

Aus dem Institut für Humangenetik  
der Universität Würzburg  
Vorstand: Professor Dr. med. Holger Höhn

# **Durchflusszytometrische Diagnostik bei Verdacht auf Nijmegen Breakage Syndrom**

Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von  
Katja Geier  
aus Jena

Würzburg, Februar 2008

Referent: Prof. Dr. med. Holger Höhn

Koreferent: Prof. Dr. med. Detlev Schindler

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 07.05.2008

Die Promovendin ist Ärztin

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Klinisches Bild beim Nijmegen Breakage Syndrom	1
1.2 Ursächlicher Gendefekt	4
1.3 Zugrunde liegende Mechanismen der Strahlensensitivität und des erhöhten Krebsrisikos	5
1.4 Die Rolle des Nibrin in der Zellzykluskontrolle	8
1.5 Meiose und Infertilität	9
1.6 Immundefizienz und erhöhtes Infektionsrisiko	9
1.7 Diagnostik bei Nijmegen Breakage Syndrom	11
1.7.1 Chromosomenbruchanalyse	11
1.7.2 Durchflusszytometrische Analyse	12
1.7.3 Mutationsanalyse	13
1.8 Fragestellung	14
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>15</b>
2.1 Isolierung der Lymphozyten und Bestrahlung	15
2.2 Zellkultur und Zellfärbung	16
2.3 Durchflusszytometrie und Zellzyklusanalyse	17
2.4 Mutationsanalyse	20
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>22</b>
3.1 Diagnostik bei Nijmegen Breakage Syndrom	22
3.2 Falldarstellungen	24
Kategorie I (NBS-negative Kontrollen)	24
Kategorie II (NBS-positiv)	30
Kategorie III (erhöhte Strahlensensitivität ohne nachgewiesene NBS1-Mutation)	39
Kategorie IV (erhöhte Strahlensensitivität)	51
Kategorie V (Sonderfälle; fragliche Auswertbarkeit)	58
<b>4. Diskussion</b>	<b>64</b>
4.1 Zusammenfassende Auswertung und Diskussion der Zellzyklusanalyse	64
4.2 Erkrankungsalter und Diagnosestellung	70
4.3 AFP-Wert	71
4.4 Indikationen zur Diagnostik	71
4.5 Differentialdiagnostische Aspekte	72
4.6 NBS-like Syndrome	77
4.7 NBS1-Mutationen bei Krebspatienten	77
4.8 Therapeutische Möglichkeiten beim Nijmegen Breakage Syndrom	78
4.9 Schlussfolgerungen	81
4.9.1 Durchflusszytometrie im Vergleich mit anderen Diagnoseverfahren	81
4.9.2 klinische Anwendung der Durchflusszytometrie als Screening-Verfahren	83
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>85</b>
<b>6. Literatur</b>	<b>87</b>

# **1. Einleitung**

Das Nijmegen Breakage Syndrom (NBS, Ataxia-Telangiectasia Variant 1) ist eine sehr seltene autosomal rezessiv vererbte Erkrankung. Es gehört zusammen mit dem Bloom Syndrom, der Fanconi Anämie und der Ataxia teleangiectatica zu der Gruppe der Chromosomeninstabilitätssyndrome.

Erstmals beschrieben wurde das Nijmegen Breakage Syndrom 1981 durch C. Weemaes et al. Leider gibt es derzeit noch keine zuverlässigen Schätzungen über die Prävalenz der Erkrankung, aber wahrscheinlich liegt sie bei etwa 1:100.000 Lebendgeburten [7]. Patienten mit NBS sind weltweit zu beobachten, die Mehrheit der Patienten stammt aber aus Polen und der Tschechischen Republik [9][29][30].

## **1.1 Klinisches Bild beim Nijmegen Breakage Syndrom**

Das Nijmegen Breakage Syndrom wird durch ein typisches Erscheinungsbild mit Mikrozephalie, Wachstumsretardierung, geistiger Retardierung, Immundefizienz und eine stark erhöhte Prädisposition gegenüber malignen Tumoren des lymphatischen Systems charakterisiert.

Die für NBS charakteristischen Stigmata im Gesichtsbereich (eingefallene Stirn, Hypoplasie des Unterkiefers, prominente mittlere Gesichtspartie) werden als „bird-like-face“ beschrieben. Die meisten Patienten zeigen zusätzlich lateral ansteigende Lidachsen, einen Epikanthus, große Ohren, eine große Nase mit eingesunkener Nasenwurzel sowie spärlichen Haarwuchs [9]. Meist prägt sich diese auffällige Facies erst im Alter von 3 Jahren vollständig aus [7].

Besonders kennzeichnend für das Nijmegen Breakage Syndrom ist der Mikrozephalus (occipitofrontaler Kopfumfang unter 3. Perzentile), da er bei fast 100% der Patienten vorliegt [33]. Während 75% bereits mikrozephal geboren werden, entwickelt sich bei den restlichen 25% eine schwere progressive Mikrozephalie innerhalb der ersten Lebensmonate [7][9]. Die für NBS typische Wachstumsretardierung manifestiert sich üblicherweise bis zum 2. Lebensjahr [9]. Die Mehrheit liegt dabei unter der 10. Perzentile. Danach pendelt sich die Wachstumsrate auf ein normales Level ein, die Patienten bleiben aber für ihr Alter kleinwüchsig [7]. Der Intelligenzquotient und die psychomotorische Entwicklung sind in der frühen Kindheit meist normal. Mit zunehmenden Alter kommt es aber bei etwa 60% der Patienten zu einer fortschreitenden geistigen Retardierung mit Verlust vor allem der kognitiven Fähigkeiten [9][38]. Ebenfalls typisch für NBS-Patienten sind Café-au-lait

Flecken, Vitiligo sowie unregelmäßige Hautpigmentationen (Hyper- / Hypopigmentierung). In einigen Fällen sind kongenitale Missbildungen wie Analatresien, Nierenfehlbildungen, Klinodaktylie und Syndaktylie beschrieben [7][38]. Weiterhin zeigen NBS-Patientinnen eine frühzeitige Fehlentwicklung der Ovarien mit primärer Amenorrhoe, erhöhtem Gonadotropin Level und fehlenden sekundären Geschlechtsmerkmalen. Ob Fehlentwicklungen der Gonaden beim Mann zum Krankheitsbild gehören ist bisher noch unklar [7].

Häufig finden sich kombinierte zelluläre und humorale Immundefizienzen bei NBS-Patienten, die zu erhöhter Anfälligkeit für verschiedene Infektionen führen. Im Vordergrund stehen dabei vor allem rezidivierende bakterielle und virale Infektionen des Respirationstraktes wie Pneumonie, Bronchitis, Sinusitis, Otitis media und Mastoiditis. Diese führen häufig zu schwerer Lungeninsuffizienz und zu einer frühen Sterblichkeit der Patienten. Über eine Agammaglobulinämie wird bei über  $\frac{1}{3}$  der Patienten berichtet [7][9]. Während IgM meist unverändert ist, können ein Mangel an IgA (bei 20%), IgG2 bzw. IgG4, isoliert oder in Kombination, am häufigsten beobachtet werden. Nur etwa 10% weisen einen normalen Immunglobulinstatus auf [9]. Defekte in der zellulären Immunabwehr zeigen sich bei den meisten Patienten in reduzierten Prozentsätzen an CD3+ und CD4+ T-Zellen, während die CD8+ Zellen häufig im Normalbereich liegen (veränderter CD4+ / CD8+ Quotient) [7][9]. Etwa 60% der Patienten weisen eine erhöhte Zahl an Natürlichen-Killerzellen (NK) auf [14] [42] und bei über 90% der NBS-Patienten zeigen die Lymphozyten eine herabgesetzte Stimulierbarkeit durch Mitogene wie PHA (Phytohämagglutinin) [9][38]. Insgesamt gesehen sind die Störungen des Immunsystems bei Patienten mit Nijmegen Breakage Syndrom sehr variabel ausgeprägt und zeigen über die Zeit eine eher progressive Tendenz [14].

Typischerweise zeigen die Zellen der NBS-Patienten eine spontane und induzierbare Chromosomeninstabilität und damit einhergehend eine gesteigerte Mutationsrate. Die homozygoten Genträger zeichnet daher ein stark erhöhtes Krebsrisiko mit bevorzugt Tumoren des lymphatischen Systems aus [29]. Die Mehrzahl der Patienten entwickelt Non-Hodgkin-Lymphome [9], viele bereits vor dem 15. Lebensjahr [7]. Aber auch T-Zell-Lymphome und seltener Medulloblastome, Rhabdomyosarkome, T- und B- prolymphatische Leukämien sowie akute lymphatische Leukämien. Bis zum 7. Lebensjahr haben bereits 14-37% einen Tumor entwickelt [9], bis zum 21. Lebensjahr ungefähr 40% [38] und bis zum 35. Lebensjahr sind schon mehr als die Hälfte der Patienten betroffen [28][29]. Charakteristisch für NBS-Patienten ist außerdem eine hohe Empfindlichkeit gegenüber ionisierender Strahlung, so dass ihr therapeutischer Gebrauch bei nicht diagnostizierten Patienten fatal sein kann [9].

Im Gegensatz dazu sind heterozygote Genträger in ihrem klinischen Bild vollkommen asymptomatisch. Epidemiologische Studien zeigen, dass die Heterozygotenfrequenz in Tschechien, Polen und der Ukraine bei etwa 1:155 [7][29] bzw. 1:177 [30][42] Neugeborenen liegt. Die Heterozygotenfrequenz in Deutschland hingegen liegt bei etwa 1:866 Neugeborenen [30]. Ob Heterozygote ebenfalls ein erhöhtes Risiko für Neoplasien aufweisen, konnte bisher noch nicht endgültig geklärt werden und ist Gegenstand laufender Untersuchungen. Es gibt jedoch bereits Hinweise auf eine ebenfalls erhöhte spontane Chromosomeninstabilität und ein gesteigertes Risiko für die Entwicklung von Neoplasien wie Melanome, kolorektale Tumore, Brustkrebs und Lymphome [9]. Beispielsweise zeigte sich bei der Untersuchung von nahen Blutsverwandten von NBS-Patienten bei den heterozygoten Trägern der 657del5 Mutation eine erhöhte Rate an Krebspatienten [35].



(Quelle: M. Digweed, K. Sperling / DNA Repair 3 [2004] 1207-1217)

Abb. 1.1: Zwei Brüder mit dem charakteristischen Erscheinungsbild des Nijmegen Breakage Syndroms



(Quelle: The International Nijmegen Breakage Syndrome Study Group / Arch. Dis. Child [2000] 82: 400-406)

Abb. 1.2: Patient mit Nijmegen Breakage Syndrom in jungen Jahren (A) und im Erwachsenenalter (B,C)

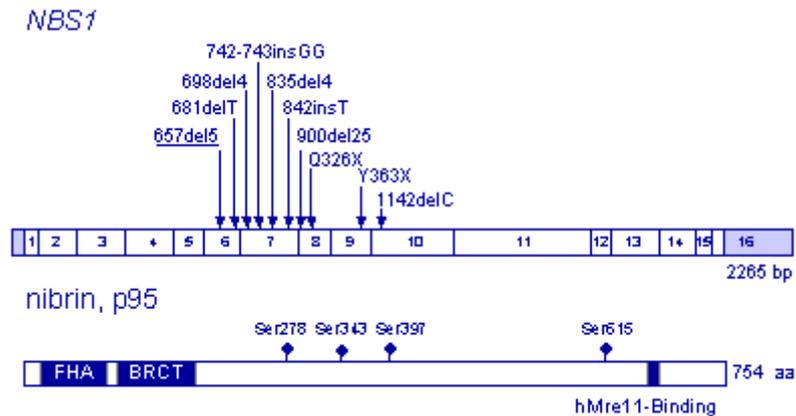
## 1.2 Ursächlicher Gendefekt

Obwohl sich die klinischen Bilder völlig voneinander unterscheiden, wurde das Nijmegen Breakage Syndrom lange als Variante der Ataxia teleangiectatica (AT) betrachtet, da die Zellen bei beiden genetischen Erkrankungen charakteristischerweise sehr strahlenempfindlich sind. Bei beiden stehen spontane und induzierbare Chromosomenbrüche sowie Störungen der Zellzykluskontrolle im Vordergrund [42]. Trotzdem sind zwei unterschiedliche Gene betroffen.

Das für das Nijmegen Breakage Syndrom verantwortliche Gen (NBS1) wurde erst 1998 entdeckt. Es liegt auf dem langen Arm von Chromosom 8 in der Bande q21, ist auf 51 kb genomischer Sequenz verteilt und hat 16 Exons [5][7][28][30]. Das NBS1-Gen kodiert für das Proteinprodukt Nibrin (p95), welches aus 754 Aminosäuren besteht und ubiquitär in allen Geweben exprimiert wird [7]. Am n-terminalen Ende des Nibrins befindet sich eine „forkhead associated“ Domäne (FHA, AS: 24-100) und eine „breast cancer carboxyterminal“ Domäne (BRCT, AS: 105-190). Beide Domänen konnten unabhängig voneinander bereits bei Proteinen gefunden werden, welche an der Zellzykluskontrolle beteiligt sind. [11][28][30][37] Am c-terminalen Ende befindet sich eine MRE11 Bindungsstelle, wobei die direkte Wechselwirkung von Nibrin mit MRE11 für die Kernlokalisation und für eine normale Strahlenresistenz verantwortlich ist [20]. Nibrin selbst ist Teil des MRE11-RAD50-Nibrin Proteinkomplexes, welcher offensichtlich eine wichtige Rolle bei der Erkennung und der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen spielt [28]. Das Fehlen von Komponenten des Komplexes ist für Zellen von Vertebraten letal [20].

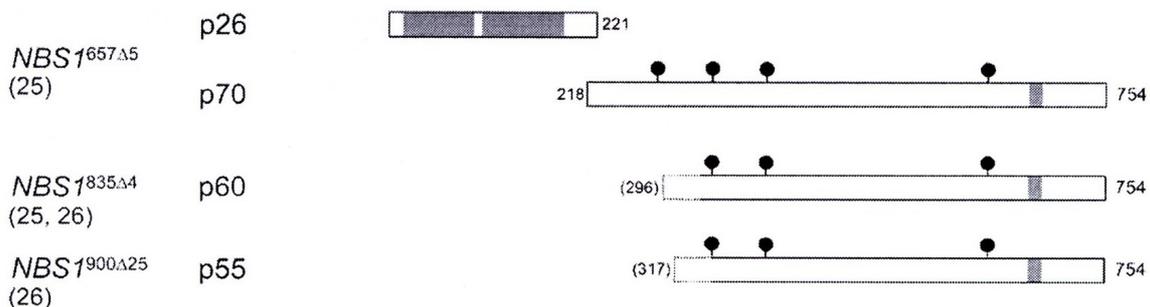
90-95% der Patienten mit NBS sind homozygot für die so genannte „Founder-“ oder Gründermutation [30], eine 5-Basenpaar-Deletion (657 $\Delta$ 5) in Exon 6, welche zu einer Verschiebung des Leserasters (frameshift) führt. Diese wiederum verursacht einen frühzeitigen Kettenabbruch des Originalproteins und führt zu einem alternativen „reading frame“ [9]. Neun weitere krankheitsverursachende Mutationen konnten bereits identifiziert werden [42], welche zwischen den Nukleotiden 657 und 1142 liegen und ebenfalls zu einem frühzeitigen Kettenabbruch führen [9]. Bei der vorherrschenden 657 $\Delta$ 5 Mutation entstehen 2 Proteinfragmente: ein kurzes, wahrscheinlich funktionsloses „n-terminales“ Proteinfragment von ungefähr 26 kDa und durch den alternativen „reading frame“ ein langes „c-terminales“ Proteinfragment von ungefähr 70 kDa [39]. Eine noch vorhandene partielle Aktivität des „c-terminalen“ Proteinfragments ist wahrscheinlich, da eine Nullmutation letal wäre [9][22]. Die FHA- und BRCT-Domäne finden sich auf dem kurzen Proteinfragment (NBS1p26), die

MRE11 Bindungsstelle hingegen auf dem langen Proteinfragment (NBS1p70). Ähnliche Proteinfragmente wurden auch bei der 835 $\Delta$ 4 und 900 $\Delta$ 25 Mutation gefunden [9][42].



(Quelle: M. Digweed. <http://www.charite.de/humangenetik2/genfunk/Forsch2.htm>)

Abb. 1.3: Das NBS1-Gen und sein Proteinprodukt Nibrin. Schematisch sind alle bisher bekannten Mutationen angegeben



(Quelle: M. Digweed, K. Sperling / DNA Repair 3 [2004] 1207-1217)

Abb. 1.4: Nibrin Proteinfragmente bei der 657del5 Mutation und bei zwei weiteren Mutationen

### 1.3 Zugrunde liegende Mechanismen der Strahlensensitivität und des erhöhten Krebsrisikos

Ionisierende Strahlen verursachen in der DNA Doppelstrangbrüche (DSB), welche nicht selten letal für die Zelle sind. Ihre fehlerhafte oder fehlende Reparatur ist eine der schwerwiegendsten Veränderung der DNA auf molekularer Ebene [28]. So gelten DNA-Doppelstrangbrüche als entscheidende Läsion für das zelluläre Überleben, sowie für die Entstehung von Mutationen und Chromosomenaberrationen, welche die Grundlage für kanzerogenes Zellwachstum bilden [20]. Doppelstrangbrüche kommen aber auch

physiologisch als notwendige Intermediärschritte bei der V(D)J-Rekombination der Immunglobulin- und T-Zellrezeptor Gene, beim Erhalt der Telomere und bei der homologen Rekombination in der Meiose vor [28][30]. Zu den Zellzyklus-unabhängigen Aspekten der DNA-Schaden-Antwort gehört die Änderung der Chromatinstruktur, die in Säugern durch die Phosphorylierung der Histon-H2A-Isoform H2AX erfolgt. Diese Veränderung am Ort des DNA-Schadens könnte dazu dienen, die Rekrutierung von DSB-Reparaturfaktoren zu verbessern [20].

Sind nun die an der Reparatur von DSB beteiligten Proteine in ihrer Funktion eingeschränkt oder fehlen sie sogar, ist die Zelle nicht mehr in der Lage DSB korrekt zu reparieren. Dies kann zu genomischer Instabilität und chromosomalen Rearrangements führen [20].

Da Nibrin wahrscheinlich an der Reparatur von Doppelstrangbrüchen beteiligt ist, lassen sich das klinische Bild und die zellbiologischen Veränderungen beim Nijmegen Breakage Syndrom auf eine gestörte DNA-Doppelstrangbruchreparatur zurückführen [28][29]:

Die Proteinkinase ATM (ataxia telangiectasia mutated) ist Teil des zellulären Kontrollsystems für DNA-Doppelstrangbrüche. Sie besitzt Kinaseaktivität und kann mit einer Reihe von Substraten reagieren und diese somit aktivieren [28]. Entstehen DSB wird ATM aktiviert und phosphoryliert verschiedene „Downstream“-Substrate, zu denen p53, die Checkpointkinasen CHK1, CHK2, wie auch BRCA1 und Nibrin gehören [20]. Die Aktivierung dieser Proteine führt, wiederum vermittelt durch die Aktivierung weiterer Proteine, entweder zu einer Arretierung der Zellen in der G1- bzw. G2-Phase und Reparatur der Schäden oder zur Induktion von Apoptose. Nach ionisierender Bestrahlung von Zellen ist ATM also normalerweise in der Lage Nibrin über eine Phosphorylierung an 4 Serinbausteinen zu aktivieren [9]. Dies führt wiederum zu einer Konformationsänderung des MRE11-RAD50-Nibrin Komplexes und beeinflusst so seine Funktion [30]. Der Komplex bildet so genannte „Foci“ im Zellkern, die als Orte aktiver DNA-Doppelstrangbruchreparatur gelten und in Zellen von NBS-Patienten nach Bestrahlung fehlen [11][10]. Die Phosphorylierung der Serinbausteine wird dabei durch die FHA- und BRCT-Domäne initiiert [9]. Für die vorgeschaltete Aktivierung der Proteinkinase ATM ist nach neuesten Erkenntnissen der MRE11-RAD50-Nibrin Komplex ebenfalls notwendig [8][10].

Für die Interaktion des Nibrins mit dem Histon H2AX sind wiederum die FHA- und BRCT-Domänen erforderlich. Die Fähigkeit via FHA- und BRCT-Domäne mit H2AX zu interagieren, scheint dabei die Voraussetzung für die effiziente Phosphorylierung des Nibrin durch ATM zu sein [9].

Beim Nijmegen Breakage Syndrom fehlt dem langen Proteinfragment (NBS1p70) die FHA- und BRCT-Domäne. Die Serinbausteine können also nicht phosphoryliert werden und es kommt zu keiner Interaktion des Nibrins mit dem Histon H2AX. Im Endeffekt kann ATM die Nibrin-Proteinfragmente nicht aktivieren [9]. Es resultiert eine gestörte Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen nach ionisierender Bestrahlung. Auf Grund dessen weisen NBS-Zellen ebenfalls eine erhöhte Sensitivität für viele andere Mutagene auf, welche zu Doppelstrangbrüchen führen oder zu Defekten, welche über Doppelstrangbrüche repariert werden (z.B. Mitomycin C, bestimmte Radiomimetika). In Kontrast dazu konnte ein Defekt in der DSB-Reparatur bei NBS-Zellen biochemisch noch nicht direkt nachgewiesen werden. Ob die Zellen einen alternativen aber möglicherweise unpassenden Reparaturweg verwenden, was den fehlenden Nachweis erklären würde, wurde bisher noch nicht untersucht [9][42].

Die erhöhte Strahlenempfindlichkeit bei NBS kann demnach also auf die Rolle des Nibrins in der zellulären Antwort auf DNA-Schäden durch ionisierende Strahlen zurückgeführt werden [9]. Auch die charakteristische spontane und strahlungsinduzierte Chromosomenbrüchigkeit, welche zu erhöhter Chromosomeninstabilität führt und so mit einer gesteigerten Mutationsrate einhergeht, lässt sich daraus ableiten. Vor allem in den rasch proliferierenden Lymphozyten treten gehäuft physiologische und eventuell durch ionisierende Strahlung exogen induzierte Doppelstrangbrüche auf. Bei NBS-Patienten ist deren korrekte Reparatur gestört. Dies könnte ein Schritt in der Tumorgenese darstellen und somit ursächlich für das gehäufte Auftreten von B- und T-Zell-Lymphomen sein. Ebenfalls diskutiert wird die Annahme, dass eine verzögerte Induktion der p53-Reaktion und somit die verzögerte Einleitung der Apoptose eine Rolle bei der Tumorentstehung spielen könnte [28]. Denn durch die fehlerhafte Funktion des MRE11-RAD50-Nibrin Komplexes wird ATM nicht effizient aktiviert und kann somit auch p53 nicht phosphorylieren. Die fehlende Apoptoseinduktion ist ein bekannter Faktor der Tumorgenese. Vielleicht beeinflusst aber auch die bestehende Immundefizienz bei NBS-Patienten die Entstehung von Malignomen. Eine immunsuppressive Therapie ist z.B. assoziiert mit einem erhöhten Risiko für Non-Hodgkin-Lymphome [9].

Des Weiteren konnte für das ATM-Gen gezeigt werden, dass es unter anderen auch als Tumorsuppressorgen fungiert und somit somatische Mutationen zu den gleichen Tumoren führen können, die auch bei AT-Patienten gefunden werden, die ja Keimbahnmutationen tragen. In Analogie dazu ist also anzunehmen, dass auch dem NBS1-Gen eine Rolle als Tumorsuppressorgen zukommen dürfte und dass somatische Mutationen im NBS1-Gen eine Rolle bei der Tumorentstehung spielen könnten [28][30]. In laufenden Untersuchungen soll

daher geklärt werden, ob bei homozygot unauffälligen Patienten solche somatischen Mutationen einen Schritt in der Genese bestimmter Tumoren spielen [29].

#### **1.4 Die Rolle des Nibrin in der Zellzykluskontrolle**

Es ist bekannt, dass bestrahlte Zellen eine Verzögerung im Durchlauf durch den Zellzyklus aufweisen. Dies wird durch die Zellzyklus-Checkpoints bedingt, denn hier wird die Kompetenz der Zelle für den Eintritt in die nächste Phase kontrolliert. Dadurch wird gewährleistet, dass der Zellzyklus nach Schädigung an diesen Punkten angehalten werden kann, um die Reparatur der Erbinformation zu ermöglichen und somit den Verlust oder die Veränderung von DNA zu verhindern. Im Extremfall bewirken diese Signalwege den programmierten Zelltod (Apoptose). Erst bei Behebung der Störung erfolgt der Übergang in die nächste Phase. Ist die Zelle nicht in der Lage den DNA-Schaden zu beheben, so wird die Zelle in der jeweiligen Phase arretiert. Diese Arretierung lässt sich zum Beispiel mittels durchflusszytometrischer Analysen nachweisen. Sind die Checkpoints selbst inaktiviert, gehen die Zellen ungecheckt in die nächste Phase über, was zur Ansammlung von Mutationen und Krebsentstehung führen kann. [20]

Nibrin spielt eine Hauptrolle in der Kontrolle des Zellzyklus. Beim Nijmegen Breakage Syndrom kommt es deshalb zu Störungen der Zellzykluskontrolle. Treten zum Beispiel DNA-Schäden während der Replikationsphase (S-Phase) auf, so haben diese massive Auswirkungen auf die Genomstabilität. Unter anderem ist auch die Phosphorylierung von Nibrin durch ATM für den S-Phase Checkpoint notwendig. Die Mutation der ATM-Phosphorylierungsstelle im Nibrin führt daher zu „radioresistenter DNA-Synthese“ (RDS), einem Indikator für einen fehlerhaften S-Phase Checkpoint [20][22][28]. Dies bedeutet ein Versagen der DNA Replikationssuppression und somit DNA-Schädigung [22]. Neben dem S-Phase Checkpoint sind beim NBS wahrscheinlich auch die G1/S und G2/M Checkpoints betroffen [28][29].

Die Rolle des Nibrin in den Checkpoints für Zellwachstum und Zellteilung ist derzeit Gegenstand intensiver Forschung. Die Daten aus diversen Studien sind hier allerdings sehr unterschiedlich. Zusammenfassend spielt Nibrin eine essentielle Rolle in der Zellzykluskontrolle. Ob abhängig oder unabhängig von RAD50 und MRE11 ist noch zu zeigen. Die Vermutung, dass die Proteinfragmente noch partielle Aktivität aufweisen und in einigen Zellen die Checkpoint Funktion aufrecht erhalten können, konnte leider noch nicht bewiesen werden [9]. Experimente zeigten aber, dass das NBS1p70 Proteinfragment in der Lage war mit RAD50 und MRE11 einen Komplex zu bilden. Dieser fehlerhafte Komplex könnte möglicherweise die Fähigkeit besitzen mit ATM zu interagieren [8].

## 1.5 Meiose und Infertilität

Die Meiose gewährleistet, dass der Chromosomensatz einer Art ständig gleich bleibt. Die homologe Rekombination während der Meiose wird physiologischer Weise durch Doppelstrangbrüche initiiert. Da es beim Nijmegen Breakage Syndrom zu Fehlern bei der Reparatur von Doppelstrangbrüchen kommt, könnte dies auch bei der Meiose zu Defekten führen. Infertilität und Gonadendysgenesien könnten das Ergebnis solcher Fehler in der meiotischen Rekombination sein [9][28]. In vitro scheint der MRE11-RAD50-Nibrin Komplex eine entscheidende Rolle bei der Meiose zu spielen, da er möglicherweise die anfängliche Prozessierung der Doppelstrangbrüchenden ausführt. Er besitzt Exonuklease- sowie Endonuklease-Aktivitäten und ist in der Lage die DNA zu entwinden. Nibrin selbst ist dabei für die Bildung des Komplexes verantwortlich und interagiert mit dem Histon H2AX [20]. RAD50 hingegen ist ein ATP-abhängiges DNA-bindendes Protein [11][20] und MRE11 hat mehrere Funktionen, wobei die wichtigste wahrscheinlich die einer 3'→5' dsDNA Exonuklease ist. Stimuliert von RAD50 und Nibrin, kann MRE11 die geschädigten oder fehlgepaarten DNA-Enden entfernen und so kurze Stücke einzelsträngiger DNA erzeugen [20]. Als Teil des DNA-Doppelstrang-Reparaturprozesses beziehungsweise zur Markierung und Signalisierung des Doppelstrangbrüches formen RAD50 und MRE11 gemeinsam eine brückenförmige Struktur, welche die zwei DNA-Enden zusammen halten kann [9]. Die exakte Rolle des Nibrin bei der Meiose in vivo und wie sein Fehlen zur Gonadendysgenese führen kann, ist allerdings bisher noch unklar [9].

## 1.6 Immundefizienz und erhöhtes Infektionsrisiko

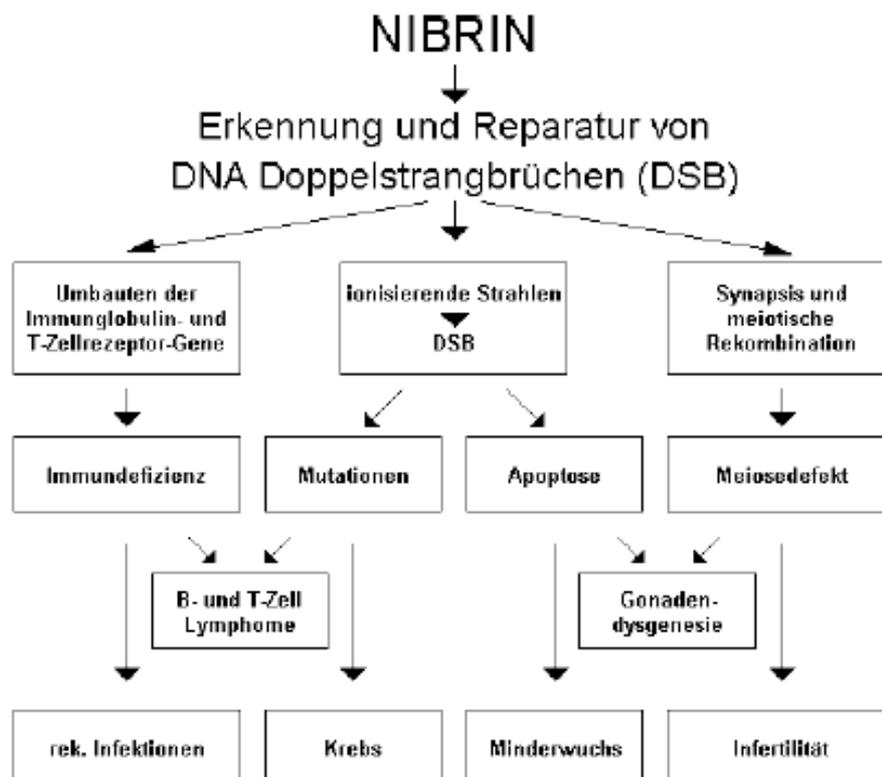
Die für das Nijmegen Breakage Syndrom charakteristische spontane und strahlungsinduzierte Chromosomeninstabilität zeigt sich unter anderem in spezifischen Chromosomenaberrationen wie Translokationen und Inversionen. Diese umfassen besonders die Immunglobulin- und T-Zellrezeptor Gene auf Chromosom 7 und 14 [9][28][29]. Als Ursache wird eine fehlerhafte V(D)J-Rekombination vermutet, da Nibrin für diese Rekombination von entscheidender Bedeutung zu sein scheint [9].

Auch für die Bildung der schweren und leichten Ketten der Antikörper sowie für die Rezeptoren der B- und T-Lymphozyten ist die Rekombination von V-, D-, und J-Genen von enormer Bedeutung. Erst dadurch wird die Spezifität einer Zelle bzw. des Antikörpers festgelegt, was wiederum die spezifische Reaktion des Körpers mit den verschiedenen Antigenen gewährleistet. Die Immundefizienz und somit das erhöhte Infektionsrisiko als dessen

klinische Manifestation könnten daher potentiell auf diese Störung der V(D)J-Rekombination zurück zu führen sein [28].

Des Weiteren kann bei vielen NBS-Patienten bei unverändertem IgM ein Mangel an IgG und IgA beobachtet werden. Dies lässt vermuten, dass Nibrin auch bei dem Prozess des Klassenswitch eine entscheidende Rolle spielt. Analysen des Klassenswitch in Patienten Zellen scheinen diese Annahme zu bestätigen [9][19]. Durch den Mangel an Nibrin beim Nijmegen Breakage Syndrom kommt es demnach zu einem gestörten Klassenswitch, was beim Umschalten von IgM auf einen anderen Immunglobulin Typ zu Fehlern und Störungen führt. Der Körper kann so nicht mehr adäquat auf Infektionen reagieren.

Die folgende vereinfachte schematische Darstellung zeigt zusammenfassend die klinischen Aspekte des Nijmegen Breakage Syndroms mit den vermuteten Zusammenhängen in Hinsicht auf die Funktion des Nibrins. Die Grafik lässt erkennen, dass sich wahrscheinlich alle entscheidenden Charakteristika auf die fehlerhafte bzw. defekte Erkennung und Reparatur von Doppelstrangbrüchen zurückführen lässt.



(Quelle: A. Reis, M. Digweed / in: Stuurman M, Dörk T, Karstens JH (Hrsg.) Ataxia teleangiectatica, medizinischegenetik edition Band 1 [1999])

Abb. 1.5: Die klinischen Charakteristika des Nijmegen Breakage Syndroms und ihre potentielle Zusammenhänge

## 1.7 Diagnostik bei Nijmegen Breakage Syndrom

### 1.7.1 Chromosomenbruchanalyse

Bei zytogenetischen Untersuchungen werden die Chromosomen aus bestimmten Körperzellen unter dem Lichtmikroskop analysiert. Untersuchungsziel ist dabei der Nachweis oder der Ausschluss eines strukturell auffälligen Chromosomensatzes. Die Analyse der Metaphasenchromosomen auf Brüche und Rearrangements kann so der Identifizierung und Bestätigung von Syndromen mit chromosomaler Instabilität, wie dem Nijmegen Breakage Syndrom, dienen. [32] Die gebräuchlichste Methode zur Bestimmung des konstitutionellen Karyotyps ist die Präparation der Chromosomen aus stimulierten Lymphozyten des peripheren Blutes nach vorhergehender Kultivierung. Danach werden die Chromosomen routinemäßig nach einer GTG-Färbung (**G**-Banden, **T**rypsin, **G**iemsa) analysiert [23]. Gehäuft auftretende strukturelle Aberrationen, vor allem der Chromosomen 7 und 14, sprechen für das Nijmegen Breakage Syndrom, sind aber nicht beweisend. Sie können bei NBS-positiven Zellen in etwa 10 bis 50% der Metaphasen nachgewiesen werden [7]. Deswegen können bei dieser bestimmten Fragestellung auch andere Techniken zum Einsatz kommen. Zum Beispiel eine Giemsa-Übersichtsfärbung nach erfolgter ionisierender Bestrahlung der Zellen zur Ermittlung einer spontanen und induzierten Bruchrate [23]. Die Chromosomenbruchanalyse kann so zum Nachweis einer erhöhten Radiosensitivität genutzt werden. Patienten mit Nijmegen Breakage Syndrom zeigen typischerweise erhöhte Bruchraten nach ionisierender Bestrahlung:  $2,47 \pm 0,71$  Brüche/Zelle bei 1,0 Gy. Kontrollen hingegen weisen bei 1,0 Gy nur etwa 0,22 Brüche/Zelle auf.

Ein Nachteil dieser Methode ist allerdings, dass Veränderungen in der Struktur der Chromosomen nur soweit erkannt werden können, wie es das Auflösungsvermögen des Lichtmikroskops und die Qualität des jeweiligen Präparates erlauben [17]. Feinere Veränderungen der Chromosomen, die unterhalb der mikroskopischen Auflösung liegen, sind deswegen in der Regel nicht zu erkennen. Nichtchromosomale Veränderungen können ebenfalls durch diese Untersuchung nicht festgestellt werden. Darüber hinaus ist eine mikroskopische Analyse der Metaphasen mühselig und zeitaufwendig, obwohl die Analyse der Chromosomen heute zunehmend von Computerprogrammen übernommen wird. Außerdem findet sich beim Nijmegen Breakage Syndrom eine verminderte Zellproliferation mit nur wenigen brauchbaren Metaphasen, was die Analyse zusätzlich erschwert.

Tabelle 1.1 zeigt beispielhaft die Ergebnisse der zytogenetischen Untersuchung eines Patienten mit dem Verdacht auf Nijmegen Breakage Syndrom.

Bestrahlung	Indexpatient 99B408 LCLs	Negativkontrolle 1 Lymphozyten	Negativkontrolle 2 LCLs
-------------	--------------------------------	-----------------------------------	----------------------------

	% aberrante Meta-phasen	Brüche/ Zelle	% aberrante Meta-phasen	Brüche/ Zelle	% aberrante Meta-phasen	Brüche/ Zelle
0,0 Gy	4	0,04	4	0,04	0	0,00
0,5 Gy	20	0,24	28	0,34	14	0,16
1,0 Gy	36	0,52	22	0,22	14	0,22

G2-Phasen Bestrahlung: 68 h Kultur >>> Bestrahlung >>> 2 h Kultur >>> Colcemid >>> 2 h Kultur >>> Präparation

Tab. 1.1: Chromosomenanalyse: spontane und strahleninduzierte Chromosomenbrüchigkeit

### 1.7.2 Durchflusszytometrische Analyse

Zur Diagnostik des Nijmegen Breakage Syndroms kann die Zellzyklusdiagnostik mittels Durchflusszytometrie angewandt werden. Diese Methode ist schnell, einfach und kann teilweise automatisiert werden. Vorteilhaft gegenüber der traditionellen Chromosomenbruchanalyse sind ihre Genauigkeit, die statistische Sicherheit und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Die Subjektivität der mikroskopischen Analysen entfällt. Die Tatsache, dass nicht nur der geringe Prozentsatz von Zellen in Mitose, sondern auch alle Interphase-Zellen detektiert werden können, ist besonders vorteilhaft bei Kulturen mit verminderter Zellproliferation. So kann die Durchflusszytometrie die zeitaufwendige Chromosomenanalyse ergänzen oder gar ersetzen.

Die Methode kann mit peripheren Blutlymphozyten, Fibroblasten oder mit lymphoblastoiden Zellen durchgeführt werden. Durch die ionisierende Bestrahlung werden bestimmte DNA-Schäden induziert, die aber aufgrund des Gendefektes nicht repariert werden können. Im Gegensatz zu Zellen gesunder Spender zeigen daher die Zellen von NBS-Patienten typischerweise eine meist stark herabgesetzte Mitogenantwort mit hohen Anteilen an nichtproliferierenden Zellen. Eine gesteigerte Sensitivität gegenüber ionisierender Strahlung ist ebenfalls charakteristisch und lässt sich mittels der Durchflusszytometrie nachweisen. Mit Hilfe dieser Tatsachen können die NBS-positiven Fälle von den negativen Kontrollen abgegrenzt werden. Leider ist diese Abgrenzung nicht ganz überschneidungsfrei, so dass die Diagnose nicht immer genau gestellt werden kann. Weiterhin nachteilig an dieser Methode ist, dass sie die diagnostisch relevanten Chromosomenrearrangements der Chromosomen 7 und 14 nicht nachweisen kann. [32]

### 1.7.3 Mutationsanalyse

Die Primärdiagnostik des Nijmegen Breakage Syndroms ist auch mittels der Mutationsanalyse möglich. Das verantwortliche Gen NBS1 ist seit 1998 bekannt, mittlerweile vollständig sequenziert und es ist das einzige bekannte Gen, welches mit NBS assoziiert ist. Etwa 95% der Patienten tragen die „slawische-“ oder „Founder-“ Mutation im Exon 6 des NBS1-Gens [30]. Diese Tatsache erleichtert die Testung auf das Vorliegen einer Mutation enorm. Die übrigen bekannten neun Mutationen sind bisher nur in einzelnen Personen verschiedener ethnischer Abstammung beobachtet worden [42].

Nur durch die Mutationsanalyse kann die Diagnose NBS definitiv bestätigt oder ausgeschlossen werden. Auftretende Unklarheiten bei der klinischen und funktionellen Diagnostik können so beseitigt werden. Auch die molekulargenetische Analyse möglicherweise heterozygoter Familienangehöriger bzw. die pränatale Diagnostik ist erst sinnvoll, wenn die zugrunde liegende Mutation bekannt ist.

Eine weitere Möglichkeit der Diagnose ist die Nibrin-Protein-Analytik mittels Immunoblot. Da alle bekannten Mutationen zu einem vorzeitigen Kettenabbruch führen, kann das Proteinprodukt Nibrin in NBS-Zellen nicht detektiert werden [7][42]. Bei einem Nachweis von Nibrin, ist die Diagnose Nijmegen Breakage Syndrom demnach auszuschließen.

Als Nachteil der Mutationsanalyse steht dem der erhöhte Kosten- und Zeitaufwand gegenüber.

<b>Mutation</b>	<b>Exon</b>	<b>Konsequenz</b>	<b>Ursprung</b>
657 del 5	6	Frameshift	Slawischer Ursprung
681 del T	6	Frameshift	Russland
698 del 4	6	Frameshift	England
742 ins GG	7	Frameshift	Italien
835 del 4	7	Frameshift	Italien
842 ins T	7	Frameshift	Mexico
900 del 25	8	Frameshift	Afrika
976 C>T	8	Q326X	Niederlande
1089 C>A	9	Y363X	Pakistan
1142 del C	10	Frameshift	Kanada

(Quelle: Concannon PJ, Gatti RA / Gene Reviews [2003] <http://www.genetests.org> sowie <http://www.nijmegenbreakagesyndrom.net>)

Tab. 1.2: Alle derzeit bekannten NBS1-Mutationen mit ihren dazugehörigen Eigenschaften

## 1.8 Fragestellung

Trotz erheblicher Fortschritte in Forschung und Wissenschaft bleibt das Nijmegen Breakage Syndrom eine schwerwiegende und lebensbedrohliche Erkrankung, für die es derzeit keinerlei Therapie- oder Behandlungsmöglichkeiten gibt. Immer noch werden viele Patienten viel zu spät diagnostiziert, was zusammen mit der bestehenden Radiosensitivität eine große Gefahr darstellt. Haben diese Patienten bereits Neoplasien entwickelt und werden mit Radio- oder Chemotherapie behandelt, kann dies zu Zweittumoren oder sogar zum Tode führen. Deshalb ist eine frühe, korrekte Diagnose sehr wichtig und entscheidend für eine angemessene Therapie und präventive Pflege bei zum Beispiel auftretenden Tumoren. Nur so besteht die Möglichkeit die Lebenserwartung und Prognose der Patienten zu verbessern. Doch die verschiedenen zur Verfügung stehenden diagnostischen Methoden mit teilweise sehr unterschiedlicher Aussagekraft sowie die Seltenheit des Nijmegen Breakage Syndroms erschweren die Diagnostik.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die Auswertung von 40 Fällen, die im Rahmen der Verdachtsdiagnose eines Nijmegen Breakage Syndroms mit der Durchflusszytometrie im Institut für Humangenetik der Universität Würzburg untersucht wurden. Zielsetzung hierbei war die Frage, in wie weit das Verfahren der durchflusszytometrischen Zellzyklusanalyse für eine Differenzierung zwischen NBS-positiven und NBS-negativen Patienten geeignet ist. Dadurch soll ein Vergleich der hier angewandten Methode mit weiteren verfügbaren diagnostischen Verfahren ermöglicht werden. Des Weiteren soll diskutiert werden, inwiefern die Möglichkeit besteht, die Durchflusszytometrie als sinnvolles Screening-Verfahren bei der Primärdiagnostik des Nijmegen Breakage Syndroms einzusetzen. Die ergänzende Darstellung und Diskussion der wichtigsten Differentialdiagnosen sowie der therapeutischen Möglichkeiten beim Nijmegen Breakage Syndrom sollen die Bedeutung der Diagnostik verdeutlichen.

## **2. Material und Methoden**

Neben der Sequenzierung des NBS1-Gens als molekulare Methode zur Diagnostik des Nijmegen Breakage Syndroms, gibt es wie bereits beschrieben das diagnostische Verfahren der zellzyklusabhängigen DNA-Messung. Dieses Verfahren stellt eine funktionelle Untersuchung dar und beruht auf der Zellzyklusanalyse von in vitro stimulierten peripheren Blutlymphozyten nach ionisierender Bestrahlung.

### **2.1 Isolierung der Lymphozyten und Bestrahlung**

Zur Anlage einer Zellkultur werden mononukleäre Zellen des peripheren Blutes benötigt. Hierfür sind mindestens 5-10 ml heparinisiertes Vollblut notwendig, welches möglichst innerhalb von 24-48 Stunden verarbeitet werden sollte. Alle Arbeitsschritte müssen dabei unter sterilen Bedingungen erfolgen. Sind Lagerung oder Transport nötig, sollte dies nur bei Raumtemperatur geschehen.

Zunächst werden die mononukleären Zellen durch Dichtegradientenzentrifugation über Ficoll-Plaque isoliert. Dazu werden nach Zentrifugation des Blutes 2 ml Plasma abgetrennt, verworfen und durch HBSS (Hank's balanced salt solution) ersetzt. Die so erhaltene Suspension wird nochmals mit dem entsprechenden Volumen an HBSS verdünnt (Verhältnis 1:2). Jeweils 3 ml Ficoll-Plaque werden nun mit 4 ml dieser verdünnten Suspension überschichtet und für 30 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand an HBSS wird verworfen. Die verbleibende, mit Lymphozyten angereicherte Zwischenschicht an der Phasengrenze (weißliche Bande, Lymphozytenring) wird vorsichtig abpipettiert und in 6 ml HBSS resuspendiert. Nach mehreren Waschschrinen wird das Zellpellet in 3,6 ml RPMI-1640- Zellkulturmedium eingesät. Die endgültige Zellzahl wird auf  $1 \times 10^6$ /ml eingestellt. Dazu werden 10 µl der Suspension mit 10 µl 1%iger Essigsäure versetzt. Anschließend werden 10 µl dieses Gemisches mit der gleichen Menge an Trypanblau (0,2%) gemischt, wodurch tote Zellen (Trypanblau-positive) von ungefärbten Zellen (Trypanblau-negative) unterschieden werden können. Die Zellen werden in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer ausgezählt.

Danach erfolgt die Behandlung eines Teils der Zellen mit Röntgenstrahlung in verschiedenen Dosierungen, während der andere Teil unbehandelt bleibt. Die Bestrahlung mit 1,5 Gy stellt hierbei die diagnostisch relevante Dosis dar.

## 2.2 Zellkultur und Zellfärbung

Das Medium in den Kulturansätzen wird nun mit Zusätzen versehen, so dass folgende Endkonzentrationen erreicht werden:

- 1 % autologes Plasma aus der betreffenden Blutprobe (zur Verbesserung des Zellwachstums)
- 15 % FBS (fetal bovine serum)
- 1,2 µg/ml PHA (Phytohämagglutinin, als Mitogen zur Stimulierung der Lymphozyten)
- $1 \times 10^{-4}$  M BrdU (5-Bromo-2-deoxyuridin, was als Thymidinanalogon bei der Replikation in die DNA eingebaut wird)
- $2 \times 10^{-5}$  M 1-Monothioglycerin (zur Verbesserung des Zellwachstums)

In diesen Zellkulturmedien werden die Lymphozyten bei 37,5 Grad Celsius in 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert. Die Kulturflaschen müssen aufrecht im Inkubator eingestellt werden und zur Lichtabschirmung zusätzlich mit Aluminiumfolie umhüllt werden. Dadurch sollen lichtinduzierte Chromosomenbrüche verhindert werden, da BrdU als Photosensitizer wirkt.

Nach 72 Stunden werden die Zellen durch Zentrifugation geerntet. Dieser Schritt sollte nur bei indirektem Licht, unter Abdunklung oder Rotlicht durchgeführt werden. Es folgen Waschschrte und die Doppelfärbung der DNA mit den Fluorochromen Hoechst-33258 und Ethidiumbromid. Die Zellen können aber auch für spätere Zwecke im Medium mit 80% RPMI-1640, 10% FBS und 10% DMSO aufgenommen und bei -20 °C für bis zu 2 Jahren eingefroren werden.

Zur Färbung werden die Zellen zunächst in einem Puffer (0,1 M Tris-HCl, pH 7,4; 0,154 M NaCl; 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2% bovine serum albumin und 0,1% Nonidet P-40) aufgenommen. Nun wird mit Hoechst-33258 (Endkonzentration 1,2 mg/ml) für 15 Minuten bei 4 °C unter Lichtausschluss inkubiert. Danach wird Ethidiumbromid (Endkonzentration 1,5 mg/ml) hinzugefügt und für weitere 15 Minuten bei 4 °C inkubiert. Die gefärbten Proben sind so bei 4 °C und geschützt vor Lichteinwirkung für einige Stunden stabil.

### 2.3 Durchflusszytometrie und Zellzyklusanalyse

Die Durchflusszytometrie stellt ein optisches Messsystem dar, das Streulicht- und Fluoreszenzsignale einzelner in einem Flüssigkeitsstrom fokussierter Partikel analysieren kann. Sie basiert auf dem Prinzip der Färbung bzw. Markierung verschiedener Komponenten mit geeigneten Fluorochromen. Hier wurden die Fluoreszenzfarbstoffe Hoechst-33258 und Ethidiumbromid (EB) verwendet. Letzteres ist ein interkalierendes Molekül, welches kovalent und basenspezifisch an die DNA bindet. Hoechst-33258 ist hingegen ein nicht-interkalierendes Fluorochrom, welches sich an AT-reiche Sequenzen der DNA anlagert.

Bei der durchflusszytometrischen Messung werden die Zellen bzw. Zellkerne perlschnurartig hintereinander in einer Flusskammer an einem Objektiv vorbei geführt und hydrodynamisch fokussiert. Bei einer Flussrate zwischen 100 und 300 Zellen pro Sekunde beruht jede Messung auf 50.000 bis 100.000 Zellen. In der Fokussierungsebene trifft ein Anregungslichtstrahl auf die einzelnen Zellen. Die einfachsten Durchflusszytometer besitzen eine Anregungslichtquelle mit breitem Spektrum, welches den UV-Bereich umfasst (Quecksilberhochdrucklampe HBO, Spektrum ca. 300 bis 800 nm). Aufgrund der Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe emittiert jede Zelle ein Lichtsignal proportional zur stöchiometrisch gebundenen Fluorochrommenge. Dabei emittiert jeder Farbstoff ein Licht im für ihn charakteristischen Frequenzbereich (Hoechst-33258: 450-500 nm; Ethidiumbromid: > 600 nm).

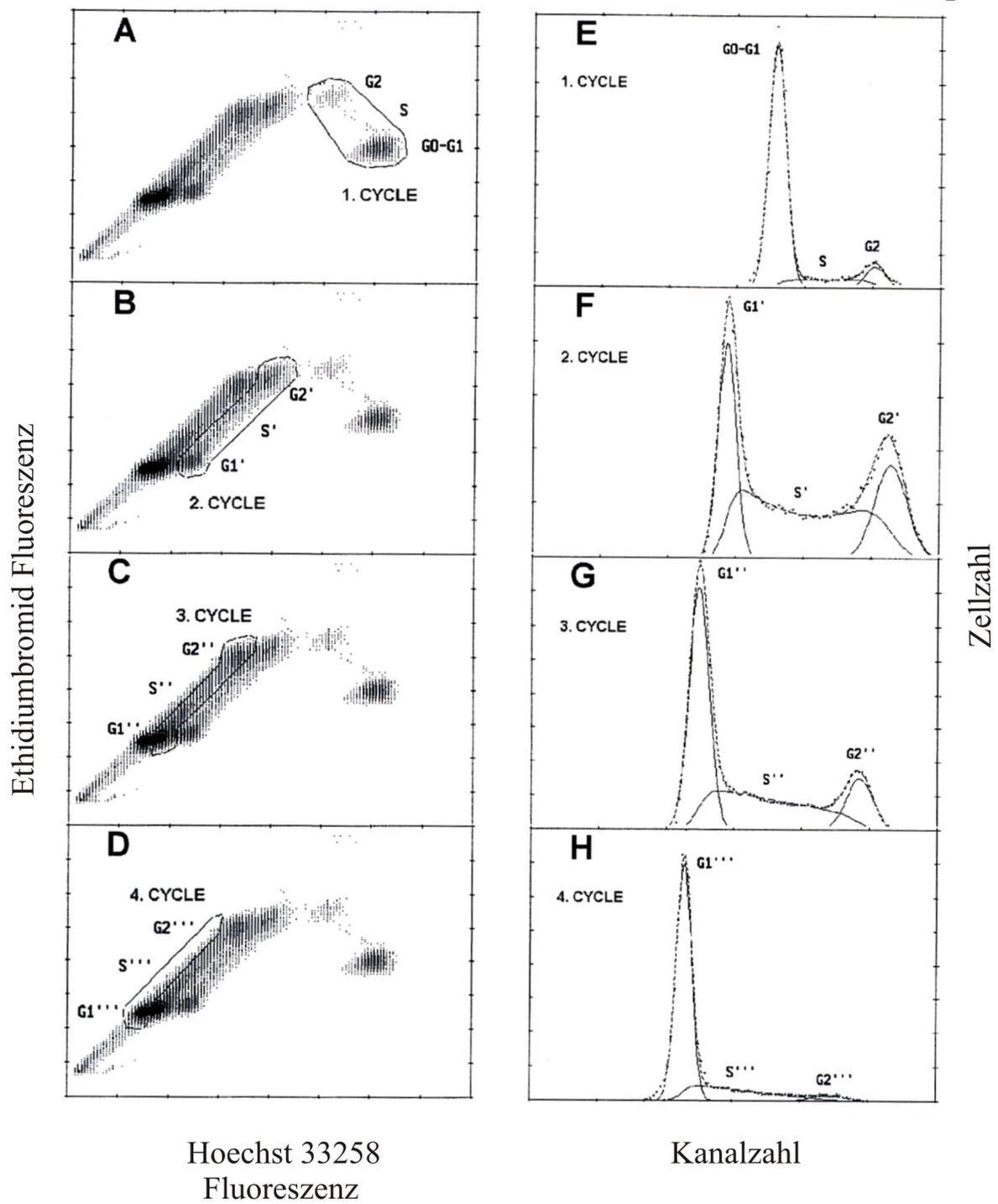
Über entsprechende Spiegel, Farbteiler und Filter für verschiedene Wellenlängen können die resultierenden Fluoreszenzsignale getrennt voneinander erfasst werden. Dabei werden die Anzahl der Signale sowie die Lichtintensität jedes Einzelsignals detektiert. Das nach Wellenlänge aufgetrennte Licht wird zu zwei Photomultipliern weiter geleitet. Diese können simultane Fluoreszenzsignale messen und sie einem gemeinsamen Ereignis zuordnen. An den Photomultipliern werden die optischen Signale verstärkt und schließlich in elektronische Signale umgewandelt und auf einen PC übertragen. Die so gewonnenen Daten werden mit Hilfe von speziellen Computerprogrammen (MCYCLE-AV, MULTI 2D-AV oder MPLUS-AV) ausgewertet. Die Messungen der vorliegenden Daten erfolgte an den Durchflusszytometern ICP 22 (Phywe) bzw. LSR1 (Becton-Dickinson).

In der Zellzyklusanalyse können die verschiedenen Phasen des Zellzyklus erfasst werden. In der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase des ersten Zellzyklus haben die Zellen den einfachen diploiden DNA-Gehalt (2n). Alle Zellen weisen einen einheitlichen DNA-Gehalt und die gleiche Hoechst-33258- und EB-Fluoreszenz auf. In der S-Phase wird die DNA repliziert und der DNA-

Gehalt steigt bis zum Erreichen des doppelten diploiden DNA-Gehalts ( $4n$ ). Dies bewirkt auch eine Zunahme der EB vermittelten Fluoreszenzintensität infolge der vermehrten Einlagerung von EB in die DNA. Hingegen nimmt die Hoechst-33258-Fluoreszenzintensität ab, da die Anlagerung von Hoechst-33258 umso mehr sterisch gehindert wird, je mehr Thymidin durch BrdU während der semikonservativen DNA-Replikation substituiert wird. Dieses Phänomen wird als „Quenching“ bezeichnet. In der G2-Phase verändert sich der DNA-Gehalt der Zellen nicht. Während der Mitose-Phase teilen sich die Zellen in zwei diploide Tochterzellen, die in die G1-Phase des zweiten Zellzyklus eintreten. Der DNA-Gehalt wird also halbiert und fällt auf den ursprünglichen Wert ( $2n$ ) zurück. Dementsprechend fällt auch die EB-Fluoreszenz zurück auf das Ausgangsniveau. Die Hoechst-33258 vermittelte Fluoreszenzintensität erreicht jedoch nicht mehr das Ausgangsniveau, sondern verbleibt bei einem niedrigeren Wert. Dies lässt sich wieder auf die BrdU Substitution zurückführen. Diese Abläufe wiederholen sich in jedem weiteren Zellzyklus. Der „Quench“- Effekt nimmt dabei infolge der wachsenden BrdU Inkorporation von Zellzyklus zu Zellzyklus zu, so dass die Hoechst-33258- Fluoreszenzintensität immer weiter abnimmt.

Zusammenfassend spiegelt die EB-Fluoreszenzintensität den jeweiligen DNA-Gehalt der Zelle wieder, wonach man sie den einzelnen Zellzyklusphasen (G1, S, G2) zuordnen kann. Hingegen ermöglicht die Hoechst-33258-Fluoreszenzintensität eine Einordnung zu den jeweils durchlaufenen Zellzyklen. Mittels der Durchflusszytometrie kann also der zellzyklusabhängige nukleäre DNA-Gehalt gemessen werden. Zur Auswertung werden die Daten in zweiparametrischen Histogrammen dargestellt. In diesen Zytogrammen gibt die x-Achse die Hoechst-33258- und die y-Achse die EB-Fluoreszenzintensität wieder. So können, anhand des DNA-Gehalts und den jeweils abgelaufenen Replikationszyklen, die einzelnen Zellzyklen mit den jeweils einzelnen Phasen genau aufgelöst und quantifiziert werden. Veränderungen der normalen Zellzyklusverteilung, sowie der nichtproliferierende Anteil einer Zellpopulation können so erkannt werden. [31][32][40]

In Abbildung 2.1/A-D sind die Zytogramme eines gesunden Probanden gezeigt. Die einzelnen Zellzyklen und ihre entsprechenden Kompartimente (G0/G1, S, G2) sind zur Verdeutlichung eingerahmt. In Abbildung 2.1/E-H sind die jeweils dazugehörigen eindimensionalen Histogramme wiedergegeben. Aus ihnen lässt sich der Anteil der Zellen in den jeweiligen Zellzyklusphasen ablesen.



(Quelle: modifiziert nach Schindler & Hoehn, 1999)

Abb. 2.1: A-D: Zytogramme einer 72 Stunden Kultur aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes eines gesunden Probanden  
E-H: dazugehörige eindimensionale Histogramme

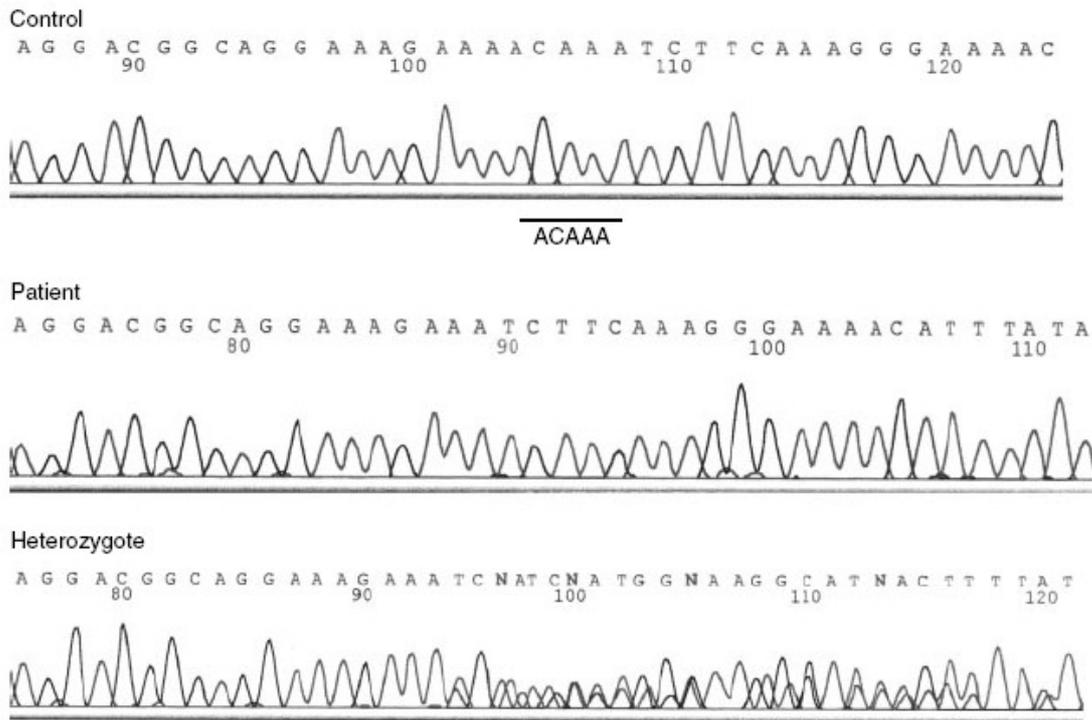
## 2.4 Mutationsanalyse

Für eine molekulargenetische Diagnostik muss zunächst die Patienten-DNA aus den entsprechenden Zelllinien isoliert werden. Als Untersuchungsmaterial dient dabei meist heparinisiertes Vollblut aus dem zunächst in Kultur wachsende Zelllinien etabliert werden müssen. Später kann die DNA-Extraktion beispielsweise mit dem High-Pure-PCR-Template-Preparation-Kit erfolgen.

Dazu werden mittels PCR (Polymerase chain reaction) die zu untersuchenden Exons amplifiziert und anschließend sequenziert. Die PCR dient dabei der Vervielfältigung des jeweils definierten DNA-Abschnittes. Dazu wird mit Hilfe geeigneter Oligonukleotid-Primerpaare, den entsprechenden Nukleotiden, dem Enzym Polymerase und einem DNA-Template in einem Thermocycler in ca. 25-35 Reaktionszyklen der durch die Primerauswahl bestimmte DNA-Bereich millionenfach kopiert [13]. Die Produkte der PCR bilden dann die Grundlage der DNA-Sequenzierung. Die Sequenzierung des Sense- und Antisense-Strangs dient dabei der Ermittlung der genauen Basenabfolge in diesem definierten Abschnitt der DNA. Im Anschluss an die Sequenzierung wird die ermittelte Basensequenz mit der normalen Referenzsequenz verglichen. Diese präzise Methode der DNA-Strukturanalyse ermöglicht so die Auffindung der veränderten Sequenzvarianten bzw. der krankheitsverursachenden Mutation.

Die Automatisierung des Verfahrens als One-Lane-Four-Dye-Technologie gewährleistet dabei einen hohen Probendurchlauf und eine sensitive Erfassung und Analyse der Daten. [13]

Abbildung 2.2 zeigt Ausschnitte der genomischen Sequenz aus Exon 6 des NBS1-Gens. In der ersten Zeile ist eine Referenz-DNA dargestellt, in Zeile zwei die Sequenz eines homozygoten NBS-Patienten mit der bei 95% der Patienten vorherrschenden 657del5 Mutation. Im Vergleich dazu zeigt Zeile drei die DNA eines für diese Mutation heterozygoten Patienten. Zur Veranschaulichung ist die 5-Basenpaar-Deletion (ACAAA) in der Referenz-DNA mit einem Balken markiert. In der Sequenz des heterozygoten Trägers wird ab der Stelle der Deletion die Verschiebung des Leserasters deutlich.



(Quelle: Muschke et al. / Prenatal Diagnosis [2004] 24: 111-113)

Abb. 2.2: Ausschnitt der genomischen Sequenz aus Exon 6 des NBS1-Gens bei einem Patienten mit homozygoter 657del5 Mutation (Patient). Im Vergleich dazu, die gleiche Sequenz bei einer negativen Kontrollperson (Control), sowie bei einem heterozygoten Träger der Mutation (Heterozygote).

## **3. Ergebnisse**

### **3.1 Diagnostik bei Nijmegen Breakage Syndrom**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Daten von 40 Patienten, die mit der Verdachtsdiagnose eines Nijmegen Breakage Syndroms mit der Durchflusszytometrie untersucht wurden, ausgewertet. Um zwischen NBS-positiven und NBS-negativen Fällen zu unterscheiden wurden folgende Parameter verwendet: Der Anteil nichtproliferierender Zellen, das heißt die Zellen, welche innerhalb von 72 Stunden nicht in den Zellzyklus eintraten und in der G0/G1-Phase des ersten Zellzyklus verblieben, sowie die G2/GF-Ratio als Maß für Strahlensensitivität. Letzteres ergibt sich aus dem Zellanteil in der G2-Phase des ersten Zellzyklus im Verhältnis zur Wachstumsfraktion (GF). Beide Werte sind bei Patienten mit Nijmegen Breakage Syndrom im Vergleich zu negativen Kontrollen erhöht. Trägt man sie gegeneinander in einem zweiparametrischen Diagramm auf, kann man positive und negative Fälle gut von einander abgrenzen. Des Weiteren wurde zur differentialdiagnostischen Abgrenzung der AFP-Wert im Serum der Patienten bestimmt. Im Gegensatz zu Patienten mit Ataxia teleangiectatica, die typischerweise erhöhte Werte für das  $\alpha$ -Fetoprotein aufweisen, sind für alle NBS-Patienten normale Serumwerte beschrieben [5][38][39].

So konnte in 22 Fällen die Verdachtsdiagnose NBS ausgeschlossen werden. In 16 Fällen zeigte sich ein für das Nijmegen Breakage Syndrom typischer Zellzyklusbefund mit erhöhter Strahlensensitivität und herabgesetzter Mitogenantwort. Bei 9 dieser Patienten konnte die Diagnose des Nijmegen Breakage Syndroms durch Mutationsanalyse bestätigt werden. Bei 4 Patienten konnte jedoch trotz erhöhter Strahlensensitivität keine Mutation im NBS1-Gen nachgewiesen werden, was damit die Diagnose NBS ausschließt. Bei den übrigen 3 dieser Patienten wurde keine Mutationsanalyse durchgeführt, so dass die endgültige Diagnose nicht mit Sicherheit feststeht. In weiteren 2 Fällen konnte wegen einer mangelhaften Probe keine Aussage getroffen werden.

Dementsprechend lassen sich die Ergebnisse in 5 Kategorien unterteilen:

<b>Kategorie I</b>	NBS-negative Kontrollen	22 Fälle
<b>Kategorie II</b>	NBS-positiv	9 Fälle
<b>Kategorie III</b>	erhöhte Strahlensensitivität ohne nachgewiesene NBS1-Mutation	4 Fälle
<b>Kategorie IV</b>	erhöhte Strahlensensitivität	3 Fälle
<b>Kategorie V</b>	Sonderfälle; fragliche Auswertbarkeit	2 Fälle

Abbildung 3.1 zeigt die Ergebnisse der Zellzyklusanalyse bei Bestrahlung mit 1,5 Gy aller bearbeiteten Fälle, wobei die Abszisse die G2/GF-Ratio repräsentiert und auf der Ordinate der Prozentsatz an G0/G1-Phase-Zellen aufgetragen ist. Mit durchgezogenen Linien und entsprechenden Symbolen sind jeweils für gesichert positive als auch für negative Fälle Mittelwert plus/minus eine Standardabweichung dargestellt.

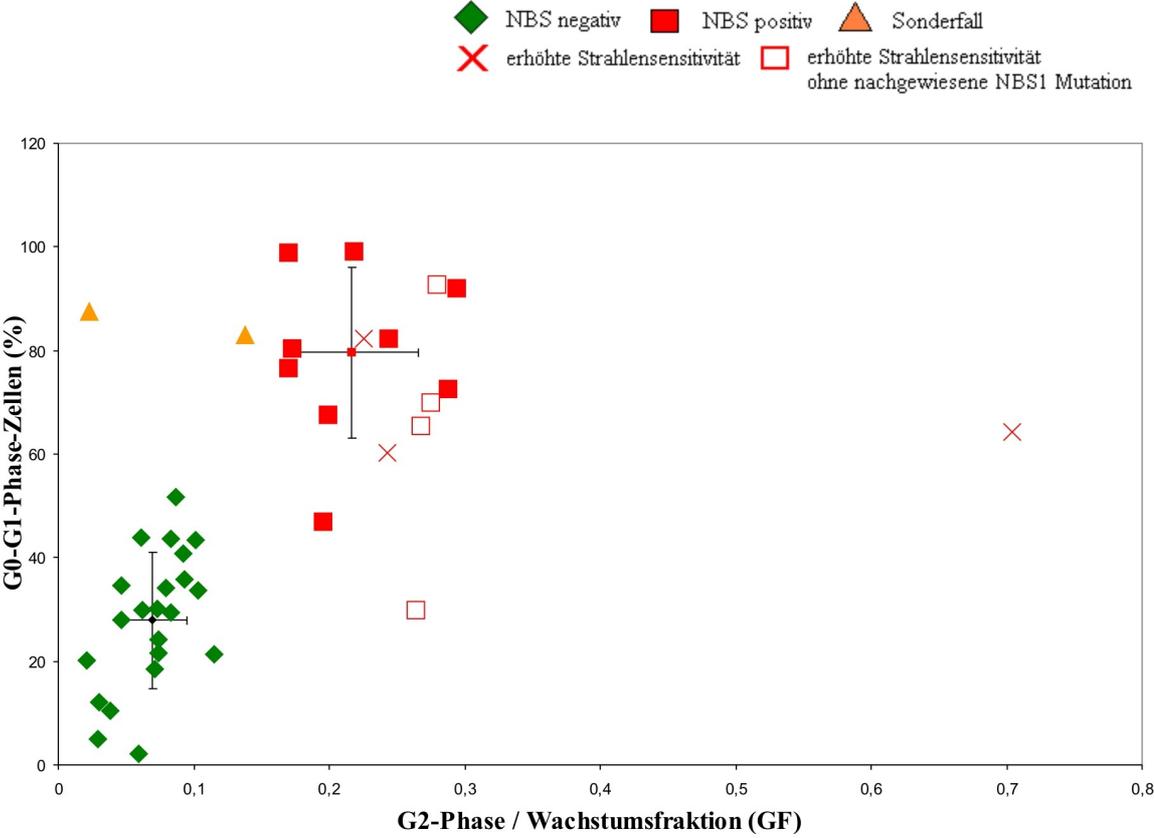


Abb. 3.1 : Übersicht über alle bearbeiteten Fälle: Strahlensensitivität (G2/GF-Ratio) im Verhältnis zum Anteil nichtproliferierender Zellen (G0-G1-Phase) unter Bestrahlung mit 1,5 Gy

## 3.2 Falldarstellungen

### Kategorie I (NBS-negative Kontrollen)

#### Fall 1 (G-01-1387)

Der erst 1-jährige Patient fiel klinisch durch einen Mikrozephalus auf. Bei Verdacht auf Nijmegen Breakage Syndrom wurde eine zellkinetische Untersuchung durchgeführt, welche im Einzelnen folgende Ergebnisse ergab:

72 Stunden nach Kulturbeginn befanden sich bezogen auf die Ausgangspopulation

ohne Bestrahlung	31,5 %	im ursprünglichen G0-G1-Kompartiment
mit Bestrahlung (1,5 Gy)	30,1 %	
ohne Bestrahlung	29,4 %	im dritten Zellzyklus
mit Bestrahlung (1,5 Gy)	25,0 %	

G2/GF-Ratio des 1. Zellzyklus bei 1,5 Gy	0,073
AFP-Wert im Plasma	27,5 ng/ml

Zusammenfassend zeigten die Lymphozyten des Patienten eine unauffällige Stimulierbarkeit, bezogen auf das Lebensalter. Lymphozyten gesunder Kontrollen vergleichbaren Alters zeigen, bestrahlt und unbestrahlt, ähnliche Zellzyklusverteilungen über drei bis vier Zellzyklen nach 72 Stunden Kulturdauer.

Das Verhältnis des Anteils der Zellen in der G2-Phase des ersten Zellzyklus nach Bestrahlung mit 1,5 Gy zum Anteil der proliferierenden Zellen (G2/GF-Ratio) ist ein Maß für Strahlensensitivität und liegt mit 0,073 im Normalbereich von Kontrollpersonen. Dieser Wert ist in Abbildung I/1b gegen den Prozentsatz nichtproliferierender Zellen (G0-G1-Phase) aufgetragen.

Der AFP-Wert liegt ebenfalls im Normalbereich der Altersgruppe.

Bei normaler Mitogenantwort der Lymphozyten des Patienten, liegt keine erhöhte Strahlensensitivität vor. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zur Diagnose Nijmegen Breakage Syndrom.

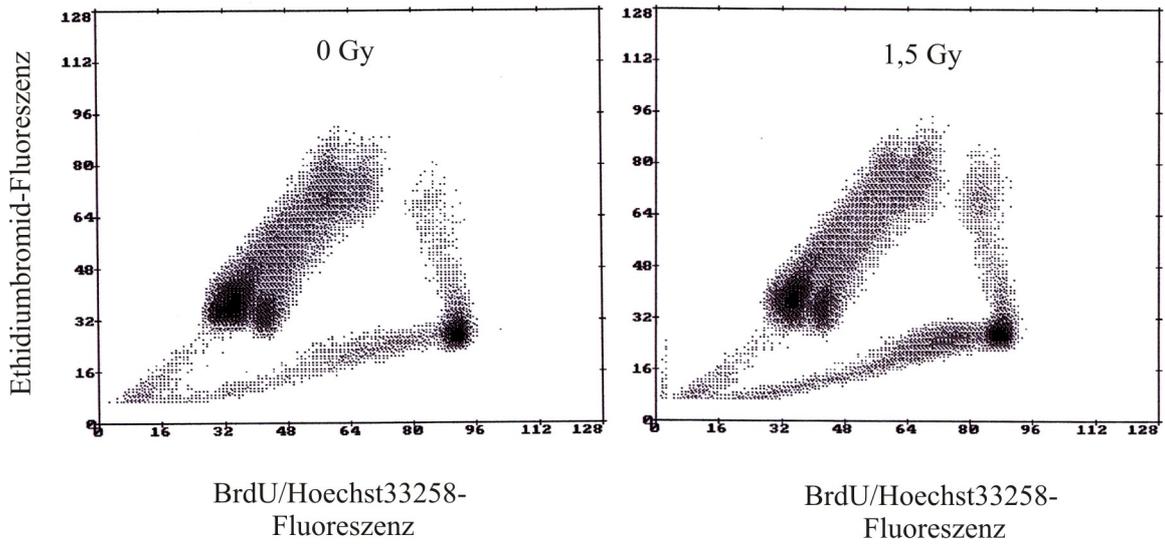


Abb. I/1a: der Zellzyklusanalyse zugrundeliegende Zytogramme

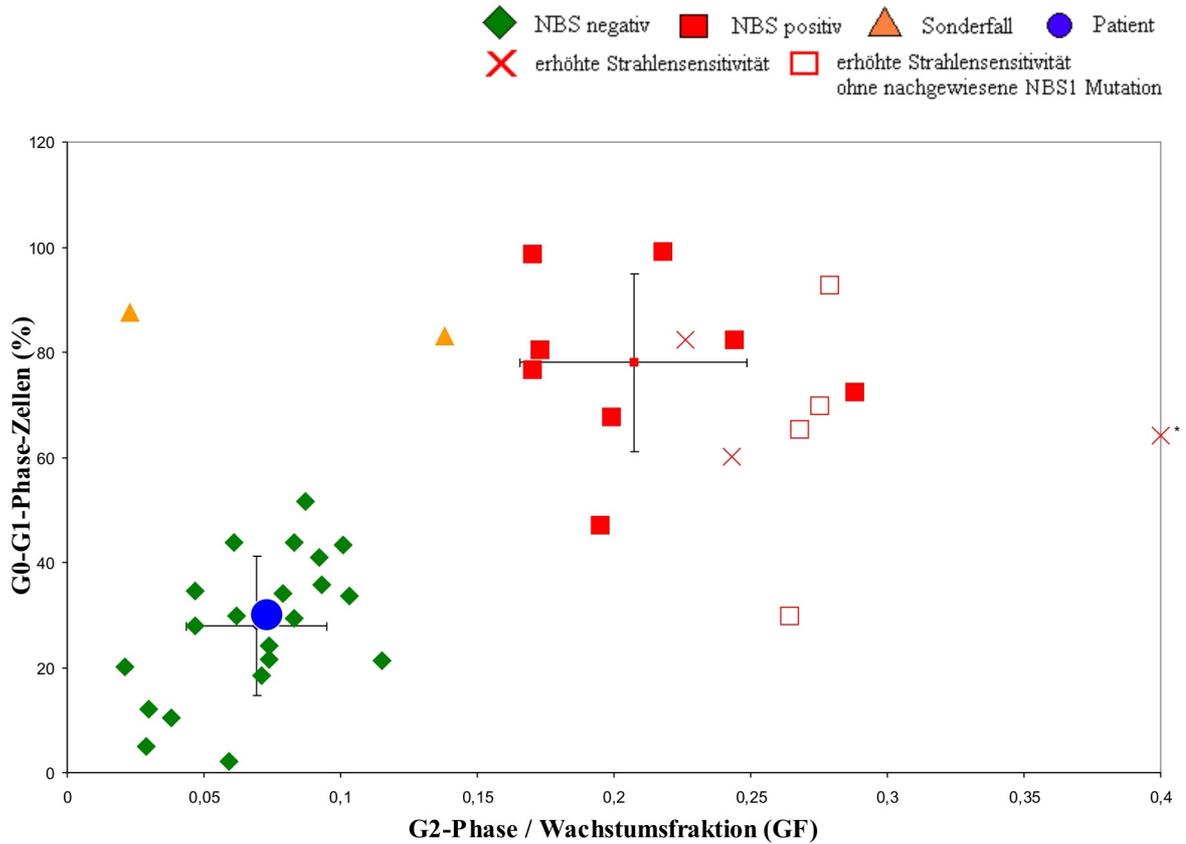


Abb. I/1b: Darstellung der Strahlensensitivität (G2/GF- Ratio) im Verhältnis zum Anteil nichtproliferierender Zellen (G0-G1-Phase) unter Bestrahlung mit 1,5 Gy (\* Datenpunkt 0,704 ; 64,2)

## Fall 2 (G-01-1022)

Es handelt sich um eine 8-jährige Patientin mit der Verdachtsdiagnose Nijmegen Breakage Syndrom. Klinisch finden sich ein Mikrozephalus, ein Hypotelorismus, statomotorische sowie mentale Retardierung und eine Tumorentwicklung in der Schilddrüse. Ein Minderwuchs besteht jedoch nicht und alle weiteren Familienmitglieder sind klinisch unauffällig und gesund. Zur Klärung wurde eine zellkinetische Untersuchung durchgeführt, welche im Einzelnen folgende Befunde ergab:

72 Stunden nach Kulturbeginn befanden sich bezogen auf die Ausgangspopulation

ohne Bestrahlung	32,8 %	im ursprünglichen G0-G1-Kompartiment
mit Bestrahlung (1,5 Gy)	32,8 %	
ohne Bestrahlung	28,0 %	im dritten Zellzyklus
mit Bestrahlung (1,5 Gy)	21,2 %	
G2/GF-Ratio des 1. Zellzyklus bei 1,5 Gy		0,093
AFP-Wert im Plasma		1,5 ng/ml

Zusammenfassend zeigten die Lymphozyten der Patientin eine leicht unterdurchschnittliche Stimulierbarkeit, bezogen auf das Lebensalter. Lymphozyten gesunder Kontrollen vergleichbaren Alters zeigen aber, bestrahlt und unbestrahlt, eine ähnliche Zellzyklusverteilung über drei bis vier Zellzyklen nach 72 Stunden Kulturdauer.

Das Verhältnis des Anteils der Zellen in der G2-Phase des ersten Zellzyklus nach Bestrahlung mit 1,5 Gy zum Anteil der proliferierenden Zellen (G2/GF-Ratio) ist ein Maß für Strahlensensitivität und liegt mit 0,093 im Normalbereich von Kontrollpersonen. Dieser Wert ist in Abbildung I/2b gegen den Prozentsatz nichtproliferierender Zellen (G0-G1-Phase) aufgetragen.

Der AFP-Wert liegt ebenfalls im Normalbereich der Altersgruppe.

Bei leicht verringerter Mitogenantwort der Lymphozyten der Patientin, konnte keine erhöhte Strahlensensitivität nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zur klinischen Verdachtsdiagnose Nijmegen Breakage Syndrom.

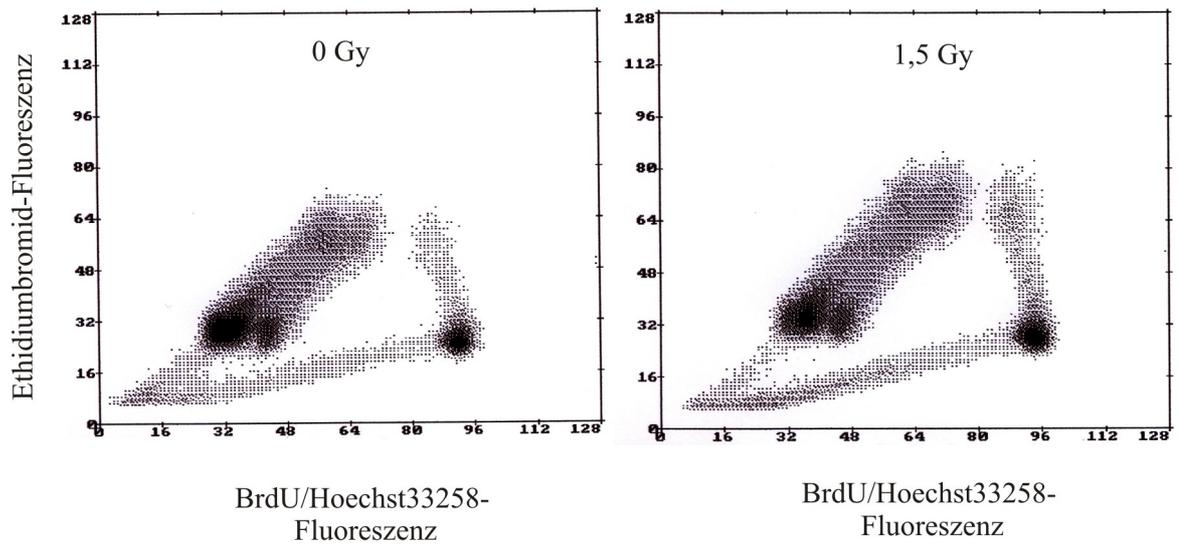


Abb. I/2a: der Zellzyklusanalyse zugrundeliegende Zytogramme

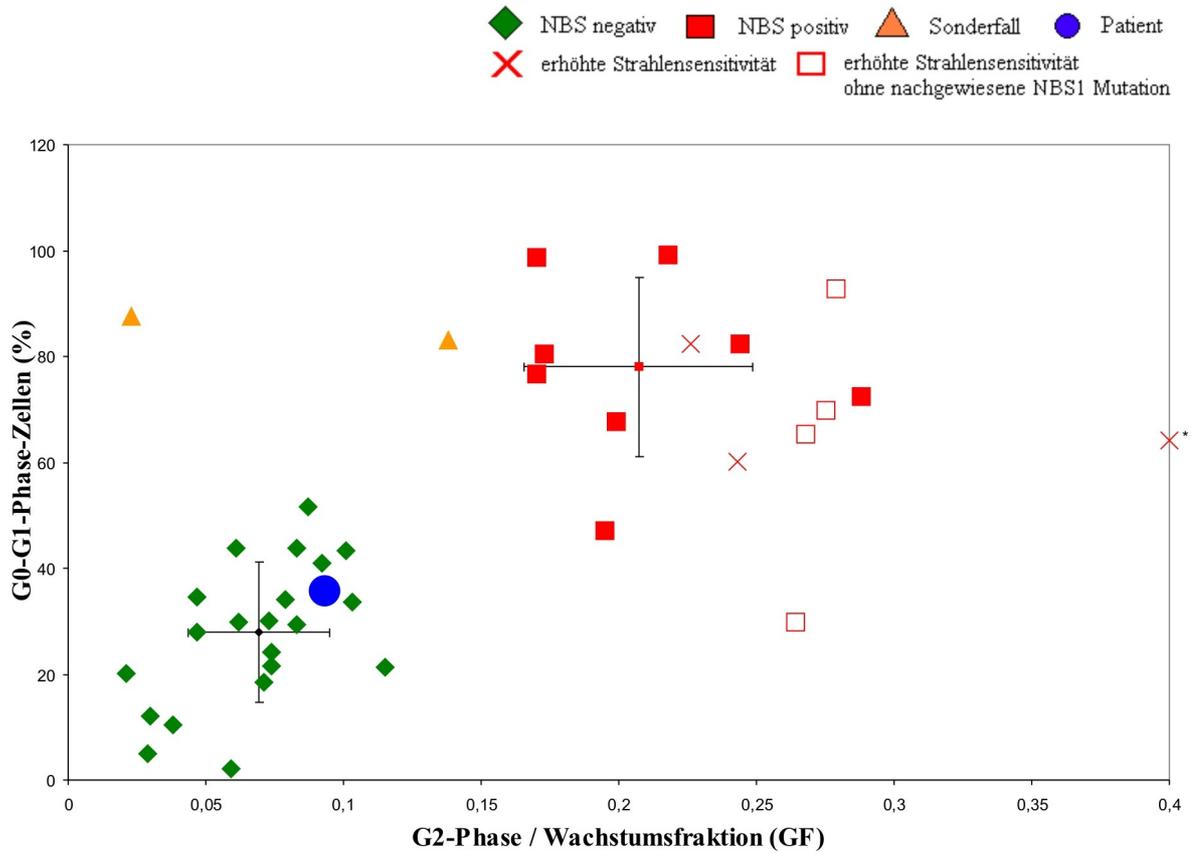


Abb. I/2b: Darstellung der Strahlensensitivität (G2/GF- Ratio) im Verhältnis zum Anteil nichtproliferierender Zellen (G0-G1-Phase) unter Bestrahlung mit 1,5 Gy (\* Datenpunkt 0,704 ; 64,2)

### Fall 3 (G-03-122)

Bei der 9-jährigen Patientin mit Verdacht auf Nijmegen Breakage Syndrom fallen klinisch eine Mikrozephalie, spärliches Haupthaar, verminderte Pigmentierung mit Sommersprossen, Ataxien und eine Infektneigung zu Bronchitiden und Bronchopneumonien auf. Weiterhin wird über einen prä- und postnatalen Minderwuchs, eine leichte Knochenreifungsstörung und statomotorische sowie mentale Retardierung berichtet. Zytogenetisch und molekulargenetisch konnten bereits das Angelman-Syndrom und Morbus Friedreich ausgeschlossen werden. Zur weiteren Diagnostik wurde eine zellkinetische Untersuchung durchgeführt, welche im Einzelnen folgende Ergebnisse zeigte:

72 Stunden nach Kulturbeginn befanden sich bezogen auf die Ausgangspopulation

ohne Bestrahlung	25,1 %	im ursprünglichen G0-G1-Kompartiment
mit Bestrahlung (1,5 Gy)	29,3 %	
ohne Bestrahlung	35,1 %	im dritten Zellzyklus
mit Bestrahlung (1,5 Gy)	32,8 %	

G2/GF-Ratio des 1. Zellzyklus bei 1,5 Gy	0,083
AFP-Wert im Plasma	1,2 ng/ml

Zusammenfassend zeigten die Lymphozyten der Patientin eine durchschnittliche Stimulierbarkeit, bezogen auf das Lebensalter. Lymphozyten gesunder Kontrollen vergleichbaren Alters zeigen, bestrahlt und unbestrahlt, eine ähnliche Zellzyklusverteilung über drei bis vier Zellzyklen nach 72 Stunden Kulturdauer.

Das Verhältnis des Anteils der Zellen in der G2-Phase des ersten Zellzyklus nach Bestrahlung mit 1,5 Gy zum Anteil der proliferierenden Zellen (G2/GF-Ratio) ist ein Maß für Strahlensensitivität und liegt mit 0,083 im Normalbereich von Kontrollpersonen. Dieser Wert ist in Abbildung I/3b gegen den Prozentsatz nichtproliferierender Zellen (G0-G1-Phase) aufgetragen.

Der AFP-Wert im Plasma liegt ebenfalls im Normalbereich der Altersgruppe.

Bei durchschnittlicher Mitogenantwort der Lymphozyten der Patientin, liegt keine erhöhte Strahlensensitivität vor. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zur Verdachtsdiagnose Nijmegen Breakage Syndrom.

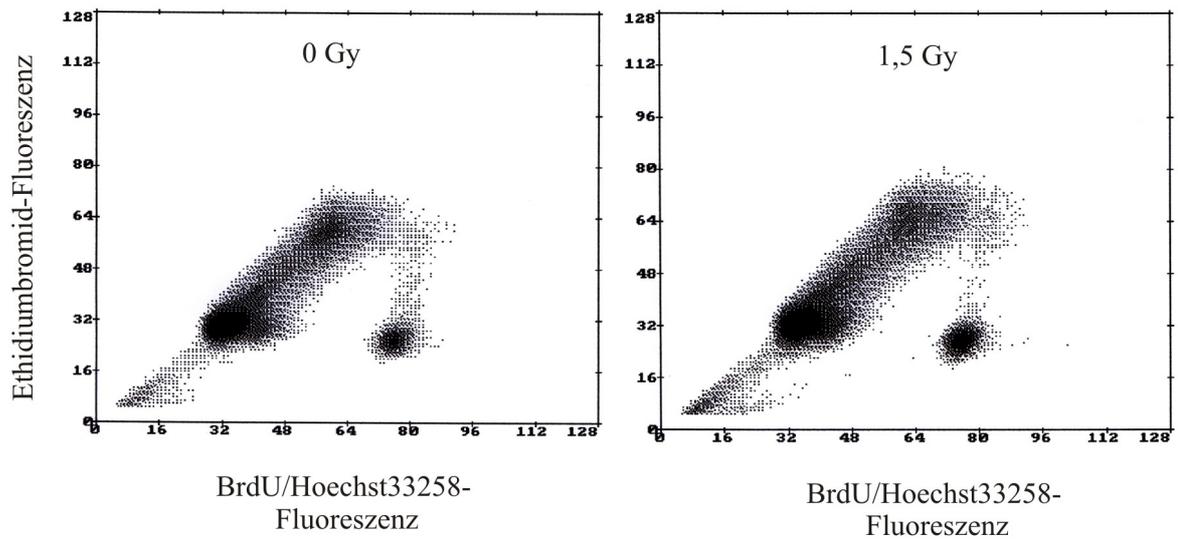


Abb. I/3a: der Zellzyklusanalyse zugrundeliegende Zytogramme

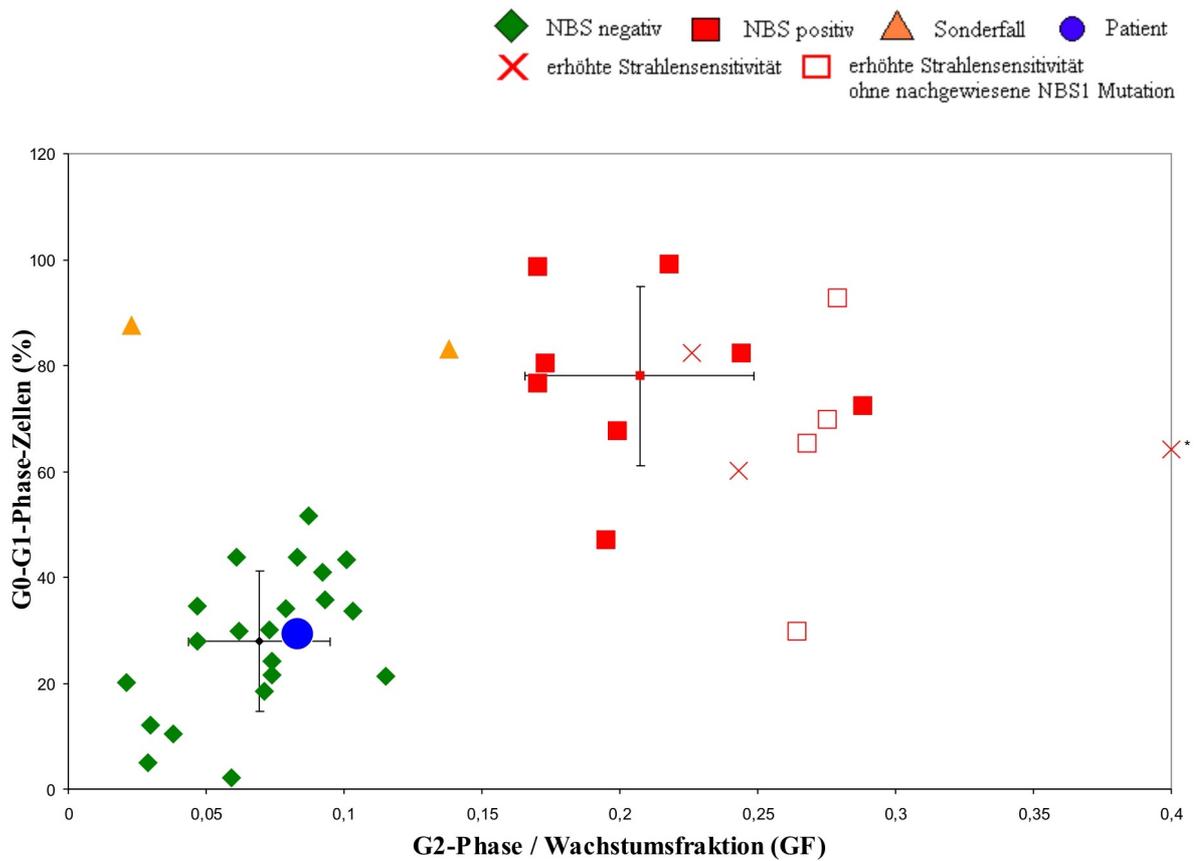


Abb. I/3b: Darstellung der Strahlensensitivität (G2/GF- Ratio) im Verhältnis zum Anteil nichtproliferierender Zellen (G0-G1-Phase) unter Bestrahlung mit 1,5 Gy (\* Datenpunkt 0,704 ; 64,2)

## Kategorie II (NBS-positiv)

### Fall 4 (G-04-2972)

Der fast 2-jährige Patient wurde mit folgendem Befund zur Zellzyklusanalyse vorgestellt: Mikrozephalie, Minderwuchs, leichter kombinierter Immundefekt mit Lymphopenie, signifikant erniedrigten T-Zellen (insbesondere der T-Helfer-Zellen) sowie vermindertem Immunglobulinspiegel. Weiterhin typische Stigmata wie Schrägstellung beider Lidachsen, fliehende Stirn, große und weit abstehende Ohren, eine Hypoplasie des Unterkiefers und ein prominentes Mittelgesicht. Bisher hatte der Patient keine schweren Infektionen und zeigte adäquate Reaktion auf alle verabreichten Impfstoffe. Die zellkinetische Untersuchung ergab im Einzelnen folgende Ergebnisse:

72 Stunden nach Kulturbeginn befanden sich bezogen auf die Ausgangspopulation

ohne Bestrahlung	32,7 %	im ursprünglichen G0-G1-Kompartiment
mit Bestrahlung (1,5 Gy)	47,0 %	
ohne Bestrahlung	19,9 %	im dritten Zellzyklus
mit Bestrahlung (1,5 Gy)	10,6 %	

G2/GF-Ratio des 1. Zellzyklus bei 1,5 Gy	0,195
AFP-Wert im Plasma	5,2 ng/ml (Normalbereich der Altersgruppe)

Zusammenfassend zeigten die Lymphozyten des Patienten eine nur unterdurchschnittliche Stimulierbarkeit, bezogen auf das Lebensalter. Lymphozyten gesunder Kontrollen vergleichbaren Alters zeigen, bestrahlt und unbestrahlt, eine Zellzyklusverteilung über drei bis vier Zellzyklen nach 72 Stunden Kulturdauer.

Die G2/GF-Ratio ist ein Maß für Strahlensensitivität und liegt mit 0,195 im Bereich anderer Patienten mit Nijmegen Breakage Syndrom. Dieser Wert ist in Abbildung II/4b gegen den Prozentsatz nichtproliferierender Zellen (G0-G1-Phase) aufgetragen.

Die unterdurchschnittliche Mitogenantwort der Lymphozyten des Patienten, die erhöhte Strahlensensitivität nach Bestrahlung und der normale AFP-Wert stehen im Einklang mit der Verdachtsdiagnose Nijmegen Breakage Syndrom.

Die Diagnose NBS konnte später durch einen Nibrin-Immunoblot und durch eine Mutationsanalyse des NBS1-Gens bestätigt werden. Die Mutation 657del5 wurde auf beiden Chromosomen nachgewiesen. Dabei handelt es sich um die häufigste NBS1-Mutation, auch bezeichnet als „Founder-“ Mutation.

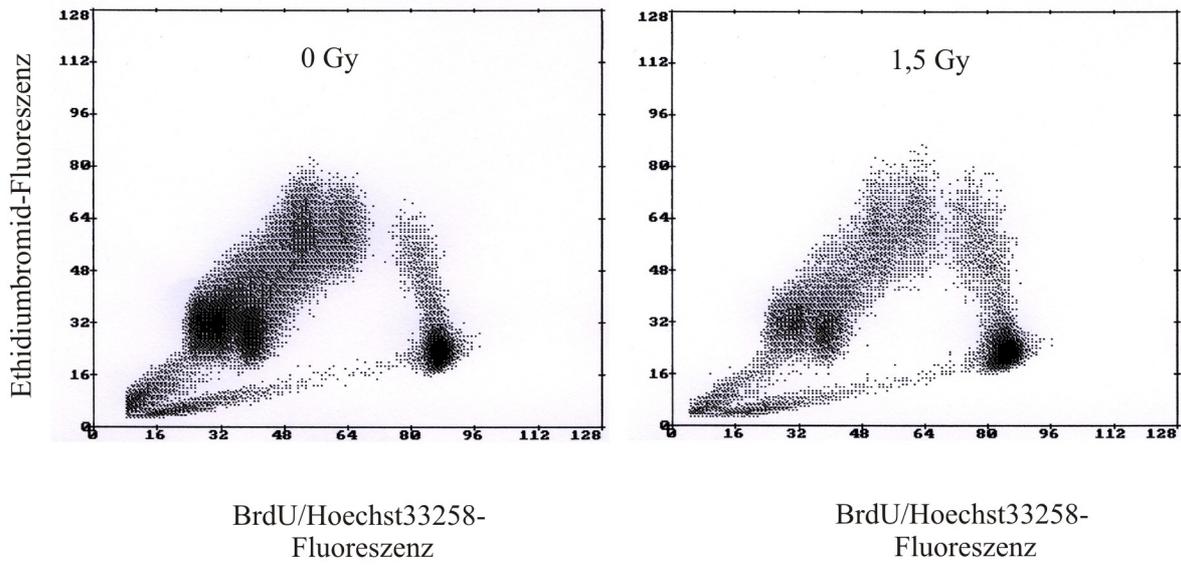


Abb. II/4a: der Zellzyklusanalyse zugrundeliegende Zytogramme

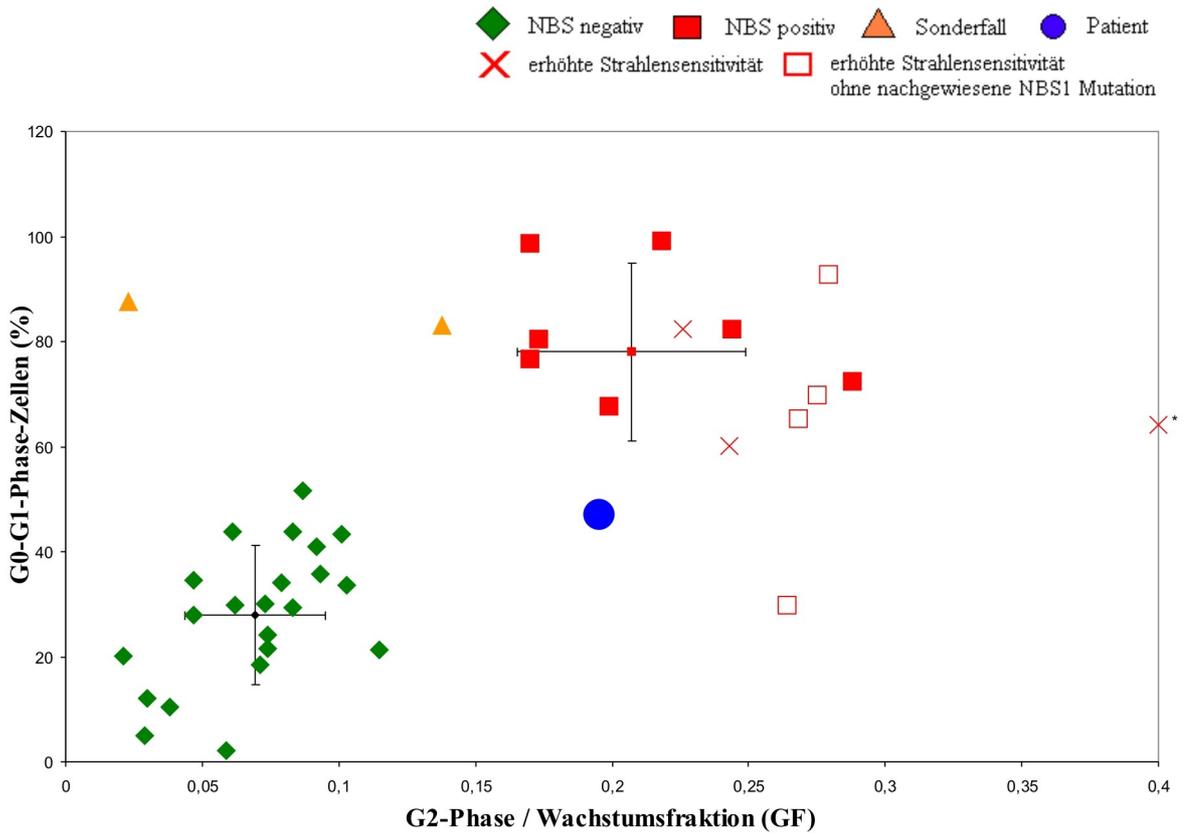


Abb. II/4b: Darstellung der Strahlensensitivität ( $G2/GF$ - Ratio) im Verhältnis zum Anteil nichtproliferierender Zellen ( $G0-G1$ -Phase) unter Bestrahlung mit 1,5 Gy  
 (\* Datenpunkt 0,704 ; 64,2)

### Fall 5 (G-01-1875)

Es handelt sich um einen 22-jährigen Patienten mit bereits bekanntem Nijmegen Breakage Syndrom, der im Alter von 15 Jahren an einem Non-Hodgkin-Lymphom erkrankte. Zur Untersuchung der Chromosomenbrüchigkeit wurde eine zellkinetische Untersuchung durchgeführt, welche im Einzelnen folgende Befunde ergab:

72 Stunden nach Kulturbeginn befanden sich bezogen auf die Ausgangspopulation

ohne Bestrahlung	65,7 %	im ursprünglichen G0-G1-Kompartiment
mit Bestrahlung (1,5 Gy)	67,6 %	
ohne Bestrahlung	9,5 %	im dritten Zellzyklus
mit Bestrahlung (1,5 Gy)	5,7 %	

G2/GF-Ratio des 1. Zellzyklus bei 1,5 Gy	0,199
AFP-Wert im Plasma	4,7 ng/ml (Normalbereich der Altersgruppe)

Zusammenfassend zeigten die Lymphozyten des Patienten eine unterdurchschnittliche Stimulierbarkeit, bezogen auf das Lebensalter. Die Zellen durchliefen insgesamt nur zwei bis drei vollständige Zellzyklen. Lymphozyten gesunder Kontrollen vergleichbaren Alters zeigen, bestrahlt und unbestrahlt, eine Zellzyklusverteilung über drei bis vier Zellzyklen nach 72 Stunden Kulturdauer mit höheren Anteilen von Zellen. Außerdem zeigte sich eine Blockierung der proliferierenden Zellen in der G2-Phase des ersten Zellzyklus nach Bestrahlung mit 1,5 Gy.

Das Verhältnis des Anteils der Zellen in der G2-Phase des ersten Zellzyklus nach Bestrahlung mit 1,5 Gy zum Anteil der proliferierenden Zellen (G2/GF-Ratio) ist ein Maß für Strahlensensitivität und liegt mit 0,199 im Bereich anderer Patienten mit Nijmegen Breakage Syndrom. Dieser Wert ist in Abbildung II/5b gegen den Prozentsatz nichtproliferierender Zellen (G0-G1-Phase) aufgetragen.

Die unterdurchschnittliche Mitogenantwort der Lymphozyten des Patienten, die erhöhte Strahlensensitivität nach Bestrahlung und der normale AFP-Wert stehen im Einklang mit der Verdachtsdiagnose Nijmegen Breakage Syndrom.

Die Diagnose NBS konnte durch Mutationsanalyse des NBS1-Gens bestätigt werden. Auf beiden Chromosomen wurde die 657del5 Mutation nachgewiesen.

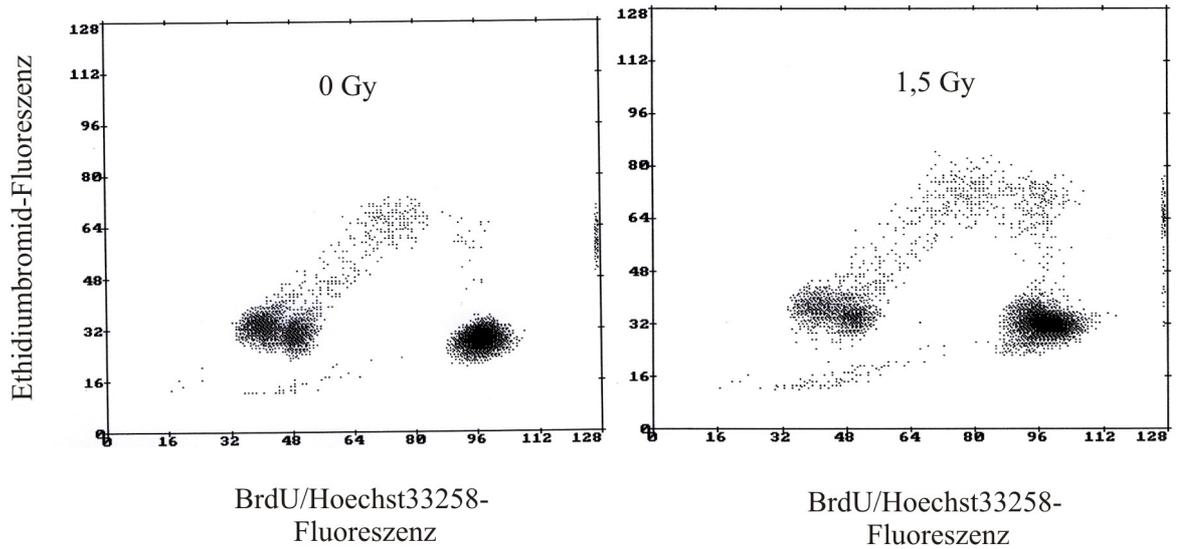


Abb. II/5a: der Zellzyklusanalyse zugrundeliegende Zytogramme

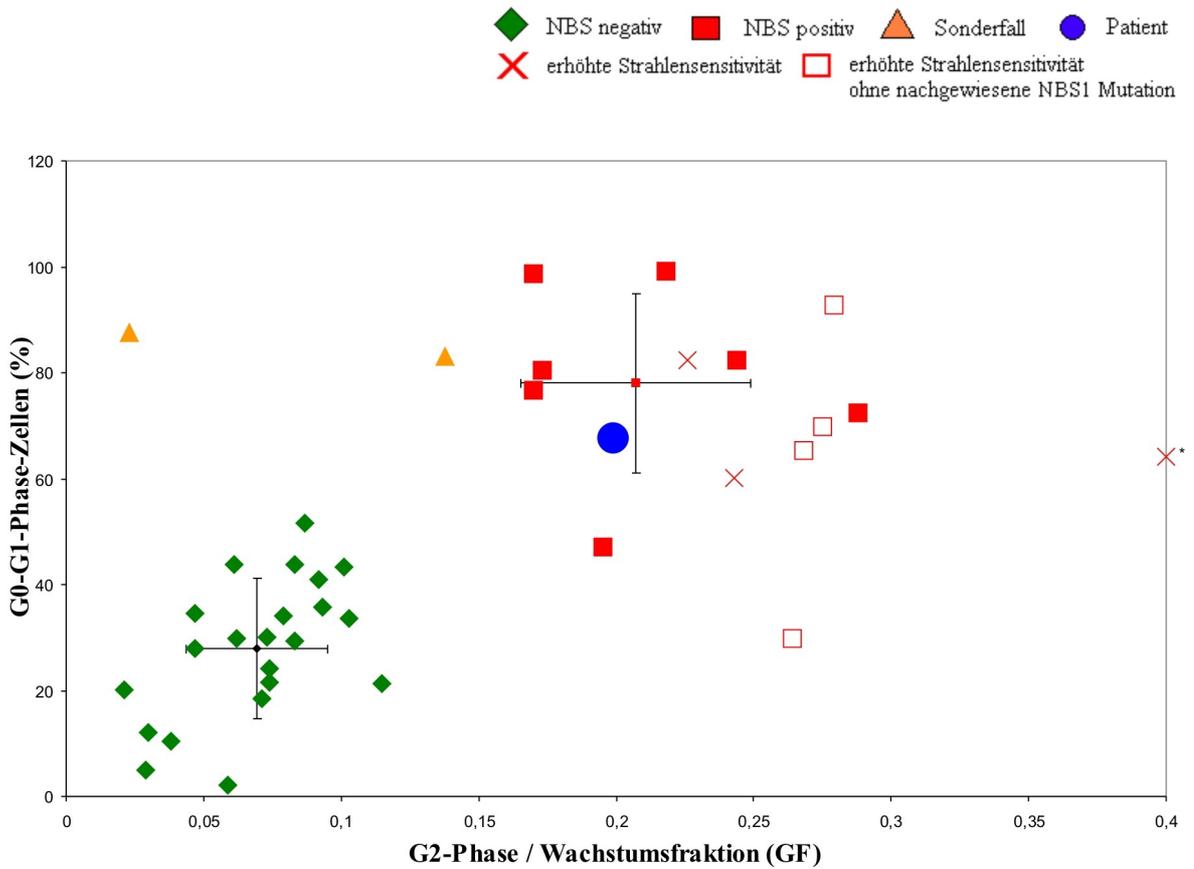


Abb. II/5b: Darstellung der Strahlensensitivität (G2/GF- Ratio) im Verhältnis zum Anteil nichtproliferierender Zellen (G0-G1-Phase) unter Bestrahlung mit 1,5 Gy (\* Datenpunkt 0,704 ; 64,2)

### Fall 6 (G-03-3293)

Bei diesem 16-jährigen Patienten stellte sich der Verdacht auf das Nijmegen Breakage Syndrom durch einen bestehenden Mikrozephalus und einen verminderten Immunglobulinspiegel. In einer humangenetischen Begutachtung ergab sich ein Chromosomensatz mit strukturellen Aberrationen in 36% aller untersuchten Metaphasen, wobei die Chromosomen 7 und 14 am häufigsten betroffen waren. Zur weiteren Abklärung wurde eine zellkinetische Untersuchung veranlasst, welche folgende Ergebnisse zeigte:

72 Stunden nach Kulturbeginn befanden sich bezogen auf die Ausgangspopulation

ohne Bestrahlung	97,5 %	im ursprünglichen G0-G1-Kompartiment
mit Bestrahlung (1,5 Gy)	98,8 %	
ohne Bestrahlung	0,0 %	im dritten Zellzyklus
mit Bestrahlung (1,5 Gy)	0,0 %	

G2/GF-Ratio des 1. Zellzyklus bei 1,5 Gy	0,171
AFP-Wert im Plasma	3,2 ng/ml (Normalbereich der Altersgruppe)

Zusammenfassend zeigten die Lymphozyten des Patienten eine stark unterdurchschnittliche Stimulierbarkeit, bezogen auf das Lebensalter. Die Zellen durchliefen insgesamt nur ein bis zwei vollständige Zellzyklen. Lymphozyten gesunder Kontrollen vergleichbaren Alters zeigen, bestrahlt und unbestrahlt, eine Zellzyklusverteilung über drei bis vier Zellzyklen nach 72 Stunden Kulturdauer.

Die G2/GF-Ratio ist ein Maß für Strahlensensitivität und liegt mit 0,171 im Bereich anderer Patienten mit Nijmegen Breakage Syndrom. Dieser Wert ist in Abbildung II/6b gegen den Prozentsatz nichtproliferierender Zellen (G0-G1-Phase) aufgetragen.

Die stark unterdurchschnittliche Mitogenantwort der Lymphozyten des Patienten, die erhöhte Strahlensensitivität nach Bestrahlung und der normale AFP-Wert stehen im Einklang mit der Verdachtsdiagnose Nijmegen Breakage Syndrom.

Die Diagnose NBS konnte später durch Mutationsanalyse des NBS1-Gens gesichert werden. Ein Immunoblot mit Nibrin-Antikörpern zeigte kein Nibrin-Protein und bei der Sequenzanalyse des Exon 6 des NBS1-Gens konnte die Deletion 657delACAAA im homozygoten Zustand nachgewiesen werden. Dabei handelt es sich um die häufigste NBS1-Mutation („Founder-“ Mutation).

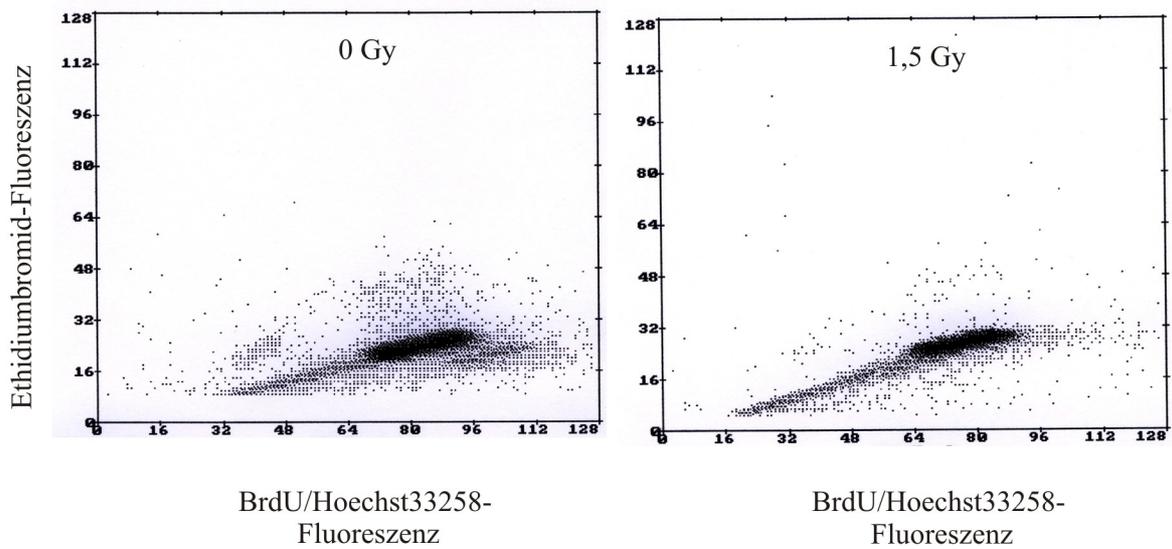


Abb. II/6a: der Zellzyklusanalyse zugrundeliegende Zytogramme

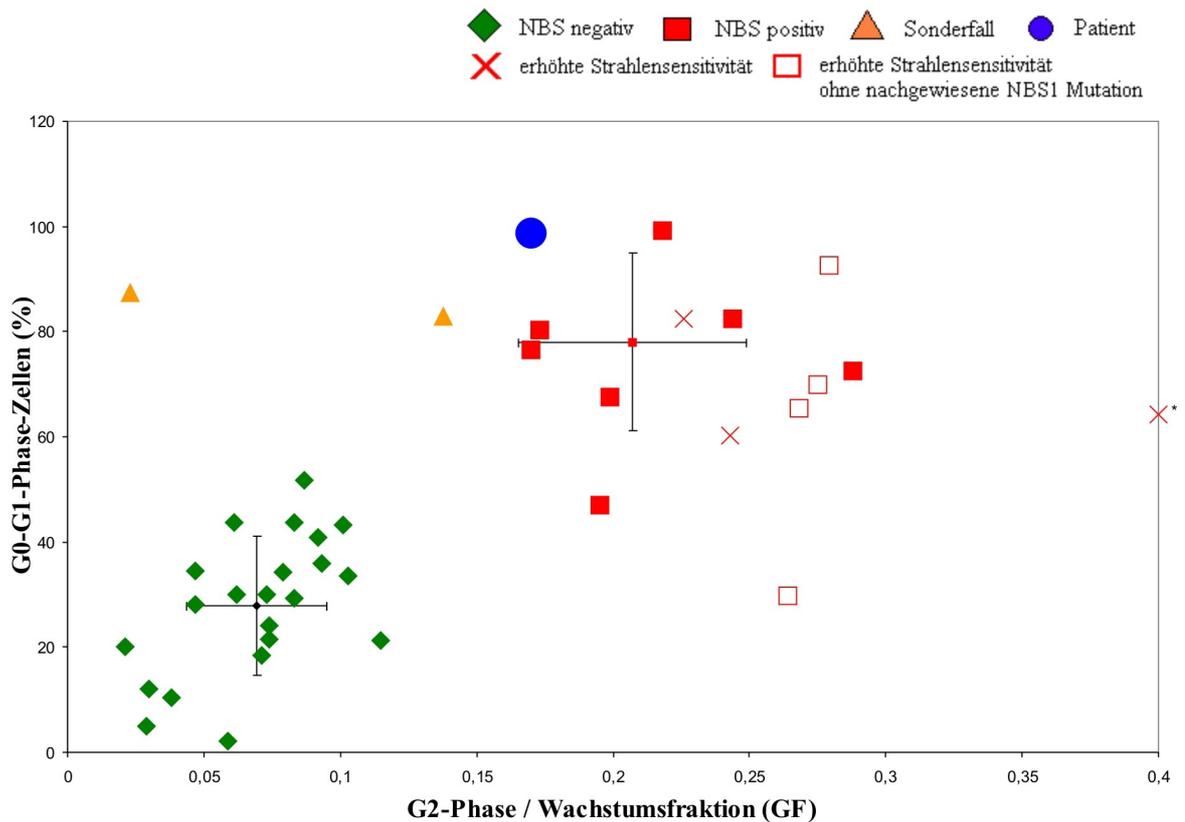


Abb. II/6b: Darstellung der Strahlensensitivität (G2/GF- Ratio) im Verhältnis zum Anteil nichtproliferierender Zellen (G0-G1-Phase) unter Bestrahlung mit 1,5 Gy (\* Datenpunkt 0,704 ; 64,2)

### Fall 7 (G-02-736)

Es handelt sich um einen 17-jährigen Patienten mit hochmalignem B-Zell-Lymphom und einer akuten lymphatischen Leukämie. Bereits kurz nach der Geburt wurde eine deutlich erhöhte spontane Chromosomenbrüchigkeit festgestellt und der Verdacht auf Ataxia teleangiectatica geäußert. Klinisch zeigt er derzeit aber weder Teleangiektasien, noch Ataxien.

Zur Klärung wurde eine zellkinetische Untersuchung durchgeführt, welche im Einzelnen folgende Ergebnisse ergab:

72 Stunden nach Kulturbeginn befanden sich bezogen auf die Ausgangspopulation

ohne Bestrahlung	97,6 %	im ursprünglichen G0-G1-Kompartiment
mit Bestrahlung (1,5 Gy)	99,1 %	
ohne Bestrahlung	0,1 %	im dritten Zellzyklus
mit Bestrahlung (1,5 Gy)	0,0 %	

G2/GF-Ratio des 1. Zellzyklus bei 1,5 Gy	0,218
AFP-Wert im Plasma	konnte nicht bestimmt werden

Zusammenfassend zeigten die Lymphozyten des Patienten eine stark unterdurchschnittliche Stimulierbarkeit, bezogen auf das Lebensalter. Die Zellen durchliefen nur zwei bis drei vollständige Zellzyklen und unter Bestrahlung sogar nur ein bis zwei vollständige Zellzyklen. Lymphozyten gesunder Kontrollen vergleichbaren Alters zeigen, bestrahlt und unbestrahlt, eine Zellzyklusverteilung über drei bis vier Zellzyklen nach 72 Stunden Kulturdauer mit weitaus höheren Anteilen von Zellen. Zusätzlich zeigte sich eine Blockierung der proliferierenden Zellen in der G2-Phase des ersten Zellzyklus nach Bestrahlung mit 1,5 Gy.

Das Verhältnis des Anteils der Zellen in der G2-Phase des ersten Zellzyklus nach Bestrahlung mit 1,5 Gy zum Anteil der proliferierenden Zellen (G2/GF-Ratio) ist ein Maß für Strahlensensitivität und liegt mit 0,218 im Bereich anderer Patienten mit Nijmegen Breakage Syndrom. Dieser Wert ist in Abbildung II/7b gegen den Prozentsatz nichtproliferierender Zellen (G0-G1-Phase) aufgetragen.

Die stark unterdurchschnittliche Mitogenantwort der Lymphozyten des Patienten und die erhöhte Strahlensensitivität nach Bestrahlung stehen im Einklang mit der Verdachtsdiagnose Nijmegen Breakage Syndrom.

Die Diagnose NBS konnte durch Mutationsanalyse des NBS1-Gens gesichert werden. Bei der Sequenzanalyse des Exon 6 des NBS1-Gens konnte die 657del5 Mutation im homozygoten

Zustand nachgewiesen werden. Dabei handelt es sich um die häufigste NBS1-Mutation, auch bezeichnet als „Founder-“ Mutation oder „slawische-“ Mutation.

In wie weit das stark verringerte Wachstum der Zellen möglicher Ausdruck der bestehenden akuten Leukämie ist, bleibt zu diskutieren.

Erstaunlich ist aber, dass sich die erhöhte Strahlensensitivität trotz des extrem verringerten Zellwachstums in der zellkinetischen Untersuchung zeigen ließ.

Der Patient verstarb leider unterdessen an den Folgen der akuten lymphatischen Leukämie.

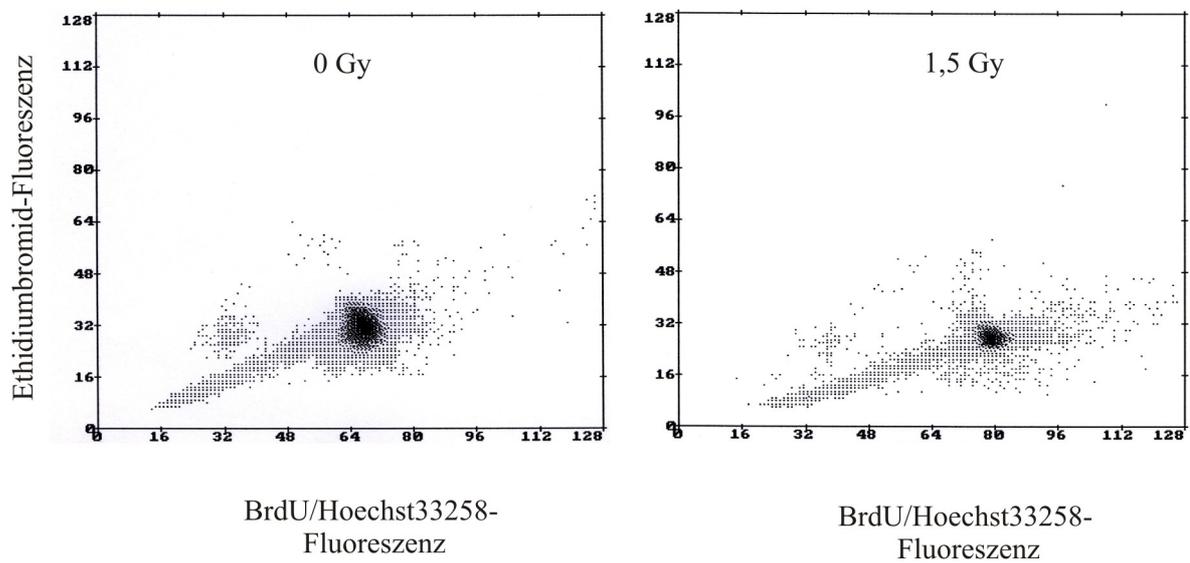


Abb. II/7a: der Zellzyklusanalyse zugrundeliegende Zytogramme

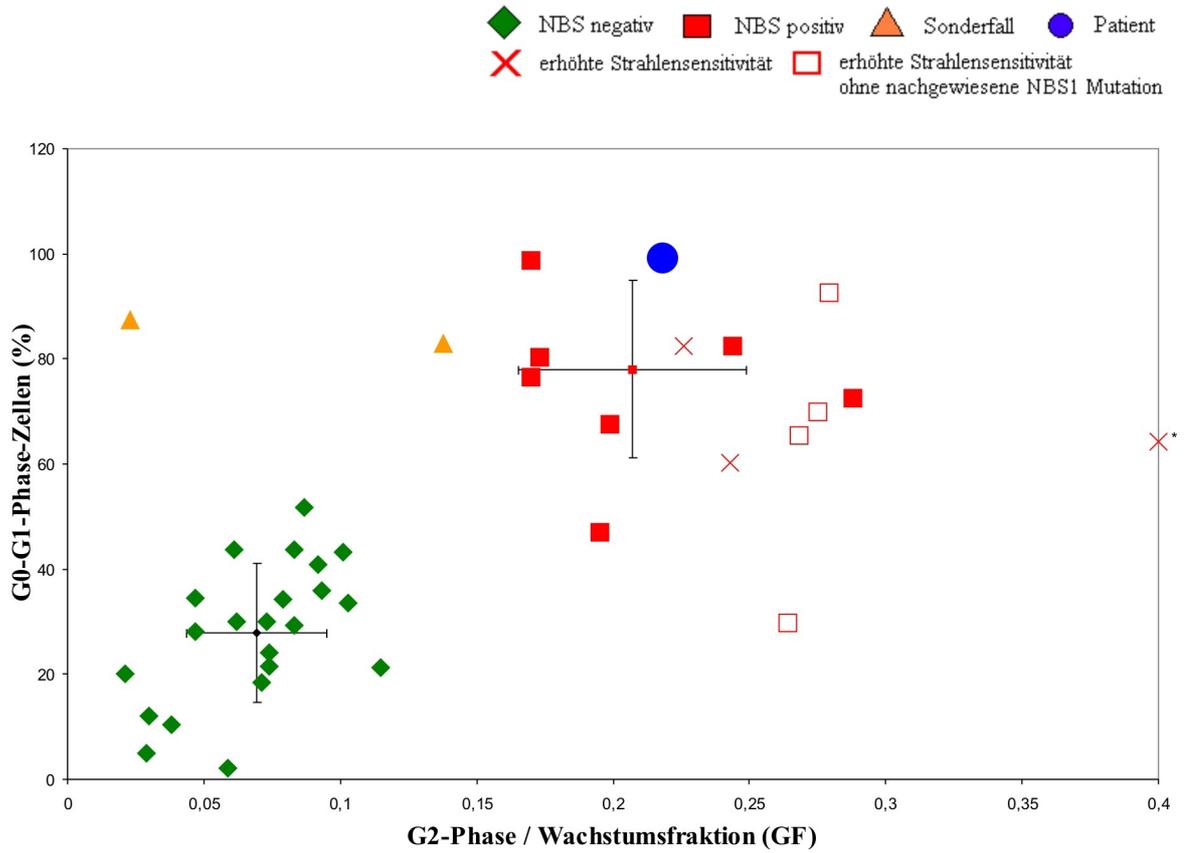


Abb. II/7b: Darstellung der Strahlensensitivität (G2/GF- Ratio) im Verhältnis zum Anteil nichtproliferierender Zellen (G0-G1-Phase) unter Bestrahlung mit 1,5 Gy (\* Datenpunkt 0,704 ; 64,2)

### Kategorie III (erhöhte Strahlensensitivität ohne nachgewiesene NBS1-Mutation)

#### Fall 8 (G-00-1997)

Die 2-jährige Patientin fiel klinisch durch eine Mikrosomie in allen Körpermaßen, erniedrigte IgA- und IgG-Level sowie Hautveränderungen in ekzematöser Form hauptsächlich im Gesichtsbereich auf. Weiterhin werden über einen Entwicklungsrückstand mit Retardierung und leichter neurologischer Symptomatik (Ataxien) berichtet. Neben den Verdachtsdiagnosen Ataxia teleangiectatica und Bloom Syndrom wurde auch der Verdacht auf ein Nijmegen Breakage Syndrom geäußert. Eine zytogenetische Chromosomenanalyse war allerdings unauffällig. Zur Abklärung wurde eine zellkinetische Untersuchung durchgeführt, welche im Einzelnen folgende Ergebnisse zeigt:

72 Stunden nach Kulturbeginn befanden sich bezogen auf die Ausgangspopulation

ohne Bestrahlung	9,8 %	im ursprünglichen G0-G1-Kompartiment
mit Bestrahlung (1,5 Gy)	29,8 %	
ohne Bestrahlung	17,0 %	im dritten Zellzyklus
mit Bestrahlung (1,5 Gy)	4,1 %	

G2/GF-Ratio des 1. Zellzyklus bei 1,5 Gy	0,264
AFP-Wert im Plasma	6,5 ng/ml (Normalbereich der Altersgruppe)

Zusammenfassend zeigten die Lymphozyten der Patientin eine normale Stimulierbarkeit, bezogen auf das Lebensalter. Die Zellen durchliefen allerdings insgesamt nur drei vollständige Zellzyklen. Lymphozyten gesunder Kontrollen vergleichbaren Alters zeigen, bestrahlt und unbestrahlt, eine Zellzyklusverteilung über drei bis vier Zellzyklen nach 72 Stunden Kulturdauer. Zusätzlich zeigte sich eine Blockierung der proliferierenden Zellen in der G2-Phase des ersten Zellzyklus nach Bestrahlung mit 1,5 Gy.

Das Verhältnis des Anteils der Zellen in der G2-Phase des ersten Zellzyklus nach Bestrahlung mit 1,5 Gy zum Anteil der proliferierenden Zellen (G2/GF-Ratio) ist ein Maß für Strahlensensitivität und liegt mit 0,264 im Bereich anderer Patienten mit Nijmegen Breakage Syndrom. Dieser Wert ist in Abbildung III/8b gegen den Prozentsatz nichtproliferierender Zellen (G0-G1-Phase) aufgetragen.

Die erhöhte Strahlensensitivität nach Bestrahlung und der normale AFP- Wert könnten im Einklang mit der Verdachtsdiagnose Nijmegen Breakage Syndrom stehen. Allerdings ist die altersbezogen normale Mitogenantwort der Lymphozyten eher untypisch für NBS-Patienten,

welche charakteristischerweise ein unterdurchschnittliches Zellwachstum zeigen. Gegen die Verdachtsdiagnose Ataxia teleangiectatica spricht das nicht ganz typische klinische Bild und der nicht erhöhte AFP-Wert im Plasma des Patienten, denn für Patienten mit klassischer AT sind über den Normalbereich erhöhte AFP-Werte charakteristisch.

In einer zum späteren Zeitpunkt durchgeführten Mutationsanalyse konnte jedoch keine NBS1-Mutation gefunden werden, was die Diagnose NBS ausschließt.

Ungeklärt bleibt also, ob möglicherweise ein anderer Gendefekt vorliegt, welcher die erhöhte Strahlensensitivität verursacht.

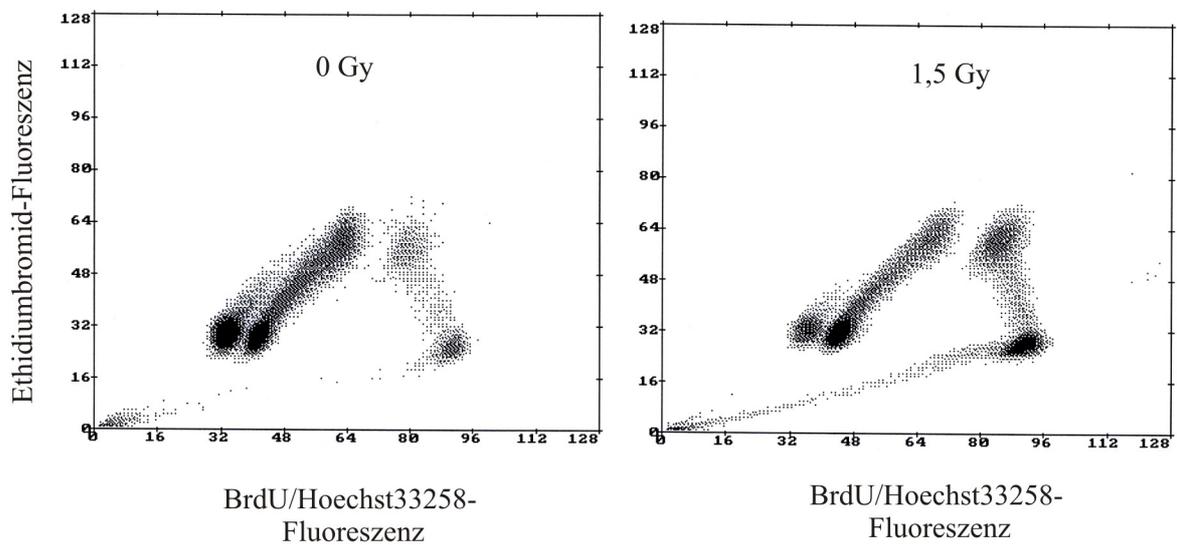


Abb. III/8a: der Zellzyklusanalyse zugrundeliegende Zytogramme

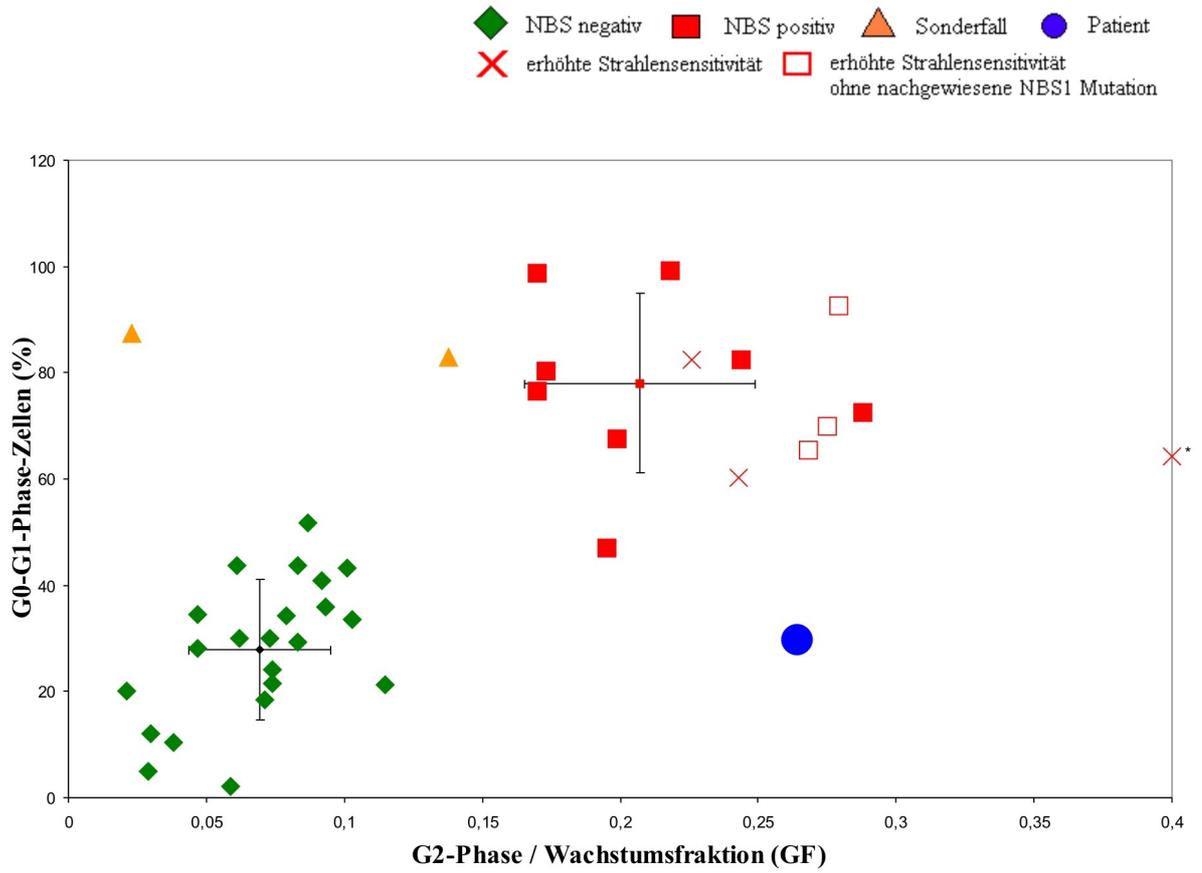


Abb. III/8b: Darstellung der Strahlensensitivität (G2/GF- Ratio) im Verhältnis zum Anteil nichtproliferierender Zellen (G0-G1-Phase) unter Bestrahlung mit 1,5 Gy  
 (\* Datenpunkt 0,704 ; 64,2)

### Fall 9 (G-00-1358)

Der 9-jährige Patient wurde mit folgendem klinischen Befund zur Zellzyklusanalyse vorgestellt: Immundefekt, Sino-broncho-pulmonales Syndrom, rezidivierende bakterielle und virale Pneumonien seit frühester Kindheit, IgA Mangel, eine monoklonale Gammopathie vom Typ IgG $\kappa$ , Lymphopenie und fehlenden Polysaccharid- und HiB-Antikörpern. Weiterhin fallen eine chronische Gonarthrit rechts und ein großer „Rheumaknoten“ auf dem Nasenrücken auf. Es bestehen keine Ataxien, keine Mikrozephalie und bis jetzt eine normale intellektuelle Entwicklung. Die Größe des Patienten liegt auf der 10. Perzentile. Die zellkinetische Untersuchung ergab im Einzelnen folgende Befunde:

72 Stunden nach Kulturbeginn befanden sich bezogen auf die Ausgangspopulation

ohne Bestrahlung	75,5 %	im ursprünglichen G0-G1-Kompartiment
mit Bestrahlung (1,5 Gy)	82,9 %	
ohne Bestrahlung	6,6 %	im dritten Zellzyklus
mit Bestrahlung (1,5 Gy)	2,2 %	

G2/GF-Ratio des 1. Zellzyklus bei 1,5 Gy	0,167
AFP-Wert im Plasma	1,8 ng/ml (Normalbereich der Altersgruppe)

Zusammenfassend zeigten die Lymphozyten des Patienten eine unterdurchschnittliche Stimulierbarkeit, bezogen auf das Lebensalter. Die Zellen durchliefen insgesamt nur drei vollständige Zellzyklen. Lymphozyten gesunder Kontrollen vergleichbaren Alters zeigen, bestrahlt und unbestrahlt, eine Zellzyklusverteilung über drei bis vier Zellzyklen nach 72 Stunden Kulturdauer mit höheren Anteilen von Zellen.

Die G2/GF-Ratio ist ein Maß für Strahlensensitivität und liegt mit 0,167 im unteren Bereich anderer Patienten mit Nijmegen Breakage Syndrom.

Die unterdurchschnittliche Mitogenantwort der Lymphozyten des Patienten, die grenzwertig erhöhte Strahlensensitivität (leicht erhöhte G2/GF-Ratio) nach Bestrahlung und der normale AFP-Wert könnten vereinbar sein mit der Verdachtsdiagnose Nijmegen Breakage Syndrom. Auf Grund des unklaren Ergebnisses wurde im Alter von 11 Jahren eine erneute zellkinetische Untersuchung durchgeführt:

72 Stunden nach Kulturbeginn befanden sich bezogen auf die Ausgangspopulation

ohne Bestrahlung	34,8 %	im ursprünglichen G0-G1-Kompartiment
mit Bestrahlung (1,5 Gy)	69,9 %	
ohne Bestrahlung	26,1 %	im dritten Zellzyklus
mit Bestrahlung (1,5 Gy)	1,2 %	

G2/GF-Ratio des 1. Zellzyklus bei 1,5 Gy	0,275
AFP-Wert im Plasma	1,8 ng/ml (Normalbereich der Altersgruppe)

Zusammenfassend zeigten die Lymphozyten des Patienten hier wieder eine unterdurchschnittliche Stimulierbarkeit. Die Zellen durchliefen insgesamt wieder nur drei vollständige Zellzyklen.

Die G2/GF-Ratio lag diesmal mit 0,275 im Bereich anderer Patienten mit Nijmegen Breakage Syndrom. Dieser Wert ist in Abbildung III/9b gegen den Prozentsatz nichtproliferierender Zellen (G0-G1-Phase) aufgetragen.

Die unterdurchschnittliche Mitogenantwort der Lymphozyten des Patienten, die erhöhte Strahlensensitivität nach Bestrahlung und der normale AFP-Wert könnten daher im Einklang mit der Verdachtsdiagnose Nijmegen Breakage Syndrom stehen.

In einem zusätzlich durchgeführten Comet-Assay mit unstimulierten Lymphozyten zeigte sich allerdings kein Unterschied zu gesunden Kontrollen in Bezug auf die Strahlenempfindlichkeit. Zu diesen Ergebnissen könnten technische Faktoren beigetragen haben, beispielsweise zu geringe Zellzahl bzw. Bestrahlung mit nur einer Dosis. Zusätzlich kam es bei der Bearbeitung der Probe kaum zur Auftrennung beim Dichte-Gradienten und im Lymphozyten-Ring fanden sich viele Erythrozyten. Allerdings ist belegt, dass unterschiedliche Radiosensitivitätstests verschiedene Ergebnisse erbringen können, gerade im Bereich geringer Strahlenempfindlichkeit, wenn sie unterschiedliche Teilaspekte untersuchen. Eine eindeutige Beurteilung der Ergebnisse ist in diesem Fall also nicht ohne weiteres möglich.

In einer zum späteren Zeitpunkt durchgeführten Mutationsanalyse konnte keine NBS1-Mutation gefunden werden. Ein Immunoblot mit Nibrin-Antikörpern zeigte normale Nibrin-Banden. Diese Ergebnisse schließen das Nijmegen Breakage Syndrom aus.

Ob möglicherweise ein anderer Gendefekt zugrunde liegt, welcher das Krankheitsbild und die erhöhte Strahlensensitivität verursacht, bleibt zu prüfen.

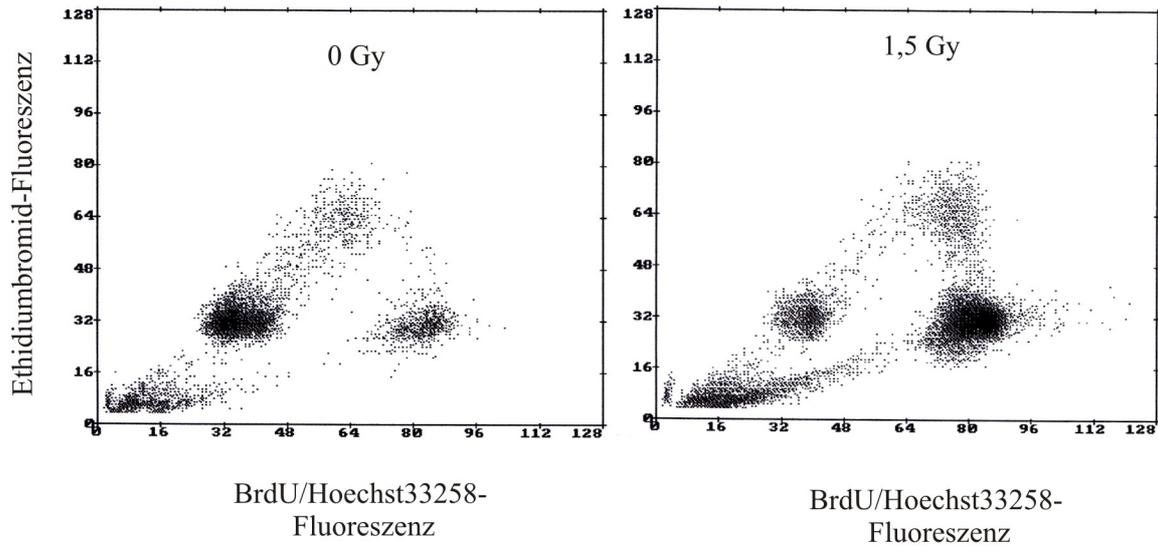


Abb. III/9a: der Zellzyklusanalyse zugrundeliegende Zytogramme

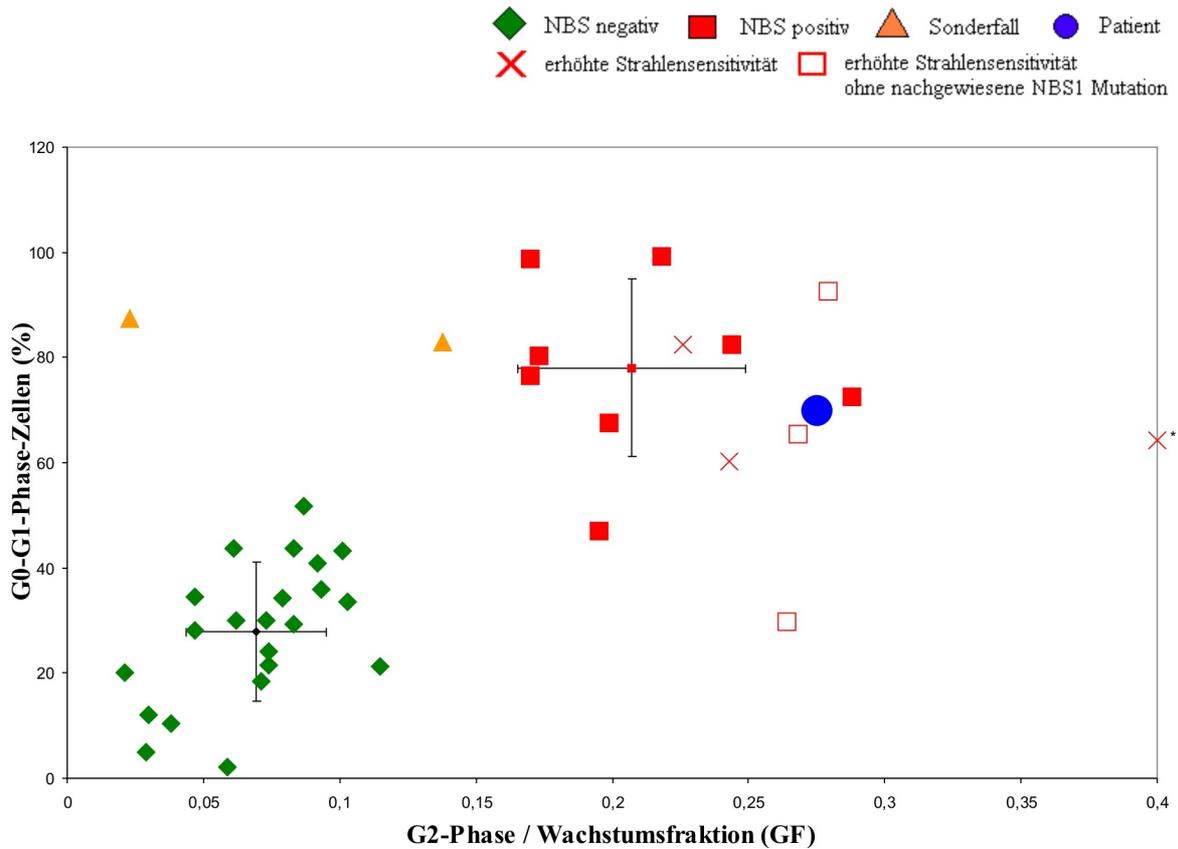


Abb. III/9b: Darstellung der Strahlensensitivität (G2/GF- Ratio) im Verhältnis zum Anteil nichtproliferierender Zellen (G0-G1-Phase) unter Bestrahlung mit 1,5 Gy (\* Datenpunkt 0,704 ; 64,2)

### Fall 10 (F-99-108-0/1)

Es handelt sich um eine 3-jährige Patientin mit kombiniertem Immundefekt und bereits disseminiertem Lymphom bei Verdacht auf Nijmegen Breakage Syndrom. Eine durchgeführte zellkinetische Untersuchung zeigte im Einzelnen folgende Ergebnisse:

72 Stunden nach Kulturbeginn befanden sich bezogen auf die Ausgangspopulation

ohne Bestrahlung	50,8 %	im ursprünglichen G0-G1-Kompartiment
mit Bestrahlung (1,5 Gy)	65,4 %	
ohne Bestrahlung	1,7 %	im dritten Zellzyklus
mit Bestrahlung (1,5 Gy)	0,6 %	

G2/GF-Ratio des 1. Zellzyklus bei 1,5 Gy	0,268
AFP-Wert im Plasma	3,1 ng/ml (Normalbereich der Altersgruppe)

Zusammenfassend zeigten die Lymphozyten der Patientin eine unterdurchschnittliche Stimulierbarkeit, bezogen auf das Lebensalter. Die Zellen durchliefen insgesamt nur drei vollständige Zellzyklen. Lymphozyten gesunder Kontrollen vergleichbaren Alters zeigen, bestrahlt und unbestrahlt, eine Zellzyklusverteilung über drei bis vier Zellzyklen nach 72 Stunden Kulturdauer mit höheren Anteilen von Zellen. Außerdem zeigte sich eine Blockierung der proliferierenden Zellen in der G2-Phase des ersten Zellzyklus nach Bestrahlung mit 1,5 Gy.

Das Verhältnis des Anteils der Zellen in der G2-Phase des ersten Zellzyklus nach Bestrahlung mit 1,5 Gy zum Anteil der proliferierenden Zellen (G2/GF-Ratio) ist ein Maß für Strahlensensitivität und liegt mit 0,268 im Bereich anderer Patienten mit Nijmegen Breakage Syndrom. Dieser Wert ist in Abbildung III/10b gegen den Prozentsatz nichtproliferierender Zellen (G0-G1-Phase) aufgetragen.

Die unterdurchschnittliche Mitogenantwort der Lymphozyten der Patientin, die erhöhte Strahlensensitivität nach Bestrahlung und der normale AFP-Wert könnten im Einklang mit der Verdachtsdiagnose Nijmegen Breakage Syndrom stehen.

Im Alter von 4 Jahren wurde zur Prüfung der Radiosensibilität eine zytogenetische Untersuchung durchgeführt. Diese ergab allerdings keinen Hinweis auf eine erhöhte spontane Chromosomeninstabilität. Lediglich gegenüber ionisierender Strahlung zeigte sich eine

moderate in vitro Hypersensibilität, wobei die Werte deutlich unter den historischen Positivkontrollen lagen. Die Verdachtsdiagnose NBS konnte also nicht bestätigt werden. Allerdings können mit der zytogenetischen Untersuchung nichtchromosomale Veränderungen nicht festgestellt und schwache chromosomale Mosaik sowie strukturelle Aberrationen nicht ausgeschlossen werden. Außerdem ist belegt, dass unterschiedliche Radiosensitivitätstests verschiedene Ergebnisse gerade im Bereich geringer Strahlenempfindlichkeit erbringen können, wenn sie unterschiedliche Teilaspekte untersuchen.

In einer zum späteren Zeitpunkt durchgeführten Mutationsanalyse konnte jedoch keine NBS1-Mutation gefunden werden, was die Diagnose NBS ausschließt. Auch das dem Nijmegen Breakage Syndrom sehr ähnliche Ligase-IV-Mangel-Syndrom konnte durch die Mutationsanalyse des *LIG4*-Gens ausgeschlossen werden.

Auch in diesem Fall bleibt demnach weiterhin fraglich welcher Gendefekt die erhöhte Strahlensensitivität und das Krankheitsbild verursacht.

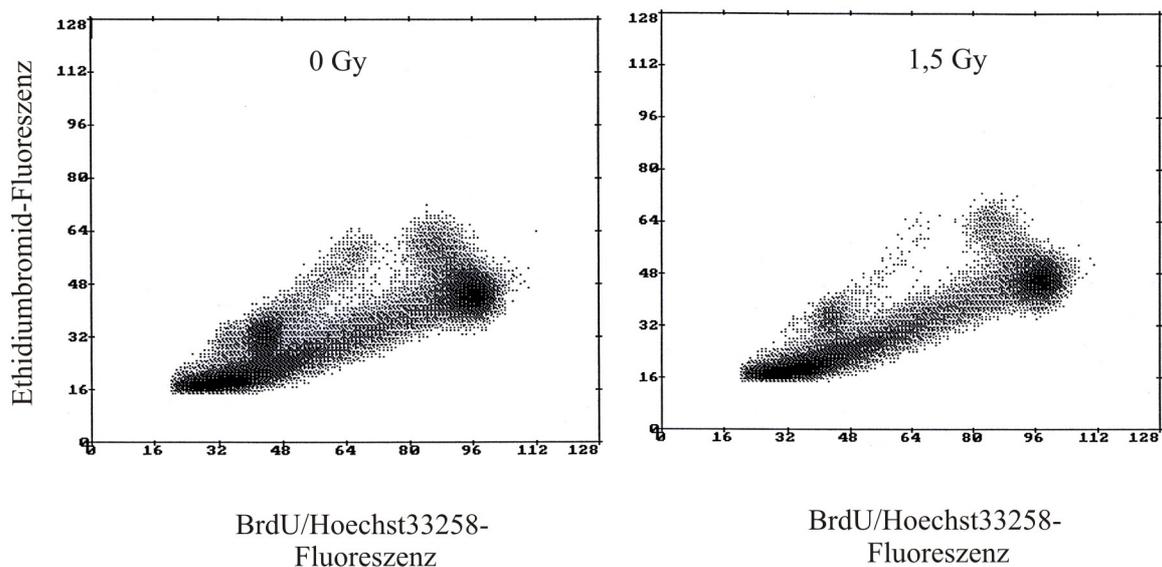


Abb. III/10a: der Zellzyklusanalyse zugrundeliegende Zytogramme

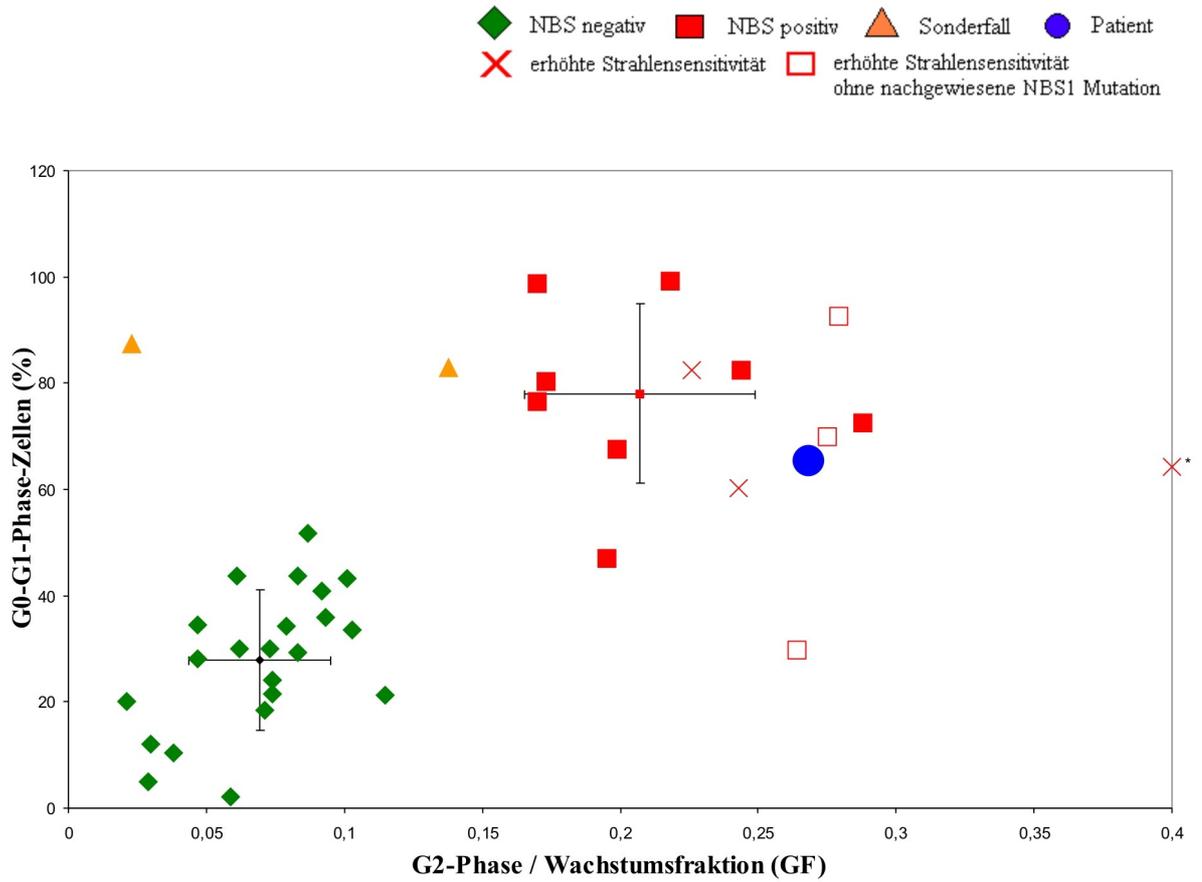


Abb. III/10b: Darstellung der Strahlensensitivität (G2/GF- Ratio) im Verhältnis zum Anteil nichtproliferierender Zellen (G0-G1-Phase) unter Bestrahlung mit 1,5 Gy (\* Datenpunkt 0,704 ; 64,2)

### Fall 11 (G-02-1692)

Bei dem 12-jährigen Patienten mit Verdacht auf Nijmegen Breakage Syndrom fallen klinisch ein Mikrozephalus, ein Immundefekt mit Lymphopenie (insbesondere erniedrigten CD4+ Zellen), rezidivierende Infektionen der Luftwege seit frühester Kindheit mit herabgesetzter Lungenfunktion, häufige Diarrhoen sowie Gedeihstörungen auf. Weiterhin wird über einen erhöhten Muskeltonus und eine fixierte Flexion in den Knien berichtet. Die Eltern des Patienten sind konsanguin. Zur Abklärung wurde daher eine zellkinetische Untersuchung durchgeführt, welche im Einzelnen folgende Ergebnisse ergab:

72 Stunden nach Kulturbeginn befanden sich bezogen auf die Ausgangspopulation

ohne Bestrahlung	88,7 %	im ursprünglichen G0-G1-Kompartiment
mit Bestrahlung (1,5 Gy)	91,6 %	
ohne Bestrahlung	2,9 %	im dritten Zellzyklus
mit Bestrahlung (1,5 Gy)	0,3 %	

G2/GF-Ratio des 1. Zellzyklus bei 1,5 Gy	0,136
AFP-Wert im Plasma	2,5 ng/ml (Normalbereich der Altersgruppe)

Zusammenfassend zeigten die Lymphozyten des Patienten eine unterdurchschnittliche Stimulierbarkeit, bezogen auf das Lebensalter. Die Zellen durchliefen insgesamt nur drei vollständige Zellzyklen. Lymphozyten gesunder Kontrollen vergleichbaren Alters zeigen, bestrahlt und unbestrahlt, eine Zellzyklusverteilung über drei bis vier Zellzyklen nach 72 Stunden Kulturdauer mit höheren Anteilen von Zellen. Es zeigte sich außerdem eine Blockierung der proliferierenden Zellen in der G2-Phase des ersten Zellzyklus nach Bestrahlung mit 1,5 Gy.

Das Verhältnis des Anteils der Zellen in der G2-Phase des ersten Zellzyklus nach Bestrahlung mit 1,5 Gy zum Anteil der proliferierenden Zellen (G2/GF-Ratio) ist ein Maß für Strahlensensitivität und liegt mit 0,136 noch im oberen Normalbereich.

Die unterdurchschnittliche Mitogenantwort der Lymphozyten des Patienten und der normale AFP-Wert stehen zusammen mit dem relativ typischen klinischen Bild im Einklang mit der Verdachtsdiagnose Nijmegen Breakage Syndrom. Eine erhöhte Strahlensensitivität, die charakteristisch für Zellen von NBS-Patienten wäre, konnte allerdings nicht eindeutig gezeigt werden.

Deshalb wurde eine erneute zellkinetische Untersuchung durchgeführt:

72 Stunden nach Kulturbeginn befanden sich bezogen auf die Ausgangspopulation

Ohne Bestrahlung	88,9 %	im ursprünglichen G0-G1-Kompartiment
mit Bestrahlung (1,5 Gy)	92,7 %	
Ohne Bestrahlung	1,6 %	im dritten Zellzyklus
mit Bestrahlung (1,5 Gy)	1,5 %	

G2/GF-Ratio des 1. Zellzyklus bei 1,5 Gy	0,243
AFP-Wert im Plasma	< 4 ng/ml (Normalbereich der Altersgruppe)

Zusammenfassend zeigten die Lymphozyten des Patienten wiederum eine unterdurchschnittliche Stimulierbarkeit. Die Zellen durchliefen insgesamt wieder nur drei vollständige Zellzyklen. Es zeigte sich ebenfalls wieder eine Blockierung der proliferierenden Zellen in der G2-Phase des ersten Zellzyklus nach Bestrahlung mit 1,5 Gy.

Die G2/GF-Ratio lag diesmal mit 0,243 im Bereich anderer Patienten mit Nijmegen Breakage Syndrom. Dieser Wert ist in Abbildung III/11b gegen den Prozentsatz nichtproliferierender Zellen (G0-G1-Phase) aufgetragen.

Die unterdurchschnittliche Mitogenantwort der Lymphozyten des Patienten, die erhöhte Strahlensensitivität nach Bestrahlung und der normale AFP-Wert könnten daher im Einklang mit der Verdachtsdiagnose Nijmegen Breakage Syndrom stehen.

In einer zum späteren Zeitpunkt durchgeführten Mutationsanalyse konnte jedoch bei der Sequenzanalyse der Exons 6-10 des NBS1-Gens keine Mutation gefunden werden. Ein Immunoblot mit Nibrin-Antikörpern zeigte normale Nibrin-Banden. Dies schließt die Diagnose NBS aus.

Fraglich bleibt also, ob hier möglicherweise ein anderer Gendefekt zugrunde liegt.

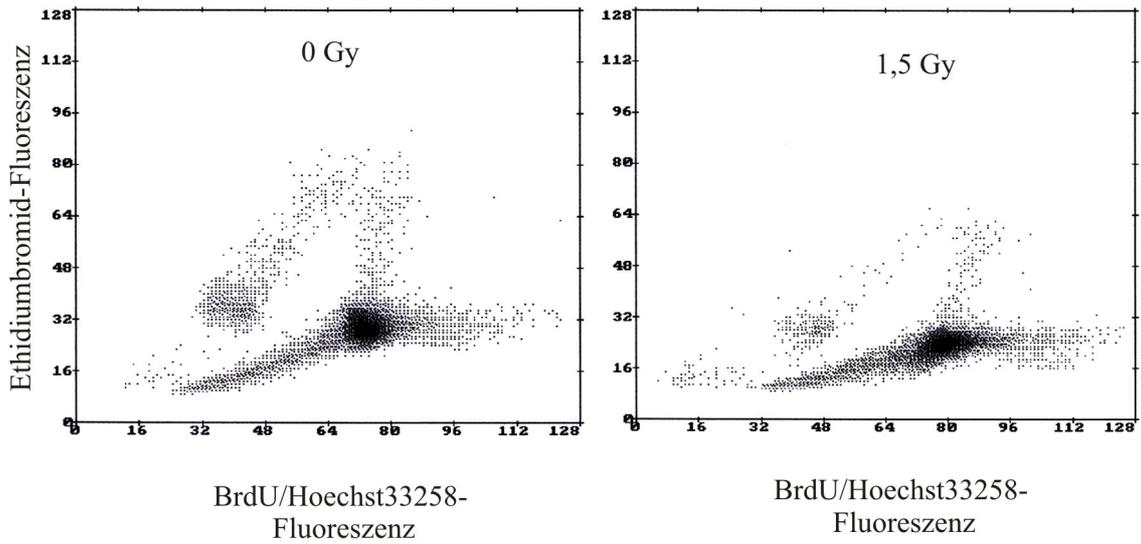


Abb. III/11a: der Zellzyklusanalyse zugrundeliegende Zytogramme

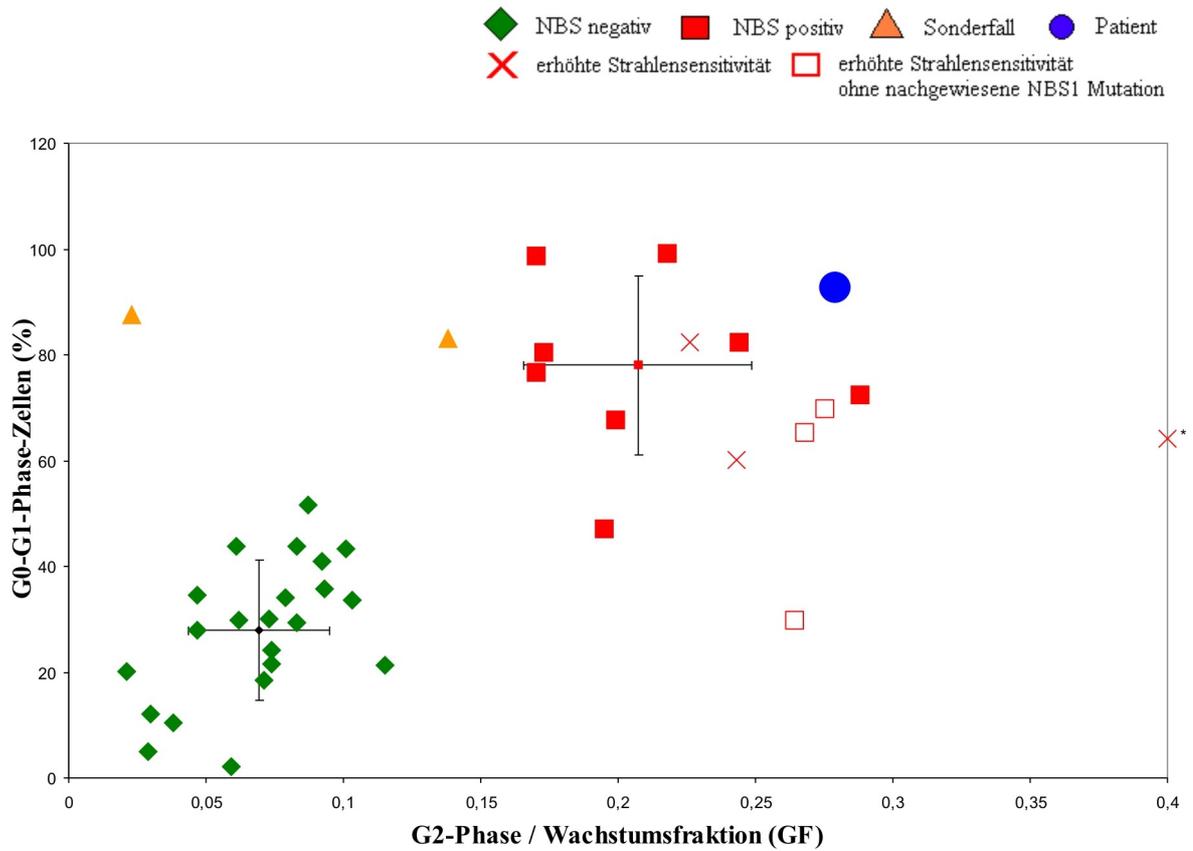


Abb. III/11b: Darstellung der Strahlensensitivität ( $G2/GF$ - Ratio) im Verhältnis zum Anteil nichtproliferierender Zellen ( $G0-G1$ -Phase) unter Bestrahlung mit 1,5 Gy (\* Datenpunkt 0,704 ; 64,2)

### Kategorie IV (erhöhte Strahlensensitivität)

#### **Fall 12 (F-89-0031-01)**

Der 8-jährige Patient fiel klinisch durch eine Mikrozephalie auf. Da alle Geschwister des Patienten ebenfalls betroffen waren, stellte sich der Verdacht auf das Nijmegen Breakage Syndrom. Die durchgeführte zellkinetische Untersuchung ergab folgende Befunde:

72 Stunden nach Kulturbeginn befanden sich bezogen auf die Ausgangspopulation

ohne Bestrahlung	78,2 %	im ursprünglichen G0-G1-Kompartiment
mit Bestrahlung (1,5 Gy)	82,4 %	
ohne Bestrahlung	1,3 %	im dritten Zellzyklus
mit Bestrahlung (1,5 Gy)	0,3 %	

G2/GF-Ratio des 1. Zellzyklus bei 1,5 Gy	0,226
AFP-Wert im Plasma	< 4 ng/ml (Normalbereich der Altersgruppe)

Zusammenfassend zeigten die Lymphozyten des Patienten eine unterdurchschnittliche Stimulierbarkeit, bezogen auf das Lebensalter. Die Zellen durchliefen insgesamt nur zwei bis drei vollständige Zellzyklen. Lymphozyten gesunder Kontrollen vergleichbaren Alters zeigen, bestrahlt und unbestrahlt, eine Zellzyklusverteilung über drei bis vier Zellzyklen mit höheren Anteilen von Zellen. Außerdem zeigte sich eine Blockierung der proliferierenden Zellen in der G2-Phase des ersten Zellzyklus nach Bestrahlung mit 1,5 Gy.

Die G2/GF-Ratio ist ein Maß für Strahlensensitivität und liegt mit 0,226 im Bereich anderer Patienten mit Nijmegen Breakage Syndrom. Dieser Wert ist in Abbildung IV/12b gegen den Prozentsatz nichtproliferierender Zellen (G0-G1-Phase) aufgetragen.

Die unterdurchschnittliche Mitogenantwort der Lymphozyten des Patienten, die erhöhte Strahlensensitivität nach Bestrahlung und der normale AFP-Wert könnte im Einklang mit der Verdachtsdiagnose Nijmegen Breakage Syndrom stehen.

Bei dem Patienten wurde allerdings keine Mutationsanalyse durchgeführt, so dass sich die Diagnose NBS nicht endgültig bestätigen lässt. Obwohl die Klinik typisch für das Nijmegen Breakage Syndrom ist, können andere Gendefekte, welche zu erhöhter Strahlensensitivität führen, letztlich nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden.

Der Patient verstarb im Alter von 10 Jahren an einem generalisierten Lymphom.

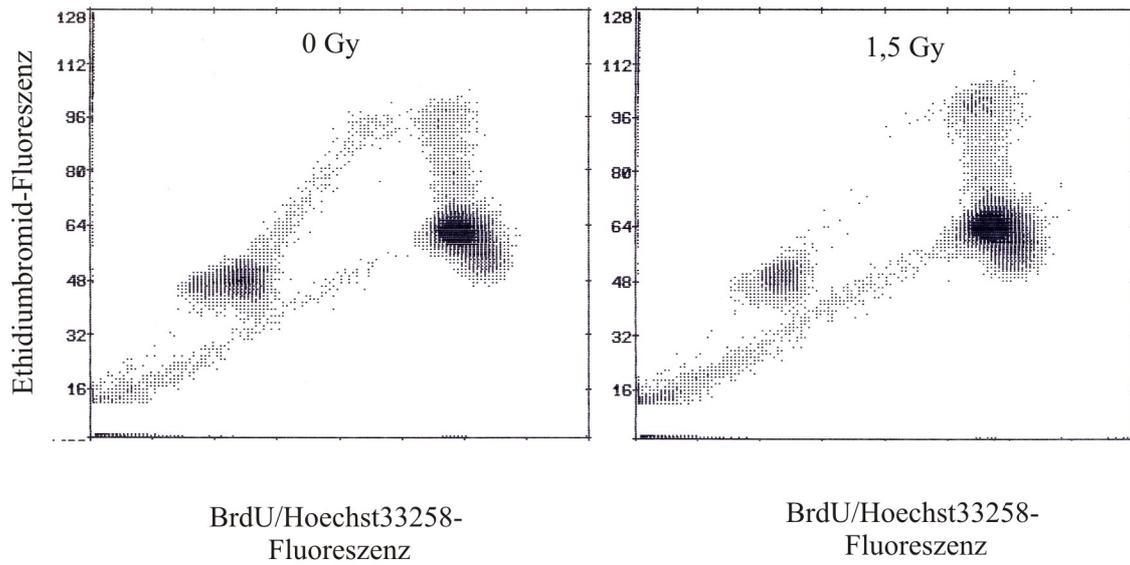


Abb. IV/12a: der Zellzyklusanalyse zugrundeliegende Zytogramme

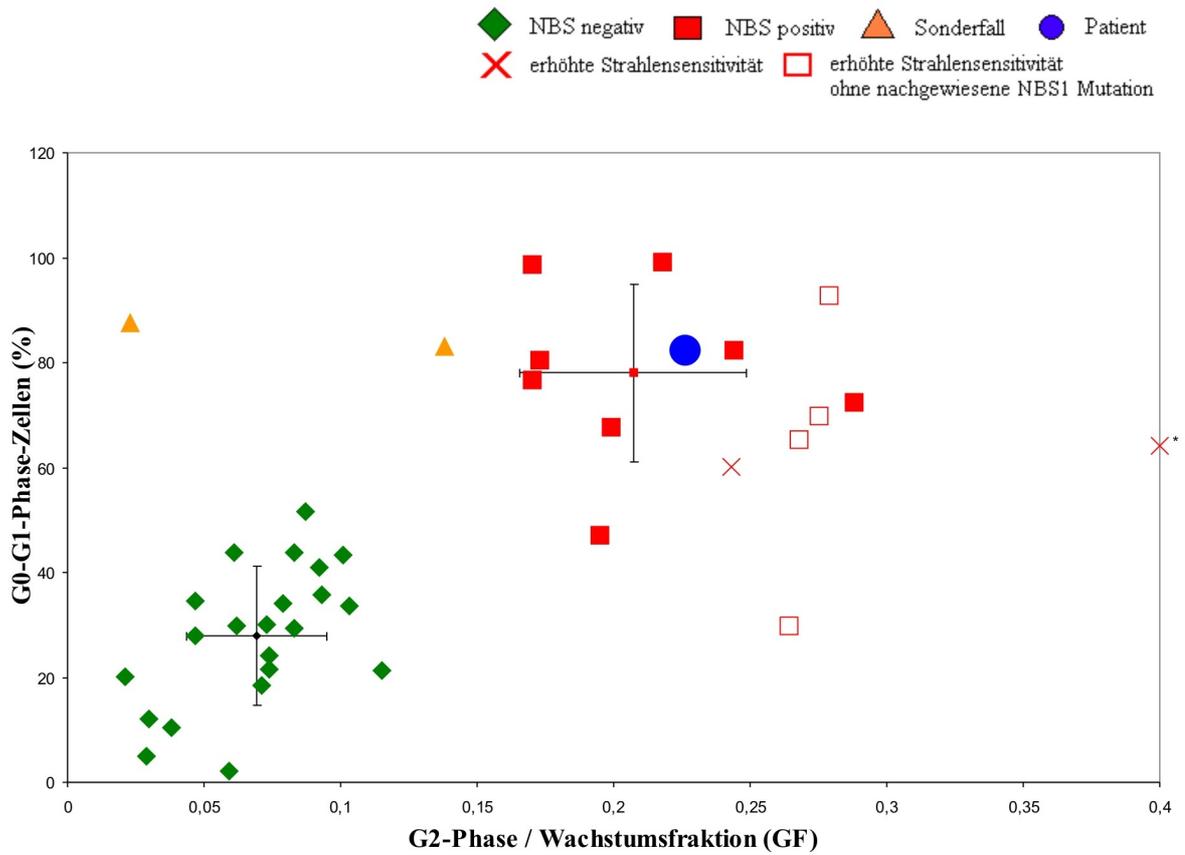


Abb. IV/12b: Darstellung der Strahlensensitivität (G2/GF- Ratio) im Verhältnis zum Anteil nichtproliferierender Zellen (G0-G1-Phase) unter Bestrahlung mit 1,5 Gy (\* Datenpunkt 0,704 ; 64,2)

### Fall 13 (F-89-0065-01)

Diese 9-jährige Patientin fiel klinisch durch einen Mikrozephalus und eine Immundefizienz auf. Der Vater der Patientin stammt aus einer Familie mit erhöhter Inzidenz für Malignome. Zur weiteren Diagnostik wurde eine zellkinetische Untersuchung durchgeführt, welche im Einzelnen folgende Ergebnisse ergab:

72 Stunden nach Kulturbeginn befanden sich bezogen auf die Ausgangspopulation

ohne Bestrahlung	63,9 %	im ursprünglichen G0-G1-Kompartiment
mit Bestrahlung (1,5 Gy)	60,2 %	
ohne Bestrahlung	7,3 %	im dritten Zellzyklus
mit Bestrahlung (1,5 Gy)	6,6 %	

G2/GF-Ratio des 1. Zellzyklus bei 1,5 Gy	0,243
AFP-Wert im Plasma	< 4 ng/ml (Normalbereich der Altersgruppe)

Zusammenfassend zeigten die Lymphozyten des Patienten eine stark unterdurchschnittliche Stimulierbarkeit, bezogen auf das Lebensalter. Lymphozyten gesunder Kontrollen vergleichbaren Alters zeigen, bestrahlt und unbestrahlt, eine Zellzyklusverteilung über drei bis vier Zellzyklen nach 72 Stunden Kulturdauer mit höheren Anteilen von Zellen. Zusätzlich zeigte sich eine Blockierung der proliferierenden Zellen in der G2-Phase des ersten Zellzyklus nach Bestrahlung mit 1,5 Gy.

Die G2/GF-Ratio ist ein Maß für Strahlensensitivität und liegt mit 0,243 im Bereich anderer Patienten mit Nijmegen Breakage Syndrom. Dieser Wert ist in Abbildung IV/13b gegen den Prozentsatz nichtproliferierender Zellen (G0-G1-Phase) aufgetragen.

Die unterdurchschnittliche Mitogenantwort der Lymphozyten des Patienten, die erhöhte Strahlensensitivität nach Bestrahlung und der normale AFP-Wert könnten die Verdachtsdiagnose Nijmegen Breakage Syndrom bestätigen.

Eine Mutationsanalyse wurde bei der Patientin leider nicht durchgeführt, so dass sich die Verdachtsdiagnose NBS nicht endgültig bestätigen lässt. Anderer Gendefekte, welche ebenfalls zu erhöhter Strahlensensitivität führen, können auch hier nicht mit völliger Sicherheit ausgeschlossen werden.

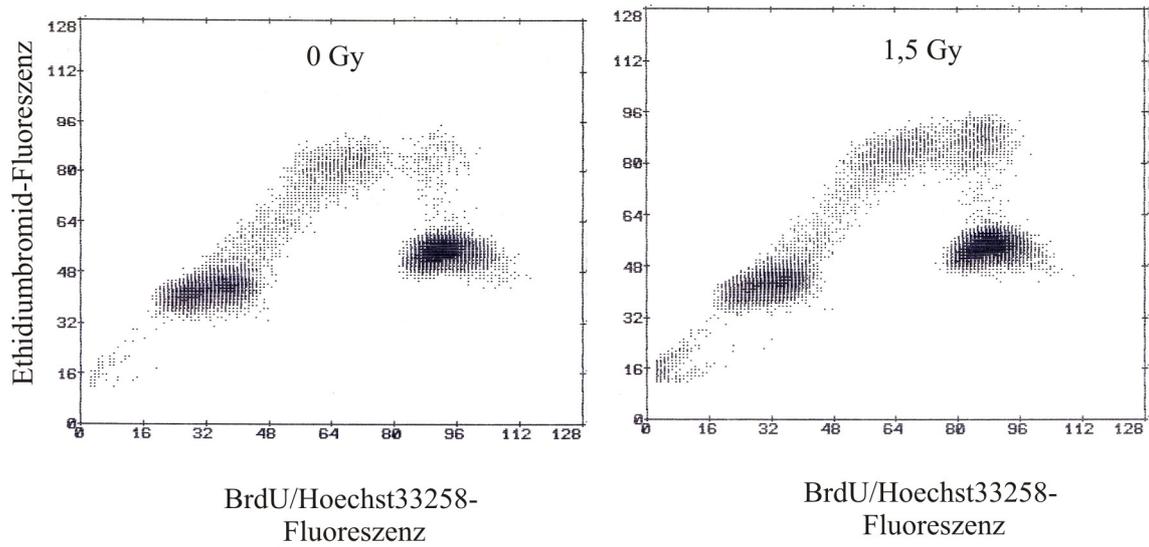


Abb. IV/13a: der Zellzyklusanalyse zugrundeliegende Zytogramme

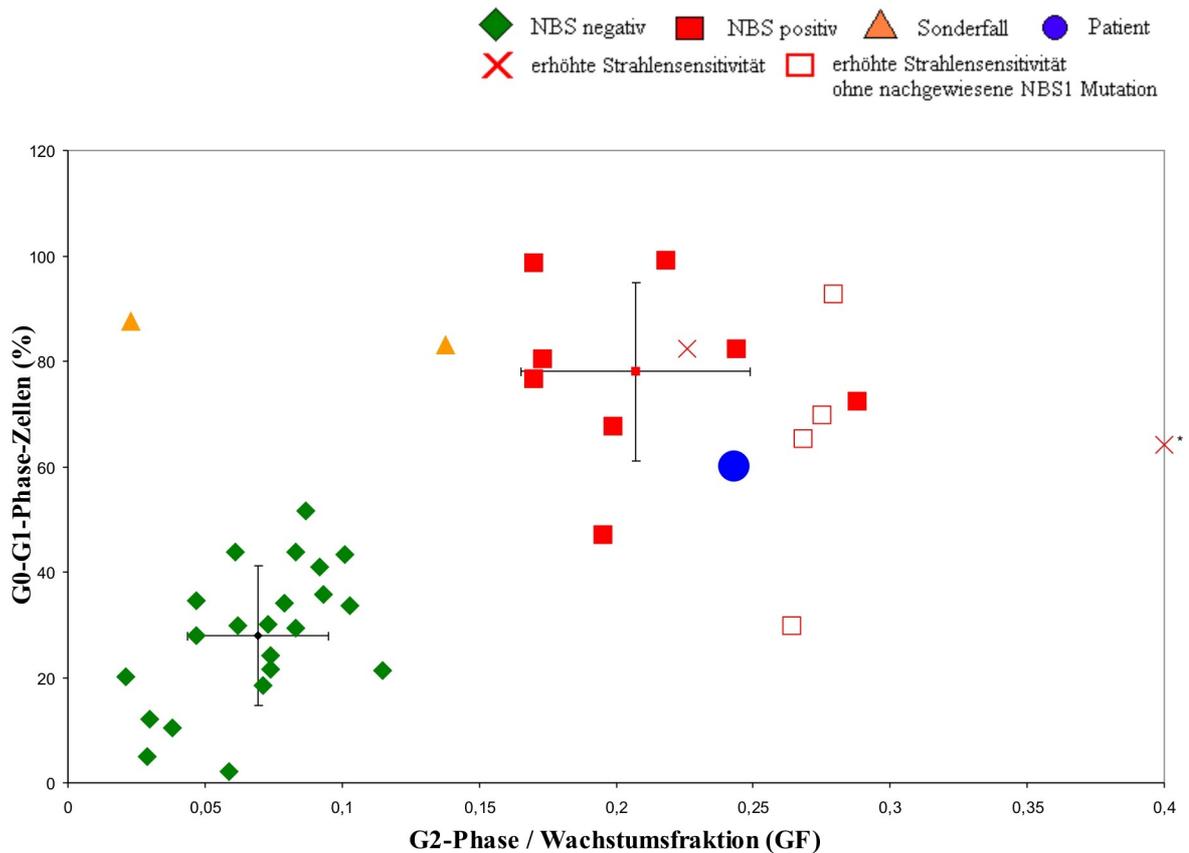


Abb. IV/13b: Darstellung der Strahlensensitivität (G2/GF- Ratio) im Verhältnis zum Anteil nichtproliferierender Zellen (G0-G1-Phase) unter Bestrahlung mit 1,5 Gy (\* Datenpunkt 0,704 ; 64,2)

#### Fall 14 (G-02-2393)

Die erst 1-jährige Patientin wurde mit rezidivierenden Infektionen und dem Verdacht auf Nijmegen Breakage Syndrom zur Zellzyklusanalyse vorgestellt. Die Eltern der Patientin sind konsanguin und zwei ihrer Brüder wurden bereits erfolgreich unter der Diagnose eines SCID (severe-combined-immune-deficiency) transplantiert. Bei einem der beiden Brüder ist eine Mikrozephalie bekannt. Die zellkinetische Untersuchung zeigte im Einzelnen folgende Ergebnisse:

72 Stunden nach Kulturbeginn befanden sich bezogen auf die Ausgangspopulation

ohne Bestrahlung	27,5 %	im ursprünglichen G0-G1-Kompartiment
mit Bestrahlung (1,5 Gy)	64,2 %	
ohne Bestrahlung	33,8 %	im dritten Zellzyklus
mit Bestrahlung (1,5 Gy)	0,2 %	

G2/GF-Ratio des 1. Zellzyklus bei 1,5 Gy	0,704
AFP-Wert im Plasma	6,8 ng/ml (Normalbereich der Altersgruppe)

Zusammenfassend zeigten die Lymphozyten der Patientin ohne Bestrahlung eine durchschnittliche Stimulierbarkeit, bezogen auf das Lebensalter. Unter Bestrahlung kam es aber zu einem starken Rückgang der Stimulierbarkeit. Die Zellen durchliefen nur zwei bis drei vollständige Zellzyklen. Lymphozyten gesunder Kontrollen vergleichbaren Alters zeigen, bestrahlt und unbestrahlt, eine Zellzyklusverteilung über drei bis vier Zellzyklen nach 72 Stunden Kulturdauer mit höheren Anteilen von Zellen. Außerdem zeigte sich eine Blockierung der proliferierenden Zellen in der G2-Phase des ersten Zellzyklus nach Bestrahlung mit 1,5 Gy.

Das Verhältnis des Anteils der Zellen in der G2-Phase des ersten Zellzyklus nach Bestrahlung mit 1,5 Gy zum Anteil der proliferierenden Zellen (G2/GF-Ratio) ist ein Maß für Strahlensensitivität und ist mit 0,704 sehr stark erhöht und liegt somit eher im Bereich von Patienten mit Ataxia teleangiectatica. Dieser Wert ist in Abbildung IV/14b gegen den Prozentsatz nichtproliferierender Zellen (G0-G1-Phase) aufgetragen.

Allerdings ist bei Patienten mit klassischer Ataxia teleangiectatica der AFP-Wert typischerweise über den Normalbereich hinaus erhöht, wobei Patienten mit NBS normale AFP-Werte aufweisen.

Bei der Behandlung der Zellen mit dem Radiomimetikum Bleomycin verblieben 72 Stunden nach Kulturbeginn 81,9% (1 µg/ml Bleomycin) bzw. 95% (5 µg/ml Bleomycin) der behandelten Ausgangspopulation im ursprünglichen G0/G1-Kompartiment. Zu diesem

Zeitpunkt konnten sowohl bei 1 µg/ml als auch bei 5 µg/ml Bleomycin keine Zellen im dritten Zellzyklus nachgewiesen werden.

Die unterdurchschnittliche Mitogenantwort der Lymphozyten der Patientin unter Bestrahlung und der normale AFP-Wert könnten im Einklang mit der Verdachtsdiagnose Nijmegen Breakage Syndrom stehen. Die sehr stark erhöhte Strahlensensitivität (hohe G2/GF-Ratio) nach Bestrahlung ist aber eher untypisch für Patienten mit NBS.

Leider wurde bei der Patientin keine Mutationsanalyse durchgeführt, so dass sich die Verdachtsdiagnose NBS nicht endgültig bestätigen lässt. Somit könnten auch anderer Gendefekte, welche ebenfalls zu erhöhter Strahlensensitivität führen, in Frage kommen.

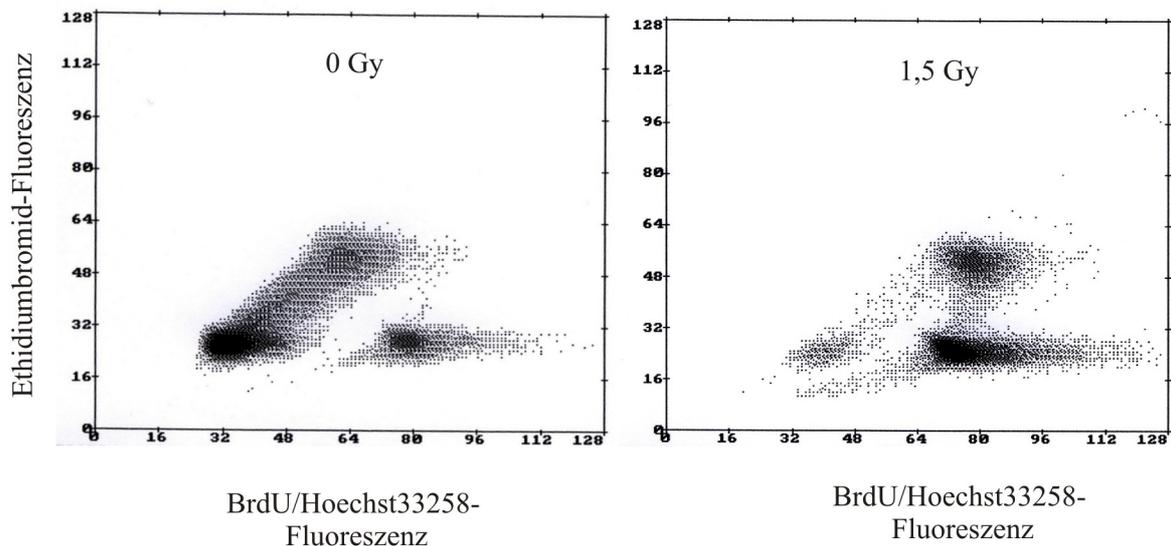


Abb. IV/14a: der Zellzyklusanalyse zugrundeliegende Zytogramme

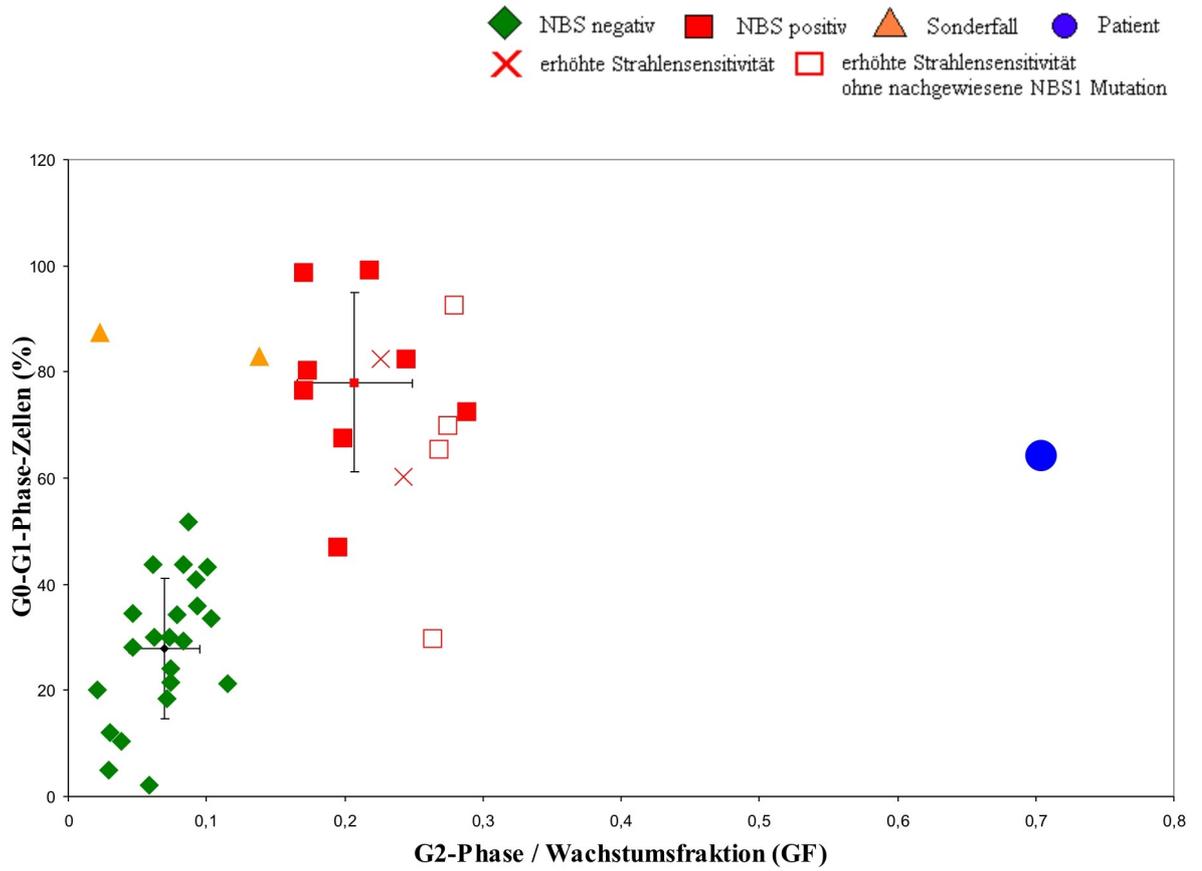


Abb. IV/14b: Darstellung der Strahlensensitivität (G2/GF- Ratio) im Verhältnis zum Anteil nichtproliferierender Zellen (G0-G1-Phase) unter Bestrahlung mit 1,5 Gy

## Kategorie V (Sonderfälle; fragliche Auswertbarkeit)

### **Fall 15 (F-96-04-0 / F-96-63-0)**

Bei der 7-jährigen Patientin mit Verdacht auf Nijmegen Breakage Syndrom fallen klinisch ein Mikrozephalus, rezidivierenden Infektionen des Respirationstraktes, eine prominente Nase und große Ohren, sowie eine Splenomegalie auf. Weiterhin wird über eine prä- und postnataler Wachstumsretardierung (unter 3. Perzentile), eine Immundefizienz, eine Dysgammaglobulinämie und seit dem 4. Lebensjahr über Bronchiektasien berichtet. Die drei Geschwister der Patientin sind klinisch unauffällig und gesund. Die durchgeführte zellkinetische Untersuchung ergab im Einzelnen folgende Ergebnisse:

72 Stunden nach Kulturbeginn befanden sich bezogen auf die Ausgangspopulation

ohne Bestrahlung	81,6 %	im ursprünglichen G0-G1-Kompartiment
mit Bestrahlung (1,5 Gy)	87,5 %	
ohne Bestrahlung	0,6 %	im dritten Zellzyklus
mit Bestrahlung (1,5 Gy)	0,0 %	

G2/GF-Ratio des 1. Zellzyklus bei 1,5 Gy	0,023
AFP-Wert im Plasma	< 2 ng/ml (Normalbereich der Altersgruppe)

Zusammenfassend zeigten die Lymphozyten des Patienten eine stark unterdurchschnittliche Stimulierbarkeit, bezogen auf das Lebensalter. Die Zellen durchliefen insgesamt nur zwei bis drei vollständige Zellzyklen. Lymphozyten gesunder Kontrollen vergleichbaren Alters zeigen, bestrahlt und unbestrahlt, eine Zellzyklusverteilung über drei bis vier Zellzyklen mit höheren Anteilen von Zellen. Es zeigte sich außerdem eine Blockierung der proliferierenden Zellen in der G2-Phase des ersten Zellzyklus nach Bestrahlung mit 1,5 Gy.

Die G2/GF-Ratio ist ein Maß für Strahlensensitivität, jedoch hier nicht zuverlässig, da kaum Zellen proliferierten. Dieser Wert ist in Abbildung V/15b gegen den Prozentsatz nichtproliferierender Zellen (G0-G1-Phase) aufgetragen.

Die stark unterdurchschnittliche Mitogenantwort der Lymphozyten der Patientin und das typische klinische Bild stehen im Einklang mit der Verdachtsdiagnose Nijmegen Breakage Syndrom. Eine erhöhte Strahlensensitivität, die typisch für Zellen von NBS-Patienten wäre, konnte wegen des geringen Zellwachstums allerdings nicht gezeigt werden.

Eine klare Aussage ist also in diesem Fall, auf Grund des zu geringen Zellwachstums (möglicherweise exogen bedingt, durch zu lange Transportzeit und ungünstige Transportbedingungen) nicht ohne weiteres möglich.

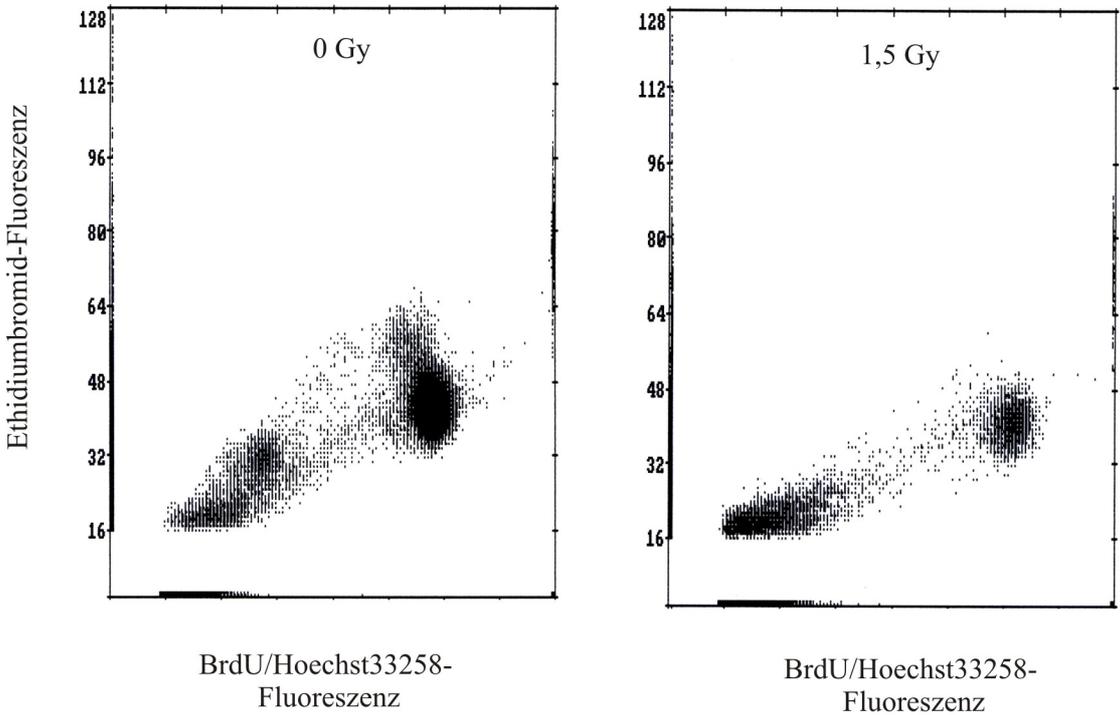


Abb. V/15a: der Zellzyklusanalyse zugrundeliegende Zytogramme

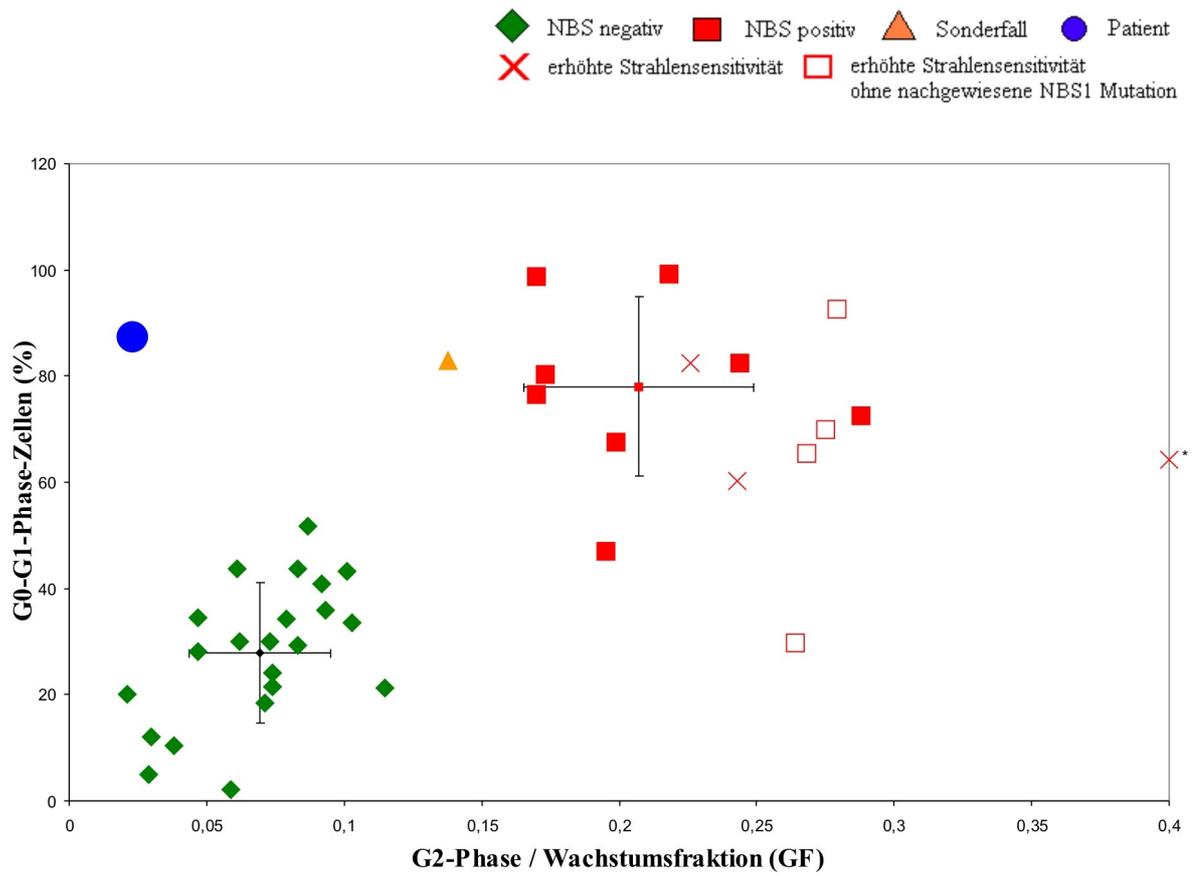


Abb. V/15b: Darstellung der Strahlensensitivität (G2/GF- Ratio) im Verhältnis zum Anteil nichtproliferierender Zellen (G0-G1-Phase) unter Bestrahlung mit 1,5 Gy (\* Datenpunkt 0,704 ; 64,2)

### Fall 16 (G-02-0650)

Es handelt sich um eine 8-jährige Patientin mit einem nicht näher klassifizierten humoralen Immundefekt, Hautveränderungen, rezidivierenden bakteriellen Infekten, MRSA Besiedlung und Verdacht auf chronische mukokutane Candidiasis.

Zur diagnostischen Abklärung wurde zunächst eine zellkinetische Untersuchung (Blutprobe hämolytisch) unter der Fragestellung Fanconi Anämie durchgeführt. Die Lymphozyten zeigten eine stark verringerte Stimulierbarkeit mit nur 12,3% proliferierenden Zellen. Die proliferierenden Zellen durchliefen nur zwei bis drei vollständige Zellzyklen, zeigten aber keine spontane Zellzyklusblockierung in der G2-Phase. Lymphozyten gesunder Kontrollen durchlaufen drei bis vier vollständige Zellzyklen. Das Verhältnis: Summe der G2-Phasen / Wachstumsfraktion (GF) ergab mit 0,129 einen Wert im Normalbereich. Es konnte keine erhöhte Sensitivität gegenüber Mitomycin C nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse stehen demnach im Widerspruch zur Diagnose Fanconi Anämie. Das schlechte Zellwachstum ist allerdings ungewöhnlich, könnte aber exogen (hämolytische Probe) bedingt sein.

Eine zweite zellkinetische Untersuchung (Blutprobe wieder stark hämolytisch) wurde unter der Fragestellung Nijmegen Breakage Syndrom durchgeführt und ergab im Einzelnen folgende Ergebnisse:

72 Stunden nach Kulturbeginn befanden sich bezogen auf die Ausgangspopulation

ohne Bestrahlung	37,9 %	im ursprünglichen G0-G1-Kompartiment
mit Bestrahlung (1,5 Gy)	83,0 %	
ohne Bestrahlung	7,0 %	im dritten Zellzyklus
mit Bestrahlung (1,5 Gy)	0,3 %	

G2/GF-Ratio des 1. Zellzyklus bei 1,5 Gy	0,138
AFP-Wert im Plasma	0,6 ng/ml (Normalbereich der Altersgruppe)

Zusammenfassend zeigten die Lymphozyten der Patientin wiederum eine unterdurchschnittliche Stimulierbarkeit, bezogen auf das Lebensalter. Die Zellen durchliefen nach Bestrahlung nur zwei bis drei vollständige Zellzyklen. Lymphozyten gesunder Kontrollen vergleichbaren Alters zeigen, bestrahlt und unbestrahlt, eine Zellzyklusverteilung über drei bis vier Zellzyklen nach 72 Stunden Kulturdauer mit höheren Anteilen von Zellen. Es zeigte sich keine überproportionale Blockierung der proliferierenden Zellen in der G2-Phase des ersten Zellzyklus nach Bestrahlung mit 1,5 Gy.

Das Verhältnis des Anteils der Zellen in der G2-Phase des ersten Zellzyklus nach Bestrahlung mit 1,5 Gy zum Anteil der proliferierenden Zellen (G2/GF-Ratio) ist ein Maß für Strahlensensitivität und liegt mit 0,138 im oberen Normalbereich. Dieser Wert ist in Abbildung V/16b gegen den Prozentsatz nichtproliferierender Zellen (G0-G1-Phase) aufgetragen.

Obwohl die Zellen nur ein unterdurchschnittliches Zellwachstum zeigten, konnte keine erhöhte Strahlensensitivität (noch normale G2/GF-Ratio), die typisch für Zellen von NBS-Patienten wäre, nachgewiesen werden. Dies steht im Widerspruch zur Diagnose NBS.

Die zur Verfügung stehende Blutprobe war allerdings sehr hämolytisch, was möglicherweise zur Verfälschung der Ergebnisse geführt haben könnte. Eine klare Aussage ist also in diesem Fall nicht ohne weiteres möglich.

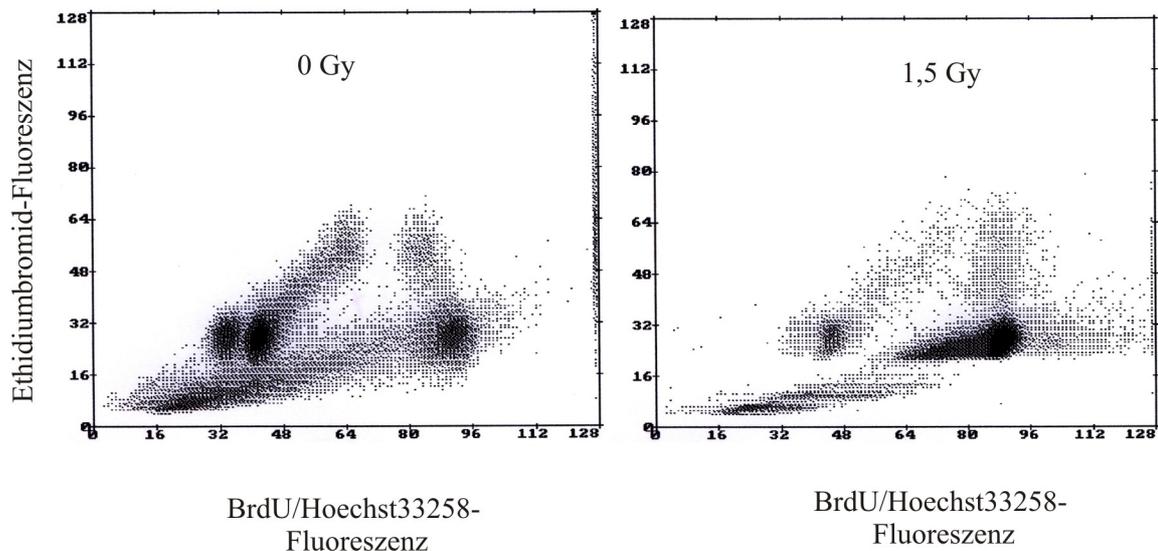


Abb. V/16a: der Zellzyklusanalyse zugrundeliegende Zytogramme

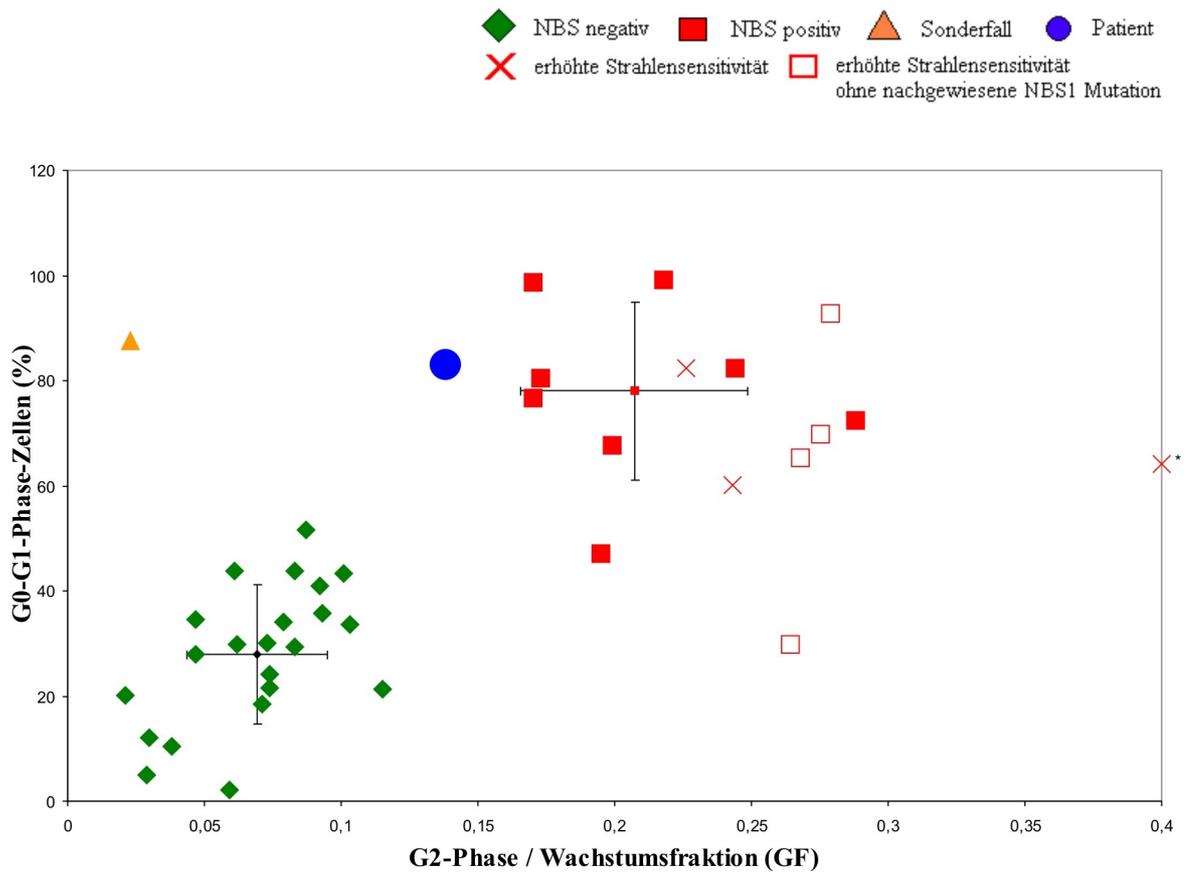


Abb. V/16b: Darstellung der Strahlensensitivität (G2/GF- Ratio) im Verhältnis zum Anteil nichtproliferierender Zellen (G0-G1-Phase) unter Bestrahlung mit 1,5 Gy (\* Datenpunkt 0,704 ; 64,2)

## 4. Diskussion

### 4.1 Zusammenfassende Auswertung und Diskussion der Zellzyklusanalyse

Insgesamt wurden im Rahmen dieser Arbeit die Daten von 40 Patienten im Alter zwischen 6 Wochen und 22 Jahren ausgewertet. Ziel war es, mittels der Durchflusszytometrie diejenigen Patienten mit Nijmegen Breakage Syndrom von Patienten ohne NBS Erkrankung abzugrenzen, um so die Verdachtsdiagnose zu bestätigen.

Entsprechend der Ergebnisse der Zellzyklusanalyse konnten die Patienten in 5 Kategorien unterteilt werden:

<i>Kategorie I</i>	NBS-negative Kontrollen	22 Fälle
<i>Kategorie II</i>	NBS-positiv	9 Fälle
<i>Kategorie III</i>	erhöhte Strahlensensitivität ohne nachgewiesene NBS1-Mutation	4 Fälle
<i>Kategorie IV</i>	erhöhte Strahlensensitivität	3 Fälle
<i>Kategorie V</i>	Sonderfälle; fragliche Auswertbarkeit	2 Fälle

Die Grundlage für die diagnostische Abgrenzung zwischen NBS-positiven und NBS-negativen Fällen bildet hierbei die für Patienten mit Nijmegen Breakage Syndrom charakteristisch gesteigerte Strahlensensitivität. Dafür wurden die Lymphozyten-Kulturen mit ionisierender Strahlung in verschiedener Dosierung behandelt und anschließend verglichen. Bei geringen bis mittleren Bestrahlungsdosen (1,5 Gy) zeigten sich die Unterschiede am deutlichsten.

Die in der Durchflusszytometrie zu beobachtenden Zellzyklusstörungen der Lymphozyten-Kulturen von NBS-Patienten, zeigen hauptsächlich zwei prominente Merkmale:

1. Der Anteil nichtproliferierender Zellen (G0/G1-Phase-Zellen) ist höher als in Kulturen von gesunden Kontrollen.
2. Der Anteil von Zellen in der G2-Phase des 1. Zellzyklus im Verhältnis zur Wachstumsfraktion (G2/GF-Ratio) ist im Gegensatz zu den Kontrollkulturen erhöht.

Trägt man nun genau diese, bei einer Bestrahlungsdosis von 1,5 Gy gewonnen Werte in einem zweiparametrischen Diagramm gegeneinander auf, so ergeben sich in der Auswertung zwei gut voneinander abgrenzbare Cluster. In den 22 Fällen der Kategorie I zeigten die Kulturen Normalwerte sowohl für die G0/G1-Phase-Zellen, als auch für die G2/GF-Ratio.

Eine NBS Erkrankung kann dadurch ausgeschlossen werden, so dass diese im Folgenden als negative Kontrollkulturen betrachtet werden.

16 Kulturen zeigten einen für das Nijmegen Breakage Syndrom typischen Zellzyklusbefund. Allerdings konnte nur bei 9 von diesen Kulturen mittels Genanalyse eine Mutation im NBS1-Gen nachgewiesen werden (Kategorie II). Für diese ist damit die Diagnose Nijmegen Breakage Syndrom gesichert. Bei 4 Kulturen war das Ergebnis der Mutationsanalyse negativ, womit die Verdachtsdiagnose auszuschließen ist (Kategorie III). Bei den übrigen 3 Kulturen wurde oder konnte keine Genanalyse durchgeführt werden, so dass ein Nijmegen Breakage Syndrom mit Sicherheit weder ausgeschlossen noch bestätigt werden kann (Kategorie IV).

#### Differenzierung zwischen NBS-positiven und NBS-negativen Fällen

Betrachtet man den Prozentsatz nichtstimulierbarer Zellen (G0/G1-Phase-Zellen) unter Bestrahlung mit 1,5 Gy bei den gesichert positiven NBS-Fällen (Kategorie II), betragen Mittelwert und Standardabweichung  $79,59\% \pm 16,49\%$  (Bereich: 47,0%-99,1%). Die Werte der Kontrollkulturen lagen dagegen bei  $27,90\% \pm 13,21\%$  (Bereich: 2,1%-51,7%) ( $p < 0,001$ ). Die G0/G1-Phase-Zellen entsprechen den in der G0/G1-Phase des ersten Zellzyklus verbliebenen Zellen, welche innerhalb von 72 Stunden nicht in den Zellzyklus eingetreten sind. Sie spiegeln eine herabgesetzte Mitogenantwort der Lymphozyten und somit deren geringe Stimulierbarkeit wider. Eine reduzierte Mitogenantwort wird jedoch auch bei einzelnen nicht-strahlensensitiven Kontrollen beobachtet. So zeigen Patienten mit aplastischer Anämie typischerweise sehr hohe G0/G1-Fraktionen [D. Schindler, persönliche Mitteilung]. Trotz des signifikanten Unterschiedes lässt sich das NBS-Kollektiv auf Grund der teilweisen Überlappung durch die alleinige Bestimmung der G0/G1-Fraktion nicht in allen Fällen von den Kontrollen abgrenzen.

Mit der G2/GF-Ratio gelingt jedoch eine überschneidungsfreie Trennung beider Kollektive. Mittelwert und Standardabweichung des Verhältnisses G2/GF betragen bei den Kontrollkulturen  $0,07 \pm 0,03$  (Bereich: 0,02-0,12) und bei den NBS-Kulturen  $0,22 \pm 0,05$  (Bereich: 0,17-0,29). Damit ist die G2/GF-Ratio bei NBS gegenüber den Kontrollen signifikant erhöht ( $p < 0,001$ ).

Die G2/GF-Ratio ist bei der Durchflusszytometrie ein Maß für Strahlensensitivität. Beim Nijmegen Breakage Syndrom ist die korrekte Reparatur der durch ionisierende Strahlung induzierten DNA-Schäden gestört. Dadurch nimmt der Anteil an Zellen, die in der G2-Phase verbleiben, im Vergleich mit Kontrollen überproportional zu. Zusammen mit einem geringen

Anteil an proliferierenden Zellen ergeben sich somit bei strahlensensitiven Zellen erhöhte Werte für die G2/GF-Ratio. Der Normalbereich wird auf Grund der hier ausgewerteten Daten bis zu einem Wert von 0,13 definiert. Liegen die Werte darunter, kann von einer normalen Strahlensensitivität ausgegangen werden. Ab Werten über 0,15 liegt eine erhöhte Strahlensensitivität vor, dazwischen liegt ein Grenzbereich in dem nicht immer exakt zugeordnet werden kann. Aufgrund der charakteristisch erhöhten Strahlensensitivität von NBS-Zellen lässt sich demnach eine zweifelsfreie durchflusszytometrische Diagnostik durchführen. Beide Kollektive sind gut voneinander abgrenzbar. Insgesamt wird außerdem deutlich, dass eine erhöhte Strahlensensitivität tendenziell mit einer verminderten Stimulierbarkeit der Lymphozyten einhergeht.

Die 4 Fälle der Kategorie III zeigten aber ebenfalls einen erhöhten Anteil an nichtproliferierenden Zellen und eine gesteigerte Strahlensensitivität, obwohl keine Mutation im NBS1-Gen nachweisbar war. Ob in diesen Fällen möglicherweise ein anderes Strahlensensitivitätssyndrom vorliegt, bleibt zu prüfen.

Die Auswertung dieser Fälle zeigt also, dass sowohl Kulturen mit nachgewiesener NBS1-Mutation, als auch Lymphozytenkulturen ohne NBS1-Mutation, im Gegensatz zu Kontrollkulturen, eine erhöhte G2/GF-Ratio aufweisen können.

Dies impliziert die Annahme, dass mit der Durchflusszytometrie zwar das Vorliegen von Strahlensensitivität nachgewiesen werden kann, nicht aber das gesicherte Vorhandensein einer NBS Erkrankung.

#### *Vergleich mit Ergebnissen der Zellzyklusanalyse bei Patienten mit Ataxia teleangiectatica*

Ein Vergleich der durchflusszytometrischen Ergebnisse von gesicherten NBS- und AT-Patienten bestätigt diese Aussage. Abbildung 4.1 zeigt die Ergebnisse der Zellzyklusanalyse bei Bestrahlung mit 1,5 Gy bei Patienten mit Ataxia teleangiectatica, Nijmegen Breakage Syndrom sowie von negativen Kontrollen.

Da für beide Erkrankungen eine erhöhte Strahlensensitivität charakteristisch ist, zeigen auch beide Kollektive einen erhöhten Anteil an G0/G1-Phase-Zellen und eine erhöhte G2/GF-Ratio. Sie lassen sich also gut von den gesunden Kontrollkulturen abgrenzen. Untereinander ist allerdings keine überschneidungsfreie Trennung der beiden Kollektive möglich. Dies untermauert die Überlegung, dass sich mittels Durchflusszytometrie eine gesteigerte Strahlensensitivität nachweisen lässt, nicht aber die Unterscheidung zwischen einzelnen Strahlensensitivitätssyndromen.

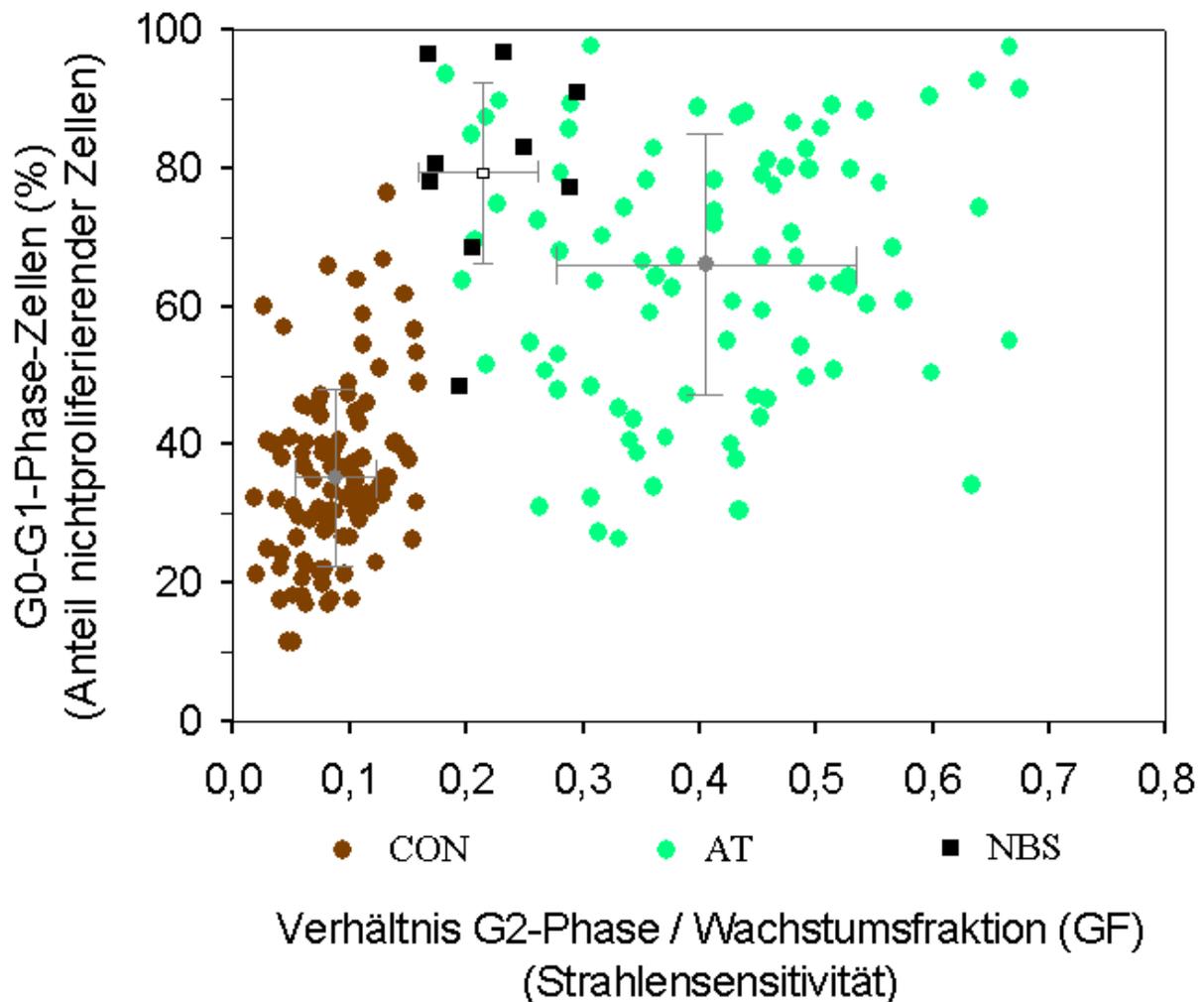


Abb. 4.1: Vergleich zwischen NBS-positiven und AT-positiven Fällen (modifiziert nach Schindler und Sobeck, 1999)

NBS- und AT-Patienten zeigen lediglich in der Verteilung der zwei Parameter Unterschiede. Mittelwert und Standardabweichung der G2/GF-Ratio betragen bei den in Abbildung 4.1 dargestellten AT-positiven Fällen  $0,41 \pm 0,13$  (Bereich: 0,18-0,67), bei den Kontrollen  $0,09 \pm 0,03$  (Bereich: 0,02-0,16) ( $p < 0,001$ ) [32]. Die Werte der im Rahmen dieser Arbeit ausgewerteten NBS-Patienten lagen hingegen bei  $0,22 \pm 0,05$  (Bereich: 0,17-0,29). Beim Nijmegen Breakage Syndrom liegt also, im Gegensatz zu Patienten mit Ataxia teleangiectatica, eine durchschnittlich geringere Strahlensensitivität vor. AT-Patienten zeigen dagegen eine deutlich größere Streuung und durchschnittlich höhere Werte als NBS-Patienten. Ein weiterer Unterschied zeigt sich bei der Betrachtung des Prozentsatz

nichtstimulierbarer Zellen (G0/G1-Phase-Zellen). Mittelwert und Standardabweichung betragen  $66,7\% \pm 18,1\%$  (Bereich: 26,3%-98,6%) bei den AT-positiven Fällen und  $35,9\% \pm 13,4\%$  (Bereich: 11,4%-76,4%) bei den Kontrollen ( $p < 0,001$ ) [32]. Bei den NBS-positiven Fällen zeigte sich in der Regel eine noch geringere Mitogenantwort der Lymphozyten als bei AT. So betragen Mittelwert und Standardabweichung der G0/G1-Phase-Zellen bei NBS-positiven Fällen  $79,59\% \pm 16,49\%$  (Bereich: 47,0%-99,1%).

### Sonderfälle

Die Fälle 15 und 16 (Kategorie V) stellen Sonderfälle dar. Bei beiden zeigte sich ein stark erhöhter Anteil an nichtproliferierenden Zellen bei normaler Strahlensensitivität. Als Gründe für das geringe Zellwachstum müssen hier vor allem exogene Faktoren in Betracht gezogen werden. So könnten ungünstige Transportbedingungen, zu lange Transportzeiten oder wie in Fall 16 die hämolytischen Blutproben den starken Zellzerfall bedingt haben. Dies zeigt, dass für die Durchflusszytometrie bestimmte Voraussetzungen und konstante Bedingungen bei der Probengewinnung und Probenverarbeitung von großer Wichtigkeit sind. So sollten Antikoagulantien wie EDTA oder Citrat vermieden werden, da sie im Gegensatz zu Na-Heparin zu verminderten Zellwachstum führen. Eine Aufbewahrung bei zu warmen Temperaturen oder eine Transportzeit von über 48 Stunden verursachen ein rasches Nachlassen der Wachstumseigenschaften der Blutprobe und somit auch der Qualität der Ergebnisse [32].

Auf der anderen Seite ist zu diskutieren, ob bei zu geringem Zellwachstum wie z.B. in Fall 15 die G2/GF-Ratio überhaupt einen zuverlässigen und aussagekräftigen Wert darstellt.

### Sensitivität und Spezifität der Durchflusszytometrie

Um der Frage nachzugehen wie sensitiv bzw. wie spezifisch die Durchflusszytometrie in Bezug auf die Differenzierung zwischen NBS-positiven und NBS-negativen Fällen ist, wurden folgende Kategorien zusammengefasst:

Die Patienten der Kategorie I und III werden als NBS-negative Fälle definiert, da sie Normalwerte für die G0/G1-Fraktion und die G2/GF-Ratio zeigten bzw. eine NBS-Erkrankung durch Mutationsanalyse ausgeschlossen werden konnte. Als NBS-positive Fälle werden die Patienten der Kategorie II definiert. Die Sonderfälle sowie die Patienten der Kategorie IV blieben hier unberücksichtigt da keine endgültige Diagnose festgestellt werden konnte.

Betrachtet man die Daten dieser so definierten Fälle, so ergeben sich folgende Werte für die G0/G1-Fraktion und die G2/GF-Ratio:

		G0/G1-Fraktion	G2/GF-Ratio
NBS-negativ	Mittelwert	33,53 %	0,10
	Standardabweichung	20,21 %	0,08
	Minimum	2,1 %	0,02
	Maximum	92,7 %	0,28
	N	26	26
NBS-positiv	Mittelwert	79,59 %	0,22
	Standardabweichung	16,49 %	0,05
	Minimum	47,0 %	0,17
	Maximum	99,1 %	0,29
	N	9	9

Damit ergibt sich nachstehende graphische Darstellung:

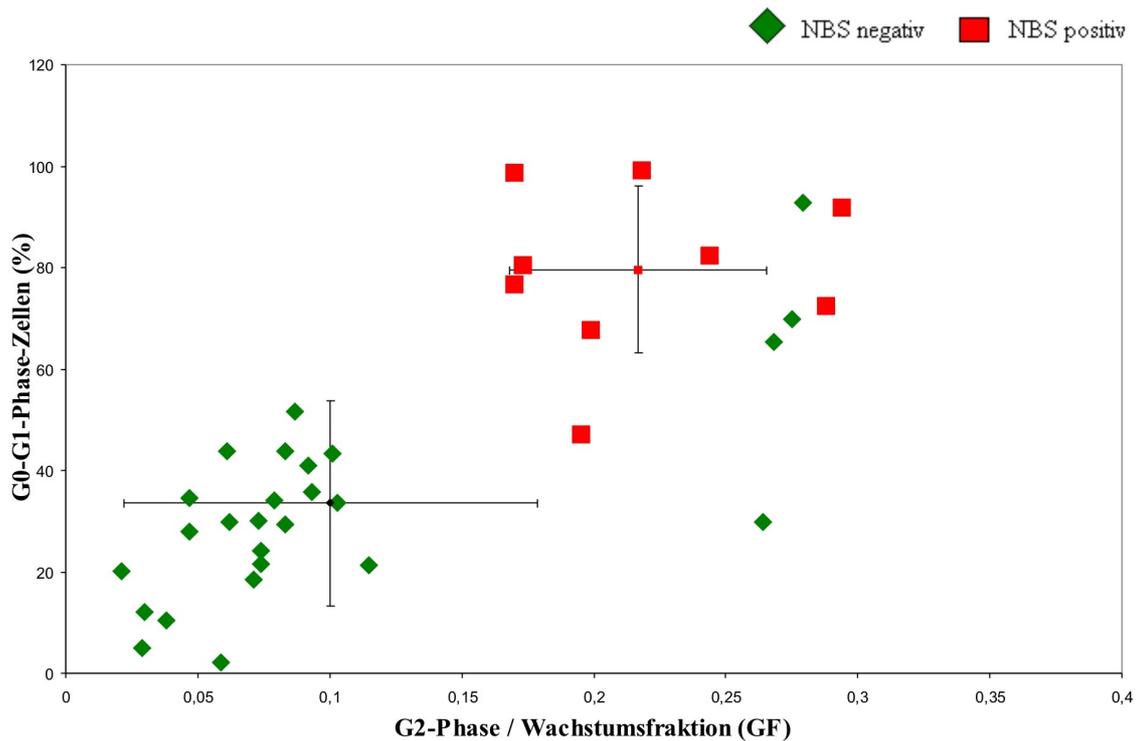


Abb. 4.2: Darstellung NBS-positiver (Kategorie II) und NBS-negativer (Kategorie I + III) Fälle

Die Mittelwerte sowohl für die G0/G1-Fraktion als auch für die G2/GF-Ratio bei NBS-positiven Fällen sind von den NBS-negativen Fällen signifikant verschieden ( $p < 0,001$ ). Die

beste Trennung beider Kollektive ergibt sich bei einer G0/G1-Fraktion von 45,40% und bei einer G2/GF-Ratio von 0,14.

Auf Grund dieser Daten ergeben sich für die Durchflusszytometrie eine Sensitivität von 100% und eine Spezifität von 84,6%. Der negative prädiktive Vorhersagewert (NPV) eines Testergebnisses unter dieser Fragestellung liegt damit bei 100%, der positive prädiktive Vorhersagewert (PPV) hingegen nur bei 69,2%.

Die Durchflusszytometrie ist demnach ein sehr sensitives Verfahren zum Ausschluss einer NBS-Erkrankung. Die Spezifität hingegen ist sehr viel geringer, so dass die Durchflusszytometrie für eine definitive Bestätigung der Diagnose Nijmegen Breakage Syndrom weniger geeignet ist. Das Testverfahren ist aber in der Lage zwischen strahlensensitiven und nicht-strahlensensitiven Zellen eindeutig zu differenzieren. Der sich so ergebende Hinweis auf das Vorliegen eines Strahlensensitivitätssyndrom kann durch das klinische Bild, weitere Parameter (z.B. AFP-Wert) und zusätzliche Untersuchungen (z.B. Chromosomenbruchanalyse) weiter differenziert werden. So zeigen NBS-Patienten typischerweise normale, AT-Patienten jedoch stark erhöhte AFP-Werte [15]. Eine eindeutige Diagnosestellung ist allerdings nur mittels Mutationsanalyse möglich.

#### **4.2 Erkrankungsalter und Diagnosestellung**

Auf Grund der Heterozygotenfrequenz in der Tschechischen Republik wurde in epidemiologischen Studien die Inzidenz des Nijmegen Breakage Syndroms auf etwa 1:68.000 Lebendgeburten geschätzt. Die Zahl der tatsächlich diagnostizierten Patienten war allerdings sehr viel geringer und lag nur bei 1:238.000 Lebendgeburten. Diese Diskrepanz zwischen erwarteten und diagnostizierten Fällen lässt sich am wahrscheinlichsten darauf zurückführen, dass viele der NBS-Patienten nicht erkannt werden. Hinzu kommt, dass die Diagnose bei den meisten Patienten erst zu einem relativ späten Zeitpunkt (mittleres Alter:  $7,1 \pm 4,5$ ) gestellt wurde [9].

Das mittlere Alter der an NBS erkrankten Patienten der hier ausgewerteten Fälle betrug bei Diagnosestellung  $10,8 \pm 5,4$  Jahre (ohne Berücksichtigung von Fall 5, da NBS hier bereits bekannt). Mittelwert und Standardabweichung der negativen Kontrollen hingegen lagen bei  $4,7 \pm 3,9$  Jahren. Diese Zahlen bestätigen die Werte der Literatur und zeigen, dass trotz vieler neuer Erkenntnisse über das Nijmegen Breakage Syndrom die Diagnose der Erkrankung in den meisten Fällen immer noch viel zu spät gestellt wird.

### **4.3 AFP-Wert**

Zusätzlich zur Durchflusszytometrie wird bei Verdacht auf ein Nijmegen Breakage Syndrom immer auch eine Bestimmung des AFP-Wertes im Plasma durchgeführt. Dabei zeigen NBS-Patienten typischerweise Werte im Normalbereich [5][39]. Erhöhte Werte sind dagegen typisch für Patienten mit Ataxia teleangiectatica [5][15]. Der AFP-Wert kann demnach keinen zusätzlichen Parameter zur Unterscheidung zwischen NBS-positiven und NBS-negativen Fällen darstellen. Er sollte aber dennoch bestimmt werden, da er bei Fällen mit erhöhter Strahlensensitivität und atypischer Klinik durchaus zur Abgrenzung zwischen Nijmegen Breakage Syndrom und Ataxia teleangiectatica herangezogen werden kann.

Bei allen hier bearbeiteten Fällen, die eine erhöhte Strahlensensitivität aufwiesen, lag der AFP-Wert im Normalbereich der jeweiligen Altersgruppe und steht daher zur Verdachtsdiagnose Nijmegen Breakage Syndrom nicht im Widerspruch. Eine AT Erkrankung kann demnach bei den unklar gebliebenen Fällen so gut wie ausgeschlossen werden. Für andere möglicherweise in Frage kommende Strahlensensitivitätssyndrome (NBS-like Syndrome) liegen derzeit hinsichtlich des AFP-Werts keine Daten vor [21]. Hingegen weisen Patienten mit Bloom Syndrom, welches ebenfalls zu den Chromosomeninstabilitätssyndromen zählt, genau wie NBS-Patienten AFP-Werte im Normalbereich auf [38].

### **4.4 Indikationen zur Diagnostik**

Das Nijmegen Breakage Syndrom ist eine schwerwiegende Erkrankung ohne derzeit bekannte Therapiemöglichkeit. Die Entwicklung von Malignomen ist neben schweren rezidivierenden Infektionen die Haupttodesursache. Nur sehr wenige der NBS-Patienten erreichen das zwanzigste Lebensjahr. Um die Lebensqualität und insbesondere die Lebenserwartung der betroffenen Patienten zu verbessern, ist eine frühzeitige und vor allem korrekte Diagnose von entscheidender Bedeutung. Das durchschnittliche Alter bei Diagnosestellung liegt derzeit noch bei etwa 7 Jahren [42]. Zu diesem Zeitpunkt haben bereits 14-37 % einen Tumor entwickelt [9]. Werden diese Patienten mit konventioneller Radio- oder Chemotherapie behandelt, so besteht die große Gefahr der Entwicklung von Zweitneoplasien oder schweren toxischen Nebenwirkungen bis hin zum Tod. Ziel der frühen Diagnose ist es also, derartiges zu verhindern und stattdessen den Gebrauch von ionisierender Strahlung, wenn es nicht absolut notwendig ist, zu verhindern [42].

Für eine sichere Diagnose ist es daher wichtig den charakteristischen Phänotyp des Nijmegen Breakage Syndroms zu kennen und rechtzeitig die Indikation zur NBS-Diagnostik zu stellen.

Die Hauptsymptome, die auf das Vorliegen eines Nijmegen Breakage Syndroms hindeuten können, sind:

- **Mikrozephalie**
- **rezidivierende Infektionen, insbesondere des Respirationstraktes**
- **Entwicklung von Neoplasien, bevorzugt des lymphatischen Systems**
- **erhöhte Strahlensensitivität**

Natürlich können noch viele andere Merkmale hinweisend sein. So zum Beispiel das Vorliegen ähnlicher Symptome bzw. bereits diagnostizierte NBS-Fälle bei Geschwistern oder anderen Verwandten. Ebenfalls ein erhöhtes Risiko haben Patienten aus Ländern mit hoher Heterozygotenfrequenz wie Tschechien, Polen oder der Ukraine bzw. Kinder aus Verwandtenehen.

Die frühe Indikation zur NBS-Diagnostik ist für die betroffenen Patienten von vorrangiger und lebenswichtiger Bedeutung. Entscheidend ist der klinische Phänotyp, auf dessen Grundlage die Indikation zur Diagnostik gestellt werden sollte. Ganz besonders wichtig ist die Abklärung vor geplanten Radio- oder Chemotherapien bzw. vor dem Gebrauch ionisierender Strahlung für diagnostische Zwecke. Bei hinreichendem Verdacht können Chromosomenbruchanalysen und die Durchflusszytometrie erste richtungweisende Hinweise geben und die Verdachtsdiagnose funktionell bestätigen bzw. erhärten. Andere Erkrankungen, die keine erhöhte Chromosomeninstabilität oder keine erhöhte Strahlensensitivität aufweisen, können somit ausgeschlossen werden. Eine definitive Bestätigung der Diagnose kann allerdings nur eine Mutationsanalyse erbringen.

#### **4.5 Differentialdiagnostische Aspekte**

*Leitsymptom: Mikrozephalie*

Das bedeutsamste Merkmal für das Vorliegen eines Nijmegen Breakage Syndroms ist der Mikrozephalus (occipitofrontaler Kopfumfang unter 3. Perzentile), da er nahezu bei 100% der Patienten vorliegt [33]. Wird ein Kind ohne erkennbare Ursache mit einem Mikrozephalus geboren oder entwickelt innerhalb der ersten Lebensmonate eine Mikrozephalie, sollte daher immer eine NBS-Diagnostik in Betracht gezogen werden [42]. Die typischen Stigmata im Gesichtsbereich wie eine Hypoplasie des Unterkiefers, eine eingefallene Stirn und eine prominenter mittlerer Gesichtspartie („bird-like-face“) weisen ebenfalls auf ein Nijmegen

Breakage Syndrom hin, werden aber oft erst bei zunehmender Progredienz des Mikrozephalus im Alter von drei Jahren deutlich [7].

Differentialdiagnostisch müssen viele verschiedene andere Ursachen berücksichtigt werden. Neben der „einfachen“ familiären Mikrozephalie, kann das Auftreten eines Mikrozephalus durch angeborene degenerative Erkrankungen bzw. durch chromosomale Defekte verursacht werden. Eine sekundäre Entwicklung einer Mikrozephalie kann nach einer hypoxischen Schädigung (z.B. Plazentainsuffizienz), durch toxisch- metabolische Einwirkungen (z.B. nach Infektionen wie Toxoplasmose oder durch Drogen wie Alkohol, Heroin) oder bei perinatalen metabolisch- endokrinologischen Veränderungen (z.B. Nebenniereninsuffizienz, Hypothyreose) entstehen. [18] Im Rahmen von Syndromen findet sich ebenfalls häufig ein Mikrozephalus. Sowohl das Seckel Syndrom, als auch das seltene Rubinstein-Taybi Syndrom sind unter anderem durch Mikrozephalie, Minderwuchs, geistige Retardierung und einem typischen „bird-like-face“ charakterisiert [7]. Zu den wichtigsten Differentialdiagnosen gehören aber die Fanconi Anämie [26], das Bloom Syndrom [38] und das Ligase-IV-Mangel-Syndrom [7]. Für alle drei Erkrankungen ist die Mikrozephalie charakteristisch, weshalb sie gesondert besprochen werden.

#### *Leitsymptom: rezidivierende Infektionen*

Rezidivierende Infektionen vor allem des Respirationstraktes sind ein weiteres charakteristisches Merkmal beim Nijmegen Breakage Syndrom und sollten daher unbedingt abgeklärt werden. Sie sind Zeichen der Immundefizienz und mitverantwortlich für eine frühe Sterblichkeit der Patienten [7]. In der Labordiagnostik fallen meistens reduzierte IgG und IgA Antikörperlevel, sowie erniedrigte CD3<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten auf [7][9]. Allerdings ist die Immundefizienz bei NBS-Patienten oft progredient, so dass vor allem sehr junge Patienten komplett normale immunologische Parameter aufweisen können [42]. Besteht der dringliche Verdacht auf ein Nijmegen Breakage Syndrom, so ist unter diesen Umständen ein Monitoring der immunologischen Funktionen zu erwägen [42].

Differentialdiagnostisch muss hinsichtlich des Immundefekts vor allem an ein Bloom Syndrom, Ataxia teleangiectatica [38], das Ligase-IV-Mangel-Syndrom sowie erbliche Immundefizienzen (z.B. Bruton'sche Agammaglobulinämie) bzw. an schwere kombinierte Immundefekte gedacht werden [7].

### *Leitsymptom: Entwicklung von Neoplasien*

Am schwerwiegendsten für NBS-Patienten ist das Vorliegen eines erhöhten Krebsrisikos, vor allem für Neoplasien des lymphatischen Systems [29]. Immerhin sind bis zum 21. Lebensjahr bis zu 40% der Patienten betroffen [38]. Erkranken sehr junge Patienten an lymphoproliferativen Erkrankungen, wie z.B. einem Non-Hodgkin-Lymphom oder einer akuten lymphatischen Leukämie, sollte daher auch die Diagnose Nijmegen Breakage Syndrom in Betracht gezogen werden [42]. Die erhöhte Prädisposition gegenüber Neoplasien ist aber auch für viele andere Syndrome charakteristisch. Vor allem die Gruppe der Chromosomeninstabilitätssyndrome, zu denen auch das Nijmegen Breakage Syndrom gehört, wird durch das gehäufte Auftreten von Neoplasien charakterisiert und müssen daher am ehesten differentialdiagnostisch berücksichtigt werden. Besonders typisch für NBS und Ataxia teleangiectatica sind lympho- retikuläre Tumore. Für eine Fanconi Anämie sprechen dagegen eher akute myeloische Leukämien und Schleimhautkarzinome, beim Bloom Syndrom finden sich häufig alle Arten von Leukämien und soliden Tumoren. [28][32]

### *Leitsymptom: erhöhte Strahlensensitivität*

Besonders charakteristisch für NBS-Patienten ist eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber ionisierender Strahlung [9]. Im Zusammenhang mit einer zu späten Diagnose kann dies für den Betroffenen eine fatale und unter Umständen auch lebensbedrohliche Situation darstellen. Das Auftreten von besonders schweren Nebenwirkungen oder von Zweitneoplasien bei einer Radio- bzw. Chemotherapie sollte daher immer kritisch hinterfragt werden, da es hinweisend auf das Vorliegen eines Nijmegen Breakage Syndroms sein kann [42].

Aber auch für die Ataxia teleangiectatica ist eine erhöhte Strahlensensitivität charakteristisch und mittels Durchflusszytometrie nachweisbar [15]. Für das dem NBS sehr ähnliche Ligase-IV-Mangel-Syndrom ist ebenfalls eine erhöhte Strahlensensitivität beschrieben [7][20]. Bei der Differentialdiagnose sollten außerdem einige erbliche Immundefizienzen, wie z.B. die Bruton'sche Agammaglobulinämie und schwere kombinierte Immundefekte (SCID) berücksichtigt werden, da die Zellen hier ebenfalls eine Sensitivität gegenüber ionisierender Strahlung aufweisen können [7].

Besteht demnach bei einem Patienten der dringende Verdacht auf ein Nijmegen Breakage Syndrom oder ein anderes Strahlensensitivitätssyndrom, sollte immer, egal wie dringlich die Therapie auch sein mag, eine Abklärung mittels Durchflusszytometrie oder gegebenenfalls Mutationsanalyse erfolgen. Vor allem mit dem diagnostischen Verfahren der Durchflusszytometrie lässt sich eine erhöhte Strahlensensitivität nachweisen.

#### *Abgrenzung zum Ligase-IV-Mangel-Syndrom:*

Das Ligase-IV-Mangel-Syndrom (Lig4-Syndrom) wurde erst in den letzten Jahren als eigenständiges Syndrom beschrieben, da es viele Ähnlichkeiten mit dem Nijmegen Breakage Syndrom aufweist. Dazu zählen Mikrozephalie, Wachstumsretardierung, charakteristische Stigmata im Gesichtsbereich, Immundefizienz (Panzytopenie) sowie erhöhte Radiosensitivität [2][7][20]. Ein gesteigertes Risiko für die Entwicklung von Neoplasien des lymphatischen Systems wird ebenfalls diskutiert [2]. Zellen, die von verschiedenen Patienten mit Lig4-Syndrom in Kultur genommen wurden, sind strahlenempfindlich und zeigen eine stark eingeschränkte Doppelstrangbruchreparatur. Allerdings sind beim Lig4-Syndrom keine Defekte in der Zellzykluskontrolle beschrieben [20], es besteht keine erhöhte Chromosomeninstabilität und die Immundefizienz ist meistens weitaus schwerer ausgeprägt als bei NBS-Patienten [7]. Dennoch muss das Ligase-IV-Mangel-Syndrom bei der Differentialdiagnose berücksichtigt werden. Eine exakte Diagnose gelingt allerdings nur durch Mutationsanalyse des LIG4-Gens [7].

#### *Abgrenzung zu anderen Chromosomeninstabilitätssyndromen:*

##### *Ataxia teleangiectatica*

Das Nijmegen Breakage Syndrom wurde lange Zeit als Variante der Ataxia teleangiectatica betrachtet, da bei beiden eine erhöhte Strahlenempfindlichkeit, Zellzyklusstörungen, als auch spontane und induzierbare Chromosomenbrüche vorliegen [29]. In der Durchflusszytometrie weisen ebenfalls beide eine herabgesetzte Stimulierbarkeit der Lymphozyten und eine erhöhte Strahlensensitivität auf [32]. Diese nahezu vollständige Übereinstimmung der zellulären Eigenschaften von AT und NBS erlaubt eine Unterscheidung der beiden Erkrankungen meist nur auf Grund des klinischen Bildes [36]. Aber auch hier finden sich Gemeinsamkeiten, wie zelluläre und humorale Immundefizienz sowie eine Prädisposition zu malignen Tumoren, insbesondere für Lymphome und lymphozytäre Leukämien. Die für AT-Patienten charakteristischen Teleangiektasien und die fortschreitenden neuro-motorischen Dysfunktionen wie beispielsweise Ataxien werden allerdings beim Nijmegen Breakage Syndrom nicht beschrieben [29]. Ein relativ einfacher Parameter zur Abgrenzung zwischen NBS und Ataxia teleangiectatica ist der AFP-Wert, wobei AT-Patienten charakteristischerweise einen erhöhten AFP-Wert aufweisen [15] und bei NBS-Patienten die Werte im Normalbereich liegen [5][39].

### *Bloom Syndrom*

Das Bloom Syndrom wird unter anderem, wie auch das Nijmegen Breakage Syndrom, durch Minderwuchs, Mikrozephalie, verstärkter Anfälligkeit gegenüber Infekten, erhöhte Chromosomenbrüchigkeit, AFP-Werte im Normalbereich und durch häufige Erkrankung an Malignomen charakterisiert [38]. Im Gegensatz zu NBS findet sich jedoch bei den meisten Patienten mit Bloom Syndrom ein makulös bis plaqueförmiges teleangiektatisches Erythem im Gesicht bzw. an anderen sonnenempfindlichen Bereichen, sowie typische Chromosomenanomalien mit Austauschfiguren homologer Chromosomen und erhöhter Schwesterchromatid-Austauschrage [1]. Eine erhöhte Strahlensensitivität wie beim Nijmegen Breakage Syndrom wird hingegen nicht beschrieben [38]. Die definitive Diagnose eines Bloom Syndroms wird durch den Nachweis einer stark erhöhten SCE-Rate (sister chromatid exchanges) gestellt [1].

### *Fanconi Anämie*

Die Fanconi Anämie (FA) ist wie das Nijmegen Breakage Syndrom eine seltene autosomal rezessive Erkrankung und wird durch spontane Chromosomenbrüchigkeit und ein gesteigertes Malignomrisiko charakterisiert. Während NBS allerdings eher mit Immundefizienzen und Lymphomen assoziiert ist, finden sich bei der Fanconi Anämie vor allem Panzytopenien und spezifische Skelettanomalien wie z.B. eine Hypo- oder Aplasie des Radius. Dennoch gibt es Überschneidungen im klinischen Bild der beiden Erkrankungen. So zeigen 27% - 56% der FA-Patienten eine Mikrozephalie, 58% eine Wachstumsretardierung und 60% - 71% unregelmäßige Hautpigmentierungen, wie z.B. Café-au-lait Flecken [26]. Die Diagnostik der FA basiert auf dem Nachweis der Empfindlichkeit gegenüber DNA schädigenden Substanzen wie Mitomycin C und Diepoxybutan [26]. Es zeigte sich allerdings, dass NBS-Zellen ebenfalls sensibel gegenüber Mitomycin C sein können [25][36], so dass der Test nicht mehr spezifisch für FA gesehen werden kann [26]. Daraus ergeben sich natürlich differentialdiagnostische Probleme. In der Literatur sind bereits einige Patienten beschrieben, die fälschlicherweise zuerst mit atypischer Fanconi Anämie diagnostiziert wurden. Später stellte sich durch eine Mutationsanalyse die korrekte Diagnose NBS heraus [25][26]. Es ist daher von großer Bedeutung die Überlappung der beiden Syndrome zu kennen und sie vor allem beim Vorliegen eines atypischen klinischen Bildes zu bedenken.

#### **4.6 NBS-like Syndrome**

Die im Rahmen dieser Arbeit ausgewerteten Fälle der Kategorie III zeigten in der Durchflusszytometrie eine erhöhte Strahlensensitivität. Dennoch konnte bei keinem der 4 Patienten eine Mutation im NBS1-Gen nachgewiesen werden. Ähnliche Fälle sind unter anderen durch Hiel et al. [16] und Maraschio et al. [21] beschrieben worden. In beiden Fall-Berichten bestand ebenfalls klinisch der dringliche Verdacht auf ein Nijmegen Breakage Syndrom. Dennoch konnte auch hier keine Mutation im NBS1-Gen nachgewiesen werden. Fraglich bleibt also, ob all diesen Fällen ein anderes Strahlensensitivitätssyndrom mit bisher unbekanntem Gendefekt zugrunde liegt. Letztlich kommen für diese NBS-like Syndrome verschiedene Gene als ursächlich in Frage. Auf Grund der Ähnlichkeit der klinischen Bilder mit dem Nijmegen Breakage Syndrom stehen insbesondere die Proteine des Reparatursystems für DNA-Doppelstrangbrüche im Mittelpunkt des Interesses. Diskutiert werden in dieser Hinsicht vor allem Mutationen in den Genen welche für die Proteine MRE11, RAD50 bzw. XRCC4 kodieren [21]. Dafür spricht, dass bereits Mutationen im MRE11-Gen bei Patienten mit einer AT-ähnlichen Erkrankung (Ataxia-telangiectasia-like disorder, ATLD) beschrieben wurden [19][30]. In dem von Maraschio et al. berichteten Fall konnten allerdings keine Mutationen in den erwähnten Genen gefunden werden [21]. Aktuell laufende Untersuchungen sollen in dieser Richtung weitere wegweisende Ergebnisse liefern. So konnten bei einem Patienten mit erhöhter Strahlensensitivität Mutationen im RAD50-Gen nachgewiesen werden [D. Schindler, persönliche Mitteilung].

#### **4.7 NBS1-Mutationen bei Krebspatienten**

Derzeit konnten bei Patienten mit Nijmegen Breakage Syndrom 10 verschiedene Mutationen im NBS1-Gen identifiziert werden. Über 90% der Patienten sind Träger der 657del5 Mutation [30], während alle anderen Mutationen bisher nur in einzelnen Personen verschiedener ethnischer Abstammung beobachtet wurden [42].

Seit der Klonierung des NBS1-Gens im Jahre 1998 untersuchen verschiedene Laboratorien die Frequenz von NBS1-Mutationen und Polymorphismen bei Krebspatienten [9]. Beispielsweise zeigten Untersuchungen bei russischen Kindern mit sporadischen Malignomen des lymphatischen Systems sowie Untersuchungen bei polnischen Erwachsenen mit Non-Hodgkin-Lymphom eine signifikant höhere Frequenz von heterozygoten Trägern der „Founder-“ Mutation 657del5. Außerdem konnte bei einigen Kindern mit akuter lymphatischer Leukämie die bislang unbekannte Mutation 643C>T im NBS1-Gen nachgewiesen werden [6].

Bisher konnten neben der 657del5 und der 742insGG Mutation, die beide auch bei NBS-Patienten zu finden sind, 7 neue Sequenzvarianten des NBS1-Gens bei Krebspatienten in heterozygoten Trägerstatus entdeckt werden. Während allerdings die Mutationen 278C>T, 381T>C, 448C>T und 628G>T bis jetzt nur in Krebspatienten gefunden wurden, konnten zwei der Mutationen (283G>A und 511A>G) auch in gesunden Patienten nachgewiesen werden [42].

All diese Befunde rücken das NBS1-Gen und auch sein Proteinprodukt Nibrin in den Mittelpunkt intensiver Forschung. Vor allem die Frage inwiefern Mutationen im NBS1-Gen die Entstehung von Malignomen beeinflussen bzw. wie sie sich auf das klinische Bild der Patienten auswirken. Interessanterweise konnte beispielsweise die 511A>G Substitution in homozygoten Zustand bei einem Japanischen Patienten mit aplastischer Anämie gefunden werden, der keinerlei weitere klinische Zeichen einer NBS Erkrankung aufwies [42]. Hingegen beschreiben Seemanová et al. in einer aktuellen Publikation Zwillingbrüder, bei denen sowohl eine 657del5 Mutation als auch eine 643C>T Mutation im NBS1-Gen nachgewiesen werden konnte. Beide Brüder zeigen eine schwere kongenitale Mikrozephalie, Entwicklungsverzögerungen und myoklonische Anfälle bis hin zum Status epilepticus, aber keine erhöhte Chromosomeninstabilität bzw. Radiosensitivität [34]. In einer anderen aktuellen Studie konnte in einer großen Gruppe polnischer Patienten mit ALL bzw. Non-Hodgkin-Lymphom eine leicht erhöhte Frequenz an heterozygoten Trägern der 657del5 Mutation gefunden werden. Trotzdem gehen die Autoren hier nicht davon aus, dass ein heterozygoter Trägerstatus des NBS1-Gens ein Hauptrisikofaktor für die Entwicklung von Tumoren des lymphatischen Systems darstellt [6].

Insgesamt gesehen, konnte bisher die Frage ob und in welcher Weise NBS1-Mutationen eine Rolle in der Pathogenese von Malignomen spielen nicht eindeutig geklärt werden [9]. Dennoch scheint die 657del5 Mutation bei heterozygoten Trägern mit einem erhöhten Krebsrisiko assoziiert zu sein [35].

#### **4.8 Therapeutische Möglichkeiten beim Nijmegen Breakage Syndrom**

Wie bereits beschrieben, existieren für das Nijmegen Breakage Syndrom derzeit noch keine spezifischen oder kausalen Behandlungsmöglichkeiten. Alle therapeutischen Maßnahmen haben daher nur einen präventiven Charakter und haben vor allem die Verbesserung der Lebensqualität und die Verlängerung der Lebenserwartung als Ziel.

Neben der frühzeitigen Diagnose einer NBS-Erkrankung spielt natürlich die Vermeidung ionisierender Strahlung die wichtigste Rolle. Hierbei sollte nicht nur der therapeutische

Gebrauch ionisierender Strahlung, sondern vor allem auch der diagnostische Gebrauch, wenn nicht unbedingt erforderlich, unterlassen werden [7].

Die für das Nijmegen Breakage Syndrom typischen rezidivierenden Infektionen, vor allem des Respirationstraktes, sind häufig mitverantwortlich für die frühe Sterblichkeit der jungen Patienten. Ein kontinuierliches Monitoring und eine adäquate Therapie der Infektionen sind deshalb hier von großer Bedeutung. Bei Kindern mit Agammaglobulinämie kann zum Beispiel zusätzlich eine intravenöse Immunglobulintherapie in Betracht gezogen werden. Eine Antibiotikaphylaxe ist vor allem für Patienten mit häufigen Harnwegsinfektionen bei kongenitalen Missbildungen des Harntraktes zu empfehlen. [5][42]

Ebenfalls essentiell und notwendig ist ein regelmäßiges und systematisches Screening auf die Entwicklung von Neoplasien, um sie rechtzeitig und angemessen therapieren zu können. Allerdings gestaltet sich die Therapie von Malignomen bei Nijmegen Breakage Syndrom auf Grund der erhöhten Strahlensensitivität der Patienten als sehr schwierig. Selbst konventionelle Bestrahlungsdosen oder Chemotherapeutika können für NBS-Patienten tödlich sein. Eine Strahlentherapie sollte also unbedingt vermieden werden [33]. Trotzdem kann und sollte durchaus bei den betroffenen Patienten eine kurative Therapie angestrebt werden. Um eine Vollremission zu erreichen muss allerdings ein individuell modifiziertes Behandlungsprotokoll entwickelt werden. Empfohlen wird hierbei eine reduzierte Chemotherapie unter der besonderen Berücksichtigung individueller Dosis- und Toleranzgrenzen. [33][42] Deshalb ist zu überlegen vor einer Tumorthherapie ein individuelles zelluläres Sensibilitätsspektrum für Substanzen, die für den Therapieeinsatz geplant sind, zu bestimmen. Die Ergebnisse solcher Analysen könnten das Risiko durch Nebenwirkungen reduzieren [36]. Dumic et al. [12] beschreiben beispielsweise die erfolgreiche Behandlung eines Non-Hodgkin-Lymphoms bei einem Jungen mit Nijmegen Breakage Syndrom. Das Therapieregime beinhaltete in diesem speziellen Fall eine modifizierte Chemotherapie nach dem CHOP Protokoll (Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Prednisolon) in Kombination mit dem monoklonalen CD20-Antikörper Rituximab. Der 17 jährige Patient befand sich für 3 Jahre nach Beendigung der Behandlung in kompletter Remission.

Des Weiteren spielen eine gezielte und unterstützende Betreuung, Behandlung und Beratung in erzieherischen-, sprachlichen- und neuropsychiatrischen Bereichen eine Rolle. Auf Grund der Chromosomeninstabilität wird zusätzlich eine Gabe von Vitamin E und Folsäurepräparaten angepasst an das Körpergewicht empfohlen. [7][42]

Wurde in einer Familie die Mutation des NBS1-Gens identifiziert und besteht ein weiterer Kinderwunsch der betroffenen Eltern, so ist eine pränatale Diagnostik möglich. Eine

zusätzliche genetische Beratung sollte hierbei in erster Linie dazu dienen die Betroffenen und ihre Familien zu informieren und zu beraten. Da das Nijmegen Breakage Syndrom eine autosomal rezessiv vererbte Erkrankung ist, sind beide Elternteile eines betroffenen Patienten obligat heterozygote Träger des mutierten Gens. Jedes Kind einer solchen Verbindung hat also, unabhängig vom Geschlecht, eine 25% Chance betroffen zu sein, eine 50% Chance heterozygoter Träger zu sein und eine 25% Chance kein Träger des mutierten Gens zu sein. Geschwister der Eltern haben ebenfalls ein 50% Risiko heterozygote Träger zu sein, während Geschwister des Betroffenen selbst zu 2/3 heterozygote Träger sind. Genetische Tests auf das Vorhandensein eines heterozygoten Trägerstatus sind ebenfalls möglich und sinnvoll, wenn die Mutation bekannt ist. Bisher sind keine NBS-Patienten mit eigenen Nachkommen bekannt. [7]

Ein 2005 erschienener Bericht von New et al. [26] beschreibt unter anderen den Einsatz einer Knochenmarktransplantation beim Nijmegen Breakage Syndrom.

Bei dem hier beschriebenen Patienten wurde zunächst im Alter von 9 Monaten eine atypische Fanconi Anämie diagnostiziert. Mit drei Jahren entwickelte er eine schwere Immundefizienz welche mit einer Knochenmarktransplantation behandelt wurde. Die Konditionierung erfolgte aufgrund seiner zuvor diagnostizierten Fanconi Anämie nach einem speziell angepassten Protokoll mit 1 mg/kg Alemtuzumab über 5 Tage, 20 mg/kg Cyclophosphamid über 4 Tage und einer thorako-abdominalen Bestrahlung mit einer Einzeldosis von 5 Gy. Die Behandlung wurde von dem Patienten im Allgemeinen gut vertragen und es zeigten sich keinerlei schwerwiegende Komplikationen. Drei Jahre nach der Transplantation ist er weiterhin stabil und zeigt eine normale zelluläre und humorale Immunität. Bei späteren Untersuchungen zeigte sich allerdings das der Patient homozygot für die 1089C>A Mutation im NBS1-Gen ist, so dass die ursprüngliche Diagnose FA in ein Nijmegen Breakage Syndrom geändert wurde.

Die vorgenommene Transplantation ist normalerweise nur eine Therapieoption bei Chromosomeninstabilitätssyndromen wie der Fanconi Anämie und wurde beim Nijmegen Breakage Syndrom bislang noch nicht beschrieben. Es bestehen große Bedenken über die kurz- und langfristigen toxischen Nebenwirkungen der Behandlung, insbesondere wegen der Gefahr der Entwicklung von Malignomen [26]. Trotzdem zeigt das Beispiel des Patienten, dass eine erfolgreiche Behandlung durchaus möglich ist. So könnte die Knochenmarktransplantation, durch die Verwendung speziell modifizierter Therapieprotokolle, eine zukünftige Rolle in der Behandlung von NBS-Patienten mit lebensbedrohlicher Immundefizienz spielen. [5][26]

## 4.9 Schlussfolgerungen

### 4.9.1 Durchflusszytometrie im Vergleich mit anderen Diagnoseverfahren

Zielsetzung dieser Arbeit war es zu prüfen, ob das Verfahren der Durchflusszytometrie dazu geeignet ist NBS-positive und NBS-negative Fälle von einander zu unterscheiden. Dadurch sollte ein Vergleich mit anderen Diagnoseverfahren wie der Chromosomenbruchanalyse und der Mutationsanalyse ermöglicht werden.

Die Vor- und Nachteile der Chromosomenbruchanalyse und der Durchflusszytometrie wurden bereits in den Abschnitten 1.7.1 und 1.7.2 erläutert. Daraus wird deutlich, dass die Durchflusszytometrie der Chromosomenbruchanalyse vor allen in den Punkten Zeitersparnis, Ersparnis an Arbeitskraft, Genauigkeit, Reproduzierbarkeit und statistischer Sicherheit überlegen ist. Weitere mögliche Diagnoseverfahren stellen der colony survival assay (CSA) und die Nibrin-Protein-Analytik dar. Beide Methoden sind allerdings auf die Etablierung einer lymphoblastoiden Zelllinie angewiesen, was mit einem erheblichen Zeitaufwand von bis zu 3 Monaten verbunden ist. Die Vorteile der Nibrin-Protein-Analytik mittels Immunoblot bestehen darin, dass alle derzeit bekannten Mutationen im NBS1-Gen zu einem vorzeitigen Kettenabbruch führen und somit das Proteinprodukt Nibrin in NBS-positiven Zellen nicht detektierbar ist. Der Nachweis des Fehlens von Nibrin bestätigt so die Diagnose eines Nijmegen Breakage Syndroms [7][42]. Der CSA hingegen ist eine Methode, die das Überleben bestrahlter Kulturen lymphoblastoider Zellen quantifiziert, wodurch eine Beurteilung der Radiosensitivität ermöglicht wird [42]. NBS-positive Zellen zeigen im CSA eine 3-5-mal höhere Radiosensitivität als Kontrollkulturen [5]. Der hohe Zeitaufwand für die Transformation von Lymphozyten zu lymphoblastoiden Zellen macht die beiden Verfahren im Sinne einer schnellen Diagnostik jedoch ungeeignet.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass alle ausgewerteten Fälle, bei denen die Diagnose Nijmegen Breakage Syndrom mittels Mutationsanalyse bestätigt werden konnte, in der Durchflusszytometrie ein positives Ergebnis hatten. Die Durchflusszytometrie ist demnach geeignet zwischen NBS-positiven und NBS-negativen Fällen zu differenzieren. Die Auswertung zeigte aber auch, dass in 4 Fällen trotz positiven Ergebnisses in der Durchflusszytometrie, ein Nijmegen Breakage Syndrom durch Mutationsanalysen ausgeschlossen werden konnte.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die Durchflusszytometrie das Vorliegen einer erhöhten Strahlensensitivität nachweisen kann. Da eine erhöhte Strahlensensitivität ein charakteristisches Leitsymptom des Nijmegen Breakage Syndroms ist, stellt die

Durchflusszytometrie ein sinnvolles und robustes Diagnoseverfahren von hoher Sensitivität dar. Allerdings ist die Spezifität des Verfahrens sehr viel geringer, da eine erhöhte Strahlensensitivität auch viele andere Erkrankungen und Syndrome charakterisiert, welche zusammenfassend als Strahlensensitivitätssyndrome bezeichnet werden. Hierzu zählen unter anderen die Ataxia teleangiectatica, das Ligase-IV-Mangel-Syndrom, MRE11 und RAD50-Defekte, sowie einige erbliche Immundefekte wie die Bruton'sche Agammaglobulinämie oder schwere kombinierte Immundefekte (SCID). Alle diese Erkrankungen weisen Ähnlichkeiten beziehungsweise Gemeinsamkeiten mit dem Nijmegen Breakage Syndrom auf und zählen zu den wichtigsten Differentialdiagnosen.

Daraus wird ersichtlich, dass eine endgültige und im Endeffekt eindeutig sichere Diagnose nur die Mutationsanalyse liefern kann. Dies wurde allerdings erst durch die Entdeckung des verantwortlichen NBS1-Gens im Jahre 1998 ermöglicht, 17 Jahre nach der Erstbeschreibung des Nijmegen Breakage Syndroms durch C. Weemaes et al. Die Entwicklungen und Neuerungen der letzten Jahre, sowohl auf technischer, als auch auf molekulargenetischer Ebene, lassen die Mutationsanalyse immer häufiger zum primären diagnostischen Verfahren beim Nijmegen Breakage Syndrom werden. Von Vorteil ist dabei die Tatsache, dass das NBS1-Gen das einzig bekannte Gen ist, welches mit NBS assoziiert ist. Es ist mittlerweile vollständig sequenziert, besitzt eine überschaubare Größe und etwa 95% der Patienten tragen die vorherrschende „Founder-“ oder 657del5 Mutation [30]. Diese Tatsachen verringern Zeitaufwand und Kosten der Mutationsanalyse. Während für einen molekulargenetisch-differentialdiagnostischen Nachweis von NBS vor wenigen Jahren noch Kosten von ungefähr 2000 € notwendig waren, so konnten diese mittlerweile enorm gesenkt werden. Dies liegt unter anderen darin begründet, dass nur die Exons des Gens sequenziert werden (Exon 6 – 10), in welchen die derzeit bekannten Mutationen lokalisiert sind. Außerdem wird zunächst nur nach der bei 95% der Patienten vorliegenden 657del5 Mutation gesucht, da alle anderen bekannten Mutationen bisher nur in einzelnen Personen verschiedener ethnischer Abstammung beobachtet wurden [42]. Das Untersuchungsergebnis einer solchen Mutationsanalyse kann bereits nach 2 bis 3 Tagen vorliegen, wobei sich die Kosten derzeit nur noch auf etwa 100 € belaufen. Im Vergleich dazu liegen die Kosten für eine Durchflusszytometrie zwischen 300 und 350 €, für die Ergebnisse werden ungefähr 7 Tage benötigt.

#### **4.9.2 Klinische Anwendung der Durchflusszytometrie als Screening-Verfahren**

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es unter Einbeziehung aller gewonnenen Ergebnisse die Möglichkeit zu prüfen, in wie weit die Durchflusszytometrie als sinnvolles Screening-Verfahren eingesetzt werden kann. Der Einsatz als Screening soll sich in dieser Fragestellung auf Patienten beziehen, welche beispielsweise aus ungeklärten Gründen mit einer Mikrozephalie geboren werden, einen Mikrozephalus in den ersten Lebensmonaten entwickeln oder welche bereits in sehr jungen Jahren an einem Tumor des lymphatischen Systems erkranken.

Ein Screening-Verfahren sollte vor allem ein einfacher, zeit- und kostengünstiger Suchtest sein, der auf eine bisher unerkannte Erkrankung hinweisen oder sie sogar nachweisen kann. Natürlich ist ein Screening nur dann sinnvoll, wenn durch die Erkennung der Erkrankung in therapeutischer Hinsicht ein Vorteil entsteht. Die Durchflusszytometrie stellt ein solches einfaches Testverfahren mit einem relativ geringen Zeit- und Arbeitsaufwand dar. Die Zellzyklusanalyse kann durch den Nachweis einer erhöhten Strahlensensitivität aber nur einen Hinweis auf das Vorliegen eines Nijmegen Breakage Syndrom geben. Für eine endgültige Diagnose müsste sich in jedem Fall eine Mutationsanalyse anschließen. Einer der entscheidenden Vorteile im Gegensatz zur Durchflusszytometrie liegt hier im sicheren Ausschluss bzw. in der sicheren Bestätigung der Verdachtsdiagnose NBS. Im Endeffekt ist die Mutationsanalyse eine noch schnellere und noch kostengünstigere Screening-Methode. Auf Grund dessen wird sich die Mutationsanalyse in Zukunft als die Methode der Wahl in der Primärdiagnostik des Nijmegen Breakage Syndrom etablieren. Zwar gibt es derzeit keine spezifische Therapie, aber erst die gesicherte Diagnose mit Kenntnis der verantwortlichen Genmutation macht eine pränatale Diagnostik bzw. die Heterozygoten-Erkennung innerhalb von Familien sinnvoll. Gerade letzteres könnte von großem Interesse für Länder wie Polen, Tschechen und Ukraine sein, da hier die Mehrheit der NBS-Patienten zu finden ist und dementsprechend auch die höchste Heterozygotenfrequenz. Auf medizinisch-epidemiologischen Weg sollte es dadurch möglich sein, der Frage nachzugehen, ob heterozygote Träger ebenfalls ein erhöhtes Risiko für Neoplasien aufweisen [28][29][35]. Bei solchen Untersuchungen benötigt man ein schnelles und sicheres Screening; und hierfür stellt die Mutationsanalyse gegenüber allen anderen diagnostischen Verfahren die effektivste Methode dar.

Nun stellt sich allerdings die Frage, was dies für Patienten bedeutet, deren molekular-genetische Analyse einen negativen Befund ergibt. Oder für jene Patienten, die an so genannten „NBS-like“ Syndromen leiden, für die bislang keine genetische Grundlage

gefunden wurde. Hier erweist sich die Durchflusszytometrie durch den Nachweis einer erhöhten Strahlensensitivität als wichtiges differential-diagnostisches Verfahren. Auch wenn keine Therapie oder Behandlung zur Verfügung steht, können diese Patienten durch das Vermeiden von ionisierender Strahlung ihre Lebensqualität und Prognose entscheidend verbessern. Für solche unklaren Fälle stellt die Durchflusszytometrie, im Gegensatz zur Mutationsanalyse, ein unersetzbares Diagnoseverfahren dar.

## **5. Zusammenfassung**

Das Nijmegen Breakage Syndrom ist eine seltene autosomal- rezessive Erkrankung, die durch ein typisches Erscheinungsbild mit Mikrozephalie, Wachstumsretardierung, Immundefizienz sowie durch eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber ionisierender Strahlung und eine erhöhte Prädisposition gegenüber malignen Tumoren charakterisiert wird. Die Erkrankung wird durch Mutationen im NBS1-Gen verursacht, welches auf Chromosom 8q21 lokalisiert werden konnte. Das NBS1-Gen Produkt, Nibrin, ist Teil des MRE11-RAD50-Nibrin Proteinkomplexes, welcher eine zentrale Rolle bei der Erkennung und der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen spielt. Das Fehlen von Nibrin führt zu einer fehlerhaften DNA-Reparatur und erklärt die verschiedenen klinischen und zellulären Symptome bei NBS-Patienten. Trotz aller medizinischen Fortschritte existieren derzeit keine spezifischen Therapie- oder Behandlungsmöglichkeiten. Von entscheidender Bedeutung für die Betroffenen ist eine frühzeitige und korrekte Diagnose der Erkrankung vor allem unter dem Aspekt der Prävention. Hierzu zählen insbesondere ein engmaschiges Screening auf das Vorliegen von Neoplasien sowie die Vermeidung von ionisierender Strahlung.

Ziel dieser Arbeit war es zu prüfen, ob das Verfahren der Durchflusszytometrie geeignet ist zwischen NBS-positiven und NBS-negativen Patienten zu differenzieren. Dadurch sollte ein Vergleich mit anderen Diagnoseverfahren ermöglicht werden, sowie die Möglichkeit diskutiert werden, inwiefern die Durchflusszytometrie als Screening-Methode eingesetzt werden kann.

Hierzu wurden die Daten von 40 Patienten ausgewertet, die im Rahmen der Verdachtsdiagnose eines Nijmegen Breakage Syndroms mit der Durchflusszytometrie im Institut für Humangenetik der Universität Würzburg untersucht wurden. Für die Unterscheidung zwischen NBS-positiven und NBS-negativen Fällen sind folgende Parameter von diagnostischer Relevanz:

- 1) der Anteil nichtproliferierender Zellen (G0/G1-Phase-Zelle), welcher bei NBS-Patienten meist deutlich höher ist als bei gesunden Kontrollen. Die G0/G1-Phase-Zellen entsprechen den in der G0/G1-Phase des ersten Zellzyklus verbliebenen Zellen. Sie spiegeln bei erhöhten Werten die herabgesetzte Mitogenantwort dieser Lymphozyten und somit deren geringe Stimulierbarkeit wider.
- 2) die G2/GF-Ratio als Maß für Strahlensensitivität, welche bei NBS-Patienten charakteristischerweise erhöht ist. Die G2/GF-Ratio ergibt sich aus dem Zellanteil in der G2-Phase des ersten Zellzyklus im Verhältnis zur Wachstumsfraktion (GF).

Für die Auswertung wurden diese Parameter in einem zweidimensionalen Diagramm gegeneinander aufgetragen. Diese Darstellung erlaubte es in 22 Fällen die Verdachtsdiagnose NBS auszuschließen, da diese für beide Parameter Werte im Normalbereich zeigten. In 16 Fällen ergab sich ein positives Ergebnis mit erhöhtem Anteil nichtproliferierender Zellen und erhöhter Strahlensensitivität. In 2 weiteren Fällen konnte, zum Teil auf Grund mangelhafter Proben, keine eindeutige Aussage getroffen werden.

Unter den positiven Fällen konnte bei 9 Patienten die Diagnose des Nijmegen Breakage Syndroms mittels Mutationsanalyse bestätigt werden. Bei 4 Patienten konnte jedoch trotz erhöhter Strahlensensitivität keine Mutation im NBS1-Gen nachgewiesen werden. Bei den übrigen 3 Patienten wurde keine Mutationsanalyse durchgeführt, so dass die endgültige Diagnose nicht mit Sicherheit feststeht.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die Durchflusszytometrie das Vorliegen einer erhöhten Strahlensensitivität eindeutig nachweisen kann. Eine erhöhte Strahlensensitivität ist wiederum ein charakteristisches Merkmal des Nijmegen Breakage Syndroms, da es in direkten Zusammenhang mit dem verursachenden Gendefekt steht. Die Durchflusszytometrie kann daher, unter Berücksichtigung des klinischen Bildes, als ein sinnvolles diagnostisches Verfahren von hoher Sensitivität bei Patienten mit der Verdachtsdiagnose NBS angesehen und erfolgreich eingesetzt werden. Allerdings ist der Nachweis einer erhöhten Strahlensensitivität in der durchflusszytometrischen Zellzyklusanalyse nicht gleichbedeutend mit einem Beweis für das Vorliegen einer NBS Erkrankung. Viele andere Erkrankungen und Syndrome werden ebenfalls durch eine erhöhte Strahlensensitivität charakterisiert, so dass die Spezifität des Verfahrens sehr viel geringer ist.

Auf Grund dessen rückt mehr und mehr der direkte Nachweis des Nijmegen Breakage Syndroms mittels Mutationsanalyse in den Vordergrund. Nicht zuletzt auch, weil sich die Mutationsanalyse in den letzten Jahren zum günstigsten und schnellsten Diagnoseverfahren entwickelt hat. Die Methode der Wahl für die Primärdiagnostik des Nijmegen Breakage Syndroms wird in Zukunft daher die Mutationsanalyse sein.

Als Screening-Verfahren bleibt die Durchflusszytometrie den diagnostisch ungeklärten Fällen vorbehalten. Denn der Nachweis einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber ionisierender Strahlung ermöglicht es den Betroffenen den Einsatz solcher Strahlung, wenn es nicht absolut notwendig ist, zu vermeiden. Dadurch lassen sich iatrogene Schäden verhindern und die Lebensqualität der Patienten und nicht zuletzt deren Prognose entscheidend verbessern.

## 6. Literatur

- [1] Bajoghli A. Bloom Syndrome (Congenital Telangiectatic Erythema). *emedicine* 2005; URL: <http://www.emedicine.com/derm/topic54.htm>
- [2] Ben-Omran TI, Cerosaletti K, Concannon P, Weitzmann S, Nezarati MM. A patient with mutations in DNA Ligase IV: clinical features and overlap with Nijmegen breakage syndrome. *Am J Med Genet* 2005; 137: 283-287
- [3] Brunner T, Corazza N, Jakob S, Nachbur U, Cima I, Kassahn D. Immunologie II Praktikum Wintersemester 2004/2005 Anwendungen der Durchflusszytometrie. Abteilung Immunpathologie, Institut für Pathologie, Universität Bern
- [4] Cerosaletti KM, Lange E, Stringham HM, Weemaes C, Smeets D, Sölder B, Belohradsky BH, Taylor A, Karnes P, Elliott A, Komatsu K, Gatti RA, Boehnke M, Concannon P. Fine Localization of the Nijmegen Breakage Syndrome Gene to 8q21: Evidence for a Common Founder Haplotype. *Am J Hum Genet* 1998; 63:125-134
- [5] Chrzanowska KH, Janniger CK. Nijmegen Breakage Syndrome. *emedicine* 2002; URL: <http://www.emedicine.com/derm/topic725.htm>
- [6] Chrzanowska KH, Piekutowska-Abramczuk D, Popowska E, Gladkowska-Dura M, Maldyk J, Syczewska M, Krajewska-Walasek M, Goryluk-Kozakiewicz B, Bubala H, Gadowski A, Gaworczyk A, Kazanowska B, Koltan A, Kuzmicz M, Luszawska-Kutrzeba T, Maciejka-Kapuscinska L, Stolarska M, Stefanska K, Sznurkowska K, Wakulinska A, Wieczorek M, Szczepanski T, Kowalczyk J. 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): 1269-1274
- [7] Concannon PJ, Gatti RA. Nijmegen Breakage Syndrome. *Gene Reviews* 2003; URL: <http://www.genetests.org>
- [8] Demuth I, Frappart PO, Hildebrand G, Melchers A, Lobitz S, Stöckl L, Varon R, Herceg Z, Sperling K, Wang Z, Digweed M. An inducible null mutant murine model of Nijmegen breakage syndrome proves the essential function of NBS1 in chromosomal stability and cell viability. *Human Molecular Genetics* 2004; 13(20): 2385–2397
- [9] Digweed M, Sperling K. Nijmegen breakage syndrome: clinical manifestation of defective response to DNA double-strand breaks. *DNA Repair* 2004; S. 1207-1217
- [10] Digweed M. Nijmegen Breakage Syndrom. URL: <http://www.charite.de/humangenetik2/genfunk/Forsch2.htm>
- [11] Dong Z, Zhong Q, Chen PL. The Nijmegen Breakage Syndrome protein is essential for Mre11 phosphorylation upon DNA damage. *The Journal of Biological Chemistry* 1999; 274(28): 19513-19516

- [12] Dunic M, Radman I, Krnic N, Nola M, Kusec R, Begovic D, Labar B, Rados M. Successful treatment of diffuse large B-cell non-hodgkin lymphoma with modified CHOP (cyclophosphamide/doxorubicin/vincristine/prednisone) chemotherapy and rituximab in a patient with Nijmegen syndrome. *Clin Lymphoma Myeloma* 2007; 7(9): 590-593
- [13] Froster U. Molekulargenetische Diagnostik. Universität Leipzig, Institut für Humangenetik.  
URL: <http://www.uni-leipzig.de/~genetik/index.php>
- [14] Gregorek H, Chrzanowska KH, Michal'Kiewicz J, Syczewska M, Madalin'Ski K. Heterogeneity of humoral immune abnormalities in children with Nijmegen breakage syndrome: an 8- year follow-up study in a single centre. *Clinical & Experimental Immunology* 2002; 130(2): 319-324
- [15] Heinrich T, Prowald C, Friedl R, Gottwald B, Kalb R, Neveling K, Herterich S, Hoehn H, Schindler D. Exclusion/confirmation of Ataxia telangiectasia via cell cycle testing. *Eur J Pediatr.* 2006; 165(4): 250-257
- [16] Hiel JAP, Weemaes CMR, van Engelen BGM, Smeets D, Ligtenberg M, van der Burgt I, van den Heuvel LPWJ, Cerosaletti KM, Gabreëls FJM, Concannon P. Nijmegen breakage syndrome in a Dutch patient not resulting from a defect in NBS1. *J Med Genet* 2001; 38: 19-21
- [17] Institut für Humangenetik und Anthropologie der Universität Freiburg. Genetische Beratung – Information und Einwilligungserklärung zur postnatalen zytogenetischen Untersuchung (Chromosomenanalyse)  
URL: <http://humangenetik.uniklinik-freiburg.de/gb/info/zytogene.html>
- [18] Kiess W, Braun W. Kinderheilkunde systematisch. UNI-MED Verlag AG, Bremen 2002, S. 693-694
- [19] Kracker S, Bergmann Y, Demuth I, Frappart PO, Hildebrand G, Christine R, Wang Z, Sperling K, Digweed M, Radbruch A. Nibrin functions in Ig class-switch recombination. *PNAS* 2005; 102(5): 1584-1589
- [20] Löbrich M. Vorlesung und Aufbaupraktikum Biophysik im Studiengang Biologie mit Schwerpunkt Human- und Molekularbiologie (26.01.04-13.02.04), Gruppe A: zelluläre Strahlenphysik – Strahlenempfindlichkeit – DNA Doppelstrangbruchreparatur – Zellzykluskontrollpunkte; S. 9-19
- [21] Maraschio P, Spadoni E, Tanzarella C, Antoccia A, di Masi A, Maghnie M, Varon R, Demuth I, Tiepolo L, Danesino C. Genetic heterogeneity for a Nijmegen breakage-like syndrome. *Clin Genet* 2003; 63: 283–290
- [22] 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): 417-421

- [23] Medizinische Genetik Dresden, Dr. Prager, Dr. Junge, Dr. Hennig, Dr. Linné. Mitteldeutscher Praxisverbund Humangenetik. Zytogenetik – Zytogenetische Untersuchungen - Postnatale Chromosomenanalyse. 2007  
URL: <http://www.genetik-dresden.de/index1.htm>
- [24] Muschke P, Gola H, Varon R, Röpke A, Zumkeller W, Wieacker P, Stumm M. Retrospective diagnosis and subsequent prenatal diagnosis of Nijmegen breakage syndrome. *Prenat Diagn* 2004; 24: 111-113
- [25] Nakanishi K, Taniguchi T, Ranganathan V, New HV, Moreau LA, Stotsky M, Mathew CG, Kastan MB, Weaver DT, D'Andrea A. Interaction of FANCD2 and NBS1 in the DNA damage response. *Nature Cell Biology* 2002; 4: 913-920
- [26] New HV, Cale CM, Tischkowitz M, Jones A, Telfer P, Veys P, D'Andrea A, Mathew CG, Hann I. Nijmegen Breakage Syndrome Diagnosed as Fanconi Anaemia. *Pediatr Blood Cancer* 2005; 44: 1-6
- [27] Reina-San-Martin B, Nussenzweig MC, Nussenzweig A, Difilippantonio S. Genomic instability, endoreduplication, and diminished Ig class-switch recombination in B cells lacking Nbs1. *PNAS* 2005; 102(5): 1590-1595
- [28] Reis A, Sperling K. Nibrin-Mutationen beim Nijmegen Breakage Syndrom: Chromosomeninstabilität und Strahlenempfindlichkeit als Ausdruck gestörter DNA-Doppelstrangbruch- Reparatur. *Wissenschaftsberichte aus dem DHGP Xpress* Nr. 4 1998; 2-5
- [29] Reis A, Digweed M. NBS: Nibrin-Mutationen als Ursache für gestörte DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur, Chromosomeninstabilität und Strahlenempfindlichkeit. In: Stuhrman M, Dörk T, Karstens JH (Hrsg) *Ataxia teleangiectatica*, medizinischegenetik edition Band 1, München 1999, S. 34-38
- [30] Reis A, Digweed M, Varon R. Das Nijmegen Breakage Syndrom – Ein Syndrom der Chromosomeninstabilität. *Überblick Biospektrum* 3.2001, 7. Jahrgang, S. 215-217
- [31] Schindler D, Hoehn H. Flow cytometric testing for syndromes with chromosomal instability, aplastic anemia and related hematological disorders. In: R.-D. Wegner (Hrsg) *Diagnostic cytogenetics*, Springer Verlag, Heidelberg 1999, S. 269-281
- [32] Schindler D, Soback A. Diagnostik von Ataxia teleangiectatica mittels Durchflußzytometrie und Zellzyklusanalyse. In: Stuhrman M, Dörk T, Karstens JH (Hrsg) *Ataxia teleangiectatica*, medizinischegenetik edition Band 1, München, 1999, S. 11-16
- [33] Seeman P, Gebertová K, Paděrová K, Sperling K, Seemanová E. Nijmegen Breakage Syndrome in 13% of Age-Matched Czech Children With Primary Microcephaly. *Pediatr Neurol* 2004; 30(3): 195-200
- [34] Seemanová E, Sperling K, Neitzel H, Varon R, Hadac J, Butova O, Schröck E, Seeman P, Digweed M. Nijmegen Breakage Syndrome (NBS) with neurological abnormalities and without chromosomal instability. *J Med Genet* 2006; 43: 218-224

- [35] Seemanová E, Jarolim P, Seeman P, Varon R, Digweed M, Swift M, Sperling K. Cancer risk of heterozygotes with the NBN founder mutation. *J Natl Cancer Inst.* 2007; 99(24): 1875-1880
- [36] Stumm M, Wegner RD. Zytogenetik der Ataxia teleangiectatica und des Nijmegen Breakage Syndroms. In Stuurman M, Dörk T, Karstens JH (Hrsg) *Ataxia teleangiectatica, medizinischegenetik edition Band 1*, München 1999; S. 5-7
- [37] Tauchi H. Positional cloning and functional analysis of the gene responsible for Nijmegen breakage syndrome, NBS1. *J Radiat Res* 2000; 41(1): 9-17
- [38] The International Nijmegen Breakage Syndrome Study Group. Nijmegen breakage syndrome. *Arch Dis Child* 2000; 82: 400–406
- [39] Uhrhammer N, Bay JO, Gatti RA. Nijmegen breakage syndrome. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.* 2002;  
URL: <http://AtlasGeneticsOncology.org/Kprones/NijmegenID10020.html>
- [40] Zankl H. Die Durchflusszytometrie. Technische Universität Kaiserslautern, Abteilung Humanbiologie und Humangenetik, 2005;  
URL: <http://www.uni-kl.de/FB-Biologie/AG-Zankl/FCM.htm>
- [41] Zeilinger M, Hübl W. Durchflusszytometrie - eine Einführung. 2004;  
URL: <http://www.med4you.at>
- [42] URL: <http://www.nijmegenbreakagesyndrome.net>; 2007

# LEBENS LAUF

## Persönliche Daten

Name: Katja Geier, geb. Ludwig  
Geburtsdatum: 12.11.1982  
Geburtsort: Jena  
Familienstand: verheiratet  
Staatsangehörigkeit: deutsch

## Schulausbildung

09/1989 – 07/1993 Grundschole, Jena  
09/1993 – 06/2001 Staatliches Gymnasium Am Anger, Jena  
06/2001 Allgemeine Hochschulreife, Note: 1,4

## Hochschulausbildung

09/2001 – 10/2007 Studium der Humanmedizin, Julius-Maximilians-Universität  
Würzburg  
08/2003 Ärztliche Vorprüfung, Note: 2,66  
11/2007 Ärztliche Prüfung, Note: 1,5

## Klinische Ausbildung

08/2006 – 11/2006 1. Tertial des Praktischen Jahres, Innere Medizin, Klinikum  
Schweinfurt  
12/2006 – 03/2007 2. Tertial des Praktischen Jahres, Wahlfach Kinderheilkunde,  
Universitätsklinik Würzburg  
04/2007 – 07/2007 3. Tertial des Praktischen Jahres, Chirurgie, Universitätsklinikum  
Würzburg  
seit 11/2008 Assistenzärztin der Kinderklinik Aschaffenburg

26.2.08 Katja Geier