

Aus dem Institut für Humangenetik der Universität Tübingen
Abteilung Medizinische Genetik
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. O. Rieß

**Molekulargenetische Untersuchung des *NBS1*-Gens bei
Patienten mit malignen Melanomen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Henrike Stapelmann
aus
Hannover

2007

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. O. Rieß

2. Berichterstatter: Professor Dr. M. Röcken

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG	5
1.1 Erbliche Aspekte des malignen Melanoms	5
1.1.1 Die Krebsentstehung nach der Knudson-Hypothese	5
1.1.2 Familiäre Melanome	6
1.1.3 Sporadische Melanome	8
1.2 Das <i>NBS1</i> -Gen	12
1.2.1 <i>NBS1</i> -Mutationen	15
1.2.2 Klinische Auswirkung heterozygoter <i>NBS1</i> -Mutationen	18
1.2.3 Molekulargenetische Assoziationsstudie und Haplotypen-Analyse ..	18
1.3 Fragestellung der Dissertation	20
2 MATERIAL UND METHODEN	21
2.1 Analyse von <i>NBS1</i> -Exon 6 bei Melanompatienten	21
2.1.1 Patientengut	21
2.1.2 DNA-Präparation	24
2.1.3 DNA-Amplifikation mit PCR	25
2.1.4 Denaturing High Performance Liquid Chromatography	27
2.1.5 Sequenzieren	28
2.1.6 Vergleichsanalyse mittels direkter Sequenzierung	30
2.2 Screening der F222L-Sequenzvariation	32
2.2.1 Patientengut	32
2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	34
2.2.3 Primerextension mittels MassEXTEND	35
2.2.4 MALDI-TOF-Massenspektrometrie	36
2.3 Molekulargenetische Assoziationsstudie	37
2.3.1 Patientengut	37
2.3.2 Präparation der DNA-Pools und Genotypisierung	37
2.3.3 Statistische Analyse	38
2.3.4 Rekonstruktion und Analyse der Haplotypen	40
3 ERGEBNISSE	41
3.1 Patientengut	41
3.2 Sequenzvariationen in <i>NBS1</i> - Exon 6	42

3.3 Stammbaumanalyse der betroffenen Patienten	50
3.4 F222L-Analyse.....	52
3.5 Assoziationsstudie	52
4 DISKUSSION	56
4.1 Patientengut.....	56
4.2 Methodik	58
4.3 Sequenzvariationen in <i>NBS1</i> - Exon 6.....	60
4.4 Assoziation zwischen <i>NBS1</i> und der Melanomerkrankung.....	66
4.5 Schlussfolgerungen	68
4.6 Ausblick	68
5 ZUSAMMENFASSUNG.....	72
6 ANHANG	74
6.1 Literaturverzeichnis.....	74
6.2 Abbildungsverzeichnis	84
6.3 Tabellenverzeichnis	84
6.4 Herstellerverzeichnis.....	85
6.5 Danksagung.....	87
6.6 Lebenslauf	88

1 EINLEITUNG

1.1 Erbliche Aspekte des malignen Melanoms

Das maligne Melanom ist ein hochgradig bösartiger Tumor, dessen Inzidenz in den letzten Jahren stark zugenommen hat. Als Ursachen dieser multifaktoriellen Erkrankung werden neben UV-Strahlung und dem gehäuften Auftreten von atypischen melanozytären Nävi auch genetische Faktoren diskutiert (*Bataille, 2003*).

In ca. 10% der Melanomfälle liegt eine familiäre Häufung vor, wobei hier mindestens ein erst- oder zweitgradiger Verwandter an einem Melanom erkrankt ist (*Hayward, 2003; Meyer et al., 2006*). Die Vererbung des familiären Melanoms folgt vermutlich einem autosomal-dominanten Erbgang mit inkompletter Penetranz (*Rivers, 1996*). Die Entwicklung eines erblich bedingten Melanoms steht außerdem häufig in Zusammenhang mit dem atypischen Nävussyndrom AMS (atypical mole syndrome) (*Bataille et al., 1996*). Individuen mit 10 oder mehr atypischen Nävi haben ein 12-fach erhöhtes Melanomrisiko (*Tucker et al., 1997*). Die familiäre Häufung von Melanomen in Kombination mit klinisch atypischen Nävi wurde als FAMMM (familial atypical multiple mole and melanoma) beschrieben (*Lynch et al., 1978*). Mitglieder von FAMMM-Familien mit atypischen Nävi haben ein Risiko von fast 100%, im Laufe ihres Lebens an einem malignen Melanom zu erkranken (*Halpern und Altman, 1999*).

Bei der Erforschung der erblichen Aspekte der Melanomerkrankung konzentriert sich die Suche insbesondere auf Kandidatengene, die mit der Melanomentwicklung assoziiert sein könnten. Dabei stehen Tumorsuppressorgene, Protoonkogene und Gene, die an der DNA-Reparatur, der Zellzykluskontrolle und der Apoptose beteiligt sind, im Vordergrund.

1.1.1 Die Krebsentstehung nach der Knudson-Hypothese

Bei der Krebsentstehung spielen neben somatischen Mutationen auch Keimbahnmutationen eine Rolle, die eine Prädisposition für die Erkrankung verursachen und weitervererbt werden können (*Knudson, 2001*). Alfred Knudson konnte bei der Untersuchung der erblich bedingten Variante des

Retinoblastoms das *Rb*-Gen als erstes Tumorsuppressorgen identifizieren. Er formulierte die Vermutung, dass zwei aufeinander folgende Mutationen in einem Gen notwendig sind, um eine Tumorgenese auszulösen. Seine „**Zwei-Treffer-Hypothese**“ besagt, dass als „erster Treffer“ eine Mutation in der Keimbahn oder in einer Vorläuferzelle der späteren Tumorzellen erfolgt und so zunächst eine Prädisposition hervorgerufen wird. Der „zweite Treffer“ findet in der somatischen Zelle statt, die folglich maligne entartet und zur Tumorentstehung führt (Knudson, 2000; Knudson, 2001).

Bei Krankheiten und Syndromen, die mit einer Krebsdisposition einhergehen, wie z. B. Neurofibromatose Typ I, familiäres Retinoblastom, familiärer Brustkrebs und Li-Fraumeni-Syndrom, kommt diese Hypothese zur Anwendung. Die Neurofibromatose Typ I (NF1) ist die häufigste genetisch bedingte Erbkrankheit, die mit einer Krebsprädisposition einhergeht. Sie wird autosomal dominant vererbt und konnte mit Mutationen in dem *NF1*-Gen (MIM# 162200) in Zusammenhang gebracht werden. Patienten mit NF1 entwickeln häufig Neurofibrome, die mit einem Risiko von 5% maligne entarten können und betroffene Kinder haben ein 400-fach erhöhtes Risiko an der seltenen juvenilen, myelomononukleären Leukämie (JMML) zu erkranken. Diese Prädisposition wird damit erklärt, dass eine konstitutionelle Mutation in einem Allel des Tumorsuppressorgens *NF1* besteht. Dadurch ist das Risiko erhöht, dass das zweite Allel durch eine somatische Mutation ebenfalls inaktiviert wird und es zur Tumorentstehung kommt (Quelle:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispmim.cgi?id=162200>).

Bei der Entstehung des malignen Melanoms- vor allem bei den familiären Formen und den früh auftretenden, multiplen Melanomen - wäre es folglich ebenfalls denkbar, dass als erster Treffer eine vererbte Keimbahnmutation in einem Allel eines Tumorsuppressorgens oder eines Protoonkogens vorliegt und als zweiter Treffer eine somatische Mutation des zweiten Allels (z.B. aufgrund von UV-Bestrahlung) in einem Melanozyten zur Pathogenese führt.

1.1.2 Familiäre Melanome

Die erblichen Ursachen des familiären Melanoms sind bislang nicht vollständig geklärt. Es konnten zwei Gene mit dieser Erkrankung in

Zusammenhang gebracht werden. In 25-40% der Fälle bestehen Keimbahnmutationen im *CDKN2a*-Gen und in drei Fällen konnte ein Zusammenhang mit Mutationen im *CDK4*-Gen aufgezeigt werden. Diese Gene gelten daher heute als Melanomprädispositionsgene mit hoher Penetranz (Hayward, 2003).

CDKN2a: (Cyclin dependent kinase inhibitor 2a; MIM# 600160)

CDKN2a befindet sich auf Genlokus 9q21 und kodiert die beiden Splice-Varianten p16^{INK4a} und p14^{ARF} (Nobori et al., 1994; Kamb et al., 1994; Quelle et al., 1995).

p16 bindet an die Cyclin D-abhängigen Kinasen CDK4 und CDK6 und hemmt so die Phosphorylierung des Retinoblastomproteins (Rb), welches am Übergang der G1- in die S-Phase des Zellzyklus aktiv ist. p14 interagiert mit HDM2, um das p53-Protein im Zellkern zu stabilisieren und ist so am Zellzyklusstop beteiligt (Rizos et al., 2001). Aufgrund der Funktionen dieser beiden bekannten *CDKN2a*-Produkte wird das Gen in die Klasse der Onkogene eingeordnet.

CDKN2a-Keimbahnmutationen wurden erstmals 1994 in 13/18 Melanomfamilien identifiziert, wodurch gezeigt werden konnte, dass *CDKN2a* mit dem malignen Melanom segregiert (Hussussian et al., 1994). Zahlreiche nachfolgende Studien bestätigten diesen Zusammenhang und es wird vermutet, dass *CDKN2a* hier als Tumorsuppressorgen im Sinne der Knudson-Hypothese an der Melanomprädisposition beteiligt ist. Insgesamt bestehen jedoch nur bei ca. 40% der auf 9q21 gekoppelten Melanomfamilien Keimbahnmutationen in *CDKN2a*. Dies deutet darauf hin, dass sich in diesem Chromosomenabschnitt entweder ein oder mehrere weitere Gene befinden, die an der Entstehung des familiären Melanoms beteiligt sind, oder dass Mutationen in den nicht-kodierenden Abschnitten von *CDKN2a* für eine Melanomerkkrankung prädisponieren (Liu et al., 1997).

In zahlreichen Studien wurde deutlich, dass Pankreaskrebs auffällig häufig in FAMMM-Familien auftritt, die Keimbahnmutationen im *CDKN2*-Gen aufweisen (Greene, 1999; Klein et al., 2002; Goldstein et al., 1995; Parker et al., 2003).

CDK4: (Cyclin dependent kinase 4; MIM# 123829)

Das CDK4-Gen befindet sich auf Genlokus 12q13 und kodiert die Cyclin D-abhängige Kinase 4, die die Phosphorylierung des Retinoblastomproteins (Rb) und in der Folge die DNA-Replikation katalysiert. Insgesamt wurden in drei nicht-verwandten Melanomfamilien, die keine *CDKN2a*-Mutationen aufwiesen, Nukleotidsubstitutionen in CDK4 identifiziert. Da diese Mutationen einen spezifischen Effekt auf die CDK4- Bindungsstelle für p16 hat und die mutierte CDK4-Kinase resistent gegen die p16-Inhibition ist, scheint das so modifizierte Gen alle Eigenschaften eines dominanten Onkogens zu besitzen (*Zuo et al., 1996* ; *Soufir et al., 1998*).

1.1.3 Sporadische Melanome

Neben umweltbedingten Risikofaktoren - hier gilt insbesondere UV-Bestrahlung als ein gesicherter Hauptfaktor für ein erhöhtes Melanomrisiko (*Hayward, 2003*) - wird weiterhin nach genetischen Faktoren für die sporadischen Melanome gesucht, die mit ca. 90% den Großteil der Melanome darstellen. Dabei sind unter anderem solche Gene von Interesse, die die prädisponierenden Faktoren des Hautkrebses, wie z.B. den Hauttyp, beeinflussen.

In Assoziationsstudien konnte nachgewiesen werden, dass neben dem *CDKN2A*-Gen, das auch bei den familiären Melanomen eine Rolle spielt, bestimmte Polymorphismen in den Genen *XRCC3*, *BRAF*, *MC1R*, *EGF*, *GSTM1*, *CYP2D6* und *VDR* mit einem erhöhten Melanomrisiko in Zusammenhang stehen.

CDKN2A: (cyclin dependent kinase inhibitor 2a; MIM# 600160)

Bei Patienten mit sporadischen multiplen primären Melanomen ohne familiäre Häufung wurden Keimbahnmutationen im *CDKN2A*-Gen mit einer Häufigkeit von 9-15% identifiziert (*Auroy et al., 2001*; *Monzon et al., 1998*). Weiterhin konnte LOH im Bereich des *CDKN2a*-Gens in Tumormaterial von sporadischen Melanomen mit einer Frequenz von 24% identifiziert werden (*Fujimoto et al., 1999*).

XRCC3: (x-ray repair cross-complementing protein 3; MIM# 600675)

Das *XRCC3*-Gen ist auf Chromosom 14q32.3 kartiert und sein Genprodukt ist ein Enzym im DNA-Reparationsmechanismus. Bei 125 Individuen mit sporadischen Melanomen wurde eine signifikante Assoziation zwischen dem Polymorphismus T/C auf Position 18067 in Exon 7 des *XRCC3*-Gens und der Melanomentstehung festgestellt ($P= 0,004$) (*Winsey et al., 2000*).

BRAF: (V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1; MIM# 164757)

BRAF befindet sich auf dem Genlokus 7q34 und kodiert eine Serin/Threonin-Kinase. In einer genomweiten Assoziationsstudie mit 266 weiblichen und 236 männlichen Melanompatienten kaukasischer Herkunft konnten 6 SNPs und 2 Haplotypen in diesem Gen identifiziert werden, die mit einem erhöhten Melanomrisiko bei männlichen Patienten assoziiert waren ($P= 0,045$). Es konnte gezeigt werden, dass *BRAF* und seine genetischen Varianten ein höheres Risiko für die Entwicklung maligner Melanome darstellt, als alle bisher bekannten „Melanom-Gene“ zusammen. Der Anteil von *CDKN2A* an allen Melanom-Risikofaktoren - umweltbedingte und erblich bedingte Risikofaktoren - beträgt beispielsweise 0,2%, der von *BRAF* in der süddeutschen Population ca. 4% (*Meyer et al., 2003*) und 1,6% bei Patienten mit australischer Abstammung (*James et al., 2005*).

MC1R: (Melanocortin1-Rezeptor; MIM# 155555)

Im Fall des *MC1R*-Gens wird die indirekte Beteiligung an einer Prädisposition zur Melanomentwicklung diskutiert, da es den G-Protein-Rezeptor für das α -Melanozyten-stimulierende Hormon (α -MSH) kodiert und so bei der Determination des Haut- und Haartyps eine Rolle spielt (*van der Velden et al., 2001; Jackson et al., 2005*). Einige Polymorphismen in *MC1R* (wie z.B. Asp84Glu (*Kennedy et al., 2001; Valverde et al., 1996*), Arg151Cys, Arg160Trp und Asp294His (*Palmer et al., 2000*)) konnten mit einem erhöhten Melanomrisiko in Zusammenhang gebracht werden, wobei die Risikoerhöhung zwischen dem Faktor 2,2 und 4,8 schwankte. Arg151Cys, Arg160Trp und Asp294His sind an der Ausprägung einer roten Haarfarbe beteiligt, die durch die *MC1R*-Varianten prädisponierte Melanomentstehung scheint jedoch von Hauttyp und Haarfarbe unabhängig zu sein. Weiterhin agieren bestimmte

MC1R-Varianten als modifizierende Allele, die die Penetranz einer CDKN2a-Deletion von 50% auf 84% erhöhen (Box et al., 2001). Ein funktioneller Zusammenhang zwischen diesen beiden Genen konnte aber nicht nachgewiesen werden und MC1R scheint im Gegensatz zu CDKN2a keinen funktionellen Einfluss auf ein erhöhtes Melanomrisiko zu haben.

EGF: (Epidermal growth factor; MIM# 131530)

Dieses Gen befindet sich auf 4q25 und kodiert den Wachstumsfaktor EGF (epidermal **g**rowth **f**actor), der eine Rolle in der Mitogenese, Wundheilung und Hautproliferation spielt. In einer Studie mit 135 Melanompatienten und 99 Kontrollen wurde ein SNP identifiziert (G/A an Position 61 des EGF-Gens), der eine vermehrte Produktion des Wachstumsfaktors EGF verursacht und signifikant mit der Melanomentstehung assoziiert ist. Dabei war das Risiko um das 2,7-fache erhöht (Shahbazi et al., 2002).

GSTM1: (Glutathione S-transferase, Mu1; MIM# 138350)

Das GSTM1-Gen ist eine mutierte Variante des GST-Gens, das auf 1p13.3 lokalisiert. Sein Produkt ist ein Isoenzym der Glutathion-S-Transferase, das an Entgiftungsreaktionen insbesondere von karzinogenen Substanzen beteiligt ist. GSTM1 wird dominant vererbt und hat eine Prävalenz von 60% in der kaukasischen Population. Personen, die diese Genvariante nicht haben, weisen ein erhöhtes Krebsrisiko auf. Eine vergleichende Untersuchung von 197 Melanompatienten und 147 Kontrollpersonen ergab, dass unter Melanompatienten im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich mehr Personen mit fehlendem GSTM1-Isoenzym zu finden waren (58% zu 40,9%; $P= 0,002$). Statistische Analysen ergaben weiterhin, dass Personen denen diese Genvariante fehlt, ein 2-fach erhöhtes Risiko haben, an einem malignen Melanom zu erkranken (Lafuente et al., 1995).

CYP2D6: (Cytochrome P450; MIM# 124030)

Die Enzyme der Cytochrom P450-Familie sind an diversen Stoffwechselfvorgängen beteiligt, in denen einerseits lipophile Substanzen unschädlich gemacht, andererseits aber auch zu karzinogenen Formen aktiviert werden können. Auf dem Locus der Cytochrom P450 Debrisoquine Hydroxylase (CYP2D6), der sich auf 22q13.1 befindet, sind die drei inaktivierenden

Polymorphismen Val92Met, Asp294His und Asp84Glu bekannt. In einer Studie mit 333 Melanompatienten und 467 Kontrollen war die Frequenz dieser Polymorphismen in der Melanomgruppe mit 28% gegenüber den Kontrollen mit 21% ($P= 0,039$) signifikant erhöht (*Strange et al., 1999*).

VDR: (Vitamin D receptor; MIM# 601769)

Es wird vermutet, dass das VDR-Gen, das einen Vitamin D-Rezeptor kodiert, an der Melanomprädisposition beteiligt sein könnte, da der Rezeptorligand Calcitriol antiproliferative und differenzierungsfördernde Wirkungen auf Melanozyten und Melanomzellen hat. Von dem VDR-Gen, das sich auf Genlokus 12q12-q14 befindet, sind Polymorphismen bekannt, die eine erhöhte Calcitriolkonzentrationen im Serum verursachen. In einer Studie mit 316 Melanompatienten und 108 Kontrollen war der *Fok-RFLP*-Polymorphismus in Exon 2, der ein neues Startcodon in VDR verursacht, bei Melanompatienten signifikant erhöht (39,9% zu 31,5%; $P= 0,029$) (*Hutchinson et al., 2000; Halsall et al., 2004*).

Bei der Melanomentstehung könnten darüber hinaus Wechselwirkungen zwischen umweltbedingten und genetisch bedingten Faktoren eine Rolle spielen. Da ionisierende Strahlung bekanntlich DNA-Doppelstrangbrüche (DNA-DSB) verursacht (*Tauchi et al., 2002*), wäre es naheliegend, dass Melanompatienten Defekte im DNA-Reparatur-Mechanismus aufweisen. UV-induzierte Schäden in somatischen Zellen könnten gemäß der „Zwei-Treffer-Hypothese“ nach Knudson nicht mehr repariert werden und würden so zur Melanomgenese führen. Zu den Tumorsuppressorgenen, die an diesem Reparaturmechanismus beteiligt sind, gehört unter anderen das *NBS1*-Gen. Dieses Gen ist außerdem von besonderem Interesse, da bekannt ist, dass homozygote Mutationen innerhalb dieses Gens u. a. mit Hautveränderungen und einem erhöhten Risiko für bestimmte Krebserkrankungen assoziiert sind (siehe Kapitel 1.2).

1.2 Das *NBS1*-Gen

Das *NBS1*-Gen ist in homozygot mutierten Zustand für die Ausprägung des so genannten Nijmegen Breakage Syndroms (NBS) verantwortlich. Hierbei handelt es sich um eine autosomal-rezessiv vererbte Krankheit, die zu der Gruppe der so genannten „Chromosomenbruchsindrome“ gehört. NBS ist mit ca. 1:95.000 Lebendgeburten selten und kommt vor allem in osteuropäischen Populationen vor (*Varon et al., 2000*). NBS wurde erstmals 1981 beschrieben (*Weemaes et al., 1981*) und weltweit konnten seither über 130 Fälle des Nijmegen Breakage Syndroms identifiziert werden, davon 68 in Polen und 26 in der Tschechischen Republik (*Chrzanowska und Janniger, 2006*).

Die klinischen Charakteristika von NBS sind Mikrozephalie, Wachstums- und Entwicklungsstörungen, typische „vogelähnliche“ Gesichtszüge, Pigmentstörungen der Haut (sog. „Café-au-lait“-Flecken) und Teleangiektasien, Immuninsuffizienz, Gonadendysgenese, Infertilität, häufig rezidivierende Infektionen des Atmungstraktes und eine Prädisposition für die frühe Entwicklung maligner Tumore (1.-34. Lebensjahr). Die häufigsten Tumore sind dabei B-Zell-Lymphome und Leukämien; vereinzelt wurden auch Gliome, Medulloblastome und Rhabdomyosarkome entdeckt (*The Int. Nijmegen Breakage Syndrome Study Group, 2000*). Die Chromosomeninstabilität ist für NBS charakteristisch und Chromatidbrüche sowie chromosomale Reunionsfiguren werden häufig in somatischen Zellen beobachtet. Die T-Lymphozyten von NBS-Patienten weisen vermehrt Translokationen und Inversionen zwischen den Chromosomen 7 und 14 auf, wobei die Bruchstellen in den Genloki für Immunglobuline und T-Zell-Rezeptoren liegen und diese folglich in ihrer Funktion deutlich eingeschränkt sind. Besonders bedeutsam im Zusammenhang mit der vorliegenden Melanomstudie ist die Tatsache, dass NBS-Zellen 3-5 Mal sensibler auf ionisierende Strahlung reagieren als gesunde Zellen und dass hier nach ionisierender Bestrahlung so genannte RDS (radio resistant DNA synthesis) stattfindet. Diese ungehinderte DNA-Synthese trotz vorhandener DNA-Doppelstrangbrüche könnte die Ursache für das erhöhte

Krebsrisiko bei NBS-Patienten sein (*Digweed und Sperling, 2003; Jongmans et al., 1997; van der Burgt et al., 1996*).

Durch Positionsklonierung und gesamt-genomische Kopplungsanalysen von NBS-Familien konnte das *NBS1*-Gen (MIM# 602667) auf dem q-Arm von Chromosom 8 identifiziert werden (*Reis et al., 2001; Saar et al., 1997; Cerosaletti et al., 1998*). Es besteht aus 16 Exons und überspannt mitsamt den Introns ca. 50 kb auf Chromosom 8q21. Die gesamte cDNA-Sequenz besteht aus 4.386 bp und enthält ein offenes Leseraster (ORF = open reading frame) von 2.277 bp. Durch alternative Polyadenylierung an den Positionen 2440 und 4386 der cDNA entstehen zwei unterschiedliche mRNAs von 2,4 kb und 4,4 kb Länge.

Nibrin, das Produkt des *NBS1*-Gens, ist ein Protein aus 754 Aminosäuren mit der Größe von 95 kDa (Abbildung 1). Die Aminosäuresequenz von Nibrin enthält drei funktionelle Regionen: den N-Terminus (1.- 196. AS), die zentrale Region (278.- 343. AS) und den C-Terminus (666.- 693. AS). Im N-terminalen Bereich befinden sich eine FHA (forkhead-associated)-Domäne (24.-108. AS) und eine BRCT (breast cancer carboxy-terminal)-Domäne (108.-196. AS). Beide Domänen sind für Protein-Protein-Wechselwirkungen verantwortlich und wurden häufig in Proteinen gefunden, die am DNA-Reparationsmechanismus beteiligt sind (*Matsuura et al., 1998; Varon et al., 1998*).

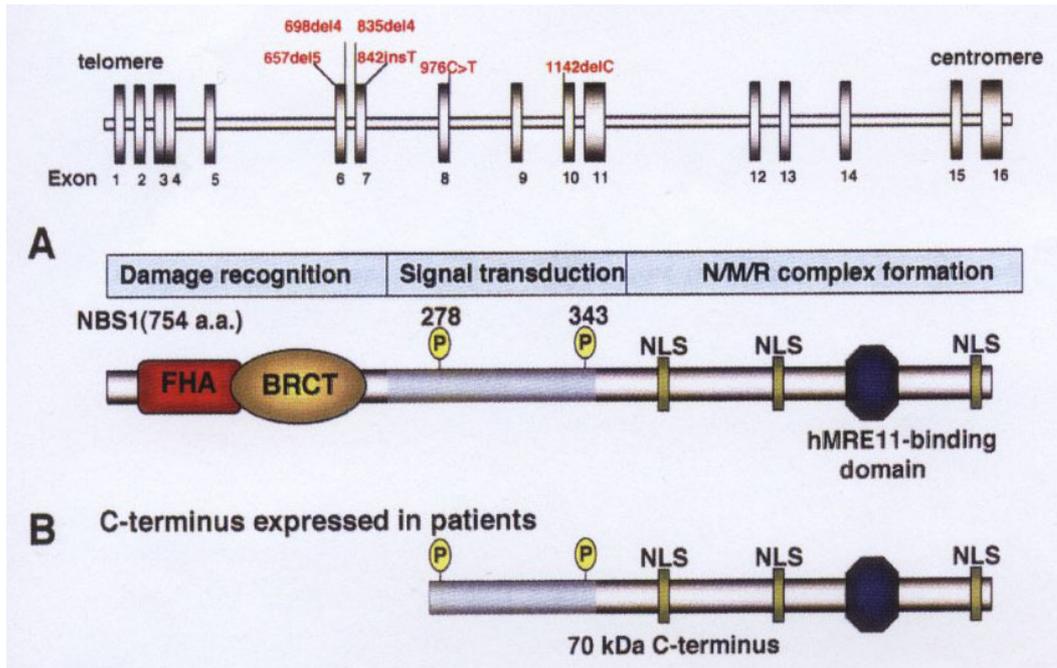


Abbildung 1: Struktur von Nibrin

Aus *Tauchi et al., 2002*. **(A)** Schematische Darstellung der *NBS1*-Struktur. Die Mutationen in Zellen von NBS-Patienten sind rot markiert. Sie treten gehäuft in den Exons 6-10 auf. Die blauen Kästen stellen die drei funktionellen Regionen von *NBS1* dar: 1. Erkennung einer DNA-Schädigung durch Bindung der FHA/BRCT-Region des N-Terminus an ein Histon, 2. Signalübermittlung durch Phosphorylierung von Serinen in der zentralen Region und 3. Komplexbildung mit den Proteinen Mre11 und Rad50 durch Bindung am C-Terminus. **(B)** Der C-Terminus in der typischen Ausbildung bei NBS-Patienten. Das C-terminale 70kDa-Protein wird durch interne Translationsinduktion produziert und ist bei NBS-Patienten nur schwach ausgebildet. Dieses verkürzte Polypeptid ist für die Lebensfähigkeit der Zellen notwendig.

Zahlreiche Studien und Funktionsanalysen konnten die Rolle von Nibrin als Bestandteil des Mre11/Rad50/Nibrin-Komplexes bei der Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität unter anderem durch seine Beteiligung am DNA-Reparaturmechanismus zeigen: Erkennung von DNA-Doppelstrangbrüchen (*Carney et al., 1998; Nelms et al., 1998; Maser et al., 2001*), Zellzykluskontrolle durch Interaktion mit p53 am G1-Kontrollpunkt (*Jongmans et al., 1997; Kastan et al., 1991*) und Signalübertragung am S-Phase-Kontrollpunkt (*Wu et al., 2000; Zhao et al., 2000; Gatei et al., 2000*). Aufgrund der bislang bekannten Funktionen von Nibrin wird *NBS1* zu der Gruppe der Tumorsuppressorgene gezählt.

1.2.1 NBS1-Mutationen

Die Tabellen 1 und 2 geben eine Übersicht über die bislang bekannten Sequenzveränderungen im NBS1-Gen.

Polymorphismus	Exon/Intron	Referenz
L34L (G102A)	2	<i>K. Cerosaletti, unveröffentlicht</i>
E185Q (G553C)	5	<i>(Varon et al., 1998)</i>
D399D (T1197C)	10	"
P672P (A2016G)	9	"
IVS5+9T/C	IVS5	<i>K. Cerosaletti, unveröffentlicht</i>
IVS5+ 51delT	IVS5	<i>K. Cerosaletti, unveröffentlicht</i>
IVS9+ 18C/T	IVS9	<i>K. Cerosaletti, unveröffentlicht</i>
IVS12+ 7A/G	IVS12	<i>K. Cerosaletti, unveröffentlicht</i>

Tabelle 1: Normvarianten im NBS1-Gen

Quelle: http://www.benaroyaresearch.org/investigators/concannon_patrick/nbs.htm

Variationstyp	Exon	Referenz
Nukleotidsubstitutionen		
S93L (C278T)	3	<i>(Varon et al., 1998)</i>
D95N (G283A)	3	"
I171V (A511G)	5	"
R215W (C643T)	6	<i>(Varon et al., 2001)</i>
V210F (G628T)	6	<i>(Cerosaletti et al., 2002)</i>
P266L (C797T)	7	"
Q326X (C976T)	8	<i>(Varon et al., 1998)</i>
Y363X (C1089A)	9	<i>(Gennery et al., 2004; New et al., 2005)</i>
Kleine Deletionen		
681delT	6	<i>(Resnick et al., 2002)</i>
657del5bp (657-661delACAAA)	6	<i>(Varon et al., 1998)</i>
698del4 (698-701delAACA)	6	"
835del4 (835-838delCAGA)	7	"
1142delC	10	"
Kleine Insertionen		
842insT (842-843T)	7	<i>(Varon et al., 1998)</i>
Grosse Deletionen		
900del25	8	<i>(Maraschio et al., 2001)</i>

Tabelle 2: Pathologische Varianten im NBS1-Gen

Quellen: <http://uwcmml1s.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/search/9598211.html> (erweitert);
Human Gene Mutation Database entry for NBS1

Alle Deletionen bzw. die Insertion verursachen Leserasterverschiebungen, die zu einem vorzeitigen Stoppcodon führen und so eine Genverkürzung bewirken (Varon *et al.*, 2001).

DNA-Analysen von nicht miteinander verwandten NBS-Patienten ergaben, dass ca. 90% der Erkrankten (46/51) die 5bp-Deletion 657-661delACAAA (657del5bp) homozygot aufweisen. Die Deletion verursacht eine Leserasterverschiebung an Position 657 der cDNA (AS-Position 219), wodurch es zu einem Stoppcodon an Position 732 der cDNA kommt. Dieses Stoppcodon bewirkt einen Abbruch der Aminosäuresequenz an Position 241. Da der Großteil der betroffenen Patienten tschechischer oder polnischer Abstammung ist, wird vermutet, dass es sich hierbei um eine „founder mutation“ slawischen Ursprungs handelt. Die Häufigkeit dieser Mutation beträgt in der slawischen Population 1/177 (Varon *et al.*, 2000). Eine Studie der tschechischen Bevölkerung ergab eine Frequenz der 657del5-Mutation von 1/106 (95% Konfidenzintervall (95%CI) = 1/331 zu 1/46) (Drabek *et al.*, 2002). In der deutschen Bevölkerung beträgt die Heterozygotenfrequenz der 657del5-Mutation 1/866 (95%CI = 1/ 34.376 zu 1/156) (Carlomagno *et al.*, 1999).

NBS1-Mutationen im Zusammenhang mit Krebserkrankungen

Eine signifikante Häufung von heterozygot vorliegenden NBS1-Mutationen konnte bei Patienten mit akuter lymphoblastischer Leukämie (ALL) festgestellt werden. Dabei wurden in einer Studie mit Knochenmarkszellen in 7/47 Fällen (14,5%) vier verschiedene somatische Nukleotidsubstitutionen (S93L, D95N, I171V, R215W) im NBS1-Gen (Varon *et al.*, 2001) gefunden, in einer anderen Untersuchung konnte die 657del5-Mutation in 3/270 ALL-Patienten und 2/212 Patienten mit NHL identifiziert werden ($P < 0,05$) (Chrzanowska *et al.*, 2006). Eine Kontrollstudie zu der Veröffentlichung von Varon *et al.* konnte den Zusammenhang jedoch nicht bestätigen. Hier wurden Blutproben von 231 Kindern mit primärer Leukämie, 90 Kindern mit primären Lymphomen und 332 Kontrollpersonen auf Mutationen in NBS1 hin untersucht. Die D95N-Substitution trat bei einer Kontrollperson auf und die R215W-Variante

wurde als Keimbahnmutation bei 4 Leukämiepatienten, einem Lymphompatienten und 2 Kontrollpersonen gefunden. Durch die Relation zu den Kontrollen lag hier jedoch keine statistische Relevanz vor und die Autoren folgerten, dass *NBS1*-Mutationen, wenn überhaupt, nur in einem geringen Ausmaß an der Entstehung von ALL und Lymphomen beteiligt sind (*Taylor et al., 2003*). Untersuchungen von Brustkrebspatientinnen ergaben ebenfalls unterschiedliche Resultate. So wurde in einer Studie mit 477 deutschen Brustkrebspatientinnen keine Assoziation gefunden (*Carlomagno et al., 1999*), während die Untersuchung von 80 Patientinnen mit slawischer Herkunft ergab, dass die 657del5-Mutation in Exon 6 von *NBS1* in einer geringen, aber statistisch signifikanten Anzahl der Fälle ($3/80 = 3,75\%$; $P = 0,037$) mit der Entstehung von Brustkrebs assoziiert ist (*Gorski et al., 2003*). Diese Aussage wird auch in einer russischen Studie getroffen, in der die 657del5-Mutation bei $2/173$ (1,16%) beidseitigen Brustkrebsfällen und $5/700$ (0,71%) ($P = 0,046$) einseitig betroffenen Brustkrebspatientinnen gefunden wurde (*Buslov et al., 2005*).

In einer Untersuchung mit 361 Prostatakarzinompatienten wurde die 657del5-Mutation bei $5/56$ (9%) familiären Fällen ($OR = 16$; $P < 0,0001$), bei $7/305$ (2,2%) sporadischen Fällen ($OR = 3,9$; $P = 0,01$) und bei $9/1500$ (0,6%) Kontrollpersonen heterozygot gefunden ($OR = 4,5$; $P = 0,002$). LOH-Analysen von Tumorzellen von 8 Mutationsträgern ergaben weiterhin den Verlust des *NBS1*-Wildtypallels in 7 dieser Fälle im Vergleich zu 1 von 9 *NBS1*-mutationsfreien Prostata Tumoren ($P = 0,003$), woraus geschlossen wird, dass die *NBS1*-„founder mutation“ mit der Entstehung von Prostatakarzinomen signifikant assoziiert ist (*Cybulski et al., 2004*).

In einer 2003 veröffentlichten Studie wurde die Frequenz der 657del5-Mutation bei 80 Melanompatienten und 530 Kontrollpersonen mit Hilfe von PCR und direkter Sequenzierung ermittelt. Dabei waren $2/80$ Melanompatienten (2,5%) und $3/530$ (0,6%) ($P = 0,262$) in der Kontrollpersonen heterozygot für die *NBS1*-Grundmutation. Weiterführende LOH- und Haplotypenanalysen ergaben einen Verlust des Wildtypallels in den Tumorzellen, so dass in diesen Fällen die 657del5-Mutation an der Melanomentstehung im Sinne der „Zwei-Treffer-

Hypothese“ nach Knudson ursächlich beteiligt sein könnte (*Debniak et al., 2003*). Zu Non-Hodgkin-Lymphomen (*Stanulla et al., 2000*) und Kolorektalkarzinomen (*Varon et al., 2002*) besteht nach derzeitigem Kenntnisstand keine Assoziation.

1.2.2 Klinische Auswirkung heterozygoter *NBS1*-Mutationen

Eng verbunden mit der Frage, welche Rolle *NBS1* als Tumorsuppressorgen bei der Krebsentstehung spielt, ist die Frage, ob heterozygote Mutationsträger ein erhöhtes Krebsrisiko haben. Es konnte gezeigt werden, dass auch Zellen von Patienten mit heterozygoten Mutationen in *NBS1* eine erhöhte Chromosomeninstabilität aufweisen, die sich in gehäuften Brüchen und Rearrangements von Chromosomen zeigt. Weiterhin ergaben densitometrische Untersuchungen und Immunpräzipitationsanalysen, dass das Genprodukt Nibrin hier quantitativ reduziert und in seiner Struktur verändert ist (*Tanzanella et al., 2003*). Die klinische Beobachtung einer hohen Inzidenz von hämatologischen und soliden Tumoren bei nahen Verwandten von NBS-Patienten deutet darauf hin, dass *NBS1*-Mutationen im heterozygoten Zustand ein erhöhtes Krebsrisiko verursachen könnten (*Seemanova, 1990*). Bei insgesamt 1683 polnischen Krebspatienten wurde mit 16 heterozygoten Trägern der 657del5-Mutation eine signifikante Häufung ($P= 0,042$) festgestellt (*Steffen et al., 2004*).

Heterozygot Betroffene könnten folglich z.B. überempfindlich auf diagnostische Röntgenstrahlung oder auf eine Strahlentherapie reagieren und bei Kenntnis ihrer Veranlagung könnte z. B. die Indikation zur radiologischen Diagnostik strenger gestellt oder die Therapieplanung verändert werden.

1.2.3 Molekulargenetische Assoziationsstudie und Haplotypen-Analyse

Bei **molekulargenetischen Assoziationsstudien** handelt es sich um retrospektive Studien, bei denen Patientenproben mit einer alters- und geschlechtsgleichen Kontrollgruppe aus der Bevölkerung verglichen werden, um einen Zusammenhang zwischen einer Erkrankung und einem bestimmten genetischen Merkmal zu untersuchen. Analysiert werden diejenigen Kandidatengene, deren Produkte an der Entstehung der Krankheit beteiligt sein

könnten. Dabei werden polymorphe Marker verwendet, die in der Nähe des zu untersuchenden Gens oder direkt innerhalb desselben liegen. Kann eine Assoziation festgestellt werden, so deutet dies auf die Existenz einer ursächlichen Sequenzveränderung in der Genregion hin, die mit dem polymorphen Marker im Kopplungsungleichgewicht liegt. Molekulargenetische Assoziationsstudien können z.B. mit SNPs (single nucleotide polymorphism) durchgeführt werden (*Kruglyak, 1999*). SNPs sind Einzelnukleotidaustausche im menschlichen Genom, die mit einer Häufigkeit von mindestens 1% in der Bevölkerung vorkommen. Meistens existieren an diesen Positionen im Genom zwei Allele. Mit speziellen Computerprogrammen können DNA-Sequenzen aus verschiedenen Datenbanken verglichen und dabei potentielle SNPs identifiziert werden. Das National Center for Biotechnology Information (NCBI) verfügt über eine SNP-Datenbank (dbSNP), die aktuell im Jahre 2006 etwa 10 Millionen menschliche SNPs enthält (*Wheeler et al., 2006*).

Weitere Informationen über eine mögliche Assoziation zwischen einem bestimmten Genlokus und einer Erkrankung bzw. einem Phänotyp liefern **Haplotypenanalysen**. Dabei wird untersucht oder rekonstruiert welche Kombinationen von Polymorphismen auf jedem der beiden Chromosomenabschnitte der zu testenden Person vorhanden sind. Sollen Haplotypendaten experimentell bestimmt werden, benötigt man neben dem betreffenden Individuum weitere Familienangehörige, am besten die Eltern. Alternativ können Haplotypen auch aus genotypischen Daten rekonstruiert werden. Häufig wird hierfür das Computerprogramm PHASE verwendet, das mittlerweile in mehreren Entwicklungsversionen vorliegt. Das Programm ermittelt durch umfangreiche und zeitaufwendige Abschätzungen, welche Haplotypen in einer Gruppe von untersuchten Individuen am wahrscheinlichsten aufgetreten waren und ordnet die Haplotypen jedem Individuum zu. Danach kann durch statistische Auswertungen festgestellt werden, ob bestimmte Haplotypen mit einem Phänotyp (Erkrankung) assoziiert sind und welches Risiko für die Entstehung der Erkrankung vermittelt wird (*Stephens et al., 2001*).

1.3 Fragestellung der Dissertation

Als häufige Ursachen der Tumorgenese werden Mutationen in der Keimbahn, in somatischen Zellen oder als Kombination der beiden Fälle diskutiert. Dabei spielen insbesondere die Tumorsuppressorgene eine Rolle, die dem zellulären Reparaturmechanismus von Chromosomendefekten zugrunde liegen und von großer Bedeutung für die Stabilität des Genoms sind. Liegen in diesen Genen Sequenzveränderung oder Mutationen vor, so könnte in der Folge die DNA-Reparatur bzw. Apoptose nur unzureichend stattfinden und es könnte zur Tumorentstehung kommen. Da das *NBS1*-Gen als Tumorsuppressorgen an diesem Mechanismus beteiligt ist, ist es bei der Suche nach erblichen Aspekten von Krebserkrankungen von Interesse. Die Tatsache, dass auf der einen Seite UV-Strahlung in der Melanomgenese und Strahlung insgesamt bei der Krebsentstehung eine wichtige Rolle spielen und andererseits NBS-Patienten eine erhöhte Strahlensensibilität und Hautveränderungen aufweisen, führte zu der Frage, ob ein Zusammenhang zwischen der Melanomentstehung und Defekten im *NBS1*-Gen besteht.

Ziel dieser Studie war es, eine mögliche Beteiligung des *NBS1*-Gens an der Entstehung der Melanomerkrankung zu untersuchen. Dazu wurde zunächst in einer Studienpopulation von 376 Melanompatienten das Exon 6 des *NBS1*-Gens auf Sequenzveränderungen, insbesondere auf die häufige 657del5-Mutation hin, analysiert. Der zweite Teil der Studie befasste sich mit der in diesem Kollektiv neu entdeckten Sequenzvariation F222L und hatte das Ziel durch ein Screening von 629 Melanompatienten und 590 Kontrollen diese weiter zu klassifizieren. Eine umfassende molekulargenetische Assoziationsstudie lieferte anschließend weitere Informationen über den Zusammenhang zwischen dem *NBS1*-Gen und der Melanomerkrankung. Dabei wurde eine Studienpopulationen aus 632 Patienten und 615 Kontrollpersonen sowohl in Form von DNA-Pools als auch mittels individueller Genotypisierung auf mögliche Assoziationen hin untersucht. Die Rekonstruktion und Analyse der Haplotypen stellte den abschließenden Teil dieser Studie dar.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Analyse von *NBS1*-Exon 6 bei Melanompatienten

Die Studie wurde nach positiver Begutachtung der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen durchgeführt (Projektnummer: 99/2001). Von allen Studienteilnehmern lagen schriftliche Einverständniserklärungen vor.

Von den Studienteilnehmern wurden detaillierte Anamnesedaten erhoben und mit dem Programm Microsoft-Excel erfasst, Stammbaumanalysen durchgeführt und Blutproben entnommen. Nach der Extraktion der DNA aus den Blutproben habe ich die Amplifikation von Exon 6 des *NBS1*-Gens mittels PCR (polymerase chain reaction) und die molekulargenetische Analyse mittels DHPLC (denaturing high performance liquid chromatography) durchgeführt. Die auffälligen Proben habe ich erneut mit PCR vervielfältigt und direkt sequenziert.

Durch eine vom deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) in Heidelberg durchgeführte Analyse mittels direkter Sequenzierung von *NBS1*-Exon 6 aller dieser Patienten konnte ich weiterhin ein Methodenvergleich zwischen DHPLC und direkter Sequenzierung durchführen. Genaue Angaben zu den verwendeten Produkten und Herstellern sind dem Herstellerverzeichnis in Kapitel 6.4 zu entnehmen.

2.1.1 Patientengut

Von 376 Melanompatienten mit histologischer Diagnosebestätigung, die im Rahmen der Melanom-Nachsorge-Sprechstunde an der Universitäts-Hautklinik der Eberhard Karls Universität Tübingen für diese Studie rekrutiert wurden, wurden folgende anamnestische und diagnostische Daten erhoben und ausgewertet: Name, Geschlecht, Geburtsdatum, Alter bei Diagnosestellung(en) der Melanomerkrankung(en), Anzahl diagnostizierter Melanome, Angaben zu Sonnenbränden in der Vorgeschichte, Lokalisation des Melanoms bzw. der Melanome, Tumordicke, histologische Klassifikation, TNM-Klassifikation, Art und Anzahl weiterer Krebserkrankungen, Art und Anzahl von

Krebserkrankungen bei erst- und zweitgradigen Verwandten. Das Patientengut setzte sich aus 169 Frauen (45%) und 207 Männern (55%) zusammen. Das Durchschnittsalter bei Diagnosestellung lag mit einem Spektrum von 7 bis 83 Jahren bei 50,1 Jahren. Bei Patienten mit mehr als einem primären Melanom wurde das Alter zum Zeitpunkt der Diagnose der ersten Melanomerkrankung für die Alterskalkulation herangezogen. Die Tumordicke lag im Mittel bei 1,78 mm (mit einem Spektrum von „Melanom in situ“- hier wurde ein Wert von 0,01 mm für die Kalkulation genommen - bis zu einer maximalen Dicke von 15,0 mm). Bei 47 von 376 Patienten (12,5%) konnten keine Tumordaten zur Auswertung erfasst werden. Die wichtigsten Daten zu dieser Studienpopulation sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Anzahl Melanompatienten	gesamt	376
	weiblich	169
	männlich	207
Alter	Minimum (in Jahren)	7
	Maximum (in Jahren)	83
	Mittelwert (in Jahren)	50,1
Erkrankungsalter < 40 Jahre	weiblich (n [%])	58 [34,3]
	männlich (n [%])	43 [20,8]
	Daten verfügbar (n [%])	376 [100]
Tumordicke	Minimum (mm)	In situ (0,01)
	Maximum (mm)	15
	Mittelwert (mm)	1,78
	Daten verfügbar (n [%])	329 [87,5]
Histologie	Superfiziell spreizendes Melanom (n [%])	281 [71,9]
	Noduläres Melanom (n [%])	69 [17,7]
	Acro-lentiginöses Melanom (n [%])	15 [3,8]
	Lentigo Maligna Melanoma (n [%])	15 [3,8]
	Andere (n [%])	11 [2,8]
	Daten verfügbar (n [%])	391 [86,8]
Lokalisation	Extremitäten (n [%])	206 [48,5]
	davon bei weibl. Patienten	130 [63,1]
	davon bei männl. Patienten	76 [36,9]
	Körperstamm (n [%])	183 [43,0]
	davon bei weibl. Patienten	58 [31,7]
	davon bei männl. Patienten	125 [68,3]
	Kopf (n [%])	36 [8,5]
	Daten verfügbar (n [%])	425 [94,4]

Tabelle 3: Anamnesedaten der Melanompatienten

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Softwareprogramm Excel sowie mit einem online verfügbaren Pearson's χ^2 -Test (Freiheitsgrad $m=1$) (verfügbar unter: <http://statpages.org/ctab2x2.html>).

Die Stammbaumanalysen der 376 Melanompatienten führten zu einer Unterteilung des Patientenguts in vier Gruppen:

Gruppe A: Familiäre Fälle mit mindestens einem erstgradigen Verwandten, der ebenfalls an einem Melanom oder an Pankreaskrebs erkrankt ist (FM)

→ **51 Fälle**

Bem: Diese Definition wurde gewählt, da das maligne Melanom und Pankreaskrebs eine gemeinsame genetische Basis zu haben scheinen (vgl. Kapitel 1.1.2)

Gruppe B: Patienten mit multiplen Melanomen ohne familiäre Häufung (MM)

→ **30 Fälle**

Gruppe C: Patienten mit mindestens einem erstgradigen Verwandten, der an einem anderen Krebs erkrankt ist (FDRC = first degree relative with cancer)

→ **116 Fälle**

Gruppe D: Patienten, die keine dieser Merkmale aufweisen und somit an sporadischen Melanomen leiden (SM) → **179 Fälle**

Damit ergab sich folgende prozentuale Gruppenverteilung, die in Abbildung 2 dargestellt ist: Gruppe A: 13,56 %, Gruppe B: 7,98 %, Gruppe C: 30,85 %, Gruppe D: 47,61 %. Für die Auswertung wurde weiterhin ein Erkrankungsalter unter 40 Jahren (Subgruppe E) berücksichtigt (siehe Kapitel 3.1)

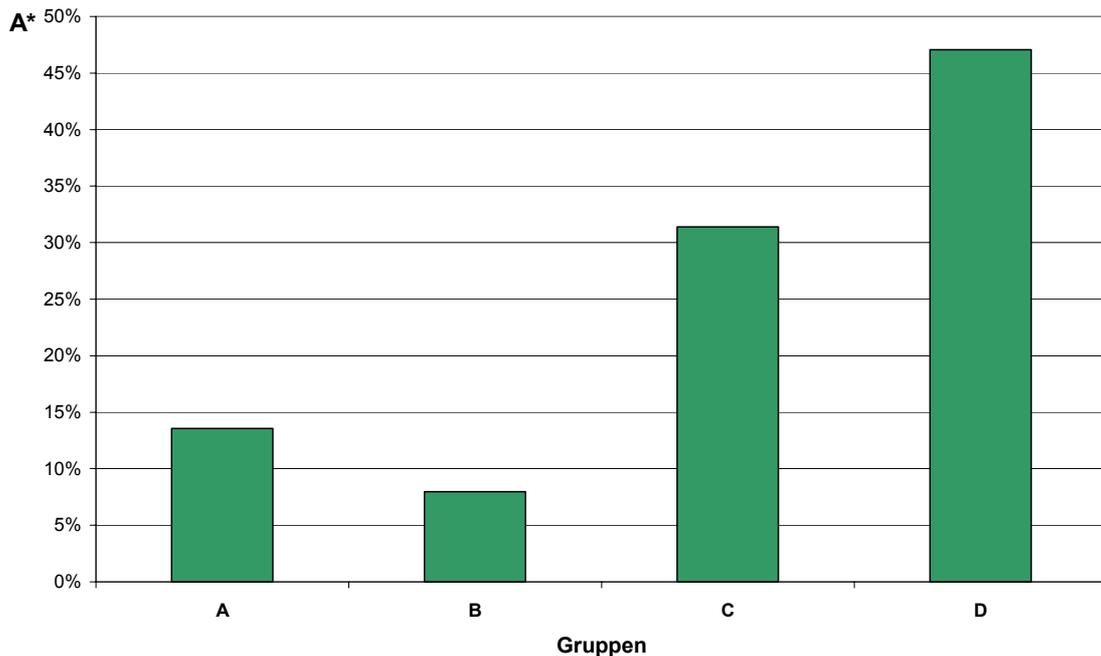


Abbildung 2: Patientengruppen in %

A*= Prozentuale Anteile an der Gesamtpopulation

2.1.2 DNA-Präparation

Jedem Patienten wurden 2x 9ml peripheres Blut abgenommen (Probe A und Probe B) und jede Probe erhielt zur Anonymisierung eine DNA-Nummer. Um die DNA aus den Leukozyten zu extrahieren, erfolgte zunächst die Lyse der Erythrozyten durch Inkubation mit 35 ml RBCL (red blood cell lysis) für 10 Minuten bei Raumtemperatur und Zentrifugieren bei 4000 U/Min und 15°C ebenfalls für 10 Minuten. Das entstandene Leukozytenpellet wurde mit 6ml WBCL (white blood cell lysis) bei 37°C im Rüttler inkubiert und nach Zugabe von 2ml PPL (protein precipitation lysis) bei 4000 U/Min und 25°C für 10 Minuten zentrifugiert, um so die DNA von den restlichen Proteinen zu trennen. Im Anschluss daran erfolgte die Zugabe von 7 ml 100% Isopropanol, wodurch sich die DNA ausfällen ließ. Zum Lösen der DNA nach dem Trocknen wurde 1ml TE-Puffer zugegeben. Um sicherzustellen, dass diese Methode kontinuierlich genügend DNA für die nachfolgenden Analysen lieferte, wurde die Konzentration der gelösten DNA von jeder Probe photometrisch bestimmt. Dabei erwies es sich als günstig, eine Verdünnung der gelösten DNA 1:100 mit destilliertem Wasser (AMPUWA®) herzustellen. Schließlich wurden für die

weiteren Analysen DNA-Verdünnungen mit einer Konzentration von **50 ng/μl** hergestellt.

2.1.3 DNA-Amplifikation mit PCR

Die PCR ist eine schnelle und effiziente Methode zur Amplifikation von DNA bzw. speziellen DNA-Abschnitten. Ausgehend von synthetischen Oligonukleotiden (Primern), die an die denaturierte, einzelsträngige DNA hybridisieren, synthetisiert eine hitzestabile DNA-Polymerase einen neuen DNA-Doppelstrang. Durch die Wahl von zwei gegenläufig orientierten Oligonukleotid-Primern (forward-Primer und reverse-Primer) kann gezielt eine bestimmte DNA-Sequenz vervielfältigt werden. Für die sequenzspezifische Hybridisierung der Primer muss eine geeignete Temperatur (Annealing-Temperatur) gewählt werden, die mit der Formel **$(G+C) \times 4 + (A+T) \times 2 - 5^{\circ}\text{C}$** berechnet wird. Dabei stehen die Buchstaben A, T, G und C für die Anzahl der entsprechenden Nukleotide in der betreffenden DNA-Sequenz. Beim *NBS1*-Exon 6 beträgt die Annealing-Temperatur **53,5°C**.

Praktisches Vorgehen und verwendete Materialien

Für die PCR habe ich 50 μl-Ansätze aus 1 μl DNA-Verdünnung der Patienten-DNA (50 ng/μl) und 49 μl Mastermix hergestellt. Das Mastermix setzte sich dabei wie folgt zusammen: 1 μl je Primer (forward und reverse; 10 pmol); 0,5 μl je dNTP (100 mM); 0,25 μl Taq-Polymerase; 5 μl Puffer; 41,25 μl Aqua dest.

Dabei kamen folgende Materialien zur Anwendung:

Primer: NBS- Ex6-F: 5` - CAG ATA GTC ACT CCG TTT ACA-3`

NBS- Ex6-R-VII: 5` - CAA AAT GAA ATA GGT TAA CA- 3`

dNTP: (desoxy-nucleotid-tri-phosphate)

dNTP-Lösung der Firma Rapidozym für DNA-Polymerisationsreaktionen und DNA-Labeling-Reaktionen mit den Nukleotiden dATP, dTTP, dGTP und dCTP in einer Konzentration von 100mM dNTP Lösung (25 μmol von jedem dNTP).

Taq-Polymerase:

Die GenTherm™ Taq-Polymerase wurde in einer Konzentration von 50 Units/ μl eingesetzt.

NH₄-Taq-Puffer:

160mM (NH₄)₂SO₄ + 500mM Tris-HCL (pH 8,8 bei 25°C) + 15 mM MgCl₂ + 0,1% Tween®20.

Ich habe eine „Touchdown“-PCR gemäß dem in Tabelle 4 dargestellten PCR-Protokoll durchgeführt.

	Temperatur	Zeit (Min)	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	5'	1
Touchdown-PCR			
Denaturierung	95 °C	15''	10 X
Annealing	63,5 °C ↓	30''	
Extension	72 °C	30''	
PCR			
Denaturierung	95 °C	20''	30 X
Annealing	53.5 °C	30''	
Extension	72 °C	30''	
Finale Extension	72 °C	7'	1

Tabelle 4: PCR-Protokoll

Kontrolle der PCR-Produkte

Die Kontrolle der 291bp-Produkte erfolgte mittels Gelelektrophorese in einem 2%igen Agarosegel. Dazu habe ich aus jedem PCR-Ansatz eine 5 µl-Probe entnommen, mit 5 µl Stoppmix (EDTA 10mM + Orange G + Saccharose 40% + H₂O) vermischt, in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und unter einer UV-Lampe beurteilt und fotografiert.

a) Herstellung eines 2%igen Agarosegels:

4g Agarose-Pulver + 200ml TBE-Puffer

Agarose-Pulver: Gel-Temperatur für eine 2%ige Lösung: 36- 42 °C

Gelstärke eines 2%igen Gels: > 999,9 g/ cm²

TBE-Puffer: 540 g Tris + 257 g Borsäure + 46,5 g EDTA

Nachdem ich das Pulver in der Mikrowelle bei 360 W für 5 Minuten im TBE-Puffer aufgelöst hatte, habe ich es mit 50µl Ethidiumbromid versetzt und in 2x24-Kämme gegossen.

Jeweils in die vorderste Kammer habe ich 5 µl Kb(=Kilobasen)-Leiter pipettiert, die restlichen Kammern wurden mit je 10 µl Kontrollmischung gefüllt. Die Gelelektrophorese lief 15 Minuten bei 180V.

2.1.4 Denaturing High Performance Liquid Chromatography

Das Transgenomic WAVE™ DNA Fragment Analysis System ist ein automatisiertes Verfahren für die Analyse von DNA-Fragmenten und zur Identifikation von DNA-Sequenzveränderungen. Das Prinzip der Analyse von Nukleinsäuren mit dem WAVE™ System basiert auf der Flüssigkeitschromatographie. Dabei werden die zu analysierenden DNA-Fragmente in einem speziellen Puffergemisch durch das System geleitet und bilden so die mobile Phase. Die Auftrennung der DNA-Fragmente nach ihrer Größe erfolgt durch die unterschiedliche Adsorption zwischen der Flüssigkeit und der DNASep®-Säule (stationäre Phase).

Zunächst wird ein Mindestvolumen von 2µl aus der DNA-Probe (PCR-Produkte) entnommen und in die mobile Phase des WAVE™ Systems injiziert. Die Pufferzusammensetzung wird entsprechend der DNA-Fragmentlänge bzw. der Basenpaarzusammensetzung durch die WAVEmaker3.4®-Software automatisch berechnet und aus den Puffern A und B zusammengemischt. Eine Hochdruckpumpe leitet die flüssige Phase vom Pufferreservoir ausgehend durch die DNASep®-Säule zu einem UV-Detektor. Die analogen Signale werden in digitale Werte umgewandelt und in Chromatogrammen, z.B. als Peak-Abfolge, dargestellt.

Praktisches Vorgehen:

Vor dem Start der DHPLC habe ich die PCR-Produkte bei 95°C für 5 Minuten denaturiert. Nach dem Zentrifugieren habe ich die Proben im entsprechend programmierten Transgenomic WAVE™-Gerät unter den in Tabelle 5 dargestellten Bedingungen analysiert.

Testläufe mit Wildtyp und Positivkontrollen von 657del5 und R215W bei 53°, 54°C, 55°C und 56°C ergaben eine optimale Temperatur von 54°C und 55°C. Die Probenanalysen führte ich daher jeweils sowohl bei 54°C als auch bei 55°C durch.

Materialien:

Puffer A: 50 ml Triethylammoniumacetat (TEAA)
250 µl Acetonitril (100 %ig)
949,75 ml Millipore-Wasser

Puffer B: 50 ml TEAA
250 ml Acetonitril (100 %ig)
700 ml Millipore-Wasser

Puffer C: Acetonitril (8 %ig)

Puffer D: Acetonitril (75 %ig)

	Zeit (Min.)	Puffer A (%)	Puffer B (%)
Laden	0.0	1	49
Startgradient	0.5	46	54
Stopgradient	5.0	37	63
Start Waschen	5.1	0	100
Stop Waschen	5.6	0	100
Start Equilibrieren	5.7	51	49
Stop Equilibrieren	6.8	51	49

Tabelle 5: DHPLC-Bedingungen für NBS1-Exon 6

DNA-Sequenz:

CAGATAGTCACTCCGTTTACAATTTAATAGCAAACATAGTAGTATATAATTA
GAATATACTTTAATTATTTTTACAGTTTTTACCCACCTCTTGATGAACCATCT
ATTGGAAGTAAAAATGTTGATCTGTCAGGACGGCAGGAAAGAAAACAAATC
TTCAAAGGGAAAACATTTATATTTTTGAATGCCAAACAGGTAATTATGTTAT
AAGCTAAATTTTCCTAAAGAATACATTACAAACTAGGATACATTATTA ACTCT
TATCAGTAGTTGTTAACGTATTTCAATTTG

2.1.5 Sequenzieren

Ziel der DNA-Sequenzierung ist es, die genaue Nukleotidabfolge in einem DNA-Fragment zu bestimmen. Dabei wird die DNA zunächst durch Denaturierung in die einzelsträngige Form überführt und anschließend in einer Sequenzier-PCR mit einem spezifischen Sequenzierprimerpaar amplifiziert. Der Sequenzieransatz enthält neben den Primern und der Polymerase alle vier 2'-Desoxynucleotidtriphosphate (dNTP) und zusätzlich fluoreszenz-farb-markierte

2`-3`-Dideoxynucleotidphosphate (ddNTP) der vier Nukleotide (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTT). Bei der PCR akzeptiert die Polymerase sowohl die dNTP als auch die ddNTP als Substrat zur Kettenverlängerung. Wird ein ddNTP eingebaut, so stoppt die Reaktion danach (Kettenabbruch), da aufgrund der fehlenden 3`-Hydroxygruppe kein weiteres Nukleotid angefügt werden kann. Das Verhältnis von dNTP zu ddNTP muss dabei so gewählt werden, dass ein einzelner Strang eine gewisse Länge erreichen kann, bevor ein ddNTP eingebaut wird. Auf diese Weise entsteht eine Mischung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Kettenlänge, deren 5`-Ende jeweils von einem Sequenzierprimer gebildet wird und deren 3`-Ende aus einem der vier markierten ddNTP besteht. Anschließend werden die DNA-Fragmente in einer Gelelektrophorese entsprechend ihrer Größe aufgetrennt und mit Hilfe eines Chromatogramms sichtbar gemacht. Mit einer speziellen Software kann die DNA-Sequenz aus dem Chromatogramm direkt ermittelt werden.

In der vorliegenden Studie habe ich jene Proben, die bei der DHPLC-Analyse auffällig waren, direkt sequenziert. Hierfür habe ich je 1µl aus den entsprechenden DNA-Verdünnungen entnommen, gereinigt, gemäß einem speziellen Sequenzier-PCR-Protokoll (Tabelle 6) erneut amplifiziert, erneut gereinigt und mit dem ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer der Firma Applied Biosystems analysiert.

	Temperatur	Zeit (Min)	Zyklen
Denaturierung	96 °C	10``	25 X
Annealing	52 °C	15``	
Extension	60 °C	4`	

Tabelle 6: PCR-Protokoll für die Sequenzierung

Praktisches Vorgehen

Nach Reinigung der PCR-Produkte mit Hilfe von Microcon® PCR-Filtern habe ich die Herstellung der Sequenzier-PCR-Ansätze wie folgt durchgeführt:

2,5 µl H₂O + 0,5 µl Primer (forward oder reverse) + 1,0 µl „Big dye“* +
2,0 µl gereinigte PCR-Produkte

*„Big dye“: (= SnaPshot Multiplex Ready Reaction Mix)

- AmpliTaq[®] DNA-Polymerase
- fluoreszenzmarkierte ddNTPs (dATP (dR6G, grün), dCTP (dTAMRA[™], schwarz), dGTP (DR110, blau), dTTP (dROX[™],rot)
- Reaktionspuffer

Zur Reinigung der Seq-PCR-Produkte habe ich eine Ethanol-fällung durchgeführt. Dazu habe ich 100µl Rezipitationsmix (4 ml EDTA + 500 µl Natriumacetat + 45,5 ml Ethanol) zu den Seq-PCR-Produkten gegeben, diese Mischung für 30 Minuten bei 3000 U/Minute zentrifugiert und der Überstand abgegossen.

Anschließend wurden 200µl 70 %iges Ethanol zugeben, diese Mischung erneut für 8 Minuten bei 3000 U/Minuten zentrifugiert, der Überstand entfernt und die Proben getrocknet. Die gereinigten Seq-PCR-Produkte habe ich je nach Konzentration der Produkte auf ein Endvolumen von 20 µl verdünnt (meist 1:10-Verdünnung) und auf 96-Well-Platten pipettiert.

Zur Vorbereitung der Proben für die Sequenzierung im ABI PRISM[®] 3100 Genetic Analyzer habe ich eine Mischung aus 0,5 µl SnapShot Produkten + 9 µl Hi-Di formamide + 0,5 µl GeneScan[™] 120 LIZ[™] size standard hergestellt. Bei dem GeneScan[™]120 LIZ[™] size standard handelt es sich um ein spezielles Primer-Kit, das in Kombination mit dem SnapShot Multiplex Kit die Qualität der Probenanalyse sichert. Die Analyse der Proben im ABI PRISM[®] 3100 Sequenzer erfolgte bei 10kV für 5 Sekunden, die digitale Datenanalyse erfolgte mit der GeneScan Analysis Software Version 3.5 und GeneScan[™] 120 LIZ[™] size standard analysis parameter files.

2.1.6 Vergleichsanalyse mittels direkter Sequenzierung

Die nachfolgend beschriebenen Analysen wurden im DKFZ in Heidelberg durchgeführt. Die Daten wurden der Autorin zu Vergleichs- und Publikationszwecken zur Verfügung gestellt.

Primer: NBS- Ex6-F-01: 5'-GAG TGT CAG ATA GTC ACT CCG -3'

NBS- Ex6-R-01 : 5'-TCA CAC TTT TAC ACA AAA TCC -3'

11 µl-Ansätze für Standard-PCR-Amplifikation:

10 ng genomische DNA; 1x PCR-Puffer; 1,5 mM MgCl₂; 0,11 µM dNTP-Mischung (Invitrogen, Paisley, UK); 0,15 µM jedes Primers (MWG Biotech AG, Ebersberg, Germany); 0,4 U PlatinumTaq DNA polymerase (Invitrogen).

Die PCR wurde in dem Gerät GeneAmp PCR System 9700 Thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, USA) gemäß dem in Tabelle 7 aufgeführten „Touchdown“-Protokoll durchgeführt.

	Temperatur	Zeit (Min)	Zyklen
Initiale Denaturierung	94°C	2'	1
Denaturierung	94 °C	30''	5 X
Annealing	64°C	20''	
Extension	72 °C	30''	
Denaturierung	94 °C	30''	4 X
Annealing	62°C	20''	
Extension	72 °C	30''	
Denaturierung	94 °C	30''	4 X
Annealing	60°C	20''	
Extension	72 °C	30''	
Denaturierung	94 °C	25''	6 X
Annealing	58°C	20''	
Extension	72 °C	30''	
Denaturierung	94 °C	25''	33 X
Annealing	56°C	20''	
Extension	72 °C	30''	
Finale Extension	72 °C	4'	1

Tabelle 7: PCR-Protokoll für direkte Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde, wie von Frank et al. beschrieben (Frank et al., 2005), unter Verwendung eines BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) mit einem 10 µl-Ansatz aus vorbehandelten PCR-Produkten (30 Min. bei 37°C und 15 Min. bei 85°C mit 0,75 µl ExoSapIT®, Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) und Sequenzierprimern (*NBS1-*

Ex6-F-01 und NBS1-Ex6-R-01) nach dem in Tabelle 8 angegebenen Protokoll durchgeführt.

	Temperatur	Zeit (Min)	Zyklen
Initiale Denaturierung	94 °C	2`	1
Denaturierung	96 °C	30``	27 X
Annealing	58 °C	10``	
Extension	60 °C	4`	

Tabelle 8: Sequenzierprotokoll

Die Sequenzierprodukte wurden mit 2-Propanol präzipitiert, mit 75 % Ethanol gewaschen, in 25 µl H₂O wieder gelöst und anschließend mit einem ABI Prism 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems) untersucht. Die Analyse der Sequenzierdaten erfolgte mit der Sequence Analysis software von Applied Biosystems und der DNASTar Lasergene Software (DNASTar Inc., Madison, USA).

2.2 Screening der F222L-Sequenzvariation

Zur Anwendung kam eine von der Firma Sequenom (San Diego, CA, USA) entwickelte Genotypisierungs-Technologie mit einem ultrahohen Durchsatz, die im Wesentlichen auf den automatisierten Analyseschritten PCR, sequenzspezifische Primer-Extensionsreaktion, MALDI-TOF-Massenspektrometrie und Software-unterstützter Auswertung der Spektren zur Identifizierung der Genotypen beruht. Die oben genannten Arbeitsschritte wurden von der Firma Sequenom an deren Hauptsitz in San Diego, Californien, durchgeführt.

2.2.1 Patientengut

Das Patientenkollektiv bestand aus 335 weiblichen und 297 männlichen Melanompatienten mit einem Durchschnittsalter von 51,7 bzw. 54,9 Jahren. Für alle teilnehmenden Melanompatienten lag ein histologischer Nachweis der Erkrankung vor. Sie wurden im Rahmen des Melanom-Nachsorge-Programmes der Hautklinik des Tübinger Universitätsklinikums akquiriert. Die Kontrollgruppe wurde an der Poliklinik der selben Klinik rekrutiert und setzte sich aus 615 nicht-

verwandten Individuen zusammen, bei denen zum Zeitpunkt der Untersuchung keinerlei Krebserkrankung diagnostiziert war. Es handelte sich dabei um 310 Frauen und 305 Männern mit einem Durchschnittsalter von 45,6 bzw. 45,7 Jahren. Das Alter bei Diagnosestellung rangierte in beiden Gruppen von 14 bis 87 Jahre. Weitere Daten zur Studienpopulation sind Tabellen 9 zu entnehmen.

		Patienten	Kontrollen
Anzahl der Individuen	gesamt	632	615
	weiblich	335	310
	männlich	297	305
Alter	Minimum (in Jahren)	12	14
	Maximum (in Jahren)	87	87
	Mittelwert (in Jahren)	50.39	45.68
Erkrankungsalter < 40 Jahre	weiblich (n [%])	102 [30,4]	
	männlich (n [%])	59 [19,8]	
	Daten verfügbar (n [%])	623 [98,6]	615 [100,0]
Abstammung	Beide Elternteile deutscher Herkunft (n [%])	502 [79,4]	451 [73,3]
	>= 1 Elternteil nicht deutscher Herkunft, aber europäisch (n [%])	86 [13,6]	79 [12,8]
	>= 1 Elternteil nicht europäischer Herkunft (n [%])	44 [7,0]	85 [13,8]
	Daten verfügbar (n [%])	623 [100,0]	615 [100,0]
Tumordicke	Minimum	in situ	
	Maximum (mm)	10	
	Mittelwert (mm)	1,79	
	Daten verfügbar (n [%])	576 [91,1]	
Histologie	Superfiziell spreizendes Melanom (n [%])	371 [63,1]	
	Noduläres Melanom (n [%])	100 [17,0]	
	Acro-lentiginöses Melanom (n [%])	35 [6,0]	
	Lentigo Maligna Melanoma (n [%])	22 [3,7]	
	Andere (n [%])	60 [10,2]	
	Daten verfügbar (n [%])	588 [93,0]	
Lokalisation	Extremitäten (n [%])	271 [48,6]	
	davon bei weibl. Patienten	187 [69,0]	
	davon bei männl. Patienten	84 [30,9]	
	Körperstamm (n [%])	219 [39,2]	
	davon bei weibl. Patienten	87 [39,7]	
	davon bei männl. Patienten	132 [60,3]	
	Kopf (n [%])	50 [9,0]	
	Andere (n [%])	18 [3,2]	
Daten verfügbar (n [%])	558 [88,3]		

Tabelle 9: Populationsdaten der F222L-Studie

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Softwareprogramm Excel sowie mit einem online verfügbaren Pearson's χ^2 -Test (Freiheitsgrad $m=1$) (verfügbar unter: <http://statpages.org/ctab2x2.html>).

2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zunächst wurde die DNA aus 5-9ml EDTA-Venenblut isoliert und gereinigt (PUREGENE[®] DNA Purification Kit). Die Bestimmung der genomischen DNA-Konzentration erfolgte mit Hilfe von Fluoroskan Ascent[®] (Thermo Lab-systems) (Aktivierung 485 nm, Abstrahlung 538 nm) mit PicoGreen[®] Reagenzien (Quant-iT[™] PicoGreen[®] dsDNA Assay Kit) anhand des Herstellerprotokolls. Anschließend wurde die DNA auf eine Standardkonzentration von 5 ng/ μ l verdünnt. Alle Assays wurden unter standardisierten PCR-Konditionen durchgeführt.

Primerdesign:

Mit dem Programm Spectrodesigner wurden die PCR Primer erstellt, die den SNP, hier F222L, flankieren und Produkte von 80-120 bp Länge erzeugten. Die PCR Primer mussten dabei mindestens 10 bp vom SNP entfernt sein und bestimmte Kompositionskriterien erfüllten: %G+C 40-70%, Mischung aus allen 4 Basen, Verteilung der Basen im Primer. Angestrebte Schmelztemperatur war 60°C. Die Auswahl des Extensionsprimers erfolgte so, dass er genau neben dem SNP zum Liegen kam und die Extension über den SNP exakte Extensionsprodukte erzeugte. Die angestrebte Schmelztemperatur war 53°C. Alle Primer mussten daraufhin überprüft werden, dass sie nur einmal im Genom binden und nicht miteinander interagieren. Der PCR Primer, der den Strang komplementär zum Extensionsprimer erzeugte, wurde zusätzlich mit einer Universalsequenz versehen, die später den Einbau eines Biotinmoleküls ermöglichte.

Für F222L kamen folgende Primer (5`-3`) zum Einsatz:

PCR Primer 1: AACATAATTACCTGTTTGGC

PCR Primer 2: AAAAATGTTGATCTGTCAGG

Extensionsprimer : CAAAAATATAAATGTTTTCCCTTTGA

2,5 ng genomische DNA, 0,1 Units Taq-Polymerase (HotStarTaq™ Qiagen), 20 µmol von jedem dNTP, 2,5 pmol des nicht-biotinylierten, genspezifischen PCR Primers Nr. 1, 2 pmol des genspezifischen PCR Primers Nr. 2 und 10 pmol eines biotinylierten Universalsequenz-Primers (5'-bio-AGA ACC CAT GCG GCA GCA AGG-3') wurden gemäß dem in Tabelle 10 dargestellten PCR-Profil amplifiziert.

	Temperatur	Zeit (Min)	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	15`	1
Denaturierung	95 °C	20``	45 X
Annealing	56°C	30``	
Extension	72 °C	30``	
Finale Extension	72 °C	3`	1

Tabelle 10: PCR-Protokoll für F222L

Anschließend erfolgte die Immobilisation der PCR Produkte über den Biotinrest an Streptavidin-beschichteten paramagnetischen Beads (DynaL, Oslo). Zur Denaturierung des Doppelstranges wurden 50 µl von 0,1 M NaOH bei Raumtemperatur zugegeben. Nach Entfernung der NaOH Lösung und Neutralisation mit 10 mM TrisHCl Lösung wurden die Beads mit den einzelsträngigen PCR Produkten für die Primerverlängerung durch MassEXTEND Reaktion verwendet (*Jurinke et al., 2002*).

2.2.3 Primerextension mittels MassEXTEND

Ziel der MassEXTEND-Reaktionen ist es, allelspezifische Produkte zu erzeugen. Der assayspezifische anti-sense-Extensionsprimer wurde dem einzelsträngigen Template zugegeben. Er hybridisierte neben dem zu genotypisierenden SNP und wurde mit Deoxynukleotidtriphosphaten und einer DNA-Polymerase verlängert, bis es durch den Einbau eines Dideoxynukleotidtriphosphates zum Abbruch der DNA-Synthese kam. Die Primer-Extensionreaktionen erfolgten in der vorliegenden Studie durch Triple-Terminator-Mix. Dieser Terminationsmix ermöglichte die Verlängerung der Primers oder den Abbruch des Stranges. Die letzte Reaktion von 15 µl umfasste 1 Einheit

Thermosequenzase (Thermo Sequenzase™II, Amersham Biosciences), 50 µM des Terminatoren-Mixes und 10 pmol assay-spezifische MassEXTEND Primers. Die Extensionsreaktion wurde gemäß dem in Tabelle 11 dargestellten Protokoll durchgeführt.

	Temperatur	Zeit (Min)	Zyklen
Initiale Denaturierung	80 °C	30''	1
Extension	45 °C	15''	3
Finale Extension	72 °C	1'	1

Tabelle 11: Protokoll der Primerextension mittels MassEXTEND

Nach Reinigung der Extensionsprodukte mit Polystyren-Divinylbenzen-Sulfonsäure-Harz (Clean Resin, SEQUENOM) wurden 15 nl jeder Probe mit Hilfe einer piezoelektrischen Pipettiervorrichtung (SpectroPOINT™ Spotting Dispenser, SEQUENOM) auf einen Silizium Chip mit 384 Elementen (SpectroCHIP®Bioarray, SEQUENOM) aufgebracht. Die Produkte bilden hier homogene Kristalle mit der Matrix (3-Hydroxy-Picolin-Säure; 3-HPA), die aus niedermolekularen organischen Molekülen besteht und die ultraviolette Strahlung stark absorbiert.

2.2.4 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Mit der Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight-Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS) kann das exakte Molekulargewicht einer DNA-Probe gemessen werden. Das MassARRAY Massenspektrometer (Bruker-SEQUENOM) besteht aus einer Ionenquelle, einem Massenanalysator und einem Massendetektor. Das 384-well Chip mit der kristallförmige Matrix-Analyt-Mischung wurde für Nanosekunden unter Vakuumbedingungen durch einen ultravioletten (337 nm) Nitrogen-Laserpuls (SpectroREADER™ Genotype Analyzer, SEQUENOM) beschossen. Durch Absorption des Laserstrahls transformiert der Analyt dabei in einen ionisierten, gasförmigen Zustand. Anschließend wurden die Analytmoleküle durch das Spannungsfeld des Massenspektrometers beschleunigt und in den Massenanalysator gelenkt. Die Geschwindigkeit ist dabei umgekehrt proportional zum Masse-Ladung Quotienten und je größer die Masse, desto länger ist die Flugzeit. Das

Molekulargewicht des Analyten wurde schließlich durch eine Flugzeitanalyse bestimmt. Für das endgültige Sepktrum wurden 20 Lasershots pro Element durchgeführt. Die Bearbeitung und Analyse der Massenspektren erfolgte mit Hilfe einer Software (SpectroTYPER™ RT Workstation, SEQUENOM), die auf Algorithmen zur Basislinien-Korrektur, Peak-Identifikation und Peakflächen-Kalkulation beruht. Korrigierte Peakflächen beider Allele wurden für die Kalkulation der Allelfrequenzen herangezogen.

2.3 Molekulargenetische Assoziationsstudie

2.3.1 Patientengut

Das Studienkollektiv der molekulargenetischen Assoziationsstudie entsprach der unter 2.2.1 beschriebenen Studienpopulation. Die Genotypisierungen wurden im Rahmen der Studie als Auftrag von der Firma Sequenom, San Diego, Californien, durchgeführt.

2.3.2 Präparation der DNA-Pools und Genotypisierung

Im Rahmen der Assoziationsstudie des *NBS1*-Gens zum malignen Melanom wurden 3 SNPs aus der dbSNP-Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) getestet (Tabelle 12).

dbSNP ID ^a	Chromosom	Position im Chromosom ^b	Genregion
rs9995	8	90902639	3'UTR
rs867185	8	90931733	Intron 8
rs1063045	8	90951602	Exon 2 (L34L)

Tabelle 12: Untersuchte SNPs im *NBS1*-Gen

^aSNP-Identifikationsnummer aus der dbSNP-Datenbank des NCBI. ^bNCBI Genome Build 34.

dbSNP ID	PCR Primer 1	PCR Primer 2	Extensionsprimer
rs9995	TAGATGCAAGTCTCTTGTCTG	ACAGTCAAGCCACAGACTAG	GCAAGTCTCTTGTCTGGATATA
rs867185	CACCACCATTTCTCAAAACG	CAAGCTGAGTCTTAAAGCTG	AAGCCATTTGACTGCAATGT
rs1063045	TGGCGTTGAGTACGTTGTTG	CATGATTTGCGCTGATCGAC	GAAAAACTGTGCCATTCT

Tabelle 13: In der Assoziationsstudie verwendete hME Primer (5'-3')

Die DNA-Präparation, Amplifikation und Analysen erfolgten wie in den Abschnitten 2.2.2- 2.2.4 beschrieben. Es wurden vier DNA-Pools generiert: (1) weibliche Melanompatienten, (2) männliche Melanompatienten, (3) weibliche Kontrollpersonen, (4) männliche Kontrollpersonen. Um sicher zustellen, dass eine konstante Menge von jeder DNA-Probe in den Pool einging, wurden äquimolare Anteile der individuellen DNA-Proben (83 pg pro Patient) durch automatisiertes Pipettieren (Hamilton ML2200 und Vivace) in ein Sammelgefäß transferiert. Nach dem Mischen erfolgte zunächst die Entnahme von 25 ng aus jedem DNA-Pool, dann die Verdünnung auf eine Arbeitskonzentration von 5 ng/µl.

Für die individuelle Genotypisierung kamen nur 2,5 ng DNA pro Individuum im Arbeitsansatz zur Analyse.

2.3.3 Statistische Analyse

Die ermittelten Genotypfrequenzen wurden anschließend mit Hilfe eines online verfügbaren Statistik-Tools (verfügbar unter: <http://statpages.org/ctab2x2.html>; <http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>, Institut für Humangenetik des GSF-Forschungszentrums für Umwelt und Gesundheit, München-Neuherberg, Germany) auf eine Assoziation mit einem erhöhten Melanomrisiko hin getestet. Diese statistischen Analysen basierten auf dem Pearson's χ^2 -Test (Freiheitsgrad $m=1$) und wurden in Anlehnung an die von Sasieni beschriebene Methode angewendet (Sasieni, 1997). Dieselben Tools kamen auch zu Anwendung, um Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht in den Fall- und Kontroll-populationen zu analysieren.

Bei dem χ^2 -Test (Vier-Felder-Test) wird untersucht, ob die beobachteten Häufigkeiten zweier Merkmale oder Ereignisse sich maßgeblich von solchen Häufigkeiten unterscheiden, die man aufgrund einer bestimmten Annahme (Nullhypothese H_0) erwartet. Die Nullhypothese H_0 besagt, dass die Ereignisse bzw. Merkmale unabhängig voneinander sind, wohingegen eine Alternativhypothese H_1 von einer Abhängigkeit ausgeht. Man betrachtet also zwei Alternativmerkmale, in unserem Fall einerseits das entsprechende Allel und andererseits den Krankheitsstatus bezogen auf das Melanom. Die Ausprägungen der beiden Merkmale, hier z. B. C-Allel bzw. T-Allel und

Melanompatient bzw. Kontrollperson, und deren vier Kombinationsmöglichkeiten a, b, c, und d lassen sich anschaulich in einer Vierfeldertafel darstellen:

	Kontrollen	Patienten	
C-Allel	a	b	a+b
T-Allel	c	d	c+d
	a+c	b+d	a+b+c+d=n

Die Prüfgröße χ^2 mit folgender Formel berechnet:

$$\chi^2 = n \cdot (ad-bc)^2 / (a+b)(a+c)(c+d)(b+d)$$

Unter der Nullhypothese würden nun alle beobachteten mit den erwarteten Häufigkeiten übereinstimmen, d. h. es wäre $\chi^2 = 0$. Je weiter die beobachteten von den erwarteten Häufigkeiten abweichen, desto größer ist die Prüfgröße χ^2 . Liegt nun der Wert der Prüfgröße innerhalb des Intervalls $[0, \chi^2_{1, 1-\alpha}]$, so wird die Nullhypothese auf dem alpha-Niveau beibehalten, d. h. man nimmt an, dass keine Abhängigkeit der beiden Merkmale vorliegt. Für $\alpha = 0,05$ wäre $\chi^2_{1, 0,95} = 3,841$. Ist der Wert der errechneten Prüfgröße größer als dieser $\chi^2_{1, 0,95}$ -Wert, so wird die Nullhypothese verworfen und die Alternativhypothese angenommen, nämlich dass es eine Abhängigkeit/ Assoziation zwischen den beiden Merkmalen gibt.

In den **DNA-Pools** wurden zunächst die prozentualen Anteile jeweils der beiden Allele des Polymorphismus bestimmt und daraus die absoluten Zahlen der Genotypen berechnet. Bestand ein Pool beispielsweise aus 500 Personen und ergab das Allel "T" beispielsweise 40%, dann ergab sich daraus 400 "T-Allele" und 600 "nicht T-Allele". Nach der Berechnung der Werte für den Kontrollpool konnten diese Werte in eine Vierfeldertafel eingetragen werden und mit Hilfe eines χ^2 -Tests (online verfügbar unter: <http://statpages.org/ctab2x2.html>) ausgewertet werden. Ein statistisches Signifikanzniveau von $P < 0,05$ wurde festgelegt, was einer 5%igen Irrtumswahrscheinlichkeit bzw. einer 95%igen Sicherheit entspricht (Kammerer et al., 2004; Bansal et al., 2002).

2.3.4 Rekonstruktion und Analyse der Haplotypen

Um darüber hinaus zu überprüfen, ob durch die Analyse der aus dem Patientengut rekonstruierbaren Haplotypen eine Assoziation zur Melanom-erkrankung festzustellen ist (im Gegensatz zu einzelnen SNPs), wurden diese für jedes genotypisierte Individuum rekonstruiert. Dabei kam die von Stephens et. al (Stephens et al., 2001; Stephens und Donnelly, 2003) entwickelte Methode unter Verwendung des Softwareprogramm PHASE (Version 1.0; verfügbar unter: <http://www.stat.washington.edu/stephens>) zur Anwendung. Das Ausmaß des Kopplungsungleichgewichtes (Linkage Disequilibrium, LD) zwischen jeden SNP-Paar wurde als die Differenz der beiden Haplotypenfrequenzen kalkuliert, indem die häufigsten Allele jedes SNPs und das Produkt der beobachteten Haplotypenfrequenzen verwendet wurden. Mittels eines anschließenden χ^2 -Tests mit YATES-Korrektur für kleine Fallzahlen (verfügbar unter: <http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>) wurde die statistische Signifikanz von Abweichungen dieses LD vom Nullwert überprüft (Meyer et al., 2003). Auch hier galten P -Werte $< 0,05$ als statistisch relevant.

3 ERGEBNISSE

3.1 Patientengut

Die Auswertungen der Patientendaten aus der *NBS1*-Exon6-Analyse, die in Tabelle 3 (Kapitel 2.1.1) dargestellt sind, ergaben folgende signifikante Unterschiede zwischen weiblichen und männlichen Melanompatienten: Bei den unter 40 jährigen Patienten (Subgruppe E) zeigte sich, dass Frauen deutlich früher als Männer erkranken. 58 von 169 Frauen (34,3%) und nur 43 von 207 Männer (20,8%) zählten in diese Gruppe ($P= 0,003$).

Wie in Abbildung 3 gezeigt, wurde weiterhin deutlich, dass Frauen im Vergleich häufiger an den unteren Extremitäten, Männer dagegen bevorzugt am Körperstamm Melanome aufweisen. So waren bei den Frauen 130 von 200 (65%) insgesamt auswertbaren Melanomen an den Extremitäten lokalisiert, davon 102 (78,5%) an den unteren Extremitäten. Bei den Männern hingegen waren nur 76 von 225 (33,8%) an den Extremitäten zu finden, davon 45 (59,2%) an den Beinen ($P< 0,05$). Für die Melanomlokalisierung am Körperstamm ergab sich bei den Frauen die Werte 58 von 200 (29%) und bei den Männern 125 von 225 (55,6%) ($P< 0,05$).

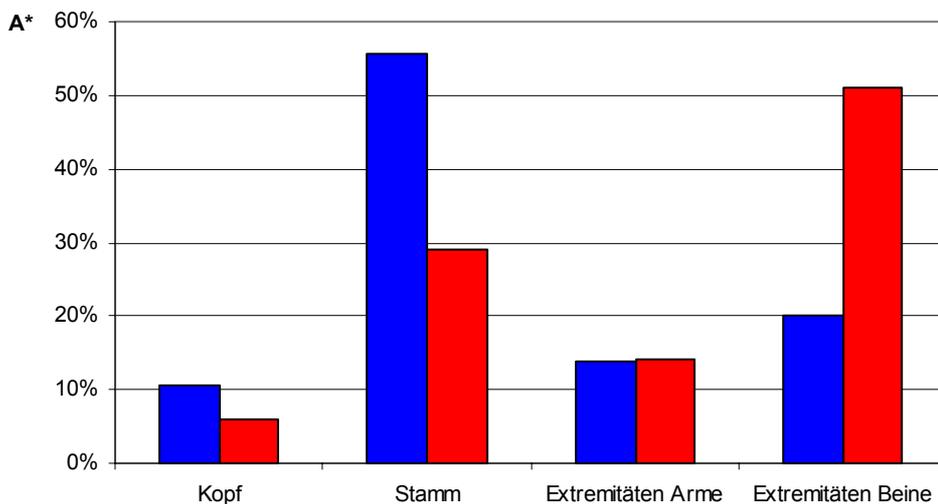


Abbildung 3: Verteilung und Lokalisation aller auswertbaren Melanome

*Gesamtanzahl der auswertbaren Melanome; rote Balken: Anteile bei den Frauen; blaue Balken: Anteile bei den Männern

Die statistische Auswertung der Daten des in Tabelle 8 (Kapitel 2.2.1) dargestellten Patientengutes der F222L-Analyse und der Assoziationsstudie ergab, dass 102 von 335 (30,4%) Melanompatientinnen und nur 59 von 297 Melanompatienten (19,8%) mit einem Alter unter 40 Jahre erkrankten ($P=0,002$). Weiterhin traten von insgesamt 271 Melanomen, die an Extremitäten lokalisiert waren, 187 (69,0%) bei weiblichen Patienten und 84 (30,9%) bei männlichen Patienten auf ($P<0,05$). 219 der auswertbaren Melanome waren am Körperstamm lokalisiert, davon 87 (39,7%) bei Frauen und 132 (60,3%) bei Männern ($P<0,05$).

3.2 Sequenzvariationen in *NBS1*- Exon 6

Die PCR lieferte von allen 376 DNA-Proben verwendbare Produkte, die ich mit dem Transgenomic WAVE™ DNA-Fragment Analysis System untersucht habe. Bei allen DHPLC-Läufen lief jeweils eine Wildtypprobe als Negativkontrolle und je eine Probe mit der Mutationen 657del5 und R215W als Positivkontrollen mit. Bei den Patientenproben 0098HH, 0178RW, 0251EA konnte ich auffällige Kurven identifizieren. Abbildung 4 zeigt neben den Positiv- und Negativkontrollen die auffälligen DHPLC-Kurven. Die Patientenprobe 0178RW zeigte dabei die Kurve der 657del5-Mutation, bei den Proben 0098HH und 0241EA sind die Bezeichnungen der identifizierten Sequenzvarianten in Klammern notiert. Abbildung 5 zeigt die auffälligen Kurven im direkten Vergleich.

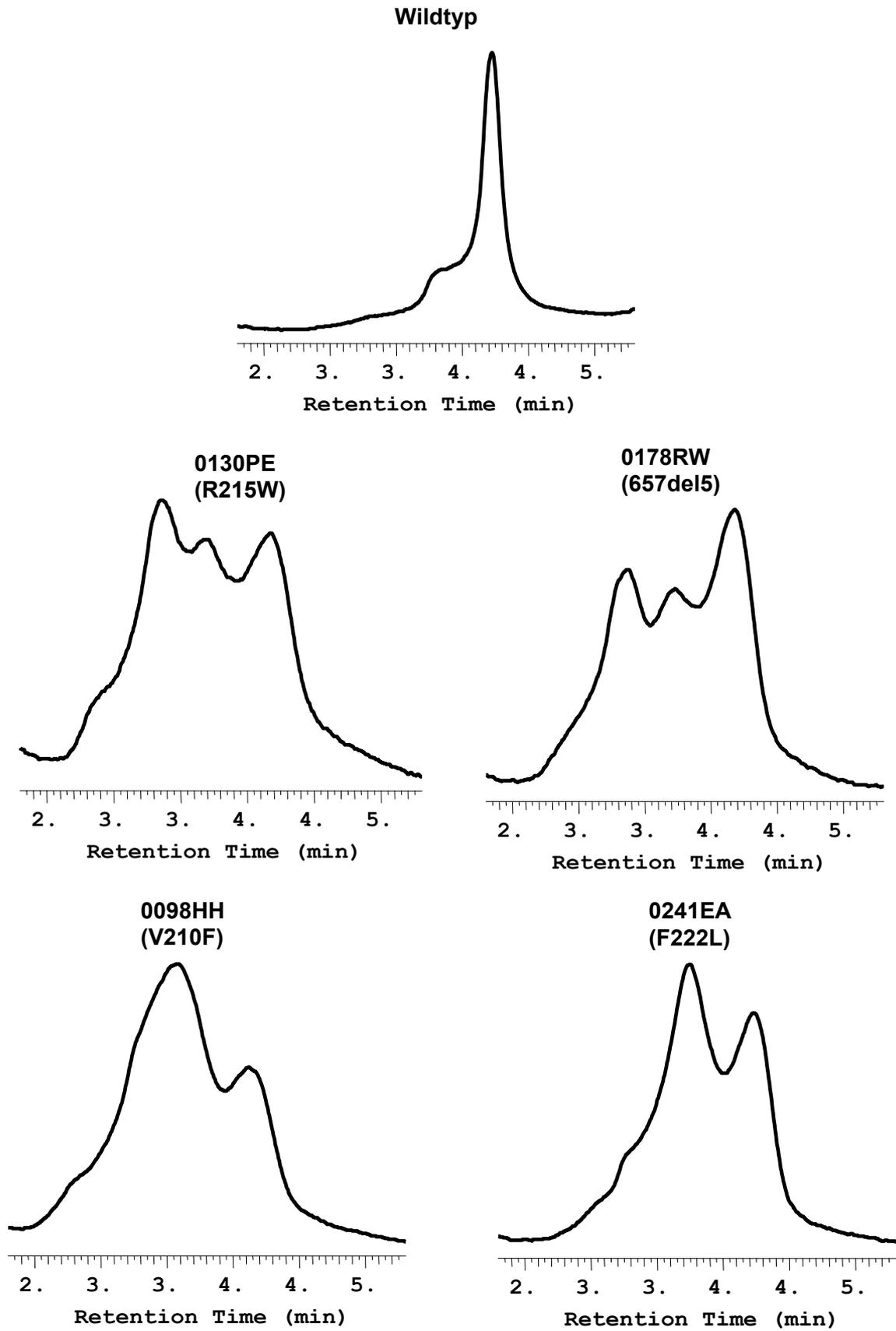


Abbildung 4: DHPLC-Kurven (Einzeldarstellung)

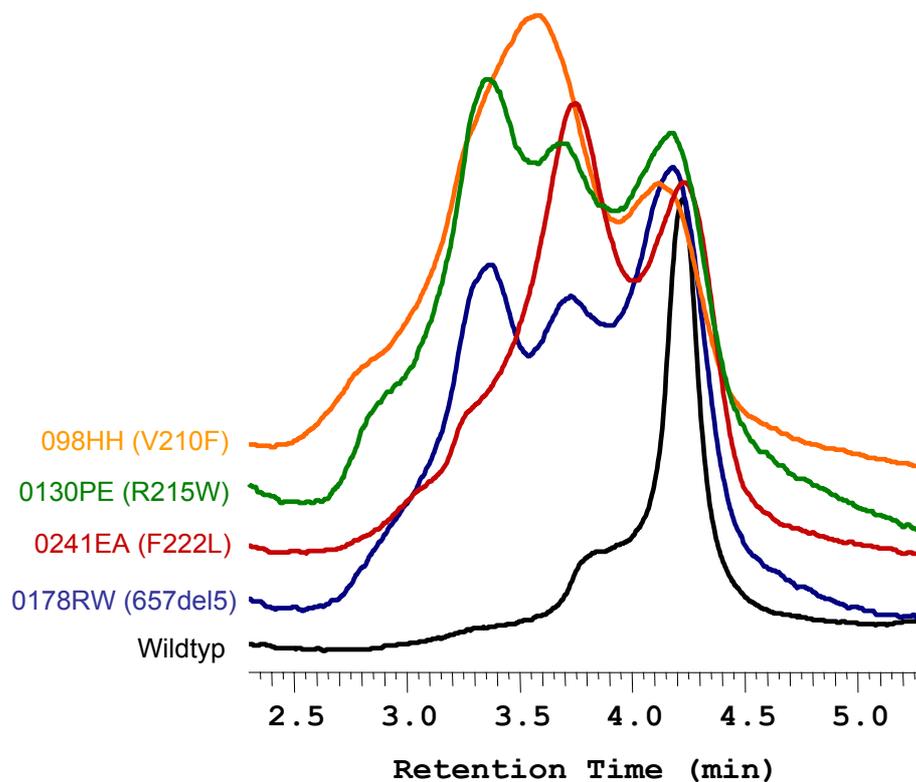


Abbildung 5: DHPLC-Kurven (Direktvergleich)

Die Sequenzierung der bei der DHPLC auffälligen Proben habe ich mit dem ABI PRISM[®] 3100 Genetic Analyzer durchgeführt. Dabei konnte ich die folgenden 3 Sequenzveränderungen identifizieren:

Probe 0098HH: V210F (G628T)

Hierbei handelt es sich um einen Austausch der Nukleotide G durch T, was zum Einbau von Phenylalanin (TTT) statt Valin (GTT) an Position 210 im Nibrinprotein führt.

Probe 0178RW: 657del5 (657del ACAA)

Diese bekannte Mutation führt zu einer Deletion von 5 Nukleotide an Position 657 von *NBS1*.

Probe 0251EA: F222L (C664T)

Hier erfolgt ein Austausch der Nukleotide T durch C, was zum Einbau von Leucin (CTC) statt Phenylalanin (TTC) an Position 222 im Genprodukt führt.

Im Rahmen der Vergleichsstudie mit direkter Sequenzierung lieferten 374 der 376 Proben auswertbare Ergebnisse. Dabei wurde in einer weiteren Patientenprobe (0130PE) die Punktmutation **R215W (C643T)** identifiziert. Bei dieser Sequenzvariante wird das Nukleotid C durch T ersetzt, was den Einbau von Tryptophan (TGG) statt Arginin (CGG) in die Aminosäuresequenz zur Folge hat. Diese Sequenzveränderung konnte bei der DHPLC nicht identifiziert werden.

Abbildung 6 zeigt die vollständige Sequenz des *NBS1*-Gens, in der alle identifizierten Veränderungen farblich markiert sind. In Abbildung 7 sind die Folgen der Sequenzveränderungen auf die Aminosäureabfolge in Genprodukt dargestellt.

```

DEFINITION Homo sapiens gene for NBS1, complete cds.
ACCESSION AB013139
source     1..56500
           /organism="Homo sapiens"
           /mol_type="genomic DNA"
           /db_xref="taxon:9606"
           /chromosome="8"
           /map="8q21"
           /sub_clone="RG255A7"

4621 ttccctttcc aaccaccagg tggcgggcaa gcgcccgaagt cgcactcccg cctcatccaa
4681 ggcagcctgc gtggctcccg ggagcgcgca cgtcccggag cccatgccga ccgcaggcgc
4741 cgtatcccg ctcgtctagc agccccggtt acgcggttgc acgtcggccc cagccctgag Exon1
4801 gagccggacc gatgtggaaa ctgctgcccg ccgcggggccc ggcagagagt aagggcagaa
4861 gggaaacctc ggggcctatt ttcccggtag cgaactgcctc gggggagggc ctgcccggtag
...
6421 catacctata tcataatacac ttacatgtat gtgtgtgttc gtgtacatgt gtatgtgtct
6481 atcaacttat ctttttttaa aaaaaaattt atctcaggag aaccatacag acttttgact Exon2
6541 ggcggttagt acgttgttgg aaggaaaaac tgtgccattc tgattgaaaa tgatcagtcg
6601 atcagccgaa atcatgctgt gttaactgct aacttttctg taaccaacct ggatagtac
6661 taattttatt tcactagttt ccagtaaggg ggttgaatc acaaaatatt ctcttggttt
6721 gtatgtgaga gagagttcac aggatttgtc attttataga gctgtgtaga cttttttaat
...
7681 gaattgttag ttgagtgatc ttctctcaa ggcaaccgaa gcagtaattg ttgtctgccg
7741 tgttgggagg ttagccacct gcctattgtc ttttcttttg aaaacttttt ctctgagaag
7801 tgaatgtact gagtggtaaa agacttttaa ttatttgcta acttttcaga gtcaaacaga Exon3
7861 tgaatccct gtattgacat taaaagataa ttctaagtat ggtacctttg ttaatgagga
7921 aaaaatgcag aatggccttt cccgaacttt gaagtcgggg gatggtatta cttttggagt
7981 gtttggaaat aaattcaggt aagacatttt aaaattgatt ttaaaatgga cagctttggt
8041 tcagccaaat cctaaaggaa aatgatattt ctgattaatg aattttaaac agtataatnt
8101 agttcctgct tagcacagta ttggactctg tgccatgggt ggtgagtgca ttttgtacat
...
8401 ttaaagtttt aaagtactaa aaattgccat ctctgcaact ctgatactat gacttttatt
8461 aacttattct catttacaga atagagtatg agcctttggt tgcattgctt tcttgtttag Exon4
8521 atgtctctgg gaaaactgct ttaaatcaag ctatattgca acttgaggga tttactgtaa
8581 acaattggac agaagaatgc actcaccttg tcatggtatc agtgaaagtt accattaaag
8641 taggttgaat gtcttgttct tatgttaaaa ataagttatt tgaatttaag cttaccact
8701 atacacagat ttttttttaa ttacttttaa actatcagaa ctgtagttag tagatttata
...
10921 agagagatga aagggaaaac attatttttt atggatgtaa acagcctctt tgtagtttat
10981 aacttaaac ttttctttaa aaaatgctag catgtgaata tatatattca catgttttct
11041 tcattgtaga caatatgtgc actcatttgt ggacgtccaa ttgtaaagcc agaataatnt Exon5
11101 actgaattcc tgaagcagt tgagtccaag aagcagctc cacaaattga aaggtatatt
11161 atgtatttta aatataacaa gatgtcactt atatgatagc attgattttt atttaagtta
...

```

17941	agataaaaat	tcttacttaa	aaaaaatact	ataaaggat	tatggaaatt	atgccttttg	
18001	agtgtcagat	agtcactccg	tttacaattt	aatagcaaac	atagtagtat	ataattagaa	F-Primer
18061	tatactttaa	ttatttttac	agttttttacc	cacctcttga	tgaaccatct	attggaagta	Exon6
18121	aaaatggtga	tctgtcagga	ggcagggaaa	gaaaacaaat	cttcaaaggg	aaaacattta	*1;*2;*3;*4
18181	tattttttgaa	tgccaacacag	gtaattatgt	tataagctaa	attttctctaa	agaatacatt	
18241	acaactagg	atcacattatt	aaactcttatc	agtagttggt	aacgtatttc	attttgggat	R-Primer
18301	tttgtgtaa	agtgtgaagt	agaataaaaa	aacccaggc	accagacctg	cccagtgatc	
...							
18721	tcttgaattg	tacttctatg	tttcccaaat	caaattctta	tgtgttcaaa	aaattactac	
18781	attttacttt	aaaaaatggt	tccttcatt	tttagcataa	gaaattgagt	tcccgagttg	Exon7
18841	tctttggagg	tggggaagct	aggttgataa	cagaagagaa	tgaagaagaa	cataatttct	
18901	ttttggctcc	gggaacgtgt	gttgttgata	caggaataac	aaactcacag	accttaattc	
18961	ctgactgtca	gaagaaatgg	attcagtcaa	taatggatat	gctccaaggg	tatagaatta	
19021	ttctttatta	gtaaaaaact	gcaagtagga	gattttatgt	ttaacctttt	ttgttgcttt	
...							
24721	attatagtac	tctgcatttg	aaattctgtc	tataccataa	aattattttg	gaggaaaaaa	
24781	aagaggttgc	tttatcttga	cattatctga	ataaaaagttg	ctagttttaa	tatattatca	
24841	tacttaaaact	atttttattct	aatagcaag	gtcttagacc	tattcctgaa	gcagaaattg	Exon8
24901	gattggcgtg	gattttcatg	actacaaaga	attactgtga	tcctcagggc	catcccagta	
24961	caggtaaatg	cagcattatt	ttattgattc	gttagcaact	ttattatgta	aatcgataag	
25021	ctaaatatac	gttactcata	tacttgctag	gggtgacct	attcaccatg	ttttaaaatt	
...							
30361	tgttttgtgt	ttgttggtag	cactcattgg	agaaaacct	gtgcagtatt	ccctagttaa	
30421	tccctcagc	atggtatagt	ctaacaattt	taagtacca	gatgttcctc	ttctatctag	
30481	cagttgtgat	tctttctttc	tacttgtgtg	atttacagga	ttaaagacaa	caactccagg	Exon9
30541	accaagcctt	tcacaaggcg	tgctcagtga	tgaaaaacta	atgcccaagcg	ccccagtgaa	
30601	cactacaaca	tacgtagctg	acacagaatc	agagcaagca	gatacatggt	aaagcttctt	
30661	cattaccgta	ctattgttat	tattctatca	ataaattaat	agtataattca	ggaagtaatg	
30721	ccctttatca	ggttgtctct	tgagagagaa	agcatggaag	aatgggatac	cagggaaaaat	
...							
33661	ttgctttctt	gggatggtaa	aatatattca	gtgtattttt	gtctaaaaat	tatcttctaa	
33721	ggttatatta	cgtagaact	atttaaagat	ctttgtttct	ctattaaggt	tgctgtaaac	
33781	ttgattattt	accttgcaat	cttttctttt	tctacagga	tttgagttaa	aggccaaaag	Exon10
33841	aaatcaaaat	ctccaaaatg	gaacaaaat	tcagaatgct	ttcacaaat	gcaccactg	
33901	taaggagctc	ctgcaaaaaca	agctcctaata	ataatagtat	ggtatcaaat	actttggcta	
33961	agatgagaat	cccaaaactat	cagctttcac	caactaaatt	gccaagtata	aataaaagta	
34021	aagatagggc	ttctcagcag	cagcagacca	actccatcag	aaactacttt	cagccgtcta	
34081	ccaaaaaaag	gtctgttttt	gataacttct	ctcatgtctc	tgaaaaaaaa	atgaaagttt	
34141	tttatactgt	tgtagaatgg	tattgtcttt	agtctgttct	gattaagtat	gcttctgctg	
...							
35581	tgtaactaa	atggaggag	tgatgaatat	tgccaaaacta	aatggttact	tagctgtggt	
35641	cattttcttg	ttttgttttc	ttcttttttt	ttaaatctaa	gggaaagggg	tgaagaaaat	Exon11
35701	caagaaatgt	cttcatgcaa	atcagcaaga	atagaaactg	cttgttctct	tttagaacia	
35761	acacaacctg	ctacaccctc	atgttggaag	aaataaggagc	agcatctatc	tgagaatgag	
35821	ccctgtggaca	caaaactcaga	caataactta	tttacagata	cagatttaaa	atctattgtg	
35881	aaaaattctg	ccagtaaatc	tcagtctgca	gaaaagctaa	gatcaataa	aaaaagggaa	
35941	atggatgatg	tgccataga	agatgaagta	ttggaaactg	tattcaagga	cacaaaacca	
36001	gagtagaaa	ttgatgtgaa	agttcaaaaa	caggagggaag	atgtcaatgt	tagaaaaagg	
36061	ccaagtagg	atatagaaac	aaatgacact	ttcagtgatg	aagcagttacc	agaaagtagc	
36121	aaaatatctg	taagtaacat	tttaaatgag	aggtatagta	catagaagct	tagaatgcta	
36181	acaggtactt	tcgattttgt	attgacagta	tgagcatcca	ttaatgtctt	taaacactcag	
...							
41341	ggtcatacat	aacatgaata	tctcttaagt	ttttagaag	gaaccatttt	acacttctac	
41401	ttattcaaaa	ggccaagaag	tgatagaaac	ataccatttt	attactccta	tgaacagtat	
41461	tttttatttt	atttcttttag	caagaaaatg	aaattgggaa	gaaacgtgaa	ctcaaggaag	Exon12
41521	actcactatg	gtcagctaaa	gaaatatctg	tgagaacgt	tttattaatt	tttatacaga	
41581	tttggcttac	ggggactgtc	atctcatcaa	tttttgtgat	tttacattct	taggattatt	
...							
42961	aacattttta	ctattttttc	aggtatttga	acttttttct	atagattccc	aaatgacaag	
43021	tgacttttct	ttgttatttc	ttctctttct	taoctatcca	tcttaacccc	atttaagaac	Exon13
43081	aatgacaaa	ttcaggatga	tagtgagatg	cttccaaaaa	agctgttatt	gactgaattt	
43141	agatcactgg	tgattaaaaa	ctctacttcc	agaaatccat	ctggcataaa	tgatgattat	
43201	ggtcaactaa	aaaatttcaa	gaaattcaaa	aaggtaggta	tttcaactgt	atcacaagag	
43261	gtcagtgttt	gaaatgtttt	tagagatacc	agtgatgcta	aacaaaagata	aaagcagttt	
...							
45901	ttggcactta	tgcatgattt	accatctttg	cttttttaac	tttttaaaaa	aatggtcatt	
45961	tttgtttgtt	aatatgattt	actgtaactac	ttttattatt	caataggtca	catatcctgg	Exon14
46021	agcaggaaaa	cttccacaga	tcattggagg	atcagatcta	atagctcatc	atgctcgaaa	
46081	gaatacacgaa	ctagaagagt	ggcaaaaggca	ggaaaatggag	gttagtagga	agtgaggccc	
46141	agaaacttgc	ttaaattgca	ctttggtcca	ttatggtggc	cttcaagcaa	attcttctta	
...							
52141	ggatcagttg	aatgaaatat	tgtagaggca	agaactcaga	tgtggtgacc	tccaggatgt	
52201	ggaatctct	aagatgacag	tgacctatca	ctatagcaat	tcattaacta	tatattcacc	
52261	actgagcaaa	tgtttgaat	tatgttaatt	ttgacagta	caaaatcaac	atgcaaaa	Exon15

```

52321 agagtctctt gctgatgac ttttaggta aagtttgatt cacctttctc atgtaccttt
52381 gagagatgta tataaaattht agttctgttc atagaaatta agaatttggt tcttctgtcc
...
53641 acaaaattgt cattccccatc ctatthtgcca aagtgtgact acagthtgaa agttctttac
53701 ctttaaaaga aataccatcc cttatctaaa tatcattthaa ccccatthtct tctthtgag
53761 atacaatcct tattthaaaa ggagaagata actgaggatt thaaaaagaa gccatggaaa Exon16
53821 aacttcttag taagcatcta cttcaggcca acaagthtat atgaatata agtgtataga
53881 agcgattthaa gttacaatgt tttatggcct aaattthatta aataaaatgc acaaaacttht
53941 gattctthtg tatgtaacaa ttgthtgthc tgththtcagg cthtgthcatt gcatcttht
54001 thcatththta aatgtgththt gththththaa tagthththt agththcagtht caaaaththta
...

```

Abbildung 6: Lokalisation der Veränderungen in der NBS1-Gensequenz

*1: V210F (GTT→TTT); *2: R215W (CGG→TGG); *3: 657delACAAA ; *3: F222L (TTC→CTC)
(Quelle: www.bioinfo.weizman.ac.il- modifiziert)

V210F, R214W, F222L:

```

..... ttatththtac agt/tht/thc/cct/cct/ctt/gat/gaa/cct/tct/att/gga/agt/ Exon6
196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207
Phe Tyr Pro Pro Leu Asp Glu Pro Ser Ile Gly Ser

aaa/aat/gtt/gat/ctg/tca/gga/cgg/cag/gaa/aga/aaa/caa/atc/tht/aaa/ggg/aaa/
208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 227
Lys Asn Val Asp Leu Ser Gly Arg Gln Glu Arg Lys Gln Ile Phe Lys Gly Lys
      ↓           ↓           ↓
      Phe         Trp         Leu

aca/tht/ata/tht/thg/aat/gcc/aaa/cag/gta/att/atg/tha/tht/ctaa atththctta Intron6
228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240 241
Thr Phe Ile Phe Leu Asn Ala Lys Gln Val Ile Met Leu Ter

aagaatacatt acaaaactagg atacattatt aactcttht acgtagththt.....

```

657del15-Mutation:

```

..... ttatththtac agt/tht/thc/cct/cct/ctt/gat/gaa/cct/tct/att/gga/agt/ Exon6
196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207
Phe Tyr Pro Pro Leu Asp Glu Pro Ser Ile Gly Ser

aaa/aat/gtt/gat/ctg/tca/gga/cgg/cag/gaa/aga/aaacaaat/ctt/caa/agg/gaa/agg/
208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224
Lys Asn Val Asp Leu Ser Gly Arg Gln Glu Arg Ile Leu Gln Arg Glu Arg

gaa/aac/att/tat/att/tht/gaa/tgc/caa/aca/ggt/aat/tat/gtt/ata/agc/tha// Intron6
225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240 241
Glu Asn Ile Tyr Ile Phe Glu Cys Gln Thr Gly Asn Tyr Val Ile Ser Stop

atththctaa agaatacatt acaaaactagg atacattatt aactcttht acgtagththt.....

```

Abbildung 7: Folgen der Sequenzvarianten in Exon 6 auf die AS-Abfolge

In den Abbildungen 8-12 sind die Elektropherogramme der vier identifizierten Sequenzveränderungen unter Verwendung des Software-Programms Chromas 2.0 dargestellt. Nukleotid- und Aminosäuresequenzen sind über den Elektropherogrammen angezeigt. Die Sequenzveränderungen sind jeweils mit pinkfarbenen Pfeilen und einem N innerhalb der Sequenzabfolge gekennzeichnet.

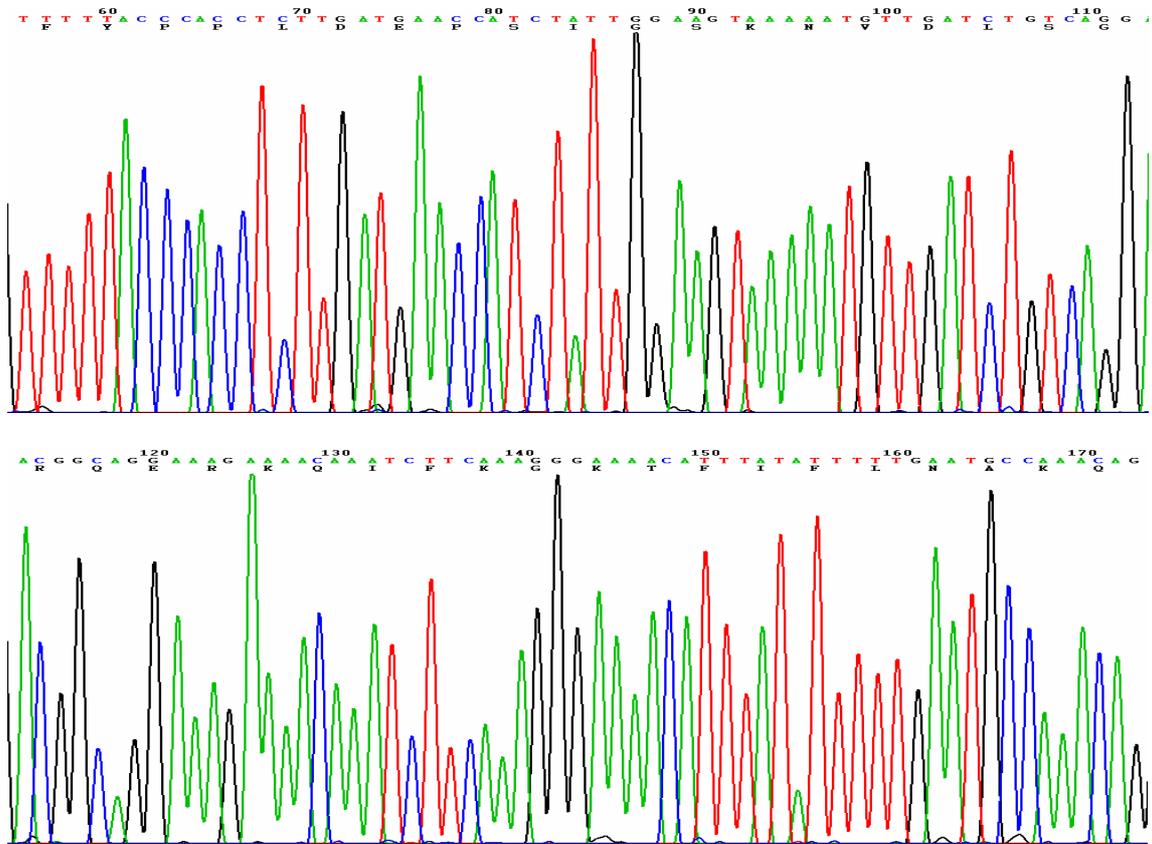


Abbildung 8: Sequenz von Exon 6 (mutationsfrei)

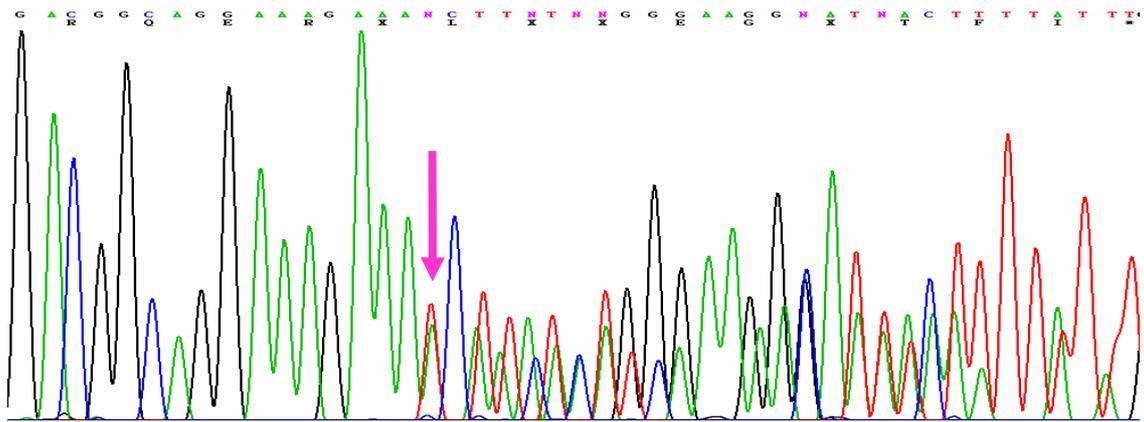


Abbildung 9: 657del5-Mutation

3.3 Stammbaumanalyse der betroffenen Patienten

V210F:

Alter bei Diagnosestellung: 37 Jahre

Geschlecht des Patienten: weiblich

Krankheitsstatus: keine weiteren Krebserkrankungen bekannt

Stammbaumanalyse: - beide Elternteile deutscher Herkunft
- keine Krebserkrankung bei 3 analysierbaren
erstgradigen Verwandten
- ein zweitgradiger Verwandter von 13
analysierbaren mit Kolorektalkarzinom

Histologie: superfiziell spreitendes Melanom

Tumordicke: 0,87 mm

Klassifizierung: pT2N0M0

Tumorlokalisierung: Vorderfuß

Besonderes: viele Sonnenbrände im Laufe des Lebens

Gruppe: Sporadische Melanome (SM)

657del5:

Alter bei Diagnosestellung: 48 Jahre

Geschlecht des Patienten: männlich

Krankheitsstatus: keine weiteren Krebserkrankungen bekannt

Stammbaumanalyse: - beide Elternteile deutscher Herkunft
- keine Krebserkrankung bei 7 analysierbaren
erstgradigen Verwandten
- ein zweitgradiger Verwandter von 13
analysierbaren mit Magenkarzinom

Histologie: superfiziell spreitendes Melanom

Tumordicke: 1,5 mm

Klassifizierung: pT3N0M0

Tumorlokalisierung: Rücken

Besonderes: viele Sonnenbrände in der Kindheit

Gruppe: Sporadische Melanome (SM)

F222L:

Alter bei Diagnosestellung: 65 Jahre

Geschlecht des Patienten: weiblich

Krankheitsstatus: keine weiteren Krebserkrankungen bekannt

Stammbaumanalyse: - beide Elternteile rumänischer Herkunft
- keine Krebserkrankung bei 7 erstgradigen und 20
zweitgradigen analysierbaren Verwandten

Histologie: entzündlich-erodierendes, superfiziell spreizendes
Melanom

Tumordicke: 1,6 mm

Klassifizierung: pT2N0M0

Tumorlokalisation: Oberschenkel

Besonderes: viele Sonnenbrände im Laufe des Lebens

Gruppe: Sporadische Melanome (SM)

R215W:

Alter bei Diagnosestellung: 68 Jahre

Geschlecht des Patienten: männlich

Krankheitsstatus: keine weiteren Krebserkrankungen bekannt

Stammbaumanalyse: - beide Elternteile deutscher Herkunft
- keine Krebserkrankung bei 5 erstgradigen und 13
zweitgradigen analysierbaren Verwandten

Histologie: superfiziell spreitendes Melanom

Tumordicke: nicht verfügbar

Klassifizierung: nicht verfügbar

Tumorlokalisation: Oberschenkel

Besonderes: Patient erinnert sich an einige Sonnenbrände in der
Vergangenheit

Gruppe: Sporadische Melanome (SM)

Bei den betroffenen Patienten handelt es sich um 2 Frauen und 2 Männer.

Bemerkenswert ist, dass alle vier Patienten zu der Gruppe der sporadischen
Melanome (SM) gehören. Die Stammbaumanalysen ergaben jeweils keine

Häufung von Melanomerkrankungen in der näheren Verwandtschaft, was darauf hinweist, dass es sich bei den identifizierten Melanomfällen nicht um familiäre Fälle handelt.

3.4 F222L-Analyse

Um zu analysieren, ob es sich bei der neu entdeckten Sequenzvariation F222L um einen Polymorphismus handelt oder um eine neue Mutation, konnte eine Testpopulation aus 629 unselektierten Melanopatienten und 604 Kontrollen mittels MassEXTEND/MALDI-TOF-Massenspektroskopie auf diese genetische Variante hin untersucht werden. Acht der Patientenproben und 14 Kontrollproben ergaben keine auswertbaren Ergebnisse. Bei den verbleibenden 621 Melanopatienten und 590 Kontrollpersonen ergaben die Analysen, dass alle getesteten Personen das Wildtypallel TT an Position 664 in Exon 6 von *NBS1* homozygot aufwiesen.

3.5 Assoziationsstudie

Um eine mögliche Assoziation zwischen dem *NBS1*-Gen und der Melanomerkrankung zu untersuchen, wurden 3 SNPs innerhalb dieses Gens bei 632 Patienten und 615 Kontrollpersonen getestet.

Gemäß den Daten des Internationalen HapMap Projektes (<http://www.hapmap.org>) stehen die SNPs in unterschiedlichen Graden des Kopplungsungleichgewichtes (linkage disequilibrium; LD) und sind damit für diese Studie informativ. Die Werte des LD betragen $r^2 = 0.34$ für rs9995/rs867185 ($D' = 0,78$), $r^2 = 0.52$ für rs9995/rs106304 ($D' = 0,62$) und $r^2 = 0.73$ für rs867185/rs106304 ($D' = 1,0$). Die Genotypenfrequenzen der analysierten Sequenzvarianten stimmten dabei mit der gemäß dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht vermuteten Allelverteilung überein.

Im Rahmen dieser Studie erfolgte zunächst die Untersuchung der vier in Tabelle 14 dargestellten DNA-Pools.

dbSNP ID	A1/A2 ^a	AF ^b Weibliche Kontrollen	AF Weibliche Patienten	AF Männliche Kontrollen	AF Männliche Patienten
rs9995	G/A	0,588	0,591	0,592	0,541
rs867185	A/G	0,466	0,493	0,471	0,538
rs1063045	A/G	0,485	0,465	0,489	0,516

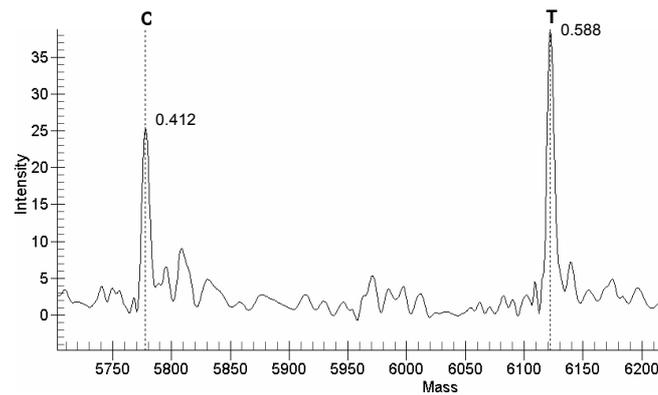
Tabelle 14: Allelfrequenzen der SNPs im *NBS1*-Gen

^aKombination der Allele. ^bAF= Allelfrequenz

Es zeigten sich keine signifikanten Differenzen der Allelfrequenzen zwischen den vier DNA-Pools.

In Abbildung 13 sind die MALDI-TOF-Massenspektrogramme des SNPs rs9995 von den beiden Pools weiblicher Individuen im Vergleich dargestellt. Die Allelfrequenzen ergeben sich jeweils aus der Fläche unter der Kurve im Vergleich zwischen den Fall- und Kontrollpools. Die Analyse der SNPs rs867185 und rs1063045 ergab ähnliche Werte, die Untersuchung der Pools männlicher Individuen zeigte ebenfalls vergleichbare Resultate. Für keinen der drei SNPs zeigte sich eine statistisch signifikante Differenz der Allelfrequenzen zwischen Patienten und Kontrollpersonen.

**A: Pool weibl.
Kontrollen**



**B: Pool weibl.
Patienten**

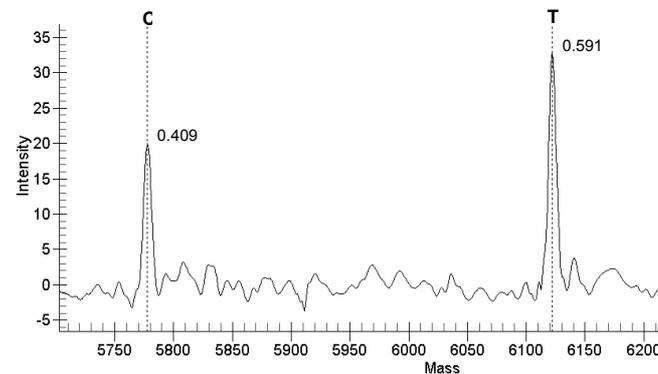


Abbildung 13: MALDI-TOF-Massenspektrogramm von rs9995

Die Allelbezeichnungen (C/T) befinden sich oberhalb des Peaks, die Zahlen an der Peakspitze stehen für die relativen Allelfrequenzen. Auf der X-Achse ist die Masse der Extensionsprodukte aufgetragen, auf der Y-Achse deren Intensität.

Dieses Resultat konnte durch die Ergebnisse der **individuellen Genotypisierung** bestätigt werden, die in Tabelle 15 dargestellt sind. Mit Hilfe des χ^2 -Tests nach Pearson wurden die *P*-Werte für die drei SNPs berechnet, wobei ein statistisches Signifikanzniveau von $P < 0,05$ festgelegt wurde. Der Anteil auswertbarer Genotypen lag für rs9995 bei 98,2% (1.225 Ergebnisse von 1.247 Proben), für rs867185 bei 98,6% (1.229 Ergebnisse von 1.247 Proben) und für rs1063045 bei ebenfalls bei 98,6% (1.230 Ergebnisse von 1.247 Proben). Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, zeigte sich auch hier bei keinem der drei SNPs eine statistisch signifikante Assoziation zur Melanomerkrankung.

SNP	Probe		N ^a	CC ^b	CT ^c	TT ^d	N ^e	Fall ^f	Kontr. ^f	Delta	P ^g
rs9995	gesamt	Fall	1225	9,5% (59)	42,6% (265)	47,9% (298)	2450	69,2% (861)	69,4% (837)	-0,2	0,918
		Kontr.		9,4% (57)	42,3% (255)	48,3% (291)		69,1% (459)	68,6% (417)		
	weibl.	Fall	636	9,3% (31)	43,1% (143)	47,6% (158)	1272	69,1% (459)	68,6% (417)	0,5	0,835
		Kontr.		9,5% (29)	43,8% (133)	46,7% (142)		69,3% (402)	70,2% (420)		
	männl.	Fall	589	9,6% (28)	42,1% (122)	48,3% (140)	1178	69,3% (402)	70,2% (420)	-0,9	0,730
		Kontr.		9,4% (28)	40,8% (122)	49,8% (149)					
SNP	Probe		N ^a	AA ^b	AG ^c	GG ^d	N ^e	Fal ^f	Kontr. ^f	Delta	P ^g
rs867185	gesamt	Fall	1229	12,9% (80)	43,8% (271)	43,3% (268)	2458	65,2% (807)	62,0% (757)	3,2	0,106
		Kontr.		14,4% (88)	47,0% (287)	38,6% (235)		65,1% (427)	61,9% (380)		
	weibl.	Fall	635	13,7% (45)	42,4% (139)	43,9% (144)	1270	65,1% (427)	61,9% (380)	3,2	0,236
		Kontr.		15,0% (46)	46,2% (142)	38,8% (119)		65,3% (380)	62,2% (377)		
	männl.	Fall	594	12,0% (35)	45,4% (132)	42,6% (124)	1188	65,3% (380)	62,2% (377)	3,1	0,270
		Kontr.		13,9% (42)	47,9% (145)	38,2% (116)					
SNP	Probe		N ^a	TT ^b	TC ^c	CC ^d	N ^e	Fall ^f	Kontr. ^f	Delta	P ^g
rs1063045	gesamt	Fall	1230	10,4% (64)	42,3% (262)	47,3% (293)	2460	68,5% (848)	67,3% (822)	1,2	0,513
		Kontr.		10,1% (62)	45,2% (276)	44,7% (273)		67,8% (445)	67,0% (413)		
	weibl.	Fall	636	11,2% (37)	41,8% (137)	47,0% (154)	1272	67,8% (445)	67,0% (413)	0,8	0,764
		Kontr.		9,7% (30)	46,4% (143)	43,8% (135)		69,2% (403)	67,5% (409)		
	männl.	Fall	594	9,2% (27)	43,0% (125)	47,8% (139)	1188	69,2% (403)	67,5% (409)	1,7	0,516
		Kontr.		10,6% (32)	43,9% (133)	45,5% (138)					

Tabelle 15: Ergebnisse der individuellen Genotypisierung

^aAnzahl der Individuen mit Genotypen. ^{b-d}Genotypenfrequenzen. ^eAnzahl von Chromosomen. ^fProzentzahlen und Gesamtzahlen des jeweiligen primären SNP-Allels. ^gP-Werte aus dem Vergleich von zwischen Fällen und Kontrollen (χ^2 -Test nach Pearson; Freiheitsgrad m= 1).

Haplotypenanalyse

Die Haplotypenanalyse ergab für die drei SNPs sechs Haplotypen (H1-H6), von denen zwei für ca. 83% aller Haplotypenkombinationen zutraten. Im Vergleich der Haplotypenfrequenzen von Melanompatienten und Kontrollen zeigte sich, dass keiner der Haplotypen signifikant mit einem erhöhten Melanomrisiko assoziiert war (Tabelle 16).

Haplotyp ^a	Fälle (N _{Haplotypen} = 1.264)	Kontrollen (N _{Haplotypen} = 1.230)	P-Wert ^b
CTG (H1)	58% (733)	56% (692)	0,405
TCA (H2)	26% (322)	26% (320)	0,792
CTA (H3)	4% (47)	5% (61)	0,154
CCG (H4)	6% (74)	5% (65)	0,594
TTA (H5)	6% (81)	7% (84)	0,732
CCA (H6)	0% (7)	1% (8)	0,958

Tabelle 16: Ergebnisse der Haplotypenanalyse

^aNukleotide an den SNP-Stellen rs1063045/rs9995/rs867185; ^bP-Werte aus dem Vergleich der Haplotypenhäufigkeiten zwischen Patienten und Kontrollen (χ^2 -Test mit YATES-Korrektur).

4 DISKUSSION

4.1 Patientengut

Die statistische Auswertung der anamnestischen Daten beider Studienpopulationen ergab zum einen, dass Frauen signifikant häufiger in einem Alter unter 40 Jahren an Melanomen erkrankten als Männer. Weiterhin waren Melanome bei Frauen bevorzugt am den Extremitäten (insbesondere den Beinen) lokalisiert, bei Männern dagegen signifikant häufiger am Körperstamm. Diese Ergebnisse stimmen mit den Angaben in der Literatur überein. So erkrankten laut der amerikanischen Datenbank SEER (Surveillance, Epidemiology and End Results) des National Cancer Institute männliche Melanompatienten deutlich häufiger an Körperstamm, Kopf und Nacken, Frauen dagegen meist an den unteren Extremitäten (*Hall et al., 1999*). Diese Tatsache wird zumeist mit der entsprechenden Häufung von Sonnenbränden in Zusammenhang gebracht, deren Lokalisation sich ebenfalls zwischen den Geschlechtern unterscheidet.

Auch die Tatsache der früheren Erkrankung von Frauen kann anhand der statistischen Reviews 1975-2003 des SEER (online verfügbar unter: http://seer.cancer.gov/cgi-bin/csr/1975_2003/search.pl#results; *Cancer Site: Melanoma of the skin*) bestätigt werden. Demnach ist unter den Melanompatienten der Anteil der Frauen in den Altersgruppen bis 1- 44 höher als der der Männer, ab einem Alter von 45 kehrt sich dieses Verhältnis um. Abbildung 14 zeigt die statistischen Daten des SEER von Melanompatienten für Inzidenz und Todesraten von Melanompatienten in den USA in Abhängigkeit vom Alter der Patienten.

Table XVI-4
MELANOMA OF THE SKIN (Invasive)

SEER INCIDENCE AGE AT DIAGNOSIS AGE-ADJUSTED RATES, 2000-2003	All Races		Total		Whites		Blacks	
	Total	Males	Females	Total	Males	Females	Total	Females
All ages	18.2	23.2	14.7	11.1	26.5	17.3	1.0	1.1
Under 65	12.1	12.9	11.4	14.2	15.0	13.6	0.5	0.5
65 and over	60.5	94.1	37.5	48.4	106.1	42.4	4.2	3.7
All ages/IARC world std ^f	13.2	15.9	11.2	15.4	18.3	13.2	0.7	0.6
AGE-SPECIFIC RATES, 2000-2003								
<1	-	-	-	-	-	-	-	-
1-4	0.1	-	-	0.1	-	-	-	-
5-9	0.1	-	0.2	0.2	-	-	-	-
10-14	0.3	0.3	0.4	0.4	0.4	0.4	-	-
15-19	1.7	1.9	2.1	2.1	1.7	2.5	-	-
20-24	4.0	2.6	5.6	4.3	3.1	6.9	-	-
25-29	6.9	4.8	9.1	8.4	5.9	11.2	-	-
30-34	9.5	7.0	12.1	11.4	8.3	14.7	-	-
35-39	12.3	10.4	14.1	10.6	12.3	17.0	-	-
40-44	16.0	16.2	19.0	12.2	22.3	21.9	-	-
45-49	21.2	22.6	25.9	17.4	27.7	28.2	-	-
50-54	27.6	32.0	32.9	23.4	37.7	37.2	-	-
55-59	35.9	44.1	47.4	48.4	60.4	59.0	-	-
60-64	45.1	54.1	58.8	47.6	67.7	53.6	-	-
65-69	48.1	70.5	61.5	57.6	80.9	57.2	-	-
70-74	68.7	89.5	87.8	69.8	101.6	63.6	-	-
75-79	68.9	103.0	99.9	74.1	115.8	64.8	-	-
80-84	70.5	117.1	101.5	77.6	130.1	65.1	-	-
85+	63.7	114.7	80.8	69.2	126.0	64.2	-	-
U.S. MORTALITY								
AGE AT DEATH								
AGE-ADJUSTED RATES, 2000-2003	2.6	3.8	1.8	3.0	4.3	2.0	0.4	0.4
All ages	1.7	1.6	0.9	1.6	2.0	1.1	0.2	0.1
Under 65	11.7	18.3	7.4	12.9	20.1	8.1	2.4	2.4
65 and over	1.7	2.4	1.2	2.0	2.6	1.3	0.3	0.2
All ages/IARC world std ^f	-	-	-	-	-	-	-	-
AGE-SPECIFIC RATES, 2000-2003								
<1	-	-	-	-	-	-	-	-
1-4	-	-	-	-	-	-	-	-
5-9	-	-	-	-	-	-	-	-
10-14	0.0	0.1	0.2	0.0	0.1	0.2	-	-
15-19	0.2	0.2	0.3	0.4	0.5	0.4	-	-
20-24	0.2	0.7	0.5	0.7	0.9	0.6	-	-
25-29	1.0	0.7	0.8	1.2	1.3	1.0	-	-
30-34	1.7	2.1	1.3	2.0	2.5	1.6	-	-
35-39	2.5	3.2	1.8	3.0	3.8	2.2	-	-
40-44	3.5	4.7	2.4	4.1	5.4	2.8	-	-
45-49	4.7	6.5	3.0	5.3	7.3	3.4	-	-
50-54	6.2	8.7	3.9	7.1	9.9	4.4	-	-
55-59	7.7	11.2	4.7	8.7	12.6	5.3	-	-
60-64	10.2	15.2	6.3	11.4	16.9	6.9	-	-
65-69	12.7	20.0	7.6	14.0	21.9	8.3	-	-
70-74	15.0	24.2	9.5	16.3	26.3	10.2	-	-
75-79	18.0	30.2	12.8	19.5	33.0	13.7	-	-
80-84	-	-	-	-	-	-	-	-
85+	-	-	-	-	-	-	-	-

^a SEER 17 areas. Rates are per 100,000 and are age-adjusted to the 2000 US Std Population (19 age groups - Census 725-1130), unless noted.
^b NCI's public use data file for the total US. Rates are per 100,000 and are age-adjusted to the 2000 US Std Population (15 age groups - Census 725-1130), unless noted.
^c Rates are per 100,000 and are age-adjusted to the IARC world standard population.
^d Statistic not shown. Rate based on less than 16 cases for the time interval.

Abbildung 14: Inzidenz und Todesraten von Melanompatienten in Abhängigkeit vom Alter

4.2 Methodik

Im Rahmen der vorliegenden Studie kamen unterschiedliche moderne „state of the art“-Verfahren zum Einsatz.

Bei der **Denaturierende Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie** (**Denaturing High Performance Liquid Chromatography**) handelt es sich um eine schnelle, weitgehend automatisierte und ökonomische Hochdurchsatz-Methode für die Analyse von DNA-Fragmenten und für das Screening nach DNA-Sequenzveränderungen. DHPLC zeichnet sich vor allem durch eine hohe Sensitivität und Spezifität aus. Studien zu diesen Parametern ergaben Werte von bis zu 100% (*O'Donovan et al., 1998*). Nachteile dieser Methode sind neben der hohen Sensibilität der Kunststoffsäule und der Puffer die Tatsache, dass zur Detektion der genauen Mutationsstelle und der exakten Nukleotidabfolge weitere Analysen wie Klonierung oder Sequenzierung notwendig sind (*Xiao und Oefner, 2001*).

Die **direkte DNA-Sequenzierung** wird nach wie vor als „Goldstandard“ bei der Suche nach Sequenzvariationen und Mutationen angesehen. Bei dieser Methode kann der DNA-Code eines bestimmten DNA-Fragmentes direkt als Buchstabenfolge der vier Nukleotide abgelesen werden. Da es sich im Vergleich zur DHPLC um eine kosten- und zeitaufwendigere Methode handelt, wurde die direkte Sequenzierung im ersten Teil dieser Studie nur auf die in der DHPLC auffälligen Proben angewendet.

Im Verlauf der vorliegenden Studie ergab sich die Möglichkeit, zusammen mit dem deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) in Heidelberg einen Vergleichsdatensatz von allen Proben aus einer direkten Sequenzierung auszuwerten. Dabei zeigte sich, dass dem „Goldstandard Sequenzierung“ der Vorrang einzuräumen ist, da hierbei eine vierte Sequenzveränderung identifiziert werden konnte, die bei der DHPLC unentdeckt blieb. Bei einer angenommenen Sensitivität der Sequenzierungsmethode von 100% läge diese bei der DHPLC nur bei 75%.

Molekulargenetische Assoziationsstudien von SNPs haben zum Ziel, Kopplungen zwischen häufigen genetischen Sequenzvariationen und einem erhöhten Krankheitsrisiko zu identifizieren. Hierfür stehen unterschiedliche

technische Verfahren zur Verfügung. Im Bereich der Hochdurchsatz-Genotypisierung sind dies in erster Linie MALDI-TOF-Massenspektroskopie, DHPLC, Pyrosequenzierung, Fluoreszenz-Kapillarelektrophorese und DNA-Chip-Technologien auf der Basis immobilisierter SNP-spezifischer Primer (Mohlke et al., 2002).

In der vorliegenden Studie wurde die MALDI-TOF-Massenspektroskopie angewandt. Bei diesem Verfahren handelt es sich um eine vollautomatische, schnelle Methode mit einem hohen Probendurchsatz, die aufgrund von standardisierten Testkonditionen und Software-unterstützter Interpretation zuverlässige und vergleichbare Resultate liefert. Aufgrund des hohen Automatisierungsniveaus ist sie weitgehend unabhängig von menschlichen Arbeitsfehlern. Nachteile dieser Methode sind, dass die zu analysierende Fragmentlänge klein sein muss (< 30 Basen), die DNA-Proben einen sehr hohen Reinheitsgrad aufweisen müssen und dass die Nachweisempfindlichkeit geringer ist als bei manchen Fluoreszenzmethoden.

Bei der **Rekonstruktion und Analyse der Haplotypen** kam die von Stephens et al. entwickelte Methode zur Anwendung. Die derzeit gängigen Hochdurchsatz-Genotypisierungstechnologien sind zwar in der Lage, jeweils beide Allele eines bestimmten Genlokus zu bestimmen, sie liefern jedoch keine Informationen zu den möglichen Haplotypenkombinationen, das heißt, welche Allelkombinationen auf jedem der beiden Chromosomen eines diploiden Individuums vorliegen. Die Kenntnis der Haplotypen kann jedoch im Rahmen von Assoziationsstudien sehr aufschlussreich sein, da genetische Vererbung auf Transmission und Rekombination chromosomaler Segmente beruht. Haplotypeninformationen können zum einen experimentell bzw. durch Genotypisierung weiterer Familienmitglieder erlangt werden, zum anderen stehen Zeit und Kosten sparende statistische Methoden zur Verfügung, die direkt auf die Genotypisierungsdaten anwendbar sind und mit Hilfe von Computerprogrammen die Haplotypen rekonstruieren können. Bei der in dieser Studie angewendeten Methode von Stephens et al. handelt es sich um eine Bayesische Methode, die mit Hilfe des Softwareprogramm PHASE (Version 1.0) umgesetzt wurde.

Bayesische Haplotyp-Rekonstruktionsmethoden behandeln unbekannte Haplotypen als Randquantitäten und kombinieren so genannte „*prior informations*“ (Informationen aus den untersuchten Daten) mit der „*likelihood*“ (Annahmen über die in der Population anzutreffenden Haplotypenmuster), um die Beteiligung der unbeobachteten Haplotypen an den erhaltenen Genotypisierungsdaten zu kalkulieren. Die Haplotypen selbst können dann abgeschätzt werden, indem z.B. die wahrscheinlichste Haplotypenrekonstruktion für jedes Individuum gewählt wird (*Stephens et al., 2001; Stephens und Donnelly, 2003*).

4.3 Sequenzvariationen in *NBS1*- Exon 6

Im Rahmen dieser Studie wurde zunächst Exon 6 des *NBS1*-Gens auf Mutationen und Sequenzveränderungen hin untersucht. Eine Konzentration auf diesen Genabschnitt erfolgte, weil die mit Abstand am häufigsten in diesem Gen aufgefundene „founder mutation“ des Nijmegen Breakage Syndroms, 657del5, hier lokalisiert ist (siehe Abbildung 15). Diese Mutation ist in homozygoter Ausprägung die Ursache für die Symptome von NBS-Patienten. Besonders bedeutsam sind dabei u.a. die auffälligen Hautveränderungen sowie die Prädisposition zur Erkrankung an malignen Tumoren. Eine Assoziation zum malignen Melanom der Haut schien daher möglich zu sein.

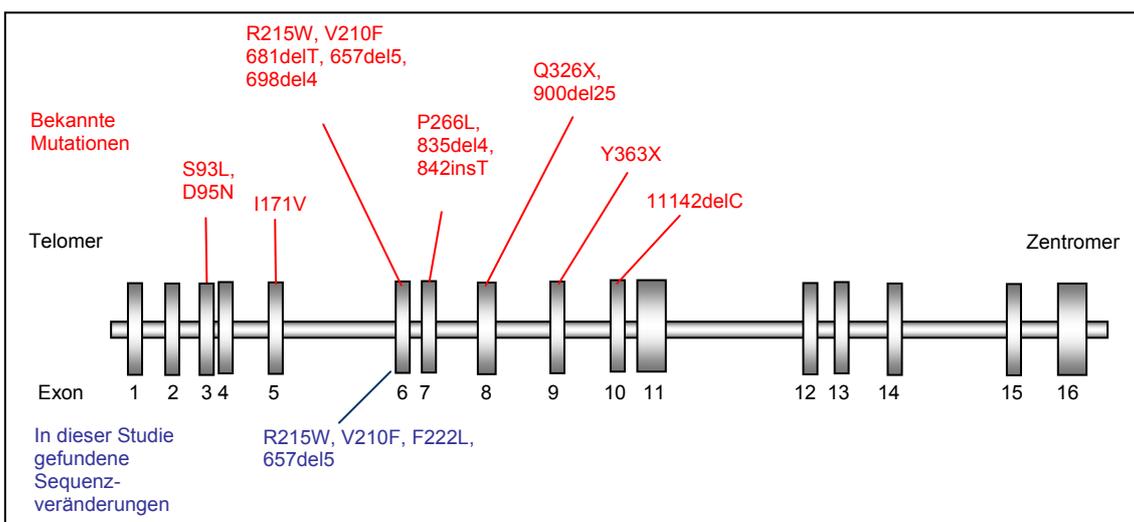


Abbildung 15: Exon-Intron-Darstellung der bekannten Mutationen im *NBS1*-Gen

Bei der Analyse der 376 Patienten-DNA-Proben wurden folgende heterozygote Sequenzvariationen identifiziert:

1. 657del5 (657del ACAA)

2. V210F (G628T)

3. R215W (C643T)

4. F222L (C664T)

Die Aminosäuren Valin, Leucin und Phenylalanin, die in den Missense-Mutationen V210F und F222L ausgetauscht werden, sind hydrophobe AS mit apolaren Seitenketten. Bei R215W wird dagegen Arginin, eine stark basische Aminosäure mit polarer, basischer Seitenketten, gegen Tryptophan, eine heterozyklische AS mit apolarer Seitenkette, ausgetauscht.

Bei allen drei Nukleotid austauschen handelt es sich nicht um synonyme Mutationen, da durch die Veränderung der Nukleotidabfolge aufgrund des genetischen Codes andere Aminosäuren in das Genprodukt eingebaut werden.

Die 657del5-Mutation:

Bei dieser Mutation handelt es sich um die so genannte slawische „founder mutation“ des Nijmegen Breakage Syndroms, die bei 90% der NBS-Patienten homozygot gefunden wurde. Hier führt die Deletion von 5 Nukleotiden zu einer Verschiebung des Leserasters an Position 657 der cDNA, was der AS-Nummer 219 entspricht. In der Folge entsteht ein Stoppcodon an Position 732 der cDNA (AS Nr. 241) (siehe Abbildung 7, S. 43). Infolgedessen kommt es zu einem vorzeitigen Abbruch der Aminosäurekette des Nibrinmoleküls und es resultiert ein verkürztes, 26-kD großes, N-terminales Genprodukt, das in seiner Funktion als Bestandteil des Mre11/RAD50/NBS1-Komplexes stark eingeschränkt ist. Maser et al. fanden jedoch heraus, dass in NBS-Lymphoblasten neben diesem verkürzten Genprodukt ein weiteres, C-terminales Polypeptid gebildet wird, dessen Produktion durch interne Translation innerhalb der mRNA von *NBS1* initiiert wird. Diese Translationsinitiation beginnt an einem neuen ORF (open reading frame), welches durch die deletionsbedingte Leserasterverschiebung entsteht.

Während das N-terminale Protein (26-kD) physikalisch nicht an Mre11 binden kann, ist das 70-kD große C-terminale Protein (p70) dazu in der Lage. Die Autoren folgern daraus, dass die 657del5-Mutation ein so genanntes „hypomorphes Allel“ bildet, dass die essentiellen Funktionen des Mre11/RAD50/NBS1-Komplexes gewährleistet, die nicht-essentiellen Funktionen jedoch durch den fehlenden N-Terminus nicht erfüllt werden (*Lee et al., 2003; Maser et al., 2001*).

Im homozygoten Zustand führt die 657del5-Mutation zu den bekannten Symptomen des Nijmegen Breakage Syndroms (*Varon et al., 1998*). Ein heterozygoter Auftreten konnte gehäuft bei Patienten mit Brustkrebs (*Gorski et al., 2003*) und malignen Melanomen (*Debniak et al., 2003*) festgestellt, wobei die statistische Aussagekraft aufgrund der relativ geringen Probandenanzahl eingeschränkt war. Weiterhin wurde in einer groß angelegten Studie in Polen die 657del5-Mutation mit Hilfe von PCR-SSCP (single strand conformation polymorphism) und direkter Sequenzierung bei 4/105 Melanompatienten ($P=0,0081$), 4/232 Brustkrebspatientinnen ($P=0,0795$), 3/246 Patienten mit Kolorektalkarzinomen ($P=0,2197$) und 2/49 Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphomen ($P=0,0351$) heterozygot gefunden. Stammbaumanalysen ergaben weiterhin, dass 2 erstgradige Verwandte von *NBS1*-heterozygoten Melanompatienten und ein zweitgradiger Verwandter einer *NBS1*-heterozygoten Patientin mit Gebärmutterkrebs ebenfalls an Melanomen erkrankt waren. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass in dieser Population heterozygote Träger der 657del5-Mutation ein erhöhtes Risiko haben könnten, an Krebs- und insbesondere an Melanomen- zu erkranken (*Steffen et al., 2004*). Die 657del5-Mutation wurde mit einer Frequenz von 1/106 (*Drabek et al., 2002*) bzw. 1/177 (*Varon et al., 2000*) am häufigsten in der slawischen Population gefunden. Die Stammbaumanalyse des in der vorliegenden Studie identifizierten Melanomfalles ergab allerdings keine osteuropäische Herkunft.

Die V210F-Sequenzvariation:

Diese Nukleotidsubstitution wurde bereits zwei Mal im Exon 6 des *NBS1*-Gens gefunden. Im ersten Fall dienten Knochenmarksproben von 47

Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie als Untersuchungsmaterial. Die Analyse von *NBS1* erfolgte mittels PCR, DHPLC und der direkten Sequenzierung der auffälligen Proben und ein Patient wies die V210F-Mutation auf (*Varon et al., 2001*). In einer anderen Studie wurde das *NBS1*-Gen in Tumorzellen aus 91 Non-Hodgkin-Lymphomen sowie die genomische DNA von 154 Kontrollpersonen untersucht. Dabei erfolgten die Analysen mit PCR-SSCP und direkter Sequenzierung. Hier konnte die V210F-Mutation in einer der Tumorproben identifiziert werden (*Cerosaletti et al., 2002*).

Zu den funktionellen Auswirkungen dieser Sequenzvariation auf das Genprodukt gibt es in der Literatur keine Angaben. Da sie sich an Position 210 im Nibrinmolekül befindet, liegt sie in keinem der drei bislang bekannten funktionell wichtigen Bereiche des Proteins (N-Terminus: 1.-196. AS, zentrale Region: 278.-343. AS und C-Terminus: 666.- 693. AS) und somit auch nicht in der FHA- (forkhead-associated)-Domäne (24.-108. AS im N-Terminus) oder der BRCT- (breast cancer carboxy-terminal)-Domäne (108.-196. AS im N-Terminus). Es ist folglich nach dem derzeitigen Wissensstand eher unwahrscheinlich, dass diese Nukleotidsubstitution direkte Auswirkungen auf die Funktionsfähigkeit des Nibrinmoleküls hat.

Die R215W-Sequenzvariation:

Diese Sequenzvariante wurde erstmals bei 9 Probanden in einer slawischen Studienpopulation (*Varon et al., 2001*), sowie bei mehreren Leukämiepatienten (*Taylor et al., 2003*) entdeckt. Weiterhin deutet ein identifizierter LOH des *NBS1*-Wildtypallels in den Tumorzellen eines R215W-Trägers mit einem Hodgkin-Lymphom darauf hin, dass diese Variante pathogen sein könnte. Ein kausaler Effekt auf die Nibrinfunktionen bleibt jedoch weiterhin unklar (*Steffen et al., 2004*).

Die F222L-Sequenzvariation:

Diese Sequenzvariation in Exon 6 des *NBS1*-Gens wurde bisher in der Literatur noch nicht beschrieben. Für den Nachweis, dass es sich bei F222L nicht um einen häufigen Polymorphismus handelt, wurde im Rahmen dieser

Studie die DNA von weiteren 621 Melanompatienten und 590 Kontrollpersonen auf diese Sequenzvariante hin untersucht. F222L wurde in dieser Population nicht gefunden. Ferner wurde auch in nachfolgend aufgeführten Studien, in denen ebenfalls Exon 6 von *NBS1* analysiert wurde, F222L nicht gefunden:

- Varon et al.: Untersuchung genomischer DNA aus Guthrie-Karten von 4416 Neugeborenen mit PCR-SSCP, Gelelektrophorese und direkter Sequenzierung (Varon et al., 2000).

- Steffen et al.: DNA-Analyse von 1042 Krebspatienten mit PCR-SSCP (Steffen et al., 2004).

PCR-SSCP ermöglichte in diesen Studien nicht nur die Determination der 657del5-Mutation, sondern war auch für andere Variationen in Exon 6 sensibel (Steffen et al., 2004). Aus diesen Ergebnissen kann gefolgert werden, dass es sich bei der neu entdeckten F222L-Nukleotidsubstitution nicht um einen Polymorphismus handelt. Aufgrund der geringen Datenmenge, die zu dieser neuen Sequenzvariation vorliegt, ist es sinnvoll, sie als so genannte „**unclassified variant**“ einzuordnen. Segregationsanalysen in der betroffenen Familie und LOH-Analysen im Tumor könnten weitere Aufschlüsse über die funktionelle Konsequenz dieser Sequenzvariante geben.

Die drei Aminosäuresubstitutionen V210F, R214W und F222L sowie die “founder mutation” 657del5 sind in keiner der drei bekannten funktionellen Regionen des Nibrinmoleküls (N-Terminus (1.-196. AS) mit FHA-Domäne (24.-108. AS) und BRCT-Domäne (108.-196. AS), zentrale Region (278.- 343. AS), C-Terminus (666.- 693. AS)) lokalisiert (Kobayashi et al., 2004). Es ist jedoch auffällig, dass sich alle vier Varianten in der Nähe der BRCT-Domäne befinden. Da die Funktionen von Nibrin bislang nur teilweise bekannt sind, kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch andere Bereiche des Proteins von funktioneller Bedeutung sind. Nukleotidaustausche in dem Bereich von AS 197 bis AS 277, in dem die gefundenen Sequenzveränderungen liegen, könnten Veränderungen der räumlichen Struktur des Nibrinmoleküls verursachen und so indirekt die Funktion seiner FHA/BRCT-Regionen beeinflussen oder seine Phosphorylierung stören. Dies hätte möglicherweise funktionelle Defizite des

Genproduktes im zellulären Kontrollmechanismus zur Folge und könnte von klinischer Relevanz sein.

Frequenz:

Die vorliegende Studie ergab folgende Frequenz von heterozygoten *NBS1*-

Mutationen: 657del5-Mutation: **1/ 376**

V210F-Variante: **1/ 376**

R214W-Variante: **1/ 376**

F222L-Variante: **1/ 376**

Die Häufigkeit liegt somit jeweils <1% und scheint damit von geringer statistischer Relevanz zu sein. Aufgrund der Konzentration auf Exon 6 des *NBS1*-Gens im Rahmen der vorliegenden Studie bleibt offen, ob eine Analyse des kompletten *NBS1*-Gens eine signifikant höhere Mutationsfrequenz ergeben hätte, die dann einen Unterschied zwischen dem Melanompatientengut und der Allgemeinbevölkerung aufgezeigt hätte.

Die Frequenz der 657del5-Mutation in der deutschen Bevölkerung wurde mit ASO (allele specific oligonucleotide hybridization assay) bestimmt und ergab eine Häufigkeit von **1/866** (95%CI = 1/34,376 zu 1/156). Daraus wurde die Häufigkeit von NBS auf 1 in 3 Millionen Personen geschätzt (*Carlomagno et al., 1999*). Die mittlere Frequenz von 657del5 in der slawischen Bevölkerung beträgt **1/177**. Dabei sind es speziell in der tschechischen Bevölkerung 1/154, in der polnischen 1/190 und in der ukrainischen Bevölkerung 1/182 (*Varon et al., 2000*). Eine Studie speziell der tschechischen Bevölkerung ergab sogar eine Frequenz der 657del5-Mutation von 1/106 (95%CI = 1/331 zu 1/46) (*Drabek et al., 2002*). Die in der vorliegenden Studie ermittelte Frequenz der 657del5 liegt demnach in der Größenordnung der bislang ermittelten Bevölkerungsdaten und zeigt keine signifikante Häufung in der süddeutschen Bevölkerung und in der Gruppe der untersuchten Melanompatienten.

Für eine mögliche anschließende molekulargenetische Assoziationsstudie zum Zusammenhang der 657del5-Mutation und der Melanomerkrankung, wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für Medizinische Biometrie der Universität

Tübingen in einer Fallzahlplanung für einen χ^2 -Test die benötigte Stichprobenanzahl mit Hilfe der folgenden Formel berechnet:

$$m = \left[z_{1-\alpha} \sqrt{\{(r+1) \pi' (1 - \pi')\}} + z_{1-\beta} \sqrt{\{r \pi_1 (1 - \pi_1) + \pi_2 (1 - \pi_2)\}} \right]^2 / r \delta^2$$

m= benötigte Stichprobenanzahl

z= Quantil der Normalverteilung

$z_{1-\alpha}$ = 1,96 (Tabellenwert)

$z_{1-\beta}$ = 0,53 (Tabellenwert)

π_1 = Wahrscheinlichkeit, dass ein Patient die Mutation hat; hier 1/376

π_2 = Wahrscheinlichkeit, dass eine Kontrollperson die Mutation hat

(Berechnung: $\pi_2 = \pi_1 / OR (1 - \pi_1) + \pi_1$; Odds Ratio (OR) hier 1,5 bzw. 5

π_2 bei OR=1,5: 0,00177 und π_2 bei OR= 5: 0,00053)

r= Verhältnis von Anzahl der Patienten zu Anzahl der Kontrollpersonen; hier r=1

α = Fehlerwahrscheinlichkeit 1. Art, üblicherweise 0,05

β = Fehlerwahrscheinlichkeit 2. Art, üblicherweise 0,2

$\pi' = (\pi_1 + r \pi_2) / (r+1)$

$\delta = \pi_2 - \pi_1$

(Machin und Campbell, 1987)

Mit den Screeningdaten der 376 Melanompatienten ergaben die Berechnungen, dass bei einem „odds ratio“ von 5 sowohl in der Fall- als auch in der altersgleichen Kontrollgruppe 5.561 Personen in die Studie einbezogen werden müssten. Wenn ein „odds ratio“ von 1,5 als signifikant angesehen werden sollte, bräuchte man in jeder der beiden Gruppen sogar 44.635 Personen. Aufgrund der hohen benötigten Personenzahlen wurde diese Strategie im Rahmen dieser Studie nicht weiter verfolgt, sondern vielmehr die Untersuchung einer generellen Assoziation des *NBS1*-Gens mit der Melanomerkrankung im Rahmen einer Fall-Kontroll-Studie mit 3 SNPs innerhalb dieses Gens umgesetzt.

4.4 Assoziation zwischen *NBS1* und der Melanomerkrankung

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte molekulargenetische Assoziationsstudie mit den SNPs rs9995, rs867185 und rs1063045 umfasste neben der Genotypisierung der vier DNA-Pools die individuelle Genotypisierung sowie Haplotypenanalysen jedes Studienteilnehmers. Die statistische Auswertung der Daten ergab weder für die Genotypen der SNPs noch für deren

rekonstruierte Haplotypen eine signifikante Differenz zwischen Patientenfällen und Kontrollen. Diese Daten lassen demzufolge nicht auf eine Assoziation zwischen dem untersuchten Gen und der Melanomerkrankung schließen. Zahlreiche Studien haben in den letzten Jahren gezeigt, dass Keimbahnmutationen im *NBS1*-Gen mit verschiedenen Krebserkrankungen assoziiert sind, wobei insbesondere akute lymphoblastischer Leukämie (ALL) (*Varon et al., 2001*), Brustkrebs (*Gorski et al., 2003*) und Prostatakrebs (*Cybulski et al., 2004*) zu nennen sind. In der Melanomstudie von *Debniak et al.* wurde bei 2/80 Patienten und 3/530 Kontrollen die 657del5-Mutation heterozygot gefunden. Statistische Analysen mit Fischer- und χ^2 -Tests ergaben, dass daraus keine signifikante Assoziation abzuleiten ist (Fischer-Test, $P=0,1305$, $\chi^2=1,261$, $P=0,262$). Da jedoch LOH-Analysen in beiden Melanomfällen einen Verlust des Wildtyp-Allels in den Tumorzellen aufzeigten, wurde gefolgert, dass *NBS1* in einzelnen Fällen gemäß der Knudson-Hypothese an der Melanomentstehung beteiligt sein könnte (*Debniak et al., 2003*). Die oben erwähnte polnische Krebsstudie ergab die höchste Frequenz von heterozygoten 657del5-Trägern (4/105; 3,8%) in der Gruppe der Melanompatienten, woraus gefolgert wurde, dass *NBS1* durchaus in einer kleinen Zahl von Fällen an der Melanomentstehung beteiligt sein könnte. Eine generelle Assoziation zwischen *NBS1* und Melanomprädisposition leitete man hieraus jedoch nicht ab (*Steffen et al., 2004*).

Das Ergebnis der vorliegenden Studie steht in Übereinstimmung mit den vorangegangenen Studien. Tumormaterial stand für die Durchführung von LOH-Analysen nicht zur Verfügung. In der vorliegenden Studie können deshalb keine weitere Aussage darüber gemacht werden, ob das Wildtyp-Allel im Tumor zusätzlich zur Keimbahnmutation auf dem zweiten Allel verändert vorlag.

Es ist weiterhin anzumerken, dass durch das Mutationsscreening in *NBS1*-Exon 6 und durch die Assoziationsstudie epigenetische Phänomene oder allelische Heterogenität im *NBS1*-Gen nicht erfasst werden können. Es wäre daher möglich, dass das Gen durch viele seltene Veränderungen an der Melanomentstehung beteiligt ist.

4.5 Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Studie wurden bei 4 von 376 Melanompatienten Sequenzveränderungen in Exon 6 von *NBS1* gefunden, die Frequenz der entdeckten Mutationen liegt also unter 1%.

Die neu entdeckte Sequenzvariation F222L wurde in einer weiteren Studienpopulation aus 621 Melanompatienten und 590 Kontrollpersonen nicht gefunden und kann somit als häufiger Polymorphismus ausgeschlossen werden.

Die Assoziationsstudie, die auf 3 SNPs innerhalb des *NBS1*-Gens basierte, sowie die Analyse der rekonstruierten Haplotypen ergab keine statistisch signifikante Assoziation zur Melanomerkrankung. Demzufolge scheint das *NBS1*-Gen an der Melanomentwicklung, wenn überhaupt, nur in einem geringen Maße beteiligt zu sein.

Wenn die genetischen Ursachen des Melanoms in Defekten des DNA-Reparaturmechanismus nach UV-Bestrahlung zu suchen sind, so spielen hier vermutlich andere Gene eine zentrale Rolle. In den speziellen Patientenfällen könnte jedoch ein Zusammenhang zwischen den aufgefundenen Mutationen und der Melanomerkrankung angenommen werden. Diese Hypothese müsste jedoch durch weiterführende Untersuchungen (LOH-Analysen) untermauert werden. In diesem Fall könnte *NBS1* (ebenso wie die in Abschnitt 1.1.3 aufgeführten MC1R-Varianten (*Valverde et al., 1996*)) als Prädispositionsgen für maligne Melanome bezeichnet werden.

4.6 Ausblick

Mögliche weiterführende Untersuchungen der Mutationsfolgen

Um konkret die Auswirkungen der Mutationen auf die Funktionen des *NBS1*-Produktes überprüfen zu können, müssten weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Dabei kann man sich an den bekannten zellulären Merkmalen des NBS wie erhöhte chromosomale Instabilität, erhöhte Strahlensensibilität und defekte Immunglobuline orientieren und nach Funktionsausfällen durch die entdeckten Mutationen im heterozygoten Zustand

suchen. Dazu stehen verschiedene Untersuchungsansätze zu Verfügung (*Chrzanowska und Janniger, 2006*).

Immunologische Testverfahren: Defekte in *NBS1* verursachen eine Chromosomeninstabilität und in der Folge treten gehäuft Chromosomenbrüche im Bereich der Gene für die Immunglobuline IgG und IgA auf (siehe Kapitel 1.2). Die Funktionsfähigkeit dieser Antikörper wird also indirekt durch Mutationen in *NBS1* beeinflusst und bei der Untersuchung spezieller Mutationsfolgen sollten daher insbesondere diese Immunglobuline auf ihre Funktion hin geprüft werden. Weiterhin ist beim NBS in erster Linie die T-Zell-Immunität gestört. Eine Bestimmung der Anzahl von CD3⁺-Zellen und der CD4⁺-Helferzellen, sowie des CD4⁺/CD8⁺-Verhältnisses könnte Rückschlüsse auf mögliche Mutationsauswirkungen zulassen.

Zelluläre Analysen: Um die Reaktion der Zellen auf ionisierende Bestrahlung zu untersuchen werden in der Regel Lymphozyten und Fibroblasten nach der Bestrahlung mit so genannten CSAs (colony survival assays) auf eine möglicherweise erhöhte Sensitivität oder eine erhöhte Rate von Chromosomenbrüchen hin untersucht. DNA-Replikationsanalysen zeigen das Vorkommen von RDS auf und Immunfluoreszenzanalysen liefern Informationen über die Bildung nukleärer Foki (IRIF) durch den Mre11/Rad50/Nibrin-Komplexes infolge ionisierender Bestrahlung (*Carney et al., 1998*). Weiterhin kann mit Methoden wie Western Blot-Technik, Immunpräzipitationen mit spezifischen farbmarkierten Antikörpern, Massenspektrographien und Gelfiltrationschromatographien das Genprodukt Nibrin sowie dessen Interaktionen mit Mre11 und Rad50 im M/R/N-Komplex untersucht werden (*Carney et al., 1998*).

Was die Assoziationsanalyse betrifft, so wurden im Rahmen dieser Studie mit Genotypisierung von DNA-Pools, Individualgenotypisierung und Haplotypenrekonstruktionen alle derzeit üblichen Untersuchungsmethoden weitgehend durchgeführt. Um weitere Informationen über eine mögliche Assoziation zwischen Mutationen im *NBS1*-Gen und der Melanomerkrankung zu erhalten, könnte die Durchführung einer **Segregationsanalyse** diskutiert werden. Dabei werden möglichst umfangreiche Familiendaten gesammelt und mit Hilfe eines

statistischen Verfahrens ausgewertet. Ziel der Untersuchung ist es festzustellen, ob zum Beispiel eine bei einem Indexpatienten gefundene Sequenzvariation in der betreffenden Familie mit der Erkrankung oder einem Vorläufer der Erkrankung segregiert. Generell werden Segregationsanalysen für die Untersuchung von Erbgangshypothesen verwendet, wobei man zwischen einfachen und komplexen Segregationsanalysen unterscheidet. In den klassischen, einfachen Modellen wird dabei getestet, ob die als Hypothese angenommene Segregation eines Einzelgens bzw. einer Sequenzvariante entsprechend den Mendelschen Gesetzen mit den in den aufeinanderfolgenden Generationen auftretenden Phänotypen in Einklang zu bringen ist. Komplexe Segregationsanalysen dagegen beruhen auf Likelihood-Methoden und erlauben zum einen den Test auf monogene, polygene und gemischt monogen-polygene Erbgänge, zum anderen ermöglichen sie es, das Auftreten von Hauptgenen, bei denen mehrere Genkombinationen der Eltern möglich sind, zu testen (*Bonney et al., 1988 ; Elston, 1992*).

Da in der vorliegenden Studie die Stammbaumanalysen der drei Patienten, bei denen Mutationen in Exon 6 von *NBS1* gefunden wurden, ergaben, dass in der näheren Verwandtschaft keine Melanomfälle aufgetreten waren, könnte die Datenerhebung z.B. auf das Vorkommen und die Anzahl dysplastischer Nävi erweitert werden. Möglicherweise segregieren Sequenzveränderungen im *NBS1*-Gen mit diesen Melanompräkursoren.

Gemäß den Leitlinien der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft (DDG) (<http://awmf.org/> → <http://leitlinien.net/> → *AWMF-Leitlinien-Register Nr. 013/045*) zählen die Familienmitglieder von Patienten mit malignen Melanomen zu Risikopersonen, die einer eingehenden Überwachung bedürfen. Dabei sollten durch einen speziell dafür qualifizierten Arzt jährliche oder halbjährliche Screening-Untersuchungen der Haut und speziell von melanozytären Nävi mittels Auflichtmikroskopie durchgeführt werden. Weiterhin gelten insbesondere für diese Personen die allgemeinen Regeln zur Hautkrebsprävention, die unter anderem durch die Sektion Dermatologische Onkologie der Universitäts-Hautklinik der Eberhard-Karls-Universität Tübingen in Zusammenarbeit mit dem „Südwestdeutschen Tumorzentrum- Comprehensive Cancer Center Tübingen“

unter dem Motto „Im Schatten ist die Sonne am schönsten- Sonne mit Vernunft“ formuliert wurden (<http://www.dermonko.de/arbeitsbereiche/melanomnachsorge.html>; <http://www.medizin.uni-tuebingen.de/itz/itzsonne.html>). Zu der primären Prävention gehören neben dem Schutz der Haut vor UV-Strahlung durch Sonnenschutzmittel und ausreichende Bekleidung, Selbstbeobachtungen der Haut auf Veränderungen hin, sowie möglichst jährliche Kontrollen durch einen Dermatologen. Da die Bedeutung von Mutationen im *NBS1*-Gen bei Patienten mit Melanomen bisher nicht abschließend geklärt werden konnte, können für heterozygote Mutationsträger keine abweichenden Empfehlungen gegeben werden. Sie sollten jedoch als Risikopersonen die geltenden präventiven Massnahmen unbedingt einhalten und unter intensiver dermatologischer Beobachtung stehen.

Bedeutung der genetischen Melanomforschung für Diagnostik und Gentherapie

Die Suche nach Prädispositionsgenen ist auch in Bezug auf die genetische Diagnostik und Therapie des malignen Melanoms von Bedeutung. Die Entwicklung molekulargenetischer Tests für Mutationen in bekannten Prädispositionsgenen würde die frühe Diagnose eines erhöhten Melanomrisikos ermöglichen und zu einer gezielten Vermeidung weiterer Risikofaktoren beitragen. Aus gentherapeutischer Sicht ist die Erforschung der genetischen Ursachen des malignen Melanoms insbesondere für die somatische Gentherapie von Interesse, da im Falle dieser Hauterkrankung ein direkter Zugang zu den betroffenen Zellen über Salben, Auflagen oder kutaner Injektionen möglich ist. Die grundlegende Idee der somatischen Gentherapie besteht zum einen darin, intakte Gene in die defekten somatischen Körperzellen einzubringen, um so den Krankheitsverlauf aufzuhalten oder zumindest zu verlangsamen. Zum anderen werden Gene oder sogar ganze Chromosomen eingesetzt, die die Funktion des im betreffenden Patienten veränderten Gens günstig beeinflussen. Zum Erreichen dieser zukunftsorientierten Ziele können Studien wie die hier vorgelegte beitragen, indem bekannte Tumorsuppressorgene als Prädispositionsgene charakterisiert werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Das maligne Melanom weist in ca. 10% der Fälle eine familiäre Häufung auf und es konnten bislang nur für einen Teil dieser Fälle die zugrunde liegenden Gene bzw. Mutationen identifiziert werden. Die Suche konzentriert sich daher weiterhin auf Onkogene und Tumorsuppressorgene, zu denen auch das *NBS1*-Gen zählt. Homozygote Mutationen im *NBS1*-Gen verursachen das Nijmegen Breakage Syndrom (NBS), eine seltene autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung, die zu der Gruppe der „Chromosomenbruchsindrome“ gehört. Das *NBS1*-Genprodukt Nibrin ist als Teil des Mre11/Rad50/Nibrin-Komplexes unter anderem am DNA-Reparaturmechanismus beteiligt. Die Tatsache, dass UV-Strahlung eine entscheidende Rolle in der Melanomgenese spielt und NBS-Patienten eine erhöhte Strahlungssensibilität sowie Hautveränderungen aufweisen, führte zu der Fragestellung, ob Sequenzveränderungen im *NBS1*-Gen bei Melanompatienten gehäuft auftreten und somit mit einem erhöhten Melanomrisiko in Zusammenhang stehen könnten. Heterozygote Träger von *NBS1*-Mutationen könnten demzufolge z.B. überempfindlich auf diagnostische Röntgenstrahlung oder Strahlentherapie reagieren und es wäre denkbar, dass in ihren Zellen die Reparatur UV-vermittelter DNA-Schäden nur ungenügend erfolgt.

Im Rahmen dieser Studie wurde daher in einem ersten Schritt die genomische DNA von 376 Melanompatienten auf Mutationen in *NBS1*-Exon6 hin untersucht, da hier am häufigsten Mutationen auftreten. Für die Untersuchungen wurde dieses Exon mittels Polymerase Chain Reaction (PCR) amplifiziert und mit Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC) analysiert. Auffällige Proben wurden anschließend direkt sequenziert. Die Analysen identifizierten Sequenzveränderungen in drei Fällen, wobei ein Patient heterozygot für die *NBS1*-Grundmutation 657del5 war. Der zweite Patient wies die Missense-Mutation V210F (628G→T) auf, welche bereits bei Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphomen und akuter lymphatischer Leukämie beschrieben wurde. Bei einem dritten Patienten konnte die Aminosäuresubstitution F222L (664T→C), die bislang noch nie beschrieben wurde, heterozygot nachgewiesen werden. Eine Vergleichsstudie desselben Patientengutes mit direkter

Sequenzierung konnte zusätzlich bei einem Patienten die Punktmutation R215W identifizieren. Die Frequenz der Sequenzvariationen im untersuchten Patientengut lag jeweils unter 1%.

Um die neu entdeckte Sequenzvariante F222L als Polymorphismus auszuschließen, wurde in einem zweiten Studienabschnitt ein Kollektiv aus 629 Melanompatienten und 590 Kontrollpersonen mittels MassEXTEND/MALDI-TOF-Analysen auf diese Einzelnukleotidsubstitution hin untersucht. Da sie bei keiner der getesteten Personen gefunden werden konnte, wurde F222L als nicht-krankheitsassoziierte „unklassifizierte Variante“ eingestuft.

Um schließlich den generellen Zusammenhang zwischen dem *NBS1*-Gen und der Melanomerkrankung zu analysieren, wurde in einem dritten Schritt im Rahmen einer molekulargenetische Assoziationsstudie eine Studienpopulation aus 632 deutschen Melanompatienten und 615 deutschen Kontrollpersonen untersucht. Drei aus der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) ausgewählte SNPs innerhalb des *NBS1*-Gens dienten dabei als Marker und wurden nach MassEXTEND-Primerextension mittels MALDI-TOF-Massenspektroskopie sowohl in vier DNA-Pools als auch für jedes Individuum einzeln genotypisiert. Eine Haplotypenrekonstruktion und –analyse mit Hilfe des Softwareprogrammes PHASE (Version 1.0) lieferte weitere molekulargenetische Informationen zu der Studienpopulation. Alle Analysen ergaben dasselbe Ergebnis: es konnte keine statistisch signifikante Assoziation zwischen dem *NBS1*-Gen und der Melanomerkrankung festgestellt werden. Daraus wird gefolgert, dass dieses Tumorsuppressorgen in der deutschen Bevölkerung keinen starken Einfluss auf eine Erhöhung des Melanomrisikos hat. Da aufgrund von mangelndem Tumormaterial der Patienten mit Sequenzvarianten in Exon 6 von *NBS1* keine LOH-Analysen durchgeführt werden konnten, bleibt die Frage offen, ob in diesen Einzelfällen die entdeckten DNA-Veränderungen an der Entwicklung der Melanomerkrankung ursächlich beteiligt waren. Weiterhin können aufgrund dieser Untersuchungsergebnisse keine Aussagen darüber getroffen werden, ob epigenetische Phänomene oder allelische Heterogenität von *NBS1* zu einer erhöhten Melanomprädisposition beitragen.

6 ANHANG

6.1 Literaturverzeichnis

1. Auroy,S., Avril,M.F., Chompret,A., Pham,D., Goldstein,A.M., Bianchi-Scarra,G., Frebourg,T., Joly,P., Spatz,A., Rubino,C., Demenais,F., Bressac-de Paillerets,B. (2001). Sporadic multiple primary melanoma cases: CDKN2A germline mutations with a founder effect. *Genes Chromosomes. Cancer* 32, 195-202.
2. Bansal,A., van den,B.D., Kammerer,S., Honisch,C., Adam,G., Cantor,C.R., Kleyn,P., Braun,A. (2002). Association testing by DNA pooling: an effective initial screen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 16871-16874.
3. Bataille,V. (2003). Genetic epidemiology of melanoma. *Eur. J. Cancer* 39, 1341-1347.
4. Bataille,V., Bishop,J.A., Sasieni,P., Swerdlow,A.J., Pinney,E., Griffiths,K., Cuzick,J. (1996). Risk of cutaneous melanoma in relation to the numbers, types and sites of naevi: a case-control study. *Br. J. Cancer* 73, 1605-1611.
5. Bonney,G.E., Lathrop,G.M., Lalouel,J.M. (1988). Combined linkage and segregation analysis using regressive models. *Am. J. Hum. Genet.* 43, 29-37.
6. Box,N.F., Duffy,D.L., Chen,W., Stark,M., Martin,N.G., Sturm,R.A., Hayward,N.K. (2001). MC1R genotype modifies risk of melanoma in families segregating CDKN2A mutations. *Am. J. Hum. Genet.* 69 , 765-773.
7. Buslov,K.G., Iyevleva,A.G., Chekmariova,E.V., Suspitsin,E.N., Togo,A.V., Kuligina,E.S., Sokolenko,A.P., Matsko,D.E., Turkevich,E.A., Lazareva,Y.R., Chagunava,O.L., Bit-Sava,E.M., Semiglazov,V.F., Devilee,P., Cornelisse,C., Hanson,K.P., Imyanitov,E.N. (2005). NBS1 657del5 mutation may contribute only to a limited fraction of breast cancer cases in Russia. *Int. J. Cancer* 20;114, 585-589.
8. Carlomagno,F., Chang-Claude,J., Dunning,A.M., Ponder,B.A. (1999). Determination of the frequency of the common 657Del5 Nijmegen breakage syndrome mutation in the German population: no association with risk of breast cancer. *Genes Chromosomes. Cancer* 25, 393-395.
9. Carney,J.P., Maser,R.S., Olivares,H., Davis,E.M., Le Beau,M., Yates,J.R., III, Hays,L., Morgan,W.F., Petrini,J.H. (1998). The hMre11/hRad50 protein complex and Nijmegen breakage syndrome:

linkage of double-strand break repair to the cellular DNA damage response. *Cell* 93, 477-486.

10. Cerosaletti, K.M., Lange, E., Stringham, H.M., Weemaes, C.M., Smeets, D., Solder, B., Belohradsky, B.H., Taylor, A.M., Karnes, P., Elliott, A., Komatsu, K., Gatti, R.A., Boehnke, M., Concannon, P. (1998). Fine localization of the Nijmegen breakage syndrome gene to 8q21: evidence for a common founder haplotype. *Am. J. Hum. Genet.* 63, 125-134.
11. Cerosaletti, K.M., Morrison, V.A., Sabath, D.E., Willerford, D.M., Concannon, P. (2002). Mutations and molecular variants of the NBS1 gene in non-Hodgkin lymphoma. *Genes Chromosomes. Cancer* 35, 282-286.
12. Chrzanowska, K.H., Piekutowska-Abramczuk, D., Popowska, E., Gladkowska-Dura, M., Malyk, J., Syczewska, M., Krajewska-Walasek, M., Goryluk-Kozakiewicz, B., Bubala, H., Gadomski, A., Gaworczyk, A., Kazanowska, B., Koltan, A., Kuzmich, M., Luszawska-Kutrzeba, T., Maciejka-Kapuscinska, L., Stolarska, M., Stefanska, K., Sznurkowska, K., Wakulinska, A., Wieczorek, M., Szczepanski, T., Kowalczyk, J. (2006). Carrier frequency of mutation 657del5 in the NBS1 gene in a population of Polish pediatric patients with sporadic lymphoid malignancies. *Int. J. Cancer.* 118, 1269-1274.
13. Chrzanowska, K.H., Janniger, C.K. (2006), Nijmegen Breakage Syndrome. Last Update: 22. Februar 2006. ePublikation unter: <http://www.emedicine.com/DERM/topic725.htm>
14. Cybulski, C., Gorski, B., Debniak, T., Gliniewicz, B., Mierzejewski, M., Masojc, B., Jakubowska, A., Matyjasik, J., Zlowocka, E., Sikorski, A., Narod, S.A., Lubinski, J. (2004). NBS1 is a prostate cancer susceptibility gene. *Cancer Res.* 64, 1215-1219.
15. Debniak, T., Gorski, B., Cybulski, C., Jakubowska, A., Kurzawski, G., Lener, M., Mierzejewski, M., Masojc, B., Medrek, K., Kladny, J., Zaluga, E., Maleszka, R., Chosia, M., Lubinski, J. (2003). Germline 657del5 mutation in the NBS1 gene in patients with malignant melanoma of the skin. *Melanoma Res.* 13, 365-370.
16. Digweed, M., Sperling, K. (2003). *Molekularmedizinische Grundlagen von hereditären Tumorerkrankungen*, 3 Bde., Bd.3 : *Molekularmedizinische Grundlagen von hämatologischen Neoplasien*. Herausgeber: Ganten, D. und Ruckpaul, K. ISBN 3-540-41640-4. Springer-Verlag Berlin.
17. Drabek, J., Hajduch, M., Gojova, L., Weigl, E., Mihal, V. (2002). Frequency of 657del(5) mutation of the NBS1 gene in the Czech population by polymerase chain reaction with sequence specific primers. *Cancer Genet. Cytogenet.* 138, 157-159.

18. Elston,R.C. (1992). Segregation and linkage analysis. *Anim Genet.* 23, 59-62.
19. Frank,B., Hemminki,K., Wirtenberger,M., Bermejo,J.L., Bugert,P., Klaes,R., Schmutzler,R.K., Wappenschmidt,B., Bartram,C.R., Burwinkel,B. (2005). The rare ERBB2 variant Ile654Val is associated with an increased familial breast cancer risk. *Carcinogenesis.* 26, 643-647.
20. Fujimoto,A., Morita,R., Hatta,N., Takehara,K., Takata,M. (1999). p16INK4a inactivation is not frequent in uncultured sporadic primary cutaneous melanoma. *Oncogene.* 18, 2527-2532.
21. Gatei,M., Young,D., Cerosaletti,K.M., Desai-Mehta,A., Spring,K., Kozlov,S., Lavin,M.F., Gatti,R.A., Concannon,P., Khanna,K. (2000). ATM-dependent phosphorylation of nibrin in response to radiation exposure. *Nat. Genet.* 25, 115-119.
22. Gennery,A.R., Slatter,M.A., Bhattacharya,A., Barge,D., Haigh,S., O'Driscoll,M., Coleman,R., Abinun,M., Flood,T.J., Cant,A.J., and Jeggo,P.A. (2004). The clinical and biological overlap between Nijmegen Breakage Syndrome and Fanconi anemia. *Clin. Immunol.* 113, 214-219.
23. Goldstein,A.M., Fraser,M.C., Struewing,J.P., Hussussian,C.J., Ranade,K., Zametkin,D.P., Fontaine,L.S., Organic,S.M., Dracopoli,N.C., Clark,W.H. (1995). Increased risk of pancreatic cancer in melanoma-prone kindreds with p16INK4 mutations. *N. Engl. J. Med.* 333, 970-974.
24. Gorski,B., Debniak,T., Masojc,B., Mierzejewski,M., Medrek,K., Cybulski,C., Jakubowska,A., Kurzawski,G., Chosia,M., Scott,R., Lubinski,J. (2003). Germline 657del5 mutation in the NBS1 gene in breast cancer patients. *Int. J. Cancer* 106, 379-381.
25. Greene,M.H. (1999). The genetics of hereditary melanoma and nevi. 1998 update. *Cancer* 86, 2464-2477.
26. Hall,H.I., Miller,D.R., Rogers,J.D., Bewerse,B. (1999). Update on the incidence and mortality from melanoma in the United States. *J. Am. Acad. Dermatol.* 40, 35-42.
27. Halpern,A.C., Altman,J.F. (1999). Genetic predisposition to skin cancer. *Curr. Opin. Oncol.* 11, 132-138.
28. Halsall,J.A., Osborne,J.E., Potter,L., Pringle,J.H., Hutchinson,P.E. (2004). A novel polymorphism in the 1A promoter region of the vitamin D receptor is associated with altered susceptibility and prognosis in malignant melanoma. *Br. J. Cancer.* 91, 765-770.
29. Hayward,N.K. (2003). Genetics of melanoma predisposition. *Oncogene* 19;22, 3053-3062.

30. Hussussian,C.J., Struewing,J.P., Goldstein,A.M., Higgins,P.A., Ally,D.S., Sheahan,M.D., Clark,W.H., Jr., Tucker,M.A., Dracopoli,N.C. (1994). Germline p16 mutations in familial melanoma. *Nat. Genet.* 8, 15-21.
31. Hutchinson,P.E., Osborne,J.E., Lear,J.T., Smith,A.G., Bowers,P.W., Morris,P.N., Jones,P.W., York,C., Strange,R.C., Fryer,A.A. (2000). Vitamin D receptor polymorphisms are associated with altered prognosis in patients with malignant melanoma. *Clin. Cancer Res.* 6, 498-504.
32. Jackson,S., Harland,M., Turner,F., Taylor,C., Chambers,P.A., Rander-son-Moor,J., Swerdlow,A.J., dos,S.S., I, Beswick,S., Bishop,D.T., New- ton Bishop,J.A. (2005). No Evidence for BRAF as a melanoma/nevus susceptibility gene. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 14, 913-918.
33. James,M.R., Roth,R.B., Shi,M.M., Kammerer,S., Nelson,M.R., Stark,M.S., Dumenil,T., Montgomery,G.W., Hayward,N.K., Martin,N.G., Braun,A., Duffy,D.L. (2005). BRAF polymorphisms and risk of melano- cytic neoplasia. *J. Invest Dermatol.* 125, 1252-1258.
34. Jongmans,W., Vuillaume,M., Chrzanowska,K., Smeets,D., Sperling,K., Hall,J. (1997). Nijmegen breakage syndrome cells fail to induce the p53- mediated DNA damage response following exposure to ionizing radia- tion. *Mol. Cell Biol.* 17, 5016-5022.
35. Jurinke,C., van den,B.D., Cantor,C.R., Koster,H. (2002). The use of MassARRAY technology for high throughput genotyping. *Adv. Biochem. Eng Biotechnol.* 77:57-74., 57-74.
36. Kamb,A., Gruis,N.A., Weaver-Feldhaus,J., Liu,Q., Harshman,K., Tav- tigan,S.V., Stockert,E., Day,R.S., Johnson,B.E., Skolnick,M.H. (1994). A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 264, 436-440.
37. Kammerer,S., Roth,R.B., Reneland,R., Marnellos,G., Hoyal,C.R., Mark- ward,N.J., Ebner,F., Kiechle,M., Schwarz-Boeger,U., Griffiths,L.R., Ul- brich,C., Chrobok,K., Forster,G., Praetorius,G.M., Meyer,P., Rehbock,J., Cantor,C.R., Nelson,M.R., Braun,A. (2004). Large-scale association study identifies ICAM gene region as breast and prostate cancer suscep- tibility locus. *Cancer Res.* 64, 8906-8910.
38. Kastan,M.B., Onyekwere,O., Sidransky,D., Vogelstein,B., Craig,R.W. (1991). Participation of p53 protein in the cellular response to DNA dam- age. *Cancer Res.* 51, 6304-6311.
39. Kennedy,C., ter Huurne,J., Berkhout,M., Gruis,N., Bastiaens,M., Berg- man,W., Willemze,R., Bavinck,J.N. (2001). Melanocortin 1 receptor (MC1R) gene variants are associated with an increased risk for cutane- ous melanoma which is largely independent of skin type and hair color. *J. Invest Dermatol.* 117, 294-300.

40. Klein,A.P., Beaty,T.H., Bailey-Wilson,J.E., Brune,K.A., Hruban,R.H., Petersen,G.M. (2002). Evidence for a major gene influencing risk of pancreatic cancer. *Genet. Epidemiol.* 23, 133-149.
41. Knudson,A.G. (2000). Chasing the cancer demon. *Annu. Rev. Genet.* 34:1-19., 1-19.
42. Knudson,A.G. (2001). Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat. Rev. Cancer* 1, 157-162.
43. Kobayashi,J., Antoccia,A., Tauchi,H., Matsuura,S., Komatsu,K. (2004). NBS1 and its functional role in the DNA damage response. *DNA Repair (Amst)* 3, 855-861.
44. Kruglyak,L. (1999). Prospects for whole-genome linkage disequilibrium mapping of common disease genes. *Nat. Genet.* 22, 139-144.
45. Lafuente,A., Molina,R., Palou,J., Castel,T., Moral,A., Trias,M. (1995). Phenotype of glutathione S-transferase Mu (GSTM1) and susceptibility to malignant melanoma. MMM group. Multidisciplinary Malignant Melanoma Group. *Br. J. Cancer* 72, 324-326.
46. Lee,J.H., Ghirlando,R., Bhaskara,V., Hoffmeyer,M.R., Gu,J., Paull,T.T. (2003). Regulation of Mre11/Rad50 by Nbs1: effects on nucleotide-dependent DNA binding and association with ataxia-telangiectasia-like disorder mutant complexes. *J. Biol. Chem.* 278, 45171-45181.
47. Liu,L., Goldstein,A.M., Tucker,M.A., Brill,H., Gruis,N.A., Hogg,D., Las-sam,N.J. (1997). Affected members of melanoma-prone families with linkage to 9p21 but lacking mutations in CDKN2A do not harbor mutations in the coding regions of either CDKN2B or p19ARF. *Genes Chromosomes. Cancer* 19, 52-54.
48. Lynch,H.T., Frichot,B.C., Lynch,J.F. (1978). Familial atypical multiple mole-melanoma syndrome. *J. Med. Genet.* 15, 352-356.
49. Machin D., Campbell M. J. (1987). *Statistical Tables for the Design of clinical trials.* Blackwell Scientific Publications, Oxford.
50. Maraschio,P., Danesino,C., Antoccia,A., Ricordy,R., Tanzarella,C., Varon,R., Reis,A., Besana,D., Guala,A., Tiepolo,L. (2001). A novel mutation and novel features in Nijmegen breakage syndrome. *J. Med. Genet.* 38, 113-117.
51. Maser,R.S., Mirzoeva,O.K., Wells,J., Olivares,H., Williams,B.R., Zinkel,R.A., Farnham,P.J., Petrini,J.H. (2001). Mre11 complex and DNA replication: linkage to E2F and sites of DNA synthesis. *Mol. Cell Biol.* 21, 6006-6016.

52. Matsuura,S., Tauchi,H., Nakamura,A., Kondo,N., Sakamoto,S., Endo,S., Smeets,D., Solder,B., Belohradsky,B.H., Der,K., V, Oshimura,M., Iso-mura,M., Nakamura,Y., Komatsu,K. (1998). Positional cloning of the gene for Nijmegen breakage syndrome. *Nat. Genet.* 19, 179-181.
53. Meyer,P., Stapelmann,H., Frank,B., Varon R, Burwinkel B, Schmitt C, Boettger MB, Klaes R, Sperling K, Hemminki K, Kammerer. Molecular Genetic Analysis of *NBS1* in German Melanoma Patients. (submitted to *Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention*; June 2006)
54. Meyer,P., Sergi,C., Garbe,C. (2003). Polymorphisms of the BRAF gene predispose males to malignant melanoma. *J. Carcinog.* 2, 7.
55. Mohlke,K.L., Erdos,M.R., Scott,L.J., Fingerlin,T.E., Jackson,A.U., Si-lander,K., Hollstein,P., Boehnke,M., Collins,F.S. (2002). High-throughput screening for evidence of association by using mass spectrometry geno-tying on DNA pools. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 16928-16933.
56. Monzon,J., Liu,L., Brill,H., Goldstein,A.M., Tucker,M.A., From,L., McLaughlin,J., Hogg,D., Lassam,N.J. (1998). *CDKN2A* mutations in mul-tiple primary melanomas. *N. Engl. J. Med.* 338, 879-887.
57. Nelms,B.E., Maser,R.S., MacKay,J.F., Lagally,M.G., Petrini,J.H. (1998). In situ visualization of DNA double-strand break repair in human fibro-blasts. *Science* 280, 590-592.
58. New,H.V., Cale,C.M., Tischkowitz,M., Jones,A., Telfer,P., Veys,P., D'Andrea,A., Mathew,C.G., and Hann,I. (2005). Nijmegen breakage syn-drome diagnosed as Fanconi anaemia. *Pediatr. Blood Cancer.* 44, 494-499.
59. Nobori,T., Miura,K., Wu,D.J., Lois,A., Takabayashi,K., Carson,D.A. (1994). Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in mul-tiple human cancers. *Nature* 368, 753-756.
60. O'Donovan,M.C., Oefner,P.J., Roberts,S.C., Austin,J., Hoogendoorn,B., Guy,C., Speight,G., Upadhyaya,M., Sommer,S.S., McGuffin,P. (1998). Blind analysis of denaturing high-performance liquid chromatography as a tool for mutation detection. *Genomics* 52, 44-49.
61. Palmer,J.S., Duffy,D.L., Box,N.F., Aitken,J.F., O'Gorman,L.E., Green,A.C., Hayward,N.K., Martin,N.G., Sturm,R.A. (2000). Melano-cortin-1 receptor polymorphisms and risk of melanoma: is the association explained solely by pigmentation phenotype? *Am. J. Hum. Genet.* 66, 176-186.
62. Parker,J.F., Florell,S.R., Alexander,A., DiSario,J.A., Shami,P.J., Leach-man,S.A. (2003). Pancreatic carcinoma surveillance in patients with fa-milial melanoma. *Arch. Dermatol.* 139, 1019-1025.

63. Quelle,D.E., Zindy,F., Ashmun,R.A., Sherr,C.J. (1995). Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell* 83, 993-1000.
64. Reis, A., Digweed, M., Varon, R. (2001). Das Nijmegen Breakage Syndrom- Ein Syndrom der Chromosomeninstabilität. Biospektrum.
65. Resnick,I.B., Kondratenko,I., Togojev,O., Vasserman,N., Shagina,I., Evgrafov,O., Tverskaya,S., Cerosaletti,K.M., Gatti,R.A., Concannon,P. (2002). Nijmegen breakage syndrome: clinical characteristics and mutation analysis in eight unrelated Russian families. *J. Pediatr.* 140, 355-361.
66. Rivers,J.K. (1996). Melanoma. *Lancet* 347, 803-806.
67. Rizos,H., Darmanian,A.P., Holland,E.A., Mann,G.J., Kefford,R.F. (2001). Mutations in the INK4a/ARF melanoma susceptibility locus functionally impair p14ARF. *J. Biol. Chem.* 276, 41424-41434.
68. Saar,K., Chrzanowska,K.H., Stumm,M., Jung,M., Nurnberg,G., Wienker,T.F., Seemanova,E., Wegner,R.D., Reis,A., Sperling,K. (1997). The gene for the ataxia-telangiectasia variant, Nijmegen breakage syndrome, maps to a 1-cM interval on chromosome 8q21. *Am. J. Hum. Genet.* 60, 605-610.
69. Sasieni,P.D. (1997). From genotypes to genes: doubling the sample size. *Biometrics* 53, 1253-1261.
70. Seemanova,E. (1990). An increased risk for malignant neoplasms in heterozygotes for a syndrome of microcephaly, normal intelligence, growth retardation, remarkable facies, immunodeficiency and chromosomal instability. *Mutat. Res.* 238, 321-324.
71. Shahbazi,M., Pravica,V., Nasreen,N., Fakhoury,H., Fryer,A.A., Strange,R.C., Hutchinson,P.E., Osborne,J.E., Lear,J.T., Smith,A.G., Hutchinson,I.V. (2002). Association between functional polymorphism in EGF gene and malignant melanoma. *Lancet* 359, 397-401.
72. Soufir,N., Avril,M.F., Chompret,A., Demenais,F., Bombled,J., Spatz,A., Stoppa-Lyonnet,D., Benard,J., Bressac-de Paillerets,B. (1998). Prevalence of p16 and CDK4 germline mutations in 48 melanoma-prone families in France. The French Familial Melanoma Study Group. *Hum. Mol. Genet.* 7, 209-216.
73. Stanulla,M., Stumm,M., Dieckvoss,B.O., Seidemann,K., Schemmel,V., Muller,B.A., Schrappe,M., Welte,K., Reiter,A. (2000). No evidence for a major role of heterozygous deletion 657del5 within the NBS1 gene in the pathogenesis of non-Hodgkin's lymphoma of childhood and adolescence. *Br. J. Haematol.* 109, 117-120.

74. Steffen,J., Varon,R., Mosor,M., Maneva,G., Maurer,M., Stumm,M., Nowakowska,D., Rubach,M., Kosakowska,E., Ruka,W., Nowecki,Z., Rutkowski,P., Demkow,T., Sadowska,M., Bidzinski,M., Gawrychowski,K., Sperling,K. (2004). Increased cancer risk of heterozygotes with NBS1 germline mutations in poland. *Int. J. Cancer* *111*, 67-71.
75. Stephens,M., Donnelly,P. (2003). A comparison of bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *Am. J. Hum. Genet.* *73*, 1162-1169.
76. Stephens,M., Smith,N.J., Donnelly,P. (2001). A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am. J. Hum. Genet.* *68*, 978-989.
77. Strange,R.C., Ellison,T., Ichii-Jones,F., Bath,J., Hoban,P., Lear,J.T., Smith,A.G., Hutchinson,P.E., Osborne,J., Bowers,B., Jones,P.W., Fryer,A.A. (1999). Cytochrome P450 CYP2D6 genotypes: association with hair colour, Breslow thickness and melanocyte stimulating hormone receptor alleles in patients with malignant melanoma. *Pharmacogenetics* *9*, 269-276.
78. Tanzanella,C., Antoccia,A., Spadoni,E., di Masi,A., Pecile,V., Demori,E., Varon,R., Marseglia,G.L., Tiepolo,L., Maraschio,P. (2003). Chromosome instability and nibrin protein variants in NBS heterozygotes. *Eur. J. Hum. Genet.* *11*, 297-303.
79. Tauchi,H., Matsuura,S., Kobayashi,J., Sakamoto,S., Komatsu,K. (2002). Nijmegen breakage syndrome gene, NBS1, and molecular links to factors for genome stability. *Oncogene* *21*, 8967-8980.
80. Taylor,G.M., O'Brien,H.P., Greaves,M.F., Ravetto,P.F., Eden,O.B. (2003). Correspondence re: R. Varon et al., Mutations in the Nijmegen breakage syndrome gene (NBS1) in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res.*, 61: 3570-3572, 2001. *Cancer Res.* *63*, 6563-6564.
81. The International Nijmegen Breakage Syndrome Study Group (2000). Nijmegen breakage syndrome. The International Nijmegen Breakage Syndrome Study Group. *Arch. Dis. Child* *82*, 400-406.
82. Tucker,M.A., Halpern,A., Holly,E.A., Hartge,P., Elder,D.E., Sagebiel,R.W., Guerry,D., Clark,W.H., Jr. (1997). Clinically recognized dysplastic nevi. A central risk factor for cutaneous melanoma. *JAMA* *277*, 1439-1444.
83. Valverde,P., Healy,E., Sikkink,S., Haldane,F., Thody,A.J., Carothers,A., Jackson,I.J., Rees,J.L. (1996). The Asp84Glu variant of the melanocortin 1 receptor (MC1R) is associated with melanoma. *Hum. Mol. Genet.* *5*, 1663-1666.

84. van der Burgt,I., Chrzanowska,K.H., Smeets,D., Weemaes,C. (1996). Nijmegen breakage syndrome. *J. Med. Genet.* **33**, 153-156.
85. van der Velden,P.A., Sandkuijl,L.A., Bergman,W., Pavel,S., van Mourik,L., Frants,R.R., Gruis,N.A. (2001). Melanocortin-1 receptor variant R151C modifies melanoma risk in Dutch families with melanoma. *Am. J. Hum. Genet.* **69**, 774-779.
86. Varon,R., Gosse-Brun,S., Bignon,Y.J., Sperling,K., Uhrhammer,N. (2002). Nijmegen breakage syndrome gene (NBS1) is not the tumor suppressor gene at 8q21.3 involved in colorectal carcinoma. *Oncol. Rep.* **9**, 709-711.
87. Varon,R., Reis,A., Henze,G., von Einsiedel,H.G., Sperling,K., Seeger,K. (2001). Mutations in the Nijmegen Breakage Syndrome gene (NBS1) in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Cancer Res.* **61**, 3570-3572.
88. Varon,R., Seemanova,E., Chrzanowska,K., Hnateyko,O., Piekutowska-Abramczuk,D., Krajewska-Walasek,M., Sykut-Cegielska,J., Sperling,K., Reis,A. (2000). Clinical ascertainment of Nijmegen breakage syndrome (NBS) and prevalence of the major mutation, 657del5, in three Slav populations. *Eur. J. Hum. Genet.* **8**, 900-902.
89. Varon,R., Vissinga,C., Platzer,M., Cerosaletti,K.M., Chrzanowska,K.H., Saar,K., Beckmann,G., Seemanova,E., Cooper,P.R., Nowak,N.J., Stumm,M., Weemaes,C.M., Gatti,R.A., Wilson,R.K., Digweed,M., Rosenthal,A., Sperling,K., Concannon,P., Reis,A. (1998). Nibrin, a novel DNA double-strand break repair protein, is mutated in Nijmegen breakage syndrome. *Cell* **93**, 467-476.
90. Weemaes,C.M., Hustinx,T.W., Scheres,J.M., van Munster,P.J., Bakkeren,J.A., Taalman,R.D. (1981). A new chromosomal instability disorder: the Nijmegen breakage syndrome. *Acta Paediatr. Scand.* **70**, 557-564.
91. Wheeler,D.L., Barrett,T., Benson,D.A., Bryant,S.H., Canese,K., Chetvernin,V., Church,D.M., DiCuccio,M., Edgar,R., Federhen,S., Geer,L.Y., Helmsberg,W., Kapustin,Y., Kenton,D.L., Khovayko,O., Lipman,D.J., Madden,T.L., Maglott,D.R., Ostell,J., Pruitt,K.D., Schuler,G.D., Schriml,L.M., Sequeira,E., Sherry,S.T., Sirotkin,K., Souvorov,A., Starchenko,G., Suzek,T.O., Tatusov,R., Tatusova,T.A., Wagner,L., Yaschenko,E. (2006). Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res.* **34**, D173-D180.
92. Winsey,S.L., Haldar,N.A., Marsh,H.P., Bunce,M., Marshall,S.E., Harris,A.L., Wojnarowska,F., Welsh,K.I. (2000). A variant within the DNA repair gene XRCC3 is associated with the development of melanoma skin cancer. *Cancer Res.* **60**, 5612-5616.

93. Wu,X., Ranganathan,V., Weisman,D.S., Heine,W.F., Ciccone,D.N., O'Neill,T.B., Crick,K.E., Pierce,K.A., Lane,W.S., Rathbun,G., Livingston,D.M., Weaver,D.T. (2000). ATM phosphorylation of Nijmegen breakage syndrome protein is required in a DNA damage response. *Nature* 405, 477-482.
94. Xiao,W., Oefner,P.J. (2001). Denaturing high-performance liquid chromatography: A review. *Hum. Mutat.* 17, 439-474.
95. Zhao,S., Weng,Y.C., Yuan,S.S., Lin,Y.T., Hsu,H.C., Lin,S.C., Gerbino,E., Song,M.H., Zdzienicka,M.Z., Gatti,R.A., Shay,J.W., Ziv,Y., Shiloh,Y., Lee,E.Y. (2000). Functional link between ataxia-telangiectasia and Nijmegen breakage syndrome gene products. *Nature* 405, 473-477.
96. Zuo,L., Weger,J., Yang,Q., Goldstein,A.M., Tucker,M.A., Walker,G.J., Hayward,N., Dracopoli,N.C. (1996). Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial melanoma. *Nat. Genet.* 12, 97-99.

Verwendete Internetseiten:

97. http://archive.u.wcm.ac.uk/u_wcm/mg/search/9598211.html
98. <http://awmf.org/>; <http://leitlinien.net/> Leitlinien der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft
99. http://www.benaroyaresearch.org/investigators/concannon_patrick/nbs.htm
100. <http://www.bioinfo.weizman.ac.il>
101. <http://www.dermonko.de/arbeitsbereiche/melanomnachsorge.html>
102. <http://www.hapmap.org/downloads/index.html.en>
<http://www.google.de>
103. <http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>
104. <http://insertion.stanford.edu/melt.html>
105. <http://www.medizin.uni-tuebingen.de/itz/itzleit.html>
106. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=162200>
107. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM>
108. <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/melan.html>
109. http://seer.cancer.gov/cgi-bin/csr/1975_2003/search.pl#results
110. <http://statpages.org/ctab2x2.html>
111. <http://www.stat.washington.edu/stephens>

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur von Nibrin	14
Abbildung 2: Patientengruppen in %	24
Abbildung 3: Verteilung und Lokalisation aller auswertbaren Melanome	41
Abbildung 4: DHPLC-Kurven (Einzeldarstellung)	43
Abbildung 5: DHPLC-Kurven (Direktvergleich).....	44
Abbildung 6: Lokalisation der Veränderungen in der <i>NBS1</i> -Gensequenz	47
Abbildung 7: Folgen der Sequenzvarianten in Exon 6 auf die AS-Abfolge.....	47
Abbildung 8: Sequenz von Exon 6 (mutationsfrei).....	48
Abbildung 9: 657del5-Mutation.....	48
Abbildung 10: V210F-Nukleotidsubstitution.....	49
Abbildung 11: R215W-Nukleotidsubstitution	49
Abbildung 12: F222L-Nukleotidsubstitution	49
Abbildung 13: MALDI-TOF-Massenspektrogramm von rs9995	54
Abbildung 14: Inzidenz und Todesraten von Melanompatienten in Abhängigkeit vom Alter	57
Abbildung 15: Exon-Intron-Darstellung der bekannten Mutationen im <i>NBS1</i> -Gen	60

6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Normvarianten im <i>NBS1</i> -Gen	15
Tabelle 2: Pathologische Varianten im <i>NBS1</i> -Gen.....	15
Tabelle 3: Anamnesedaten der Melanompatienten	22
Tabelle 4: PCR-Protokoll.....	26
Tabelle 5: DHPLC-Bedingungen für <i>NBS1</i> -Exon 6	28
Tabelle 6: PCR-Protokoll für die Sequenzierung.....	29
Tabelle 7: PCR-Protokoll für direkte Sequenzierung	31
Tabelle 8: Sequenzierprotokoll	32
Tabelle 9: Populationsdaten der F222L-Studie	33
Tabelle 10: PCR-Protokoll für F222L.....	35

Tabelle 11: Protokoll der Primerextension mittels MassEXTEND	36
Tabelle 12: Untersuchte SNPs im <i>NBS1</i> -Gen	37
Tabelle 13: In der Assoziationsstudie verwendete hME Primer (5`-3`).....	37
Tabelle 14: Allelfrequenzen der SNPs im <i>NBS1</i> -Gen.....	53
Tabelle 15: Ergebnisse der individuellen Genotypisierung	55
Tabelle 16: Ergebnisse der Haplotypenanalyse	55

6.4 Herstellerverzeichnis

1. PCR:

ThermoHybaid GmbH; Rischerstr 12; 69123 Heidelberg

InViTek; Eppendorf BioChem GmbH; Robert- Rössle- Str. 10; D- 13125 Berlin

ThermoHybaid (s.o.): Reverse-Primer: OR-63840-11
Forward-Primer: OR-1633840-9

Rapidozym; Laborhandel und DNA Diagnostika GmbH; Tempelhofer Weg 11-12; 10829 Berlin

Invitrogen- life technologies, Technologiepark Karlsruhe; Emmy-Noether-Str. 10; 76131 Karlsruhe

2. DHPLC:

Transgenomic, INC., 2032 Concourse Drive, San José, CA 95131, USA

Stanford Genome Technology Center, 855 California, Avenue Palo Alto, CA 9434 USA; <http://insertion.stanford.edu/melt.html>

3. Sequenzieren:

Amicon Microcon[®] PCR; Millipore GmbH, Am Kronberger Hang 5; 65824 Schwalbach

AB-Applied Biosystems; 850 Lincoln Drive; Foster City; California 94404-1128; USA

4. Assoziationsstudie:

PUREGENE[®] DNA Purification Kit, Gentra Systems Inc., 13355 10th Avenue North, Minneapolis, MN 55441, USA; Katalog-Nr.: D-50K; <http://gentra.com>

Fluoroskan Ascent[™]: Thermo Labsystems, Thermo Electron Corporation; Waltham, MA, Katalog-Nr.: 5210470; <http://thermo.com>

PicoGreen®-Reagenzien: Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit, Molecular Probes, Invitrogen, 1600 Faraday Ave., Carlsbad, CA 92008, USA; Katalog-Nr.: P-7589; <http://probes.invitrogen.com>

Taq-Polymerase : HotStarTaq™, Qiagen Inc., 28159 Avenue Stanford, Valencia, CA 91355 USA; Katalog-Nr. : 203203 ; <http://www1.qiagen.com>

Streptavidin-beschichtete paramagnetische Beads: Dynal Biotech, P.O. Box 114, Smestad N-0309 Oslo, Norway

Thermo Sequenase™II: Amersham Biosciences, jetzt zugehörig zu GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway, NJ, Katalog-Nr.: US82010; <http://www5.amershambiosciences.com>

Polystyren-Divinylbenzen-Sulfonsäure-Harz: Clean Resin, SEQUENOM, San Diego, CA, Katalog-Nr.: 10053; <http://www.sequenom.com>

Piezoelektrischen Pipettiervorrichtung: SpectroPOINT™ Spotting Dispenser, SEQUENOM, Katalog-Nr.: 11150

Silizium Chip: SpectroCHIP®Bioarray, SEQUENOM, Katalog-Nr.: 00601

Nitrogen-Laser: SpectroREADER™ Genotype Analyzer, SEQUENOM, Katalog-Nr.:00450

Software: SpectroTYPER™ RT Workstation, SEQUENOM, Katalog-Nr.: 11304

6.5 Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei Herrn Professor Dr. med. Olaf Rieß dafür bedanken, dass er mir als Doktorvater die Durchführung dieser Arbeit ermöglicht hat.

Mein Dank gilt weiterhin Herrn Dr. Peter Meyer für die Überlassung des interessanten und spannenden Themas. Seine sehr gute Betreuung und die stets schnelle Hilfe bei meinen Fragen, sowie seine zahlreichen wertvollen Tipps und die von ihm mit den Nibrin-Spezialisten in Berlin aufgenommene Kooperation haben entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Er hat so mein Interesse für das Fach Humangenetik und das wissenschaftliche Arbeiten nachhaltig gefördert.

Sehr herzlich möchte ich mich bei Frau Privatdozentin Dr. Raymonda Varon, Herrn Professor Dr. Karl Sperling und den Labormitarbeitern im Institut für Humangenetik an der Charité der Humboldt-Universität in Berlin dafür bedanken, dass ich die Analysen an ihrem Institut durchführen durfte. Ihre exzellente Anleitung, sowie die Freundlichkeit und große Hilfsbereitschaft haben meine Freude an dem wissenschaftlichen Arbeiten im molekulargenetischen Labor geweckt.

Herrn Professor Dr. rer. nat. Klaus Dietz und Frau Dr. Tina Herberts möchte ich für die statistische Berechnung sehr herzlich danken. Für die Durchführung der Genotypisierungen im Rahmen der Assoziationsstudien sei Herrn Dr. Stefan Kammerer bei der Firma Sequenom sehr herzlich gedankt. Für die Bereitstellung der Sequenzierungsdaten zu Vergleichszwecken danke ich Frau Dr. Barbara Burwinkel und Herrn Dr. Bernd Frank vom DKFZ Heidelberg.

Mein besonderer Dank gilt allen Patienten, die sich für die Teilnahme an dieser Studie bereit erklärt und durch ihre Blutspende die Analysen ermöglicht haben.

Schließlich danke ich meiner Familie für ihre große Hilfe und die fortwährende Unterstützung.

6.6 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Stapelmann
Vorname: Henrike
Geburtsdatum: 22.08.1978
Geburtsort: Hannover
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig
Eltern: Marianne Stapelmann, geb. Seeger, Lehrerin
Dr. Ing. Jürgen Stapelmann, Physiker
Geschwister: Dr. med. dent. Christine Lorenz, geb. Stapelmann,
Zahnärztin

Ausbildung:

1985-1989: Grundschule "Bodenseeschule St. Martin", Friedrichshafen
1989-1997: Karl-Maybach-Gymnasium, Friedrichshafen

Studium:

Ab SS 1998: Studium der Zahnmedizin an der Eberhard Karls
Universität Tübingen
12. März 1999: Naturwissenschaftliche Vorprüfung
12. Oktober 2000: Zahnärztliche Vorprüfung
17. November 2003: Zahnärztliche Prüfung
05. Dezember 2003: Approbation als Zahnärztin

Berufstätigkeit:

01. April 2004 - 31. Dezember 2004:
Anstellung als Assistenz Zahnärztin in der Zahnarztpraxis
Müller-Kauter in Steinkirchen
01. Januar 2005 - 31. Dezember 2005:
Anstellung als Assistenz Zahnärztin in der Zahnklinik
Medeco, Zahnarztpraxis Dr. Felden in Hamburg

Seit 01. Februar 2006:

Anstellung als Assistenzärztin an der Klinik für
Rekonstruktive Zahnmedizin und Myoarthropathien der
Universität Basel, Schweiz

Publikationen:

Meyer P.*, **Stapelmann H.***, Frank B., Varon R., Burwinkel B., Schmitt C.,
Boettger M.B., Klaes R., Sperling K., Hemminki K., Kammerer S.

*contributed equally to this work

Molecular genetic analysis of NBS1 in German melanoma patients.
Melanoma Res. 2007 Apr;17(2):109-16.

Frank,B., Meyer,P., Boettger,M.B., Hemminki,K., **Stapelmann,H.**, Gast,A.,
Schmitt,C., Kumar,R., Sergi,C., Burwinkel,B. (2006). ARLTS1 variants and
melanoma risk. *Int J Cancer.* 2006 Apr 27;
Impact factor: 4,4 (2004)

Mossner,R., Meyer,P., Jankowski,F., Konig,I.R., Kruger,U., Kammerer,S.,
Westphal,G., Boettger,M.B., Berking,C., Schmitt,C., Brockmoller,J., Ziegler,A.,
Stapelmann,H., Kaiser,R., Volkenandt,M., Reich,K. (2006). Variations in the
peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene and melanoma risk.
Cancer Lett. 2006 May 17;
Impact factor: 2,9 (2004)

Meyer P., Boettger M.B., **Stapelmann H.**, Schmitt C.
„Pedigree Analysis versus common Family History in the Identification of Fami-
lial Cancers “
Der Bay Int. 2006; 25(3): Accepted for Publication
Impact factor: 0,5 (No specific Impact Factor yet available)

Stapelmann H., Varon R., Schmitt C., Garbe C., Sperling K., Meyer P.
„Is NBS1 a Melanoma Susceptibility Gene? “
Poster presented at the 14th Annual Meeting of the German Society
of Human Genetics together with the Austrian Society of Human Genetics and
the Swiss Society of Medical Genetics in Marburg, Germany, October 1-4, 2003
(Abstract number P 183)

Schmitt C., Klaes R., **Stapelmann H.**, Garbe C., Meyer P.
"Melanoma Susceptibility Genes CDKN2A and CDK4: Lack of Germline Muta-
tions in German Melanoma Patients".
Poster presented at the 14th Annual Meeting of the German Society
of Human Genetics together with the Austrian Society of Human Genetics and
the Swiss Society of Medical Genetics in Marburg, Germany, October 1-4, 2003
(Abstract number P 029)