

Aus der Abteilung Dermatologie, Venerologie und Allergologie  
(Prof. Dr. med. M. P. Schön)  
im Zentrum Arbeits-, Sozial-, Umweltmedizin und Dermatologie  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

---

**Xeroderma-Pigmentosum-Guppe-C- und -G-Gen-  
Polymorphismen:  
Alternatives Splicing und funktionelle DNA-Reparatur  
beim multiplen Melanom**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von  
Seike Vollert  
aus  
Itzehoe

Göttingen 2010

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. S. Emmert

II. Berichterstatter/in:

III. Berichterstatter/in:

Tag der mündlichen Prüfung:

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>12</b>
2.1 Materialien	12
2.1.1 Chemikalien	12
2.1.2 Enzyme	13
2.1.3 Medien und deren Bestandteile	13
2.1.4 Restriktionsenzyme	13
2.1.5 Antibiotika	14
2.2 Organismen und Plasmide	14
2.2.1 Bakterien	14
2.2.2 Eukaryotische Zellen	14
2.2.3 Plasmide	14
2.3 Standardmethoden für das Arbeiten mit Nukleinsäuren	16
2.3.1 Sterilisation	16
2.3.2 Phenol-Chloroform-Extraktion	16
2.3.3 Ethanolpräzipitation	16
2.3.4 Photometrische Bestimmung der Reinheit und Konzentration von Nukleinsäuren	17
2.3.5 Agarose-Gelelektrophorese	18
2.3.6 RNA-Extraktion	18
2.3.7 Synthese von cDNA	20
2.3.8 Restriktionsenzymverdau	20
2.4 Methoden zur molekularen Klonierung	21
2.4.1 Medien, Nährböden und Antibiotikastammlösungen	21
2.4.2 Herstellung kompetenter Bakterien	22

---

2.4.3 Transformation kompetenter E. coli	22
2.4.4 Maxi-Präparation von Plasmid-DNA	23
2.5 Polymerase-Kettenreaktion	25
2.5.1 Primer	25
2.5.2 Genotypisierung XPC Exon 8	26
2.5.3 Genotypisierung XPC Exon 10	27
2.5.4 Genotypisierung XPC Exon 15	29
2.5.5 Genotypisierung XPC Intron 9 PAT	30
2.5.6 Genotypisierung XPC Intron 11	32
2.5.7 Genotypisierung XPG Exon 15	33
2.5.8 Real-time-PCR und Quantifizierung	35
2.5.9 Herstellung der externen Quantifizierungsstandards	38
2.6 Methoden für die Arbeit mit Zellkulturen	39
2.6.1 Standardbedingungen	39
2.6.2 Medien	40
2.6.3 Mediumwechsel	40
2.6.4 Zellen splitten	40
2.6.5 Gefrierkonservierung und Revitalisierung von Zellen	41
2.6.6 Transfektion mit der DEAE-Dextran-Methode	42
2.6.7 Zellyse	43
2.6.8 Wirtszell-Reaktivierungs – Assay	44
2.6.9 Messung der Luciferase-Reportergen-Aktivität	45
2.7 Probenkollektiv	46
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>47</b>
3.1 Studienpopulation und phänotypische Melanomrisikofaktoren	47
3.2 Genotypen	48

---

3.3 Assoziation der 7 Genotypen mit dem Melanom	55
3.4 mRNA-Expression von wt XPC und XPG in Abhängigkeit der Polymorphismen	56
3.5 Expression der XPC-Exon12–Deletion-mRNA – Isoform und Zusammenhang mit der DNA-Reparaturfähigkeit	67
<b>4 Diskussion</b>	69
<b>5 Zusammenfassung</b>	78
<b>6 Literaturverzeichnis</b>	80
<b>7 Abkürzungsverzeichnis</b>	97

---

## 1 Einleitung

Nahezu weltweit steigt die Inzidenz für Hautkrebs in der kaukasischen Bevölkerung (Armstrong und Kricger 1995, Garbe und Blum 2001, Stang et al. 2000) und nahm vor allem in den letzten Jahrzehnten deutlich zu (McCaul et al. 2008). Derzeit beträgt diese ca. 5-10 Neuerkrankungen pro 100000 Einwohner pro Jahr in Europa, so dass Hautkrebs mittlerweile die häufigste Tumorart der weißen Bevölkerung darstellt (Leiter und Garbe 2008).

Unter dem Begriff Hautkrebs werden im allgemeinen die Basalzellkarzinome, die häufigste Hautkrebsart mit kontinuierlich steigender Inzidenz (Situm et al. 2008), Plattenepithelkarzinome mit einer etwas geringeren Häufigkeit (Lipozencic et al. 2008), jedoch gegenüber der Normalbevölkerung erhöhten Mortalitätsrate (Jensen et al. 2008) sowie maligne Melanome zusammengefasst, wobei letzteren hinsichtlich der Mortalität die klinisch größte Bedeutung zukommt (Rass und Tilgen 2008). Es handelt sich hierbei um aggressiv wachsende Tumore der Haut, Schleimhaut, Leptomeningen, Uvea, Retina, Cochlea und Vestibularorgane, deren Prognose aufgrund frühzeitiger lymphogener und hämatogener Metastasierung häufig als ungünstig einzustufen ist, deren Mortalität in den letzten Jahren in den USA, Australien und Europa jedoch stabil geblieben ist. Die höchste Inzidenz dieser hochmalignen Hauttumore herrscht momentan in Queensland, Australien (Leiter und Garbe 2008).

Beim malignen Melanom handelt es sich um einen hochgradig malignen von den epidermalen Melanozyten ausgehenden Hauttumor, der sich in vier Subtypen untergliedern lässt: Superfiziell spreitendes malignes Melanom, primär noduläres malignes Melanom, Lentigo-maligna-Melanom sowie akrolentiginöses malignes Melanom. In Abhängigkeit von ihrer Wuchsform unterscheiden sich die unterschiedlichen Melanomtypen klinisch sowie hinsichtlich ihrer Prognose (Garbe und Schaumburg-Lever 1997).

Das superfiziell spreitende maligne Melanom ist die häufigste Form des malignen Melanoms und zeichnet sich durch ein relativ langsames Wachstum aus. Es tritt bei

Frauen bevorzugt an den Unterschenkeln sowie beim Mann am Rumpf auf und entsteht meist jenseits des 50. Lebensjahrs.

Das noduläre maligne Melanom ist durch ein schnelles Wachstum in die Tiefe, frühe lymphogene und hämatogene Metastasierung sowie konsekutiv durch eine ungünstige Prognose charakterisiert und tritt gehäuft jenseits des 55. Lebensjahres auf. Bevorzugte Körperstellen sind Rücken, Brust und Extremitäten.

Eine spezielle Unterform des nodulären malignen Melanoms stellt das amelanotische Melanom dar. In diesem Fall wird von den Tumorzellen aufgrund ihrer fortgeschrittenen Entartung kein Melanin mehr gebildet. Die Inzidenz für Melanome mit großer Tumordicke konnte beispielsweise in Neuseeland trotz frühzeitigerer Tumorerkennung bis 2004 nicht gesenkt werden (Richardson et al. 2008).

Das Lentigo-maligna-Melanom hat seinen Erkrankungsgipfel erst jenseits des 65. Lebensjahrs und entsteht meist UV-induziert aus einer Lentigo maligna, einem Melanoma in situ. Es ist zu 90% im Gesicht lokalisiert und wächst nur sehr langsam. Das akrolentiginöse maligne Melanom tritt bevorzugt an Handflächen, Fußsohlen oder als subunguales Melanom unter den Nägeln auf und ist durch ein aggressives und erosives Wachstum gekennzeichnet. Dunkelhäutige Menschen sind häufiger betroffen (Clark et al. 1969).

Das Risiko, an einem zweiten malignen Melanom zu erkranken, ist nach dem ersten Auftreten lebenslang konstant erhöht. Für Männer besteht dabei ein bis zu 62% höheres Risiko als für Frauen. Im Wesentlichen hängt das Risiko jedoch vom Alter des Patienten bei Diagnose des Ersttumors sowie der Tumordicke des Ersttumors ab, wobei die Unterart des ersten Melanoms eine eher untergeordnete Rolle spielt (McCaul et al. 2008).

Die Überlebensrate hängt im Wesentlichen von der Tumordicke ab, was eine frühzeitige Entdeckung umso wichtiger macht (Rass und Tilgen 2008). Die Standardtherapie besteht im Wesentlichen aus der operativen Entfernung des Tumors im Gesunden. Im Falle einer inoperablen Metastasierung ist eine Chemo- bzw. Immunochemotherapie indiziert. Das Ansprechen des Tumors auf diese Chemotherapie hängt unter anderem von seiner DNA-Reparaturkapazität ab (Wei et al. 1998). In naher Zukunft werden voraussichtlich auch antiproliferative,

antiangiogenetische sowie proapoptotische Therapieformen zum Einsatz kommen (Rass und Tilgen 2008). UV-Strahlung wird die bedeutendste Rolle aller exogenen Faktoren zur Karzinogenese und damit zur Entwicklung maligner Melanome zugeschrieben, insbesondere, wenn diese intensiv, kurzzeitig und intermittierend einwirkt (Gilchrest et al. 1999, Nelemans et al. 1993, Wei et al. 2003). Allerdings finden sich nur ca. 20% der Primärtumoren tatsächlich an sonnenexponierten Hautarealen, was größtenteils der Verteilung der Melanome bei XP-Patienten entspricht (Kraemer et al. 1994).

Zu den endogenen Risikofaktoren, im Laufe des Lebens ein malignes Melanom zu entwickeln, zählen beispielsweise ein heller Hauttyp (Typ I nach Fitzpatrick) sowie rötliches Haar (Wei et al. 1995) oder dysplastische Nävuszellnävi (Greene et al. 1985a, Tucker et al. 1993). Ca. 10% der Melanome zeigen eine familiäre Häufung (Fritsch et al. 1998, Greene et al. 1985b). Auch dysplastische Nävi können familiär gehäuft auftreten (Elder et al. 1980) und finden sich bei nahezu allen Melanompatienten mit familiärer Häufung sowie bei ca. 60% der Patienten mit sporadischem Auftreten maligner Melanome (Elder et al. 1980, Greene et al. 1985b). Auch ist die Entwicklung eines malignen Melanoms aus einem benignen Nävus über die Zwischenstufe eines dysplastischen Nävus im Sinne einer Mehrschrittkanzerogenese möglich (Ananthaswamy und Pierceall 1990).

Ätiologisch nehmen drei „Melanom-Gene“, CMM1 (Cutaneous-malignant-Melanoma-Gene 1), CMM2 (Cutaneous-malignant-Melanoma-Gene 2) sowie CDK4 (Cyclin-dependent Kinase 4) Einfluss. Durch die Deletion von 1p kommt es zum Verlust des Tumorsuppressorgens CMM1, eine Deletion von 9p führt zum Verlust des Tumorsuppressorgens p16, welches mit dem CMM2-Gen gleichzusetzen ist. Ferner führt die Deletion von 12q zur Ineffektivität der CDK4-Kinase. Alle diese Deletionen können eine ungehemmte und unkontrollierte Zellwucherung mit erhöhter genetischer Instabilität zur Folge haben.

Genetische Zusammenhänge liegen ebenfalls beim Dysplastischen Nävussyndrom vor (Solomon et al. 2004).

---

Melanome sind häufig mit Chromosomenaberrationen assoziiert, wobei es sich am häufigsten um Umlagerungen oder numerische Abweichungen des Chromosoms 1, -3p, +3q, partielle oder vollständige Trisomie 6, Trisomie 7, +8q, -9p, +9q, partiellen oder vollständigen Verlust von Chromosom 10, -17p, +17q sowie partielle oder vollständige Multisomie von Chromosom 20 handelt (Carless und Griffiths 2008). Durch die Untersuchung dieser Chromosomenaberrationen wurde auf dem Chromosom 9p21 der Genort INK4a/ARF als eine tumorsuppressive Region identifiziert, der durch verschiedene erste Exone sowie ein alternatives Leseraster für die folgenden beiden Exone die zwei Proteine p14ARF und p16INK4a codiert (Sherr und Roberts, 1995). Bei p16INK4a handelt es sich um ein aus 156 Aminosäuren bestehendes Protein mit einem Molekulargewicht von 16,57 kDa, welches vier Ankyrindomänen für Protein-Protein-Interaktionen enthält (Ruas und Peters 1998). p16INK4a ist in der Lage, die Aktivität von Komplexen aus CDK4 oder CDK6 und Cyclin D in der Vorbereitungsphase für die DNA-Synthese zu hemmen (Bruce et al. 2000) und hat somit als Zellzyklusinhibitor eine wichtige Kontrollfunktion vor dem Eintritt in die DNA-Synthesephase, um defekte Zellen aus dem Proliferationszyklus entfernen zu können (Serrano 1997). In vielen verschiedenen Tumoren, darunter auch in Melanomen, wurde eine Inaktivierung des Tumorsuppressorproteins p16 entdeckt (Serrano 1997, Malumbres et al. 1997), welche durch homozygote Deletion, Mutation und/oder Promotor-Hypermethylierung zustande kam (Caldas et al. 1994, Liggett und Sidransky 1998, Yang et al. 1995) und ein vermehrtes Eintreten geschädigter und somit möglicherweise tumoröser DNA in die Synthesephase des Zellzyklus zur Folge hat.

Bei Vorliegen von DNA-Schäden erfolgt ein Zellzyklusarrest normalerweise in einer der beiden G-Phasen oder spätestens in der S-Phase, und es werden die verschiedenen DNA-Reparaturenzyme der Zelle aktiviert.

So haben beispielsweise Patienten mit der seltenen autosomal-rezessiv vererbaren Krankheit Xeroderma pigmentosum, welcher Mutationen in den XP-Genen, die DNA-Reparaturenzyme kodieren, zugrunde liegen, aufgrund verminderter DNA-Reparaturkapazität und konsekutiv erhöhter Sensitivität gegenüber UV-Licht ein 1000-fach erhöhtes Risiko, an Hauttumoren wie Basalzellkarzinomen,

---

Plattenepithelkarzinomen sowie malignen Melanomen zu erkranken (Bootsma et al. 2002, Kraemer et al. 1987). Dieses wird durch die verminderte Fähigkeit, UV-induzierte DNA – Schäden zu reparieren, begründet (Kraemer et al. 1984, van Steeg und Kraemer 1999). Maligne Melanome treten hier sogar häufig multipel auf (Boddie und McBride 1988). Die verminderte DNA-Reparaturfähigkeit, welche mittels des sogenannten Wirts-Zell-Reaktivierungs-Assays quantifiziert werden konnte (Qiao et al. 2002a, Qiao et al. 2002b), resultiert in einem Ausfall jeweils eines der sieben DNA-Reparaturgene XPA bis XPG bzw. in einer verminderten Expression oder der Expression in seiner Funktion geminderter Genprodukte, welche allesamt bei der Nukleotidexzisionsreparatur eine Rolle spielen, was zur Manifestation der Krankheit Xeroderma pigmentosum führt (Bootsma et al. 2002, van Steeg und Kraemer 1999, Traupe 1997). Defekte im XPC-Gen sind bei europäischen und amerikanischen XP-Patienten am häufigsten (Khan et al. 1998). Eine weitere Krankheitsentität stellt die XP-Variante (XPV) dar, bei der die Nukleotidexzisionsreparaturmechanismen einwandfrei funktionieren. Hier liegt eine Mutation im die Polymerase  $\eta$  kodierenden Gen zugrunde, welche normalerweise fehlerfrei über Pyrimidin-Dimere hinweglesen kann (Broughton et al. 2002, Masutani et al. 1999).

Eine weitere genetisch determinierte Erkrankung, die mit Defekten der DNA-Reparaturgene vergesellschaftet ist, ist die seltene, autosomal-rezessiv vererbte Trichothiodystropie, die 1971 zum ersten Mal beschrieben wurde (Tay 1971). Es handelt sich hierbei um eine heterogene Krankheitsgruppe mit dem Leitsymptom kurzer brüchiger Haare, denen eine Synthesestörung schwefelhaltiger Keratine zugrunde liegt (Price et al. 1980). Häufig geht dies mit einer kongenitalen Ichthyose, körperlicher und geistiger Retardierung, Gesichtsfehlbildungen sowie vorzeitiger Alterung einher. In etwa der Hälfte der Fälle liegt eine erhöhte Photosensibilität vor, die durch Defekte in den Genen der Nukleotidexzisionsreparatur zustande kommt (Crovato und Rebora 1985). Liegt diese erhöhte Photosensibilität vor, ist in ca. 95% der Fälle eine Mutation im XPD/ERCC 2 -Gen (Chromosomenregion 19q13.2-q13.3) ursächlich (Rebora und Crovato 1987; Chu und Mayne 1996), die übrigen Fälle sind durch Mutationen im XPB-Gen begündet. Je nach Ausprägungsgrad werden verschiedene Varianten der Trichothiodystrophie unterschieden.

---

Auch dem Cockayne-Syndrom liegt ein Defekt der Nukleotidexzisionsreparatur zugrunde, und zwar der transkriptionsgebundenen Reparatur (TCR) (Yuan et al. 2007). Es resultiert eine seltene, autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung, die bei Lichtexposition mit roten, schuppigen Hautläsionen, jedoch ohne Hauttumore einhergeht. Des Weiteren sind für das Cockayne-Syndrom körperliche und geistige Retardierung sowie vorzeitige Alterung charakteristisch. Ferner werden Mikrozephalie, dysproportionierter Minderwuchs, Gehörlosigkeit, Gangstörungen, Beugekontrakturen sowie Gesichtsfehlbildungen beobachtet. Die mittlere Lebenserwartung beträgt ca. 12 Jahre (Johnson 1977).

Auf die DNA-Reparatur soll im Folgenden aufgrund ihres Stellenwerts bei der Entstehung maligner Melanome und anderer Tumoren nochmals genauer eingegangen werden.

Für die verschiedenen Arten von DNA-Schäden stehen verschiedene DNA-Reparaturmechanismen zur Verfügung. So sind z.B. die eukaryontische  $\delta$ - und  $\epsilon$ -Polymerase in der Lage, den zu synthetisierenden DNA-Strang während der Replikation zu überprüfen. Fehlerhaft eingebaute Nukleotide können sofort entfernt und neu synthetisiert werden, was als Mismatch-Reparatur bezeichnet wird. Diese repariert kurze Deletionen oder Insertionen, die entweder als zufällige Mutationen oder als Fehler der DNA-Polymerase bei der Replikation entstehen (Wildenberg und Meselson 1974).

Einzelstrangbrüche können direkt mittels DNA-Ligase (Walker und Sridhar 1976), Doppelstrangbrüche, die hauptsächlich durch radiochemische Noxen auftreten, entweder durch homologe oder durch nicht homologe Rekombination mittels Informationsgewinn vom Schwesterchromosom behoben werden (Lange 1975), was als Strangbruchreparatur bezeichnet wird.

Ein weiterer DNA-Reparaturmechanismus ist die Basenexzisionsreparatur, die im Falle einer fehlerhaften Basenpaarung mit konsekutiver Störung der Doppelhelixstruktur aktiviert wird. Eine DNA-Glykosylase entfernt hierbei die entsprechende Base, anschließend wird die verbleibende Desoxyribose durch eine Endonuklease ausgeschnitten. Die neue Base wird durch eine DNA-Polymerase synthetisiert und durch eine Ligase ligiert (Painter 1974).

---

Ferner gibt es zur Gewährleistung der Unversehrtheit der DNA beispielsweise Polymerasen, die fehlerfrei über DNA-Schäden hinweglesen können oder direkte Reversion von DNA-Schäden. Insgesamt sind bisher über 130 DNA-Reparaturenzyme bekannt (Wood et al. 2001).

Bei der Nukleotidexzisionsreparatur handelt es sich um einen komplexen Prozess, an dem über 20 verschiedene Proteine beteiligt sind (Wood et al. 2001), wobei die Xeroderma-pigmentosum (XP)-Proteine (XPA-XPG) eine entscheidende Rolle spielen. Sie stellt den DNA-Reparaturmechanismus mit dem größten Läsionsspektrum dar (de Boer und Hoeijmakers 2000) und wird bei helikalen Distorsionen der DNA aktiv. Substrate der Nukleotidexzisionsreparatur sind beispielsweise DNA-Schäden, die durch Aflatoxine, Benzpyrene oder Cisplatin entstanden sind. Bestrahlung mit UV-Licht kann spezifische Schäden in der DNA, die Cyclobuten-Pyrimidindimere und 6'-4' – Photoprodukte hervorrufen, die im Normalfall durch die Mechanismen der Nukleotidexzisionsreparatur sofort korrigiert werden (Hansson et al. 1989, Lindahl und Wood 1999, Wood 1999, de Boer und Hoeijmakers 2000), wobei 6-4-Photoprodukte im Vergleich zu Cyclopyrimidindimeren fünf mal schneller repariert werden (Mitchell und Nairn 1989). Auch Guanin-Addukte, Produkte Triplex formender Oligonukleotide, die die Expression bestimmter Onkogene inhibieren, sind Substrate der Nukleotidexzisionsreparatur (Ziemba et al. 2001).

Die Nukleotidexzisionsreparatur besteht aus zwei verschiedenen Reparatursystemen, nämlich der globalen genomischen Reparatur (global genome repair, GGR) und der transkriptionsabhängigen Reparatur (transcription coupled repair, TCR). Beide unterscheiden sich nur im ersten Schritt der Reparaturkaskade (van Steeg 2001), nämlich der Erkennung des DNA-Schadens, der bei der GGR durch die Enzymkomplexe XPC-HR23B oder DDB1-DDB2 (Christmann et al. 2003, Riedl et al. 2003, Sugawara et al. 2002, Volker et al. 2001) und bei der TCR durch eine plötzliche Blockade der RNA-Polymerase II vorgenommen wird (Mellon und Hanawalt 1989). In allen nachfolgenden Schritten der DNA-Reparatur unterscheiden sich GGR und TCR nicht.

---

GGR trägt durch kontinuierliche Entfernung von DNA-Schäden zur Reduktion von Mutationen bei, welche ansonsten als Langzeiteffekte zur Karzinogenese, Zelldysfunktion und Zellalterung beitragen können (Sugasawa et al. 2002).

TCR hingegen trägt zur schnellen Wiederaufnahme des Transkriptionsvorganges bei, indem sie Schäden in transkribierten DNA-Abschnitten beseitigt, die sonst zur Blockade der RNA-Polymerase II führen (Leadon und Lawrence 1991, Venema et al. 1992). So wird die Zelle vor akuten Folgen von DNA-Schäden wie z.B. Apoptose geschützt (Sugasawa et al. 2002).

Die enorme Spezifität der Nukleotidexzisionsreparatur (Emmert et al. 2000) kommt unter anderem durch die Selektivität von zwei DNA-Reparaturenzymen für die beiden wichtigsten UV-induzierten Photoprodukte der DNA zustande. So führt das XPC-Protein zur bevorzugten Reparatur von Cyclobutan-Pyrimidin-Dimeren (Emmert et al. 2000), das XPA-Protein jedoch von 6-4-Photoprodukten (Cleaver et al. 1995). Der Reparaturprozess läuft in folgenden Schritten ab: Schadenserkenkung, Demarkierung, Inzision und Heraustrennen, Lückenschluss und Ligation (de Boer und Hoeijmakers 2000). Der DNA-Schaden wird zunächst durch das XPC-Protein detektiert und durch XPA verifiziert. Beide DNA-Stränge werden anschließend im Bereich des Schadens aufgrund der gerichteten Helikaseaktivität der beiden XPB- und XPD-Proteine voneinander getrennt. Danach wird die DNA zu beiden Seiten des Schadens durch die als Endonuklease wirkenden XPG- und XPF-Proteine inzidiert.

Es entsteht hierbei ein 24-31 Nukleotide messender Strang, der den Schaden trägt, welcher grundsätzlich ca. 5 bp vom 3'-Ende dieses Stranges entfernt asymmetrisch zu liegen kommt. Nach dem Heraustrennen dieses Stranges wird die entstandene Lücke durch Neusynthese wieder aufgefüllt und ligiert (de Boer und Hoeijmakers 2000, Wood et al. 2001).

Fallen DNA-Reparaturmechanismen aus, beispielsweise durch eine Mutation in einem der XP-Gene, so kommt es besonders in der Metaphase zu Anhäufungen von Mutationen im Genom (Wei et al. 1996). Polymorphismen der DNA-Reparaturgene können also, wenn diese zu einer Herabsetzung der DNA-Reparaturkapazität führen, zur Erhöhung des Karzinomrisikos führen, wobei nur geringe Veränderungen

zu einer signifikanten Anhebung dieses Risikos führen können. So konnten Wei et al. 2003 eine verminderte DNA-Reparaturfähigkeit als einen unabhängigen Risikofaktor für die Entstehung kutaner maligner Melanome identifizieren. Des Weiteren konnten Wei et al. 1995 bereits zeigen, dass bei Patienten mit Basaliom die DNA-Reparaturkapazität vermindert ist (Wei et al. 1995).

Eine verminderte DNA-Reparaturkapazität scheint ebenfalls bei Patienten mit Lungenkrebs sowie Plattenepithelkarzinomen im Kopf- und Halsbereich vorzuliegen (Cheng et al. 1998, Wei et al. 1996). Auch bei klinisch gesunden Verwandten von XP-Patienten (vermutete heterozygote Träger eines defekten XP-Allels) wurde ein im Vergleich zur Normalbevölkerung 16fach erhöhtes Krebsrisiko beobachtet (Swift und Chase 1979). Ein erhöhtes Melanomrisiko kann ebenfalls aus bestimmten XP-Gen – Polymorphismen resultieren (Berwick und Vineis 2000, Mohrenweiser und Jones 1998). Einige Allelvarianten der DNA-Reparaturgene finden sich in verschiedenen hohen Anteilen in der Normalbevölkerung im Vergleich zu Krebspatienten (Dybdahl et al. 1999; Shen et al. 1998), was sich in Assoziationsstudien von Polymorphismen mit Hauttumoren (Nelson et al. 2002, Shen et al. 2001), wie auch dem malignen Melanom (Tomescu et al. 2001) zeigen ließ.

Zwei der sieben bisher bekannten XP-Gene, nämlich das XPC- und das XPG-Gen, wurden in der vorliegenden Arbeit bearbeitet. Das XPC-Gen, welches ein Protein aus 940 Aminosäuren codiert, wurde auf Chromosom 3p25 lokalisiert (Bootsma et al. 2002, Sugasawa et al. 1997). Es erkennt zunächst in einem Komplex mit HR23B (Masutani et al. 1994) den DNA-Schaden und bindet an ihn (deBoer und Hoeijmakers 2000; Sugasawa et al. 1998; Volker et al. 2001), wodurch die DNA-Reparatur initiiert wird. Das XPC-Protein kann hochspezifisch zwischen beschädigter und unbeschädigter DNA unterscheiden (Hey et al. 2002), da es eine hohe Affinität zu DNA besitzt, die sich im Falle eines Schadens noch weiter erhöht (Reardon et al. 1996). Es wird ferner eine Beteiligung des XPC-Proteins an der Trennung der DNA-Stränge vermutet (deBoer und Hoeijmakers 2000), da dieses bei Einzelstrang-DNA nicht mehr benötigt wird (Mu und Sancar 1997) und gegenüber den Einzelsträngen ebenfalls eine höhere Affinität zu Doppelstrang-DNA zeigt

(Sugasawa et al. 2002). Das XPC-Protein führt zu einer bevorzugten Reparatur von Cyclobutan-Pyrimidin-Dimeren gegenüber 6-4 Photoprodukten (Emmert et al. 2000). Es sind bisher sechs Polymorphismen des XPC-Genes bekannt (Khan et al. 2002), von denen drei, nämlich der Poly-AT – Polymorphismus im Intron9, der Intron11-C-6A – Polymorphismus sowie der Exon15 A2920C – Polymorphismus im Kopplungsungleichgewicht stehen (Khan et al. 2000, Blankenburg et al. 2005).

Das XPG-Gen, welches für eine strukturspezifische Endonuklease, die einen 3'-Einschnitt ca. 5 Nukleotide nach dem DNA-Schaden bewirkt, codiert, wurde auf Chromosom 13q32-33 lokalisiert (Takahashi et al. 1992). Im weiteren Verlauf der Nukleotidexzisionsreparatur wird XPG-Aktivität vorausgesetzt für den Strangeinschnitt durch den Komplex aus XPF und ERCC1 auf der 5'-Seite des DNA-Schadens (Mu et al. 1996, Volker et al. 2001, Wakasugi et al. 1997). Da einige XPG-Patienten im Rahmen von Genotyp-Phänotyp-Korrelationsstudien neurologische Auffälligkeiten zeigten, wurde eine weitere Funktion des XPG-Genes vermutet, die für die an die Transkription gebundene Reparatur oxidativer DNA-Schäden eine Rolle zu spielen scheint (Nospikel et al. 1997, Cooper et al. 1997, Reardon et al. 1997). Klungland et al. konnten 1999 zeigen, dass das XPG-Protein als Kofaktor für die Aktivierung der Basenexzisionsreparatur oxidativer DNA-Schäden fungiert. Oxidative DNA-Schäden entstehen im Rahmen des normalen Zellmetabolismus, können jedoch auch über Anregung zellulärer Photosensibilisatoren und Bildung freier Sauerstoffradikale durch UVA-Bestrahlung generiert werden (Boiteux und Radicella 1999, Rüniger 1999, Rüniger et al. 1995). Dies scheint für die Melanomentstehung ebenfalls eine Rolle zu spielen, da Versuche mit verschiedenen Tiermodellen ein erhöhtes Risiko für Melanome und andere Hauttumoren durch UVA-Bestrahlung ergeben haben (Matsui und DeLeo 1991, Setlow et al. 1993) und auch Fälle von malignen Melanomen bei Menschen durch UVA-Exposition z.B. in Sonnenstudios darauf hindeuten (Autier et al. 1991, Higgins und du Vivier 1992, Swerdlow et al. 1988).

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung, ob Varianten in XP-Genen bzw. XP-Proteinen zur Entwicklung maligner Melanome in der Normalbevölkerung

beitragen können. Zu diesem Zweck sollten die Häufigkeit sowie die Verteilung von sieben XPC- und XPG-Polymorphismen bei 30 Patienten mit multiplen sporadischen Primärmelanomen als einem Hochrisikokollektiv im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe desselben Alters von ebenfalls 30 Probanden bestimmt und quantifiziert werden. Weiterhin sollte eruiert werden, ob diese Polymorphismen zu einer quantitativ veränderten mRNA-Expression von mRNA-Varianten dieser Gene führen. Des Weiteren sollte geprüft werden, ob dadurch die funktionelle DNA-Reparaturkapazität dieser Patienten gemindert ist, der jeweils zugrunde liegende genetische Polymorphismus also als eine Art molekularer Marker für eine verminderte DNA-Reparaturkapazität und damit für ein erhöhtes Risiko einer Melanomentwicklung angesehen werden kann.

---

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

Hier nicht aufgeführte Materialien und Geräte werden in den entsprechenden Methodenkapiteln angegeben.

#### 2.1.1 Chemikalien

Ammoniumacetat	Sigma (München)
Bromphenolblau	Sigma (München)
Cäsiumchlorid	AppliChem (Darmstadt)
DEAE-Dextran	Sigma (München)
Desoxynukleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Qiagen (Hilden)
DMSO	Sigma (München)
ETDA	Sigma (München)
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH (Darmstadt)
Ficoll	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Isopropanol	Sigma (München)
Isopropyl-beta-D-Thiogalactopyranosid (IPTG)	BioVectra (Charlottetown, USA)
Lithiumacetat	Sigma (München)
Luciferin	Promega (Madison, USA)
NuSieve 3:1 Agarose	Cambrex (East Rutherford, USA)
Phenol	Carl Roth GmbH (Darmstadt)
Phytohämagglutinin (PHA)	Sigma (München)
RLT-Puffer	Qiagen (Hilden)
SeaKem LE Agarose	Biozym (Oldendorf)
SDS	Sigma (München)
X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-beta-D-	

Galactopyranosid)

bts BioTech (Berlin)

### 2.1.2 Enzyme

Lysozym

Boehringer (Mannheim)

Proteinase K

Sigma (München)

Restriktionsendonukleasen

MBI Fermentas (St. Leon-Rot)

RNAse T1

Boehringer (Mannheim)

Taq DNA-Polymerase

MBI Fermentas (St. Leon-Rot)

### 2.1.3 Medien und deren Bestandteile

Fötales Kälberserum

Biochrom (Berlin)

Select Agar

Invitrogen GmbH (Karlsruhe)

Select Pepton

Invitrogen GmbH (Karlsruhe)

Yeast Extract DIFCO (Lawrence, USA)

Iscove's Medium

Invitrogen GmbH (Karlsruhe)

### 2.1.4 Restriktionsenzyme

BamH I

NEB (Frankfurt am Main)

Bgl II

NEB (Frankfurt am Main)

Bme I

MBI Fermentas (St. Leon-Roth)

EcoR1

NEB (Frankfurt am Main)

DPN 1

NEB (Frankfurt am Main)

Fau I

MBI Fermentas (St. Leon-Roth)

MbolI

MBI Fermentas (St. Leon-Roth)

PvuII

MBI Fermentas (St. Leon-Roth)

### **2.1.5 Antibiotika**

Ampicillin	Boehringer (Mannheim)
Chloramphenicol	Sigma (München)
Penicillin-Streptomycin-Lösung	GIBCO BRL (Karlsruhe)

## **2.2 Organismen und Plasmide**

### **2.2.1 Bakterien**

Zur Amplifikation von Plasmiden wurde der antibiotikasensible Escherichia-coli-Stamm MLB 100 verwendet.

### **2.2.2 Eukaryotische Zellen**

Für die Transfektionsexperimente wurden aus Probandenvollblut isolierte mononukleäre Zellen (PBMC) eingesetzt.

### **2.2.3 Plasmide**

Für die Transfektionsexperimente wurden zwei Plasmide eingesetzt: Zur Bestimmung der DNA-Reparaturkapazität das Plasmid pCMV-Luc, welches die Firefly-Luciferase kodiert, und zur Kotransfektion das Plasmid pCMV-RL, welches zur Expression der Renilla-Luciferase führt.

Das Plasmid pCMV-Luc wurde im Rahmen eines Versuchs jeweils unbestrahlt, nach Bestrahlung mit 500 J/m<sup>2</sup> sowie nach Bestrahlung mit 1000 J/m<sup>2</sup> UV-C einer Wellenlänge von 254 nm (Stratalinker, UV-Crosslinker (Stratagene) eingesetzt, während das Plasmid pCMV-RL stets in der unbestrahlten Form kotransfiziert wurde.

Abbildung 1: pCMV-Luc

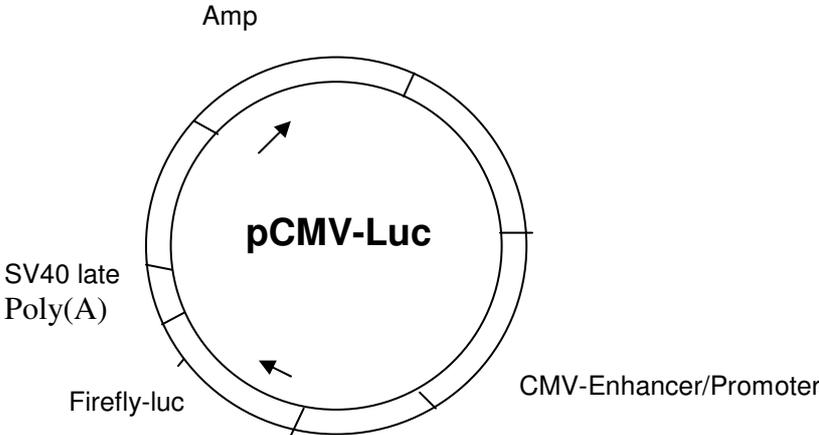
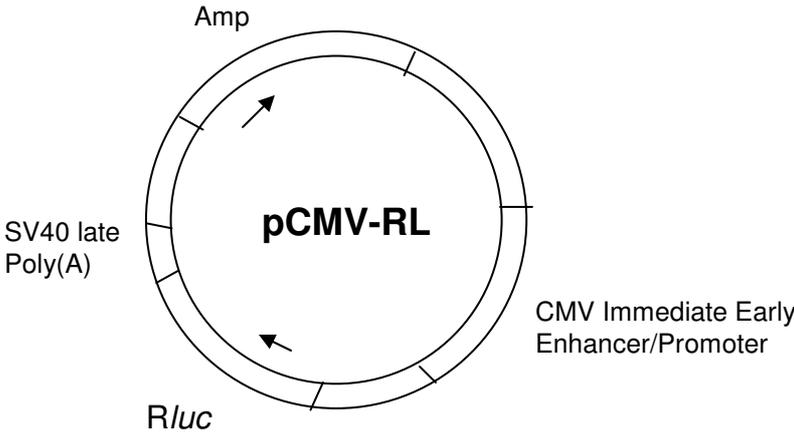


Abbildung 2: pCMV-RL



## **2.3 Standardmethoden für das Arbeiten mit Nukleinsäuren**

### **2.3.1 Sterilisation**

Um Mikroorganismen, Proteasen sowie Nukleasen zu inaktivieren, wurden hitzestabile Geräte und Lösungen für 20 min bei 121 °C und  $10^5$  Pa autoklaviert. Hitze-labile Lösungen wurden zu diesem Zweck sterilfiltriert (Sarstedt Sterilfilter 0,2  $\mu$ m).

### **2.3.2 Phenol-Chloroform-Extraktion**

Zur Extraktion von Proteinen aus Nukleinsäurelösungen wurde die Lösung mit einem Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (24:24:1) versetzt, gut durchmischt und anschließend bei 14.000 UpM und Raumtemperatur für 5 bis 10 min zentrifugiert (Eppendorfzentrifuge 5415). Es wurde die obere Phase abgenommen, mit dem gleichen Volumen Chloroform versetzt und erneut zentrifugiert. Die wässrige obere Phase, die die Nukleinsäuren enthielt, wurde abgenommen und im Anschluss einer Ethanolpräzipitation unterzogen.

### **2.3.3 Ethanolpräzipitation**

Die Konzentrierung von DNA wurde durch die Zugabe des zweifachen Volumens eiskalten puren Ethanols in Anwesenheit von 4,16 % (v/v) 5 M Natriumchlorid-Lösung erreicht. Nach gründlicher Durchmischung und anschließender Zentrifugation bei 13.000 UpM und 4 °C für 20 min (Eppendorfzentrifuge 5415C) wurde die präzipitierte DNA sedimentiert. Das Pellet wurde in der Vakuum-Zentrifuge getrocknet und im gewünschten Volumen H<sub>2</sub>O oder TE-Puffer aufgenommen.

---

TE

---

Tris (pH 8,0)	10 mM
EDTA (pH 8,0)	1 mM

### 2.3.4 Photometrische Bestimmung der Reinheit und Konzentration von Nukleinsäuren

Zur photometrischen Bestimmung von Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren in Lösungen wurden 1 cm Quarzküvetten verwendet (Beckmann DU640 Spectrophotometer). Zunächst wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm ( $OD_{260}$ ) gemessen, wobei einer  $OD_{260}$  von 1,0 für Doppelstrang-DNA eine Referenz-Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$  zugrunde gelegt wurde (Sambrook et al. 1989). Die DNA-Konzentration ( $C_{\text{Zwischen}}$ ) ließ sich daher folgendermaßen berechnen:

$$C_{\text{DNA}} = OD_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50 \mu\text{g/ml}$$

Es wurde außerdem die Extinktion bei einer Wellenlänge von 280 nm ( $OD_{280}$ ) bestimmt, was dem Absorptionsmaximum für Proteine entspricht. Dadurch ermöglichte sich eine Abschätzung des Reinheitsgrades der Nukleinsäurelösung. Ein  $OD_{260}:OD_{280}$ -Quotient von 1,8 bis 2,0 weist hierbei auf proteinfreie Nukleinsäurelösungen hin (Sambrook et al. 1989).

### 2.3.5 Agarose-Gelelektrophorese

Da Nukleinsäuren bei normalem pH-Wert eine negative Gesamtladung besitzen, lassen sie sich mittels Agarose-Gelelektrophorese (Sambrook et al. 1989) im elektrischen Feld auftrennen. Es ist darüber hinaus eine Überprüfung der Integrität und Spezifität von amplifizierten oder enzymatisch modifizierten DNA-Molekülen möglich.

In Abhängigkeit von der erwarteten Größe der zu trennenden DNA-Fragmente wurde die Agarosekonzentration des Gels zwischen 1% und 2,5% (w/v) gewählt. Die Agarose wurde dafür kurz in 1x TBE in einem Mikrowellenherd aufgeköcht und nach Abkühlung auf circa 50°C in eine Gelkammer gegossen. Größe und Anzahl der benötigten Geltaschen wurden über einen entsprechenden Kamm gewählt. Das erhärtete Gel wurde anschließend in eine ebenfalls mit 1x TBE-Puffer gefüllte Elektrophorese-Kammer überführt.

Die DNA-Proben wurden mit zweifach destilliertem Wasser auf 10 µl aufgefüllt sowie zur Markierung mit 2 µl Bromphenolblau versetzt und in die Geltaschen eingebracht. Als DNA-Größenmarker wurde je nach zu erwartender Größe eine 100 bp oder eine 1000 bp DNA-Leiter (MBI-Fermentas) verwendet.

Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 30 – 100 V. Nachdem das Gel 15 min lang in einem Ethidiumbromid-Bad (50 µl Ethidiumbromid in 750 ml H<sub>2</sub>O) angefärbt wurde, konnte das Bandenmuster mit Hilfe eines Transilluminators sichtbar gemacht und gegebenenfalls fotografisch dokumentiert werden.

### 2.3.6 RNA-Extraktion

Um ein Degradieren der RNA zu vermeiden, erfolgte die RNA-Isolierung unmittelbar nach Entnahme der Blutproben über einen Ficoll-Gradienten. 10 ml heparinisierten Vollbluts wurde mit 22,5 ml PBS vermischt, mit 10 ml Ficoll unterschichtet und für 20 min bei 1800 UpM und Raumtemperatur zentrifugiert. Interphase und Zellschleier wurden in ein neues Gefäß überführt, mit PBS (phosphate buffered saline) auf 50 ml aufgefüllt und erneut für 10 min bei 1300 UpM und RT zentrifugiert. Der Überstand

wurde verworfen, das Zellpellet in 600 µl mercaptoethanolhaltigem RLT-Puffer resuspendiert. Während sämtlicher Arbeitsschritte wurde auf RNase-freies Arbeiten geachtet. Die sich anschließende Aufreinigung und Homogenisierung des Zellysates erfolgte mittels der Qiagen Schreddersäule des Rneasy Mini Kits, die eine Siliziumoxid-Membran enthält, nach Herstellerangaben (Qiagen, Hilden, Deutschland). Um eine Kontamination auch mit kleinsten Mengen DNA zu vermeiden, beinhaltete diese unter anderem einen Inkubationsschritt mit DNase. Der RNA-Gehalt wurde schließlich in einer 1:30 Verdünnung durch die Bestimmung der Ratio bei 260 und 280 nm (zwischen 1,8 und 2,0) photometrisch nach der Formel

$$C_{\text{RNA}} = U_{260} \times 1/30 \times 0,04 = x \text{ mg}/\mu\text{l}$$

bestimmt. Anschließend wurden sämtliche Proben durch Zugabe von RNase-freiem Wasser auf die einheitliche Konzentration von 50 ng/µl eingestellt.

PBS (phosphate buffered saline)

---

Natriumchlorid (NaCl)	8 g
Kaliumchlorid (KCl)	0,2 g
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	1,44 g
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0,24 g
Aqua dest.	800 ml

Mit Salzsäure (HCl) wird der pH-Wert auf 7,4 eingestellt und anschließend mit Aqua dest. auf 1 Liter aufgefüllt.

### 2.3.7 Synthese von cDNA

Die RNA-Proben wurden mit dem RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) 1:1 in cDNA umgeschrieben. Dazu wurden je 10 µl (entsprechend 500 ng bei der einheitlichen Konzentration von 50 ng/µl) der Proben mit 0,5 µg der im Kit enthaltenen Oligo-dt und RNase freiem Wasser zu einem umfassenden Reaktionsgemisch zusammengegeben. Dieses wurde kurz vermischt und zentrifugiert, anschließend bei 70°C für 5 min inkubiert. Auf Eis wurden dem Ansatz zuerst 4xReaktionspuffer, 1µl Ribonucleaseinhibitor und 2 mM dNTP Mix hinzugegeben, so dass ein Gesamtvolumen von 20 µl erreicht wurde. Der Reaktionsansatz wurde nach einer fünfminütigen Inkubationsphase schließlich mit 1µl der reversen Transkriptase versetzt und für eine Stunde bei 42°C inkubiert. Es schloss sich eine Denaturierungsphase von 10 min bei 70°C an, bevor die Proben schließlich bei -20°C gelagert werden konnten.

### 2.3.8 Restriktionsenzymverdau

Der Restriktionsenzymverdau wurde zur Verifizierung der Identität und Integrität von DNA-Elementen verwendet. Dabei wird doppelsträngige DNA durch Restriktionsendonukleasen an spezifischen, häufig palindromischen Sequenzen gespalten. DNA-Elemente können anhand der Größe der entstehenden Fragmente identifiziert werden.

Pro µg DNA wurde 1 unit (U) der Restriktionsendonuklease in der jeweils geeigneten Pufferlösung des Herstellers eingesetzt und für 2 h bei 37°C inkubiert. Die entstandenen DNA-Fragmente wurden anschließend durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt.

## 2.4 Methoden zur molekularen Klonierung

### 2.4.1 Medien, Nährböden und Antibiotikastammlösungen

#### LB-Medium

---

Select Pepton	10 g
Yeast Extract	5 g
NaCl	10 g
H <sub>2</sub> O bidest	ad 1000 ml

Es wurde zur Herstellung von Nährböden LB-Medium unter Zusatz von 15 g/l Bacto Agar (Difco) autoklaviert und nach Abkühlung auf ca. 50°C gegebenenfalls mit einem Antibiotikum in der unten angegebenen Endkonzentration versetzt. Anschließend wurden jeweils etwa 30 ml des Gemisches in 10 cm Petrischalen gegossen. Es entstand durch weiteres Abkühlen ein fester Nährboden, der bis zur Verwendung bei 4°C gelagert wurde.

<u>Ampicillin</u>	50	mg/ml	in	H <sub>2</sub> O,	sterilfiltriert
					Endkonzentration in Medien und Nährböden 50 µg/ml
<u>Kanamycin</u>	10	mg/ml	in	H <sub>2</sub> O,	sterilfiltriert
					Endkonzentration in Medien und Nährböden 10 µg/ml
<u>Chloramphenicol</u>	40	mg/ml	in	100% Ethanol,	frisch angesetzt
					Endkonzentration in Lösungen 200 mg/l

## 2.4.2 Herstellung kompetenter Bakterien

Um Plasmid-DNA aufzunehmen, wurden Bakterien des *E. coli*-Stammes MLB 100 verwendet, die zuvor hierfür kompetent gemacht wurden.

Eine Einzelkolonie des Bakterienstammes wurde dazu mit 5 ml LB-Medium versetzt und bei 37 °C und 200 UpM im Schüttelinkubator (Infors, Bottmingen, Schweiz) für mehrere Stunden inkubiert. Am nächsten Tag wurden 500 ml LB-Medium mit dieser Vorkultur beimpft und erneut 4 h lang im Schüttelinkubator bei 37°C und 200 UpM inkubiert. Anschließend wurde die Kultur für 20 min bei 2300 UpM und 2°C abzentrifugiert (Heraeus Megafuge 1,0; Rotor #2252M). Der Überstand wurde verworfen, das Bakterienpellet in 50 ml eiskaltem zweifach destillierten Wasser resuspendiert und erneut für 20 min bei 2300 UpM und 2°C zentrifugiert. Wieder wurde der Überstand entfernt, das Pellet nun in 25 ml eiskaltem H<sub>2</sub>O bidest aufgenommen und für 10 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss folgte eine erneute Zentrifugation für 15 min bei 2300 UpM und 2°C, wonach der Überstand verworfen wurde. Das entstandene Zellpellet wurde in 10 ml zehnprozentigem Glycerol resuspendiert und für 10 min bei 2300 UpM und 2°C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das Pellet in 2 ml zehnprozentigem Glycerol aufgenommen. Schließlich wurde die Zellsuspension aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80°C gelagert.

## 2.4.3 Transformation kompetenter E.coli

Plasmid-DNA wurde zu Vermehrungszwecken mittels Transformation in kompetente *E. coli* eingebracht. Die Transformation wurde mittels Elektroporation durchgeführt. Dazu wurden 80 µl gefrorener *E. coli* MLB 100-Suspension auf Eis aufgetaut und mit 100 – 1000 ng DNA in einer Elektroporationsküvette (2 mm Gap (Bio Rad, Hercules, USA)) vermischt. Die Transformation erfolgte bei 2,5 kV, 600 Ohm und 25 µFd, wobei die Zeitkonstante 10 möglichst überschritten werden sollte (Bio-Rad Gene Pulser). Anschließend wurde die Bakteriensuspension mit LB-Medium auf 1 ml aufgefüllt und im Schüttelinkubator für 1 h bei 37°C inkubiert.

Im Anschluss daran wurde die Bakteriensuspension auf einem ampicillinhaltigen Nährboden ausgestrichen, um die transformierten Individuen von den übrigen zu selektieren. Nach circa zwei Tagen bildeten die Bakterien bei vorhandenem Ampicillin-Resistenz-Plasmid Kolonien, die dann beispielsweise zur Maxi-Präparation von Plasmid-DNA (s. 2.4.4) eingesetzt werden konnten.

#### **2.4.4 Maxi-Präparation von Plasmid-DNA**

Plasmid-DNA für DNA-Sequenzierung und Transfektionen wurde durch Amplifizierung des Plasmids in kompetenten *E. coli* Bakterien und anschließende Aufreinigung sowie Isolierung über einen CsCl-Dichtegradienten hergestellt (modifiziert nach Sambrook et al. 1989).

Dazu wurde eine mit dem Plasmid transformierte Einzelkolonie in 5 ml LB-Medium mit Ampicillin versetzt und über Nacht im Schüttelinkubator bei 37°C und 200 UpM inkubiert. Die Vorkultur wurde in 1 l LB-Medium mit Ampicillin überführt und weiterhin bei 200 UpM und 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Durch Extinktionsmessung bei einer Wellenlänge von 600 nm ( $OD_{600}$ ) im Spektralphotometer wurde das Bakterienwachstum überprüft und bei einer optischen Dichte zwischen 0,6 und 0,8 durch Zugabe von 5 ml Chloramphenicolstammllösung gestoppt (Endkonzentration 200 mg/l). Durch die Behandlung mit Chloramphenicol reichern Bakterien Plasmid-DNA an, da durch die Substanz Proteinbiosynthese und Replikation der chromosomalen DNA, nicht aber der Plasmid-DNA gehemmt wird (Sambrook et al. 1989).

Die Bakteriensuspension verblieb über Nacht weiterhin bei 37°C und 200 UpM im Schüttelinkubator. Am nächsten Tag wurde sie in 250 ml Zentrifugengefäße verteilt und bei 4000 - 6000 UpM und 4°C für 20 - 30 min zentrifugiert (Beckman JA-14 Rotor). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in je 10 ml TE resuspendiert, wobei der Inhalt von jeweils zwei 250 ml-Zentrifugenbechern in einem 50 ml-Zentrifugenröhrchen zusammengeführt wurde. Anschließend wurde bei 5000 UpM und 4°C für 20 min zentrifugiert (Rotor SW28), der Überstand erneut verworfen. Jedes Pellet wurde in 8,5 ml Lösung I (s.u.) resuspendiert, mit 4 ml

Lysozym-Lösung (50 mg/ml) versetzt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 17,1 ml Lösung II (s.u.) hinzugegeben und das Gemisch für 10 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss daran wurden 12,8 ml Lösung III (s.u.) dazu gegeben, gut vermischt und erneut 10 min auf Eis inkubiert, wobei das Gemisch zwischenzeitlich immer wieder durch Schwenken gut durchmischt wurde. Im Anschluss daran wurde für 25 min bei 8000 UpM und 4°C zentrifugiert (Beckman JA 20-Rotor), der Überstand aus je zwei

50 ml-Zentrifugenröhrchen in einem 250 ml-Zentrifugenbecher vereinigt und mit dem halben Volumen an 7,5 M Ammoniumacetat versetzt. Nach Inkubation auf Eis für 15 min erfolgte eine erneute Zentrifugation (Beckman JA 14-Rotor) für 15 min bei 5000 UpM und 4°C. Der Überstand wurde mit dem halben Volumen Isopropanol versetzt, gut vermischt und für 15 min bei 13.000 UpM und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen, das Pellet mit 25 ml 70 %igem Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 15 min bei 13.000 UpM und 4°C wurde der Überstand verworfen und die Pellets luftgetrocknet.

Im Anschluss daran wurde jedes Pellet in 5 ml Proteinase K-Puffer (s.u.) resuspendiert und für 15 min bei 65°C inkubiert. Nach dem Abkühlen wurde zur Eliminierung etwaiger Proteinreste eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt, danach zweimal mit 70 prozentigem Ethanol gewaschen, die Pellets für 15 min bei 13.000 UpM und 4°C zentrifugiert und luftgetrocknet.

Die Pellets wurden in 3,73 ml 1x TE vollständig gelöst, mit 0,27 ml Ethidiumbromid versetzt und zu 4 ml CsCl-Lösung (s.u.) gegeben. Das Gemisch wurde in ein 10 ml-Ultrazentrifugenröhrchen (Quick-Seal, Beckman) überführt, blasenfrei mit CsCl-Lösung aufgefüllt und mit der Analysenwaage auf 50 mg genau austariert. Anschließend wurden die Röhrchen verschweißt und für 20 h bei 60.000 UpM und 20°C zentrifugiert (Beckman Ti 70K-Rotor, Beckman Ultrazentrifuge L5-65).

Durch den Dichtegradienten, der bei der Ultrazentrifugation entsteht, wird die durch Ethidiumbromid gefärbte zirkuläre Plasmid-DNA als distinkte Bande sichtbar. Diese Bande wurde mit einer Kanüle und einer sterilen 5 ml-Spritze abgesaugt und in ein 15 ml-Röhrchen überführt. Zur Entfernung des Ethidiumbromids wurde das gleiche Volumen Isoamylalkohol zu der DNA-Lösung hinzugegeben, kräftig geschüttelt und bei 1500 UpM und Raumtemperatur für 5 min zentrifugiert, wobei dieser Vorgang so

oft wiederholt wurde, bis beide Phasen völlig farblos und somit das Ethidiumbromid vollständig ausgewaschen war. Zur Entfernung des CsCl wurde im Anschluss zweimal über 12 h in Dialyse-Kassetten gegen TE-Puffer (pH 8,0) dialysiert (Pierce Slide-A-Lyzer Dialysekassetten).

Schließlich wurden Konzentration und Reinheit der amplifizierten Plasmid-DNA photometrisch bestimmt und das Plasmid mittels Restriktionsenzymverdau und anschließender Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

## 2.5 Polymerase-Kettenreaktion

### 2.5.1 Primer

S80neu	(MGW-Biotech AG, Ebersberg)
S81neu	(MWG-Biotech AG, Ebersberg)
S82	(MWG Biotech AG, Ebersberg)
S83	(MWG Biotech AG, Ebersberg)
Ex15F	(MWG Biotech AG, Ebersberg)
3'ntc DNAR	(MWG-Biotech AG, Ebersberg)
N1m	(MGW Biotech AG, Ebersberg)
N2n	(MWG Biotech AG, Ebersberg)
H2	(MWG Biotech AG, Ebersberg)
E1	(MWG Biotech AG, Ebersberg)
3330-3349 FWD	(Gibco Life technologies Eggenstein-Leopoldshafen)
3624-3607 REV	(Gibco Life technologies Eggenstein-Leopoldshafen)

### 2.5.2 Genotypisierung XPC Exon 8

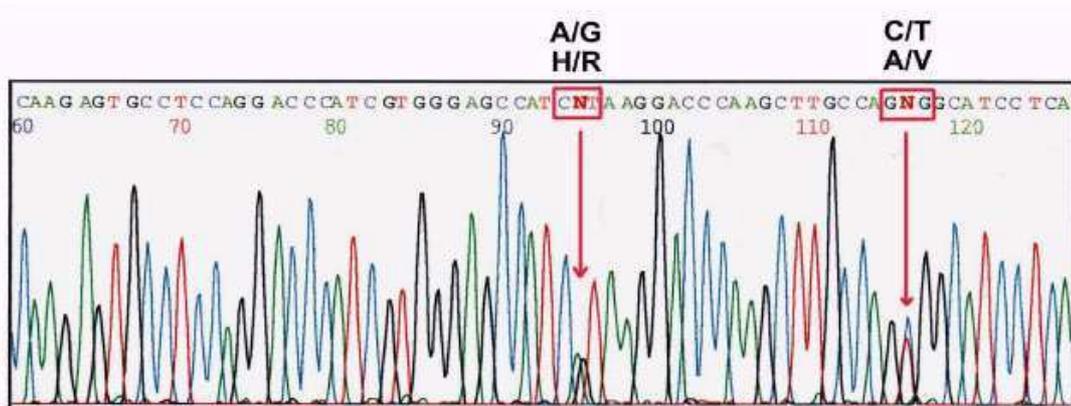
Die Genotypen der beiden XPC-Exon8-Polymorphismen G1580A und T1601C wurden mittels PCR-Amplifikation und nachfolgender Sequenzanalyse bestimmt. Die beiden Polymorphismen, die sich nur 20 bp voneinander entfernt befinden, führen zu einem Aminosäureaustausch (Arg492His; Val499Ala). Die PCR für beide Polymorphismen wurde in einem Reaktionsansatz von 20 µl durchgeführt, der Folgendes beinhaltet: 1x MBI PCR-Puffer ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (MBI Fermentas, St. Leon-Roth, Deutschland), 0,2 mM d’NTP-Mix (MBI Fermentas), jeweils 12 pmol der Primer S80neu (5’-AGC CTC TGA TCC CTC TGA TGA T-3’) und S81neu (5’-TCT TTT TTC TGC CTT CTC ACC ATC G-3’) (MWG-Biotech), 5% DMSO, 2 Einheiten der rekombinanten Taq-Polymerase (MBI Fermentas), sowie 1,4 µl (~140 ng) der gelösten DNA. Jeder Ansatz wurde mit Aqua bidest auf 20 µl aufgefüllt.

Es wurde folgendes Temperaturprogramm für die PCR verwendet: 3 min bei 95 °C, 34 Zyklen [30 sec bei 95 °C (Denaturierung), 30 sec bei 62 °C (Primeranlagerung), 45 sec bei 72 °C (Extension)] und schließlich 3 min bei 72 °C.

Zur Sequenzierung wurden die PCR-Templates mit dem QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) gereinigt und anschließend mit fluoreszenzmarkierten dNTPs versehen. Dies erfolgte in einem Reaktionsansatz von 10 µl, der folgende Komponenten beinhaltet: 2 µl des aufgereinigten Amplifikates, 5 pmol des Primers S80, 0,5x ABI Prism Sequenzierpuffer (MBI Prism, Darmstadt, Deutschland), 1,5 µl Big Dyes Ready Reaction Mix (ABI Prism). Es wurden 25 Zyklen mit 20 s bei 96 °C, 15 s bei 55 °C und 4 min bei 60 °C durchgeführt. Im Anschluss daran wurden die Proben mit 250 µl 100% Ethanol und 10 µl einer 3M Natriumacetat-Lösung (pH 5,8) versetzt, für 10 min auf Eis inkubiert und für 30 min bei 13000 Upm und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 250µl 75%igem Ethanol resuspendiert und erneut für 10min bei 13000 Upm und RT zentrifugiert. Daran schloss sich die Dehydratation des Pellets für 10 min bei 37 °C an. Zum Start der Sequenzierung wurde das Pellet in 30 µl TSR (Template suppression reagent, ABI Prism) aufgenommen und einem Denaturierungsschritt von 2 min bei 90 °C sowie 5 min Inkubation auf Eis zugeführt. Danach wurden die Proben in die entsprechenden

Sequenzierungsgefäße (Genetic Analyzer Sample Tubes 0,5 ml, ABI Prism) überführt. Nachdem die Behälter mit den Septa verschlossen worden waren, wurde der Sequenzer mit diesen beladen. Die Typisierung der Proben erfolgte im Kapillarsequenzer ABI Prism 310 Genetic Analyzer (ABI Prism, Darmstadt, Deutschland) (Abbildung 3). Mit folgenden Einstellungen liefen die Proben im Sequenzer: 30 Injektionssekunden, 2,0 kW Injektionsspannung, 15,0 kW Laufspannung, 50 °C Geltemperatur, 20 min Laufzeit.

Abbildung. 3: Heterozygoter Genotyp XPC Exon8 1580 A/G und 1601 C/T (Typisierung mittels Kapillarsequenzer ABI Prism 310 Genetic: An den mit Pfeilen markierten Positionen zeigen sich jeweils zwei Peaks, es müssen daher an diesen Stellen beide Allele vorliegen.)



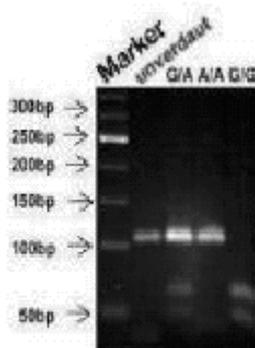
### 2.5.3 Genotypisierung XPC Exon 10

Der Polymorphismus im Exon10 des XPC-Gens führt an Position 2166 zu einem Basenaustausch (G2166A), der allerdings seinerseits keinen Aminosäureaustausch zur Folge hat (Arg687Arg). Dieser Polymorphismus wurde mittels PCR und nachfolgender Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus-Methode (RFLP) nachgewiesen. Die Reaktionsansätze der PCR enthielten ein Gesamtvolumen von 20 µl, welches sich wie folgt zusammensetzte: 1x MBI PCR-Puffer mit (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

(MBI Fermentas, St. Leon-Roth), 0,2 mM d’NTP-Mix (MBI Fermentas), jeweils 10 pmol der Primer S82 (5’-GAC TGA GTT ACC TTT GTG TCC-3’) sowie S83 (5’-TAC TTC TCC AAG CCT CAC C-3’) (MWG Biotech AG, Ebersberg), 5% DMSO, 2 Einheiten der rekombinanten Taq-Polymerase (MBI Fermentas), 2mM MgCl<sub>2</sub>, sowie 2 µl (~200 ng) der gelösten DNA.

Es wurde folgendes Temperaturprofil für die PCR verwendet: 95°C für 3 min, 35 Zyklen [45 s bei 95°C (Denaturarion), 45 s bei 81°C (Primeranlagerung), 1 min bei 72°C (Elongation)], abschließend 5 min bei 72°C. Im Anschluss daran wurde ein Restriktionsenzymverdau des PCR-Produktes mit *BmeI* (MBI Fermentas, St. Leon-Roth) durchgeführt. Jeder Reaktionsansatz enthielt 5 µl des PCR-Produktes, 1 U *BmeI* 13901, 1 µl Buffer 0 (MBI Fermentas) und wurde mit Aqua bidest auf ein Gesamtvolumen von 10 µl aufgefüllt. Die Ansätze wurden schließlich bei 37°C für mindestens 1 h inkubiert, danach mit jeweils 2 µl Bromphenolblau versetzt und zur elektrophoretischen Auftrennung auf ein 4%-iges Gel (NuSieve 3:1 Agarose, BMA Bio Whittaker Molecular Applications, Maine, USA) aufgetragen. Enthält der Genotyp die Base Guanin, so spaltet *BmeI* das ursprünglich 110 bp große PCR-Produkt in zwei Fragmente der Größe 65 bp und 45 bp (Abbildung 4).

Abbildung 4: Beispielhafter Nachweis des Polymorphismus XPC Exon10 G2166A (Agarosegelelektrophorese): Das Restriktionsenzym Bme 1 schneidet das 110 bp große PCR-Produkt nur bei Vorliegen der Base Guanin in Fragmente der Größen 65 bp und 45 bp. Bei heterozygotem Vorliegen der Base Guanin erfolgt die Verdauung im Gegensatz zum homozygoten Vorliegen nicht vollständig.

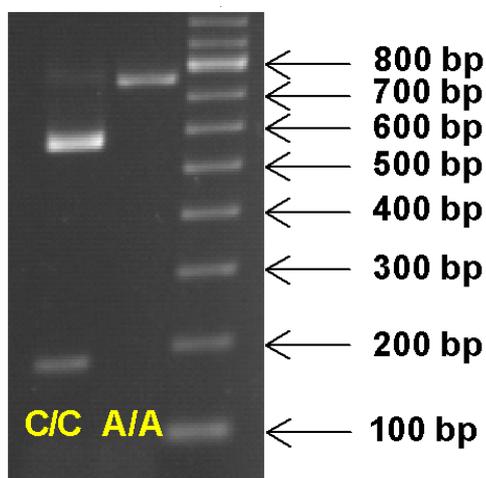


### 2.5.4 Genotypisierung XPC Exon 15

Der SNP (single nucleotide polymorphism) des XPC Exon15 führt zum Aminosäureaustausch an Position 939 (Lys939Arg). Die PCR des entsprechenden DNA-Abschnittes des XPC-Exon15-Polymorphismus wurde in einem Reaktionsansatz von 20 µl durchgeführt, der folgende Bestandteile enthielt: 1x MBI PCR-Puffer mit (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (MBI Fermentas), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTP-Mix, 2 Einheiten der rekombinanten Taq-Polymerase (MBI Fermentas, St. Leon-Rot), 5% DMSO (Sigma, München), 6 pmol des Primers Ex15F (5'GGA GGT GGA CTC TCT TCT GAT G-3') und 7 pmol des Primers 3'ntc DNAR (5' TAG ATC CCA GCA GAT GAC C-3') (MWG-Biotech), sowie 1,5 µl der gelösten DNA (ca. 150 ng). Es wurde für die PCR folgendes Temperatur-Profil verwendet: 95°C für 3 min, 35 Zyklen [45 s bei 95°C (Denaturation), 45 s bei 56°C (Primeranlagerung), 1 min bei 72°C (Extension)], abschließend 72°C für 5 min.

Im Anschluss wurde ein Restriktionsenzymverdau des XPC-Exon15-PCR-Produktes mit *PvuII* (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) durchgeführt. 10 µl Reaktionsansatz enthielten: 5 µl PCR-Produkt, 1 U *PvuII*, 1x Konzentration Puffer. Dieser wurde für 1h bei 37°C inkubiert. *PvuII* spaltet das 765 bp lange PCR-Produkt in zwei Fragmente einer Länge von 58 bp bzw. 180 bp (Abbildung 5). Zur elektrophoretischen Auftrennung der Fragmente wurde ein 2%-iges Gel (Seakem, Biozym bioproducts; Hamburg, Deutschland) verwendet.

Abbildung 5: Nachweis der jeweils homozygoten Genotypen des XPC Exon15-A2920C-SNP (Agarosegelelektrophorese: Nur bei Vorliegen des Genotyps C/C wird von dem 765 bp großen PCR-Produkt durch PvuII ein 180 bp langes Fragment abgespalten. Liegt der Genotyp A/A vor, so bleibt das 765 bp große PCR-Produkt erhalten.)

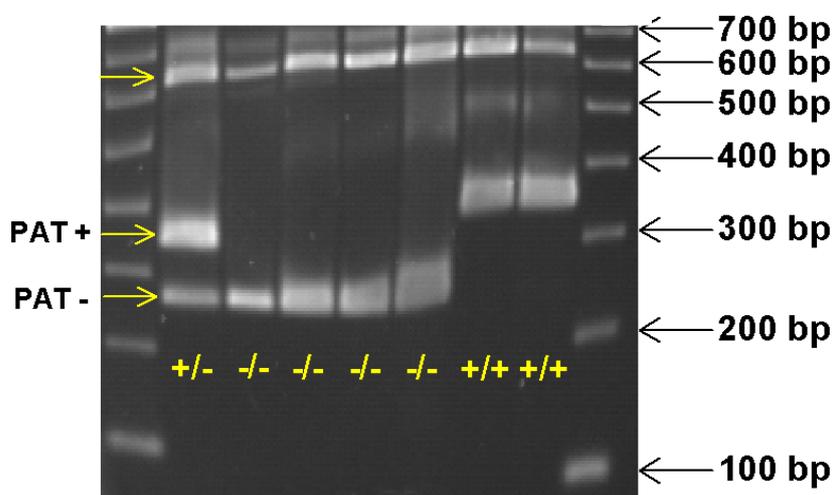


### 2.5.5 Genotypisierung XPC Intron 9 PAT

Der PAT-Polymorphismus im Intron 9 besteht aus einer 83 bp Insertion aus A und T (poly(AT)) und einer 5 bp Deletion GTACC an Position 1457-1461. Durch PCR-Amplifikation mit dem Primerpaar N1m (5'-TAG CAC CCA GCA GTC AAA G-3') und N2n (5'TGT GAA TGT GCT TAA TCG TG-3') (MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland) wird entweder ein 266 bp langes Fragment erzeugt, wenn der Insertions-Deletions-Polymorphismus fehlt (PAT-), oder ein 344 bp langes Fragment, welches die Insertion anzeigt (PAT+). Als interner Standard wurden Primer des beta-Aktin - Gens (MWG-Biotech AG) verwendet, wodurch ein

zusätzliches 621 bp langes Fragment entstand. Die PCR des PAT-Polymorphismus erfolgte mittels des Clontech Advantage 2 Kit (Clontech Laboratories, Inc.; Heidelberg, Deutschland). Das Reaktionsvolumen von 20 µl enthielt: 1x Clontech Advantage PCR-Puffer, jeweils 5-6 pmol der Primer N1m (5'-TAG CAC CCA GCA GTC AAA G-3') und N2n (5'TGT GAA TGT GCT TAA TCG TG-3'), 6 pmol der beta-Aktin sense (5'-ACA CTG TGC CCA TCT ACG AGG-3') und beta-Aktin anti-sense Primer (5'AGG GGC CGG ACT CGT CAT ACT-3'), 0,2 mM dNTP-Mix und 1x Clontech Advantage 2 Polymerase. Es wurde 1 µl (~100 ng) DNA hinzugegeben. Anschließend wurde die PCR folgendermaßen durchgeführt: 15 min bei 95°C, im Anschluss daran 35 Zyklen mit 95°C für 30 s (Denaturation) und 66°C für 3 min (Primeranlagerung, Extension), zum Abschluss 66°C für 3 min. Abbildung 6 zeigt beispielhaft den Nachweis eines PAT-Polymorphismus nach Auftrennung in einem 2%igem Agarosegel (Seakem LE Agarose, Biozym Bioproducts; Hamburg) und Anfärbung in Ethidiumbromid-Lösung (0,5 µg/ml).

Abbildung 6: Beispiel der Genotypisierung des PAT-Polymorphismus im Intron9 des XPC-Gens (Agarosegelelektrophorese: Liegt der PAT-Polymorphismus vor, zeigt sich ein PCR-Produkt einer Größe von 344 bp. Fehlt dieser Polymorphismus, entsteht ein PCR-Produkt von 266 bp. Bei Heterozygotie sind beide PCR-Produkte nachweisbar.)

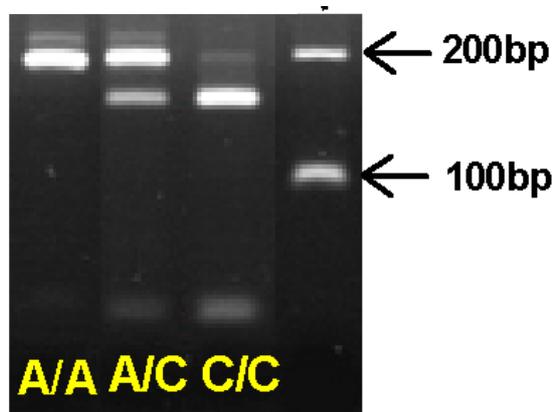


### 2.5.6 Genotypisierung XPC Intron 11

Die Analyse des SNP Intron11 C-6A in der Spliceakzeptorstelle vor Exon12 erfolgte ebenfalls mittels PCR- und RFLP-Nachweis. Die PCR des XPC Intron11 C-6A erfolgte in einem Reaktionsansatz von 20 µl. Dieser enthielt: 1x PCR Rxn Puffer (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), 0,2 mM d’NTP-Mix (MBI), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, jeweils 8 pmol der Primer H2 (5’-GGC AGG AAG AGG TAC ACA TTC-3’) und E1 (5’-AAA TGA CCT GGG CCT GTT TG-3’) (MWG Biotech), 2,5 Einheiten der rekombinanten Taq-Polymerase (Invitrogen) sowie 1 µl (~100 ng) der gelösten DNA. Für die PCR wurde folgendes Temperaturprofil verwendet: 3 min bei 94°C, 35 Zyklen [15 sec bei 94°C (Denaturation), 58°C für 30 sec (Primeranlagerung), 72°C für 30 sec (Extension)], schließlich 3 min bei 72°C.

Im Anschluss an die PCR schloss sich ein Restriktionsenzymverdau des PCR-Produktes mit der Restriktionsendonuklease *FauI* an. Dabei enthielten die Reaktionsansätze jeweils 5µl des PCR-Produktes, 0,2 µl der Restriktionsendonuklease *FauI* (~0,2 U), 1 x Puffer. Die Ansätze wurden für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde jeder Ansatz mit 2 µl Bromphenolblau versetzt und zur elektrophoretischen Auftrennung auf ein 2,5%-iges Agarosegel aufgetragen. Das ursprünglich 203 bp große PCR-Produkt wird durch *FauI* in zwei Fragmente der Größe 160 bp und 43 bp gespalten (Abbildung 7).

Abbildung 7: Nachweis des SNP C-6A im XPC Intron11 (Agarosegelelektrophorese: Liegt die Base Cytosin vor, schneidet das Restriktionsenzym *FauI* das ursprünglich 203 bp große PCR-Produkt. Bei Homozygotie (C/C) zeigen sich also nur ein 160 bp großes sowie ein 43 bp großes Fragment. Bei Heterozygotie liegt zusätzlich das Ausgangsprodukt (203 bp) vor.)



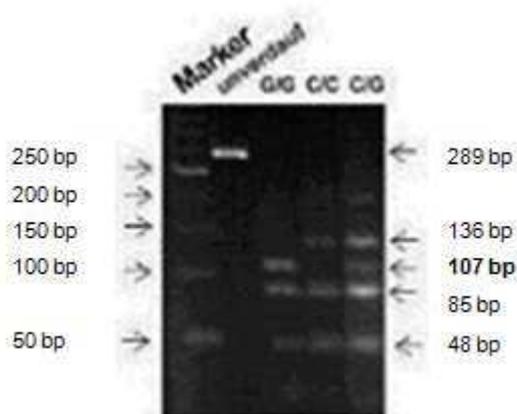
### 2.5.7 Genotypisierung XPG Exon 15

Der Polymorphismus im Exon15 des XPG-Gens führt zu einem Aminosäureaustausch (His1104Asp) und wurde mittels PCR und RFLP nachgewiesen. Die PCR wurde in einem Reaktionsansatz von 20 µl durchgeführt, der folgende Komponenten beinhaltet: 1x MBI PCR-Puffer mit  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (MBI Fermentas), 8,5 pmol des Primers 3330-3349 FWD (5' TTT GAG CTA CTT GAT AAG GC-3'), 10 pmol des Primers 3624-3607 REV (5'-CAC CTC CAT TCT TCA CGG-3') (Gibco Life technologies Eggenstein-Leopoldshafen, Deutschland), 0,2 mM dNTP-Mix (MBI Fermentas), 2 Einheiten (U) der rekombinanten Taq-Polymerase (MBI Fermentas), 5% DMSO sowie 1,5 µl (~150 ng) der gelösten DNA.

Für die PCR wurde folgendes Temperaturprofil verwendet: 3 min bei 95°C, 34 Zyklen [45 sec bei 95°C (Denaturation), 45 sec bei 58°C (Primeranlagerung), 1 min bei 72°C (Extension)] und abschließend 5 min bei 72°C.

An die PCR schloss sich ein Restriktionsenzymverdau mit *MboII* (MBI Fermentas) an. Dieser wurde in einem Reaktionsansatz von 25 µl durchgeführt, der 20 µl PCR-Produkt, 2 U *MboII* sowie 1x Puffer enthielt. Die Ansätze wurden für 1 h bei 37°C inkubiert, anschließend mit jeweils 2 µl Bromphenolblau versetzt und zur elektrophoretischen Auftrennung auf ein 4%-iges 3:1 NuSieve-Agarosegel (BMA Bio Whittaker Molecular Applications; Maine, USA) aufgetragen. Enthält der Genotyp die Base Cytosin, so spaltet *MboII* das ursprünglich 289 bp große PCR-Produkt in drei Fragmente der Größe 136 bp, 85 bp und 48 bp. Enthält der Genotyp die Base Guanin, so spaltet *MboII* das ursprüngliche PCR-Produkt in die Fragmente 107 bp, 85 bp, 48 bp sowie 29 bp. Bei Heterozygotie werden alle diese Fragmente (136 bp, 107 bp, 85 bp, 48 bp und 29 bp) im Gel sichtbar (Abbildung 8).

Abbildung 8: Elektrophoretischer Nachweis des XPG-Exon15-G3507C-Polymorphismus (Agarosegelelektrophorese: Ist die Base Guanin vorhanden, so wird das ursprünglich 289 bp große PCR-Produkt durch *MboII* in 4 Fragmente (107 bp, 85 bp, 48bp und 29 bp) geschnitten. Liegt hingegen die Base Cytosin vor, so wird das 289 bp große Ausgangsprodukt in 3 Fragmente (136 bp, 85 bp und 48 bp) gespalten. Bei Heterozygotie liegen alle diese Fragmente gleichzeitig vor.



### 2.5.8 Real-time-PCR und Quantifizierung

Die Reaktionsansätze für die real-time-PCR mit dem LightCycler-System (Roche, Mannheim) der Spliceformen des Exon12 enthielten jeweils 10 µl des SYBR Green Master Mix (Qiagen, Hilden), je 8 pmol der vorwärts- und rückwärtsgerichteten Primer (s. Tabelle 1) (MWG-Biotech AG, Ebersberg) und 2µl der cDNA-Probe (entsprechend 50ng bei postulierter 100%iger RT-Reaktion). Dieser Ansatz wurde mit RNase-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 20µl aufgefüllt. Für den Ansatz des beta-Actingens wurden 2 µl der 1:10 verdünnten cDNA-Probe (entsprechend 5ng) eingesetzt und mit 10 pmol der zugehörigen Primer (s. Tabelle 1) sowie 10 µl des SYBR Green Master Mix wiederum zu einem Gesamtvolumen von 20 µl mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt. Dabei verblieb wie bei der regulären PCR jeweils eine Kapillare als Leeransatz ohne Probenzugabe, stattdessen wurde diese jedoch mit dem äquivalenten Volumen an RNase-freiem Wasser versehen.

Tabelle 1: Primer der LightCycler-Reaktionen

	Primerbezeichnung	Primersequenz	Richtung
XPC Exon12 iso	oCCB-336	5'-CAG ACA GAG GAG TAT CAG CC-3'	vorwärts
	oCCB-330	5'-GAT GTA TCC ATC AGT CCT TC-3'	rückwärts
XPC Exon12 wt	oCCB-331	5'-CGT GGA CGG GAA GGT GC-3'	vorwärts
	oCCB-337	5'-GGC CAC GCG GTG TAG AT-3'	rückwärts
β-Aktin	L Actin-F	5'-CCC AAG GCC AAC CGC GAG AAG AT-3'	vorwärts
	L Actin-R	5'-GTC CCG GCC AGC CAG GTC CAG-3'	rückwärts

Die verwendeten Primer wurden so gewählt, dass sie die Splicevarianten spezifisch amplifizieren (Khan et al. 2002). In jeder Reaktion liegt jeweils ein Primer auf einer Exon-Exon-Verbindung. Die Primer oCCB-336, der am Beginn des Exon11 liegt, und oCCB-330, der am Übergang Exon11 zu Exon13 liegt, führen daher nur dann zu einer Amplifikation, wenn die cDNA eine Deletion des Exon12 aufweist. Ist das Exon12 vorhanden, kann sich der Primer oCCB-330 nicht anlagern, so dass eine PCR-Produktvermehrung unmöglich ist. Der Primer oCCB-331 überspannt die

Exon11-Exon12-Grenze und kann sich daher bei Exon12-Deletion nicht anlagern. oCCB-337 befindet sich wiederum am Ende des Exon12. Dem real-time-PCR-Programm mit dem LightCycler-System ging grundsätzlich eine 15-minütige Denaturierung bei 95°C voraus, der jeweils eine bestimmte Anzahl an Zyklen (30 für beta-Actin, 40 für Exon12 wt, 50 für Exon12 iso) mit je 15 s Denaturierung bei 94°C, 30 s Primeranlagerung (bei 64°C für beta-Actin, 54°C für Exon12-Wildtyp und 51°C für Exon12-Isoform) sowie 20 s Elongation bei 72°C folgten. Der Elongationsschritt beinhaltet zusätzlich noch die Messung der Fluoreszenzemission. Nach Abschluss der Amplifikationszyklen erfolgte zum Erstellen der Schmelzkurve ein kontinuierlicher Temperaturanstieg von 65°C auf 95°C mit ständigen Messungen entlang des Temperaturanstiegs. Diese Schmelzkurven zeigten jeweils einen einzelnen engen Anstieg an der Stelle der Schmelztemperatur der entsprechenden Primer als Zeichen der Amplifikation eines einzigen spezifischen Produktes. Im Kontroll-Agarosegel ergab sich ebenfalls immer nur eine Bande.

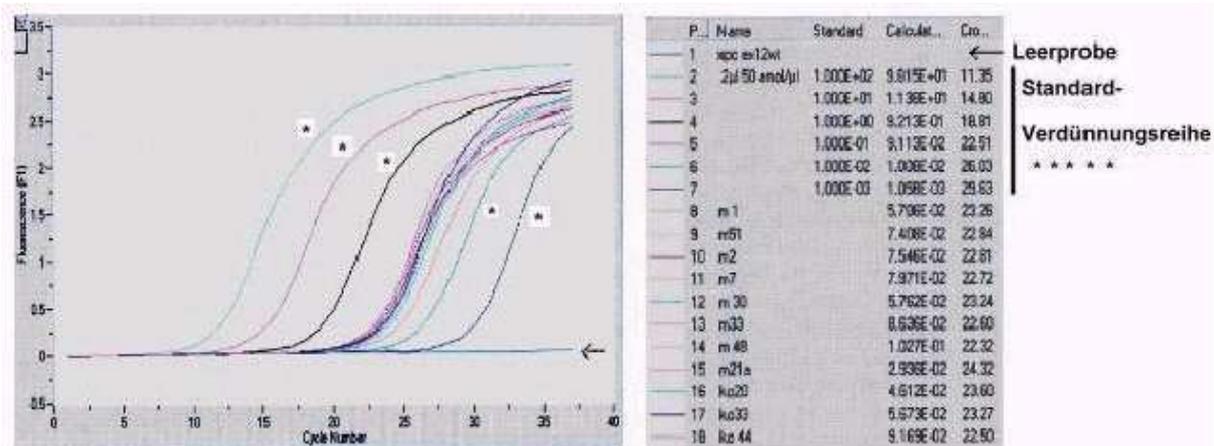
Die Evaluierung der Konzentrationen erfolgte über das von der LigtCycler Analysis Software automatisch errechnete Maximum der 2. Ableitung („Second Derivative Maximum“). Dabei wird die Zyklusnummer errechnet, in der der maximale Anstieg der Fluoreszenzaktivität in der linearen Phase der log-Kurve vorliegt. Ausgehend von diesen Werten wird anschließend die cDNA-Konzentration errechnet. Es wurde bei den verschiedenen Versuchsdurchläufen eine Abweichung der Steigung der Standardkurve von maximal 3% vom Mittelwert toleriert. Die Steigungen lagen dabei stets zwischen  $-3,3$  und  $-4$  (entsprechend einer PCR-Effizienz von 100 - 78%).

Die so bestimmten Mengen an beta-Actin, Wildtypform des XPC-Gens und alternativ gesplicerter Form mit Deletion des Exon12 (Isoform) wurden zueinander in Relation gesetzt. Beta-Actin wird als sogenanntes „Housekeeping“-Gen verwendet, wobei eine annähernd konstante Expression von beta-Actin im selben Genotyp auch unter verschiedenen Versuchsbedingungen angenommen wird. Somit variiert die Ratio der Konzentrationen aus beta-Actin und Zielgen je nach Expressionslevel des Zielgens. Da sich aber die beta-Actin-Konzentration wieder herauskürzt, spielte

dieses Gen bei der endgültigen Berechnung der Ratio aus Wildform und Isoform keine Rolle.

Im LightCycler (Roche, Mannheim) wird die Fluoreszenzaktivität der eingesetzten Verdünnungen bekannter Konzentration und der Proben, deren Konzentration noch zu bestimmen ist, gemessen. SYBR Green lagert sich dazu in die DNA der PCR-Produkte ein, wobei das Fluoreszenzsignal sich proportional zur Kopienzahl des PCR-Produktes verhält. Je höher die Menge an eingesetzten Zielmolekülen ist, desto früher beginnt die exponentielle Phase der PCR-Amplifikation (sogenannter Schwellenwert-Zyklus). In der exponentiellen Phase der Amplifikation erfolgt die Messung der Konzentrationen und wird mit Standards verglichen (Abbildung 9). Durch die Verwendung der Standardverdünnungsreihen bei jeder Amplifikationsreaktion wird eine absolute Quantifizierung der cDNA-Mengen ermöglicht.

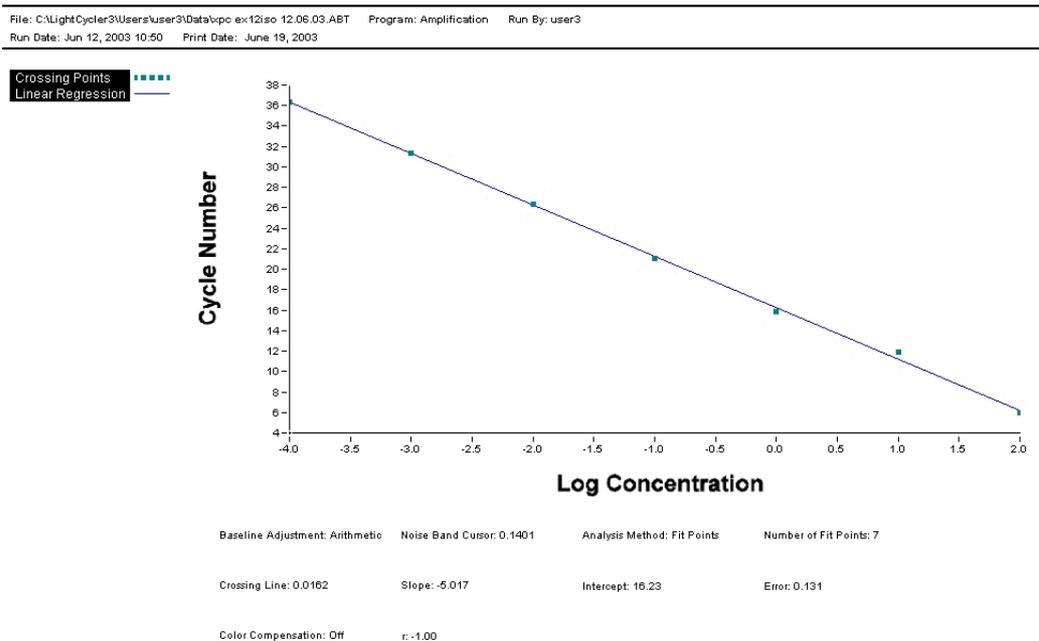
Abbildung 9: Messung der cDNA-Mengen im LightCycler



### 2.5.9 Herstellung der externen Quantifizierungsstandards

Als externe Quantifizierungsstandards dienten Verdünnungsreihen der jeweiligen real-time-PCR-Produkte für Exon12-Wildform, Deletion-Exon12 und beta-Aktin, die über eine Säule des QIAquick PCR Purification Kits (QIAGEN, Hilden, Deutschland) gereinigt wurden. Zur Herstellung dieser Quantifizierungsstandards wurden die durch eine initial mit dem LightCycler (Roche, Mannheim) durchgeführte real-time-PCR (Bedingungen s.u.) erhaltenen Produkte (XPC-Exon12-Wildtyp, Isoform „Deletion von Exon12“ und beta-Aktin) auf ein 2%-iges NuSieve-Agarosegel (BMA Bio Whittaker Molekular Applications; Maine, USA) aufgetragen und densitometrisch im Vergleich zur einer quantitativen DNA-Leiter (Mass Ruler, MBI Fermentas), die Banden bestimmter Konzentrationen enthält, quantifiziert. Zudem wurden die Amplifikate mittels Basensequenzanalyse kontrolliert. Auf diese Weise wurden absolute Konzentrationsmengen des jeweiligen spezifischen PCR-Produktes erhalten, welche als Mengenstandard bei der quantitativen real-time-PCR dienten. Für jedes PCR-Produkt wurde eine Verdünnungsreihe über sechs Log-Einheiten ( $10^2$ - $10^3$  amol/ $\mu$ l) ausgehend von der ermittelten Ursprungskonzentration erstellt. Dies entspricht etwa  $6 \times 10^8$  bis 600 Kopien/ $\mu$ l für die drei PCR-Produkte. Die Verdünnungsreihe wurde bei jeder real-time-PCR-Messung entsprechend dem zu messenden PCR-Produkt mitamplifiziert, so dass sich eine Standardkurve ergab, auf die sich die weiteren Messwerte bezogen. Aufgrund der Übereinstimmung von Standard- und Zielsequenz konnte die gleiche PCR-Effizienz sowohl für Standards als auch für zu ermittelnde Proben gewährleistet werden. Die Verwendung der Standardverdünnungsreihen erlaubte eine absolute Quantifizierung der mRNA-Mengen. Alle Messwerte lagen grundsätzlich innerhalb der Standardkonzentrationen. In Abbildung 10 wird die aus einer Verdünnungsreihe eines PCR-Produkts erstellte Standardkurve, mittels der die cDNA-Proben der Probanden quantifiziert wurden, gezeigt:

Abbildung 10: Standardkurve zur Quantifikation von cDNA-Proben, aus der Verdünnungsreihe eines PCR-Produkts erstellt



## 2.6 Methoden für die Arbeit mit Zellkulturen

### 2.6.1 Standardbedingungen

Die Arbeit mit Zellkulturen erfolgte unter sterilen Bedingungen, wobei alle verwendeten Lösungen zuvor autoklaviert oder sterilfiltriert wurden. Es wurden für die Kultur von eukaryotischen Zellen Zellkulturflaschen (greiner bio-one, 250 ml, 75 cm<sup>2</sup>; 12x75 mm), für Transfektionen 5 ml Polystyrene-Röhrchen (BD Falcon, Heidelberg) verwendet.

Die Zellen wurden im Inkubator (Heraeus) bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und unter Begasung mit 7,5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Medien und Lösungen wurden vor ihrer Verwendung im Wasserbad auf 37°C vorgewärmt.

---

## 2.6.2 Medien

Medium für Zellkultur von PBMCs (PLB)

---

Iscove's Medium	80%
FCS	20%
Penicillin/Streptomycin	1%

Einfriermedium (100ml)

---

Iscove's Medium	40 ml
Fötales Kälberserum	40 ml
DMSO	20 ml

## 2.6.3 Mediumwechsel

Um das verbrauchte Medium zu ersetzen, wurde dieses nach Zentrifugation mit 1300 UpM und Raumtemperatur für 10 min in einem 50 ml-Röhrchen (greiner bio-one; Polypropylene) abgesaugt, und die verbliebenen Zellen in 50 ml frischem komplettem Kulturmedium vorsichtig resuspendiert. Anschließend wurde der Ansatz in eine neue Zellkulturflasche überführt und weiter inkubiert.

## 2.6.4 Zellen splitten

War das Medium stark mit Zellkonglomeraten durchsetzt und auch der Boden der Kulturflasche bewachsen, wurde ein Teil der Zellen entfernt, um eine Wachstumshemmung zu verhindern. Zu diesem Zweck erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei 1300 Upm und Raumtemperatur. Der Überstand enthielt das

verbrauchte Medium und wurde verworfen, das Zellpellet wurde in einem dem gewünschten Teilungsverhältnis entsprechenden Volumen kompletten Kulturmediums aufgenommen, so dass der gewünschte Zellanteil in jeweils 5 ml Kulturmedium in eine neue Kulturflasche gegeben werden konnte, in der bereits 45 ml frisches Medium vorgelegt waren. Die übrigen Zellen wurden entweder verworfen oder auf neue Zellkulturflaschen verteilt.

### **2.6.5 Gefrierkonservierung und Revitalisierung von Zellen**

Von allen Patienten wurde venöses Blut entnommen, aus dem sofort mittels Ficoll-Gradient periphere Blut-Mononukleäre Zellen (PBMC) isoliert wurden.

PBMC wurden über längere Zeit in flüssigem Stickstoff bei  $-196^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Dazu wurden diese Zellen zunächst mittels Ficoll-Gradienten aus Vollblut isoliert, mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und für 10 min bei 1400 UpM und Raumtemperatur zentrifugiert, wobei der Überstand verworfen wurde. Das Zellpellet wurde zweimal mit PBS gewaschen und jeweils erneut für 10 min bei 1400 UpM und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde jedes Mal verworfen, das Pellet zunächst in 10 ml PBS resuspendiert. Anschließend erfolgte die Zählung der Zellen in der Neubauer-Zählkammer, woran sich ein weiterer Zentrifugationsschritt für 10 min bei 1400 UpM und Raumtemperatur anschloss. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet in 0,5 ml Iscove's Medium pro  $10 \times 10^6$  Zellen sowie 0,5 ml Einfriermedium pro  $10 \times 10^6$  Zellen resuspendiert. Zum Schutz der Zellen vor Eiskristallen wurde dem Einfriermedium DMSO zugesetzt, das letztendlich in einer Endkonzentration von 10 % (v/v) vorlag. Es wurden jeweils 1,0 ml Aliquots in auf Eis gelagerte Einfrierröhrchen gegeben und in Isopropanol bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Nach 24 h wurden sie in einen Tank mit flüssigem Stickstoff überführt.

Das Auftauen der Zellen zur Revitalisierung wurde zur Vermeidung von toxischen Effekten durch das DMSO zügig durchgeführt. Sofort nach der Entnahme der Einfrierröhrchen aus dem Stickstofftank wurden diese daher in einem  $37^{\circ}\text{C}$ -Wasserbad geschwenkt, bis noch ein kleiner Eiskern zu erkennen war, und danach

sofort in ein 50 ml Röhrchen mit 15 ml Kulturmedium überführt. Es erfolgte eine Zentrifugation für 2 min bei 1300 UpM und RT, der Überstand wurde abgesaugt. Das Zellpellet wurde nochmals in 15 ml Kulturmedium gewaschen, um das DMSO vollständig auszuwaschen. Schließlich wurde das Pellet in 10 ml Kulturmedium aufgenommen, in eine Kulturflasche mit weiteren schon vorgelegten 40 ml Kulturmedium gegeben und im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nach drei Tagen konnten die Zellen zur Transfektion eingesetzt werden.

### **2.6.6 Transfektion mit der DEAE-Dextran-Methode**

PBMC wurden nach der DEAE-Dextran-Methode (modifiziert nach Sambrook et al. 1989) transfiziert. Es wurden je 75 ng pCMV-RL zur Kontrolle der Transfektionseffizienz kotransfiziert, während je 50 ng pCMV-Luc jeweils in drei Ansätzen unbestrahlt, nach Bestrahlung mit 500 J/m<sup>2</sup> sowie nach Bestrahlung mit 1000 J/m<sup>2</sup> transfiziert wurden.

Die DEAE-Dextran-Methode beruht darauf, dass an DEAE-Dextran gebundene DNA durch Endozytose von Zellen aufgenommen wird.

Für eine Transfektion mit 9 Polystyrene-Röhrchen wurden in der Regel die Zellen aus 4 bis 6 Einfrierröhrchen eingesetzt, nachdem diese drei Tage lang in einer Zellkulturflasche mit 50 ml Kulturmedium im Brutschrank bei 37°C inkubiert worden waren. Es wurden also ca.  $5 \times 10^6$  Zellen für einen Transfektionsansatz eingesetzt. Für die einzelnen Transfektionsgruppen wurde die DNA in sterilen 12x75 mm Polystyrene-Röhrchen vorgelegt, außerdem in einem Eppendorf-Gefäß 12,5 µl/Röhrchen DEAE-Dextran (Sigma, München) (60mg/ml in Aqua bidest, Molekulargewicht (MG) 500.000) für die gesamte Transfektion sowie das kotransfizierte Reportergenplasmid.

Die Zellen wurden aus der Kulturflasche in ein 50 ml Röhrchen überführt und für 10 min bei 800 UpM und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde in einem weiteren Röhrchen aufgefangen und später für das Abstoppen der Transfektion verwendet. Das Zellpellet wurde zunächst in 15 ml STBS gewaschen und erneut für 10 min bei 800 UpM und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet

anschließend in 200 µl STBS pro Transfektionsansatz resuspendiert. Die Transfektion selbst erfolgte, indem jeweils 200 µl dieser Zellsuspension in die Polystyrene-Röhrchen mit der bereits vorgelegten DNA gegeben und vorsichtig durchmischt wurden, woran sich eine Transfektionszeit von 15 min im Inkubator bei 37°C anschloss. Zum Beenden der Transfektion wurde jedes Röhrchen mit 1 ml konditioniertem Medium versetzt und für 10 min bei 800 Umdrehungen pro Minute (UpM) und Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet mit 2 ml eines 1:1-Gemisches aus konditioniertem, also bereits verbrauchtem, und frischem Kulturmedium resuspendiert. Schließlich wurden die Röhrchen für 48 h im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

#### STBS

---

Tris-HCl pH 7,5	25 mM
NaCl	137 mM
KCl	5 mM
CaCl <sub>2</sub>	700 µM
MgCl <sub>2</sub>	500 µM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	600 µM

#### 2.6.7 Zellyse

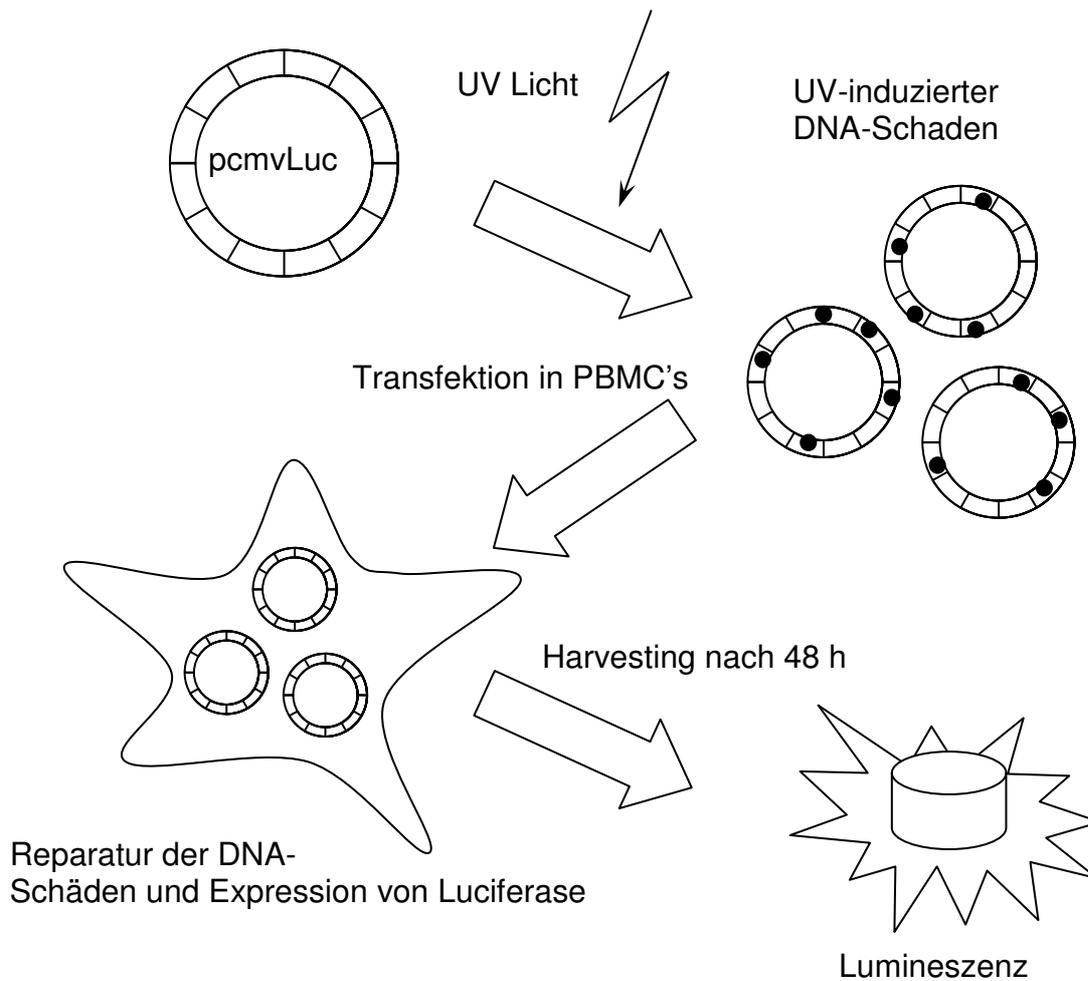
48 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert, um die Menge an funktionellem Luciferaseenym im Zelllysate zu messen. Dazu wurden die Röhrchen zunächst für 10 min bei 1300 UpM und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 2 ml PBS resuspendiert und erneut für 10 min bei 1300 UpM und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die verbliebenen Zellen zum Lysieren mit 1x passive Lysis buffer (Promega) resuspendiert.

KoAc

### 2.6.8 Wirtszell-Reaktivierungs - Assay

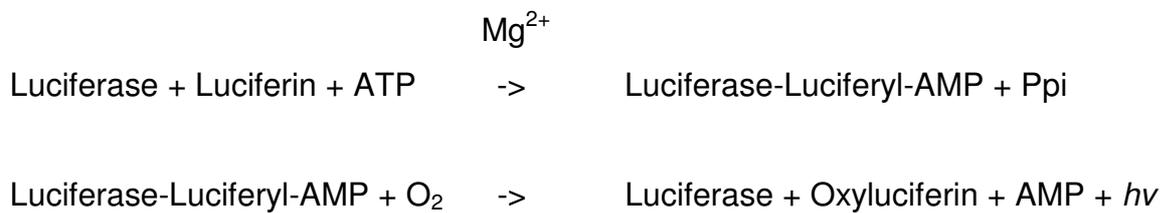
Der Wirtszell-Reaktivierungs - Assay dient dazu, DNA-Reparaturkapazität zu quantifizieren (Thoms et al. 2007). Plasmide mit DNA-Schäden, die in der vorliegenden Arbeit durch Bestrahlung mit UV-Licht induziert wurden, werden in Wirtszellen (hier PBMCs) transfiziert. Die Plasmide codieren unter anderem ein Reportergen (hier Luciferase). Es ist davon auszugehen, dass durch die UV-Bestrahlung in Abhängigkeit von der applizierten Energie auch eben diese Reportergene beschädigt wurden. Die vorhandenen DNA-Schäden werden nun durch die Mechanismen der DNA-Reparatur in den Wirtszellen in Abhängigkeit von deren Aktivität sowie der Inkubationszeit behoben und das Genprodukt des Reportergens exprimiert (hier Luciferase). Luciferasen katalysieren Reaktionen, in denen Luciferin mit Sauerstoff durch Oxidation zu energiereichen, instabilen Dioxetanen oder Dioxetanonen reagiert. Diese Substanzen zerfallen aufgrund ihrer Instabilität leicht und setzen dabei ihre hohe Energie in Form von Biolumineszenz frei (Greer und Szalay 2002). Das Vorhandensein von Luciferase führt also zur Lumineszenz des Zellysates, welche mittels Luminometer gemessen werden kann. Die im Luminometer gemessenen relativen Lichteinheiten dienen also als Quantifizierung der DNA-Reparaturkapazität der verwendeten Wirtszellen. In der vorliegenden Arbeit wurden pCMV-Luc (codiert Firefly-Luciferase) in bestrahlter bzw. unbestrahlter Form sowie pCMV-RL, welches Renilla-Luciferase als Marker für die Transfektionseffizienz codiert, in lymphoblastoide Zellen transfiziert. Die Lumineszenz der zwei Tage nach der Transfektion extrahierten Luciferasen, die mit der DNA-Reparaturkapazität korreliert, wurde mittels Luminometer gemessen (Abbildung 11).

Abbildung 11: Wirtszell-Reaktivierungs - Assay



### 2.6.9 Messung der Luciferase-Reportergen-Aktivität

In Anwesenheit von  $Mg^{2+}$ -Ionen bildet das Enzym Luciferase unter ATP-Verbrauch mit seinem Substrat Luciferin einen Luciferase-Luciferyl-AMP-Komplex. Dieser wird decarboxyliert, und unter Emission von Licht im Wellenlängenbereich von 560 nm entstehen freie Luciferase, Oxiluciferin, AMP und  $CO_2$  (De Wet et al. 1987):



Bei Überschuss des Luciferase-Substrates Luciferin ist die Lichtemission proportional der eingesetzten Luciferase-Menge, und eine Quantifizierung im Luminometer wird möglich.

Zur Messung der Luciferase-Aktivität in transfizierten Zellen wurden 40  $\mu\text{l}$  des präparierten Zellextraktes (s. 2.6.6) in ein 12 x 79 mm - Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) gegeben. Im Luminometer (AutoLumat LB 953, E&G Berthold, Wildbach) wurden automatisch 200  $\mu\text{l}$  gekühlte Luciferin-Lösung in das Röhrchen injiziert. Für jeden Ansatz und der Lichtemission bei 560 nm erfolgte automatisch eine Messung des Leerwertes über einen Zeitraum von jeweils 20 Sekunden. Die gemessenen Werte wurden als relative Lichteinheiten dargestellt.

## 2.7 Probenkollektiv

Untersucht wurden die in TE gelöste DNA, RNA sowie primäre Blutlymphozyten von insgesamt 60 Probanden, von denen 30 an multiplen malignen Melanomen erkrankt waren (Patienten). Die anderen 30 stellten die Kontrollgruppe aus gesunden Probanden dar. Die Melanompatienten wurden aus der dermatologischen Klinik der Georg-August-Universität Göttingen rekrutiert. Bei den gesunden Probanden handelte es sich entweder um Patienten ohne Tumorerkrankung in der Vorgeschichte oder um gesunde Klinik-Mitarbeiter.

Blutentnahme, Probenverarbeitung und Datenerhebung wurden gemäß der Vorgaben der Ethikkommission der Georg-August - Universität Göttingen durchgeführt.



### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Studienpopulation und phänotypische Melanomrisikofaktoren

Die Studienpopulation bestand aus 30 Fällen (Patienten mit mindestens zwei malignen Melanomen ohne bekannte familiäre Melanomneigung) und 30 Kontrollen (altersentsprechend und ohne Tumoranamnese). Um eine Verzerrung der Ergebnisse durch den bereits bekannten Risikofaktor für die Entstehung maligner Melanome „Alter“ zu vermeiden, wurde bei der Auswahl der Probanden auf eine gleichmäßige Altersverteilung geachtet. Der Altersdurchschnitt betrug 52 Jahre. Zufälliger Weise trat jedoch ein Ungleichgewicht zwischen beiden Gruppen hinsichtlich des Geschlechts auf. Es handelte sich nämlich bei 66% der Fälle, hingegen nur bei 43% der Kontrollen um Männer, wobei allerdings vorhergehende Studien gezeigt haben, dass Melanomneigung und Geschlecht nicht signifikant miteinander korrelieren (Jung 1982). Somit kann davon ausgegangen werden, dass dieser Gruppenunterschied für die Ermittlung unserer Ergebnisse keine Rolle gespielt hat.

Es wurden folgende phänotypischen und heute in der Klinik verwendeten Melanomrisikofaktoren erfasst: Haarfarbe, Augenfarbe, Lichttyp nach der Deutschen Krebsgesellschaft (DKG) sowie die Gesamtzahl an Nävuszellnävi.

Auch wenn das Hochrisikostudienkollektiv relativ klein war, lassen sich Trends ermitteln. Beispielsweise scheinen helle Haarfarben (6,67% Rothaarige in der Gruppe der Melanompatienten im Gegensatz zu 0% in der Kontrollgruppe), helle Haut (13,33% Lichttyp I in der Gruppe der Melanompatienten im Gegensatz zu 3,33% in der Kontrollgruppe) sowie viele Nävuszellnävi (>100 Nävi bei 38% in der Gruppe der Melanompatienten im Gegensatz zu 3% in der Kontrollgruppe und umgekehrt <50 Nävi bei 38% in der Gruppe der Melanompatienten im Gegensatz zu 97% in der Kontrollgruppe) häufiger im Kollektiv der Melanompatienten vorzukommen und stellen somit einen Risikofaktor für das Auftreten multipler maligner Melanome dar. Mit den bisherigen Untersuchungsergebnissen in der Literatur stimmen diese Trends gut überein (Youl et al. 2002, Tucker 2009).

		Studiengruppe			
		Fälle n=30		Kontrollen n=30	
		N	%	N	%
Geschlecht (p=0.3015)	Männer	19	66%	13	43%
	Frauen	10	34%	17	57%
Augenfarbe (p=0.4746)	grün	4	14%	3	10%
	blau	18	62%	20	67%
	grau	3	10%	2	7%
	braun	4	14%	5	17%
Haarfarbe (p=0.6347)	rötlich	2	7%	0	0%
	blond	23	79%	16	53%
	braun	4	14%	12	40%
	schwarz	0	0%	2	7%
Lichttyp (p=0.2639)	I	4	14%	1	3%
	II	24	83%	18	60%
	III	1	3%	11	37%
Gesamtzahl NZN (p=0.1026)	0-50	11	38%	29	97%
	50-100	7	24%	0	0%
	>100	11	38%	1	3%

p p-Werte eines Tests auf Homogenität zwischen den Studiengruppen

Tabelle 2: Studienpopulation. Absolute Anzahl und relativer Anteil am Gesamtkollektiv an verschiedenen Merkmalsausprägungen der klinisch relevanten Risikofaktoren für die Melanomentstehung

### 3.2 Genotypen

Es wurden sieben SNPs der Gene XPC und XPG typisiert. Dabei handelt es sich um die Polymorphismen XPC EX15 A2920C, XPC INT11 C-6A, XPC EX10 G2166A, XPC INT9 PAT, XPC EX8 T1601C, XPC EX8 G1580A sowie XPG EX15 C3507G. Um bei unserem Patienten- und Probandenkollektiv von einer idealen Population ohne signifikanten Selektionsnachteil eines der untersuchten Polymorphismen ausgehen zu können, wurden alle untersuchten Marker auf eine Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht untersucht. Bei keinem der untersuchten Marker ließ sich eine signifikante Abweichung nachweisen.

Um einen möglichen Unterschied im Auftreten bestimmter Allele bei den Melanompatienten und den gesunden Kontrollen aufzudecken, wurde zunächst für

jede Gruppe die Häufigkeit jedes einzelnen Allels ermittelt. Das seltenere Allel (MAF: minor allele frequency) trat mit einer Häufigkeit von 2% bis 47% auf (Tabelle 3). Der Polymorphismus XPC EX15 A2920C trat in heterozygoter Form in der Gruppe der Melanompatienten bei 40% und in der Kontrollgruppe bei 53% der Probanden auf. In homozygoter Form wurde er bei 27% in der Gruppe der Melanompatienten und bei 17% in der Kontrollgruppe beobachtet. Die Allelhäufigkeit für diesen Polymorphismus betrug in der Gruppe der Melanompatienten 47% und in der Kontrollgruppe 43%. Der Polymorphismus XPC INT11 C-6A konnte in heterozygoter Form bei 40% in der Gruppe der Melanompatienten und bei 57% in der Kontrollgruppe beobachtet werden, in homozygoter Form lag dieser bei 27% in der Gruppe der Melanompatienten und bei 13% in der Kontrollgruppe vor. Die Allelhäufigkeit für diesen Polymorphismus betrug in der Gruppe der Melanompatienten 47% und in der Kontrollgruppe 42%. Für den Polymorphismus XPC EX10 G2166A konnte in heterozygoter Form in der Gruppe der Melanompatienten ein Anteil von 33% im Vergleich zu 47% in der Kontrollgruppe beobachtet werden. In homozygoter Form lag dieser in der Gruppe der Melanompatienten überhaupt nicht und in der Kontrollgruppe bei 7% der Probanden vor. Die Allelhäufigkeit betrug in der Gruppe der Melanompatienten 17% im Gegensatz zu 30% in der Kontrollgruppe. Der Polymorphismus XPC INT9 PAT lag in heterozygoter Form in der Gruppe der Melanompatienten bei 40% und in der Kontrollgruppe bei 57% der Probanden vor. In homozygoter Form betrug der Anteil 27% in der Gruppe der Melanompatienten und 13% in der Kontrollgruppe. Die Allelhäufigkeit betrug in der Gruppe der Melanompatienten 47% und in der Kontrollgruppe 42%. Für den Polymorphismus XPC EX8 T1601C konnte in der Gruppe der Melanompatienten in heterozygoter Form ein Anteil von 17% im Vergleich zu 30% in der Kontrollgruppe ermittelt werden. In homozygoter Form betrug der Anteil in der Gruppe der Melanompatienten 7%. In der Kontrollgruppe lag dieser Polymorphismus in homozygoter Form nicht vor. Die Allelhäufigkeit betrug in beiden untersuchten Gruppen 15%. Der Polymorphismus XPC EX8 G1580A trat in heterozygoter Form in der Gruppe der Melanompatienten sowie in der Kontrollgruppe bei 3% der Probanden auf, in homozygoter Form lag dieser in keiner der beiden Gruppen vor. Die Allelhäufigkeit betrug in beiden Gruppen 2%. Für keinen dieser Polymorphismen ließ sich ein signifikanter Unterschied in der

absoluten und der Allelhäufigkeit zwischen beiden untersuchten Gruppen nachweisen (Tabelle 3).

Es konnte gezeigt werden, dass die Marker XPC EX15 A2920C, XPC INT11 C-6A, XPC EX10 G2166A sowie XPC INT9 PAT) im Kopplungsungleichgewicht (LD: linkage disequilibrium) stehen ( $r^2$ : 0,17 – 1,0) (Abbildungen 12a,12b und 12c). Die Wahrscheinlichkeit, dass die Polymorphismen XPC EX10 G2166A und XPC INT11 C-6A oder die Polymorphismen XPC INT11 C-6A und XPC EX15 A2920C gemeinschaftlich vererbt werden, liegt unseren Berechnungen zufolge bei 93%.

Keine allelische Korrelation zu den anderen typisierten Markern des XPC zeigte mit  $r^2 < 0,1$  der Marker XPC EX8 T1601C.

Der Polymorphismus XPG EX15 C3507G lag in der Gruppe der Melanopatienten in heterozygoter Form bei 40% und in der Kontrollgruppe bei 23% der Probanden vor. In homozygoter Form lag dieser in der Gruppe der Melanopatienten nicht vor, während sein Anteil in der Kontrollgruppe 10% betrug. Die Allelhäufigkeit betrug in der Gruppe der Melanopatienten 20% und in der Kontrollgruppe 22%. Ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen war nicht zu verzeichnen.

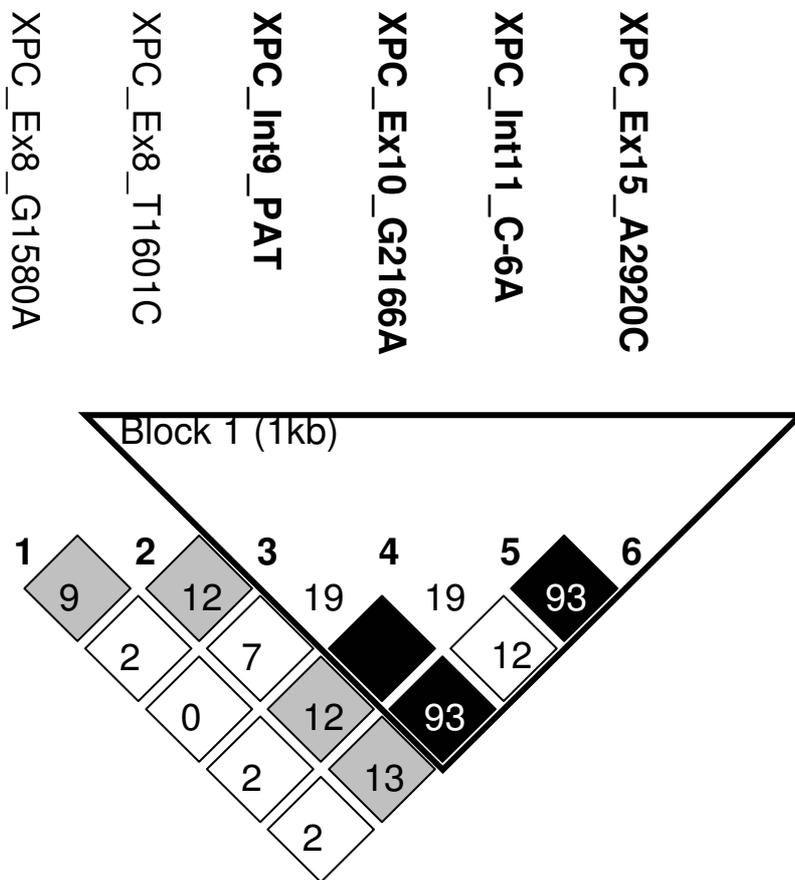


Abb. 12a: HaploView Darstellung der 6 XPC-Polymorphismen bei Kontrollen: Innerhalb der Kästchen zwischen den Polymorphismen wird die Wahrscheinlichkeit angegeben, mit der beide gemeinsam vererbt werden.

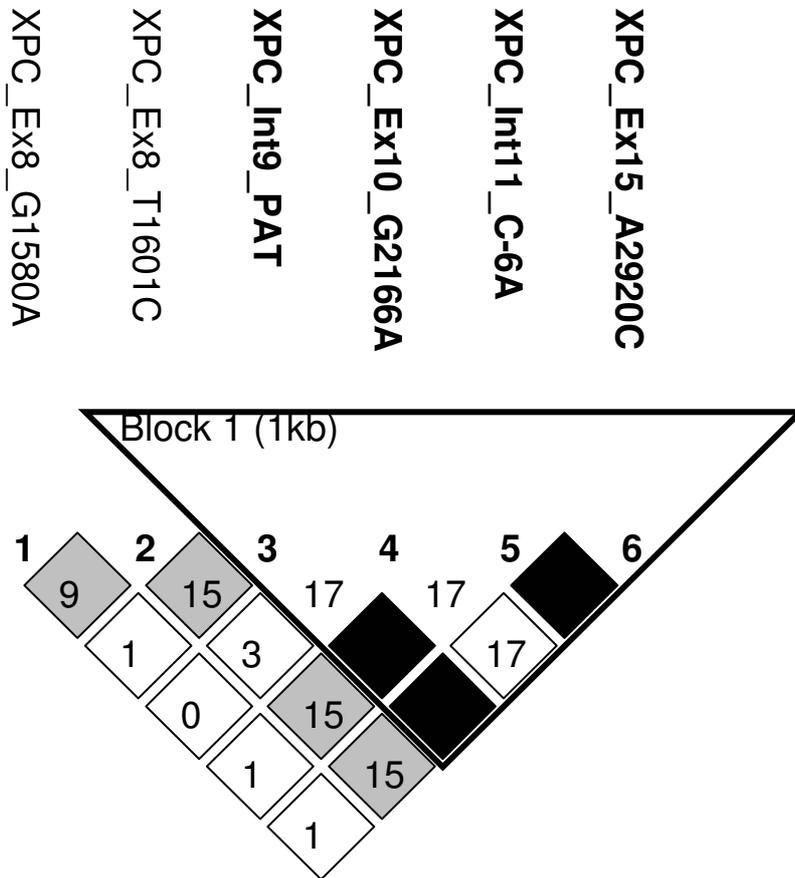


Abb. 12b: HaploView Darstellung der 6 XPC-Polymorphismen bei den Melanompatienten: Innerhalb der Kästchen zwischen den Polymorphismen wird die Wahrscheinlichkeit angegeben, mit der beide gemeinsam vererbt werden.

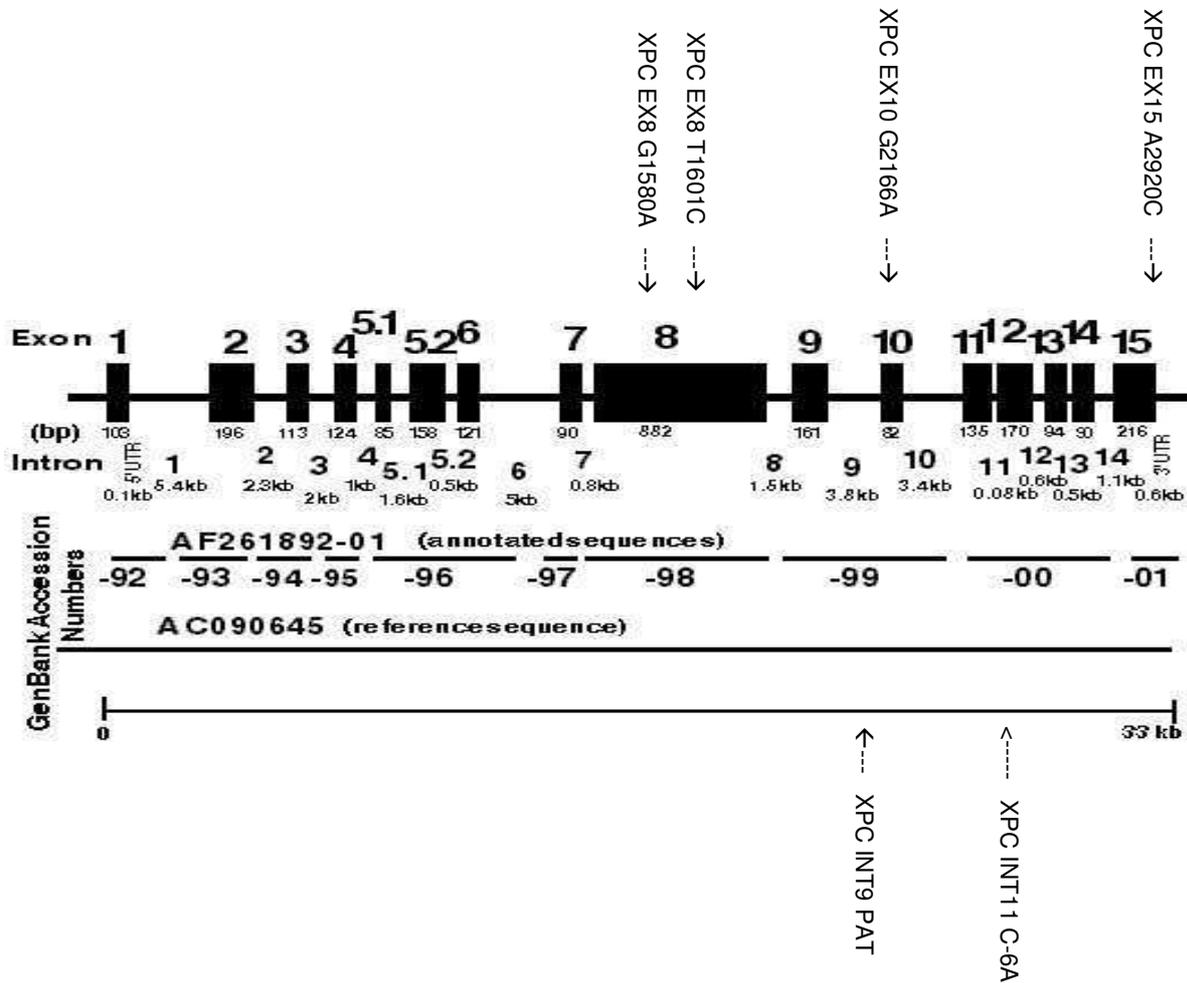


Abbildung 12c: Struktur des XPC-Gens und Lokalisation der XPC-Polymorphismen. Entnommen aus: Kahn et al. 2002, S. 3626: The human XPC DNA repair gene: Arrangement, splice site information content and influence of a single nucleotide polymorphism in a splice acceptor site on alternative splicing and function.

Marker	Gruppe	Anzahl			Anteil			Allelhäufigkeit		HWG
		0	1	2	0	1	2	95%-CI	p-Wert	
XPC_Ex15_A2920C <2=CC>	Fälle	10	12	8	33%	40%	27%	47%	(33%-62%)	0.2806
	Kontrollen	9	16	5	30%	53%	17%	43%	(30%-58%)	0.6371
XPC_Int11_Cm6A <2=AA>	Fälle	10	12	8	33%	40%	27%	47%	(33%-62%)	0.2806
	Kontrollen	9	17	4	30%	57%	13%	42%	(28%-57%)	0.3611
XPC_Ex10_G2166A <2=AA>	Fälle	20	10	0	67%	33%	0%	17%	(7%-30%)	0.1559
	Kontrollen	14	14	2	47%	47%	7%	30%	(18%-43%)	0.5367
XPC_Int9_PAT <2=II>	Fälle	10	12	8	33%	40%	27%	47%	(33%-62%)	0.2806
	Kontrollen	9	17	4	30%	57%	13%	42%	(28%-57%)	0.3611
XPC_Ex8_T1601C <2=TT>	Fälle	23	5	2	77%	17%	7%	15%	(5%-27%)	0.0930
	Kontrollen	21	9	0	70%	30%	0%	15%	(5%-27%)	0.2064
XPC_Ex8_G1580A <2=AA>	Fälle	29	1	0	97%	3%	0%	2%	(0%-10%)	0.8964
	Kontrollen	29	1	0	97%	3%	0%	2%	(0%-10%)	0.8964
XPG_Ex15_C3507G <2=CC>	Fälle	18	12	0	60%	40%	0%	20%	(10%-33%)	0.0816
	Kontrollen	20	7	3	67%	23%	10%	22%	(12%-35%)	0.1064

Tabelle 3: Verteilung der Genotypen: Absolute Anzahl, Anteil am Kollektiv und Allelhäufigkeit.

HWG: Hardy-Weinberg – Gleichgewicht: Maß für die Homogenität eines Polymorphismus innerhalb einer Gruppe

95% CI: Intervall der Allelhäufigkeit, in das mit 95% Wahrscheinlichkeit alle Werte fallen

0, 1, 2: Anzahl der Allele (siehe Spalte 1)

### 3.3 Assoziation der 7 Genotypen mit dem Melanom

Um einen ursächlichen Einfluss eines der untersuchten Marker auf die Entstehung multipler maligner Melanome nachweisen zu können, wurde für jeden möglichen Erbgang (dominant, rezessiv, kodominant, additiv) und jeden Marker die genetische Assoziation ermittelt. Es konnte jedoch weder im kodominanten noch im bestangepassten Modell für keinen der untersuchten Marker signifikant ein Einfluss für die Entstehung multipler Melanome nachgewiesen werden (Tabelle 4). Der Marker XPC EX 10 G2166A verfehlte die Signifikanz mit  $p=0,0563$  nur knapp, einen additiven Erbgang vorausgesetzt. Allerdings sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass keiner der Fälle, aber zwei Kontrollen homozygoter Träger des selteneren Allels (also Genotyp A/A) dieses SNP waren (Tabelle 5).

Gen	Marker	kodominantes Modell					
		1 vs. 0			2 vs. 0		
		p	OR	95% CI	p	OR	95% CI
XPC	EX10 G2166A	0.1147	0.386	(0.1-1.3)	0.9794		
	EX15 A2920C	0.7703	0.830	(0.2-2.9)	0.5050	1.677	(0.4-7.7)
	EX8 G1580A	0.8557	0.765	(0.0-13.7)			
	EX8 T1601C	0.2536	0.466	(0.1-1.7)	0.9812		
	INT11 C-6A	0.6823	0.771	(0.2-2.7)	0.3457	2.149	(0.4-10.5)
	INT9 PAT	0.6823	0.771	(0.2-2.7)	0.3457	2.149	(0.4-10.5)
XPG	EX15_C3507G	0.1902	2.233	(0.7-7.4)	0.9763		

Tabelle 4: Test auf genetische Assoziation: Kodominantes Modell. Getestet wurde die genetische Assoziation zunächst für einen Marker gegenüber keinem, anschließend für zwei Marker gegenüber keinem Marker.

OR: Odds Ratio (bei Signifikanz wäre ein Wert von 1 zu erwarten)

Gen	Marker	Modell	best angepasstes Modell		
			p	OR	95% CI
XPC	EX10 G2166A	additiv	0.0563	0.343	(0.1-1.0)
	EX15_A2920C	rezessiv	0.3476	1.879	(0.5-7.0)
	EX8 G1580A	dominant	0.8557	0.765	(0.0-13.7)
	EX8 T1601C	dominant	0.4033	0.589	(0.2-2.0)
	INT11 C-6A	rezessiv	0.1928	2.526	(0.6-10.2)
	INT9 PAT	rezessiv	0.1928	2.526	(0.6-10.2)
XPG	EX15 C3507G	dominant	0.3706	1.683	(0.5-5.3)

Tabelle 5: Test auf genetische Assoziation: Best angepasstes Modell.

Es wurde jeweils der Erbgang vorausgesetzt, für den p am ehesten das Signifikanzniveau ( $<0,05$ ) erreicht.

OR: Odds Ratio (bei Signifikanz wäre ein Wert von 1 zu erwarten)

### 3.4 mRNA-Expression von wt XPC und XPG in Abhängigkeit der Polymorphismen

Als nächstes sollte die mRNA-Expression zweier Splicevarianten – XPC Del Ex12 und XPG Krypt Ex1 – in Abhängigkeit der Polymorphismen und in Zusammenhang mit dem Melanomrisiko untersucht werden. Hierzu wurde zunächst die mRNA-Expression der beiden Splicevarianten bestimmt. Diese korrelierte nicht miteinander ( $r=0,1$ ,  $p=0,4297$ ).

Zwischen den Studiengruppen konnte weder ein Unterschied in der mRNA-Expression der XPC-Splicevariante ( $p=0,6736$ ) noch in der Verteilung der anderen nichtgenetischen Faktoren nachgewiesen werden.

Um einen Einfluss eines Allels auf die Genexpression der XPC-Splicevariante zu zeigen, wurde im Folgenden jedes Allel auf eine Assoziation mit der Genexpression überprüft. Dabei korrelierten die Polymorphismen XPC EX15 A2920C ( $p<0,0001$ ), XPC INT11 C-6A ( $p<0,0001$ ) und XPC INT9 PAT ( $p<0,0001$ ) signifikant mit der

Genexpression der XPC-Splicevariante: Diese war bei Trägern des jeweils selteneren Allels bei allen drei Polymorphismen fast doppelt so hoch (Tabelle 6, Tabelle 7), wobei die Allelhäufigkeiten bei ca. 45% lagen. Es zeigten sich also für die drei im Kopplungsungleichgewicht liegenden XPC-Polymorphismen höhere Expressionen der XPC-Splicevariante, wenn das seltenere Allel vorlag. Ein Zusammenhang mit dem Auftreten multipler Melanome konnte für die Expression der XPC-Splicevariante jedoch nicht signifikant nachgewiesen werden.

Es existiert bekanntermaßen eine spontan alternativ gesplice XPG mRNA-Isoform, welche ein 109 bp großes Exon im Intron 1 enthält. Dies führt nach der Insertion zu einer Rasterverschiebung, woraus ein Stopcodon nach weiteren zwei Aminosäuren resultiert (Emmert et al. 2001) (Abb. 17). Seine funktionelle Relevanz ist bislang noch ungeklärt. Um die Höhe der Expression dieser alternativ gesplicten XPG mRNA-Isoform sowie eventuelle Unterschiede zwischen Melanompatienten und gesunden Probanden zu bestimmen, wurde eine Real-Time – PCR sowohl in der Gruppe der Patienten mit multiplen Melanomen als auch in der Gruppe der gesunden Probanden durchgeführt.

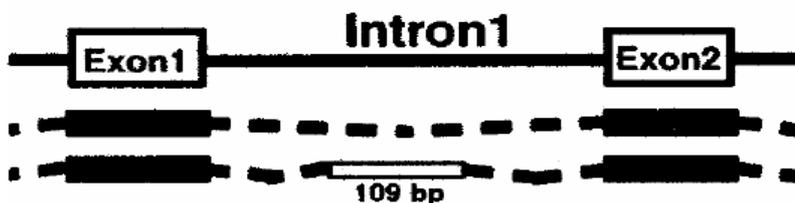


Abb. 17: Die alternativ gesplice XPG mRNA – Isoform

Ein genetischer Einfluss der untersuchten Polymorphismen auf die Expression dieser neuen XPG-Splicevariante konnte nicht beobachtet werden.

Die Expression dieser XPG-Isoform lag aber um mehr als das Dreifache höher bei Patienten mit multiplen Melanomen als bei den gesunden Probanden ( $p=0,0401$ ) (Abb. 18). Es liegt also ein signifikant höheres Vorkommen dieser spontanen alternativen Splicevariante bei Melanompatienten vor, so dass diese als neuer Marker für das Melanomrisiko betrachtet werden kann.

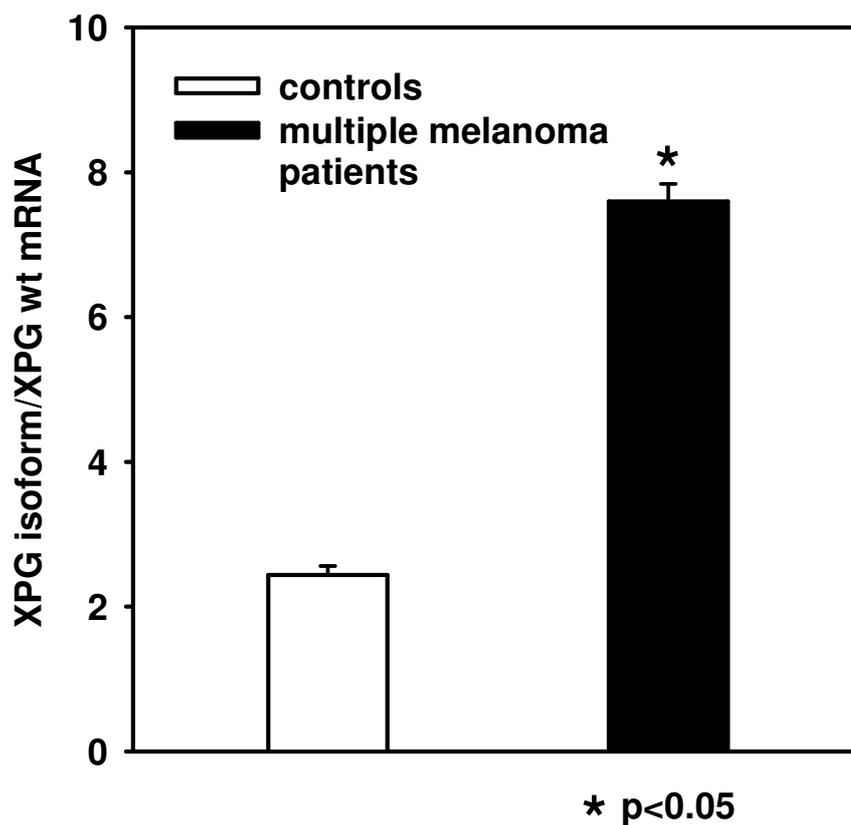


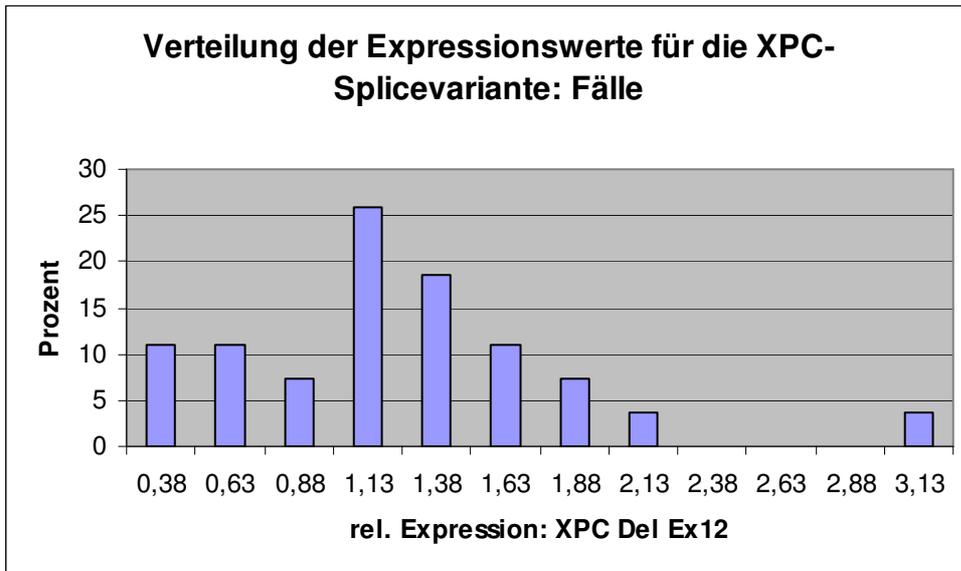
Abb. 18: Die alternativ gespligte XPG mRNA - Isoform ist signifikant mit multiplen Melanomen assoziiert.

Es waren ein Unterschied zwischen Fällen und Kontrollen ( $p=0,0401$ ) sowie ein Einfluss des Alters ( $p=0,0494$ ) signifikant zu verzeichnen. Ein Teil der Fälle wies eine mit den Kontrollen vergleichbare XPG-Splicevarianten - Expression auf (Abbildung 13), bei einem anderen Teil wird die XPG-Splicevariante überexprimiert. Desweiteren zeigten 60-80jährige eine um 40% reduzierte Expression gegenüber 20-40jährigen, nur ein Teil der älteren Studienteilnehmer ließen eine erhöhte Expression erkennen (Abbildung 14, Tabelle 6, Tabelle 7).

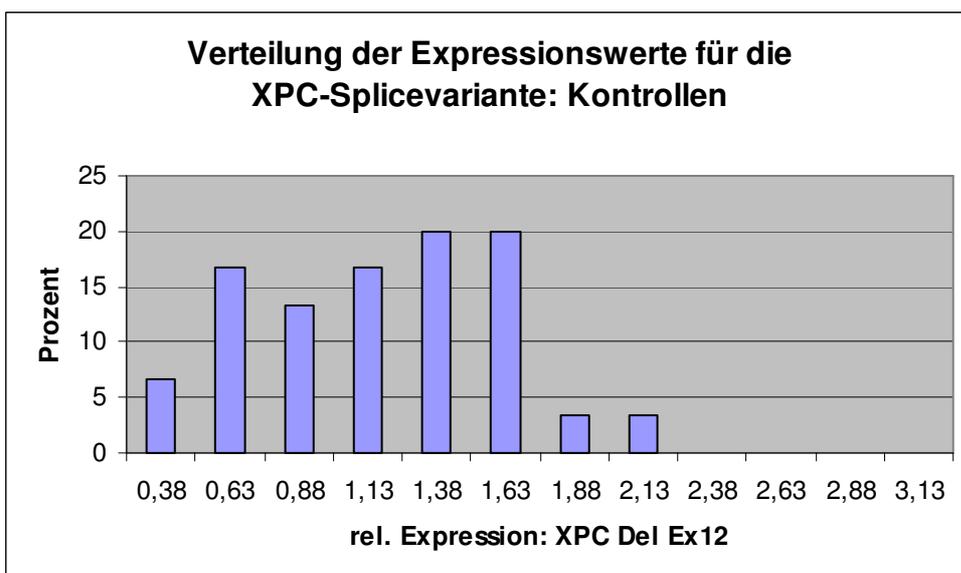
Insgesamt fiel bei 13 der 60 Studienteilnehmer eine hohe Genexpression der Splicevarianten (11 bei XPG: Expression  $> 2,5$  und 2 bei XPC: Expression  $> 6,0$ ) auf. Diese wurden nochmals nach epidemiologischen Gesichtspunkten aufgeschlüsselt. Es zeigten sich unter den Personen mit erhöhter Genexpression vermehrt Männer (75% gegenüber 49%), weniger Ältere (17% gegenüber 36%) sowie mehr mit einer hohen Gesamtzahl an NZNs (42% gegenüber 15%). Alter und Geschlecht scheinen dabei nicht unabhängig voneinander zu sein, da zwar 7 der 23 Männer (30%) im Alter zwischen 50-80 Jahren, jedoch keine der 13 Frauen eine auffällig hohe Expression zeigten. Ein signifikanter Einfluss ließ sich dennoch für keinen dieser Faktoren zeigen (Alter x Geschlecht:  $p=0,1011$ ; Gesamtzahl NZN:  $p=0,0548$ ). Selbstverständlich wäre auch ein Einfluss eines der untersuchten genetischen Marker auf eine „auffällig hohe Genexpression“ denkbar, dieser konnte jedoch signifikant nicht nachgewiesen werden.

Bei Betrachtung der Expression der XPG-Splicevariante bei unauffälliger Expression verbleibt allein das Alter als signifikanter Einflussfaktor ( $p=0,0151$ ), wobei ein Unterschied zwischen den Studiengruppen nicht festgestellt werden konnte ( $p=0,2167$ ).

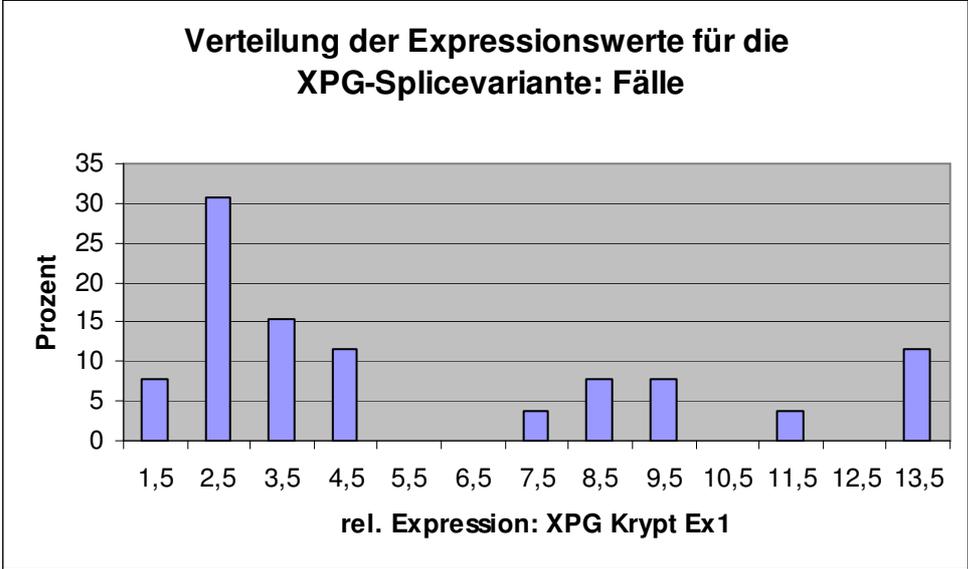
Abbildung 13: Verteilung der Expressionswerte für die XPC- und XPG-Splicevarianten zwischen Fällen (A,C) und Kontrollen (B, D). Eine Über-Expression liegt ab einer relativen Expression von 7,5 oder mehr vor.



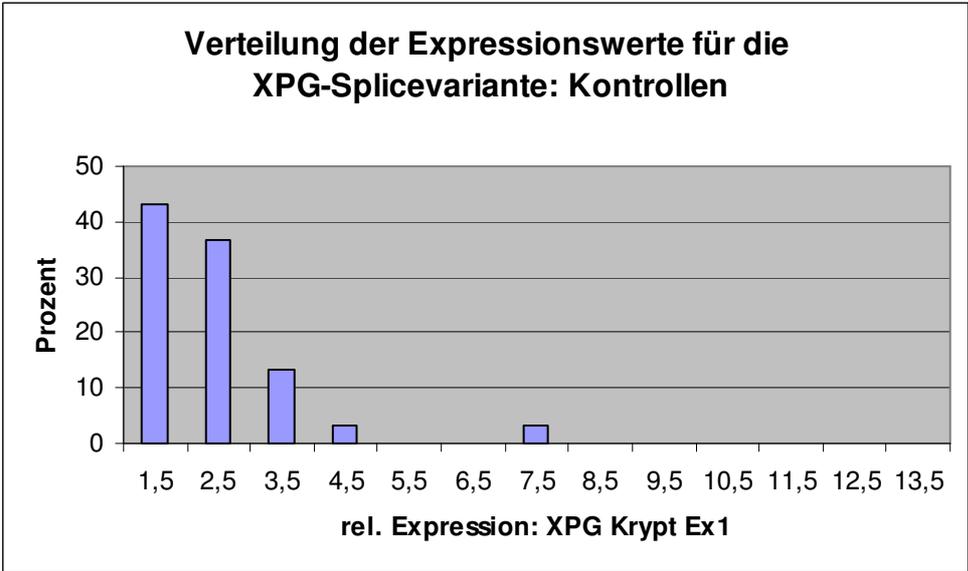
A



B

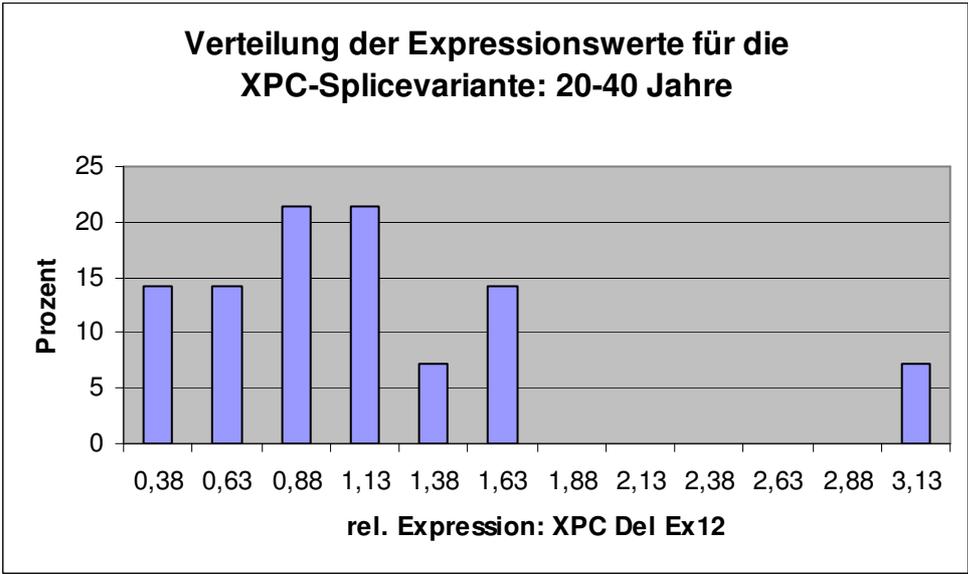


C

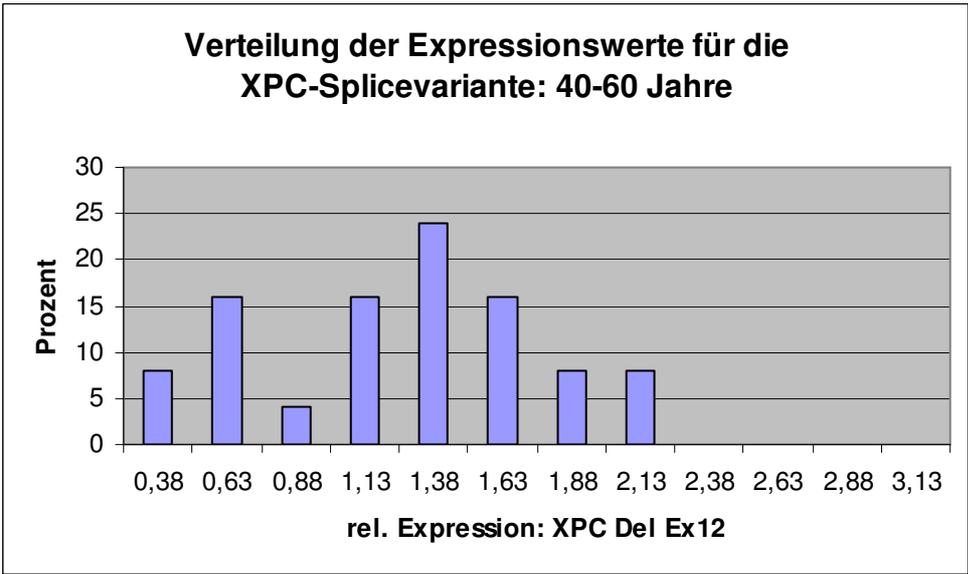


D

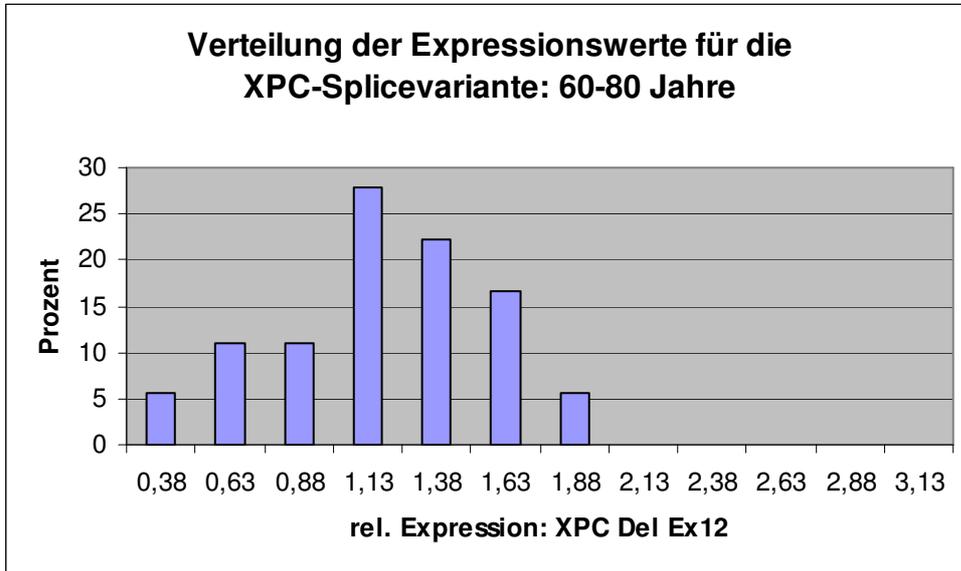
Abbildung 14: Verteilung der Expressionswerte für die XPC- und XPG-Splicevariante zwischen verschiedenen Altersgruppen 20-40 (A,D), 40-60 (B,E) und 60-80 (C,F)



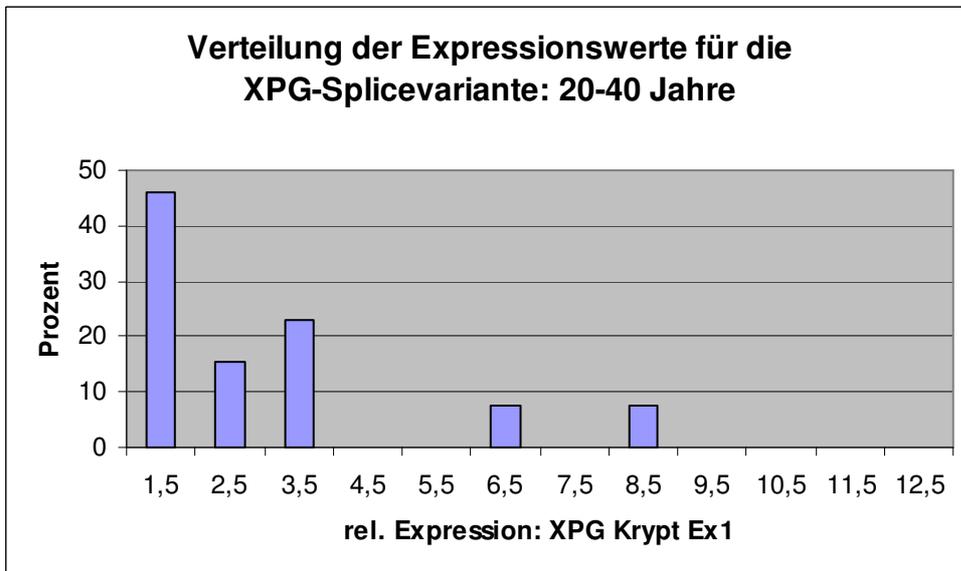
A



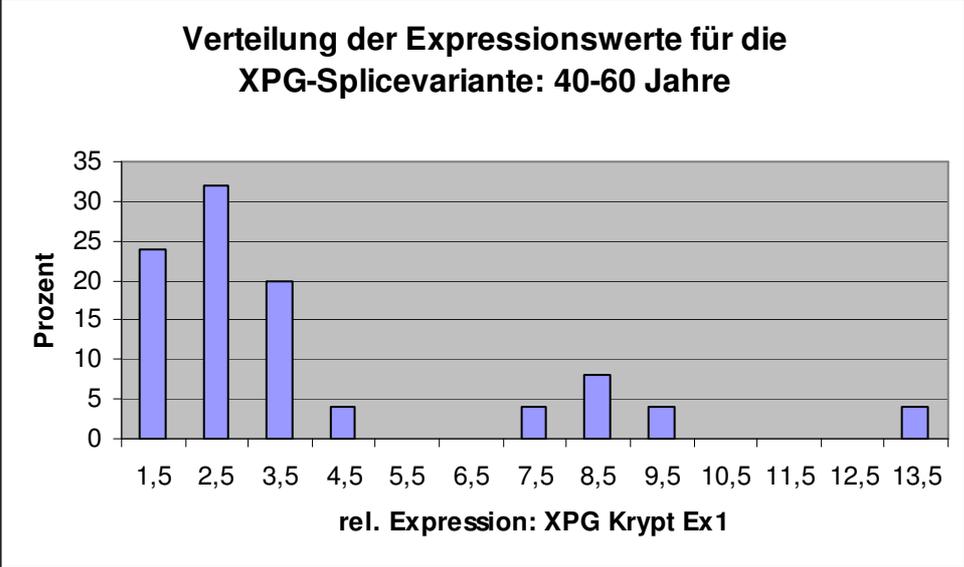
B



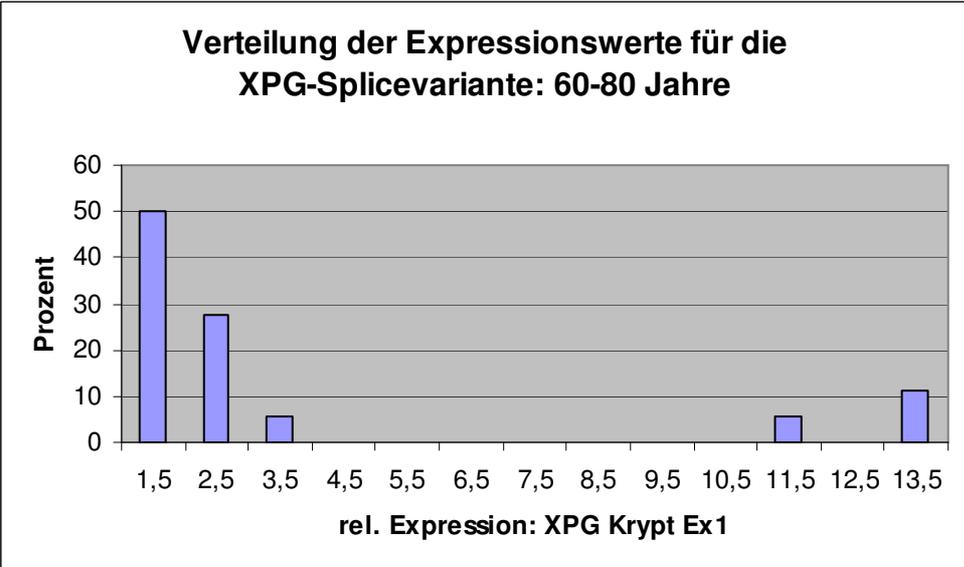
C



D



E



F

		XPC Del Ex12		XPG Krypt Ex1	
		Mittel	95% CI	Mittel	95% CI
Studiengruppe	Fälle	1.0	(0.9-1.3)	004.7	(3.6-6.1)
	Kontrollen	001.2	(0.9-1.6)	002.7	(1.8-3.9)
Geschlecht	Frauen	001.1	(0.8-1.3)	003.3	(2.4-4.5)
	Männer	001.2	(1.0-1.5)	003.8	(2.8-5.0)
Alter	20-40 Jahre	1.0	(0.8-1.3)	004.7	(3.3-6.7)
	40-60 Jahre	001.2	(0.9-1.5)	003.2	(2.3-4.5)
	60-80 Jahre	001.2	(0.9-1.5)	002.9	(2.0-4.2)
Gesamtzahl NZN	<50	1.0	(0.8-1.2)	003.1	(2.4-4.0)
	51-100	1.0	(0.7-1.5)	003.7	(2.2-6.4)
	>100	001.4	(1.0-2.0)	003.7	(2.4-5.8)
XPC Ex15 A2920C <2=CC>	0	0.7	(0.6-0.9)	4.0	(2.9-5.4)
	1	001.3	(1.1-1.5)	3.0	(2.4-3.9)
	2	001.3	(1.1-1.7)	002.9	(2.0-4.1)
XPC Int11 C-6A <2=AA>	0	0.7	(0.6-0.9)	4.0	(2.9-5.4)
	1	001.3	(1.1-1.5)	003.1	(2.4-3.9)
	2	001.4	(1.1-1.7)	002.8	(1.9-4.1)
XPC Ex10 G2166A <2=AA>	0	001.2	(1.0-1.4)	002.9	(2.3-3.6)
	1	1.0	(0.8-1.2)	4.0	(3.0-5.3)
	2	1.0	(0.5-2.1)	002.8	(1.1-7.2)
XPC Int9 PAT <2=II>	0	0.7	(0.6-0.9)	4.0	(2.9-5.4)
	1	001.3	(1.1-1.5)	003.1	(2.4-3.9)
	2	001.4	(1.1-1.7)	002.8	(1.9-4.1)
XPC Ex8 T1601C <2=TT>	0	001.1	(1.0-1.3)	003.4	(2.8-4.2)
	1	0.9	(0.7-1.2)	002.7	(1.9-3.9)
	2	1.0	(0.5-0.9)	004.1	(1.6-10.5)
XPC Ex8 G1580A <2=AA>	0	001.1	(1.0-1.2)	003.3	(2.8-4.0)
	1	0.7	(0.4-1.4)	001.6	(0.6-4.0)
	2				
XPG Ex15 C3507G <2=CC>	0	001.1	(0.9-1.3)	003.5	(2.8-4.3)
	1	001.1	(0.8-1.3)	002.9	(2.1-3.9)
	2	001.1	(0.6-1.9)	003.7	(1.7-8.2)

Tabelle 6: Verteilung der Expressionswerte für die XPC- und XPG-Splicevariante

Mittel: Mittelwerte nach Studiengruppe, Alter, Geschlecht und Gesamtzahl NZN adjustiert.

95% CI: Bereich, in dem mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% alle Werte liegen.

In den grau unterlegten Bereichen finden sich deutliche Unterschiede in der Expression.

0, 1, 2: Anzahl der Allele (siehe Spalte 1)

	p-Wert			XPG Krypt Ex1 auffällige Personen
	XPC Del Ex12	XPG Krypt Ex1	XPG Krypt Ex1 unauffällige Personen	
Studiengruppe	0.6734	0.0401	0.2167	
Gesamtzahl NZN	0.2509	0.8912	0.8383	0.0548
Alter	0.7083	0.0494	0.0151	0.1011
Geschlecht	0.8511	0.7354	0.8482	0.1011
Augenfarbe	0.7514	0.6869	0.7909	0.3200
Haarfarbe	0.6693	0.7349	0.6335	0.9918
Lichttyp	0.5175	0.8091	0.3432	0.7980
XPC Ex15 A2920C <2=CC>	<0.0001	0.2902	0.4297	0.7046
XPC Int11 C-6A <2=AA>	<0.0001	0.3094	0.5047	0.6398
XPC Ex10 G2166A <2=AA>	0.2882	0.3406	0.9416	0.8919
XPC Int9 PAT <2=II>	<0.0001	0.3094	0.5047	0.6398
XPC Ex8 T1601C <2=TT>	0.3676	0.6004	0.0297	0.4681
XPC Ex8 G1580A <2=AA>	0.1538	0.0600	0.2123	0.9764
XPG Ex15 C3507G <2=CC>	0.9604	0.6488	0.8480	0.7290

Tabelle 7: Test von Einflussfaktoren auf Expressionswerte für die XPC- und XPG-Splicevariante: p-Werte  
Grau unterlegte Felder zeigen einen signifikanten Einfluss ( $p < 0,05$ ) auf die Höhe der mRNA-Expression an.

Auffällige Personen: Insgesamt 11 der 60 Probanden wiesen eine auffällig hohe XPG-Expression auf. Diese wurden hier getrennt betrachtet.

### 3.5 Expression der XPC-Exon12–Deletion-mRNA – Isoform und Zusammenhang mit der DNA-Reparaturfähigkeit

Das Intron 11-6A – Allel, welches innerhalb der XPC Intron 11 – Spliceakzeptorstelle liegt, führt zu einem spontan erhöhten Überspringen des Exon 12 in der XPC – mRNA (Khan et al. 2000). Um die Expression dieser Isoform zu ermitteln, wurde eine Real-Time – PCR mittels LightCycler – System durchgeführt. Bei allen 60 Probanden führte das XPC 11-6A – Allel zu einer hochsignifikanten Erhöhung der Expression der XPC Del12 mRNA – Isoform ( $p < 0,0001$ ) (Abb. 15).

Diese Isoform wurde in einer relativen Menge von 1,22 der Wildtyp XPC – mRNA bei Patienten und von 1,16 bei Kontrollen exprimiert.

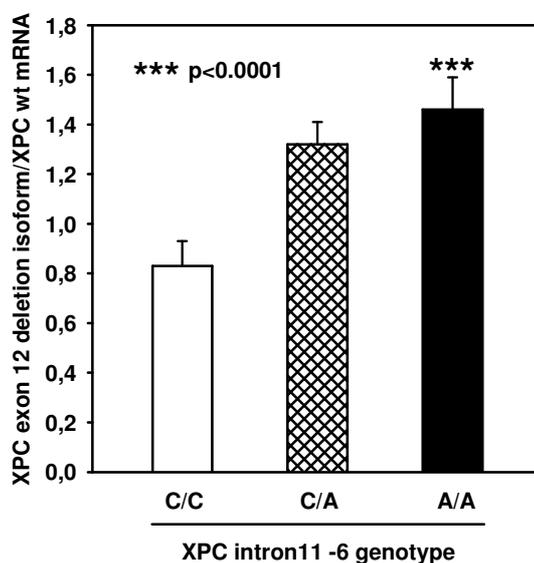


Abb. 15: Hoch signifikante Expression der XPC-Exon12-Deletion-mRNA - Isoform in Abhängigkeit vom XPC Intron 11-6 - Genotyp

In Fibroblasten konnte für das Intron 11-6A – Allel bereits eine reduzierte DNA-Reparaturkapazität nachgewiesen werden. Im Folgenden wurde bei allen Probanden der XPC Intron11-6 – Genotyp mit der im HCR ermittelten DNA-Reparaturkapazität verglichen. In unserem Kollektiv konnte für homozygote C/C – Genotyp-Träger eine

relative DNA-Reparatur von 14,9% bei 1000J/m<sup>2</sup> UVC-Bestrahlung ermittelt werden, wohingegen diese für homozygote A/A – Genotyp-Träger lediglich 5,2% betrug (Abb 16, links). Homozygotie führt tendenziell also zu einer verminderten DNA-Reparaturkapazität. Eine statistische Signifikanz konnte bei sehr kleinem Kollektiv leider nicht nachgewiesen werden (500 J/m<sup>2</sup>: p=0,1449; 1000 J/m<sup>2</sup>: p=0,0560).

Um wiederum einen Einfluss der DNA-Reparaturfähigkeit auf die Entstehung multipler maligner Melanome nachzuweisen, wurde die relative DNA-Reparatur sowohl bei Melanompatienten als auch bei gesunden Probanden mittels HCR ermittelt und miteinander verglichen. Kontrollprobanden zeigten eine relative DNA-Reparatur von 11,3% verglichen mit lediglich 4,7% bei Melanompatienten (Abb. 16, rechts). Melanompatienten wiesen also tendenziell eine verminderte DNA-Reparaturkapazität gegenüber Gesunden auf, was statistisch jedoch nicht signifikant war (500 J/m<sup>2</sup>: p=0,1804; 1000 J/m<sup>2</sup>: p=0,1113).

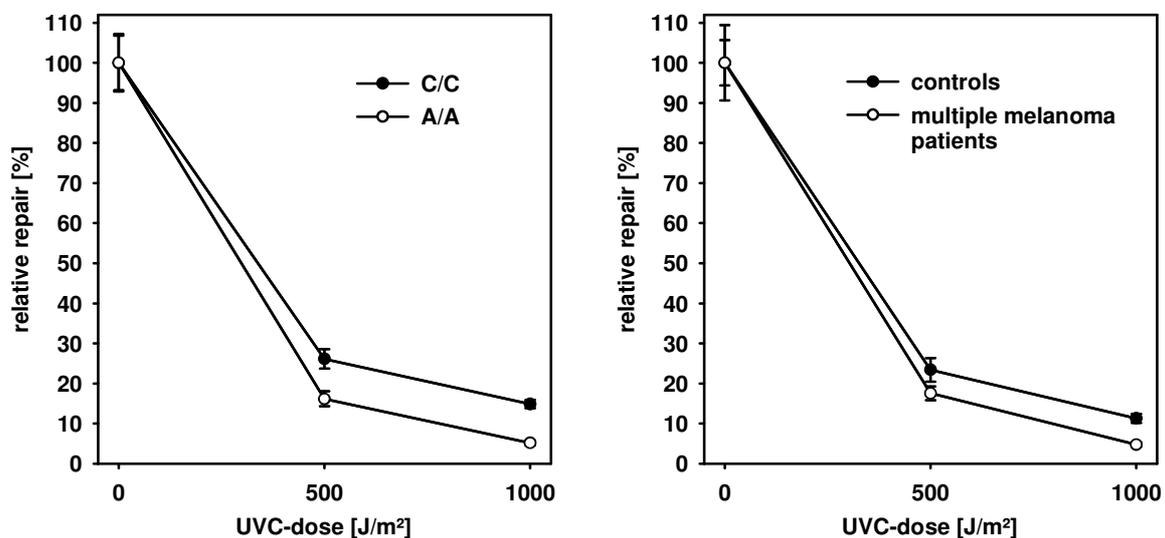


Abb. 16: Funktionelle NER bei XPC Intron 11 -6A Trägern vs. -6C Trägern (links) und bei Patienten mit multiplen Melanomen vs. Kontrollprobanden (rechts)



---

## 4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden Patienten mit multiplen malignen Melanomen als Hochrisikokollektiv mit altersentsprechenden gesunden Kontrollen ohne Tumoranamnese verglichen. Bekanntermaßen haben Melanopatienten ein erhöhtes Risiko, an einem zweiten Melanom zu erkranken (Johnson TM et al. 1998), Nashan et al. (2003) ermittelten ein über 30fach erhöhtes Risiko.

Bezüglich der Risikofaktoren einer möglichen Melanomentstehung unterschieden sich in der vorliegenden Arbeit beide Gruppen vor allem hinsichtlich der Anzahl der Nävi. So wiesen beispielsweise 96,67% der Kontrollen gegenüber 36,67% der Fälle weniger als 51 Nävi, jedoch nur 3,33% der Kontrollen gegenüber 36,67% der Fälle mehr als 100 Nävi auf. Diese Verteilung war aufgrund des bekannten erhöhten Risikos einer Melanomentstehung bei hoher Anzahl von Nävi (Youl et al. 2002) zu erwarten.

Auch hinsichtlich der Geschlechterverteilung waren die beiden untersuchten Gruppen heterogen, so war der Männeranteil in der Gruppe der Fälle höher als in der Kontrollgruppe (66% vs. 43%). Vorhergehende Studien konnten jedoch bereits zeigen, dass Geschlecht und Melanomneigung nicht signifikant miteinander korrelieren, die Überlebensrate allerdings bei Frauen etwas niedriger ausfällt (Jung 1982).

Die epidemiologische Aufschlüsselung beider Gruppen konnte einen dezenten, jedoch nicht signifikanten Trend hin zu weniger Pigmentierung in der Gruppe der Melanopatienten herausarbeiten. Dieser äußert sich im höheren Anteil an rothaarigen Probanden sowie Probanden mit Lichttyp I. Es ist also von einem erhöhten Risiko für die Entstehung multipler maligner Melanome bei wenig Pigmentierung in Haaren, Haut und Iris auszugehen. Die erhobenen Ergebnisse stimmen mit bereits in großen Kollektiven erhobenen Daten überein (Tucker 2009).

Der Altersdurchschnitt der untersuchten kaukasischen Population entspricht 52 Jahren. Auf eine möglichst hohe Übereinstimmung des Alters der einzelnen Gruppenmitglieder mit jeweils entsprechendem Partner in der anderen Gruppe wurde aufgrund der bekannten Abnahme der DNA-Reparaturfähigkeit in Abhängigkeit vom Alter (Baccarelli et al. 2004, Hemminki et al. 2001) besonderen

---

Wert gelegt. Diese sinkt auch bei Gesunden um 0,6% jährlich, was zu einer erhöhten Mutabilität nach UV-Exposition (+0,6% jährlich) führt (Annett et al. 2004, Goukassian et al. 2000, Moriwaki et al. 1996). Im Alter steigt die Vulnerabilität gegenüber Photokarzinogenen (Gilchrest et al. 1999), und aufgrund verminderter DNA-Reparaturfähigkeit akkumulieren DNA-Schäden, die Protoonkogene aktivieren und Tumorsuppressorgene inaktivieren können (Yaar und Gilchrest 2001, Hoeijmakers 2001). Daraus resultiert unter anderem ein deutlich erhöhtes Melanomrisiko im Alter (Parkin und Muir 1992). Gleichzeitig nehmen die kutanen Schutzmechanismen im Alter wie zum Beispiel Pigmentierung oder epidermale Dicke ab (Yaar und Gilchrest 2001). Der Rückgang der individuellen DNA-Reparaturfähigkeit zusammen mit einem zusätzlich modulierenden Einfluss von DNA-Reparaturgen - Polymorphismen könnten die Melanomentstehung insbesondere im Alter begünstigen.

Es ließ sich bei keinem der untersuchten Marker eine signifikante Abweichung vom Hardy-Weinberg – Gesetz nachweisen, was für eine sich im Gleichgewicht befindende Population spricht (Stern 1943). Die untersuchten Polymorphismen scheinen also nicht zu einer übermäßigen Selektion durch Krankheitsauslösung zu führen. Ferner scheint das ausgewählte Patienten- und Probandenkollektiv einer an die Realität angenäherten Situation zu entsprechen.

Single-Nukleotid - Polymorphismen wurden in verschiedenen DNA-Reparaturgenen, wie XPA, XPC, XPD, XPF sowie XPG nachgewiesen (Khan et al. 2000). Die Proteine dieser Nukleotidexzisionsreparaturgene sind allerdings nicht nur an der Korrektur UV-induzierter DNA-Schäden beteiligt, sondern sie sorgen ebenfalls für die Eliminierung von DNA-Schäden, die durch andere Karzinogene, wie zum Beispiel Benzo[a]pyrendioxid im Zigarettenrauch verursacht wurden (Denissenko et al. 1996). Vorhergehende Studien deuten darauf hin, dass Polymorphismen der NER-Gene die DNA-Reparaturfähigkeit modulieren und somit zu einem erhöhten Risiko von Hauttumoren (Wei et al. 1993), Lungentumoren (Wei et al. 1996) sowie Tumoren des Kopfes und des Halses (Cheng et al. 1998) beitragen können. So zeigte sich beispielsweise bei 40 Patienten mit Basalzellkarzinomen

gegenüber 40 gesunden Kontrollen für Träger eines homozygoten Polymorphismus im Exon23 des XPD-Gens, der zu einem Aminosäureaustausch (Lys751) führt, ein 4,3fach (nicht signifikant) erhöhtes Risiko für die Entstehung von Basalzellkarzinomen (Dybdahl et al. 1999). Weiterhin konnte von Wei et al. (2003) bei 312 Melanompatienten und 324 Kontrollen gezeigt werden, dass eine reduzierte Nukleotidexzisionsreparaturkapazität einen unabhängigen Risikofaktor für das kutane maligne Melanom darstellt und zur Suszeptibilität des malignen Melanoms in der Bevölkerung beitragen kann. Tomescu et al. (2001) fanden eine signifikante Assoziation von drei Polymorphismen des DNA-Reparaturgens XPD mit dem malignen Melanom.

Im Intron9 des des DNA-Reparaturgens XPC gibt es einen häufig vorkommenden Polymorphismus, der aus einer 83 bp – Insertion aus A und T Basen (Poly AT) und einer 5 bp – Deletion besteht. In einer Gruppe von 97 zufällig ausgewählten Probanden in den USA lag die Häufigkeit dieses Insertions/Deletions-Polymorphismus PAT+ bei ~40% (Khan et al. 2000). Dieser PAT-Polymorphismus ist interessanterweise mit erhöhtem Risiko für Tumoren im Kopf- und Halsbereich assoziiert (Shen et al. 2001). In einer Studie mit 102 gesunden Probanden konnte bei Personen mit dem homozygoten Polymorphismus PAT ++ eine um 23,4% verminderte Nukleotidexzisionsreparaturkapazität ( $p=0,02$ ) gegenüber Probanden mit PAT -/- nachgewiesen werden (Qiao et al. 2002).

Ein weiterer Polymorphismus mit ähnlicher Häufigkeit existiert am 3'-Ende der XPC-cDNA (A2920C im Exon15), welcher zu einem Aminosäureaustausch von Lysin zu Glutamin führt (Gozukara et al. 2001). Bei der Komplementierung DNA-reparaturdefizienter XPC-Zellen war das A2920C-Allel ebenso effektiv wie das A2920A-Allel (Khan et al. 2000). Der Aminosäureaustausch von Lysin zu Glutamin hat also keine Änderung der DNA-Reparaturfähigkeit des XPC-Proteins zur Folge. Interessanterweise ergab eine Studie die Vergesellschaftung des 2920C-Allels des XPC-Exon15 - Polymorphismus mit Blasenkrebs (Sanyal et al. 2004). Weiterhin scheint der 2920C/C-Genotyp mit einer verminderten Reparatur von Einzelstrangbrüchen einher zu gehen (Vodicka et al. 2004).

---

Ein weiterer häufig vorkommender C/A-SNP existiert an Position -6 im Bereich der Intron11-Spliceakzeptorstelle des Exon12 (Khan et al. 2002). In den USA ergab eine Untersuchung von 97 gesunden Probanden, dass dieser Polymorphismus mit dem PAT-Polymorphismus im Intron9 sowie dem SNP A2920C im Exon15 des XPC-Gens, die insgesamt ~9 kb voneinander entfernt liegen, im Kopplungsungleichgewicht liegt und diese drei Polymorphismen einen Haplotyp bilden. Bei ~40% aller Probanden fand sich der Haplotyp PAT<sub>+</sub>/Intron11A/Exon15C (Khan et al. 2002). Auch diese Arbeit zeigte das Kopplungsungleichgewicht dieser drei Polymorphismen (Abbildungen 1a und 1b, Tabelle 3), welches Blankenburg et al. (2005) ebenfalls nachwies. Der Informationsgehalt der Intron11/Exon12-Spliceakzeptorstelle wird durch den Polymorphismus Intron11-6A von 7,5 auf 5,1 bits reduziert (Khan et al. 2002, Schneider 1997). Es müsste also bei Vorliegen von A die Splicestelle weniger häufig durch die Splicingmechanismen erkannt werden, woraus eine vermehrte Deletion von Exon12 resultiert (Schneider 1997). Tatsächlich konnte eine signifikant höhere Menge der XPC-mRNA-Splicevariante mit Deletion von Exon12 (2,6fach im Vergleich zum C/C-Genotyp) in Fibroblasten mit homozygotem A/A-Genotyp nachgewiesen werden. In einem Wirtszell-Komplementationstestsystem wurde gleichzeitig eine verminderte DNA-Reparaturfunktion der Splicevariante „Deletion Exon12“ nachgewiesen (Khan et al. 2002). Dadurch könnte die Assoziation des XPC-PAT<sub>+</sub>/Intron11A/Exon15C – Haplotyps mit der Entwicklung verschiedener Tumoren erklärt werden. Wen et al. (2009) fanden eine höhere Frequenz von XPC- und XPG – Polymorphismen bei Patienten mit Harnblasenkarzinom im Vergleich zu gesunden Kontrollen in der chinesischen Bevölkerung. Dies macht einen zumindest modulierenden Einfluss auf die Tumorentstehung wahrscheinlich.

Der Polymorphismus XPG C3507G wurde zufällig erstmals bei einem XPG-Patienten und seinen Angehörigen gefunden (Noussipiel und Clarkson 1994). Zwei schwedische Studien ergaben einen Zusammenhang mit Blasen- und Brustkrebs (Kumar et al. 2003, Sanyal et al. 2004).

Polymorphismen, die scheinbar keinen oder nur einen subtilen Einfluss auf die DNA-Reparaturfunktion wie der XPC Exon10 G2166A – Polymorphismus, der keinen Aminosäureaustausch zur Folge hat, haben, können dennoch über die Assoziation mit anderen funktionell relevanten DNA-Veränderungen Einfluss auf die Krebsentstehung haben. So war beispielsweise der Polymorphismus XPC Exon15 A2920C, dessen Aminosäureaustausch nicht zur Veränderung der DNA-Reparaturfähigkeit führte, trotzdem mit der Krebsentstehung assoziiert (Sanyal et al. 2004).

Die ermittelten Genotypfrequenzen der Polymorphismen XPC Exon8 T1601C und XPG Exon15 C3507G entsprechen den Ergebnissen früherer Studien (Sanyal et al. 2004, Emmert et al. 2000, Gozukara et al. 2001, Kumar et al. 2003). Ebenfalls in Übereinstimmung mit vorhergehenden Studien (Blankenburg et al. 2005, Li et al. 2006) konnte für keinen der untersuchten Marker ein signifikanter Einfluss auf die Entstehung multipler maligner Melanome nachgewiesen werden, wobei jedoch der Polymorphismus G2166A in Exon10 des XPC die Signifikanz nur knapp verfehlte. Anzumerken ist hier jedoch, dass in dieser Untersuchung lediglich zwei Probanden der Kontrollgruppe homozygot für das seltenere Allel (A/A) waren.

Blankenburg et al. (2005) konnten jedoch zeigen, dass die XPC-Genotypen PAT +/+, Intron11 -6 A/A sowie Exon15 2920 C/C mit einem erhöhten Melanomrisiko bei Patienten mit weniger als 50 Nävi assoziiert sind. Möglicherweise lässt sich der unabhängige Einfluss der DNA-Reparatur erst bei fehlendem Einfluss bekannter Risikofaktoren für die Entwicklung maligner Melanome wie beispielsweise „hohe Nävuszahl“ herausarbeiten. Ähnliches wurde zuvor bereits berichtet (Baccarelli et al. 2004).

Blankenburg et al. (2005) konnten weiterhin eine Assoziation der XPC-Genotypen PAT +/+, Intron11 -6 A/A sowie Exon15 2920 C/C mit dem Melanomrisiko bei Patienten mit multiplen malignen Melanomen zeigen, welche typischerweise keine weiteren Risikofaktoren für die Entstehung multipler maligner Melanome (positive Familienanamnese, dysplastisches Nävus-Syndrom, hohe Anzahl von Nävi) aufwiesen. Patienten mit malignen Melanom haben bekanntermaßen ein deutlich erhöhtes Risiko, an einem zweiten malignen Melanom zu erkranken (Johnson et al.

1998). Dieses wurde von Nashan et al. (2003) als über 30fach erhöht beschrieben. Etwa 8-12% aller Fälle von malignen Melanomen entstehen bei Patienten mit positiver Familienanamnese (Greene et al. 1985, Kraemer et al. 1983). Allerdings lassen sich nur ca. 50% dieser familiär gehäuften Melanomfälle auf einen genetischen Defekt im CDKN2-Gen, welches das Protein p16 kodiert, zurückführen. p16 inhibiert die Zyklin-D-Kinase und fungiert somit als Zellzyklusregulator (Newton Bishop et al. 1998). Es scheinen also weitere, bisher unbekannte Faktoren an der Entstehung multipeler Melanome beteiligt zu sein, eine verminderte DNA-Reparaturkapazität ließ sich in dieser Arbeit leider nur tendenziell, nicht aber statistisch signifikant nachweisen. Möglicherweise können folgende größere Untersuchungen weiteren Aufschluss geben.

Wie erwartet korrelierte die Expression der XPC- und XPG-Splicevariante nicht miteinander. Beide Studiengruppen dieser Arbeit erwiesen sich in Bezug auf die Expression der XPC-Splicevariante sowie in der Verteilung der nichtgenetischen Faktoren als übereinstimmend. Eine hier beobachtete signifikante Assoziation der Polymorphismen A2920C (Exon15,  $p < 0,0001$ ), C-6A (Intron11,  $p < 0,0001$ ) und PAT (Intron9,  $p < 0,0001$ ) mit der Expression der Splicevariante war zu erwarten. Interessanterweise zeigten jedoch die Träger des jeweils selteneren Allels aller drei Polymorphismen eine fast doppelt so hohe Genexpression (Tabellen 6 und 7).

Für die XPG-Splicevariante konnte eine solche SNP-abhängige Überexpression nicht verzeichnet werden. Allerdings wurde für die Kontrollgruppe im Vergleich zu der Gruppe der Melanopatienten eine signifikant niedrigere mRNA-Expression der XPG-Splicevariante ermittelt. Eine niedrigere Expression von XPG wurde ebenfalls signifikant in beiden untersuchten Gruppen für 60-80 – jährige Probanden gegenüber 24-40 – Jährigen bestimmt. Insgesamt scheint die Expression der XPG-Splicevariante unter den Fällen gegenüber den Kontrollen erhöht zu sein, wenn im Allgemeinen die Genexpression natürlicherweise im Alter auch abnehmen mag. Es wurden hierbei in der Gruppe der Melanopatienten sowohl Individuen ermittelt, die eine vergleichbare Expression der XPG-Splicevariante wie die Kontrollgruppe aufwiesen (Abbildung 2), als auch welche mit einer deutlich erhöhten

Genexpression, die ermittelte Überexpression lässt sich also nicht auf eine gleichmäßige Überexpression der gesamten Gruppe zurückführen.

Insgesamt fand sich eine übermäßig hohe Expression der XPC- und XPG-Splicevariante überwiegend bei Männern, jüngeren Probanden sowie Probanden mit vielen Nävi, was bisher noch nicht beschrieben wurde. Dennoch erwies sich der Einfluss dieser Faktoren auf die Genexpression als nicht signifikant, gegebenenfalls könnten folgende Studien mit einer größeren Anzahl von Probanden weiteren Aufschluss geben.

Bei der Basismessung (also unter Verwendung von unbestrahltem Plasmid) war kein Gruppenunterschied hinsichtlich des DNA-Schadens feststellbar, beide Gruppen waren also, was Transfektionseffizienz, Plasmidüberleben, Transkription und Translation betrifft, übereinstimmend. Es ist daher davon auszugehen, dass eine im Folgenden gemessene Abweichung des DNA-Schadens nahezu ausschließlich von der individuellen funktionellen DNA-Reparaturkapazität abhing. Allerdings konnte ein signifikanter Gruppenunterschied in Bezug auf den DNA-Schaden weder für die Bestrahlung des Plasmids mit 500 J noch mit 1000 J ermittelt werden.

Im „repeated measurements“ Modell zeigte sich ein signifikanter dosisabhängiger Effekt auf den DNA-Schaden, ein dosisabhängiger oder alle Dosen betreffender Gruppenunterschied wurde jedoch nicht deutlich. Möglicherweise ist dieser Effekt auf ein ungenaues Einhalten der Transfektionszeiten zurückzuführen, da nach Ablauf der exakten Inkubationszeit stets zunächst das Abstoppen der Transfektion der Basismessung, dann der Messung der Dosis 500 J und schließlich der Messung der Dosis 1000 J erfolgte. Da dieser Fehler jedoch bei allen Messungen gemacht wurde, relativierte sich dieser und war für die Hauptfragestellung dieser Arbeit nicht mehr relevant. Eine exakte Aussage über das Ausmaß des DNA-Schadens in Abhängigkeit von der Plasmidbestrahlung lässt sich dadurch jedoch nur annähernd treffen.

In Übereinstimmung mit vorhergehenden Studien erwies sich in dieser Studie das Alter als einzige signifikante Einflussgröße auf die funktionelle DNA-

---

Reparaturkapazität (Baccarelli et al. 2004, Hemminki et al. 2001, Annett et al. 2004, Goukassian et al. 2000, Moriwaki et al. 1996).

Abschließend ist zu sagen, dass für keinen der untersuchten genetischen Marker ein signifikanter Einfluss auf die funktionelle DNA-Reparaturkapazität und damit auf das Entstehen multipler maligner Melanome ermittelt werden konnte. Ein Zusammenhang der Polymorphismen XPC Exon8 G1580A, Exon8 T1601C, Exon10 G2166A sowie XPG Exon15 C3507G mit dem Auftreten maligner Melanome konnte bereits in vorhergehenden Studien (Blankenburg et al. 2005) nicht gezeigt werden. Selbst in einem Hochrisiko-Kollektiv von Patienten mit multiplen malignen Melanomen konnte dieser Zusammenhang nicht bestätigt werden, obwohl Blankenburg et al. (2005) eine Assoziation der drei im Kopplungsungleichgewicht liegenden Polymorphismen mit dem Auftreten multipler maligner Melanome zeigen konnten. Dies liegt wohl an der zu kleinen Stichprobengröße von nur 30 Melanompatienten. Möglicherweise können folgende, größer angelegte Studien Aufschluss geben.

Zielsetzung der Untersuchung war es, neue Erkenntnisse über Risikofaktoren für die Entstehung maligner Melanome zu erlangen.

Die vorliegende Arbeit konnte tendenziell, in Übereinstimmung mit vorangegangenen Studien, zeigen, dass helle Haut- und Haarfarbe sowie multiple Nävuszellnävi als Risikofaktoren für die Entstehung maligner Melanome gelten. Von den 7 hier untersuchten Polymorphismen war keiner signifikant mit dem Melanomrisiko assoziiert. Drei der untersuchten XPC-Polymorphismen liegen im Kopplungsungleichgewicht und führen zu einer erhöhten mRNA-Expression der XPC-Splicevariante, wenn das seltenere Allel vorliegt. Ein Zusammenhang dieser XPC-Splicevarianten - Expression mit dem Melanomrisiko konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu zeigte sich eine signifikant höhere mRNA-Expression der XPG-Splicevariante bei Melanompatienten, wobei diese unabhängig von den SNPs war. Das Vorliegen des INT11-A – Allels führte in der vorliegenden Untersuchung zu einer signifikant höheren Expression der XPC Del12 mRNA – Isoform. Für Homozygotie konnte sogar eine tendenziell verminderte DNA-

---

Reparatur nachgewiesen werden. Diese tendenziell verminderte DNA-Reparaturfähigkeit konnte wiederum bei Melanompatienten gezeigt werden.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die untersuchten XPC-Polymorphismen signifikant mit der XPC mRNA-Expression und tendenziell mit einer verringerten funktionellen DNA-Reparaturfähigkeit zusammenhängen. Tendenziell konnte auch ein Zusammenhang der XPC-Polymorphismen mit einer verringerten Nukleotidexzisionsreparatur bei Melanompatienten beobachtet werden. Dass die XPC-Polymorphismen oder die Nukleotidexzisionsreparatur nicht signifikant mit dem Melanom assoziiert waren, ist am ehesten auf eine zu klein gewählte Hochrisikogruppe von Patienten mit multiplen Melanomen zurückzuführen.

Erstmalig gezeigt werden konnte ein Zusammenhang zwischen der spontanen alternativ gesplittenen XPG mRNA-Variante (kryptisches Exon 1 im Intron 1) und dem Melanomrisiko. Es wurde möglicherweise so ein neuer molekularer Marker für das Melanomrisiko gefunden.

## 5 Zusammenfassung

Das maligne Melanom ist eine bösartige Tumorerkrankung von zunehmender klinischer Bedeutung, da dessen Inzidenz weltweit steigt. Die genaue Pathogenese auf molekularer Ebene konnte bislang nur zum Teil analysiert werden. Bekanntermaßen spielt die Sonnenexposition, während derer zahlreiche DNA-Schäden wie Pyrimidin-Dimere in den Basalzellen der menschlichen Haut verursacht werden, eine große Rolle. Um einer Entartung der geschädigten Zelle entgegenzuwirken, hält diese verschiedene Mechanismen zur DNA-Reparatur bereit, unter anderem die Nukleotidexzisionsreparatur, die insbesondere Pyrimidin-Dimere eliminieren kann.

In der vorliegenden Arbeit sollte ein eventueller Zusammenhang zwischen DNA-Reparaturkapazität und der Entstehung maligner maligner Melanome ermittelt werden. Hierzu wurden periphere Blut-Mononukleäre Zellen von gesunden Probanden mit denen von Patienten mit multiplen malignen Melanomen als Hochrisikokollektiv bezüglich ihrer DNA-Reparaturkapazität verglichen. Tendenziell wiesen Patienten mit multiplen malignen Melanomen tatsächlich eine verminderte DNA-Reparaturkapazität verglichen mit gesunden Probanden auf. Möglicherweise könnte also eine reduzierte DNA-Reparaturkapazität für die Entstehung maligner Melanome mitverantwortlich sein.

Des Weiteren ist die frühzeitige Erkennung maligner Melanome von essentieller Bedeutung, um eine kurative Therapie anstreben zu können. Bei Vorliegen von bekannten Risikofaktoren für die Entstehung maligner Melanome wie beispielsweise multiple Nävuszellnävi oder helle Haut- und Haarfarbe sind engmaschigere Kontrolluntersuchungen daher sinnvoll.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war es, auf molekularer Ebene weitere Risikofaktoren für die Entstehung maligner Melanome zu untersuchen. Es wurden daher 7 Polymorphismen der Gene XPC und XPG, die Enzyme der Nukleotidexzisionsreparatur codieren, auf einen möglichen Zusammenhang mit dem Melanomrisiko untersucht. Drei der untersuchten XPC-Polymorphismen standen dabei im Kopplungsungleichgewicht. Ein Zusammenhang mit dem Melanomrisiko ließ sich signifikant jedoch für keinen der untersuchten Polymorphismen

nachweisen. Es wurden außerdem zwei alternative Splicevarianten untersucht: XPC Del Ex12 und XPG Krypt Ex1. Bei Vorliegen des selteneren Allels führen die drei im Kopplungsungleichgewicht liegenden XPC-Polymorphismen zu einer erhöhten Expression der XPC Del Ex12 – Splicevariante. Das Vorliegen des INT 11A – Allels führte zu einer signifikant erhöhten Expression der XPC Del Ex12 – Isoform, bei Homozygotie konnte dabei sogar eine verminderte DNA-Reparaturkapazität nachgewiesen werden. Die Expression der XPG Krypt Ex1 – Splicevariante war bei Melanompatienten signifikant erhöht, und dies unabhängig von den SNPs. Es handelt sich also möglicherweise um einen neuen molekularen Marker für das Melanomrisiko.

---

## 6 Literaturverzeichnis

**Ananthaswamy HN, Pierceall WE (1990):** Molecular mechanisms of ultraviolet radiation carcinogenesis. *Photochem Photobiol* 52, 1119-1136

**Annett K, Hyland P, Duggan O, Barnett C, Barnett Y (2004) :** An investigation of DNA excision repair capacity in human CD4+ T cell clones as a function of age in vitro. *Exp Gerontol* 39, 491-498

**Armstrong BK, Kricger A (1995):** Skin cancer. *Dermatol Klin* 13, 583-594

**Autier P, Joarlette M, Lejeune F, Liénard D, André J, Achten G (1991):** Cutaneous malignant melanoma and exposure to sunlamps and sunbeads: a descriptive study in Belgium. *Melanoma Res* 1, 69-74

**Baccarelli A, Calista D, Minghetti P, Marinelli B, Albetti B, Tseng T, Hedayati M, Grossman L, Landi G, Struewing JP (2004):** XPD gene polymorphism and host characteristics in the association with cutaneous malignant melanoma risk. *Br J Cancer* 90, 497-502

**Berwick M, Vineis P (2000):** Markers of DNA repair and susceptibility to cancer in humans: an epidemiologic review. *J Natl Cancer Inst* 92, 874-897

**Blankenburg S, König IR, Moessner R, Laspe P, Thoms KM, Krueger U, Khan SG, Westphal G, Berking C, Volkenandt M (2005):** Assessment of 3 xeroderma pigmentosum group C gene polymorphisms and risk of cutaneous melanoma: a case-control study. *Carcinogenesis* 26, 1085-1090

**Blankenburg S, König IR, Moessner R, Laspe P, Thoms KM, Krueger U, Khan SG, Westphal G, Volkenandt M, Neumann C (2005):** No association between three xeroderma pigmentosum group C and one group G gene polymorphisms and risk of cutaneous melanoma. *Eur J Hum Genet* 13, 253-255

---

**Boddie AW Jr., McBride CM:** Das Melanom bei Kindern und Jugendlichen; in: Hautmelanome Diagnose, Therapie und weltweite Ergebnisse; hrsg v. Balch CM, Milton GW, Shaw HM, Soong SJ;. Springer Verlag, Berlin 1988, 67-73

**Boiteux S, Radicella JP (1999) :** Base excision repair of 8-hydroxyguanine protects DNA from endogenous oxidative stress. *Biochimie* 81, 59-67

**Bootsma D, Kraemer KH, Cleaver JE, Hoeijmakers JH:** Nucleotid excision repair syndromes: Xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy; in: The genetic basis of Human Cancer; hrsg. v. Vogelstein B, Kinzler KW; McGraw-Hill, New York 2002, 211-237

**Broughton BC, Cordonnier A, Kleijer WJ, Jaspers NG, Fawcett H, Raams A, Garritsen VH, Stary A, Avril MF, Boudsocq F (2002):** Molecular analysis of mutations in DNA polymerase eta in xeroderma pigmentosum-variant patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 815-820

**Bruce JL, Hurford RK Jr, Classon M, Koh J, Dyson N (2000):** Requirements for cell cycle arrest by p16INK4a. *Mol Cell* 6, 737-742

**Caldas C, Hahn SA, da Costa LT, Redston MS, Schutte M, Seymour AB, Weinstein CL, Hruban RH, Yeo CJ, Kern SE (1994):** Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 (MTS1) gene in pancreatic adenocarcinoma. *Nat Genet* 8, 27-32

**Carless MA, Griffiths LR (2008):** Cytogenetics of melanoma and nonmelanoma skin cancer. *Adv Exp Med Biol* 624, 227-240

**Cheng L, Eicher SA, Guo Z, Hong WK, Spitz MR, Wei Q (1998):** Reduced DNA repair capacity in head and neck cancer patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 7, 465-468

---

**Christmann M, Tomicic MT, Roos WP, Kaina B (2003)** : Mechanisms of human DNA repair: An update. *Toxicology* 193, 3-34

**Chu G, Mayne L (1996)**: Xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy: Do the genes explain the diseases? *Trends Genet* 12, 187-192

**Clark WH Jr, From L, Bernardino EA, Mihm MC (1969)**: The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res* 29, 705-727

**Cleaver JE, Charles WC, McDowell ML, Sadinski WJ, Mitchell DL (1995)**: Overexpression of the XPA repair gene increases resistance to ultraviolet radiation in human cells by selective repair of DNA damage. *Cancer Res* 55, 6152-6160

**Cooper PK, Nospikel T, Clarkson SG, Leadon SA (1997)**: Defective transcription-coupled repair of oxidative base damage in Cockayne syndrome patients from XP group G. *Science* 275, 990-993

**Crovato F, Rebora A (1985)**: PIBI(D)S syndrome: A new entity with defect of the desoxyribonucleic acid excision repair. *J Am Acad Dermatol* 13, 683-685

**de Boer BJ, Hoeijmakers JH (2000)**: Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis* 21, 453-460

**Denissenko MF, Pao A, Tang M, Pfeifer GP (1996)** : Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53. *Science* 274, 430-432

**de Wet JR, Wood KV, DeLuca M, Helinski DR, Subramani S (1987)**: Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 7, 725-737

---

**Dybdahl M, Vogel U, Frenz G, Wallin H, Naxo BA (1999):** Polymorphisms in the DNA repair gene XPD: correlations with risk and age at onset of basal cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 8, 77-81

**Elder DE, Goldman LI, Goldman SC, Greene MH, Clark WH Jr (1980) :** Dysplastic nevus syndrome. A phenotypic association of sporadic cutaneous melanoma. *Cancer* 46, 1787-1794

**Emmert S, Kobayashi N, Khan SG, Kraemer KH (2000):** The xeroderma pigmentosum group C gene leads to selective repair of cyclobutane pyrimidine dimers rather than 6-4 photoproducts. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 2151-2156

**Emmert S, Schneider TD, Khan SG, Kraemer KH (2001):** The human XPG gene: gene architecture, alternative splicing and single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res* 29, 1443-1452 ,

**Fritsch P, Zelger B, Stepp N,** Tumoren der Haut; in: *Dermatologie und Venerologie Lehrbuch und Atlas*; hrsg. v. Fritsch P; Springer Verlag, Berlin 1998, 585-599

**Garbe C, Blum A (2001):** Epidemiology of cutaneous melanoma in Germany and worldwide. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 14, 280-290

**Garbe C, Schaumburg-Lever G:** Klinik und Histologie des malignen Melanoms; in: *Dermatologische Onkologie*; hrsg. v. Garbe C, Dummer R, Kaufmann R, Tilgen W; Springer Verlag, Berlin 1997, 247-270

**Gilchrest BA, Eller MS, Geller AC, Yaar M (1999):** The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. *N Engl J Med* 340, 1341-1348

**Goukassian D, Gad F, Yaar M, Eller MS, Nehal US, Gilchrest BA (2000):** Mechanisms and implications of the age-associated decrease in DNA repair capacity. *FASEB J* 14, 1325-1334

---

**Gozukara EM, Khan SG, Metin A, Emmert S, Busch DB, Shahlavi T, Coleman DM, Miller M, Chinsomboon N, Stefanini M (2001):** A stop codon in xeroderma pigmentosum group C families in Turkey and Italy: molecular genetic evidence for a common ancestor. *J Invest Dermatol* 117, 197-204

**Greene MH, Clark WH Jr, Tucker MA, Elder DE, Kraemer KH, Guerry D 4<sup>th</sup>, Witmer WK, Thompson J, Matozzo I, Fraser MC (1985a):** Acquired precursors of cutaneous malignant melanoma. The familial dysplastic nevus syndrome. *N Engl J Med* 312, 91-97

**Greene MH, Clark WH Jr, Tucker MA, Kraemer KH, Elder DE, Fraser MC (1985b):** High risk of malignant melanoma in melanoma-prone families with dysplastic nevi. *Ann Intern Med* 102, 458-465

**Greer LF 3rd, Szalay AA (2002):** Imaging of light emission from the expression of luciferases in living cells and organisms: a review. *Luminescence* 17, 43-74

**Hansson J, Munn M, Rupp WD, Kahn R, Wood RD (1989):** Localization of DNA Repair Synthesis by Human Cell Extracts to a Short Region at the Site of a Lesion. *J Biol Chem* 264, 21788-21792

**Hemminki K, Xu G, Angelini S, Snellman E, Jansen CT, Lambert B, Hou SM (2001):** XPD exon 10 and 23 polymorphisms and DNA repair in human skin in situ. *Carcinogenesis* 22, 1185-1188

**Hey T, Lipps G, Sugawara K, Iwai S, Hanaoka F, Krauss G (2002) :** The XPC-HR23B complex displays high affinity and specificity for damaged DNA in a true-equilibrium fluorescence assay. *Biochemistry* 41, 6583-6587

**Higgins EM, du Vivier AW (1992) :** Possible induction of malignant melanoma by sunbed use. *Clin Exp Dermatol* 17, 357-359

---

**Hoeijmakers JH (2001):** Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411, 366-374

**Jensen AO, Bautz A, Olesen AB, Karagas MR, Sorensen HT, Friis S (2008):** Mortality in Danish patients with nonmelanoma skin cancer, 1978-2001. *Br J Dermatol* 159, 419-425

**Johnson CF (1977):** Cockayne syndrome. *Clin Pediatr (Phila)* 16, 232

**Johnson TM, Hamilton T, Lowe L (1998):** Multiple primary melanomas. *J Am Acad Dermatol* 39, 422-427

**Jung HD (1982):** Epidemiology of malignant melanoma in East Germany and West Germany. *Hautarzt* 33, 636-639

**Khan SG, Levy HL, Legerski R, Quackenbush E, Reardon JT, Emmert S, Sancar A, Li L, Schneider TD, Cleaver JE (1998) :** Xeroderma pigmentosum group C splice mutation associated with autism and hypoglycinemia. *J Invest Dermatol* 111, 791-796

**Khan SG, Metter EJ, Tarone RE, Bohr VA, Grossman L, Hedayati M, Bale SJ, Emmert S, Kraemer KH (2000):** A new xeroderma pigmentosum group C poly(AT) insertion/deletion polymorphism. *Carcinogenesis* 21, 1821-1825

**Khan SG, Muniz-Medina V, Shahlavi T, Baker CC, Inui H, Ueda T, Emmert S, Schneider TD, Kraemer KH (2002):** The human XPC DNA repair gene: arrangement, splice site information content and influence of a single nucleotide polymorphism in a splice acceptor site on alternative splicing and function. *Nucleic Acids Res* 30, 3624-3631

**Klungland A, Höss M, Gunz D, Constantinou A, Clarkson SG, Doetsch PW, Bolton PH, Wood RD, Lindahl T (1999):** Base excision repair of oxidative DNA damage activated by XPG protein. *Mol Cell* 3, 33-42

---

**Kraemer KH, Greene MH, Tarone R, Elder DE, Clark WH Jr, Guerry D 4th (1983)** : Dysplastic naevi and cutaneous melanoma risk. *Lancet* 1983, 2 1076-1077

**Kraemer KH, Lee MM, Scotto J (1984)**: DNA repair protects against cutaneous and internal neoplasia: evidence from xeroderma pigmentosum. *Carcinogenesis* 5, 1076-1077

**Kraemer KH, Lee MM, Scotto J (1987)**: Xeroderma pigmentosum. Cutaneous, ocular and neurologic abnormalities in 830 published cases. *Arch Dermatol* 123, 241-250

**Kraemer KH, Lee MM, Andrews AD, Lambert WC (1994)**: The role of sunlight and DNA-Repair in melanoma and nonmelanoma skin cancer. The xeroderma pigmentosum paradigm. *Arch Dermatol* 130, 1018-1021

**Kumar R, Höglund L, Zhao C, Försti A, Snellman E, Hemminki K (2003)** : Single nucleotide polymorphisms in the XPG gene : determination of role in DNA repair and breast cancer risk. *Int J Cancer* 103, 671-675

**Lange CS (1975)**: The repair of DNA double-strand breaks in mammalian cells and the organization of the DNA in their chromosomes. *Basic Life Sci* 5, 677-683

**Leadon SA, Lawrence DA (1991)**: Preferential repair of DNA damage on the transcribed strand of the human metallothionein genes requires RNA polymerase II. *Mutat Res* 255, 67-78

**Leiter U, Garbe C (2008)**: Epidemiology of melanoma and nonmelanoma skin cancer – the role of sunlight. *Adv Exp Med Biol* 624, 89-103

---

**Li C, Hu Z, Liu Z, Wang LE, Strom SS, Gershenwald JE, Lee JE, Ross MI, Mansfield PF, Cormier JN (2006):** Polymorphisms in the DNA repair genes XPC, XPD and XPG and risk of cutaneous melanoma: a case-control analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15, 2526-2532

**Liggett WH Jr, Sidransky D (1998):** Role of the p16 tumor suppressor gene in cancer. *J Clin Oncol* 16, 1197-1206

**Lindahl T, Wood RD (1999):** Quality control by DNA repair. *Science* 286, 1897-1905

**Lipozencic J, Jurakic-Toncic R, Rados J, Celic D (2008):** Epidemiology of nonmelanoma and melanoma skin cancer in zagreb, croatia. *Acta Dermatovenerol Croat* 16, 193-203

**Malumbres M, Pérez de Castro I, Santos J, Meléndez B, Mangués R, Serrano M, Pellicer A, Fernández-Piqueras J (1997) :** Inactivation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p15INK4b by deletion and de novo methylation with independence of p16INK4a alterations in murine primary T-cell lymphomas. *Oncogene* 14, 1361-1370

**Masutani C, Sugasawa K, Yanagisawa J, Sonoyama T, Ui M, Enomoto T, Takio K, Tanaka K, van der Spek PJ, Bootsma D (1994):** Purification and cloning of a nucleotide excision repair complex involving the xeroderma pigmentosum group C protein and a human homologue of yeast RAD23. *EMBO* 13, 1831-1843

**Masutani C, Kusumoto R, Yamada A, Dohmae N, Yokoi M, Yuasa M, Araki M, Iwai S, Takio K, Hanaoka F (1999):** The XPV (xeroderma pigmentosum variant) gene encodes human DNA polymerase eta. *Nature* 399, 700-704

**Matsui MS, DeLeo VA (1991):** Longwave ultraviolet radiation and promotion of skin cancer. *Cancer Cells* 3, 8-12

---

**McCaul KA, Fritschi L, Baade P, Coory M (2008):** The incidence of second primary invasive melanoma in Queensland, 1982-2003. *Cancer Causes Control* 19, 451-458

**Mellon I, Hanawalt PC (1989):** Induction of the Escherichia coli lactose operon selectively increases repair of its transcribed DNA strand. *Nature* 342, 95-98

**Mitchell DL, Nairn RS (1989):** The biology of the (6-4) photoproduct. *Photochem Photobiol* 49, 805-819

**Mohrenweiser HW, Jones IM (1998):** Variation in DNA repair is a factor in cancer susceptibility: a paradigm for the promises and perils of individual and population risk estimation? *Mutat Res* 400, 15-24

**Moriwaki S, Ray S, Tarone RE, Kraemer KH, Grossman L (1996):** The effect of donor age on the processing of UV-damaged DNA by cultured human cells: reduced DNA repair capacity and increased DNA mutability. *Mutat Res* 364, 117-123

**Mu D, Sancar A (1997):** Model for XPC-independent transcription-coupled repair of pyrimidine dimers in humans. *J Biol Chem* 272, 7570-7573

**Mu D, Hsu DS, Sancar A (1996):** Reaction mechanism of human DNA repair excision nuclease. *J Biol Chem* 271, 8285-8294

**Nashan D, Kocer B, Schiller M, Luger T, Grabbe S (2003):** Significant risk of a second melanoma in patients with a history of melanoma but no further predisposing factors. *Dermatology* 206, 76-77

**Nelemans PJ, Groenendal H, Kiemeneij LA, Rampen FH, Ruiter DJ, Verbeek AL (1993):** Effect of intermittent exposure to sunlight on melanoma risk among indoor workers and sun-sensitive individuals. *Environ Health Perspect* 101, 252-255

---

**Nelson HH, Kelsey KT, Mott LA, Karagas MR (2002):** The XRCC1 Arg399Gln polymorphism, sunburn, and non-melanoma skin cancer: evidence of gene-environment interaction. *Cancer Res* 62, 152-155

**Newton Bishop JA, Harland M, Bishop DT (1998):** The genetics of melanoma: the UK experience. *Clin Exp Dermatol* 23, 158-161

**Nouspikel T, Clarkson SG (1994):** Mutations that disable the DNA repair gene XPG in a xeroderma pigmentosum group G patient. *Hum Mol Genet* 3, 963-967

**Nouspikel T, Lalle P, Leadon SA, Cooper PK, Clarkson SG (1997):** A common mutational pattern in Cockayne syndrome patients from xeroderma pigmentosum group G: implications for a second XPG function. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 3116-3121

**Painter RB (1974):** DNA damage and repair in eukaryotic cells. *Genetics* 78, 139-148

**Parkin DM, Muir CS (1992) :** Cancer incidence in five continents. Comparability and quality of data. *IARC Sci Publ* 120, 45-173

**Price VH, Odom RB, Ward WH, Jones FT (1980):** Trichothiodystrophy: sulfur-deficient brittle hair as a marker for a neuroectodermal symptom complex. *Arch Dermatol* 116, 1375-1384

**Qiao Y, Spitz MR, Guo Z, Hedayati M, Grossman L, Kraemer KH, Wei Q (2002a):** Rapid assessment of repair of ultraviolet DNA damage with a modified host-cell reactivation assay using a luciferase reporter gene and correlation with polymorphisms of DNA repair genes in normal human lymphocytes. *Mutat Res* 509, 165-174

---

**Qiao Y, Spitz MR, Shen H, Guo Z, Shete S, Hedayati M, Grossman L, Mohrenweiser H, Wei Q (2002b):** Modulation of repair of ultraviolet damage in the host-cell reactivation assay by polymorphic XPC and XPD/ERCC2 genotypes. *Carcinogenesis* 23, 295-299

**Rass K, Tilgen W (2008):** Treatment of melanoma and nonmelanoma skin cancer. *Adv Exp Med Biol* 624, 296-318

**Reardon JT, Mu D, Sancar A (1996):** Overproduction, purification and characterization of the XPC subunit of the human DNA repair excision nuclease. *J Biol Chem* 271, 19451-19456

**Reardon JT, Bessho T, Kung HC, Bolton PH, Sancar A (1997):** In vivo repair of oxidative DNA damage by human nucleotide excision repair system: possible explanation for neurodegeneration in xeroderma pigmentosum patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 9463-9468

**Rebora A, Crovato F (1987):** PIBI(D)S syndrome-trichothiodystrophy with xeroderma pigmentosum (group D) mutation. *J Am Acad Dermatol* 16, 940-947

**Richardson A, Fletcher L, Sneyd M, Cox B, Reeder AI (2008):** The incidence and thickness of cutaneous malignant melanoma in New Zealand 1994-2004. *N Z Med J* 121, 6-9

**Riedl T, Hanaoka F, Egly JM (2003):** The comings and goings of nucleotide excision repair factors on damaged DNA. *EMBO J* 22, 5293-5303

**Ruas M, Peters G (1998):** The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. *Biochim Biophys Acta* 1378, 115-177

---

**Rünger TM (1999):** Role of UVA in the pathogenesis of melanoma and non-melanoma skin cancer. A short review. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 15, 212-216

**Rünger TM, Epe B, Möller K (1995):** Repair of ultraviolet B and singlet oxygen-induced DNA damage in xeroderma pigmentosum cells. *J Invest Dermatol* 104, 68-73

**Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T:** Molecular cloning. A laboratory manual. 2. Auflage; Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 1989

**Sanyal S, Festa F, Sakano S, Zhang Z, Steineck G, Norming U, Wijkström H, Larsson P, Kumar R, Hemminki K (2004):** Polymorphisms in DNA repair and metabolic genes in bladder cancer. *Carcinogenesis* 25, 729-734

**Schneider TD (1997):** Sequence walkers: a graphical method to display how binding proteins interact with DNA or RNA sequences. *Nucleic Acids Res* 25, 4408-4415

**Serrano M (1997):** The tumor suppressor protein p16INK4a. *Exp Cell Res* 237, 7-13

**Setlow RB, Grist E, Thompson K, Woodhead AD (1993):** Wavelengths effective in induction of malignant melanoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 6666-6670

**Shen H, Sturgis EM, Khan SG, Qiao Y, Shahlavi T, Eicher SA, Xu Y, Wang X, Strom SS, Spitz MR (2001):** An intronic poly (AT) polymorphism of the DNA repair gene XPC and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck: a case-control study. *Cancer Res* 61, 3321-3325

**Shen MR, Jones IM, Mohrenweiser H (1998):** Nonconservative amino acid substitution variants exist at polymorphic frequency in DNA repair genes in healthy humans. *Cancer Res* 58, 604-608

---

**Sherr CJ, Roberts JM (1995):** Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 9, 1149-1163

**Situm M, Buljan M, Bulat V, Lugovic Mihic L, Bolanca Z, Simic D (2008):** The role of UV radiation in the development of basal cell carcinoma. *Coll Antropol* 32, 167-170

**Solomon CC, White E, Kristal AR, Vaughan T (2004) :** Melanoma and lifetime UV radiation. *Cancer Causes Control* 15, 893-902

**Stang K, Stang A, Stegmaier C, Ziegler H, Eisinger B, Stabenow R, Jöckel KH (2000):** Descriptive epidemiology of cutaneous malignant melanoma. Analyses of German cancer registry data. *Stud Health Technol Inform* 77, 139-142

**Stern C (1943):** The Hardy-Weinberg law. *Science* 97, 137-138

**Sugasawa K, Ng JM, Masutani C, Maekawa T, Uchida A, van der Spek PJ, Eker AP, Rademakers S, Visser C, Aboussekhra A (1997):** Two human homologs of Rad23 are functionally interchangeable in complex formation and stimulation of XPC repair activity. *Mol Cell Biol* 17, 6924-6931

**Sugasawa K, Ng JM, Masutani C, Iwai S, van der Spek PJ, Eker AP, Hanaoka F, Bootsma D, Hoeijmakers JH (1998):** Xeroderma pigmentosum group C protein complex is the initiator of global genome nucleotide excision repair. *Mol Cell* 2, 223-232

**Sugasawa K, Shimizu Y, Iwai S, Hanaoka F (2002):** A molecular mechanism for DNA damage recognition by the xeroderma pigmentosum group C protein complex. *DNA Repair (Amst)* 1, 95-107

**Swerdlow AJ, English JS, MacKie RM, O'Doherty CJ, Hunter JA, Clark J, Hole DJ (1988):** Fluorescent lights, ultraviolet lamps and risk of cutaneous melanoma. *BMJ* 297, 647-650

---

**Swift M, Chase C (1979):** Cancer in families with xeroderma pigmentosum. J Natl Cancer Inst 62, 1415-1421

**Takahashi E, Shiomi N, Shiomi T (1992):** Precise localisation of the excision repair gene, ERCC5, to human chromosome 13q32.3 - q33.1 by direct R-banding fluorescence in situ hybridization. Jpn J Cancer Res 83, 1117-1119

**Tay CH (1971):** Ichthyosiform erythroderma, hair shaft abnormalities, and mental and growth retardation. A new recessive disorder. Arch Dermatol 104, 4-13

**Thoms KM, Baesecke J, Emmert B, Hermann J, Roedling T, Laspe P, Leibeling D, Truemper L, Emmert S (2007):** Functional DNA repair system analysis in haematopoietic progenitor cells using host cell reactivation. Scand J Clin Lab Invest 67, 580-588

**Tomescu D, Kavanagh G, Ha T, Campbell H, Melton DW (2001) :** Nucleotide excision repair gene XPD polymorphisms and genetic predisposition to melanoma. Carcinogenesis 22, 403-408

**Traupe H:** Genetische Erkrankungen mit erhöhtem Krebsrisiko und ihre Betreuung; in: Dermatologische Onkologie: hrsg. v. Garbe C, Dummer R, Kaufmann R, Tilgen W; Springer Verlag, Berlin 1997, 599-607

**Tucker MA (2009):** Melanoma epidemiology. Hematol Oncol Clin North Am 23, 383-395

**Tucker MA, Fraser MC, Goldstein AM, Elder DE, Guerry D 4<sup>th</sup>, Organic SM (1993):** Risk of melanoma an other cancers in melanoma-prone families. J Invest Dermatol 100, 350-355

**van Steeg H (2001):** The role of nucleotide excision repair and loss of p53 in mutagenesis and carcinogenesis. Toxicol Lett 120, 209-219

---

**van Steeg H, Kraemer KH (1999):** Xeroderma pigmentosum and the role of UV-induced DNA damage in skin cancer. *Mol Med Today* 5, 86-94

**Venema J, Bartosová Z, Natarajan AT, van Zeeland AA, Mullenders LH (1992):** Transcription affects the rate but not the extent of repair of cyclobutane pyrimidine dimers in the human adenosine deaminase gene. *J Biol Chem* 267, 8852-8856

**Vodicka P, Kumar R, Stetina R, Sanyal S, Soucek P, Haufroid V, Dusinska M, Kuricova M, Zamecnikova M, Musak L (2004):** Genetic polymorphisms in DNA repair genes and possible links with DNA repair rates, chromosomal aberrations and single-strand breaks in DNA. *Carcinogenesis* 25, 757-763

**Volker M, Moné MJ, Karmakar P, van Hoffen A, Schul W, Vermeulen W, Hoeijmakers JH, van Driel R, van Zeeland AA, Mullenders LH (2001):** Sequential assembly of the nucleotide excision repair factors in vivo. *Mol Cell* 8, 213-224

**Wakasugi M, Reardon JT, Sancar A (1997):** The non-catalytic function of XPG protein during dural incision in human nucleotide excision repair. *J Biol Chem* 272, 16030-16034

**Walker IG, Sridhar R (1976):** The formation and repair of single-strand breaks in DNA of cultured mammalian cells treated with UV light, methylating agents or 4-nitroquinoline-1-oxide. *Chem Biol Interact* 12, 229-239

**Wei Q, Matanoski GM, Farmer ER, Hedayati MA, Grossman L (1993):** DNA repair and aging in basal cell carcinoma: a molecular epidemiology study. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 1614-1618

**Wei Q, Matanoski GM, Farmer ER, Hedayati MA, Grossman L (1995):** DNA repair capacity for ultraviolet light-induced damage is reduced in peripheral lymphocytes from patients with basal cell carcinoma. *J Invest Dermatol* 104, 993-996

---

**Wei Q, Spitz MR, Gu J, Cheng L, Xu X, Strom SS, Kripke ML, Hsu TC (1996) :** DNA Repair Capacity Correlates with Mutagen Sensitivity in Lymphoblastoid Cell Lines. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 5, 199-204

**Wei Q, Cheng L, Xie K, Bucana CD, Dong Z (1998):** Direct correlation between DNA repair capacity and metastatic potential of K-1735 murine melanoma cells. *J Invest Dermatol* 110, 187-188

**Wei Q, Lee JE, Gershenwald JE, Ross MI, Mansfield PF, Strom SS, Wang LE, Guo Z, Qiao Y, Amos CI (2003):** Repair of UV Light-Induced DNA Damage and Risk of Cutaneous Malignant Melanoma. *J Natl Cancer Inst* 95, 308-315

**Wen H, Ding Q, Fang ZJ, Xia GW, Fang J (2009):** Population study of genetic polymorphisms and superficial bladder cancer risk in Han-Chinese smokers in Shanghai. *Int Urol Nephrol* 41, 855-864

**Wildenberg J, Meselson M (1974):** Mismatch repair in heteroduplex DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 72, 2202-2206

**Wood RD (1999):** DNA damage recognition during nucleotide excision repair in mammalian cells. *Biochimie* 81, 39-44

**Wood RD, Mitchell M, Sgouros J, Lindahl T (2001):** Human DNA repair genes. *Science* 291, 1284-1289

**Yaar M, Gilchrist BA (2001):** Ageing and photoageing of keratinocytes and melanocytes. *Clin Exp Dermatol* 26, 583-591

**Yang R, Gombart AF, Serrano M, Koeffler HP (1995):** Mutational effects on the p16INK4a tumor suppressor protein. *Cancer Res* 55, 2503-2506

**Youl P, Aitken J, Hayward N, Hogg D, Liu L, Lassam N, Martin N, Green A (2002):** Melanoma in adolescents: a case-control study of risk factors in Queensland, Australia. *Int J Cancer* 98, 92-98

**Yuan X, Feng W, Imhof A, Grummt I, Zhou Y (2007):** Activation of RNA polymerase I transcription by cockayne syndrome group B protein and histone methyltransferase G9a. *Mol Cell* 27, 585-595

**Ziemba A, Derosier LC, Methvin R, Song CY, Clary E, Kahn W, Milesi D, Gorn V, Reed M, Ebbinghaus S (2001):** Repair of triplex-directed DNA alkylation by nucleotide excision repair. *Nucleic Acids Res* 29, 4247-4263

---

## 7 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb	Abbildung
Ala	Alanin
Amp	Ampicillin
AMP	Adenosinmonophosphat
Arg	Arginin
Asp	Asparagin
ATP	Adenosintri-phosphat
bp	Basenpaare
C	Cytosin
c	Konzentration
°C	Grad Celsius
CDK	Cyclin dependent kinase
C <sub>DNA</sub>	DNA-Konzentration
cDNA	copy-DNA
CI	Konfidenzintervall
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratzen-timeter
CMM	Cutaneous malignant melanoma
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CsCl	Cäsiumchlorid
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosintri-phosphat
dCTP	Desoxycytosintri-phosphat
DDB	DNA damage binding protein
DEAE-Dextran	Diethylaminoethyl-Dextran
dGTP	Desoxyguanintri-phosphat
DKG	Deutsche Krebsgesellschaft
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleotidtri-phosphat

---

DNA (= DNS)	Desoxyribonukleinsäure
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al	und andere
Ex	Exon
FCS	Fötale Kälberserum
Fd	Farad
Fly	Firefly
G	Guanin
g	Gramm
GGR	Global genome repair
GL	Generalisiertes lineares Regressionsmodell
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
G-Phase	Gap-Phase (Zellzyklus)
h	Stunde
HCl	Salzsäure
His	Histidin
H <sub>2</sub> O	Wasser
HWG	Hardy-Weinberg - Gleichgewicht
INK4a/ARF	Tumorsuppressiver Genort auf Chromosom 9p21
Int	Intron
IPTG	Isopropyl-beta-D-Thiogalactopyranosid
iso	Isoform
J	Joule
k	Kilo
KAc	Kaliumacetat
kb	Kilobase
KCl	Kaliumchlorid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat

---

KoAc	Kobaltacetat
krypt	kryptisch
l	Liter
LB	Luria broth
LD	Kopplungsungleichgewicht
log	Logarithmus
Luc	Luciferase
Lys	Lysin
M	Mol
m <sup>2</sup>	Quadratmeter
MAF	minor allele frequency
µg	Mikrogramm
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium-Ion
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
µm	Mikrometer
min	Minuten
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOH	Natronlauge
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ammoniumsulfat
nm	Nanometer
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
NZN	Nävuszellnävus
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OD	Optische Dichte
OR	Odds Ratio
p	kürzerer Arm eines Chromosoms

---

p16	Tumorsuppressorgen
Pa	Pascal
PAT	Poly AT
PBL	Medium für PBMCs
PBMC	Periphere Blut – mononukleäre Zellen
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
pCMV	Zytomegalievirus – Plasmid
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	Potentia hydrogenii
PHA	Phythämagglutinin
pmol	Picomol
q	längerer Arm eines Chromosoms
rel	relativ
RFLP	Restriktionsfragment-Längen- Polymorphismus
RL	Renilla-Luciferase
RLU	Relative Lichteinheit
RNA (=RNS)	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SNP	Single nucleotide polymorphism
S-Phase	Synthese-Phase (Zellzyklus)
STBS	Suspension Tris buffered saline
T	Thymin
Tab	Tabelle
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris buffered saline
TCR	Transkriptionsgebundene DNA-Reparatur
TE	Tris-EDTA
TSR	Template suppression reagent

---

U	Einheit
UpM	Umdrehungen pro Minute
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
UV	Ultraviolett
V	Volt
Val	Valin
vs	versus
W	Watt
wt	Wildtyp
XP	Xeroderma pigmentosum
XPA – XPG	Xeroderma pigmentosum – Gene A-G
XPV	Xeroderma pigmentosum Variante

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Steffen Emmert für die Initiation dieser Arbeit, seine allzeit freundliche fachliche Unterstützung sowie wertvolle Diskussionen und Ratschläge.

Weiterhin möchte ich mich ausdrücklich bei Herrn Dr. med. Kai-Martin Thoms für seine gewissenhafte Betreuung sowie insbesondere für die Einarbeitung in die Arbeit mit Zellkulturen bedanken. Er war für Fragen jederzeit ansprechbar und hat mit seiner konstruktiven Kritik wesentlich zum Zustandekommen dieser Arbeit beigetragen.

Ebenso gilt mein Dank Frau Petra Laspe insbesondere für die Einarbeitung in die Methodik der Polymerasekettenreaktion sowie Frau Karolin Zachmann für die stets motivierende Zusammenarbeit im Labor.

Sehr herzlich danken möchte ich auch Frau Prof. Dr. med. Heike Bickeböller sowie Herrn Albert Rosenberger für die statistische Auswertung der Ergebnisse dieser Arbeit.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Abteilung Dermatologie und Venerologie für die freundschaftliche und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre bedanken. Es war stets eine große Freude, mit ihnen zusammenzuarbeiten.

## **Lebenslauf**

Am 30. August 1980 wurde ich, Seike Vollert, als ältere Tochter des Diplom-Ingenieurs Uwe Vollert und der Fremdsprachenkorrespondentin Maren Vollert, geb. Jaschinski, in Itzehoe geboren.

Von 1987 bis 1991 besuchte ich die Grundschule in Krempe, anschließend von 1991 bis 2000 die Kaiser-Karl – Schule in Itzehoe, wo ich im Juli 2000 die allgemeine Hochschulreife erlangte.

Im Oktober 2000 begann ich das Studium der Humanmedizin an der Georg-August – Universität Göttingen. Die ärztliche Vorprüfung legte ich im September 2002 ab. Im Oktober 2002 begann ich in der Abteilung Dermatologie und Venerologie im Zentrum Arbeits-, Sozial-, Umwelt- und Rechtsmedizin und Dermatologie der Georg-August – Universität Göttingen mit der Anfertigung der vorliegenden Arbeit. Den ersten Abschnitt der ärztlichen Prüfung legte ich im August 2003, den zweiten Abschnitt der ärztlichen Prüfung im September 2005 ab.

Anschließend absolvierte ich das Praktische Jahr von Oktober 2005 bis Februar 2006 im Westküstenklinikum in Heide, von Februar 2006 bis Mai 2006 im Diakonissenkrankenhaus in Flensburg und von Mai 2006 bis September 2006 in der Universitätsklinik für Ophthalmologie in Kiel. Im November 2006 beendete ich das Studium der Humanmedizin mit dem Abschluss des dritten Abschnitts der ärztlichen Prüfung an der Christian-Albrechts – Universität Kiel.

Seit Januar 2007 bin ich in der Klinik für Ophthalmologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck als Assistenzärztin tätig.