Aus der Abteilung Dermatologie und Venerologie (Prof. Dr. med. Ch. Neumann) im Zentrum Arbeits-, Sozial-, Umwelt- und Rechtsmedizin und Dermatologie der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Assoziation von Polymorphismen und alternativen Splicevarianten von DNA-Reparaturgenen mit der Entwicklung von malignen Melanomen

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

> > vorgelegt von Sandra Blankenburg aus Reinbek

> > > Göttingen 2004

Dekan: Prof. Dr. med. M. Droese

- I. Berichterstatter: Engel, W.; Prof. Dr. med.
- II. Berichterstatter/in: Trümper, L.; Prof Dr. med.
- III. Berichterstatter/in:

Tag der mündlichen Prüfung: 07. Dezember 2005

# Inhaltsverzeichnis

| 1. | Einleitung  | . 1 |
|----|---|-----|
|    | 2.1. Polymorphismenanalyse  | 7   |
|    | 2.1.1. Probenkollektiv  | . 7 |
|    | 2.1.2.Genotypisierung XPC Exon8 G1580A und T1601C                         | . 8 |
|    | 2.1.3.Genotypisierung XPC Intron9 PAT                                     | . 9 |
|    | 2.1.4. Genotypisierung XPC Exon10 G2166A                                  | 10  |
|    | 2.1.5. Genotypisierung XPC Intron11 C-6A                                  | .11 |
|    | 2.1.6. Genotypisierung XPC Exon15 A2920C                                  | 12  |
|    | 2.1.7. Genotypisierung XPG Exon15 C3507G                                  | .13 |
|    | 2.1.8. Statistische Auswertung der Polymorphismendaten                    | 13  |
|    | 2.2. XPC-Exon12-Splicevariantenanalyse                                    | .14 |
|    | 2.2.1. Anlage einer RNA-Datenbank   | 14  |
|    | 2.2.2. RNA-Extraktion und cDNA-Synthese                                   | 15  |
|    | 2.2.3. Herstellen der externen Quantifizierungsstandards                  | 16  |
|    | 2.2.4. Real-time-RT-PCR und Quantifizierung                               | 17  |
|    | 2.2.5. Statistische Auswertung der LightCycler-Daten                      | 19  |
| 3. | Ergebnisse  | 20  |
|    | 3.1. Analyse der XPC-Polymorphismen Intron9 PAT, Intron11 und Exon15, die |     |
|    | einen Haplotyp bilden   | 20  |
|    | 3.2. Ergebnisse der Polymorphismen XPC Exon8, Exon10 und XPG Exon15       | 25  |
|    | 3.3. Ergebnisse der Splicevariantenbestimmung                             | 26  |
| 4. | Diskussion  | .30 |
| 5. | Zusammenfassung   | 38  |
| 6. | Literaturverzeichnis  | 39  |

# Abkürzungen

| 6-4-Photoprodukt  |
|---|
| Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin                           |
| Alanin  |
| Arginin   |
| Asparaginsäure  |
| Basenexzisionsreparatur                                   |
| complementary DNA (dt.:komplementäre DNA)                 |
| Cyclopyrimidindimer                                       |
| Dimethylsulfoxid  |
| Desoxyribonucleic acid (dt.: Desoxyribonukleinsäure)      |
| Mischung aller vier desoxy-Nukleotide                     |
| Glutamin  |
| Histidin  |
| Konfidenzintervall  |
| Lysin   |
| Miss-Match-Reparatur                                      |
| messenger ribonucleic acid (dt.: Boten-Ribonukleinsäure)  |
| Nukleotidexzisionsreparatur                               |
| Nävuszellnävus  |
| Odds Ratio  |
| Poly-AT   |
| phosphate buffered saline (dt.:Phosphat gepuffertes Salz) |
| Polymerase chain reaction (dt.:Poymerasekettenreaktion)   |
| Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus               |
| reverse-transcriptase-PCR                                 |
| Single-Nukleotid-Polymorphismus                           |
| Tris-EDTA   |
| Template suppression reagent                              |
| Ultraviolett  |
| Valin   |
| Xeroderma pigmentosum                                     |
|   |

## 1. Einleitung

Das maligne Melanom ist ein aggressiv wachsender Tumor, der an der Haut, den Schleimhäuten, den Leptomeningen, der Uvea und Retina des Auges und an Kochlea und Vestibularorgan des Ohres entstehen kann. Man unterteilt die kutanen Melanome in ihre Wuchsformen: superfiziell spreitendes Melanom, noduläres malignes Melanom und Lentigo-maligna-Melanom und das akrolentiginöse maligne Melanom. Diese Melanomtypen unterscheiden sich hinsichtlich der klinischen Merkmale und der Prognose (Garbe und Schaumburg-Lever 1997). Die Inzidenz des kutanen malignen Melanoms ist in den letzten Jahrzehnten weltweit gestiegen (Armstrong und Kricker 1995; Garbe und Blum 2001; Stang et al. 2000). Etwa 10% der Melanome zeigen eine familiäre Häufung (Fritsch et al. 1998; Greene et al. 1985a). Bei beinahe allen Patienten mit familiär auftretendem und bei etwa 60% der Patienten mit sporadisch auftretendem Melanom finden sich zusätzlich dysplastische Nävi (Elder et al. 1980; Greene et al. 1985a). Dysplastische Nävi stellen einen Risikofaktor für die Entwicklung eines malignen Melanoms dar (Greene et al. 1985b; Tucker et al. 1993) und können ebenfalls sporadisch oder familiär auftreten (Elder et al. 1980). In manchen Fällen kann die Entwicklung eines malignen Melanoms aus einem benignen Nävus über die Zwischenstufe eines dysplastischen Nävus beobachtet und als Ausdruck einer Mehrschrittkanzerogenese gewertet werden (Ananthaswamy und Pierceall 1990; Clark et al. 1991). UV-Licht scheint der wichtigste exogene auslösende Faktor für die Entstehung von Melanomen zu sein, insbesondere wenn eine kurzzeitige, intermittierende, intensive UV-Exposition gegeben ist (Gilchrest et al. 1999; Nelemans et al. 1993). Jedoch finden sich nur 20% der Primärtumoren in den bevorzugt sonnenexponierten Hautarealen wie Kopf, Hals und Extremitäten. Eine ähnliche Verteilung der Melanome ist auch bei Patienten mit Xeroderma pigmentosum (XP) bekannt (Kraemer et al. 1994).

Bei der sehr seltenen autosomal-rezessiv vererbbaren Krankheit Xeroderma pigmentosum (XP) haben die Betroffenen eine besondere Neigung zur Entstehung von Hauttumoren, wie Basalzellkarzinomen, Plattenepithelkarzinomen und malignen Melanomen (Bootsma et al. 2002, Kraemer et al. 1987). Das Risiko für die Entstehung von Hautkrebs ist dabei um ein tausendfaches höher als in der Normalbevölkerung. Melanome treten hier sogar häufig multipel auf (Boddie und McBride 1988). Dies ist in einer erhöhten Sensitivität gegenüber UV-Licht begründet,

deren Ursache in einer Unfähigkeit, UV-induzierte DNA-Schäden zu reparieren, liegt (Kraemer et al. 1984; van Steeg und Kraemer 1999). Der Ausfall jeweils eines der sieben DNA-Reparaturgene XP A-G, die alle bei der Nukleotidexzisionsreparatur (NER) eine Rolle spielen, führt zu einer verminderten DNA-Reparaturfähigkeit und dem klinischen Bild Xeroderma pigmentosum (Bootsma et al. 2002; van Steeg und Kraemer 1999; Traupe 1997). Dabei sind Defekte im XPC-Gen bei europäischen und amerikanischen XP-Patienten am häufigsten (Khan et al. 1998). Der Entität XP-Variante (XPV), deren molekular-genetische Ursache erst kürzlich identifiziert wurde, liegt ein Defekt des Gens für die Polymerase eta zugrunde, die fehlerfrei über Pyrimidin-Dimere hinweglesen kann (Broughton et al. 2002; Masutani et al. 1999). Bei XPV-Patienten funktioniert, im Gegensatz zu den anderen Subgruppen, die Nukleotidexzisionsreparatur einwandfrei.

Die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) wird bei helikalen Distorsionen der DNA aktiv und ist das DNA-Reparatursystem mit dem größten Läsionsspektrum (de Boer und Hoeijmakers 2000). Grundsätzlich existieren diverse DNA-Reparatursysteme, um die Unversehrtheit der DNA zu gewährleisten, wie z.B. die Basenexzisionsreparatur (BER), die Mismatch-Reparatur (MMR) und auch die Nukleotidexzisionsreparatur (NER). Zudem gibt es weitere Mechanismen, wie z.B. die Fähigkeit von Polymerasen, fehlerfrei über DNA-Schäden hinweglesen zu können, die direkte Reversion von DNA-Schäden oder verschiedene Wege der DNA-Strangbruchreparatur. Mehr als 130 Reparaturenzyme sind bis heute bekannt (Wood et al. 2001).

Die NER beseitigt DNA-Schäden, die z.B. durch Benzpyrene, Aflatoxin und Cisplatin entstehen, ist aber auch das Reparatursystem für UV-induzierte DNA-Fotoprodukte (de Boer und Hoeijmakers 2000; Lindahl und Wood 1999; Wood 1999). Die durch UVB-Licht induzierten DNA-Schäden Cyclopyrimidindimere (CPD) und Pyrimidin-Pyrimidon 6-4-Photoprodukte (6-4-PP) werden von der NER erfasst, jedoch werden 6-4-PP im Vergleich zu CPD 5mal schneller vom NER System repariert (Mitchell und Nairn 1989). Die NER ist ein Mehrschrittprozess mit über 20 beteiligten Proteinen (Wood et al. 2001). Die XP-Proteine (XPA-G) spielen dabei eine führende Rolle. Man unterscheidet folgende Schritte: Schadenserkennung, Demarkierung, Inzision und Heraustrennen, Lückenschluss und Ligation (de Boer und Hoeijmakers 2000). Anfangs wird der DNA-Schaden durch das XPC-Protein detektiert und durch XPA verifiziert. Dann werden die beiden DNA-Stränge um den Schaden herum mittels der gerichteten Helikaseaktivitäten der beiden XPB- und XPD- Proteine voneinander getrennt. Danach folgt eine Inzision zu beiden Seiten des DNA-Schadens durch die als Endonukleasen wirkenden XPG- und XPF-Proteine. Der den Schaden tragende DNA-Abschnitt, der grundsätzlich eine Länge von 24-32 Nukleotiden misst und bei dem der DNA-Schaden immer ca. 5bp vom 3'-Ende dieses Stranges asymmetrisch zu liegen kommt, wird dann herausgelöst. Die entstandene Lücke wird durch Neusynthese aufgefüllt und ligiert (de Boer und Hoeijmakers 2000; Wood et al. 2001).

Das XPC-Gen ist auf Chromosom 3p25 lokalisiert und codiert für ein 940 Aminosäuren umfassendes Protein (Bootsma et al. 2002, Sugasawa et al. 1997). In einem Komplex mit HHR23B initiiert XPC die NER (Masutani et al. 1994), indem es als erstes den DNA Schaden erkennt und an diesen bindet (de Boer und Hoeijmakers 2000; Sugasawa et al. 1998; Volker et al. 2001). Das XPC-Protein besitzt eine sehr hohe Affinität zu DNA, die sich bei einem vorliegenden Schaden noch erhöht (Reardon et al. 1996) und kann dadurch hochspezifisch zwischen geschädigter und unbeschädigter DNA unterscheiden (Hey et al. 2002). Bei erhitzter DNA (Einzelstrang-DNA) wird das XPC-Protein jedoch nicht mehr benötigt (Mu und Sancar 1997). Daher wird vermutet, dass das XPC-Protein auch zur Trennung der DNA-Stränge beiträgt (de Boer und Hoeijmakers 2000), zumal es gegenüber den Einzelsträngen auch eine höhere Affinität zeigt (Sugasawa et al. 2002). XPC führt zudem zur bevorzugten Reparatur von Cyclobutan-Pyrimidin-Dimeren (CPD) gegenüber 6-4-Photoprodukten (Emmert et al. 2000). Das XPA-Protein dagegen führt zu einer bevorzugten Reparatur von 6-4-PP (Cleaver et al. 1995). Diese Selektivität von 2 verschiedenen DNA-Reparaturenzymen für die beiden wichtigsten UV-induzierten DNA-Photoprodukte kann auch die enorme Spezifität des NER-Mechanismus erklären (Emmert et al. 2000).

Das Gen für XPG wurde auf Chromosom 13q32-33 lokalisiert (Takahashi et al. 1992). Das XPG-Genprodukt ist eine strukturspezifische Endonuklease, die einen 3'-Einschnitt etwa 5 Nukleotide nach dem DNA-Schaden bewirkt. Eine XPG-Aktivität ist ebenfalls Voraussetzung für einen nachfolgenden Strangeinschnitt durch den Komplex aus XPF und ERCC1 auf der 5'-Seite des DNA-Schadens im weiteren Verlauf der NER (Mu et al. 1996, Volker et al. 2001; Wakasugi et al. 1997). Das XPG-Protein scheint aber auch an einem weiteren DNA-Reparatursystem mit beteiligt zu sein. Aufgrund von neurologischen Auffälligkeiten bei einigen XPG-

Patienten im Rahmen von Genotyp-Phänotyp-Korrelationsstudien wurde für das XPG-Protein noch eine weitere Funktion vermutet, die für die an die Transkription gekoppelte Reparatur von oxidativen DNA-Schäden eine Rolle spielt (Nouspikel et al. 1997; Cooper et al. 1997; Reardon et al. 1997). Kürzlich wurde gezeigt, dass das XPG-Protein ein Kofaktor für die Aktivierung der Basenexzisionsreparatur von oxidativen DNA-Schäden ist (Klungland et al. 1999).

Dies könnte ebenso für die Entstehung von malignen Melanomen eine Rolle spielen, da die Basenexzisionsreparatur (BER) oxidative DNA-Schäden entfernt (Demple und Harrison 1994). Oxidative DNA-Schäden entstehen infolge des normalen Zellmetabolismus, können aber auch indirekt durch UVA-Bestrahlung über Anregung zellulärer Photosensibilisatoren und Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies generiert werden (Boiteux und Radicella 1999; Runger 1999; Runger et al. 1995). Versuche mit verschiedenen Tiermodellen weisen darauf hin, dass auch UVA-Strahlung die Entstehung von Melanomen und anderen malignen Hauttumoren auslösen kann (Matsui und DeLeo 1991, Setlow et al. 1993). Fälle von malignen Melanomen bei Menschen im Zusammenhang mit künstlichen UVA-Quellen (Sonnenstudios) deuten auf ein erhöhtes Risiko für die Melanomenentwicklung hin (Autier et al. 1991; Higgins und Du Vivier 1992; Swerdlow et al. 1988).

Eine normale DNA-Reparaturkapazität ist notwendig, um die normalen zellulären Funktionen aufrecht zu erhalten. Polymorphismen der DNA-Reparaturgene können zu Variationen der DNA-Reparaturkapazität in der normalen Bevölkerung führen und so die genetische Suszeptibilität gegenüber Krebsentstehung beeinflussen. Bereits geringe Veränderungen in der DNA-Reparaturkapazität könnten zu einem signifikant erhöhten Krebsrisiko führen. Wei et al. (2003) wiesen nach, dass eine verminderte DNA-Reparaturkapazität ein unabhängiger Risikofaktor für die Entstehung des kutanen malignen Melanoms ist. Zudem wurde eine verminderte DNAmit Reparaturkapazität auch bei Patienten Lungenkrebs. mit Plattenepithelkarzinomen im Kopfund Halsbereich und Patienten mit Basalzellkarzinomen gefunden (Cheng et al. 1998; Wei et al. 1995; Wei et al. 1996). Auch bei klinisch gesunden Familienangehörigen von XP-Patienten (vermutete heterozygote Träger eines defekten XP-Allels) wurde ein erhöhtes Krebsrisiko (16fach erhöht im Vergleich zur Normalbevölkerung) berichtet (Swift und Chase 1979). Bestimmte Polymorphismen der DNA-Reparaturgene können ebenfalls zu

einer Erhöhung des Melanomrisikos führen (Berwick und Vineis 2000; Mohrenweiser und Jones 1998). So finden sich einige Allelvarianten der DNA-Reparaturgene in verschieden hohen Anteilen in der gesunden Bevölkerung im Vergleich zu Krebspatienten (Dybdahl et al. 1999; Shen MR et al. 1998). Dies wurde auch bei Assoziationsstudien von Polymorphismen mit Hauttumoren (Nelson et al. 2002; Shen H et al. 2001), wie auch dem malignen Melanom (Tomescu et al. 2001), gefunden.

Die hier beschriebene Untersuchung umfasst die Analyse von vier einzelnen Basenaustauschen (Single-Nukleotid-Polymorphismen (SNP)) in verschiedenen Exons des XPC-Gens (Exon8 G1580A, Arg492His; Exon8 T1601C, Val499Ala; Exon10 G2166A, Arg687; Exon15 A2920C, Lys939Gln), von zwei Polymorphismen in Introns des XPC-Gens (Intron11 C-6A und Intron9 PAT, der aus einer 83bp Insertion aus den Basen Adenin und Thymin besteht) und einem weiteren SNP im XPG-Gen (Exon15 C3507G, His1104Asp). Entdeckt wurden diese Polymorphismen jedoch bei der Genotyp-Phänotyp-Korrelation von verschiedenen XP-Patienten, sozusagen als Nebenbefund (Chavanne et al. 2000; Nouspikel und Clarkson 1994).

Der kürzlich entdeckte Polymorphismus im Intron9 des XPC-Gens besteht aus einer Deletion von 5bp mit einer 83bp langen Insertion aus den Basen Adenin (A) und Thymin (T) (poly(AT)/PAT) (Khan et al. 2000). Bei 97 zufällig ausgewählten Probanden in den USA zeigte sich, dass der Polymorphismus PAT+ mit einer Allelfrequenz von ~40% häufig in der Bevölkerung vertreten zu sein scheint (Khan et al. 2000). Zudem zeigte sich, dass PAT+ mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf-/Halsbereich assoziiert ist (Shen H et al. 2001). Zwei weitere Polymorphismen im XPC-Gen, beides SNPs, stehen zum PAT-Polymorphismus im Kopplungsungleichgewicht: Exon15 A2920C (Lys939GIn) und Intron11 C-6A (Khan et al. 2000; Khan et al. 2002). Das Adenin-Allel des Intron-11-Splice-Akzeptorpolymorphismus reduziert den Informationsgehalt der Splicestelle für Exon12 von 7,5 auf 5,1 bits (Schneider 1997), wodurch theoretisch eine erhöhte Rate an alternativ geschnittener XPC-mRNA mit Exon12-Deletion zu erwarten wäre. Dies konnte in der Tat mittels der hochsensitiven real-time-RT-PCR nachgewiesen werden (Khan et al. 2002). Bei Vorliegen des Genotyps A/A im Intron11 an Position -6 fand sich eine ~2,6fach höhere Rate an XPC-mRNA mit Exon12-Deletion als beim Genotyp C/C. Die mRNA mit Exon12-Deletion besitzt wiederum eine reduzierte Funktion und führt so zu einer reduzierten DNA-Reparaturkapazität (Khan et al. 2002). Dies bietet eine funktionelle

Erklärung für die Assoziation von Polymorphismen des PAT+/Intron11A/Exon15C-Haplotyps im XPC-Gen mit der Krebsentstehung (Sanyal et al. 2004; Shen H et al. 2001).

Der Polymorphismus im Exon15 des XPC-Gens ist mit dem Auftreten von Blasenkrebs assoziiert (Sanyal et al. 2004). Die funktionelle Aktivität des Exon15-Polymorphismus Hilfe wurde mit eines allel-spezifischen Wirtszell-Reaktivierungsassays untersucht. Beide XPC-Exon15-Allele 2920A und 2920C konnten gleichermaßen den Reparaturdefekt von **XPC-Patientenzellen** komplementieren (Khan et al. 2000), waren also beide gleich funktionell aktiv.

Abschließend wurde innerhalb eines Pilotprojektes die Hypothese getestet, ob möglicherweise die relative Höhe der Expression von alternativ gesplicten XPC-mRNA-lsoformen im Vergleich zu der Wildtypform mit der Entstehung von malignen Melanomen assoziiert sein könnte. Es konnte bereits gezeigt werden, dass alternativ gesplicte XPG-mRNA-lsoformen bei verschiedenen gesunden Individuen in unterschiedlicher Höhe im Vergleich zu der Wildtypform exprimiert werden (Emmert et al. 2001). Solche Isoformen könnten sich kompetitiv negativ auf die DNA-Reparaturfähigkeit auswirken. Dahingehend wurden die Wildtypform und die XPC-Isoform mit Deletion des Exon12 untersucht. Dazu wurde die real-time-PCR-Technik für diese beiden mRNAs neu etabliert und die mRNA von insgesamt 26 Melanompatienten und 23 gesunden Kontrollen, die nach Alter und Geschlecht passend ausgesucht wurden, untersucht. Sollte sich oben genannte Hypothese bestötigen, wäre eine erhöhte relative Expression der XPC-mRNA-Isoform mit Deletion von Exon12 im Vergleich zur Wildtypform der XPC-mRNA bei der Gruppe der Melanompatienten im Vergleich zu der Kontrollgruppe zu erwarten.

Zusammenfassend war das Ziel dieser Arbeit: 1) die Frequenzen von insgesamt 7 Polymorphismen in den XPC- und XPG-Genen in einem europäischen Kollektiv von 669 Probanden zu bestimmen, 2) Kopplungsungleichgewichte der Polymorphismen zu verifizieren, 3) eine mögliche Assoziation dieser Polymorphismen mit dem Risiko einer Melanomentstehung zu untersuchen, 4) die real-time-PCR-Methode zur Quantifizierung der XPC-Exon12-Splicevarianten zu etablieren und 5) in einer Pilotstudie zu untersuchen, ob eine unterschiedliche Rate an alternativ gesplicter XPC-mRNA bei 26 Melanompatienten im Vergleich zu 23 nach Alter und Geschlecht zugeordneten gesunden Kontrollen nachgewiesen werden kann.

# 2. Material und Methoden

# 2.1. Polymorphismenanalyse

## 2.1.1. Probenkollektiv

Als Untersuchungsmaterial diente die in TE-Puffer gelöste DNA von 669 Probanden, davon 295 Melanompatienten (Fälle) und 374 gesunde Probanden (Kontrollen). Die Melanompatienten wurden aus den dermatologischen Abteilungen der Universitätskliniken der Ludwig-Maximilian-Universität München und der Georg-August-Universität Göttingen rekrutiert. Als Kontrollen dienten gesunde Blutspender, die den Blutspendedienst der beiden Universitätskliniken besuchten, sowie gesunde Mitarbeiter der Kliniken. Bei allen Probanden wurden folgende Parameter mittels standardisierter Verfahren ermittelt: Haarfarbe (rot, blond, braun, schwarz), Augenfarbe (blau, grün, grau, braun), Hauttyp nach Fitzpatrick (I-IV), Anzahl der Nävi an beiden Unterarmen (mit einem Durchmesser >2mm), Familienanamnese hinsichtlich des Auftretens von malignen Melanomen und Hinweise für Vorliegen eines dysplastischen Nävus-Syndroms. Bei den Melanompatienten wurden zusätzlich noch der Melanomtyp (Lentigo-maligna-Melanom, superfiziell spreitendes Melanom, noduläres malignes Melanom, akrolentiginöses Melanom, malignes Melanom in situ, Melanom der Uvea), die Lokalisation des Melanoms, die Tumordicke und das Auftreten multipler primärer Melanome aufgenommen. Tabelle 1 zeigt beispielhaft die Alters- und Geschlechtsverteilung in den beiden Gruppen.

| Marker                             | Тур               | Melanom (%) | Kontrollen (%) |
|------------------------------------|-------------------|-------------|----------------|
| Geschlecht                         | Männer            | 149 (50,9)  | 201 (53,6)     |
|                                    | Frauen            | 144 (49,1)  | 174 (46,4)     |
| Alter (Melanompatienten: Alter bei | <u>≤</u> 60 Jahre | 193 (65,9)  | 338 (90,1)     |
| Krankheitsbeginn)                  | >60 Jahre         | 100 (34,1)  | 37 (9,9)       |

| Tabelle 1  | Alters- und  | Geschlechtsverteilun | n der | Probanden |
|------------|--------------|----------------------|-------|-----------|
| rabelle 1. | Aller 3- unu | Geschiechtsvertenung | y uci | FIODanuen |

Für die Blutabnahme, die Probenverarbeitung und die Datenerhebung wurde das Einverständnis der Probanden eingeholt. Die Ethikkommissionen der Ludwig-Maximilian-Universität in München und des Universitätsklinikums in Göttingen stimmten der Verfahrensweise ebenfalls zu.

#### 2.1.2. Genotypisierung XPC Exon8 G1580A und T1601C

Die Bestimmung der Genotypen der XPC-Exon8-Polymorphismen G1580A und T1601C erfolgte mittels PCR-Amplifikation und anschließender Sequenzbestimmung. Die beiden Polymorphismen befinden sich nur 20bp voneinander entfernt. Beide Polymorphismen führen zu einem Aminosäureaustausch (Arg492His; Val499Ala). Die PCR für beide Polymorphismen des Exon8 des XPC-Gens enthielt in einem Reaktionsvolumen von 20µl: 1x MBI PCR-Puffer ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (MBI Fermentas, St. Leon-Roth, Deutschland), 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, Ebersfelde, Deutschland), 0,2mM dNTP-Mix (MBI Fermentas), 5% DMSO, 1,4 µl (~140ng) DNA und 2 Einheiten der rekombinanten *Taq*-Polymerase (MBI Fermentas). Folgendes PCR-Programm wurde durchgeführt: 3 min bei 95°C, anschließend 35 Zyklen mit 95°C für 30s (Denaturation), 63°C für 30s (Primeranlagerung) und 72°C für 45s (Extension), abschließend 72°C für 5min.

Zur Sequenzierung mussten die PCR-Templates mit dem QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Hilden, Deutschland) gereinigt werden. Im nächsten Schritt wurden die gereinigten PCR-Amplifikate mit den fluoreszenzmarkierten dNTPs versehen. Der hierfür erstellte Reaktionsansatz von 10µ enthielt: 2µl des aufgereinigten Amplifikats, 5pmol des Primers S80neu, 0,5x ABI Prism Sequenzierpuffer (ABI Prism, Darmstadt, Deutschland), 1,5µl Big Dyes Ready Reaction Mix (ABI Prism). Die Anlagerung erfolgte in 25 Zyklen mit 20s bei 96℃, 15s bei 55℃ und 4min bei 60℃. Anschließend wurden die Proben mit 250µl 100%-Ethanol und 10µl einer 3M Natriumacetat (pH 5,6) versetzt. Nach Inkubation auf Eis (10min) wurden die Proben zentrifugiert (30min bei 13000rpm). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 250µl 75% iges Ethanol resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (10min bei 13000rpm) erfolgte die Dehydratation des Pellets für 10min bei 37°C. Die erneute Resuspension erfolgte zum Start der Sequenzierung in 30µl TSR (Template suppression reagent, ABI Prism). Nach einem Denaturierungsschritt von 2min bei 90°C und 5min Inkubation auf Eis wurden die Proben in die entsprechenden Sequenziergefäße (Genetic Analyzer Sample Tubes 0,5 ml von ABI Prism) umgefüllt, die Behälter mit den Septa verschlossen und der Sequenzer mit selbigen geladen. Die Typisierung der Proben erfolgte im Kapillarsequenzer ABI Prism 310 Gentic Analyzer (ABI Prism, Darmstadt, Deutschland) (Abbildung 1). Die Proben liefen im

Sequenzer mit folgenden Einstellungen: 30 Injektionssekunden, 2,0 kV Injektionsspannung, 15,0 kV Laufspannung, 50 °C Geltemperatur, 20min Laufzeit.



Abbildung 1: Heterozygoter Genotyp XPC Exon8 1580 A/G und 1601 C/T

#### 2.1.3. Genotypisierung XPC Intron9 PAT

Der PAT-Polymorphismus im Intron9 besteht aus einer 83bp Insertion aus A und T (poly(AT)) und einer 5bp Deletion GTACC an Position 1457-1461. Die PCR-Amplifikation mit dem Primerpaar N1m und N2n (MWG-Biotech Ag, Ebersfelde, Deutschland) erzeugt entweder ein 266bp langes Fragment, welche das Fehlen des Insertions-Deletions-Polymorphismus (PAT-) anzeigt, oder ein 344bp langes Fragment, das die Insertion (PAT+) zeigt. Als interner Standard wurden Primer des B-Aktingens (MWG-Biotech Ag) verwendet, wodurch eine zusätzliches 621bp langes Fragment generiert wurde. Die PCR des PAT-Polymorphismus erfolgte mittels des Clontech Advantage 2 Kit (Clontech Laboratories, Inc.;Heidelberg, Deutschland). Das Reaktionsvolumen von 20µl enthielt: 1x Clontech Advantage 2 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 TGC TG-3'), 6 pmol der B-Aktin sense (5'-ACA CTG TGC CCA TCT ACG AGG-3') and B-Aktin antisense Primer (5'-AGG GGC CGG ACT CGT CAT ACT-3'), 0,2mM dNTP-Mix und 1x Clontech Advantage 2 Polymerase. 1µl (~100ng) DNA wurde zugegeben. Das PCR-Programm wurde folgendermaßen durchgeführt: 15 min bei 95 ℃, anschließend 35 Zyklen mit 95 ℃ für 30s (Denaturation) und 66 ℃ für 3min (Primeranlagerung/Extension), abschließend 66°C für 3min. Abbildung 2 zeigt beispielhaft den Nachweis des PAT-Polymorphismus nach Auftrennung in einem 2% igem Agarosegel (Seakam LE Agarose, Biozym bioproducts; Hamburg) und Anfärbung in einer Ethidiumbromidlösung (0,5 µg/ml).

Abbildung 2: Beispiel der Genotypisierung des PAT-Polymorphismus im Intron9 des XPC-Gens



Poly-AT Insertions-Polymorphismus

#### 2.1.4. Genotypisierung XPC Exon10 G2166A

Der Polymorphismus im Exon10 des XPC-Gens führt an Position 2166 zu einem Basenaustausch (G2166A). Daraus resultiert aber kein Aminosäureaustausch (Arg687Arg). Der Polymorphismus im Exon10 wurde mit PCR und der Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus-Methode (RFLP) nachgewiesen. Die PCR wurde in einem Reaktionsansatz mit 25µl durchgeführt. Der Reaktionsansatz enthielt: 1x MBI PCR-Puffer mit (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (MBI Fermentas, St. Leon-Rot), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2mM dNTP Mix (MBI-Fermentas), 2 Einheiten der rekombinanten Tag-Polymerase (MBI Fermentas), 5% DMSO, jeweils 10pmol der Primer S82 (5'-GAC TGA GTT ACC TTT GTG TCC-3') und S83 (5'-TAC TTC TCC AAG CCT CAC C-3') (MWG-Biotech Ag, Ebersfelde), sowie 2µl der DNA (~200ng). Folgendes Temperaturprofil wurde verwendet: 95 °C für 3 min, 35 Zyklen [45s bei 95 °C (Denaturation), 45 s bei 61 °C (Primeranlagerung), 1min bei 72°C (Elongation)], zum Schluss 5min bei 72°C. Das PCR-Produkt von Exon10 wurde mit Bmel (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) 1h bei 37 ℃ verdaut (10µl Reaktionsansatz enthielten: 7µl PCR-Produkt, 1U Bmel 1390I, 1x Konzentration Puffer) und die entstandenen Fragmente auf einem 4%igem Gel (NuSieve 3:1 Agarose, BMA Bio Whittaker Molecular Applications; Maine, USA) nachgewiesen. Bmel schneidet in Gegenwart des G-Allels und teilt das 110bp lange PCR-Amplifikat in zwei Fragmente von 65bp und 45bp Länge (Abbildung 3).

#### Abbildung 3: Beispielhafter Nachweis des Polymorphismus XPC Exon10 G2166A



#### 2.1.5 Genotypisierung XPC Intron11 C-6A

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 Polymorphismus wurde in einem Reaktionsvolumen von 20µl durchgeführt. Dieser enthielt: 1x PCR Rxn Puffer (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) 1.5 mM MgCl <sub>2</sub>, 8pmol der Primer E1 for (5'-AAA TGA CCT GGG CCT GTT TG-3') und H2 rev (5'-GGC AGG AAG AGG TAC ACA TTC-3') (MWG-Biotech), 0.2 mM dNTP-Mix (MBI), 1µl (~100ng) DNA und 2.5 Einheiten der rekombinanten *Taq*-Polymerase (Invitrogen). Die PCR wurde folgendermaßen durchgeführt: 3min bei 94 °C, 35 Zyklen [94 °C für 15 s (Denaturation); 58 °C für 30s (Primeranlagerung); 72 °C für 30s (Extension)], abschließend 5 min bei 72 °C. Das Restriktionsenzym *Smu*l (MBI Fermentas) wurde zum Nachweis des Intron 11 Polymorphismus benutzt. 10µl Reaktionsansatz enthielten: 5µl PCR-Produkt, 0,2U *Smu*l, 1x Puffer; Verdau für 1h bei 37 °C).

#### Abbildung 4: Nachweis des SNP C-6A im XPC Intron11



Das C an Position -6 erzeugt eine Restriktionsstelle für das *Smu*l Enzym. Der Verdau des 203bp langen PCR-Amplifikats mit *Smu*l erzeugt zwei kleinere Fragmente mit 160bp und 43bp Länge, die durch elektrophoretische Auftrennung in einem 2,5% igen Seakem Agarosegel (Abbildung 4) sichtbar gemacht wurden.

# 2.1.6. Genotypisierung XPC Exon15 A2920C

Der SNP des XPC Exon15 führt zu einem Aminosäureaustausch an Position 939 (Lys939Arg). Die PCR des entsprechenden DNA-Abschnittes des XPC-Exon15-Polymorphismus wurde in einem Reaktionsansatz mit 20ul durchgeführt. Der Reaktionsansatz 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>, 0.2mM dNTP-Mix, 2 Einheiten der rekombinanten MBI *Tag*-Polymerase, 5% DMSO, 6pmol des Primers Ex15F (5'-GGA GGT GGA CTC TCT TCT GAT G-3') und 7pmol des Primers 3'ntc DNAR (5'-TAG ATC CCA GCA GAT GAC C-3') (MWG-Biotech), sowie 1.5µl der gelösten DNA (etwa 150ng). Folgendes Temperaturprofil wurde verwendet: 95℃ für 3min, 35 Zyklen [45s bei 95℃ (Denaturation), 45s bei 56 °C (Primeranlagerung), 1min bei 72 °C (Extension)], abschließend 72 °C für 5min. Für den Restriktionsverdau des XPC-Exon15-PCR-Produktes wurde Pvull (MBI Fermentas) verwendet (10µl Reaktionsansatz enthielten: 5µl PCR-Produkt, 1U Pvull, 1x Konzentration Puffer) und der Ansatz für 1h bei 37°C inkubiert. Pvull konvertiert das 765bp lange PCR-Produkt zu zwei Fragmenten von 585bp und 180bp Länge (Abb.5). Ein 2% iges Gel (Seakam, Biozym bioproducts; Hamburg, Deutschland) wurde zum elektrophoretischen Nachweis der Fragmente verwendet.





Pvull schneidet auf C

# 2.1.7. Genotypisierung XPG Exon15 C3507G

Die PCR für den Polymorphismus im Exon15 des XPG-Gens, der ebenfalls zu einem Aminosäureaustausch führt (His1104Asp), wurde in einem Reaktionsvolumen von 20µl durchgeführt. Dieser enthielt: 1x MBI PCR-Puffer mit (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (MBI Fermentas), 8,5pmol des Primers 3330-3349 FWD (5'-TTT GAG CTA CTT GAT AAG GC-3') und 10pmol des Primers 3624-3607 REV (5'-CAC CTC CAT TCT TCA CGG-3') (Gibco Life technologies, Eggenstein-Leopoldshafen, Deutschland), 0,2mM dNTP-Mix (MBI Fermentas), 5% DMSO, 1,5µl (etwa 150ng) DNA und 2U der rekombinanten Taq-Polymerase (MBI Fermentas). Das PCR-Programm wurde wie folgt durchgeführt: 3min bei 95℃, 35 Zyklen mit 95℃ für 45s (Denaturation), 55℃ für 45s (Primeranlagerung) und 72°C für 1min (Extension), zum Schluss 72°C für 5min. Der Polymorphismus im XPG Exon15 wurde mit *Mboll* (MBI Fermentas) nachgewiesen. 25µl Reaktionsansatz enthielten: 20µl PCR-Produkt, 2U Mboll (MBI Fermentas), 1x Puffer. Die Ansätze wurden jeweils für 1h bei 37℃ inkubiert. Mboll schneidet in Gegenwart des G-Allels ein 136bp Fragment in zwei Fragmente von 107bp und 29bp. Zwei 85bp und 49bp Fragmente immer nachweisbar (Abbildung 6). Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte auf einem 4%igen Gel (NuSieve 3:1 Agarose, BMA Bio Whittaker Molecular Applications; Maine, USA).

#### Abbildung 6: elektrophoretischer Nachweis des XPG-Exon15-G3507C-Polymorphismus



# 2.1.8 Statistische Auswertung der Polymorphismendaten

Die statistische Auswertung der Polymorphismendaten erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Andreas Ziegler und Frau Dr. Inke König vom Institut für Medizinische Biometrie und Statistik der Universität Schleswig-Holstein, Campus Lübeck. Für jeden Polymorphismus wurde mit StatXact 5.0 der Cochrane-Armitage Trend Test mit exaktem p-Wert, Odds Ratios sowie exakten 95%-Konfidenzintervallen berechnet. Dieser Test untersucht Unterschiede in den Genotypfrequenzen zwischen zwei Gruppen, wobei er von einem linearen Anstieg des Risikos ausgeht. Mögliche Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht wurden mit dem "Monte-Carlo goodness-of-fit Test" untersucht.

#### 2.2 XPC-Exon12-Splicevariantenanalyse

#### 2.2.1. Anlage einer RNA-Datenbank

Zur Analyse der Splicevarianten "Deletion-XPC-Exon12" wurde eine RNA-Datenbank mit neuen Probanden, insgesamt 26 Melanompatienten (13 weibliche, 13 männliche) und 23 gesunden Kontrollpersonen (11 weibliche, 12 männliche), die nach Alter und Geschlecht exakt den Melanompatienten zugeordnet wurden, erstellt. Die Rekrutierung der Melanompatienten erfolgte ausschließlich aus der entsprechenden Spezialsprechstunde der Abteilung Dermatologie und Venerologie der Universität Göttingen. Als gesunde Kontrollen wurden Mitarbeiter der Abteilung rekrutiert. Wie bereits bei der Anlage der DNA-Datenbank zur Polymorphismen-Assoziationsstudie wurden über einen Fragebogen und mittels standardisierter Verfahren die folgenden Parameter erhoben: Haarfarbe, Augenfarbe, Hauttyp, Nävusanzahl und Familienanamnese. Für die Blutabnahme, die Probenverarbeitung und die Datenerhebung wurde das Einverständnis der Probanden eingeholt. Die Ethikkommission des Universitätsklinikums Göttingen stimmte der Verfahrensweise ebenfalls zu.

Die Expression der mRNA's (ß-Aktin, Exon12 Wildtypform und Isoform "Deletion-Exon12" wurde mit dem LightCycler (Roche, Mannheim) ermittelt. Der LightCycler misst die Fluoreszenzaktivität des Farbstoffes SYBR Green (Qiagen, Hilden), der sich in die doppel-strängige DNA der PCR-Produkte einlagert. Die Proben, der aus mRNA umgeschriebenen cDNA-Proben der Probanden, wurden so mit den eingesetzten Verdünnungen von bekannter Konzentration verglichen. Das Fluoreszenzsignal verhält sich proportional zur Kopienzahl des PCR-Produktes. Der Beginn der exponentiellen Phase der PCR-Amplifikation erfolgt dabei umso früher (sogenannter Schwellenwert-Zyklus), je höher die Menge der eingesetzten Zielmoleküle ist. Die Messung der Konzentration erfolgt in der exponentiellen Phase der Amplifikation und wird mit den Standards verglichen. Die Verwendung der

Standardverdünnungsreihen aus den PCR-Produkten bei jeder Amplifikationsreaktion erlaubt eine absolute Quantifizierung der cDNA-Mengen.

#### 2.2.2. RNA-Extraktion und cDNA-Synthese

Die RNA-Isolierung erfolgt unmittelbar nach Entnahme der Blutproben, um ein Degradieren der RNA zu vermeiden, über einen Ficollgradienten. 10ml heparinisierten Vollbluts wurden mit 22,5ml PBS vermischt und mit 10ml Ficolllösung unterschichtet. Nach 20minütiger Zentrifugation (1800rpm) konnten Interphase und Zellschleier in ein neues Gefäß überführt werden und wurden mit PBS auf 50ml aufgefüllt. Es erfolgte eine Zentrifugation (10min, 1300rpm), der Überstand wurde abgeschüttet und das Pellet in 5ml PBS aufgenommen. Bei sämtlichen Arbeitsschritten wurde auf möglichst RNase-freies Arbeiten geachtet. Die Aufreinigung und Homogenisierung des Zelllysates geschah im Anschluss mittels der Qiagen Schreddersäule des RNeasy Mini Kits nach Herstellerangaben (Qiagen, Hilden, Deutschland). Diese beinhaltete zudem einen Inkubationsschritt mit DNase, um eine Kontamination mit DNA auch in kleinsten Mengen zu vermeiden. Der RNA-Gehalt wurde in einer 1:30 Verdünnung photometrisch durch die Bestimmung der Ratio der Messungen bei 260 und 280nm (zwischen 1,8 und 2,0) mittels Mittelwert aus zwei Messungen bestimmt. Anschließend wurden sämtliche Proben durch Zugabe von RNase-freiem Wasser auf die einheitliche Konzentration von 50ng/µl eingestellt.

Die erhaltene RNA-Probe wurde nun 1:1 mit dem RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (MBI Fermentas) in c-DNA umgeschrieben. Dazu wurden je 10µl (entsprechend 500ng bei der einheitlichen Konzentration von 50ng/µl) der Proben mit 0,5µg der im Kit enthaltenen Oligo-dt mit RNase freiem Wasser zu einem 12µl umfassenden Reaktionsgemisch zusammengegeben, dieses kurz gemixt und zentrifugiert, danach bei 70 °C für 5min inkubiert. Auf Eis wurden dem Ansatz auf ein Gesamtvolumen von 20µl zuerst 4xReaktionspuffer, 1µl Ribonucleaseinhibitor und 2mM dNTP Mix zugegeben und erst anschließend an eine fünfminütige Inkubationsphase noch die 1µl der reversen Transkriptase. Das Gesamtvolumen wurde nun für eine Stunde bei 42 °C inkubiert. Darauf folgte noch eine Denaturierungsphase von 10min bei 70 °C, bevor die Proben bei -20 °C gelagert wurden.

#### 2.2.3. Herstellen der externen Quantifizierungsstandards

Als externe Quantifizierungsstandards dienten Verdünnungsreihen der jeweiligen real-time-PCR-Produkte für Exon12-Wildform, Deletion-Exon12 und B-Aktin, die über eine Säule des QIAquick PCR Purification Kits (QIAGEN, Hilden, Deutschland), gereinigt wurden. Zur Herstellung dieser Quantifizierungsstandards wurden nach einer initial durchgeführten real-time-PCR (Bedingungen wie unten) mit dem LightCycler (Roche, Mannheim) die erhaltenen Produkte (XPC-Exon12-Wildtyp, Isoform "Deletion von Exon12" und ß-Aktin) auf ein 2%iges NuSieve-Agarosegel (BMA Bio Whittaker Molecular Applications; Maine, USA) aufgetragen und densiometrisch im Vergleich zur einer guantitativen DNA-Leiter (Mass Ruler, MBI Fermentas), die Banden bekannter Konzentrationen enthält, quantifiziert. Zudem wurden wiederum die Amplifikate mittels Basensequenzanalyse kontrolliert. So wurden absolute Konzentrationsmengen des jeweiligen spezifischen PCR-Produktes erhalten, welches als Mengenstandard bei der guantitativen real-time-PCR diente. Es wurde eine Verdünnungsreihe für jedes PCR-Produkt über sechs Log-Einheiten (10<sup>2</sup>-10<sup>-3</sup> amol/µl) ausgehend von der ermittelten Ursprungskonzentration erstellt. Dies entspricht etwa 6x10<sup>8</sup> bis 600 Kopien/µl für die 3 PCR-Produkte. Bei jeder real-time-PCR-Messung wurde dann die Verdünnungsreihe entsprechend dem zu messenden PCR-Produkt mitamplifiziert. So ergab sich eine Standardkurve, auf die die weiteren Messwerte bezogen werden konnten. Da Standard und Zielsequenz identisch sind, ist gewährleistet, dass sowohl die Standards als auch die zu ermittelnden Proben mit PCR-Effizienz amplifiziert werden. Die Verwendung der gleichen der Standardverdünnungsreihen erlaubte eine absolute Quantifizierung der mRNA-Mengen. Alle Messwerte lagen grundsätzlich innerhalb der Standardkonzentrationen. Abbildung 7 zeigt die aus einer Verdünnungsreihe eines PCR-Produktes erstellte Standardkurve mittels der die cDNA-Proben der Probanden quantifiziert wurden.

#### Abbildung 7: Standardkurve der Verdünnungsreihe



## 2.2.4. Real-time-RT-PCR und Quantifizierung

Die Reaktionsansätze für die real-time-PCR der Spliceformen des Exon12 enthielten jeweils 10µl des SYBR Green Master Mix (Qiagen, Hilden), je 8pmol der vorwärtsund rückwärtsgerichteten Primer (Tabelle 2) (MWG-Biotech Ag, Ebersfelde) und 2µl der cDNA-Probe (entsprechend 50ng cDNA bei postulierter 100%iger RT-Reaktion). Mit RNase-freiem Wasser wurde auf das Gesamtreaktionsvolumen von 20µl aufgefüllt. Für den Ansatz des β-Aktingens wurde 2µl der 1:10 verdünnten c-DNA-Probe (entsprechend 50g) eingesetzt und mit 10pmol der zugehörigen Primer (Tabelle 2) und 10µl des SYBR Green Master Mix wiederum zu einem Gesamtvolumen von 20µl mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt. Dabei verblieb wie bei der regulären PCR jeweils eine Kapillare als Leeransatz ohne Probenzugabe, stattdessen jedoch mit dem äquivalenten Volumen an RNase-freiem Wasser versehen.

|                | 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 |
| ß-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 |

Tabelle 2: Primer der LightCycler-Reaktionen

Die verwendeten Primer wurden so gewählt, dass sie die Splicevarianten spezifisch amplifizieren (Khan et al. 2002). Jeweils ein Primer in jeder Reaktion liegt 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 es zu keiner PCR-Produktvermehrung kommen kann. Der Primer oCCB-331 überspannt die Exon11-Exon12-Grenze und kann sich daher bei Exon12-Deletion nicht anlagern. oCCB-337 liegt wiederum am Ende des Exon12.

Dem real-time-PCR-Programm ging immer eine 15-minütige Denaturierung bei 95 ℃ voraus. Dem folgten jeweils eine bestimmte Anzahl an Zyklen (30 für ß-Aktin, 40 für Exon12 wt, 50 für Exon12 iso) mit jeweils 15s Denaturierung bei 94 ℃, 30s Primeranlagerung (bei 64 °C für ß-Aktin, 54 °C für Exon12-Wildtypform und 51 °C für Exon12-Isoform) und 20s Elongation bei 72 °C. Der Elongationsschritt beinhaltet zusätzlich noch die Messung der Fluoreszenzemission. Nach Beendigung der Amplifikationszyklen folgte zum Erstellen der Schmelzkurve ein kontinuierlicher Temperaturanstieg von 65 °C auf 95 °C, mit ständigen Messungen entlang des Temperaturanstiegs. Die Schmelzkurven ergaben jeweils einen einzelnen engen Anstieg bei der Schmelztemperatur der entsprechenden Primer als Zeichen der Amplifikation eines einzigen spezifischen Produktes. Auch in Kontroll-Agarosegelen ergab sich immer nur eine Bande.

Die Evaluierung der Konzentrationen erfolgte über das von der LightCycler Analysis Software automatisch generierte Maximum der 2. Ableitung ("Second Derivative Maximum"). Dieses errechnet die Zyklusnummer, bei der der maximale Anstieg der Fluoreszenzaktivität in der linearen Phase der log-Kurve vorliegt, und kalkuliert von diesen Werten ausgehend die cDNA-Konzentrationen. Bei den verschiedenen Versuchsdurchläufen wurde 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 bestimmte absolute Menge an ß-Aktin, Wildtypform des XPC-Gens und alternativ gesplicter Form mit Deletion des Exon12 (Isoform) wurden zueinander in Relation gesetzt. ß-Aktin wird als sogenanntes "Housekeeping"-Gen verwendet. Dabei wird angenommen, dass die Expression von ß-Aktin im selben Gewebetyp auch unter verschiedenen Versuchsbedingungen annähernd konstant ist. Damit variiert die Ratio der Konzentrationen aus ß-Aktin und Zielgen je nach Expressionslevel des Zielgens. Für die letztendliche Berechnung der Ratio aus Wildform und Isoform spielte das ß-Aktingen jedoch keine Rolle, da sich seine Menge aus der Berechnung wieder herauskürzt.

Der LightCycler (Roche, Mannheim) misst die Fluoreszenzaktivität (SYBR Green lagert sich in die DNA der PCR-Produkte ein) der eingesetzten Verdünnungen mit bekannter Konzentration und der Proben, deren Konzentration noch zu bestimmen ist. Das Fluoreszenzsignal verhält sich proportional zur Kopienzahl des PCR-Produktes. Der Beginn der exponentiellen Phase der PCR-Amplifikation erfolgt um so früher (so genannter Schwellenwert-Zyklus), je höher die Menge an eingesetzten Zielmoleküle ist. Die Messung der Konzentration erfolgt in der exponentiellen Phase

der Amplifikation und wird mit den Standards verglichen (Abbildung 8). Die Verwendung der Standardverdünnungsreihen bei jeder Amplifikationsreaktion erlaubt eine absolute Quantifizierung der cDNA-Mengen.



Abbildung 8: Messung der cDNA-Mengen im LightCycler

# 2.2.5. Statistische Auswertung der LightCycler-Daten

Die Analyse der LightCycler-Daten erfolgte mit Statistica 5.0. Zudem wurden für die Messwerte des ß-Aktins, XPC Exon12 Wildform und Isoform Median, Mittelwert, Quartile, Standardabweichung und Varianz bestimmt. Signifikanzbestimmung erfolgte mittels des Mann-Whitney-U-Test.

# 3. Ergebnisse

# 3.1. Analyse der XPC-Polymorphismen Intron9 PAT, Intron11 und Exon15, die einen Haplotyp bilden

Von den 295 Melanompatienten und den 374 Kontrollen wurde die Allelfrequenz der 3 betreffenden Polymorphismen bestimmt und die Assoziation mit dem Risiko einer Melanomerkrankung untersucht (Tabelle 3). Die polymorphen Allele PAT+, Intron11 -6A und Exon15 2920C sind dabei mit einer Häufigkeit von ~37% bei den Kontrollen, recht häufig zu finden. Die Allele PAT+, Intron11 -6A und Exon15 2920C waren mit einem nicht-signifikant erhöhtem Risiko (~1,2fach gegenüber den Kontrollen) für das maligne Melanom verbunden.

| Marker             | Allel  | Melanom    | (n=295)          | Kontrolle  | ollen (n=374) Od |       | 95%-Konfidenz- | zwei-    |
|--------------------|--------|------------|------------------|------------|------------------|-------|----------------|----------|
|                    |        | Anteil     | Anteil           | Anteil     | Anteil           | ratio | intervall      | seitiges |
|                    |        | absolut    | in %             | absolut    | in %             |       |                | р        |
| Intron9<br>Poly-AT | -<br>+ | 343<br>245 | (58,3)<br>(41,7) | 471<br>275 | (63,1)<br>(36,9) | 1,223 | (0,974-1,536)  | 0,0797   |
| Intron11<br>C-6A   | C<br>A | 341<br>245 | (58,2)<br>(41,8) | 470<br>276 | (63,0)<br>(37,0) | 1,223 | (0,974-1,536)  | 0,0796   |
| Exon15<br>A2920C   | A<br>C | 345<br>243 | (58,7)<br>(41,3) | 468<br>278 | (62,7)<br>(37,3) | 1,142 | (0,908-1,435)  | 0,2555   |

Tabelle 3: Allelfrequenzen XPC Intron9 PAT, Intron11 C-6A, Exon15 A2920C

Die Ermittlung der Genotypfrequenz der Polymorphismen erbrachte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen Melanompatienten und Kontrollen. Jedoch treten die Polymorphismen PAT+ und Intron11 –6A tendenziell häufiger in der Melanomgruppe auf (Tabelle 4). Bei Homozygotie der Polymorphismen XPC Intron9 PAT+/+, Intron11 A/A und Exon15 C/C zeigt sich jeweils ein nicht-signifikant erhöhtes Risiko (~1,5fach) für die Entstehung des malignen Melanoms. Es zeigte sich ein linearer Anstieg der Risikos für das maligne Melanom vom heterozygoten PAT -/+, Intron11 C/A und Exon15 A/C zum homozygoten Genotyp PAT +/+, Intron11 A/A und Exon15 C/C.

| Marker   | Genotyp | Melanom | (n=295) | Kontrolle | Kontrollen (n=374) |       | 95%-          | Zwei-    |
|----------|---------|---------|---------|-----------|--------------------|-------|---------------|----------|
|          |         |         |         |           |                    | ratio | Konfidenz-    | seitiges |
|          |         | Anteil  | Anteil  | Anteil    | Anteil             |       | intervall     | р        |
|          |         | absolut | in %    | absolut   | in %               |       |               |          |
|          |         |         |         |           |                    |       |               |          |
| XPC      | - / -   | 101     | (34,4)  | 146       | (39,1)             |       |               |          |
| Intron9  | - / +   | 141     | (48,0)  | 179       | (48,0)             | 1,226 | (0,975-1,543) |          |
| Poly-AT  | + /+    | 52      | (17,7)  | 48        | (12,9)             | 1,502 | (0,950-2,380) | 0,0785   |
| XPC      | C/C     | 100     | (34,1)  | 146       | (39,1)             |       |               |          |
| Intron11 | A/C     | 141     | (48,1)  | 178       | (47,7)             | 1,225 | (0,975-1,542) |          |
| C-6A     | A/A     | 52      | (17,7)  | 49        | (13,1)             | 1,501 | (0,950-2,377) | 0,0789   |
| XPC      | A/A     | 104     | (35,4)  | 145       | (38,9)             |       |               |          |
| Exon15   | A/C     | 137     | (46,6)  | 178       | (47,7)             | 1,184 | (0,944-1,487) |          |
| A2920C   | C/C     | 53      | (18,0)  | 50        | (13,4)             | 1,402 | (0,891-2,211) | 0,1435   |

Tabelle 4: Genotypfrequenzen XPC Intron9 PAT, Intron11 C-6A, Exon15 A2920C

Khan et al. (2002) beobachteten ein Kopplungsungleichgewicht der drei Polymorphismen XPC Intron9 PAT, Intron11 C-6A und Exon15 A2920C an 97 gesunden Probanden, das einer Haplotypbildung dieser Polymorphismen entspricht. Die bei Khan et al. (Khan et al. 2002) festgestellte Frequenz entspricht den hier dargelegten Ergebnissen. Abbildung 9 zeigt die Verteilung möglicher Haplotypen in diesem Patientengut.



Abbildung 9: Verteilung unter Berücksichtigung möglicher Haplotypen

Der Zusammenhang zwischen den drei Polymorphismen des XPC-Gens Intron9 PAT, Intron11 C-6A und Exon15 A2920C im Sinne eines Kopplungsungleichgewichtes konnte in diesem Kollektiv bestätigt werden (D=1,0). Man kann daher auch von einem Haplotyp (+AC, -CA) sprechen. Jeweils >99% der Probanden im Melanom-/Kontrollkollektiv können einem der Haplotypen zugeordnet werden (Abbildung 9). Die Melanom- und die Kontrollgruppe unterschieden sich in der Verteilung der Haplotypen nicht signifikant (p=0,2080).

Zur weiteren Analyse wurden die Probanden in Subgruppen entsprechend der folgenden Parameter unterteilt, die bekannte Risikofaktoren und Prognosefaktoren für das maligne Melanom sind: Alter, Anzahl der Nävi, Vorhandensein von multiplen primären Melanomen und die Tumordicke nach Breslow zum Zeitpunkt der Diagnosestellung.

Um den Einfluss der Polymorphismen auf das zeitliche Auftreten des malignen Melanoms zu bestimmen, wurde das Melanomkollektiv (eingeschlossen n=292) in Gruppen jünger und älter 60 Jahre (n=100) bei Erkrankungsbeginn unterteilt. Der Vergleich erfolgte gegenüber dem gesamten Kontrollkollektiv, da der Faktor Krankheitsbeginn hier nicht erhoben werden konnte. Zudem besteht die Möglichkeit, dass jüngere Probanden noch ein Melanom entwickeln können. Die 60-Jahresgrenze wurde verwandt, da Garbe et al. (1995) ein Alter >60Jahre als unabhängigen Prognosefaktor bei Melanompatienten herausarbeiteten. Zudem liegt nach den Daten des zentralen Melanomregisters (48928 Fälle, 1983-2000) der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft das durchschnittliche Erkrankungsalter für alle verschiedenen Melanomtypen nahe bei 60 Jahren (Garbe und Blum 2001).

| Marker      | Genotyp | Melanom  |         | alle Ko | alle Kontrollen |       | 95%-        | zwei-    |
|-------------|---------|----------|---------|---------|-----------------|-------|-------------|----------|
|             |         | >60Jahre | (n=100) | (n=374) |                 | Ratio | Konfidenz-  | seitiges |
|             |         | absolut  | (%)     | absolut | (%)             |       | intervall   | р        |
| XPC         | -/-     | 26       | (26,00) | 148     | (39,47)         |       |             |          |
| Intron9     | +/-     | 56       | (56,00) | 179     | (47,73)         | 1,501 | 1,070-2,111 |          |
| Poly-AT     | +/+     | 18       | (18,00) | 48      | (12,80)         | 2,253 | 1,145-4,457 | 0,015    |
| XPC         | C/C     | 25       | (25,25) | 148     | (39,47)         |       |             |          |
| Intron11 C- | C/A     | 56       | (56,57) | 178     | (47,47)         | 1,519 | 1,082-2,138 |          |
| 5A          | A/A     | 18       | (18,18) | 49      | (13,07)         | 2,308 | 1,171-4,571 | 0,012    |
| XPC         | A/A     | 26       | (26,00) | 147     | (39,20)         |       |             |          |
| Exon15      | A/C     | 56       | (56,00) | 178     | (47,47)         | 1,469 | 1,049-2,062 |          |
| A2920C      | C/C     | 18       | (18,00) | 50      | (13,33)         | 2,158 | 1,101-4,251 | 0,020    |

#### Tabelle 5: Ergebnisse der Altersgruppe >60 Jahre

Wir fanden in der Altersgruppe, bei denen der Erkrankungsbeginn >60Jahre lag (n=100), einen linearen Risikoanstieg für die Melanomentstehung in Zusammenhang mit der Anzahl der Allele Intron9 PAT+, Intron11 -6A und Exon15 2920C. Bei Homozygotie der Polymorphismen ist das Risiko, an einem Melanom zu erkranken, jeweils über 2fach gegenüber der Kontrollpopulation erhöht (p=0,015; p=0,012; p=0,020) (Tabelle 5). In der Patientengruppe <60 Jahre fand sich keine Assoziation der Polymorphismen mit dem Auftreten eines malignen Melanom.

Die Anzahl der Nävi gilt ebenfalls als Risikofaktor für das maligne Melanom (Youl et al. 2002). Zur Überprüfung eines Zusammenhanges zwischen der Anzahl der Nävuszellnävi (NZN), wurde das Kollektiv der Melanompatienten in zwei Gruppen mit mehr und weniger als 50 Nävuszellnävi unterteilt und mit dem Kontrollkollektiv verglichen. Die Grenze von 50 Nävi wurde im Einklang mit bisherigen Studien gewählt (Haenssle et al. 2004). Bei Patienten mit weniger als 50 Nävi (n=273) ergab sich ein höheres Auftreten der Polymorphismen im Intron9, Intron11 und Exon15 des XPC-Gens (p=0,036, p=0,027 und p=0,064) gegenüber den Kontrollen (Tabelle 6). Das Melanomrisiko stieg mit der Anzahl der Allele PAT+, Intron11 -6A und Exon15 2920C linear an. Bei Patienten mit mehr als 50 Nävi zeigte sich keine Assoziation zum malignen Melanom. Eventuell wird erst bei Abwesenheit des starken Risikofaktors "viele Nävi" der Einfluss der DNA-Reparatur deutlich.

| Marker       | Genotyp | Melanom | NZN <50 | alle Ko | ontrollen | Odds  | 95%-        | zwei-    |
|--------------|---------|---------|---------|---------|-----------|-------|-------------|----------|
|              |         | (n=273) |         | (n=374) |           | Ratio | Konfidenz-  | seitiges |
|              |         | absolut | (%)     | absolut | (%)       |       | intervall   | р        |
| XPC Intron9  | -/-     | 89      | (32,60) | 142     | (38,69)   |       |             |          |
| Poly-AT      | +/-     | 134     | (49,08) | 178     | (48,50)   | 1,281 | 1,012-1,624 |          |
|              | +/+     | 50      | (18,32) | 47      | (12,81)   | 1,640 | 1.024-2,636 | 0,036    |
| XPC Intron11 | C/C     | 87      | (31,64) | 142     | (38,69)   |       |             |          |
| C-6A         | C/A     | 138     | (50,18) | 177     | (48,23)   | 1,297 | 1,025-1,644 |          |
|              | A/A     | 50      | (18,18) | 48      | (13,08)   | 1,682 | 1,050-2,703 | 0,027    |
| XPC Exon15   | A/A     | 91      | (33,33) | 141     | (38,42)   |       |             |          |
| A2920C       | A/C     | 131     | (47,99) | 177     | (48,23)   | 1,244 | 0,985-1,574 |          |
|              | C/C     | 51      | (18,68) | 49      | (13,35)   | 1,548 | 0,970-2,476 | 0,064    |

#### Tabelle 6: Gruppe mit <50 NZN

Patienten, die mehr als ein primäres Melanom haben, stellen eine Gruppe mit erhöhtem Risiko für die Entstehung von weiteren Melanomen dar (Johnson et al. 1998). Von den untersuchten Melanompatienten litten 28 an multiplen primären Melanomen. Davon hatten 25 weniger als 50 Nävi und nur 4 wiesen Zeichen eines dysplastischen Nävus-Syndroms auf. 25 der Patienten dieser Gruppe hatten keine positive Familienanamnese bezüglich des malignen Melanoms. Bei dieser Patientengruppe mit überwiegend sporadischen multiplen primären Melanomen und meist fehlenden weiteren Risikofaktoren fand sich wiederum ein linearer Anstieg des Risikos mit der Anzahl an Allelen der Polymorphismen (Tabelle 7). Der homozygote Genotyp der Polymorphismen Intron9 PAT+, Intron11 -6A und Exon15 2920C war mit einem erhöhten Melanomrisiko assoziiert (p=0,030; p=0,031 und p=0,063). Das Risiko für ein multiples malignes Melanom steigt bei Homozygotie der jeweiligen Polymorphismen im Mittel um etwa das 3,5fache. In der Gruppe ohne multiple primäre Melanome fand sich keine Assoziation der Polymorphismen zum Melanom. Der Risikoanstieg mit der Anzahl der Allele stellte sich linear dar.

| Marker      | Genotype | multiples | ;       | alle Kont | rollen  | Odds  | 95%-        | zwei-    |
|-------------|----------|-----------|---------|-----------|---------|-------|-------------|----------|
|             |          | Melanom   | (n=28)  | (n=374)   |         | Ratio | Konfidenz-  | seitiges |
|             |          | absolut   | (%)     | absolut   | (%)     |       | Intervall   | р        |
| XPC         | -/-      | 7         | (25,00) | 148       | (39,47) |       |             |          |
| Intron9     | +/-      | 13        | (46,43) | 179       | (47,73) | 1,877 | 1,040-3,420 |          |
| Poly-AT     | +/+      | 8         | (28,57) | 48        | (12,80) | 3,524 | 1,082-11,69 | 0,030    |
| XPC         | C/C      | 7         | (25,00) | 148       | (39,47) |       |             |          |
| Intron11 C- | C/A      | 13        | (46,43) | 178       | (47,47) | 1,858 | 1,032-3,376 |          |
| 6A          | A/A      | 8         | (28,57) | 49        | (13,07) | 3,452 | 1,065-11,40 | 0,031    |
| XPC         | A/A      | 8         | (28,57) | 147       | (39,20) |       |             |          |
| Exon15      | A/C      | 12        | (42,86) | 178       | (47,47) | 1,701 | 0,947-3,071 |          |
| A2920C      | C/C      | 8         | (28,57) | 50        | (13,33) | 2,892 | 0,896-9,431 | 0,063    |

| Tabelle 7: Patienter | ı mit | multiplen | Melanom |
|----------------------|-------|-----------|---------|
|----------------------|-------|-----------|---------|

Der wichtigste Prognosefaktor von primären Melanomen ist derzeit die Tumordicke. Mit zunehmender Tumordicke steigt das Mortalitätsrisiko linear an (Garbe und Blum 2001). In dieser Arbeit wurde die häufig verwendete Grenze von 1mm Tumordicke auf das Melanomkollektiv angewandt. Ab einer Tumordicke von mehr als 1mm verschlechtert sich die Prognose für den Patienten deutlich. In der Gruppe mit Melanomen dicker als 1mm (n=126) fanden sich für alle drei Polymorphismen signifikante Unterschiede im Vergleich zur Gesamtkontrollgruppe (Tabelle 8). Die homozygoten Genotypen der Polymorphismen Intron9 PAT+, Intron11 -6A und Exon15 2920C waren mit einem erhöhten Melanomrisiko verbunden (p=0,027; p=0,039 und p=0,050). Der Anstieg vom heterozygoten zum homozygoten Genotyp war wiederum annähernd linear. Bei Patienten mit einer geringeren Tumordicke  $\leq$ 1mm zeigte sich keine Assoziation der Polymorphismen zum malignen Melanom.

| Marker           | Marker Genotyp Melanom |         | >1.0 mm | alle Kont | rollen  | Odds  | 95%-        | zwei-    |
|------------------|------------------------|---------|---------|-----------|---------|-------|-------------|----------|
|                  |                        |         |         |           |         | Ratio | Konfidenz-  | seitiges |
|                  |                        |         |         |           |         |       | Intervall   | р        |
|                  |                        | absolut | (%)     | absolut   | (%)     |       |             |          |
| XPC              | -/-                    | 36      | (28,57) | 148       | (39,47) |       |             |          |
| Intron9          | +/-                    | 68      | (53,97) | 179       | (47,73) | 1,402 | 1,030-1,913 |          |
| POIY-AT          | +/+                    | 22      | (17,46) | 48        | (12,80) | 1,967 | 1,061-3,659 | 0,027    |
| XPC              | C/C                    | 36      | (29,27) | 148       | (39,47) |       |             |          |
| Intron11<br>C-64 | C/A                    | 65      | (52,85) | 178       | (47,47) | 1,381 | 1,013-1,884 |          |
| 0 04             | A/A                    | 22      | (17,89) | 49        | (13,07) | 1,906 | 1,026-3,550 | 0,039    |
| XPC              | A/A                    | 38      | (30,16) | 147       | (39,20) |       |             |          |
| Exon15           | A/C                    | 65      | (51,59) | 178       | (47,47) | 1,346 | 0,992-1,828 |          |
| A2920C           | C/C                    | 23      | (18,25) | 50        | (13,33) | 1,812 | 0,984-3,342 | 0,050    |

#### Tabelle 8: Tumordicke

#### 3.2. Ergebnisse der Polymorphismen XPC Exon8, Exon10 und XPG Exon15

Die Polymorphismen XPC Exon8 G1580A (Arg492His), Exon8 T1601C (Val499Ala), Exon10 G2166A (Arg687Arg) und XPG Exon15 C3507G (Asp1104His) befinden sich nicht im Kopplungsungleichgewicht. Es wurden keine signifikanten Abweichungen von der erwarteten Genotypverteilung nach dem Hardy-Weinberg-Theorem gefunden. Die Genotypverteilung der Polymorphismen XPC Exon8, Exon10, XPG Exon15 unterschieden sich nicht signifikant zwischen Melanom und Kontrollen im Gesamtkollektiv (Tabelle 9). Es fand sich keine Assoziation der homozygoten Genotypen XPC Exon8 1580A, Exon8 1601C, Exon10 2166A und XPG Exon 15 3507G mit einem erhöhten Risiko für die Melanomentstehung. Die Allelfrequenzen (Melanom:Kontrollen) waren für XPC Exon8 1580A 6,29%:5,63%, für XPC Exon8 1601C 79,08%:78,28%, für XPC Exon10 2166A 26,19%:218,13% und für XPG Exon15 3507C 20,14%:21,39%. Die Allelfrequenzen unterschieden sich nicht signifikant zwischen Melanompatienten und Kontrollen. Für XPC Exon8 G1580A und Exon10 G2166A wurden erstmals überhaupt diese Frequenzen bestimmt, für die anderen 2 Polymorphismen ergaben sich Frequenzen, die im Wesentlichen mit den wenigen Vorarbeiten im Einklang stehen (Emmert et al. 2001; Gozukara et al. 2001; Kumar et al. 2003; Sanyal et al. 2004).

| Marker | Genotyp | Melanom |         | Kontrollen |         | Odds  | 95%-        | zwei-    |
|--------|---------|---------|---------|------------|---------|-------|-------------|----------|
|        |         | Anteil  | Anteil  | Anteil     | Anteil  | ratio | Konfidenz-  | seitiges |
|        |         | absolut | in %    | absolut    | in %    |       | intervall   | р        |
|        |         |         |         |            |         |       |             |          |
| XPC    | G/G     | 259     | (88,14) | 333        | (89,28) |       |             |          |
| Exon8  | G/A     | 33      | (11,19) | 38         | (10,19) | 1,120 | 0,697-1,794 |          |
| G1580A | A/A     | 2       | (0,68)  | 2          | (0,54)  | 1,254 | 0,486-3,217 | 0,6489   |
| XPC    | T/T     | 14      | (4,76)  | 8          | (2,14)  |       |             |          |
| Exon8  | T/C     | 95      | (32,31) | 146        | (39,14) | 1,053 | 0,793-1,400 |          |
| T1601C | C/C     | 185     | (62,93) | 219        | (58,71) | 1,108 | 0,629-1,960 | 0,7272   |
| XPC    | G/G     | 158     | (53,74) | 192        | (51,20) |       |             |          |
| Exon10 | G/A     | 118     | (40,14) | 155        | (41,33) | 0,904 | 0,700-1,165 |          |
| G2166A | A/A     | 18      | (6,12)  | 28         | (7,47)  | 0,817 | 0,490-1,358 | 0,4520   |
| XPG    | C/C     | 9       | (3,07)  | 18         | (4,81)  |       |             |          |
| Exon15 | C/G     | 100     | (34,13) | 124        | (33,16) | 1,081 | 0,819-1,430 |          |
| C3507G | G/G     | 184     | (62,80) | 232        | (62,03) | 1,168 | 0,670-2,044 | 0,5845   |

Tabelle 9: Genotypverteilung Gesamtkollektiv

Auch die Analyse der Untergruppen zeigte keinen Zusammenhang zwischen den homozygoten Genotypen und einem erhöhten Melanomrisiko bei Patienten älter 60 Jahre (n=100), mit multiplen primären Melanomen (n=28), einer niedrigen Anzahl (<50) von Nävi (n=273), einer negativen Familienanamnese (n=277) oder einer Tumordicke >1mm (n=126).

## 3.3. Ergebnisse der Splicevariantenbestimmung

Von 26 neuen Melanompatienten und 23 neuen Kontrollpersonen wurde eine RNA-Datenbank generiert. Dazu erfolgte die Isolierung der totalen RNA aus peripheren Lymphozyten und die Umschreibung in cDNA. Mit dem LightCycler (Roche, Mannheim) wurde nun durch real-time-PCR die Menge an ß-Aktin, Wildtypform des XPC-Gens und alternativ gesplicter Form mit Deletion des Exon12 (Isoform) gemessen und zueinander in Relation gesetzt. Die Isoform "Deletion Exon12" tritt vermehrt beim Genotyp XPC Intron11 –6A/A auf und besitzt eine verminderte Reparaturfähigkeit im Vergleich zur wildtyp-XPC-mRNA. Khan et al. (2002) konnten außerdem zeigen, dass diese Isoform bei Überexpression in einer normalen Fibroblastenzelllinie zu einer verminderten Reparaturfähigkeit dieser Zelllinie führt. Damit könnte diese Isoform einen dominant negativen Effekt auf die zelluläre DNA-Reparaturfähigkeit ausüben. Emmert et al. (2001) konnten darüber hinaus für verschiedene alternativ gesplicte mRNA-Isoformen des DNA-Reparaturgens XPG eine unterschiedliche relative Expression im Vergleich zur wildtyp-XPG-mRNA bei verschiedenen gesunden Probanden zeigen. Demnach könnte eine individuell erhöhte relative Expressionsmenge der mRNA des XPC-Gens mit Exon12-Deletion zu einer verminderten Reparaturfähigkeit und zu einem damit verbundenen individuell erhöhten Melanomrisiko führen.

Abbildung 10 zeigt die Verteilung der Messwerte der Wildform (Abbildung 10A) und Isoform (Abbildung 10B) der XPC-Exon12-mRNA mit Median, 25-75%-Quartil, Minimum und Maximum. Die absoluten Expressionsmengen der XPC-Isoform und der Wildtypform waren zwischen Melanom- und Kontrollpopulation jeweils nicht signifikant unterschiedlich: Mittelwert 0,049amol/ul XPC-Wildtypform-mRNA bei Patienten und 0,042amol/µl wildtyp-mRNA bei Kontrollen (p=0,23). Die Mittelwerte betrugen 0,00016amol/µl XPC-lsoform-mRNA bei Patienten und 0,00018amol/µl Isoform-mRNA Kontrollen die bei (p=0,41).Interessanterweise laq Expressionsmenge des "Housekeeping"-Gens B-Aktin (Abb. 10C) bei den Kontrollen signifikant höher als bei den Melanompatienten (Melanompatienten: Mittelwert 13,4amol/µl, Standardabweichung 4,5amol/µl; Kontrollen: Mittelwert 10,4amol/µlm Standardabweichung 2,8amol/µl; p=0,0004). ß-Aktin wird in den Probengruppen unterschiedlich exprimiert. Die Verwendung als Housekeeping-Gen ist daher nicht gegeben. Eventuell wird die Expression des Gens durch nicht berücksichtigte Einflüsse moduliert.



Abbildung 10: Verteilung der absolut Messwerte von Wildtyp, Isoform und ß-Aktin

Auch die Analyse der relativen Expressionsmengen der Isoform "Deletion-Exon12" bezogen auf die Menge der wildtyp-XPC-mRNA (Abb. 11A). Die relativen Expressionsmengen der Isoform bezogen auf wildtyp-XPC-mRNA ergab Mediane von 0,339% +/- 0,017% Standardabweichung bei den Melanompatienten und0,358% +/- 0,016% Standardabweichung bei den Kontrollen. Der Unterschied dieser Ratios von Isoform und Wildtypform in den beiden Populationen waren nicht signifikant unterschiedlich (p=0,18). Bei Bezug der Isoformwerte auf die Menge der ß-AktinmRNA-Expression (Abb. 11B) ergaben sich Mittelwerte von 0,000001amol/µl bei Melanompatienten im Vergleich zu 0,000019amol/µl bei Kontrollen. Das Verhältnis der Isoform zu β-Aktin lag bei den Patienten signifikant niedriger gegenüber den Kontrollen (p=0,0071). Dies beruht aber vermutlich auf die unterschiedliche Expression des ß-Aktins in den beiden Populationen.

Das ermittelte Verhältnis der Isoform "Deletion-Exon12" zur Wildform mit Mittelwerten von 0,39% bei Melanompatienten und 0,50% bei Kontrollen entsprechen früheren Beobachtungen an 9 normalen Fibroblastenzelllinien (Khan et al. 2002).



Abbildung 11: Verteilung der Messwerte mit Median, 25-75%-Quartil, Ausreißern und Extremwerten bei den Ratios Isoform/Wildtyp und Isoform/ß-Aktin

Zur Bestimmung allen Expressionsbestimmungen genaueren wurden bei Doppelbestimmungen in zwei unabhängigen Messreihen durchgeführt und Mittelwerte für die Proben gebildet. Bei einem Melanompatienten wurden zudem als Qualitätskontrolle duplikate Proben angelegt. Diesem Patienten wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten zwei Mal Blut abgenommen und dieses dann in unterschiedlichen Versuchsansätzen weiterverarbeitet (RNA-Isolation und cDNA-Synthese). Die RNA-Extraktion aus den Vollblutproben erreichten totale RNA-Mengen von 5,49µg und 7,78µg. Bei der Quantifizierung ergaben sich Mittelwerte (jeweils aus Doppelbestimmungen der beiden Proben) von 11,75amol/µl und 11,82amol/µl für B-Aktin, 0,049amol/µl und 0,053amol/µl für wildtyp-Exon12 und 0,00011amol/µl und 0,00009amol/µl für die Isoform "Deletion-Exon12". Die geringen Abweichungen deuten auf eine hohe Reproduzierbarkeit der Technik und Validität der erzielten Ergebnisse hin.

# 4. Diskussion

Etwa alle 1000 Basenpaare finden sich Sequenzvarianten in der kodierenden Sequenz des menschlichen Genoms. Bei 90% dieser Varianten handelt es sich um sogenannte Single-Nukleotid-Polymorphismen (SNP) (Cargill et al. 1999; Chakravarti 1999). SNP wurden in verschiedenen XP-Genen, wie XPA, XPC, XPD, XPF und XPG. nachgewiesen (Khan et al. 2000). Die Proteine dieser Nukleotidexzisionsreparaturgene sind nicht nur an der Beseitigung von UVinduzierten DNA-Schäden beteiligt, sondern auch an der Reparatur von DNA-Läsionen durch andere Karzinogene, wie beispielsweise Benzo[a]pyrendioxid im Zigarettenrauch (Denissenko et al. 1996). In der Literatur gibt es Hinweise, dass Polymorphismen der NER-Gene die DNA-Reparaturfähigkeit modulieren können und somit zum Risiko der Entstehung von Hauttumoren (Wei et al. 1993), Lungentumoren (Cheng et al. 2000; Wei et al. 1996) und Tumoren des Kopfes und Halses (Cheng et al. 1998) beitragen können. Wu et al. (2003) konnte zeigen, dass ein Polymorphismus der nichtkodierenden XPA-Gens die Region des Nukleotidexzisionsreparaturkapazität beeinflusst und mit einem verminderten Lungenkrebsrisiko, vor allem in Gegenwart von Tabakkarzinogenen, assoziiert ist. Bei 40 Patienten mit Basalzellkarzinomen gegenüber 40 Kontrollen zeigte sich 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 kutanen Basalzellkarzinomen (Dybdahl et al. 1999). Wei et al. (2003) zeigte kürzlich bei 312 Melanompatienten und 324 Kontrollen, dass eine reduzierte NER-Kapazität ein unabhängiger Risikofaktor für das kutane maligne Melanom ist und zur Suszeptibilität für das Melanom in der Bevölkerung beitragen kann. Übereinstimmend mit dieser Theorie fanden Tomescu et al. (2001) eine signifikante Assoziation von 3 Polymorphismen des DNA-Reparaturgens XPD mit dem malignen Melanom.

Ein häufig vorkommender Polymorphismus, der aus einer 83bp-Insertion aus A und T Basen (Poly-AT) und einer 5bp-Deletion besteht, wurde vor kurzem im Intron9 des DNA-Reparaturgens XPC identifiziert. Die Häufigkeit dieses Insertions/Deletions-Polymorphismus PAT+ lag bei ~40% in einer Gruppe von 97 zufällig ausgewählten Probanden in den USA (Khan et al. 2000). Weiterhin existiert ein SNP mit ähnlicher Häufigkeit am 3'-Ende der XPC-cDNA (A2920C im Exon15). Dieser führt zu einem

Aminosäureaustausch von Lysin zu Glutamin (Gozukara et al. 2001). Das XPC-2920C-Allel war bei der Komplementierung DNA-Reparatur defizienter XPC-Zellen genauso effizient wie das 2920A-Allel (Khan et al. 2000), d.h. der Aminosäureaustausch von Lysin zu Glutamin hat keine Veränderung der Reparaturfähigkeit des XPC-Proteins zur Folge. Interessanterweise ist der im Intron9 gelegene PAT-Polymorphismus mit dem Risiko für Plattenepithelkarzinome im Kopfund Halsbereich assoziiert (Shen H et al. 2001). In einer weiteren Studie mit 102 gesunden Individuen wurde gezeigt, dass bei Personen mit dem homozygoten Polymorphismus PAT+/+ die NER um 23,4% gegenüber Probanden mit PAT-/vermindert ist (p=0,02) (Qiao et al. 2002). Vom 2920C-Allel des XPC-Exon15-Polymorphismus wurde eine Assoziation mit der Entwicklung von Blasenkrebs bei 305 Patienten und 246 gesunden Kontrollen berichtet (Sanyal et al. 2004). Vodicka et al. (2004) zeigte zudem, dass der 2920C/C-Genotyp mit einer verminderten Reparaturrate von Einzelstrangbrüchen assoziiert ist.

Zwischenzeitlich wurde ein neuer häufig vorkommender C/A-SNP an Position -6 im Bereich der Intron11-Spliceakzeptorstelle für Exon12 entdeckt (Khan et al. 2002). Untersuchungen bei 97 US-amerikanischen gesunden Probanden ergaben, dass dieser Polymorphismus mit dem PAT-Polymorphismus im Intron9 und dem SNP A2920C im Exon15 des XPC-Gens, die insgesamt ~9kb voneinander entfernt liegen, im Kopplungsungleichgewicht liegt und diese drei Polymorphismen einen Haplotyp bilden. Der Haplotyp PAT+/Intron11A/Exon15C fand sich bei etwa 40% aller Probanden (Khan et al. 2002). Der Polymorphismus Intron11-6A reduziert den Informationsgehalt der Intron11/Exon12-Spliceakzeptorstelle von 7,5 auf 5,1bits (Khan et al. 2002; Schneider 1997). Demnach würde man erwarten, dass bei Vorliegen eines A die Splicestelle weniger häufig durch die Splicing-Maschinerie erkannt wird und es zu einer vermehrten Deletion von Exon12 kommen müsste (Schneider 1997). In der Tat zeigten Fibroblasten, die einen homozygoten A/A-Genotyp besaßen, signifikant höhere Mengen an der XPC-mRNA-Splicevariante mit Deletion von Exon12 (2,6fach im Vergleich zum C/C-Genotyp). Gleichzeitig wurde in einem Wirtszell-Komplementationstestsystem nachgewiesen, dass die Splicevariante "Deletion-Exon12" eine verminderte DNA-Reparaturfunktion besitzt (Khan et al. 2002). Dies könnte die Assoziation der Polymorphismen des XPC-PAT+/Intron 11A/Exon15C-Haplotyps mit der Entwicklung von verschiedenen Tumoren erklären.

Der verwendete Cochrane-Armitage-Trend-Test geht von einem linearen Anstieg des Risikos von einem homozygoten Genotyp über den heterozygoten hin zum anderen homozygoten Genotyp aus. Die Bestimmung der Genotypfrequenzen der Polymorphismen XPC Intron9, Intron11 und Exon15 zeigten eine nicht-signifikante Assoziation des Intron9PAT+/Intron11A/Exon15C-Haplotyps mit einem erhöhten Risiko für die Melanomentstehung (Tabelle 4). Die ermittelten Frequenzen stimmten mit bisher bekannten Ergebnissen überein (Khan et al. 2000, Khan et al. 2002, Shen H et al. 2001). Das Kopplungsungleichgewicht und die Haplotypbildung der Polymorphismen XPC Intron9 PAT, Intron11 C-6A und Exon15 C2920A konnte in dieser Studie mit 669 deutschen Probanden bestätigt werden (Abb.9). Auch in unserer europäischen Population lag, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Khan et al. (2002), die Frequenz des Haplotyps PAT+/Intron11A/Exon15C bei ~40%.

Interessanterweise fanden Baccarelli et al. (2004) bei der Untersuchung von XPD-Polymorphismen und dem Melanomrisiko ebenfalls keine signifikante Assoziation in der Gesamtgruppe, aber eine signifikante Assoziation mit erhöhtem Melanomrisiko in bestimmten Subgruppen, wie z.B. älteren Melanompatienten (>50 Jahre). Andere Studien an Patienten mit Basalzellkarzinomen (Dybdahl et al. 1999) und Plattenepithelkarzinomen (Sturgis et al. 2000) deuten zudem darauf hin, dass Träger eines XPD-Polymorphismus, der mit einer verminderten DNA-Reparatur einhergeht (Hemminki et al. 2001), ein erhöhtes Krebsrisiko im Alter besitzen. Auch in dieser Arbeit zeigte sich bei Melanompatienten, die älter als 60 Jahre bei der primären Diagnosestellung waren, ein erhöhtes Melanomrisiko in Assoziation mit den Genotypen PAT+/+, Intron11 -6A/A und Exon12 2920C/C (Tabelle 5).

Das Alter spielt eine entscheidende Rolle in der Vulnerabilität gegenüber Photokarzinogene (Gilchrest et al. 1999). Im Verlauf des Alterns akkumulieren DNA-Schäden, die Protoonkogene aktivieren und Tumorsuppressorgene inaktivieren können (Yaar und Gilchrest 2001; Hoeijmakers 2001). Das Melanomrisiko steigt im Alter ebenfalls stark an (Parkin et al. 1997). Im Alter findet sich auch bei gesunden Personen eine verminderte DNA-Reparaturkapazität (-0,6% pro Jahr) und eine erhöhte Mutabilität nach UV-Exposition (+0,6% pro Jahr) (Annett et al. 2004; Goukassian et al. 2000; Moriwaki et al. 1996). Gleichzeitig kommt es zu einer Reduktion kutaner Schutzmechanismen gegen UV-Licht, wie z.B. eine verminderte Pigmentierung und eine geringere epidermale Dicke (Yaar und Gilchrest 2001). Der

Rückgang der individuellen DNA-Reparaturfähigkeit im Alter zusammen mit dem zusätzlich modulierenden Einfluss von DNA-Reparaturgen-Polymorphismen könnte die Entstehung von Melanomen gerade bei Älteren begünstigen.

Bei der Untersuchung von Subgruppen fand sich außerdem eine Assoziation der XPC-Genotypen PAT+/+, Intron11 -6 A/A und Exon 152920 C/C mit einem erhöhten Melanomrisiko bei Patienten mit weniger als 50 Nävi (Tabelle 6). Eine hohe Zahl an Nävi ist ein starker Risikofaktor für die Melanomentstehung (Youl et al. 2002). Der Risikofaktor "Nävuszahl" oder auch das Vorhandensein dysplastischer Nävi könnten den modulierenden Effekt der DNA-Reparaturgenpolymorphismen auf die DNA-Reparaturkapazität bei der Melanomentstehung überdecken. Ähnliches beschrieben auch Baccarelli et al. (2004) in ihrer Assoziationsstudie von einem XPD-Gen Polymorphismus und dem Melanomrisiko. Der unabhängige Einfluss der DNA-Reparatur kommt wohl erst bei fehlender Einwirkung des Risikofaktors "viele Nävi" zum Tragen.

Weiterhin fand sich in dieser Arbeit eine Assoziation der XPC-Genotypen PAT+/+, Intron11 -6A/A und Exon15 2920C/C mit dem Melanomrisiko bei Patienten mit multiplen Melanomen (Tabelle 7). Diese wiesen zumeist keine anderen die Risikofaktoren für Entstehung multipler Melanome auf (positive Familienanamnese, dysplastisches Nävus-Syndrom, hohe Anzahl von Nävi). Melanompatienten haben bekanntermaßen ein erhöhtes Risiko, an weiteren Melanomen zu erkranken (Johnson et al. 1998). Nashan et al. (2003) fanden bei Melanompatienten ein über 30fach erhöhtes Risiko, in der Folge ein weiteres Melanom zu entwickeln. Auch in dieser Arbeit zeigten 70% der Patienten mit multiplen Melanomen keine weiteren Risikofaktoren (positive Familienanamnese, dysplastisches Nävus-Syndrom, hohe Anzahl von Nävi). Schätzungsweise 8-12% aller Melanomfälle entstehen bei Individuen mit bekanntem familiärem Hintergrund für Melanome (Greene et al. 1985a; Kraemer et al. 1983). Nur in etwa der Hälfte dieser Fälle lässt sich das familiäre Auftreten von Melanomen auf einen genetischen Defekt im CDKN2-Gen, das für p16 kodiert, zurückführen. p16 fungiert als Zellzyklusregulator und Inhibitor der Zyklin-D-Kinase (Newton Bishop et al. 1998). Die Patienten mit multiplen primären Melanomen in dieser Studie entwickelten überwiegend sporadische multiple Melanome ohne einen familiären Hintergrund, ohne hohe Anzahl an Nävi oder dysplastischen Nävi. Offensichtlich scheint diese

Gruppe der multiplen Melanome hinsichtlich der Pathogenese sehr heterogen zu sein (Nashan et al. 2003). Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen die Vermutung, dass auch bisher unbekannte Faktoren an der Entwicklung von multiplen primären Melanomen beteiligt sein könnten (Nashan et al. 2003). Eine verminderte DNA-Reparatur könnte ein solcher Faktor sein. Weitere Untersuchungen könnten hierzu Aufschluss geben.

Auch zeigte sich in der vorliegenden Arbeit eine Assoziation der XPC-Genotypen PAT+/+, Intron11 -6A/A und Exon15 2920C/C mit Melanomen bei Patienten mit einer Primärtumordicke von mehr als 1mm (Tabelle 8). Die Tumordicke nach Breslow ist der stärkste Prognosefaktor und Marker einer Tumorprogression (Garbe et al. 1995; Garbe und Blum 2001). Im Allgemeinen geht man von einem mehrschrittigen Modell der Tumorentstehung und Progression aus (Yuspa et al. 1994). Hierbei folgt auf die Tumorinitiation und Tumorpromotion die Tumorprogression, gepaart mit einer graduell zunehmenden zellulären genetischen Instabilität. Es gibt heute eine Reihe von Hinweisen, dass erworbene oder vererbte Defekte in zellulären Systemen, welche die genetische Stabilität überwachen und bei deren Ausfall es zu einem zellulären "Mutator"-Phänotyp kommt, in Zusammenhang mit der Entwicklung von Tumoren stehen (Hoeijmakers 2001). DNA-Reparaturmechanismen sind eine der wichtigsten Zellsysteme zur Aufrechterhaltung der genetischen Stabilität. Die gefundene Assoziation von XPC-Gen-Polymorphismen mit dem Auftreten von dicken Melanomen könnte ein auf die Beteiligung Hinweis der Nukleotidexzionsreparaturfähigkeit bei der Progression des malignen Melanoms durch Erzeugung eines solchen "Mutator"-Phänotyps sein.

Darüber hinaus sind im XPC-Gen noch 3 weitere Polymorphismen bekannt: XPC Exon8 G1475A (Arg492His), T1496C (Val499Ala) und Ex10 G2061A (Arg687Arg) (Chavanne et al. 2000). Zu diesen Polymorphismen liegen jedoch bisher noch keine Daten bezüglich der Allelfrequenz oder einer möglichen Assoziation mit Tumorerkrankungen vor. Lediglich vom Polymorphismus XPC Exon8 T1496C ist bekannt, dass sich bei 84 zufällig ausgewählten Mitarbeitern des National Institutes of Health eine Häufigkeit des Allels XPC Exon8 1496C von 76,8% fand, und dass beide Allele von diesem Polymorphismus bei der Komplementierung DNA-reparaturdefizienter XPC-Zellen ähnlich effizient waren (Gozukara et al. 2001). Kleinere Schwankungen in der DNA-Reparaturfähigkeit können jedoch nur schwer

mit dem hierfür verwendeten Wirtszell-Reaktivierungs-Assay (Emmert et al. 2002) nachgewiesen werden. Unabhängig davon könnten natürlich auch Polymorphismen, die scheinbar keinen oder nur einen subtilen Einfluss auf die DNA-Reparaturfunktion haben, über die Assoziation mit anderen funktionell relevanten DNA-Veränderungen zur Krebsentstehung beitragen. So war auch der Polymorphismus XPC Exon15 A2920C. dessen Aminosäureaustausch keine Veränderung DNAder Reparaturfähigkeit bewirkte, mit der Krebsentstehung assoziiert (Sanyal et al. 2004). Der Polymorphismus XPG C3607G wurde erstmals zufällig bei einem XPG-Patienten und seinen Angehörigen gefunden (Nouspikel und Clarkson 1994). In zwei schwedischen Studien wurde ein Zusammenhang von diesem Polymorphismus mit Brust- und Blasenkrebs gezeigt (Kumar et al. 2003; Sanyal et al. 2004). In einer koreanischen Studie zeigte sich ein vermindertes Risiko von Lungenkrebs in Assoziation mit dem Allel 3507C. Demnach könnte auch dieser Polymorphismus die zelluläre DNA-Reparaturfähigkeit modulieren und zu einem erhöhten Melanomrisiko beitragen.

Die Genotypfrequenzen für XPC Exon8 G1580A und Exon10 G2166A wurden zum ersten Mal ermittelt. Die ermittelten Genotypfrequenzen der Polymorphismus XPC Exon8 T1601C und XPG Exon15 G3507C entsprechen früheren Studien (Sanyal et al. 2004; Emmert et al. 2000; Gozukara et al. 2001; Kumar et al. 2003). Die Polymorphismen im XPC Exon8 und Exon10 und im XPG Exon15 zeigten keine Assoziation zum malignen Melanom sowohl in der Gesamtpopulation (Tabelle 9) als auch in der Analyse von Untergruppen. Interessanterweise wurde in einer Koreanischen Studie mit 310 Lungenkrebspatienten und 311 gesunden Kontrollen eine Genotypfrequenz von 0,45-0,5 (gegenüber der hier ermittelten Frequenz von 0,2-0,21) und eine Assoziation mit dem Risiko für Lungenkrebs berichtet (Jeon et al. 2003). Dies könnte darauf hindeuten, dass die Verteilung des XPG-Polymorphismus in verschiedenen ethnischen Gruppen unterschiedlich ist.

Weitere Studien DNAsind notwendig, um die Rolle der Melanom, Reparaturgenpolymorphismen beim malignen auch unter Berücksichtigung von Populationen unterschiedlicher Herkunft, zu untersuchen.

In einem Pilotprojekt wurde abschließend die relative Expressionsmenge der alternativ gesplicten XPC-mRNA Variante mit Deletion von Exon12 mit Hilfe der quantitativen real-time-RT-PCR-Technik untersucht. Man nimmt an, dass mindestens

38% der menschlichen mRNA spontan alternativ gesplicte Formen haben. Ein einzelnes Gen weist im Durchschnitt etwa 2,75 Splicevarianten auf (Brett et al. 2000). Khan et al. (2002) wiesen bereits nach, dass die XPC-Splicevariante mit Deletion von Exon12 eine verminderte DNA-Reparaturfähigkeit besitzt und bei Überexpression in einer reparaturkompetenten Zelllinie sich sogar möglicherweise dominant negativ auf die zelluläre DNA-Reparaturfähigkeit auswirken kann. Demnach könnte sich eine höhere relative Expressionsrate der XPC-Splicevariante in einer verminderten DNA-Reparaturfähigkeit und in einer erhöhten Krebssuszeptibilität wiederspiegeln. Emmert et al. (2001) identifizierten zum Beispiel sechs spontan alternativ gesplicte mRNA-Isoformen im XPG-Gen. Drei der sechs Splicevarianten zeigten in einer semiquantitativen RT-PCR-Reaktion eine deutliche interindividuelle Schwankung in der Expressionsrate im Vergleich zu der wildtyp-XPG-mRNA (Emmert et al. 2001). Durch Kompetition mit der wildtyp-XPG-mRNA könnten diese XPG-Splicevarianten auch die DNA-Reparaturfähigkeit modulieren. Interessanterweise fanden Cheng et al. (2000) eine deutlich reduzierte XPG-wildtyp-mRNA-Expression bei Patienten mit Lungenkrebs im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Gleichzeitig konnte man zeigen, DNA-Reparaturfähigkeit dass eine verminderte mit einem erhöhten Lungenkrebsrisiko assoziiert ist (Wei et al. 1996). Eine interindividuelle Schwankung der DNA-Reparaturfähigkeit ist in der Literatur bekannt (Bootsma et al. 2002; Cheng et al. 1998; Oesch et al. 1987).

Für die Durchführung der quantitativen real-time-RT-PCR-Experimente wurde ein neues Probandenkollektiv aus 26 Melanompatienten und 23, nach Alter und Geschlecht abgeglichenen, gesunden Kontrollen zusammengestellt. In dem untersuchten Kollektiv fanden sich jedoch keine Unterschiede in der Verteilung der der absoluten mRNA-Expressionsmengen wildtyp-XPC-mRNA und der Splicevariante mit Deletion des Exon12 (Abb. 10A und B). Auch die Analyse der relativen XPC-mRNA-Mengen mit Deletion von Exon12 bezogen auf die XPCwildtyp-mRNA-Expression sowie auch auf die Menge der Expression des "Houeskeeping"-Gens B-Aktin ergab nicht die postulierten Unterschiede zwischen den Melanompatienten und den gesunden Kontrollen (Abbildung 11). Möglicherweise muss ein größeres Kollektiv, ggf. auch eine besondere Melanom-Risikogruppe, untersucht werden, um mögliche Unterschiede in der relativen XPC-mRNA-Expression dieser Splicevariante herausarbeiten zu können.

Die Untersuchung der Expression des ß-Aktingens als "Houskeeping"-Gen ergaben Unterschiede der Expressionsmengen zwischen der Melanom- und der Kontrollgruppe. Andere Studien kamen zu dem Schluss, dass ß-Aktin als Kontrollstandard für ihre Untersuchungen ungeeignet war, da seine Expression durch verschiedene Faktoren, wie Infektion der Zellen mit dem Herpes-simplex-Virus Typ1 oder Behandlung mit Lipopolysacchariden, variiert (Malarstig et al. 2003, Nystrom et al. 2004). Die hier gefundenen Abweichungen der Melanomgruppe könnten beispielsweise ebenso auf unbekannte metabolische Veränderungen bei den Melanompatienten zurückzuführen sein. Durch die Normalisierung auf das PCR-Produkt selbst, mittels der Standardkurven, können von unseren Messwerten trotzdem Aussagen gemacht werden.

Die sensitive Technik der quantitativen real-time-RT-PCR scheint für diese Fragestellung geeignet. Zu Kontrollzwecken wurde bei Patienten zu 2 verschiedenen Zeitpunkten Blut entnommen und die Quantifizierung der RNA-Mengen in getrennten Versuchsansätzen durchgeführt. Hier zeigte sich eine sehr gute Reproduzierbarkeit der Methode mit einer geringen Schwankung der Messergebnisse (ohne Abbildung). Auch lag die relative Expressionsmenge der alternativ gesplicten XPC-mRNA mit Deletion von Exon12 bezogen auf die XPC-wildtyp-mRNA-Expression bei etwa 0,5%. Dieselbe Größenordnung wurde auch von Khan et al. (2002) berichtet.

# 5. Zusammenfassung

Patienten mit Xeroderma pigmentosum (XP) sind extrem sonnenempfindlich und haben ein über 1000fach erhöhtes Risiko, epitheliale Hauttumore wie auch maligne Melanome zu entwickeln. Polymorphismen in XP-Genen könnten zu leichten Variationen der Nukleotidexzisionsreparaturkapazität führen und damit zur Entstehung von Melanomen beitragen. Diese Arbeit untersucht die Assoziation von insgesamt sieben Polymorphismen der DNA-Reparaturgene XPC und XPG mit dem Auftreten von malignen Melanomen in einer Fall-Kontrollstudie von 294 Melanompatienten und 375 gesunden Kontrollpersonen aus der gleichen Region.

Die Allelfrequenzen der sieben Polymorphismen entsprachen dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Es konnte bestätigt werden, dass drei Polymorphismen (XPC Intron9 PAT, Intron11 C-6A und Exon15 A2920C) im Kopplungsungleichgewicht liegen und einen Haplotyp bilden (D'=1). Die XPC-Genotypen Intron9 PAT+/+, Intron11 -6A/A und Exon15 2920C/C waren mit einem nicht-signifikant erhöhten Melanomrisiko assoziiert: OR 1.527 (95%-KI: 0.967-2.418), OR 1.526 (95%-KI: 0.966-2.414), und OR 1.425 (95%-KI: 0.906-2.246). Die Analyse von Subgruppen zeigte jedoch, dass diese Genotypen insbesondere mit Melanomen bei älteren Patienten (>60 Jahre) (n=100), bei Patienten mit weniger als 50 Nävi (n=273), bei Patienten mit multiplen primären Melanomen (n=28) und bei Patienten mit einer primären Tumordicke >1mm (n=126) assoziiert sein könnten. Dies unterstützt die Hypothese, dass der PAT+/Intron11A/Exon15C-Haplotyp zur Melanomentstehung auch und zur Melanomprogression beitragen könnte. Die Analyse der 4 anderen Polymorphismen im XPC- (Exon8 G1580A; Arg492His und T1601C; Val499Ala, Exon10 G2166A; Arg687Arg) und XPG-Gen (Exon15 C3507G; Asp1104His) zeigte keine Assoziationen mit dem Risiko einer Melanomerkrankung.

Zusätzlich wurde in einer Pilotstudie die relative Expressionsmenge der alternativ gesplicten XPC-mRNA-Isoform mit Deletion von Exon12 mittels quantitativer realtime-RT-PCR bei 26 Melanompatienten und 23 nach Alter und Geschlecht abgeglichenen gesunden Kontrollen bestimmt. Die neu etablierte sensitive Technik ergab sehr gut reproduzierbare Ergebnisse, die mit Literaturangaben übereinstimmen. Die Hypothese einer höheren relativen Expression der XPC-Splicevariante in der Melanomgruppe ließ sich jedoch in diesem Kollektiv nicht bestätigen.

# 6. Literaturverzeichnis

- 1. Ananthaswamy HN, Pierceall WE (1990): Molecular mechanisms of ultraviolet radiation carcinogenesis. Photochem Photobiol <u>52</u>, 119-1136
- 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 <u>39</u>, 491-498
- 3. Armstrong BK, Kricker A (1995): Skin cancer. Dermatol Clin <u>13</u>, 583-594
- Autier P, Joarlette M, Lejeune F, Lienard D, Andre J, Achten G (1991): Cutaneous malignant melanoma and exposure to sunlamps and sunbeds: a descriptive study in Belgium. Melanoma Res <u>1</u>, 69-74
- Baccarelli A, Calista D, Minghetti P, Marinelli B, Albetti B, Tseng T, Hedayati M, Grossman L, Landi G, Struewing JP, Landi MT (2004): XPD gene polymorphism and host characteristics in the association with cutaneous malignant melanoma risk. Br J Cancer <u>90</u>, 497-502
- 6. Berwick M, Vineis P (2000): Markers of DNA repair and susceptibility to cancer in humans: an epidemiologic review. J Natl Cancer Inst <u>92</u>, 874-897
- 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
- 8. Boiteux S, Radicella JP (1999): Base excision repair of 8-hydroxyguanine protects DNA from endogenous oxidative stress. Biochimie <u>81</u>, 59-67
- Bootsma D, Kraemer KH, Cleaver JE, Hoeijmakers JH: Nucleotide excision repair syndromes: xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrom, and trichodthiodystrophy; in: The Genetic Basis of Human Cancer; hrsg. v. Vogelstein B, Kinzler KW; McGraw-Hill, NewYork: 2002, 211-237
- Brett D, Hanke J, Lehmann G, Haase S, Delbruck S, Krueger S, Reich J, Bork P (2000): EST comparison indicates 38% of human mRNAs contain possible alternative splice forms. FEBS Lett <u>474</u>, 83-86

- Broughton BC, Cordonnier A, Kleijer WJ, Jaspers NG, Fawcett H, Raams A, Garritsen VH, Stary A, Avril MF, Boudsocq F, Masutani C, Hanaoka F, Fuchs RP, Sarasin A, Lehmann AR (2002): Molecular analysis of mutations in DNA polymerase eta in xeroderma pigmentosum-variant patients. Proc Natl Acad Sci U S A <u>99</u>, 815-820
- 12. Cargill M, Altshuler D, Ireland J, Sklar P, Ardlie K, Patil N, Shaw N, Lane CR, Lim EP, Kalyanaraman N, Nemesh J, Ziaugra L, Friedland L, Rolfe A, Warrington J, Lipshutz R, Daley GQ, Lander ES (1999): Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. Nat Genet <u>22</u>, 231-238
- Chakravarti A (1999): Population genetics--making sense out of sequence. Nat Genet <u>21</u>, 56-60
- Chavanne F, Broughton BC, Pietra D, Nardo T, Browitt A, Lehmann AR, Stefanini M (2000): Mutations in the XPC gene in families with xeroderma pigmentosum and consequences at the cell, protein, and transcript levels. Cancer Res <u>60</u>, 1974-1982
- 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 <u>7</u>, 465-468
- Cheng L, Spitz MR, Hong WK, Wei Q (2000): Reduced expression levels of nucleotide excision repair genes in lung cancer: a case-control analysis. Carcinogenesis <u>21</u>, 1527-1530
- Clark WH Jr., Evans HL, Everett MA, Farmer ER, Graham JH, Mihm MC Jr., Rosai J, Sagebiel RW, Wick MR (1991): Early melanoma. Histologic terms. Am J Dermatopathol <u>13</u>, 579-582
- 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 <u>55</u>, 6152-6160

- Cooper PK, Nouspikel T, Clarkson SG, Leadon SA (1997): Defective transcription-coupled repair of oxidative base damage in Cockayne syndrome patients from XP group G. Science <u>275</u>, 990-993
- 20. de Boer BJ, Hoeijmakers JH (2000): Nucleotide excision repair and human syndromes. Carcinogenesis <u>21</u>, 453-460
- 21. Demple B, Harrison L (1994): Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology. Annu Rev Biochem <u>63</u>, 915-948
- 22. Denissenko MF, Pao A, Tang M, Pfeifer GP (1996): Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53. Science <u>274</u>, 430-432
- Dybdahl M, Vogel U, Frentz G, Wallin H, Nexo BA (1999): Polymorphisms in the DNA repair gene XPD: correlations with risk and age at onset of basal cell carcinoma. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev <u>8</u>, 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 <u>46</u>, 1787-1794
- 25. 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 U S A <u>97</u>, 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 <u>29</u>, 1443-1452
- 27. Emmert S, Slor H, Busch DB, Batko S, Albert RB, Coleman D, Khan SG, bu-Libdeh B, DiGiovanna JJ, Cunningham BB, Lee MM, Crollick J, Inui H, Ueda T, Hedayati M, Grossman L, Shahlavi T, Cleaver JE, Kraemer KH (2002): Relationship of neurologic degeneration to genotype in three xeroderma pigmentosum group G patients. J Invest Dermatol <u>118</u>, 972-982

- 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, 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
- 30. Garbe C, Blum A (2001): Epidemiology of cutaneous melanoma in Germany and worldwide. Skin Pharmacol Appl Skin Physiol <u>14</u>, 280-290
- Garbe C, Buttner P, Ellwanger U, Orfanos CE (1995): Management of primary malignant melanoma of the skin in German-speaking countries 1983-1993. A study of the Malignant Melanoma Central Register of the German Society of Dermatology. Hautarzt <u>46</u>, 762-770
- 32. Gilchrest BA, Eller MS, Geller AC, Yaar M (1999): The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. N Engl J Med <u>340</u>, 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 <u>14</u>, 1325-1334
- 34. Gozukara EM, Khan SG, Metin A, Emmert S, Busch DB, Shahlavi T, Coleman DM, Miller M, Chinsomboon N, Stefanini M, Kraemer KH (2001): A stop codon in xeroderma pigmentosum group C families in Turkey and Italy: molecular genetic evidence for a common ancestor. J Invest Dermatol <u>117</u>, 197-204
- Greene MH, Clark WH, Jr., Tucker MA, Elder DE, Kraemer KH, Guerry D, Witmer WK, Thompson J, Matozzo I, Fraser MC (1985a): Acquired precursors of cutaneous malignant melanoma. The familial dysplastic nevus syndrome. N Engl J Med <u>312</u>, 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 <u>102</u>, 458-465

- 37. Haenssle HA, Vente C, Bertsch HP, Rupprecht R, Abuzahra F, Junghans V, Ellinghaus B, Emmert S, Hallermann C, Rosenberger A, Neumann C (2004): Results of a surveillance programme for patients at high risk of malignant melanoma using digital and conventional dermoscopy. Eur J Cancer Prev <u>13</u>, 133-138
- 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 <u>22</u>, 1185-1188
- Hey T, Lipps G, Sugasawa 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 <u>41</u>, 6583-6587
- 40. Higgins EM, Du Vivier AW (1992): Possible induction of malignant melanoma by sunbed use. Clin Exp Dermatol <u>17</u>, 357-359
- 41. Hoeijmakers JH (2001): Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. Nature <u>411</u>, 366-374
- 42. Jeon HS, Kim KM, Park SH, Lee SY, Choi JE, Lee GY, Kam S, Park RW, Kim IS, Kim CH, Jung TH, Park JY (2003): Relationship between XPG codon 1104 polymorphism and risk of primary lung cancer. Carcinogenesis <u>24</u>, 1677-1681
- 43. Johnson TM, Hamilton T, Lowe L (1998): Multiple primary melanomas. J Am Acad Dermatol <u>39</u>, 422-427
- 44. Khan SG, Levy HL, Legerski R, Quackenbush E, Reardon JT, Emmert S, Sancar A, Li L, Schneider TD, Cleaver JE, Kraemer KH (1998): Xeroderma pigmentosum group C splice mutation associated with autism and hypoglycinemia. J Invest Dermatol <u>111</u>, 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 <u>21</u>, 1821-1825
- 46. 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 <u>30</u>, 3624-3631

- Klungland A, Hoss 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 <u>3</u>, 33-42
- Kraemer KH, Greene MH, Tarone R, Elder DE, Clark WH, Jr., Guerry D (1983): Dysplastic naevi and cutaneous melanoma risk. Lancet <u>1983,2</u>, 1076-1077
- 49. Kraemer KH, Lee MM, Scotto J (1984): DNA repair protects against cutaneous and internal neoplasia: evidence from xeroderma pigmentosum. Carcinogenesis <u>5</u>, 511-514
- 50. Kraemer KH, Lee MM, Scotto J (1987): Xeroderma pigmentosum. Cutaneous, ocular, and neurologic abnormalities in 830 published cases. Arch Dermatol <u>123</u>, 241-250
- 51. 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 <u>130</u>, 1018-1021
- 52. Kumar R, Hoglund L, Zhao C, Forsti 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 <u>103</u>, 671-675
- 53. Lindahl T, Wood RD (1999): Quality control by DNA repair. Science 286, 1897-1905
- 54. Malarstig A, Tenno T, Jossan S, Aberg M, Siegbahn A (2003): A quantitative real-time PCR method for tissue factor mRNA. Thromb Res <u>112</u>, 175-183
- 55. 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 J <u>13</u>, 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 <u>399</u>, 700-704
- 57. Matsui MS, DeLeo VA (1991): Longwave ultraviolet radiation and promotion of skin cancer. Cancer Cells <u>3</u>, 8-12
- 58. Mitchell DL, Nairn RS (1989): The biology of the (6-4) photoproduct. Photochem Photobiol <u>49</u>, 805-819
- 59. 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 <u>400</u>, 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 <u>364</u>, 117-123
- 61. Mu D, Sancar A (1997): Model for XPC-independent transcription-coupled repair of pyrimidine dimers in humans. J Biol Chem <u>272</u>, 7570-7573
- Mu D, Hsu DS, Sancar A (1996): Reaction mechanism of human DNA repair excision nuclease. J Biol Chem <u>271</u>, 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 <u>206</u>, 76-77
- Nelemans PJ, Groenendal H, Kiemeney 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 <u>101</u>, 252-255

- 65. Nelson HH, Kelsey KT, Mott LA, Karagas MR (2002): The XRCC1 Arg399GIn polymorphism, sunburn, and non-melanoma skin cancer: evidence of geneenvironment interaction. Cancer Res <u>62</u>, 152-155
- 66. Newton Bishop JA, Harland M, Bishop DT (1998): The genetics of melanoma: the UK experience. Clin Exp Dermatol <u>23</u>, 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 <u>3</u>, 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 U S A <u>94</u>, 3116-3121
- Nystrom K, Biller M, Grahn A, Lindh M, Larson G, Olofsson S (2004): Real time PCR for monitoring regulation of host gene expression in herpes simplex virus type 1-infected human diploid cells. J Virol Methods <u>118</u>, 83-94
- 70. Oesch F, Aulmann W, Platt KL, Doerjer G (1987): Individual differences in DNA repair capacities in man. Arch Toxicol Suppl <u>10</u>, 172-179
- Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Raymond L, Young J (1997): Cancer incidence in five continents. (IARC Sci. Publ., Volume VII); IARC Sci. Publ., Lyon 1997
- 72. Qiao Y, Spitz MR, Shen H, Guo Z, Shete S, Hedayati M, Grossman L, Mohrenweiser H, Wei Q (2002): Modulation of repair of ultraviolet damage in the host-cell reactivation assay by polymorphic XPC and XPD/ERCC2 genotypes. Carcinogenesis <u>23</u>, 295-299
- 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 <u>271</u>, 19451-19456
- 74. Reardon JT, Bessho T, Kung HC, Bolton PH, Sancar A (1997): In vitro repair of oxidative DNA damage by human nucleotide excision repair system:

possible explanation for neurodegeneration in xeroderma pigmentosum patients. Proc Natl Acad Sci U S A <u>94</u>, 9463-9468

- Runger TM (1999): Role of UVA in the pathogenesis of melanoma and nonmelanoma skin cancer. A short review. Photodermatol Photoimmunol Photomed <u>15</u>, 212-216
- Runger TM, Epe B, Moller K (1995): Repair of ultraviolet B and singlet oxygeninduced DNA damage in xeroderma pigmentosum cells. J Invest Dermatol <u>104</u>, 68-73
- 77. Sanyal S, Festa F, Sakano S, Zhang Z, Steineck G, Norming U, Wijkstrom H, Larsson P, Kumar R, Hemminki K (2004): Polymorphisms in DNA repair and metabolic genes in bladder cancer. Carcinogenesis <u>25</u>, 729-734
- Schneider TD (1997): Sequence walkers: a graphical method to display how binding proteins interact with DNA or RNA sequences. Nucleic Acids Res <u>25</u>, 4408-4415
- 79. Setlow RB, Grist E, Thompson K, Woodhead AD (1993): Wavelengths effective in induction of malignant melanoma. Proc Natl Acad Sci U S A <u>90</u>, 6666-6670
- 80. Shen H, Sturgis EM, Khan SG, Qiao Y, Shahlavi T, Eicher SA, Xu Y, Wang X, Strom SS, Spitz MR, Kraemer KH, Wei Q (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 <u>61</u>, 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 <u>58</u>, 604-608
- Stang K, Stang A, Stegmaier C, Ziegler H, Eisinger B, Stabenow R, Jockel KH (2000): Descriptive epidemiology of cutaneous malignant melanoma. Analyses of German Cancer Registry data. Stud Health Technol Inform <u>77</u>,139-142

- Sturgis EM, Zheng R, Li L, Castillo EJ, Eicher SA, Chen M, Strom SS, Spitz MR, Wei Q (2000): XPD/ERCC2 polymorphisms and risk of head and neck cancer: a case-control analysis. Carcinogenesis <u>21</u>, 2219-2223
- 84. Sugasawa K, Ng JM, Masutani C, Maekawa T, Uchida A, van der Spek PJ, Eker AP, Rademakers S, Visser C, Aboussekhra A, Wood RD, Hanaoka F, Bootsma D, Hoeijmakers JH (1997): Two human homologs of Rad23 are functionally interchangeable in complex formation and stimulation of XPC repair activity. Mol Cell Biol <u>17</u>, 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 <u>2</u>, 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) <u>1</u>, 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 <u>297</u>, 647-650
- Swift M, Chase C (1979): Cancer in families with xeroderma pigmentosum. J Natl Cancer Inst <u>62</u>, 1415-1421
- Takahashi E, Shiomi N, Shiomi T (1992): Precise localization of the excision repair gene, ERCC5, to human chromosome 13q32.3-q33.1 by direct Rbanding fluorescence in situ hybridization. Jpn J Cancer Res <u>83</u>, 1117-1119
- Tomescu D, Kavanagh G, Ha T, Campbell H, Melton DW (2001): Nucleotide excision repair gene XPD polymorphisms and genetic predisposition to melanoma. Carcinogenesis <u>22</u>, 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, Fraser MC, Goldstein AM, Elder DE, Guerry D, Organic SM (1993): Risk of melanoma and other cancers in melanoma-prone families. J Invest Dermatol <u>100</u>, 350S-355S
- 93. van Steeg SH, Kraemer KH (1999): Xeroderma pigmentosum and the role of UV-induced DNA damage in skin cancer. Mol Med Today <u>5</u>, 86-94
- 94. Vodicka P, Kumar R, Stetina R, Sanyal S, Soucek P, Haufroid V, Dusinska M, Kuricova M, Zamecnikova M, Musak L, Buchancova J, Norppa H, Hirvonen A, Vodickova L, Naccarati A, Matousu Z, Hemminki K (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
- 95. Volker M, Mone MJ, Karmakar P, van HA, Schul W, Vermeulen W, Hoeijmakers JH, van DR, van Zeeland AA, Mullenders LH (2001): Sequential assembly of the nucleotide excision repair factors in vivo. Mol Cell <u>8</u>, 213-224
- 96. Wakasugi M, Reardon JT, Sancar A (1997): The non-catalytic function of XPG protein during dual incision in human nucleotide excision repair. J Biol Chem <u>272</u>, 16030-16034
- 97. 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 U S A <u>90</u>, 1614-1618
- 98. 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 <u>104</u>, 933-936
- Wei Q, Cheng L, Hong WK, Spitz MR (1996): Reduced DNA repair capacity in lung cancer patients. Cancer Res <u>56</u>, 4103-4107
- 100. Wei Q, Lee JE, Gershenwald JE, Ross MI, Mansfield PF, Strom SS, Wang LE, Guo Z, Qiao Y, Amos CI, Spitz MR, Duvic M (2003): Repair of UV lightinduced DNA damage and risk of cutaneous malignant melanoma. J Natl Cancer Inst <u>95</u>, 308-315

- 101. Wood RD (1999): DNA damage recognition during nucleotide excision repair in mammalian cells. Biochimie <u>81</u>, 39-44
- 102. Wood RD, Mitchell M, Sgouros J, Lindahl T (2001): Human DNA repair genes. Science <u>291</u>, 1284-1289
- Wu X, Zhao H, Wei Q, Amos CI, Zhang K, Guo Z, Qiao Y, Hong WK, Spitz MR (2003): XPA polymorphism associated with reduced lung cancer risk and a modulating effect on nucleotide excision repair capacity. Carcinogenesis <u>24</u>, 505-509
- 104. Yaar M, Gilchrest BA (2001): Ageing and photoageing of keratinocytes and melanocytes. Clin Exp Dermatol <u>26</u>, 583-591
- 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 <u>98</u>, 92-98
- 106. Yuspa SH, Dlugosz AA, Cheng CK, Denning MF, Tennenbaum T, Glick AB, Weinberg WC (1994): Role of oncogenes and tumor suppressor genes in multistage carcinogenesis. J Invest Dermatol <u>103</u>, 90S-95S

# Danksagung

Für die Möglichkeit, die Arbeit in der Abteilung Dermatologie und Venerologie der Georg-August-Universität Göttingen absolvieren zu können, bedanke ich mich herzlich bei Frau Prof. Dr. Ch. Neumann.

Herrn PD. Dr. med. S. Emmert danke ich für die Bereitstellung des Themas, die hervorragende wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit, die Besprechung der Ergebnisse und die freundschaftliche Zusammenarbeit. Die Arbeitsgruppe wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) gefördert.

Frau Laspe und Frau Zachmann danke ich sehr für die Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der Experimente.

Frau Dr. rer. biol. hum. I. König und Herrn Prof. Dr. rer. nat. A. Ziegler vom Institut für Medizinische Biometrie und Statistik des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, danke ich für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Daten.

Herrn Dr. med. V. Blaschke möchte ich für die Unterstützung in der Etablierung der LightCycler Experimente danken.

Mein Dank gilt ebenso allen hier namentlich nicht-genannten Mitarbeitern des Forschungslabors der Hautklinik für die gute Zusammenarbeit.

# Lebenslauf

Am 10. Februar 1980 wurde ich, Sandra Blankenburg, als einziges Kind von Jutta Blankenburg, geb. Schwabrow, und Bernd Blankenburg, in Reinbek geboren.

Von 1986-1990 besuchte ich die Grund- und Hauptschule Nordost in Schwarzenbek. Im August 1990 wechselte ich zum Gymnasium Schwarzenbek. Das Schuljahr 1996/1997 verbrachte ich an der GlenOak Highschool in Canton, OH, USA. 1999 verließ ich das Gymnasium Schwarzenbek mit der Allgemeinen Hochschulreife.

Im Oktober 1999 begann ich das Medizinstudium an der Georg-August-Universität Göttingen. Im September 2001 legte ich erfolgreich die Ärztliche Vorprüfung ab. Im August 2002 bestand ich das 1. Staatsexamen. Im Herbst 2004 strebe ich das 2. Staatsexamen an und werde ein Tertial meines praktischen Jahres am Kantonsspital Chur in der Schweiz ableisten.

Einen Monat meiner Famulaturen absovierte ich in der Abteilung Innere Medizin des Johanniter Krankenhauses in Geesthacht. Für eine 15-tägige Famulatur besuchte ich die Abteilung Anästhesie-, Rettungs- und Intensivmedizin des Universitätsklinikums Göttingen. Einen weiteren Monat verbrachte ich in den Abteilungen Gynäkologie und Geburtshilfe sowie Kinderchirurgie des Tokai Universitätshospitals in Isehara, Japan. Eine 3-wöchige Famulatur leistete ich zudem in der Abteilung Hals-Nasen-Ohrenheilkunde im Krankenhaus Winsen an der Luhe ab. Meine Praxisfamulaturen habe ich in der radiologischen Gemeinschaftspraxis Kretsch, Klengl, Samse und Leinweber in Göttingen und der Abteilung Dermatologie und Venerologie des Universitätsklinikums Göttingen durchgeführt.