-Hodgkin-Lymphoms unter den 228 NHL-Patienten	46
Tabelle 11	Verteilung der heterozygoten 657del5-Träger unter allen NHL-Patienten, der Gruppe von Patienten mit GIT-Lymphomen und der Kontrollen sowie die statistische Auswertung der Ergebnisse.	46
Tabelle 12	Fishers Exact Test für alle 657del5- und R215W-Heterozygote	51
Tabelle 13	Krebsformen bei den R215W-heterozygoten Patienten mit soliden Tumoren.	51

7.4 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
AI	Allelische Imbalance
ALL	Akute lymphoblastische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
AS	Aminosäure
AT	Ataxia teleangiectasia
ATLD	Ataxia teleangiectasia ähnliche Krankheit
ATM	Ataxia telangiectasia Gen
bp	Basenpaar
BRCT	Breast-cancer carboxy terminal Domäne
bzw	beziehungsweise
C	Cytosin
Cdk	Cyclin-abhängige Kinase
CI	Konfidenziinterval
CMV	Cytomegalie Virus
CRC	Colorectales Carcinom
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-PK	DNA Protein Kinase
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DLBCL	Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom
DSB	Doppelstrangbruch
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FA	Fanconi Anämie
FHA	Fork-Head-assoziierte Domäne
FL	Follikuläres Lymphom
G	Guanin
HR	Homologe Rekombination
Ig	Immunglobulin
IQ	Intelligenzquotient
IR	Ionisierende Strahlung
kb	Kilobasen

kDa	Kilodalton
LCL	Lymphoblastoide Zelllinie
Lig IV	Ligase IV
LOH	“Loss of heterozygosity”
M	molar
MALT	“Mucosa- associated lymphatic tissue”
MDC1	“Mediator of DNA damage checkpoint protein 1”
mM	millimolar
MRE11	“Meiotic recombination 11”
mRNA	messenger Ribonkleinsäure
NBN	Nibrin
NBS	Nijmegen Breakage Syndrom
NHEJ	“non-homologous end joining”
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
OR	Odds ratio
PCNT	Pericentrin
PCR	Polymerase -Ketten-Reaktion
PK	Protein Kinase
PKU	Phenylketonurie
REAL	“Revised European and American Lymphoid classification”
RNA	Ribonukleinsäure
RPA	Replikationsprotein A
SNP	single nucleotide polymorphism
T	Thymidin
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris borat EDTA
usw.	und so weiter
U	Unit (enzymatische Aktivität)
UV	ultraviolett
WHO	“World health organisation”
Wt	Wildtyp
XLF	“XRCC4-like factor”
XRCC4	“X-ray repair cross complementing protein 4”

8 Danksagung

Besonders herzlich möchte ich Herrn Professor Dr. Karl Sperling danken, der es mir ermöglicht hat, diese Arbeit am Institut für Humangenetik durchzuführen. Ich danke auch herzlich meiner Betreuerin, Frau Dr. rer. nat. Raymonda Varon, für die Unterstützung bei der Durchführung der Laborarbeiten und die gute fachliche Beratung.

Des Weiteren möchte ich auch Mohsen Karbasiyan, Ralf Eckhardt, Veronique Dutrannoy, Christina Steglich und Emeli Bektas danken, die mich jederzeit uneingeschränkt mit viel Geduld und auf äußerst nette Art unterstützt haben.

Herrn Professor Dr. Jan Steffen† danke ich für die Bereitstellung von allen Patientenproben und klinischen Daten, die diese Arbeit erst ermöglicht haben.

LITERATUR

Steffen J, Maneva G, Popławska L et al. Increased risk of gastrointestinal lymphoma in carriers of the 657del5 NBS1 gene mutation. Int J cancer 2006. 119(12):2970-3.

Steffen J, Varon R, Mosor M, Maneva G et al. Increased cancer risk of heterozygotes with NBS1 germline mutations in Poland. Int J Cancer 2004. 111: 67-71

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

Erklärung

„Ich, Galina Stoyanova Maneva, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Nijmegen Breakage Syndrom (NBS): Krebsrisiko bei Heterozygotie für die Mutationen 657del5 und R215W“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, 14.02.2011 Galina Maneva