

Aus der Universitäts-Hautklinik Tübingen  
Abteilung Dermatologie

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Röcken

Sektion für Dermatologische Onkologie  
Leiter: Professor Dr. C. Garbe

**Molekulargenetische Analyse des *CDKN2A* und des  
*CDK4* Gens  
bei Patienten mit malignen Melanomen**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
Christina Maria Schmitt  
aus  
Hannover

2006

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. C. Garbe

2. Berichterstatter: Professor Dr. O. Rieß

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Einführung: Gene und Krebs .....	1
1.2	Das maligne Melanom .....	2
1.2	Das maligne Melanom .....	2
1.2.1	Epidemiologie.....	2
1.2.2	Risikofaktoren .....	3
1.3.1	Historischer Überblick .....	4
1.3.2	Kopplungsanalysen .....	4
1.3.3	<i>CDKN2A</i> als Melanomsuszeptibilitätsgen .....	5
1.3.4	<i>CDK4</i> als Melanomsuszeptibilitätsgen .....	7
1.4	Das maligne Melanom im Zusammenhang mit anderen Tumorerkrankungen .....	8
1.5	Ziel der Arbeit .....	9
2	Studienteilnehmer, Material und Methoden .....	10
2.1	Studienteilnehmer .....	10
2.1.1	Stammbaumanalyse.....	10
2.2	Material und Methoden .....	11
2.2.1	DNA-Präparation .....	11
2.2.2	Polymerasekettenreaktion .....	12
2.2.2.1	Primerdesign .....	13
2.2.2.2	PCR-Bedingungen .....	13
2.2.2.3	Kontrolle der PCR-Produkte durch Gelelektrophorese .....	17
2.2.2.4	Gensequenzen <i>CDK4</i> und <i>CDKN2A</i> .....	17
2.3	DHPLC: Denaturing High Performance Liquid Chromatography .....	19
2.3.1	Das Prinzip des WAVE™-Systems .....	19
2.3.2	Mutationssuche mit dem WAVE™-System .....	20
2.3.3	DHPLC-Analyse der Gene <i>CDKN2A</i> und <i>CDK4</i> : Bedingungen .....	21
2.5	Positivkontrollen.....	24
2.6	Sequenzieren.....	24
2.6.1	Das Sequenzierverfahren.....	24
2.6.2	Kontrolle auffälliger DHPLC-Proben durch Sequenzieren.....	25
3	Ergebnisse .....	26
3.1	Ergebnisse der Stammbaumanalyse: Risikogruppen.....	25
3.2	DHPLC Ergebnisse des Mutationsscreenings in <i>CDKN2A</i> und <i>CDK4</i> ...	27
3.2.1	DHPLC Verlauf von <i>CDKN2A</i> .....	28
3.2.2	DHPLC Verlauf in <i>CDK4</i> .....	29
3.3	Sequenzieren.....	29
4	Diskussion .....	34
4.1	Die Studienergebnisse im Vergleich zur Literatur .....	34
4.1.1	Das Studiendesign und die Methodik .....	34
4.1.2	Mutationen bei familiären, multiplen und sporadischen Melanompatienten.....	37
4.2	Die Bedeutung von Polymorphismen im <i>CDKN2A</i> -Gen.....	40

4.3 Schlussfolgerungen: Die Bedeutung der Gene <i>CDKN2A</i> und <i>CDK4</i> .....	43
4.4 Ausblick .....	43
5 Zusammenfassung .....	47
6 Anhang .....	48
6.1 Literaturverzeichnis.....	48
6.2 Abkürzungsverzeichnis .....	54
6.3 Tabellenverzeichnis .....	55
6.4 Abbildungsverzeichnis .....	56
6.5 Danksagung.....	56
6.6 Lebenslauf .....	58
6.7 Eigene Publikationen .....	59

# 1 Einleitung

## 1.1 Einführung: Gene und Krebs

Der Entstehung von Krebs liegt ein komplexes Zusammenspiel vieler Faktoren zugrunde. Neben dem Einfluss unterschiedlichster Umweltfaktoren beruht Krebs vor allem auch auf einer Anhäufung genetischer Veränderungen in einer Zelle bzw. in einem Zellverband. Die Veränderungen im genetischen Material der Zellen können schon in der Keimbahn festgelegt sein, oder sie entstehen erst als somatische Mutationen im Laufe der Zeit in bestimmten Zellen des Körpers. Betroffene Gene können Tumorsuppressorgene sein, denen Schlüssel-funktionen in sensiblen Abschnitten des Zellzyklus zukommen. Sie regeln komplizierte und störanfällige Prozesse wie Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Zelltod. Andererseits können Protoonkogene, die durch Mutationen zu Onkogenen aktiviert werden, direkt zur Wachstumsstimulation der Zellen führen. Kommt es aufgrund der genetischen Veränderungen zu einem Wachstumsvorteil der betroffenen Zellen, kann Krebs entstehen.

Die Tumorgenese auf genetischer Ebene wird von Knudson mit Hilfe der „Zwei-Treffer-Hypothese“ erklärt: Als „erster Treffer“ erfolgt eine Mutation in der Keimbahn oder in einer Vorläuferzelle der späteren Tumorzellen. Dadurch wird eine Prädisposition geschaffen. Der „zweite Treffer“ findet in der somatischen Zelle statt, was letztlich zur malignen Entartung und zur Tumorentstehung führt.<sup>39</sup>

## 1.2 Das maligne Melanom

Diese genetischen Mechanismen der Tumorentstehung scheinen auch beim kutanen malignen Melanom von Bedeutung zu sein. Das Melanom ist ein Tumor, der durch unkontrolliertes Wachstum von pigmentbildenden Zellen, den Melanozyten, entsteht.<sup>51</sup> Dieser invasiv wachsende Tumor gehört zu den bösartigsten Neoplasmen der Haut. Aufgrund seiner Aggressivität ist das Melanom in metastasiertem Zustand auch heute noch schwer zu heilen.

### 1.2.1 Epidemiologie

In den letzten zwei Jahrzehnten ist die Epidemiologie des malignen Melanoms vor allem durch zwei Trends geprägt worden: Einerseits zeigte sich eine weiterhin steigende Tumorzinzidenz, andererseits kam es zu einem Absinken der Mortalitätsraten.

Es lässt sich in Industrienationen mit weißer Bevölkerung eine drastische Zunahme der Tumorzinzidenz beobachten, ausgeprägter als bei jedem anderen Tumor.<sup>53</sup> Während in Queensland, Australien, die weltweit höchste Inzidenz mit weit über 40 Neuerkrankungen pro 100 000 Einwohner im Jahr und in den USA Inzidenzraten von 10-20 Fällen pro 100 000 Einwohner im Jahr zu beobachten waren, liegt Deutschland im weltweiten Vergleich an mittlerer Stelle. Hier stieg die Inzidenzrate in den 90er Jahren von 6-8 in den 80er Jahren auf inzwischen 10-12 pro 100 000 Einwohner und Jahr an.<sup>16</sup> Andererseits aber nehmen die Mortalitätsraten ab, ebenso wie die durchschnittliche Tumordicke bei Diagnose zunehmend geringer wird und die Tumoren in einem weniger invasiven Stadium entdeckt werden, was wohl auf eine bessere Früherkennung schließen lässt.<sup>16,18,53</sup> Der Altersgipfel der Erkrankung liegt zwischen dem 50. und 60. Lebensjahr, wobei 22% der Melanome vor dem 40. Lebensjahr diagnostiziert werden.<sup>16</sup>

### 1.2.2 Risikofaktoren

Die Ätiologie des malignen Melanoms ist multifaktoriell. Aus verschiedenen Beobachtungen ließen sich einzelne exogene und endogene Faktoren bestimmen, die das Risiko, an einem Melanom zu erkranken, deutlich erhöhen. Nach heutiger Kenntnis ist der wichtigste exogene Faktor die UV-Sonneneinstrahlung. Es hat sich gezeigt, dass die Inzidenzen in Regionen mit weißer Bevölkerung entsprechend der Nähe zum Äquator und der damit verbundenen intensiveren Sonneneinstrahlung wie in Australien oder den Südstaaten der USA deutlich höher sind als in beispielsweise mitteleuropäischen Ländern. Außerdem spielen für die Entwicklung von Melanomen neben intensiver intermittierender Sonnenbestrahlung schwere Sonnenbrände besonders in der Kindheit und Jugend eine Rolle, die das Risiko um das 2 bis 3fache erhöhen.<sup>15,55</sup>

Durch die Sonneneinwirkung wird auch die Bildung melanozytärer Nävi induziert, wobei die Anzahl dieser den wichtigsten endogenen Risikofaktor darstellt.<sup>17,62</sup> Auch sind Menschen mit einem hellen Hauttyp, rotem Haar und blauen Augen nachweislich einem höheren Risiko für Melanome ausgesetzt.<sup>62</sup> Da bis zu 10% der Melanome besonders in Familien mit dem dysplastischen Nävusyndrom (DNS), familiär gehäuft auftreten, liegt ein genetischer Hintergrund als weiterer endogener Faktor nahe. Ein weiterer Hinweis für den genetischen Hintergrund als Risikofaktor ist, dass Menschen mit vom Melanom betroffenen Angehörigen ein deutlich höheres Risiko tragen, selbst daran zu erkranken.<sup>26</sup> Die familiäre Disposition scheint ein mindestens 2,2fach höheres Risiko für Angehörige mit vom Melanom betroffenen Verwandten zu bedingen, und das wohl unabhängig von anderen endogenen oder exogenen Risikofaktoren.<sup>12</sup>

## 1.3 Die Erbllichkeit der Melanomsuszeptibilität

Die Entstehung der Melanomdisposition ist genetisch sehr heterogen. Im Folgenden wird dargestellt, wie erste Hinweise auf einen genetischen Hintergrund der Melanomerkrankung schließlich zur Identifikation von einzelnen Genen führten. Dabei spielen im Rahmen der Melanomentstehung besonders Veränderungen in den Genen *CDKN2A* und *CDK4* eine Rolle.

### 1.3.1 Historischer Überblick

Der erste dokumentierte Hinweis für die Erbllichkeit des Melanoms findet sich in einem Aufsatz von 1820.<sup>48</sup> Darin wird das Krankheitsbild des malignen Melanoms in einer Familie mit Betroffenen in drei Generationen beschrieben. Die Melanome seien jeweils aus einem der zahlreichen Nävi der Betroffenen entstanden. In einem Fallbericht von 1952 wird das Auftreten des malignen Melanoms bei mehreren Familienmitgliedern geschildert und explizit die These geäußert, es könne sich bei der familiären Häufung um eine erbliche Form der Tumorerkrankung handeln.<sup>7</sup> Es folgten eine Reihe weiterer Fallberichte, die eine familiäre Häufung von Melanomen erwähnen.<sup>2,61</sup>

Daran schloss sich die Beobachtung an, dass auch zwischen dem Auftreten des dysplastischen Nävusyndroms (DNS) und der Melanomdisposition in einigen Familien ein Zusammenhang besteht.<sup>2,9,43</sup> Im Verlauf wurde der Anteil der familiären Melanomerkrankungen auf 8-10% geschätzt.<sup>21</sup> Aufgrund dieser Hinweise wurden weitere Studien unternommen, um Melanomfamilien zu charakterisieren und die genetischen Faktoren der Erkrankung weiter zu beleuchten.

### 1.3.2 Kopplungsanalysen

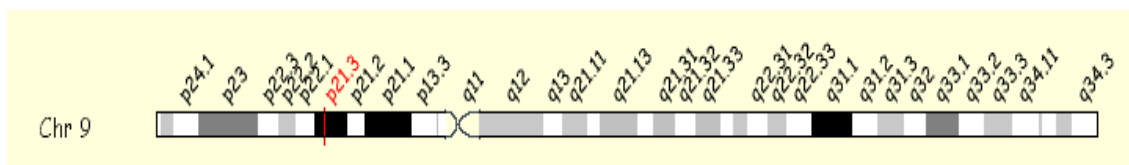
Auf der Suche nach der genetischen Suszeptibilität wurden Kopplungsanalysen durchgeführt, um geeignete Loci zu identifizieren. Eine überzeugende Kopplung von Markern auf Chromosom 9p21 zur Melanomdisposition wurde 1994 in 11 Familien aus Utah und Texas in den USA.<sup>6</sup> Dies konnte auch durch die Analyse von australischen und holländischen Familien untermauert werden.<sup>22,46</sup> Somit



ist 9p21 ein Locus, der eine wichtige Rolle bei der Melanomdisposition spielt, im Besonderen zeigen ca. 50% der Melanomfamilien eine Kopplung zu 9p21.

### 1.3.3 *CDKN2A* als Melanomsuszeptibilitäts-gen

Nachdem die Linkage zu 9p21 bestätigt wurde, gelang die Identifizierung der molekularen Beschaffenheit des Locus und somit eines ersten Gens mit Hilfe von Positionsklonierung und Tumordeletionsstudien.<sup>35,47</sup> Dieses im Rahmen der Melanomsuszeptibilität entdeckte Gen erwies sich als identisch mit einem, das kurz zuvor in einem anderen Zusammenhang isoliert wurde.<sup>54</sup> Es wurde vom HUGO Nomenklaturkomitee als *CDKN2A* benannt, wobei es auch als p16, INK4A oder MTS1 bekannt ist. Es fand sich eine weitere dazugehörige Sequenz auf p9, die als *CDKN2B* oder auch MTS2 bzw. p15, bekannt wurde.



**Abbildung 1:** Topographie des Chromosoms 9. Genlocus 9p21 ist rot markiert.

*CDKN2A* besteht aus 3 Exons: Exon 1 mit einer Länge von 125 Basenpaaren, Exon 2 mit 307 und Exon 3 mit 12 Basenpaaren Länge.<sup>42</sup> Die Transkriptionsregulation von *CDKN2A* ist komplex, sie beinhaltet 2 Promotoren und mindestens zwei unterschiedliche Transkripte. Dabei führt das  $\alpha$ -Transkript zu dem 156 Aminosäuren langen Protein p16, während sich durch ein alternatives Splicing ein anderes Leseraster ergibt, welches über das  $\beta$ -Transkript zum Protein p14ARF führt.<sup>25,44,58</sup>

Das von *CDKN2A* codierte Protein p16 spielt eine wichtige Rolle in der Regulation des Zellzyklus. Es inhibiert spezifisch die Zyklin-abhängigen Kinasen CDK4 und CDK6, die wichtige Kontrollfunktion besitzen. Sie reagieren ihrerseits mit Kofaktoren wie Cyclin D. Gemeinsam erlauben sie ein Fortschreiten des Zyklus von der G1-Phase in die S-Phase, wo die Zellteilung stattfindet. Somit wird er-

sichtlich, dass *CDKN2A* durch seine Interaktion mit den CDKs ein wichtiger negativer Inhibitor des Zellzyklus ist. Einer der Hauptmechanismen, das Gen *CDKN2A* zu inaktivieren, sind Deletionen. Diese wurden in vielen Zelllinien und Tumoren unterschiedlichster Krebserkrankungen gefunden, darunter in bis zu 75% der Zelllinien von Melanomen.<sup>34</sup> Außerdem konnten Mutationen in *CDKN2A* nachgewiesen werden, die zu einer Inaktivierung und somit zu einem selektiven Wachstumsvorteil der Tumorzellen führten. Das so veränderte Protein verliert dadurch seine Bindungskapazität zu den CDKs.<sup>24,34,40,47,57</sup> Der Verlust dieser Funktion führt zu einer unkontrollierten Zellproliferation, womit sich die Vermutung, *CDKN2A* sei ein Tumorsuppressorgen, bestätigt.<sup>35,54</sup>

*CDKN2A* ist ein Gen mit hoher Penetranz. In amerikanischen Untersuchungen hat sich eine Penetranz von ca. 30% bis zum 50. Lebensjahr gezeigt. Das bedeutet, dass dort 30% der Individuen mit Veränderungen im *CDKN2A* Gen auch am Melanom erkranken. Diese Zahlen allerdings variieren stark je nach Land und Kontinent und steigen mit zunehmender Inzidenz des malignen Melanoms in den jeweiligen Ländern an: Die Penetranz der *CDKN2A* Mutationen ab einem Alter von 50 Jahren wurde mit 0,13 in Europa, 0,50 in den USA und im Vergleich dazu mit 0,91 in Australien angegeben.<sup>37</sup>

Inaktivierende Mutationen in *CDKN2A* konnten vor allem in Familien mit mehreren vom Melanom betroffenen Angehörigen nachgewiesen werden. Die Mutationsfrequenzen schwanken allerdings je nach Studie zwischen ca. 5% und Frequenzen von über 80%.<sup>23,36</sup> Das hängt wohl zum einen mit den sehr unterschiedlich großen Patientenzahlen und den klinischen Einschlusskriterien zusammen, die nicht einheitlich sind und somit einen direkten Vergleich der Frequenzen unmöglich machen. Außerdem sind unterschiedlich hohe Frequenzen zu erwarten zwischen Patientengruppen in denen eine Kopplung zu 9p21 nachgewiesen konnte und solchen, deren Status diesbezüglich unbekannt ist. Weltweit scheinen Keimbahnmutationen im Mittel in ca. 25% der familiären Fälle eine ursächlich an der Melanomentstehung beteiligte Rolle zu spielen, wobei die Mutationsfrequenz mit Zunahme der Anzahl der Betroffenen ansteigt.<sup>13</sup> Da auffällig mehr Familien eine Kopplung zu der chromosomalen Region 9p21

aufweisen als *CDKN2A*-Keimbahnmutationen nachgewiesen werden konnten, wurde in dieser Region nach weiteren Genen gesucht. Analysen der Promotorregion von *CDKN2A* konnten jedoch keine relevanten Mutationen nachweisen, so dass Veränderungen in diesem Bereich keine signifikante Rolle zu spielen scheinen.<sup>52</sup>

Eine weitere Gruppe mit hoher Melanomsuszeptibilität sind Betroffene, die an mehreren primären Melanomen erkranken. Jedoch konnten Studien, die Patienten mit multiplen Melanomen im *CDKN2A* Gen untersucht haben, auch hier nur geringe Mutationsfrequenzen im Bereich von ca. 10% nachweisen<sup>28</sup>, und das, obwohl viele der Patienten in diesen Studien auch eine positive Familienanamnese bezüglich des Melanoms aufwiesen.

Die Keimbahnmutationen scheinen relativ spezifisch für die Hochrisikogruppe des familiären Melanoms zu sein. Zwar machen sporadische Melanome mehr als 90% aller Melanomerkrankungen aus. Die Mutationsfrequenz bei diesen Patienten aber liegt bei lediglich ca. 0,02%, so dass in dieser Gruppe andere Faktoren, vor allem die Sonnenexposition, eine bedeutendere Rolle zu spielen scheinen. Im Vergleich hierzu lässt sich in Australien für die Gesamtpopulation eine Frequenz der Keimbahnmutationen von 1: 10 000 (0.01%) berechnen.<sup>1</sup> Neben inaktivierenden Mutationen, die zu einem Funktionsverlust des Proteins p16 führen, konnten im *CDKN2A* Gen auch Polymorphismen nachgewiesen werden. Diese bewirken aber keine Veränderung der Aminosäuresequenz und führen somit wohl auch größten Teils nicht zu einer Veränderung in der Expression des Proteins. Ein Einfluss auf das Melanomrisiko kann aber nicht ausgeschlossen werden.<sup>1</sup>

#### **1.3.4 *CDK4* als Melanomsuszeptibilitätsgen**

Im Zellzyklus besitzt auch die Kinase *CDK4* Kontrollfunktion darüber, ob die Zelle aus der G1-Phase in die S-Phase eintritt. Das Gen *CDK4*, das für diese Kinase kodiert, liegt auf Chromosom 12q14.<sup>45</sup> Bisher konnten weltweit erst drei Mutationen in *CDK4*, Exon 2 ausfindig gemacht werden und das auch nur in Familien mit mehreren am Melanom erkrankten Mitgliedern. Zunächst wurde

eine somatische Mutation entdeckt, in der Melanomentstehung eine Rolle spielt.<sup>63</sup> Neben einer von Soufir et al. 1998 beschriebenen Keimbahnmutation<sup>56</sup> zeigten Funktionsstudien zu der von Zuo et al. 1996 in Melanomfamilien entdeckten Keimbahnmutation, dass diese zu einem gestörten Bindungsverhalten der *CDK4*-Domäne zu p16 führt. Dies hat eine fehlende Inhibition der *CDK4* zur Folge, woraufhin geschlossen wurde, dass es sich bei dem *CDK4*-Gen um ein Onkogen handelt.<sup>59,67</sup> Trotz hoher Penetranz der *CDK4*-Mutationen scheinen diese aufgrund ihres geringen Vorkommens bezüglich der Melanomentstehung eine weitaus geringere Rolle zu spielen als Veränderungen in *CDKN2A*.<sup>11,20,56</sup>

Jedoch scheint zur Melanomentstehung ein Zusammenspiel vieler Faktoren nötig, da, wie oben dargelegt, Keimbahnmutationen in den Genen *CDKN2A* und *CDK4* nur einen kleinen Teil der Melanomdisposition erklären.

Weitere Gene, die im Zusammenhang mit Hautpigmentierung, Zellwachstum und DNA-Reparatur stehen, sowie der Umweltfaktor UV-Strahlung scheinen das Melanomrisiko wesentlich zu beeinflussen und zu modifizieren.<sup>31</sup>

#### **1.4 Das maligne Melanom im Zusammenhang mit anderen Tumorerkrankungen**

Die Melanomdisposition wird oft im Zusammenhang mit anderen Tumorerkrankungen und familiären Tumorsyndromen beschrieben. Neben einem scheinbar gehäuftem Auftreten von Brustkrebs, Karzinomen der oberen Luftwege und gastrointestinalen Tumorerkrankungen zeigt sich ein besonders starker Zusammenhang zwischen dem Auftreten der Melanomkrankung und Pankreaskrebs. Dabei tritt dieser Zusammenhang vor allem beim familiärem Melanom bzw. in Familien auf, die nachgewiesenermaßen *CDKN2A*-Mutationsträger sind

<sup>3,38</sup>

## 1.5 Ziel der Arbeit

Veränderungen in den Genen *CDKN2A* und *CDK4* sind weltweit ursächlich an der Melanomsuszeptibilität beteiligt. Dabei spielt das Gen *CDKN2A* eine weit-aus bedeutendere Rolle als das *CDK4*-Gen.

Ziel dieser Arbeit ist es vor allem, erstmals den Beitrag dieser Gene und ihrer Keimbahnveränderungen zur Melanomentstehung in einem deutschen, 207 Patienten umfassenden, Studienkollektiv zu ermitteln.

Hierfür wird das Erbgut von Patienten untersucht, die bestimmte, als Risikofaktoren in der Melanomentstehung anerkannte, klinischen Kriterien aufweisen und anhand dieser unterschiedlichen Risikogruppen zugeordnet werden können.

Mit Hilfe von molekulargenetischen Methoden sollen Keimbahnveränderungen im Studienkollektiv nachgewiesen werden. Dabei ist interessant, welches Spektrum an genetischen Veränderungen im Kollektiv analysiert werden kann und in welcher Häufigkeit Mutationen aber auch Polymorphismen auftreten.

Die einzelnen Risikogruppen lassen auf einen unterschiedlich starken genetischen Hintergrund der Erkrankung schließen. Vor allem bei familiären Melanompatienten liegt die Vermutung nahe, Veränderungen in den Melanomsuszeptibilitätsgenen *CDKN2A* und *CDK4* nachweisen zu können, aber auch Patienten mit multiplen primären Melanomen und Melanompatienten mit von anderen Tumorerkrankungen betroffenen Verwandten scheinen eine genetische Disposition aufzuweisen.

## **2 Studienteilnehmer, Material und Methoden**

### **2.1 Studienteilnehmer**

Die Studienteilnehmer sind Patienten der Universitäts-Hautklinik Tübingen. Bei jedem Patienten ist die Diagnose der Melanomerkrankung histologisch gesichert und die Angaben dazu inklusive der schriftlichen ärztlichen Befunde darüber liegen vor. Auch wurden andere Erkrankungen, insbesondere weitere Krebserkrankungen der Patienten, erfasst.

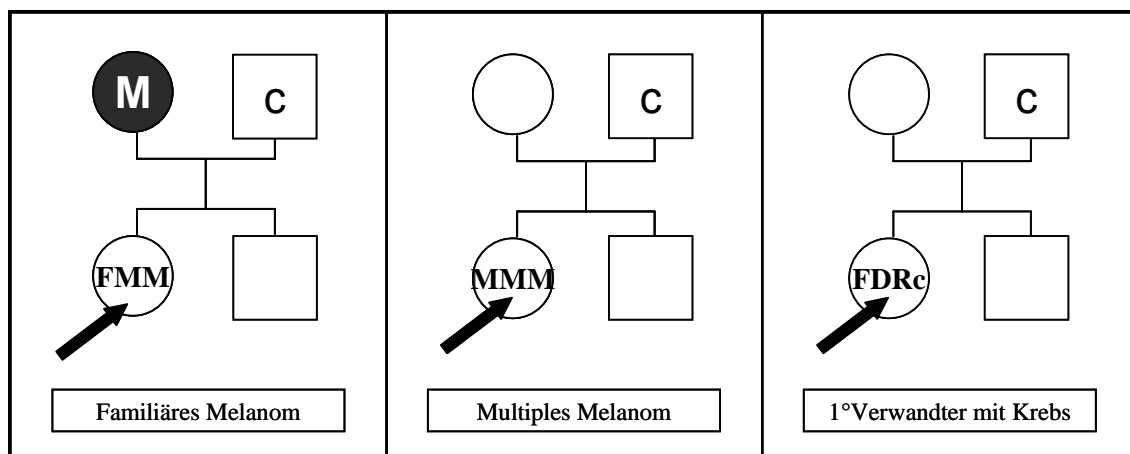
#### **2.1.1 Stammbaumanalyse**

Insgesamt wurde von 375 Patienten eine Stammbaumanalyse in mindestens drei Generationen angefertigt. Dabei notierte Daten enthalten anamnestische Angaben über Anzahl sowie Erkrankungen und Todesursache der Verwandten ersten und zweiten Grades der Patienten. Außerdem wurden Erkrankungsalter und Lebensalter der Verwandten erfragt, wobei der Schwerpunkt auf den Krebserkrankungen in der Familie lag. Diese Angaben wurden zum Großteil anamnestisch erfasst, in einigen Fällen liegen ärztliche Befunde über die Art der jeweiligen Krebserkrankungen der Verwandten vor.

Aus diesem Gesamtkollektiv sollten anhand von Merkmalen wie weitere Melanomerkrankungen in der Familie, mehrere primäre Melanome eines Patienten und andere Krebserkrankungen in der Familie einzelne Risikogruppen definiert werden.

Mit Hilfe dieser Auswahl sollten gezielt Patienten untersucht werden, bei denen der genetische Hintergrund für die Erkrankung eine wahrscheinlich wichtige Rolle spielt.

Beispielhaft sind die Stammbäume der einzelnen Risikogruppen in Abbildung 2 veranschaulicht.



**Abbildung 2:** Beispiele für Stammbäume der Risikogruppen FMM, MMM und FDRc (M: Melanom; c: Cancer; FMM, MMM und FDRc: siehe Abkürzungsverzeichnis).

## 2.2 Material und Methoden

### 2.2.1 DNA-Präparation

Von jedem Patienten lagen Blutproben vor, die bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur Verarbeitung gelagert wurden. Um für die genetische Analyse von Keimbahnmutationen genomische DNA zu gewinnen, wurde diese mit Hilfe mehrerer Arbeitsschritte aus sich im Vollblut befindlichen Leukozyten extrahiert. Zur Präparation der DNA aus den bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagerten EDTA - Vollblutproben à 9ml wurde zunächst das Blut aufgetaut. Um die Erythrozyten zu lysieren, folgte eine Inkubation der Proben mit 35 ml RBCL 10 Minuten bei Raumtemperatur; anschließend das Zentrifugieren für 10 Minuten bei 4000 RPM und  $15^{\circ}\text{C}$ . Das bewirkte eine Sedimentation der bei der Lyse intakt gebliebenen Leukozyten. Nach Abschütten des Überschusses wurde das dabei entstandene Leukozytenpellet mit 6ml WBCL versetzt, bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Rüttler über Nacht inkubiert und nach Zugabe von 2ml PPL bei 4000 RPM und  $25^{\circ}\text{C}$  10 Minuten zentrifugiert, um so die DNA von den ausgesalzenen Proteinen zu trennen. Im Anschluss daran erfolgte eine Zugabe von 7 ml 100% Isopropanol, wodurch sich nach Schwenken des Gefäßes die

DNA ausfällen ließ. Zum Lösen der extrahierten DNA eignete sich nach dem Trocknen die Zugabe von 1ml TE-Puffer. Die Proben konnten nun nach nochmaligem Zentrifugieren bei 2000 RPM und 10°C im Kühlraum gelagert werden. Um sicherzustellen, dass bei dieser Methode kontinuierlich genügend DNA für die folgenden Analysen extrahiert werden konnte, ist für jede Probe die photometrische Bestimmung der Konzentration der gelösten DNA erfolgt. Dabei erwies es sich als günstig, eine je nach DNA-Konzentration der einzelnen Probe eine individuelle Verdünnung der gelösten DNA 1:100 mit destilliertem Wasser (AMPUWA®) herzustellen. Somit stand für die weitere Analyse der Proben genomische DNA von 50 ng/µl zur Verfügung.

### **2.2.2 Polymerasekettenreaktion**

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine schnelle und effektive molekularbiologische Methode, um spezifische Nukleinsäuresequenzen eines doppelsträngigen DNA-Stranges zu amplifizieren. Spezifische Startermoleküle, so genannte Primer, hybridisieren an definierte Stellen denaturierter und somit als Einzelstrang vorliegender DNA. Eine Polymerase katalysiert die Neusynthese eines komplementären DNA-Stranges.

Die Reaktionen finden unter bestimmten Bedingungen in Thermocyclern statt, wobei die drei wichtigsten Schritte der PCR in so genannten Zyklen mehrfach wiederholt werden. Zunächst erfolgt die Denaturierung des DNA-Doppelstranges bei 94°C. Es folgt die Primerhybridisierung, die auch als „Annealing“ bezeichnet wird, bei für den zu amplifizierenden Abschnitt geeigneten Temperaturen, in der Regel zwischen 50-65°C. Hier binden die Primer an definierte Stellen der Einzelstrang-DNA. Sie dienen der Polymerase als Startermoleküle. In der sich anschließenden Extensionsphase herrscht bei 72°C die optimale Temperatur für die hitzestabile Taq-Polymerase, die in 5'-3'-Richtung neue Nukleotide anfügt und so einen komplementären Strang synthetisiert. Durch vielfaches Wiederholen dieser drei Schritte wird die als Vorlage dienende Nukleinsäuresequenz der Matrizen-DNA exponentiell amplifiziert und steht so in großen Mengen weiteren Untersuchungen zu Verfügung.



### 2.2.2.1 Primerdesign

Primer sind synthetische Oligonukleotide, die an Einzelstrang-DNA binden und der Polymerase als Startermoleküle für die Synthese eines neuen Stranges dienen. Um eine bestimmte Sequenz der vorliegenden DNA zu amplifizieren, müssen die Primer spezifisch für diese Sequenz passend hergestellt werden. Dabei werden zwei unterschiedliche Primer verwendet. Zum einen wird der Forward-Primer so ausgewählt, dass er eine komplementäre Struktur zu dem am 3'Ende an die Sequenz angrenzenden Bereich hat. Der Reverse-Primer ist komplementär zu dem Bereich, der sich an das 5'Ende der zu amplifizierenden Sequenz anschließt. So markieren die Primer im Genom den Anfang und das Ende der zu amplifizierenden Sequenz.

Zur optimalen Auswahl der Primer für die PCR der gewünschten CDKN2A- und CDK4-Sequenzen wurde das Softwareprogramm „Primer 3“ herangezogen, das im Internet unter [http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3\\_www.cgi](http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi) frei zugänglich ist und das bei der Primerkonstruktion die wichtigen Parameter für eine qualitativ hochwertige PCR berücksichtigt.

Die Sequenzen der Primer, die bei der Amplifikation der jeweiligen Exons der Gene *CDKN2A* und *CDK4* benutzt wurden, findet sich in den Tabellen 1,2,3 und 4.

### 2.2.2.2 PCR-Bedingungen

Um spezifische und quantitativ ausreichende PCR-Produkte zu erzielen, müssen einige entscheidende Parameter der PCR-Protokolle optimiert sein. Unter anderem spielt die Annealing-Temperatur eine bedeutende Rolle, die in der Regel 5°C unterhalb der Schmelztemperatur der Primer liegen sollte. Durch mehrfache Probeläufe der PCR bei schrittweise ansteigenden Temperaturen konnten geeignete Temperaturen für den Schritt der Primerhybridisierung ermittelt werden.

Gute Resultate ließen sich durch den Einsatz eines Enhancers (PCR<sub>x</sub> Enhancer System von Invitrogen™) erzielen, der dem Reaktionsgemisch beigefügt wurde und ein spezifischeres Annealing ebenso wie eine höhere Thermostabilität der Polymerasen und eine breitere Annealing-Temperatur gerade in CG-reichen Regionen ermöglichte.

Für die PCR wurde ein Thermocycler PTC 200 von MJ Research, Watertown, USA eingesetzt.

Da sich das *CDKN2A*-Gen in einer chromosomalen Region mit hohem Gehalt an CG-Basenpaaren, die das Bindungsverhalten der DNA ändert, befindet, kommt für jedes der Exons ein eigenes PCR-Protokoll zu Anwendung. Für das Exon 2 des *CDK4*-Gens erwies sich das gleiche PCR-Protokoll wie das für Exon 3 des *CDKN2A*-Gens als geeignet.

Für die Ansätze von 50 µl wurden jeweils 2 µl der in TE-Puffer gelösten genomischen Proben-DNA verwendet. Die Reaktionsmischung bestand aus den jeweiligen spezifischen Forward- und Reverse-Primern, dNTPs, PCR-Puffern, Enhancer sowie je nach Gen und Exon MgCl<sub>2</sub> oder MgSO<sub>4</sub> und Taq-Polymerase (Invitrogen™) bzw. Platinum Taq-Polymerase (Invitrogen™). Als Lösungsmittel diente destilliertes Wasser. Die genauen Volumen- und Temperaturangaben können den Tabellen 1,2,3 und 4 entnommen werden.

Außerdem zeigen die Tabellen 1,2,3 und 4 die für das jeweilige Gen und Exon benutzten PCR-Bedingungen. Im Anschluss an die DNA-Denaturierung bei 94°C folgten 36 Zyklen mit den jeweils geeigneten Annealing- und Extensions-temperaturen und darauf die Abkühlung auf Raumtemperatur.

Tabelle 1: PCR-Bedingungen CDKN2A, Exon 1

Cycler		Modus		Mastermix		
MJR-PTC200		Calculated		µl	?	..... mal
				5	10 x Puffer	
	<b>Temp</b>	<b>Time</b>	<b>Zyklen</b>	4	2.5 mM dNTPs	
<b>Denaturation</b>	94 °C	3 '		1.5	50 mM MgSO <sub>4</sub>	
<b>Denaturation</b>	94 °C	45 "		5	je 2 µM Primer	
<b>Annealing</b>	58 °C	45 "	36 x	5	Enhancer	
<b>Elongation</b>	68 °C	45 "		0.3	Polymerase PlatinumTaq	
<b>Final Elong.</b>	68 °C	5 '		21.2	Aqua	
<b>Final Denat.</b>	94 °C	5 '		47	Mastermix	
				3	Template (50ng/µl)	
<b>Primer-For</b>	AAGAGGAGGGGCTGGCTG			50	Gesamtansatz	
<b>Primer-Rev</b>	CCCTGCAAACCTTCGTCCTC					
						<b>Produkt: 315 bp</b>

Tabelle 2: PCR-Bedingungen CDKN2A, Exon 2

Cycler		Modus		Mastermix		
MJR-PTC200		Calculated		µl	?	..... mal
				5	10 x Puffer	
	<b>Temp</b>	<b>Time</b>	<b>Zyklen</b>	4	2.5 mM dNTPs	
<b>Denaturing</b>	94 °C	3 '		1.5	50 mM MgSO <sub>4</sub>	
<b>Denaturing</b>	94 °C	45 "		5	je 2 µM Primer	
<b>Annealing</b>	58 °C	45 "	36 x	5	Enhancer	
<b>Elongation</b>	68 °C	45 "		0.3	Polymerase PlatinumTaq	
<b>Final Elong.</b>	68 °C	5 '		21.2	Aqua	
<b>Final Denat.</b>	94 °C	5 '		47	Mastermix	
				3	Template (50ng/µl)	
<b>Primer-For</b>	CACCTGGCTCTGACCATTC			50	Gesamtansatz	
<b>Primer-Rev</b>	GCTCTCAGGGTACAAATTCTCA					
						<b>Produkt: 380 bp</b>

Tabelle 3: PCR-Bedingungen CDKN2A, Exon3

Cycler		Modus		Mastermix	
MJR-PTC200		Calculated		µl	? .....
				5	10 x Puffer
				4	2.5 mM dNTPs
				4	25 mM MgCl <sub>2</sub>
				5	je 2 µM Primer
				0	Enhancer
				0,25	Polymerase (Expand-HiFi)
				23,75	Aqua > µl
				47	Mastermix
				3	Template (50ng/µl)
				50	Gesamtansatz
					Produkt: 209 bp
<b>Primer-For</b>	TAGGGACGGCAAGAGAGGAG				
<b>Primer-Rev</b>	AAACTACGAAAGCGGGGTG				

Tabelle 4: PCR-Bedingungen CDK4, Exon 2

Cycler		Modus		Mastermix	
MJR-PTC200		Calculated		µl	? .....
				5	10 x Puffer
				4	2.5 mM dNTPs
				4	25 mM MgCl <sub>2</sub>
				5	je 2 µM Primer
				0	Enhancer
				0,25	Polymerase (Expand-HiFi)
				23,75	Aqua > µl
				47	Mastermix
				3	Template (50ng/µl)
				50	Gesamtansatz
					Produkt: 209 bp
<b>Primer-For</b>	TAGGGACGGCAAGAGAGGAG				
<b>Primer-Rev</b>	AAACTACGAAAGCGGGGTG				

### 2.2.2.3 Kontrolle der PCR-Produkte durch Gelelektrophorese

Um zu kontrollieren, ob bei der PCR spezifische Produkte entstanden sind, wurden je Probe 5µl des PCR-Produktes auf ein Agarosegel (2%) aufgetragen. Im Anschluss an die Gelelektrophorese wurde das Gel im Ethidiumbromid-Bad angefärbt, die Produkte unter UV-Licht sichtbar gemacht und mit einem Längenstandard verglichen sowie photographisch dokumentiert.

### 2.2.2.4 Gensequenzen von *CDK4* und *CDKN2A*

Die Abbildungen 3 und 4 zeigen die codierenden Gensequenzen von *CDKN2A* und *CDK4* mit den Stellen, an denen die Primer gelegt wurden.

**CDK4 Exon 2 Ex2-For + Ex2-Rev; Nukleotidposition: 1021-601**

```

actgggagcg ggggatggga tgctggtggt gttcctttgcg cttttttttt gggagtcctt
ttgttgctgc aggtcatacc atcctaactc tgtaagcgac ttttggtgat aggagtctgt
gattgtaggg tctcccttga tctgagaatg gctacctctc gatatgagcc agtggctgaa
attggtgtcg gtgcctatgg gacagtgtac aaggcccggtg atccccacag tggccacttt
gtggccctca agagtgtgag agtccccaat ggaggaggag gtggaggagg ccttcccata
agcacagttc gtgaggtggc tttactgagg cgactggagg cttttgagca tcccaatggt
gtcctgtgag aaggtggtgg agggttgggc gtggggagta aagggaaaag acagcctata

```

**Abbildung 3:** Gensequenzen *CDK4*. Die jeweiligen Primer sind grün markiert, die codierende Exonsequenz ist rot markiert.

**CDKN2A Exon 1 Ex1-For + Ex1-Rev; Nukleotidposition: 19801-20221**

ccccttgctt gaaagatac cgcggtcct ccagaggatt tgagggacag ggtcggaggg  
 ggctcttccg ccagcaccgg aggaaga aag aggaggggct ggctggtcac cagaggggtgg  
 ggcggaccgc gtgcgctcgg cggctgcgga gagggggaga gcaggcagcg ggcggcgggg  
agcagcatgg agccggcggc ggggagcagc atggagcctt cggctgactg gctggccacg  
gccgcggccc ggggtcgggt agaggaggtg cgggcgctgc tggagggcggg ggcgctgccc  
aacgcaccga atagttacgg tggaggccg atccagggtgg gtagaggggtc tgcagcggga  
 gcaggggatg gcgggcgact ctg gaggacg aagtttcag ggggaattgga atcaggtagc  
 gcttcgattc tccggaaaaa ggggaggctt cctggggagt tttcagaagg ggtttgtaat

**CDKN2A Exon 2 Ex2-For+ Ex2-Rev; Nukleotidposition: 23461-24001**

ttggaaactg gaagcaaagc taggggtaat tagacacctg gggcttgtgt gggggctctgc  
 ttggcgggtg gggggctcta cacaagcttc ctttccgtca tgccggcccc cacctggct  
ctgaccattc tgttctctct ggcaggtcat gatgatgggc agcgcgccgag tggcggagct  
gctgctgctc cacggcgcgg agcccaactg cgcgcacccc gccactctca cccgaccctg  
gcacgacgct gcccgggagg gcttccctgga cacgctgggtg gtgctgcacc gggccggggc  
gcggctggac gtgcgcgatg cctggggccg tctgcccctg gacctggctg aggagctggg  
ccatcgcgat gtcgcacggt acctgcgcgc ggctgcgggg ggcaccagag gcagtaacca  
tgcccgcata gatgccgcgg aaggtccctc aggtgaggac tgatgatctg agaatttcta  
ccctgagagc ttccaaagct cagagcattc attttccagc acagaaagtt cagcccggga  
 gaccagtctc cggctcttgc tcagctcacg cgccaatcgg tgggacggcc tgagtctccc

**CDKN2A Exon 3 Ex3-For + Ex3-Rev; Nukleotidposition: 26341-27121**

agcgttgag cggtcggcgc gcctggagca gccaggcggg cagtggacta gctgctggac  
 cagggaggtg tgggagagcg gtggcggcgg gtacatgcac gtgaagccat tgcgagaact  
 ttatccataa gtatttcaat gccgg taggg acggcaagag aggagggcgg gatgtgccac  
 acatcttga cctcaggttt ctaacgcctg ttttctttct gccctctgca gacatccccg  
attgaaagaa ccagagaggc tctgagaaac ctccggaaac ttagatcatc agtcaccgaa  
ggtcctacag ggccacaact gccccgccca caacc caccc cgctttcgta gttttcattt  
agaaaataga gcttttaaaa atgtcctgcc ttttaacgta gatatatgcc ttccccact  
accgtaaagc tccatttata tcatttttta tatattctta taaaaatgta aaaaagaaaa  
acaccgcttc tgccttttca ctgtgttggg gttttctgga gtgagcacac tcacgcctta  
agcgcacatt catgtgggca tttcttgcga gcctcgcagc ctccggaagc tgtcgacttc  
atgacaagca ttttgtgaac tagggaagct caggggggtt actggcttct cttgagtcac  
actgctagca aatggcagaa ccaaagctca aataaaaata aaataatttt cattcattca  
ctcatttatt gtcaacattt attgagcacc tattacaaca atttcatcgc atggaagaca

**Abbildung 4:** Gensequenzen *CDKN2A*. Die jeweiligen Primer sind grün markiert, die codierenden Exonsequenzen sind rot markiert.

## 2.3 DHPLC: Denaturing High Performance Liquid Chromatography

### 2.3.1 Das Prinzip des WAVE™-Systems

Die DHPLC ist eine sensitive, schnelle und kostengünstige Methode, die die automatisierte Detektion von DNA-Sequenzvarianten, Insertionen und Deletionen erlaubt. Sie beruht auf dem Prinzip der Flüssigkeitschromatographie, wobei DNA-Fragmente mit Hilfe des WAVE™-Systems ihrer Größe nach aufgetrennt werden<sup>64</sup>. Die zu analysierenden DNA-Fragmente in Form von PCR-Produkten werden zusammen mit der mobilen Phase, die aus unterschiedlichen Puffern besteht, mit Hilfe einer Hochdruckpumpe durch die Säule, die stationäre Phase, geleitet. Im Anschluss daran werden sie von einem UV-Detektor erfasst.

Der Hauptbestandteil eines DHPLC-Gerätes (Transgenomic WAVE™ DNA-Fragment Analysis System, USA) ist die aus Polystyren-Divinylbenzen-Polymeren (PS-DVB-Partikel) bestehende Säule DNASep® (Transgenomic, USA), an der die Auftrennung der DNA-Fragmente stattfindet. Die Säulenpartikel sind elektrisch neutral und hydrophob. Damit DNA, die negativ geladene Phosphodiestergruppen besitzt, an der Säule binden kann, sind so genannte Brückenmoleküle nötig, die in dem so genannten Ionenpaar-Reagenz enthalten sind. Hierfür eignet sich Triethylammoniumacetat (TEAA), das Bestandteil der mobilen Phase ist und dessen positiv geladene Ammoniumionen mit den negativen Phosphodiestergruppen der DNA interagieren. Gleichzeitig können die Alkylketten der TEAA-Moleküle an die hydrophobe Oberfläche der Säulenmatrix binden. Somit wird die hydrophobe stationäre Phase durch die Anheftung eines Ionenpaar-Reagenzes in einen dynamischen Ionenaustauscher umgewandelt.

Ein wichtiger Faktor bei der Fragmentauftrennung ist die Temperatur in der Säule, da mit steigender Säulentemperatur auch die Retentionszeiten für die Fragmente ansteigen.

Weiterhin ist für die Retentionszeit der Fragmente die Zusammensetzung der mobilen Phase von Bedeutung. Sie besteht aus den zwei verschiedenen Puf-

fern A und B, die unterschiedliche Konzentrationen an Acetonitril (ACN) mit den TEAA-Molekülen enthalten. Die Acetonitrilkonzentration und das Verhältnis dieser beiden Puffer zueinander ist deshalb wichtig, weil die hydrophobe Wechselwirkung zwischen der stationären Phase und den Alkylresten der Brückenmoleküle mit steigender Konzentration von Acetonitril in der mobilen Phase abnimmt. Außerdem nimmt die negative Ladung der DNA-Moleküle mit ihrer Länge zu. Längere DNA-Fragmente können mehr TEAA-Moleküle binden und werden daher in Abhängigkeit zur Acetonitrilkonzentration stärker und länger an der Säule festgehalten als kürzere.

So ergeben sich bei bestimmten Bedingungen wie einer geeigneten Temperatur der Säule, bestimmter Acetonitrilkonzentration und abhängig von der Länge der DNA-Fragmente unterschiedliche Retentionszeiten<sup>65</sup>. Die Fragmente werden nach Auswaschen aus der Säule mit Hilfe eines UV-Detektors erkannt und die Signale in digitale Werte umgewandelt. Diese werden in Chromatogrammen graphisch veranschaulicht und stellen sich zum Beispiel als charakteristische Abfolge von Peaks dar, die DNA-Fragmenten entsprechen.

### **2.3.2 Mutationssuche mit dem WAVE™-System**

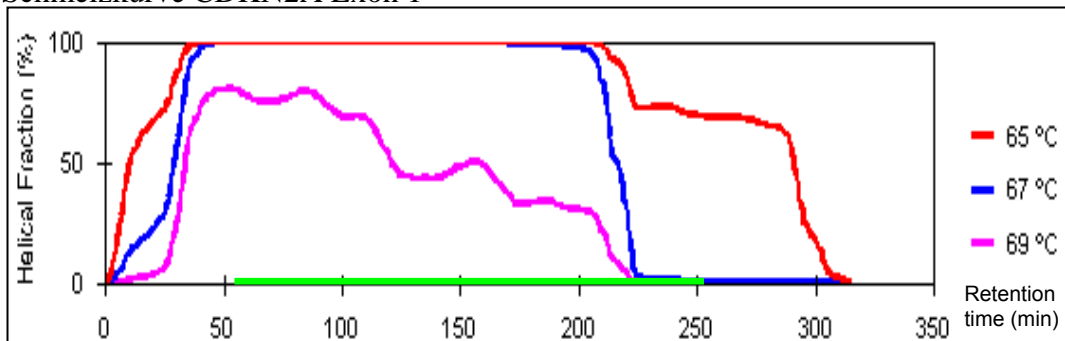
Individuen mit heterozygoten DNA-Mutationen oder Polymorphismen weisen neben einem unveränderten DNA-Strang Nukleotidveränderungen auf dem komplementären Strang der Doppelstrang-DNA auf. Somit beträgt das Verhältnis von Wildtyp-DNA zu mutanter DNA 1:1. Wird die Doppelstrang-DNA bei Temperaturen um 95° denaturiert, kommt es beim anschließenden Abkühlen zur Rehybridisierung der Stränge, wobei sich Homo- und Heteroduplices bilden. Es hat sich gezeigt, dass Heteroduplices ein anderes Bindungsverhalten zur Säule aufweisen und bei geringeren Acetonitrilkonzentrationen zu kürzeren Retentionszeiten führen als Homoduplices. Dies führt zu charakteristischen Peaks in den Chromatogrammen, die auf eine Sequenzvariation in dem DNA-Fragment hinweisen. Die optimale Temperatur für die Analyse muss berechnet werden und liegt für sehr AT- und GC-reiche Sequenzen zwischen 48° und 68° C. Von der Temperatur hängt die Sensitivität der Methode ab<sup>64</sup>.



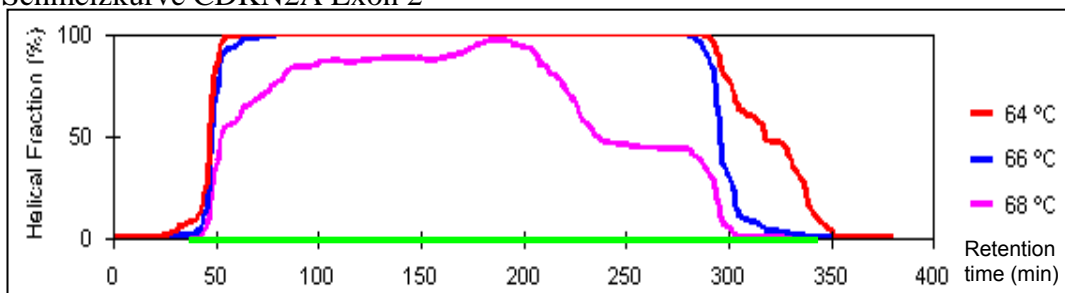
### 2.3.3 DHPLC-Analyse der Gene *CDKN2A* und *CDK4*: Bedingungen

Für die Sensitivität der Methode ist die Temperatur der Säule ausschlaggebend. Um eine Vorhersage bezüglich der optimalen Temperatur für die Analyse jedes einzelnen Exons der Gene zu bekommen, wurde das „DHPLC-Melt-Program“ benutzt, das im Internet unter <http://insertion.stanford.edu/melt.html> zur Verfügung steht (Peter Oefner Stanford Genome Technology Center, 855 California Avenue Palo Alto, CA 9434 USA). Anhand der jeweiligen Exonsequenz berechnet es mit Hilfe von bestimmten statistischen Parametern die geeignete Schmelztemperatur. Mittels mehrerer Testläufe im WAVE™-System mit Wildtyp-DNA und Positivkontrollen wurde die durch das „DHPLC-Melt-Program“ errechnete Temperatur weiter optimiert. Anhand von Positivkontrollen wird überprüft, ob Sequenzveränderungen, also die Bildung von Heteroduplices, in verschiedenen Schmelzdomänen des DNA-Fragmentes erkannt werden. Mithilfe der WAVEmaker 3.4®-Software konnten für eine bestimmte Temperatur charakteristische Schmelzkurven ermittelt und dargestellt werden. Abbildung 2 zeigt die Schmelzkurven der jeweiligen Exons bei unterschiedlichen Temperaturen. Der Vergleich mehrerer Schmelzkurven für dicht beieinander liegende Temperaturen ergab die am besten geeignete Schmelztemperatur. Die Bedingungen für die DHPLC Analysen der Gene *CDKN2A* und *CDK4* sind in den Tabellen 5-8 zusammengestellt. Ihnen können die bei der jeweiligen Schmelztemperatur benutzten Anteile der Puffer A und B im zeitlichen Verlauf entnommen werden. Im DHPLC Verlauf wurden PCR-Produkte bei den ermittelten Schmelztemperaturen denaturiert. Das anschließende Abkühlen der Proben auf Raumtemperatur ermöglichte die Bildung von Homo- und Heteroduplices der DNA-Stränge. Im Anschluss daran wurden je Probe 5µl der PCR-Produkte automatisch in das DHPLC-Gerät eingespritzt und so über die Säule (DNASep®, Transgenomic, Omaha, USA) geleitet. Mit Hilfe des integrierten UV-Detektors wurden die Fragmente mit ihren unterschiedlichen Retentionszeiten erfasst und konnten als Chromatogramme graphisch dargestellt werden.

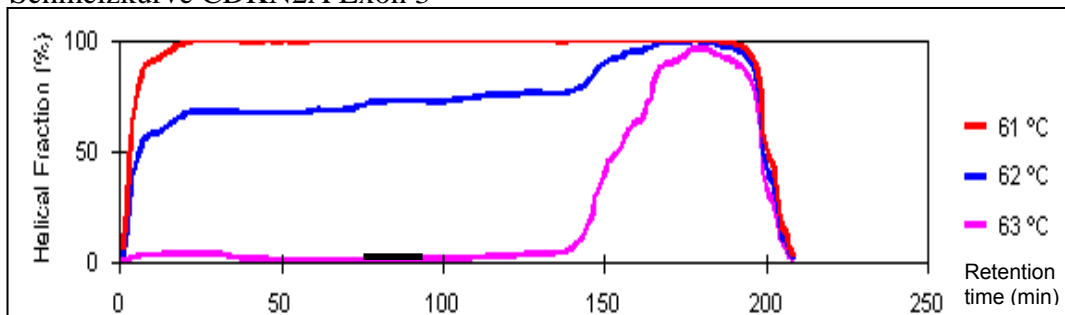
Schmelzkurve CDKN2A Exon 1



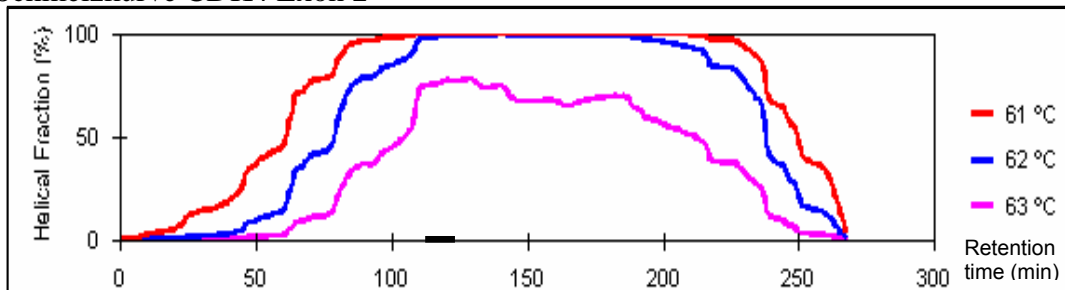
Schmelzkurve CDKN2A Exon 2



Schmelzkurve CDKN2A Exon 3



Schmelzkurve CDK4 Exon 2



**Abbildung 5:** Schmelzkurven des Gens CDKN2A, Exon 1, 2, 3 und CDK4, Exon 2, erstellt mit Hilfe der WAVEmaker 3.4<sup>®</sup>- Software.

**Tabelle 5:** DHPLC Bedingungen *CDKN2A*, Exon1

65°C		
t (min)	% A	% B
0.0	50	50
0.5	45	55
5.0	36	64
5.1	0	100
5.6	0	100
5.7	50	50
6.8	50	50

68°C		
t (min)	% A	% B
0.0	53	47
0.5	48	52
5.0	39	61
5.1	0	100
5.6	0	100
5.7	53	47
6.8	53	47

**Tabelle 6:** DHPLC Bedingungen *CDKN2A*, Exon 2

64°C		
t (min)	% A	% B
0.0	50	50
0.5	45	55
5.0	36	64
5.1	0	100
5.6	0	100
5.7	50	50
6.8	50	50

67°C		
t (min)	% A	% B
0.0	51	49
0.5	46	54
5.0	37	63
5.1	0	100
5.6	0	100
5.7	51	49
6.8	51	49

70°C		
t (min)	% A	% B
0.0	53	47
0.5	48	52
5.0	39	61
5.1	0	100
5.6	0	100
5.7	53	47
6.8	53	47

**Tabelle 7:** DHPLC Bedingungen *CDKN2A*, Exon 3

63°C		
t (min)	% A	% B
0.0	54	46
0.5	49	51
5.0	40	60
5.1	0	100
5.6	0	100
5.7	54	46
6.8	54	46

**Tabelle 8:** DHPLC Bedingungen *CDK4*, Exon 2

62°C		
t (min)	% A	% B
0.0	54	46
0.5	49	51
5.0	40	60
5.1	0	100
5.6	0	100
5.7	54	46
6.8	54	46

## 2.5 Positivkontrollen

Durch den Einsatz von DNA-Proben mit bekannten Mutationen als Positivkontrollen je Exon konnte der DHPLC-Verlauf eingeschätzt werden. Diese wurden freundlicherweise von Frau Professor B. Bressac de Paillerets (Institute Gustave Roussy in Villejuif, Frankreich) bereitgestellt. Die eingesetzten Kontrollen sind in Tabelle 9 zusammengestellt.

<b><i>CDKN2A</i> Exon 1</b>	<b><i>CDKN2A</i> Exon 2</b>	<b><i>CDKN2A</i> Exon 3</b>	<b><i>CDK4</i> Exon 2</b>
G71C	IVS1-G4C	G500C	Arg24His
C142A	Arg99Pro		
IVS1+ G37C	C241A		
	G442A		

**Tabelle 9:** Positivkontrollen - Mutationen in *CDKN2A* und *CDK4*

## 2.6 Sequenzieren

DNA-Proben, die in der DHPLC-Analyse auffällige Chromatogramme aufwiesen, wurden mittels der Sequenziermethode weitergehend untersucht, um die Sequenzveränderung möglicher Mutationen und Polymorphismen zu bestätigen bzw. eventuell falsch positive Ergebnisse nach Möglichkeit auszuschließen.

### 2.6.1. Das Sequenzierverfahren

Anhand der DNA-Sequenzierung lässt sich die genaue Abfolge der Nukleotide in einem DNA-Fragment bestimmen. Sie beruht auf dem Kettenabbruch- bzw. Didesoxynukleotidverfahren. Nach Denaturierung als Einzelstrang vorliegende DNA hybridisieren daran Primer, und unter Zusatz von dNTPs synthetisiert eine Polymerase den komplementären Strang. Außerdem werden kleine Mengen an Didesoxynucleosid-Triphosphaten (ddNTPs) hinzugefügt. Der Einbau eines

ddNTPs führt zum Abbruch der DNA-Doppelstrangsynthese. Es ist für jedes der vier verschiedenen ddNTPs eine getrennte Reaktion notwendig, an deren Anschluss die Produkte auf ein Trägermaterial aufgetragen und die Fragmente durch Gelelektrophorese nebeneinander ihrer Länge nach aufgetrennt werden. Nach Sichtbarmachen der Fragmente kann man die Nukleotidsequenz in den einzelnen Spuren ablesen.

### **2.6.2 Kontrolle auffälliger DHPLC-Proben durch Sequenzieren**

Proben, die in der DHPLC-Analyse auffällig waren, wurden im Anschluss daran sequenziert. Als Vergleich wurden die Positivkontrollen herangezogen. Dies gilt für die PCR-Produkte des Gens *CDKN2A*, Exon 1 und 2 sowie für das *CDK4*-Gen, Exon 2. Eine Ausnahme stellen die das Exon 3 des *CDKN2A*-Gens betreffenden Proben dar, die nicht mit der Sequenziermethode nachuntersucht wurden und somit in ihrer Zuverlässigkeit nur eingeschränkt zu beurteilen sind.

Es wurden 1 µl der jeweiligen DNA-Verdünnungen zunächst gereinigt, erneut mit PCR und den jeweils gleichen Primern amplifiziert und im Anschluss nochmals gereinigt. Diese Proben konnten mit Hilfe eines speziellen Sequenzieransatzes, der auch fluoreszenzmarkierte ddNTPs enthielt, mittels einer Sequenzier-PCR vervielfältigt werden. Nach Reinigen dieser Produkte mittels Ethanolfällung erfolgte die Analyse der zu sequenzierenden PCR-Produkte unter Benutzung des ABI PRISM® 3100 Genetic Analyser, wobei die Interpretation der Ergebnisse mit Hilfe der GeneScan Analysis Software 3.5 möglich wurde.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Ergebnisse der Stammbaumanalyse: Risikogruppen

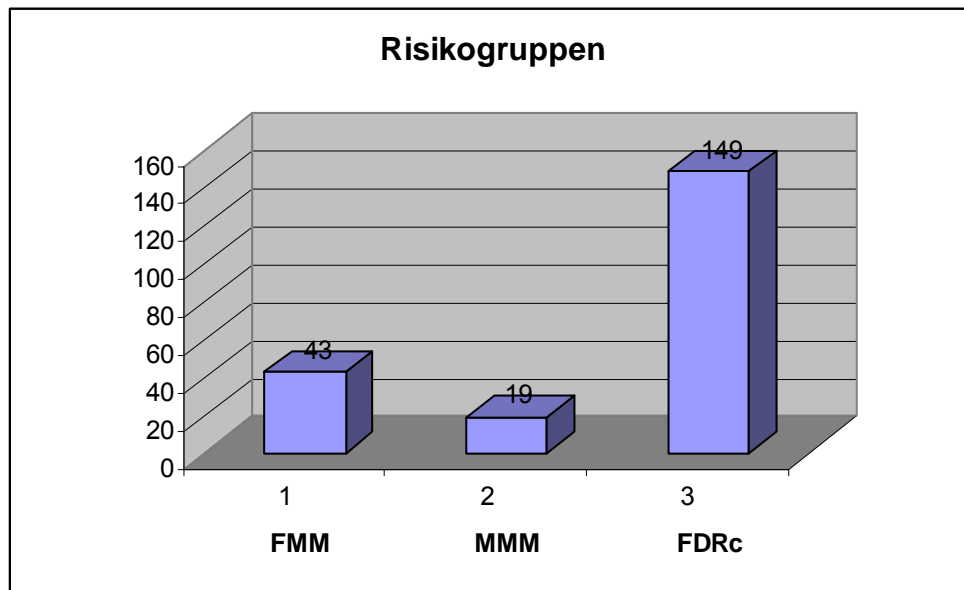
Aus der 375 Patienten umfassenden Datensammlung wurden 317 Patienten berücksichtigt. Dies waren 317 unselektierte Patienten; sie wurden zufällig für eine Teilnahme an der Studie gewonnen.

Für die Auswahl zur molekulargenetische Untersuchung im *CDKN2A* Gen und dem *CDK4* Gen wurden aus den 317 unselektierten Patienten 207 Patienten ausgewählt, die folgendes Merkmal aufwiesen: Alle haben mindestens einen erstgradig Verwandten mit einer Krebserkrankung.

Innerhalb der Gruppe von 207 Patienten wurden anhand von Risikofaktoren folgende drei Untergruppen gebildet: 43 Patienten, die innerhalb ihren erstgradig Verwandten mindestens einen mit Melanomerkrankung oder Pankreaskrebs aufwiesen, wurden als familiäre Melanompatienten (FMM) einer Gruppe zugeordnet. 19 Patienten, die selbst an mindestens zwei oder mehr primären Melanomen erkrankt waren, bildeten die Gruppe der multiplen Melanompatienten (MMM). 145 Melanompatienten konnten keiner dieser beiden Gruppen zugeordnet werden, und wurden zur dritten Gruppe zusammengefasst. Sie haben jedoch alle mindestens einen erstgradig Verwandten mit Krebs (FDRc).

Drei Patienten wiesen sowohl multiple Melanome als auch erstgradig Verwandte mit Melanomerkrankungen auf. Sie wurden ausschließlich der Gruppe familiäres Melanom (FMM) zugeordnet.

Die Anzahl der Melanompatienten innerhalb der einzelnen Risikogruppen wird in Abbildung 6 veranschaulicht.



**Abbildung 6:** Anzahl der Melanompatienten innerhalb der Risikogruppen Familiäres Melanom (43), Multiples Melanom (19) und Patienten mit an Krebs erkrankten erstgradigen Verwandten (149).

### 3.2 DHPLC Ergebnisse des Mutationsscreenings in *CDKN2A* und *CDK4*

Zur Analyse der drei Exons des Gens *CDKN2A* und Exon zwei von *CDK4* wurden die mit Hilfe der PCR vervielfältigten definierten Abschnitte der PatientendNA mittels DHPLC auf genetische Variationen hin untersucht. Dabei wurden die durch genetische Varianten bedingten veränderten Retentionszeiten mit Hilfe von Chromatogrammen graphisch dargestellt.

Die abgebildeten Chromatogramme (Abbildungen 3-6) zeigen zum einen den normalen Verlauf einer DHPLC einer Wildtyp-DNA. Im Vergleich dazu lässt sich erkennen, wie Sequenzvarianten die Aufzeichnung verändern. Zum einen werden die untersuchten Positivkontrollen gezeigt. Dadurch konnte nachgewiesen werden, dass die DPHLC unter den gewählten Bedingungen in dem jeweiligen Gen in der Lage war, Varianten zu erfassen. Die in der zu untersuchenden Pa-

tienten-DNA mittels DHPLC entdeckten genetischen Veränderungen konnten somit im Vergleich mit dem Wildtyp und den Positivkontrollen identifiziert werden.

In den Abbildungen 4-7 werden beispielhaft die Ergebnisse des Screening in den einzelnen Exons der Gene *CDKN2A* und *CDK4* der DHPLC-Untersuchung gezeigt. Es lassen sich die je nach genetischer Variante veränderten Kurven der Retentionszeiten mit dem Wildtyp vergleichen.

### 3.2.1 DHPLC Verlauf von *CDKN2A*

Genetische Varianten ließen sich in den Untersuchungen mittels DHPLC im *CDKN2A* Gen darstellen. Hier zeigte sich im Exon 1 die Veränderung c1VS1+37G->C (siehe Abbildung 4) im Intronbereich eines Patienten aus der Risikogruppe FDRc. Im Exon 2 dieses Gens ließ sich der Polymorphismus Ala148Thr darstellen. Er konnte bei einem der 19 Patienten mit multiplen malignen Melanomen (MMM) und bei drei Patienten der 146 Fälle umfassenden Risikogruppe FDRc gefunden werden. Im Gesamtkollektiv tritt er mit einer Frequenz von ca. 2% auf. Das Chromatogramm ist in Abbildung 4 wiedergegeben. Die meisten Sequenzvarianten zeigten sich im Exon 3 des Gens *CDKN2A*. Die Variante c500G>C (siehe Abbildung 6) ist mit einem Auftreten von ca.30% im Gesamtkollektiv der am häufigsten dargestellte Polymorphismus. c500G>C konnte in 10 von 43 untersuchten familiären Fällen (FMM) sowie bei 7 von 19 Patienten mit multiplen malignen Melanomen (MMM) und bei 46 von 145 Patienten mit sporadischem Melanom (FDRc) gefunden werden. Der Polymorphismus c540C>T tritt mit einer Gesamtfrequenz von ca. 8% im Kollektiv auf. Diese Variante konnte in 6 der familiären Fälle (FMM) nachgewiesen werden sowie bei drei der Patienten mit multiplen malignen Melanomen (MMM) und bei 9 Patienten aus der Gruppe FDRc. Der Verlauf der DHPLC mit Nachweis der Variante c540C>T ist in Abbildung 5 wiedergegeben. Mit einer Frequenz von 14% im Gesamtkollektiv wurde die Variante c569C>T, die schon außerhalb des codierenden Bereiches von Exon 3 liegt, relativ oft nachgewiesen. Sie zeigte sich in 7 der familiären Fälle (FMM) und konnte bei drei der Patienten aus der Gruppe MMM sowie bei 20 Patienten mit sporadischem Melanom (FDRc) mittels



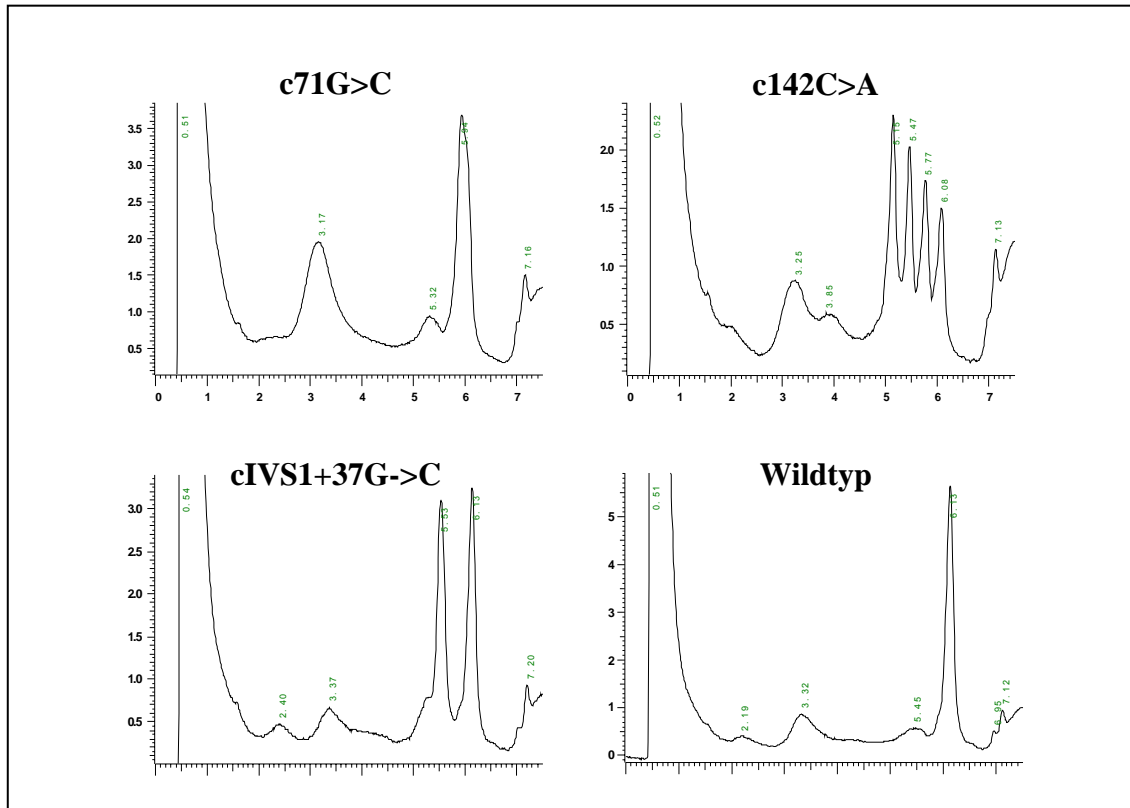
DHPLC ermittelt werden. Beispielhaft ist dieser Polymorphismus in Abbildung 6 dokumentiert. Außerdem traten bestimmte Polymorphismen im Exon 3 in Kombination auf. Mit einer Frequenz von 6% ließen sich die Varianten c540C>T und c569C>T gemeinsam bei Patienten nachweisen. Ebenso zeigte der DHPLC-Verlauf das gemeinsame Auftreten der Polymorphismen c500G>C und c540C>T in drei der familiären Fälle und bei einem Patienten aus der Gruppe FDRc. Tabelle 11 vermittelt einen Überblick über die Anzahl der Polymorphismen in den einzelnen Risikogruppen und die jeweilige Frequenz im Gesamtkollektiv.

### **3.2.2 DHPLC Verlauf in *CDK4***

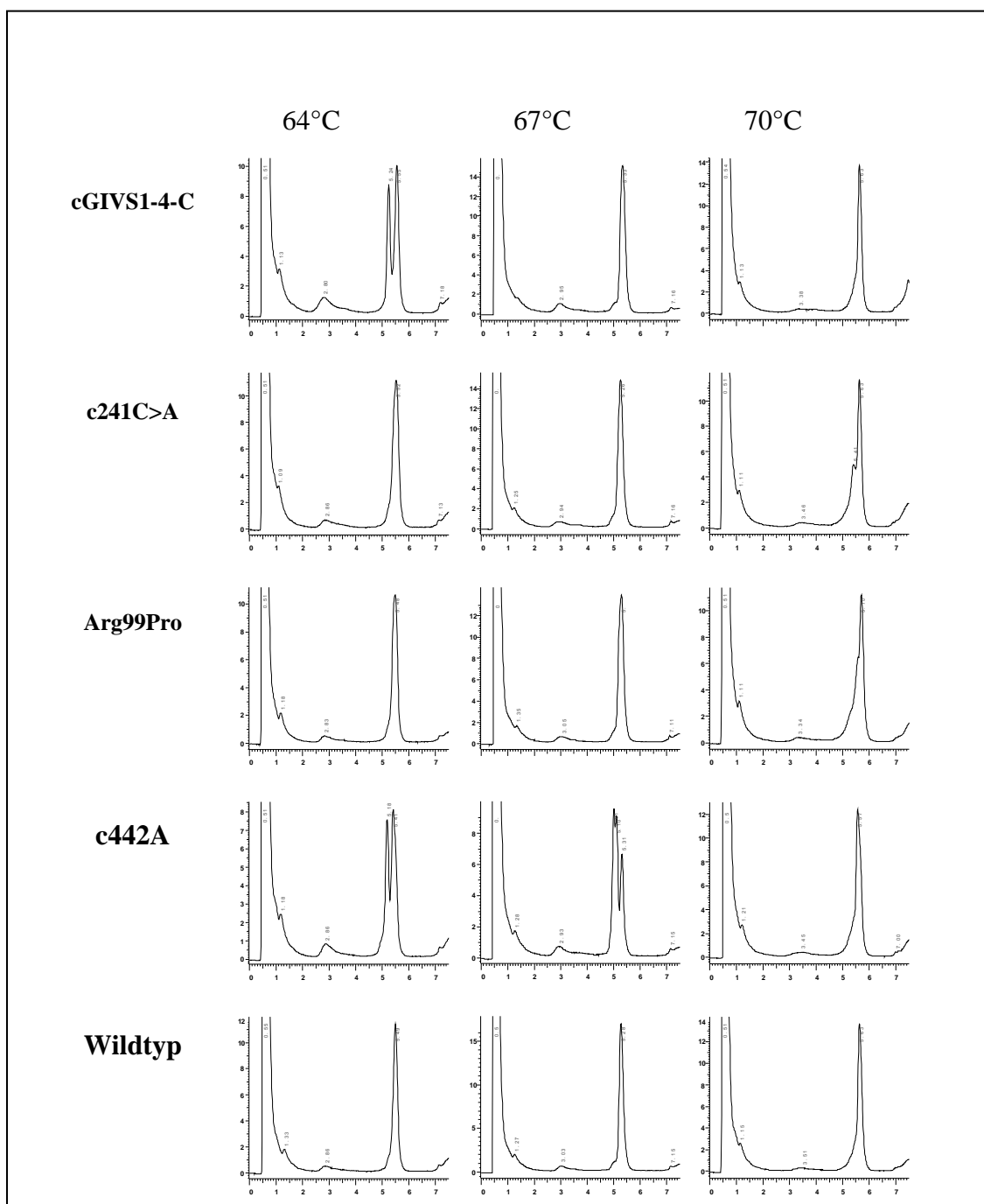
Im Gen *CDK4* konnte bei keinem der Patienten des Studienkollektivs eine genetische Veränderung nachgewiesen werden. Abbildung 7 zeigt beispielhaft den Wildtyp der untersuchten Sequenz in der DHPLC. Außerdem ist der DHPLC Verlauf der Positivkontrolle Arg24His dokumentiert.

### **3.3 Sequenzieren**

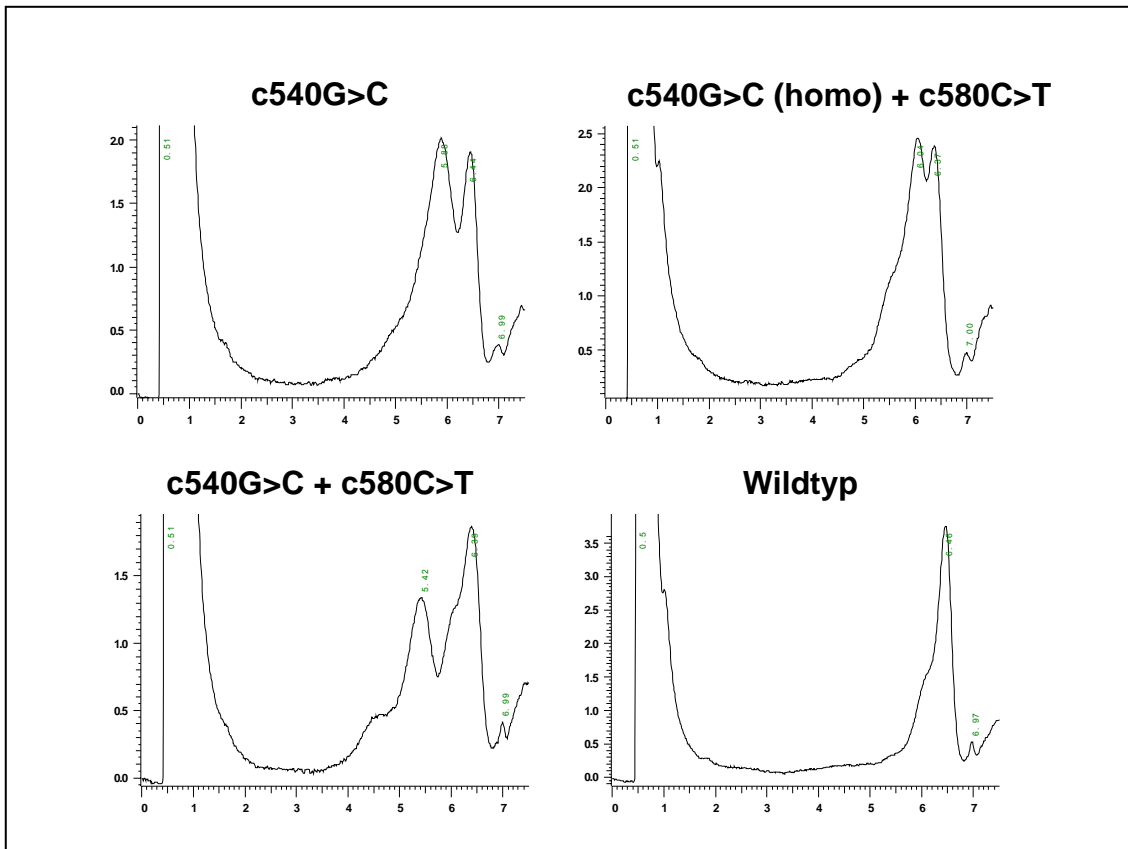
Die Proben mit Auffälligkeiten in DHPLC Chromatogrammen wurden einzeln sequenziert. Dabei konnte in allen Fällen der jeweilige in der DHPLC erkannte Polymorphismus bestätigt werden. Dies wurde nicht für das Exon 3 im *CDKN2A* Gen durchgeführt.



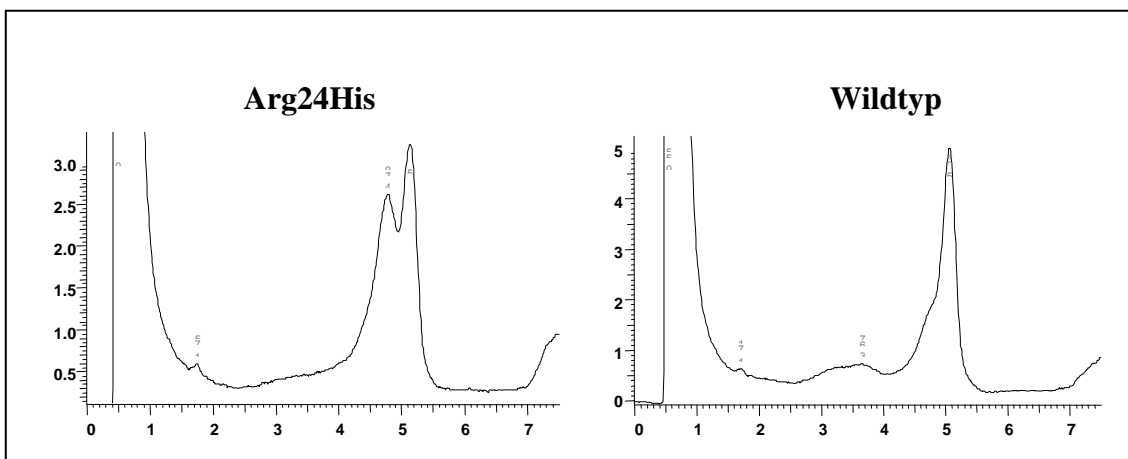
**Abbildung 7:** DHPLC-Verlauf CDKN2A, Exon 1, bei 68°C.  
X-Achse: Retention time in Minuten; y-Achse: Intensity (mV).



**Abbildung 8:** DHPLC-Verlauf CDKN2A, Exon 2, bei 64°C, 67°C und 70°C. X-Achse: Retention time in Minuten; y-Achse: Intensity (mV).



**Abbildung 9:** DHPLC-Verlauf CDKN2A, Exon 3, bei 62°C.  
X-Achse: Retention time in Minuten; y-Achse: Intensity (mV).



**Abbildung 10:** DHPLC-Verlauf CDK4, Exon 2, bei 63°C.  
X-Achse: Retention time in Minuten; y-Achse: Intensity (mV).

**Tabelle 11:** Ergebnisübersicht der Polymorphismen in CDKN2A mit Anzahl und Frequenz dieser in den Risikogruppen (+: Nachweis eines Polymorphismus, -: kein Nachweis eines Polymorphismus).

<b>Poly- morphis- men</b>	<b>FMM +</b>	<b>FMM -</b>	<b>MMM +</b>	<b>MMM -</b>	<b>FDRc +</b>	<b>FDRc -</b>	<b>Ge- samt- anzahl</b>	<b>Fre- quenz</b>
Exon1								
<b>IVS1+37G&gt;C</b>	<b>0</b>	43	<b>0</b>	19	<b>1</b>	144	<b>1</b>	1%
Exon 2								
<b>Ala148Thr</b>	<b>0</b>	43	<b>1</b>	18	<b>3</b>	142	<b>4</b>	1,90%
Exon 3								
<b>500G&gt;C</b>	<b>10</b>	33	<b>7</b>	12	<b>46</b>	99	<b>63</b>	30,24 %
<b>540C&gt;T</b>	<b>6</b>	37	<b>3</b>	16	<b>9</b>	136	<b>17</b>	8,16%
<b>569C&gt;T</b>	<b>7</b>	36	<b>3</b>	16	<b>20</b>	125	<b>30</b>	14%
<b>540C&gt;T + 569C&gt;T</b>	<b>2</b>	41	<b>3</b>	16	<b>8</b>	137	<b>13</b>	6%
<b>500G&gt;C + 540C&gt;T</b>	<b>3</b>	40	<b>0</b>	19	<b>1</b>	144	<b>4</b>	1,90%

## 4 Diskussion

### 4.1 Die Studienergebnisse im Vergleich zur Literatur

Ziel der vorliegenden Studie war es, den Beitrag der Gene *CDKN2A* und *CDK4* in Zusammenhang mit der Melanomsuszeptibilität in einem deutschen Studienkollektiv zu beleuchten. In beiden Genen konnten keine krankheitsverursachenden Mutationen nachgewiesen werden. Die genetische Analyse erbrachte Polymorphismen in *CDKN2A*.

#### 4.1.1 Das Studiendesign und die Methodik

Auf der Suche nach einer möglicher Erklärung für das Fehlen von Mutationen in dem hier untersuchten Studienkollektiv erscheint es empfehlenswert, das Studiendesign genauer zu hinterfragen.

Zunächst lässt sich die Anzahl der untersuchten Patienten diskutieren. Insgesamt wurde die DNA von 207 Patienten analysiert. Darunter befanden sich 43 familiäre Melanompatienten sowie 19 Teilnehmer mit multiplen Melanomen. Einen Überblick über die in den jeweiligen Mutationsstudien untersuchten Patienten, besonders im Hinblick auf das familiäre Melanom, bietet die Tabelle 10. Daraus wird ersichtlich, dass im Vergleich zu anderen europäischen, aber auch US-amerikanischen und australischen Studien die hier untersuchten Patienten ungefähr in der Mitte liegen, was die Anzahl betrifft. Andere Studien untersuchten zwischen 14 und ca. hundert familiärer Fälle. Eine Ausnahme bildet die australische Studie, die 482 familiäre Melanompatienten im Gen *CDKN2A* gescannt hat.<sup>1</sup> Allerdings konnten in diesen anderen, selbst kleinen Kollektiven wie in der italienischen Untersuchung von lediglich 14 familiären Fällen mehrfach Mutationen nachgewiesen werden.<sup>10</sup>

Da die Anzahl der untersuchten Probanden allein nicht ausschlaggebend ist, gilt es, die Art der Datenerhebung sowie die klinischen Einschlusskriterien in die einzelnen Risikogruppen mit denen anderer Studien zu vergleichen und in Frage zu stellen.

Zunächst einmal scheint die Art, auf die die hier vorliegenden anamnestischen Daten gewonnen wurden, relativ zuverlässig zu sein. Die Patienten wurden in einem persönlichen Gespräch befragt und mit Hilfe von Stammbäumen konnten Erkrankungen in der Familie mit besonderer Bedeutung der Melanomerkrankungen dokumentiert werden. Diese anschauliche Art ermöglichte es den Patienten möglicherweise eher als beim Ausfüllen von Fragebögen, sich an die Erkrankungen in der Familie zu erinnern. Auch wenn die Datenerhebung natürlich vor allem auf anamnestischen Daten beruht, so sind alle Melanomerkrankungen der Patienten selbst und viele der Melanome der Verwandten durch einen histologischen Bericht gesichert. Eine wesentliche Über- bzw. Unterschätzung der im Kollektiv vorhandenen Melanomerkrankungen aus diesen dürfte somit nicht stattgefunden haben.

Die klinischen Einschlusskriterien dieser Studie waren folgende: Als familiäre Fälle wurden Patienten klassifiziert, die mindestens einen erstgradig Verwandten mit Melanom bzw. Pankreaskrebs hatten. Außerdem wurden die Patienten mit multiplen Melanomen in einer Gruppe zusammengefasst. Alle anderen waren an einem Melanom erkrankt und wiesen in der Familienanamnese Verwandte mit anderen Krebserkrankungen auf. Drei Patienten hatten sowohl multiple Melanoma als auch Angehörige mit Melanomerkrankungen. Sie wurden zur Gruppe der familiären Melanome gerechnet und somit nur einmal gezählt. Weiterhin wurden keine miteinander Verwandten Patienten in die Gruppe des familiären Melanoms einbezogen. Postuliert wurde ein besonders starker genetischer Hintergrund vor allem für die familiären Fälle. Ein Grund, die Definition der familiären Fälle in Frage zu stellen, kann im Einschluss der Pankreaskrebs-erkrankung zu den familiären Kriterien liegen: Immerhin 10 der Patienten wurden aufgrund dessen zur Gruppe des familiären Melanoms gezählt, dass sie einen an Pankreaskrebs erkrankten Verwandten angaben. Auch wenn der Zusammenhang zwischen *CDKN2A* Mutationen und Pankreaskarzinomen wie schon dargelegt besteht, spielt er möglicherweise dennoch keine sehr große Rolle und mindert somit die Wahrscheinlichkeit, Mutationen in diesem Kollektiv zu finden.

Außerdem ergab die Stammbaumanalyse, dass alle hier untersuchten familiären Patienten nur einen weiteren am Melanom Erkrankten Verwandten hatten. Andere Studien definieren familiäre Fälle erst dann als solche, wenn mehr als zwei Verwandte ebenfalls am Melanom erkrankten bzw. wenn ein erstgradig Verwandter im Alter unter 50 Jahren am Melanom erkrankte.<sup>32,33,56</sup> Gerade in australischen Studien war die Anzahl der Betroffenen Verwandten sehr groß. Die familiäre Gruppe konnte teilweise sogar in weitere Untergruppen unterteilt werden, wobei sich mit ansteigendem familiärem Risiko auch die Prävalenz der Mutationen erhöhte.<sup>1</sup> Es bleibt die Frage, ob in europäischen Ländern mit geringerer Sonnenexposition der Patienten und geringeren Inzidenzen des Melanoms schon ein betroffener Verwandter für die Diagnose des familiären Melanoms ausreicht.

Weiterhin gilt es, die hier verwendete molekulargenetische Screeningmethode der DHPLC zur Detektion von Mutationen zu evaluieren.

Die DHPLC hat sich in Bezug auf Sensitivität, Spezifität, Schnelligkeit und Kosten gegenüber herkömmlichen Methoden bei der Suche nach DNA-Sequenzvarianten, die zur Bildung von Heteroduplices führen, klar überlegen gezeigt. Die Effektivität der Mutationsdetektion von DHPLC wird mit einer Detektionsrate von ca. 95% im Vergleich zu Detektionsraten anderer Methoden wie der SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism Analysis) mit nur ca. 80%.<sup>5,8,49</sup> Bedenken gegenüber einem Einsatz der DHPLC bei der Analyse des aufgrund seines Reichtums an CG-Basenpaaren *CDKN2A* Gens konnten nicht bestätigt werden. Die Literaturrecherche ergab, dass die Methode bei der Suche nach Mutationen speziell im *CDKN2A* Gen schon erfolgreich eingesetzt wurde und dabei als verlässliche Methode bewertet werden konnte.<sup>50</sup> Um sicher zu gehen, die genetischen Varianten richtig zuzuordnen zu können, wurden die Ergebnisse mit Hilfe des direkten Sequenzierens noch einmal nachkontrolliert. Diese Methode konnte in allen Fällen die in den DHPLC Chromatogrammen dargestellten Polymorphismen bestätigen. Eingeschränkt beurteilbar bleibt lediglich das *CDKN2A* Exon 3, das in dieser Studie nicht sequenziert wurde. Auf-



grund der übereinstimmenden Ergebnisse in den anderen Exons jedoch lässt sich von einer sehr geringen Fehlerquote ausgehen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass aufgrund der Größe der Risikogruppen und der eingesetzten sensitiven und spezifischen Methode DHPLC Mutationen zumindest bei familiären Fällen vor allem in *CDKN2A* zu erwarten gewesen wären. Schließlich konnten auch viele andere europäische Studien Mutationen nachweisen. Offen bleibt, inwieweit das Einschlusskriterium einer größeren Anzahl betroffener Verwandten in diesem deutschen Kollektiv die Ergebnisse verändert hätten. Sicherlich müssen diese klinischen Charakteristika in einem Land mit im weltweiten Vergleich relativ geringer Sonneneinstrahlung weiter diskutiert werden, auch wenn eine positive Familienanamnese zweifelsohne ein wichtiger Risikofaktor ist.

#### **4.1.2 Mutationen bei familiären, multiplen und sporadischen Melanompatienten**

Keimbahnmutationen in *CDKN2A* konnten hier in keiner der Risikogruppen nachgewiesen werden. Wie eingangs schon erwähnt, ist es ein Gen mit hoher Penetranz, das einen wichtigen Beitrag zur Melanomdisposition leistet. Worin sind weitere Gründe für die im Studienkollektiv fehlenden Mutationen zu suchen?

Zunächst einmal erscheinen die Ergebnisse der Risikogruppen des sporadischen (FDRc) und des multiplen Melanoms nicht sehr zu überraschen. Es wurde gezeigt, dass hier weltweit *CDKN2A* eine geringere Bedeutung hat als bei familiären Melanompatienten, bei denen es in 25-40% verändert nachgewiesen werden konnte.<sup>30</sup> Besonders bei sporadisch auftretenden Fällen jedoch muss wohl ein Zusammenspiel von mehreren Genen mit niedriger Penetranz eine Rolle spielen und es ist von einem komplexeren Vererbungsmodus auszugehen.

Immer mehr Hinweise deuten daraufhin, dass *CDKN2A* ein Gen ist, dessen Veränderungen spezifisch für eine kleine Gruppe des familiären Melanoms sind. Diese zeichnet sich vor allem aus durch Familien mit mehr als zwei Betrof-

fenen, die eventuell gleichzeitig an multiplen Melanomen erkrankt sind sowie andere Merkmale wie helle Haar- und Augenfarbe als weiteren Hinweis auf eine genetische Suszeptibilität aufweisen können.

Weltweit ist die Inzidenz von Mutationen in *CDKN2A* in Familien mit lediglich zwei Betroffenen gering.<sup>29</sup> Dabei stellt sich die Frage, ob diese scheinbar familiären Fälle nicht eine zufällige Anhäufung von Melanomerkrankungen innerhalb einer Familie darstellen. Dies könnte erklären, warum im hier untersuchten Patientengut keine Mutationen gezeigt werden konnten. Allerdings scheint dieser Effekt der zufälligen Anhäufung von Melanomerkrankungen in Ländern wie Australien mit sehr hohen Inzidenzraten der Erkrankung eine bedeutendere Rolle zu spielen. Dies macht die Hypothese für Patienten in einem Land mit geringerer Inzidenzrate wie Deutschland unwahrscheinlicher.<sup>27</sup> Umweltfaktoren können in das Melanomrisiko durch ein Eingreifen auf genetischer Ebene verändern. Der bekannteste exogene Risikofaktor, die UV-Strahlung, kann scheinbar durch noch unklare Mechanismen die Penetranz der *CDKN2A* Mutationen variieren, was die geographischen Unterschiede dieser erklären könnte.<sup>4</sup> So könnte es aber auch sein, dass mutationspositive Individuen in einem Land mit geringerer UV-Strahlung nicht durch die Melanomentstehung auffällig werden, da UV-Strahlung als modifizierender Faktor im Hintergrund steht. Möglicherweise sind diese Patienten eher in anderen Tumorkollektiven zu finden.

Auch im Gen *CDK4* konnten im hier untersuchten Patientenkollektiv weder Mutationen noch Polymorphismen dargestellt werden. Bisherige Studien konnten lediglich in Hochrisikogruppen des familiären Melanoms insgesamt nur drei unterschiedliche Mutationen, alle im selben Codon des Exon 2, durch Analysen nachweisen. Die Häufung der Mutationen im selben Codon weist auf die funktionelle Signifikanz dieser Stelle hin. Tatsächlich führen Mutationen dort zu fehlender Bindungskapazität des Proteins an die CDKs, was zu einem gestörten Zellwachstum führt. Die klinischen Charakteristika der betroffenen Patienten unterscheiden sich allerdings nicht von denen mit starker familiärer Disposition.<sup>31,56,67</sup> Selbst Studien, die ein größeres Kollektiv mit mehr als hundert familiären Fällen untersucht haben, und deren klinische Merkmale der Patienten deutlicher auf einen genetischen Hintergrund der Erkrankung hinwiesen als in dieser

Studie hier, kamen aufgrund der mangelnden Keimbahnveränderungen zu dem Schluss, dass das Gen eine weniger bedeutende Rolle spielt.<sup>31</sup> Es ist davon auszugehen, dass Mutationen in *CDK4* mit einer sehr viel geringeren Prävalenz bei Melanompatienten zu finden sind als *CDKN2A* Mutationen. Bedeutung haben jene wohl nur in Hochrisikofamilien, die eventuell gleichzeitig auch *CDKN2A* Mutationen aufweisen. Angesichts der relativ wenigen untersuchten familiären Fälle in der vorliegenden Studie erscheint es nicht verwunderlich, dass hier wie in so vielen anderen Studien, keine Mutationen in *CDK4* nachgewiesen werden konnten. Ein Einfluss dieses Gens auf die Melanomdisposition im vorliegenden Kollektiv kann wohl ausgeschlossen werden und damit dessen geringere Bedeutung im Vergleich zum *CDKN2A*-Gen erneut untermauert werden.

## 4.2 Die Bedeutung von Polymorphismen im *CDKN2A*-Gen

Auch wenn im Studienkollektiv keine inaktivierenden Mutationen gefunden werden konnten, so ließen sich in vielen Fällen Polymorphismen in *CDKN2A* nachweisen. Es stellt sich deshalb die Frage, ob und inwieweit Polymorphismen in diesem Gen das Melanomrisiko der Träger beeinflussen.

Neben der Beschreibung von Analyseergebnissen anderer Studien lässt sich für die Recherche nach schon bekannten Sequenzvarianten in den Melanomen *CDKN2A* und *CDK4* gut die durch das Melanoma Genetics Consortium unterstützte Datenbank im Internet nutzen. In dieser so genannten eMelanom-Base sind sämtliche bisher beschriebenen genetischen Veränderungen und die vermutete funktionelle Bedeutung dieser zusammengefasst.<sup>14</sup>

Die zwei in der Literatur am häufigsten beschriebenen Polymorphismen befinden sich im 3'UTR-Bereich des Gens und führen nicht zu Veränderungen in der Aminosäuresequenz des Proteins p16. Zum einen handelt es sich um eine Variante, bei der an der Nukleotidstelle Nt500 die Base Cytosin gegen Guanin ausgetauscht wird: 500C>G. Der andere Polymorphismus, 540C>T, führt an der Nukleotidstelle 540 zum Austausch der Base Cytosin gegen Thymin. Der Polymorphismus 442A>T im Exon 2 wird als dritt häufigster beschrieben. Der Austausch der Basen führt zum Einbau von Threonin anstelle von Alanin in der Aminosäuresequenz des Proteins. Auch in dem hier untersuchten Studienkollektiv haben die Polymorphismen des 3'UTR-Bereichs 500C>G insgesamt mit einer Frequenz von ca. 30% und der Polymorphismus 540C>T mit einer Frequenz von ca. 8% einen relativ großen Anteil. Die Variante 148A>T in Exon 2 tritt mit einer Frequenz von weniger als 2% im gesamten Studienkollektiv auf. Des Weiteren zeigte sich, dass die Polymorphismen 540C>T und 569C>T im gesamten Studienkollektiv in ca. 6% sowie 500C>G und 540C>T in ca. 2% der Fälle in Kombination aufgetreten sind.

Die Relevanz dieser mit relativ hoher Inzidenz auftretenden Polymorphismen ist bisher nicht ganz geklärt. Funktionelle Untersuchungen des Polymorphismus 442A>T betreffend haben gezeigt, dass dieser keinerlei Einfluss auf das Bin-

dungsverhalten von p16 zu den CDKs im Zellzyklus hat <sup>1</sup> und dass somit das Zellwachstum auf normal Art und Weise gehemmt werden kann.

Der Effekt der Polymorphismen 500C>G und 540C>T auf die Expression bzw. Funktion des Proteins p16 sowie die Assoziation zum Melanomrisiko erscheint jedoch unklar.

Auf der Suche nach der funktionellen Bedeutung der Polymorphismen 500C>G und 540C>T verglich eine skandinavische Gruppe deren Inzidenz in Tumorblöcken von Patienten mit sporadischem Melanom im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Dabei zeigte sich ein signifikant höheres Auftreten der Variante 540C>T in der Gruppe der Melanopatienten, während dieser Unterschied bei 500C>G nicht dargestellt werden konnte. Außerdem fiel auf, dass in einigen der Tumore ein Verlust der Allelheterozygotie (LOH) stattgefunden hatte. Dabei konnte der Verlust des Wildtypallels bei vorhandenem varianten Allel beobachtet werden, was einen Einfluss des Polymorphismus auf die Genexpression wahrscheinlicher erscheinen lässt.

Die Hypothese, dass diese Polymorphismen einen Effekt auf das *CDKN2A*-Transkript haben können, konnte in einer anderen Studie untermauert werden. Auf der Suche nach dem Zusammenhang von Regulationsstörungen an Kontrollstellen des Zellzyklus mit der Melanomerkrankung zeigte sich, dass das Vorkommen der Varianten 500C>G und 540C>T bei Melanopatienten mit einem aggressiveren Krankheitsverlauf assoziiert ist. So wiesen die Patienten mit diesen nachgewiesenen Polymorphismen in *CDKN2A* beispielsweise ein kürzeres Intervall zwischen der Erstdiagnose des Melanoms und dem Zeitpunkt der Metastasierung der Erkrankung auf.

Der Zusammenhang zwischen Mutationen und Polymorphismen auf das Melanomrisiko in australischen Melanomfamilien im Vergleich zu einer Kontrollgruppe wurde in einer Bevölkerungs-basierten Studie untersucht.<sup>1</sup> Dabei konnte gezeigt werden, dass die Inzidenz besonders des Polymorphismus 500C>G linear mit dem zunehmenden familiären Risiko anstieg. Am höchsten war die Inzidenz in den Familien, die auch Mutationen in *CDKN2A* aufwiesen. Diese Assoziation zwischen der Frequenz und dem Erkrankungsrisiko blieb auch bestehen, nach-

dem ein Einfluss der ethnischen Herkunft der Familien ausgeschlossen wurde. Dieser Trend zeigte sich ebenso, wenn auch schwächer, für das Auftreten der Polymorphismen 540C>T und 442A>T in Abhängigkeit von der jeweiligen Risikogruppe. Besonders 500C>G scheint laut dieser Studie mit einem erhöhten Melanomrisiko assoziiert zu sein. Im Vergleich dazu ließen sich in dem hier untersuchten Studienkollektiv keine signifikanten Unterschiede im Auftreten der einzelnen Risikogruppen zeigen. Das mag damit zusammenhängen, dass die australische Gruppe ausschließlich familiäre Melanompatienten untersucht hat und in dieser Hochrisikogruppe ähnlich wie bei den Mutationen auch bei den Polymorphismen der genetische Hintergrund wesentlich größer ist. Dafür spricht, dass die Inzidenz linear mit der Risikogruppe ansteigt.

Kombinationen von Polymorphismen konnten wie in der vorliegenden Studie auch in der australischen Studie gezeigt werden. Allerdings wurden hier vor allem die Kombinationen der Varianten 442A>T mit 500C>G und 500C>G mit 540C>T beschrieben. Dabei fiel auf, dass letzter nur selten in Kombination gefunden wurden, ähnlich wie in der hier vorliegenden Studie. Dagegen waren die Polymorphismen 442A>T und 500C>T ausnahmslos miteinander anzutreffen, was hier nicht gezeigt werden konnte. Die funktionelle Bedeutung dieses gemeinsamen Auftretens der Polymorphismen bleibt unklar, eventuell könnte dies auf einen stärker suszeptiblen genetischen Hintergrund hinweisen.<sup>31</sup>

Der in unserem Patientengut einmal nachgewiesene Polymorphismus IVS1+37G>C im *CDKN2A* Exon 1 wurde auch schon an anderer Stelle beschrieben<sup>10</sup>, allerdings wurde er dort bei einem nicht vom Melanom betroffenen Familienangehörigen entdeckt. Einen Hinweis auf die funktionelle Bedeutung dieser Sequenzvariante ist noch unbekannt.<sup>10</sup>

Die hier wohl erstmals beschriebene Variante 569C>T konnte in der vorliegenden Studie mit insgesamt einer Frequenz von ca. 16% nachgewiesen werden. Soweit es die Recherchen ergaben, wurde diese genetische Veränderung bisher nicht beschrieben. Das kann damit zusammenhängen, dass sie weit außerhalb des codierenden Bereichs von Exon 3 liegt. Eine funktionelle Bedeutung ist aus diesem Grund wohl unwahrscheinlich.

Abschließend lässt sich sagen, dass ein, wenn auch nicht sehr starker, Zusammenhang zwischen dem Auftreten der Polymorphismen und dem Melanomrisiko besteht, der allerdings in dieser Studie nicht dargestellt wurde. Diese Assoziation scheint jedoch allgemein im Zusammenhang mit anderen Risikofaktoren das Melanomrisiko zu variieren. Die Polymorphismen scheinen somit lediglich Allele zu sein, die das Melanomrisiko modifizieren.

### **4.3 Schlussfolgerungen: Die Bedeutung der Gene *CDKN2A* und *CDK4***

Keimbahnmutationen in *CDKN2A* und *CDK4* spielen im hier untersuchten Kollektiv bezüglich der Melanomentstehung keine Rolle, so dass auch ein genetisches Screening bei Angehörigen nicht unternommen werden muss. Dies ist wieder ein Hinweis dafür, wie multifaktoriell die Melanomentstehung ist. Auch wenn Polymorphismen möglicherweise bei diesen Patienten einen kleinen Beitrag zum Melanomrisiko liefern, bleiben sicherlich anerkannte Risikofaktoren im Vordergrund. Daher erscheint es weiterhin sinnvoll, Hauttyp, Augenfarbe und Familienanamnese zu beachten und Sonnenschutz zu betreiben.

Auch weltweit spielen inaktivierende Mutationen und Polymorphismen in *CDKN2A* und *CDK4* wahrscheinlich nur in einem kleinen Teil der familiären Melanompatienten eine wesentliche Rolle. Der größte Anteil des Melanomrisikos bleibt weiterhin ungeklärt und mag wohl anderen, vor allem weiteren genetischen Faktoren, zuzuschreiben sein.

### **4.4 Ausblick**

Auf der Suche nach weiteren Faktoren mit Beitrag zur Melanomdisposition sind weitere Gene ins Blickfeld geraten, die im Zusammenhang mit der Melanomentstehung stehen. Wahrscheinlich ist ein Zusammenspiel vieler Faktoren notwendig, die auf genetischer Ebene Zellwachstum und Zelldifferenzierung sowie Pigmentierung und DNA-Reparaturmechanismen betreffen.

Aufgrund der Tatsache, dass sich in Melanomfamilien häufiger eine Linkage zu Chromosom 9 zeigt als es die Ergebnisse der *CDKN2A*-Studien vermuten lassen, ist ein weiteres relevantes Gen in dieser Region zu erwarten. Hier könnte *CDKN2B* bzw. p14ARF eine Rolle spielen, das alternative Transkript des *CDKN2A* Gens. Es wurde gezeigt, dass Mutationen dort neben der Melanomentstehung auch zur Entstehung von Tumoren des Nervensystems führen.<sup>31</sup> Ein weiteres Beispiel ist das *MC1R* Gen, dessen Bedeutung immer mehr in den Vordergrund rückt. Einerseits spielt es im Rahmen der Hautpigmentierung für einen Melanocortinrezeptor codierendes Gen als Gen mit niedriger Penetranz direkt bei der Melanomentstehung eine Rolle, andererseits scheint es auf genetischer Ebene das Melanomrisiko von Trägern mit *CDKN2A* Mutationen zu modifizieren.<sup>60</sup> Außerdem konnte ein bisher unbeachteter Locus 1p22 auf Chromosom 1 entdeckt werden. Hinweise häufen sich, dass hier ein weiteres Gen, zumindest das familiäre Melanom betreffend, für die Melanomdisposition zu finden ist.<sup>19</sup>

Es ist deutlich geworden, wie heterogen die Genetik der Melanomsuszeptibilität ist. Schnelle und aussagekräftige Studien zu weiteren Melanomenen lassen sich sicher in großem Rahmen besser verwirklichen. Übergreifende Zusammenarbeit weltweit in Multicenter-Studien ist wahrscheinlich ein aussichtsreicher Ansatz, auf diesem Gebiet weiter zu forschen. Mit Sicherheit bleibt das Melanom eine spannende Herausforderung für die Onkogenetik und fungiert als exzellentes Musterbeispiel, an dem sich Gen- zu Gen- und Gen- Umweltinteraktionen studieren lassen.



**Tabelle 10: Mutationsstudien im *CDKN2A*-Gen und im *CDK4*-Gen: Literaturauswahl**

<b>Population</b>	<b><i>CDKN2A</i> Mutationen</b>	<b><i>CDK4</i> Mutationen</b>	<b>Publikation</b>
157 Melanompatienten, Polen	0%	-	Analysis of mutations in the p16/ <i>CDKN2A</i> gene in sporadic and familial melanoma in the Polish population  <i>Lamperska, K.,2002</i> <sup>41</sup>
15 Familien, Italien	33%	0%	<i>CDKN2A</i> and <i>CDK4</i> mutation analysis in Italian melanoma-prone families: functional characterization of a novel <i>CDKN2A</i> germ line mutation  <i>Della Torre, G.,2001</i> <sup>10</sup>
80 multiple Melanompatienten, Schweden	20%	-	<i>CDKN2A</i> germ-line mutations in individuals with multiple cutaneous melanomas  <i>Hashemi, J.,2000</i> <sup>28</sup>
30 Familien, Israel	7%	-	Two p16 ( <i>CDKN2A</i> ) germline mutations in 30 Israeli melanoma families  <i>Yakobson, E., 2000</i> <sup>66</sup>
482 familiäre Fälle, Australien	10%	-	<i>CDKN2A</i> variants in a population-based sample of Queensland families with melanoma  <i>Aitken, J.,1999</i> <sup>1</sup>

131 familiäre Fälle, Australien	8%	1%	<i>CDKN2A</i> (P16(INK4a)) and <i>CDK4</i> mutation analysis in 131 Australian melanoma probands: effect of family history and multiple primary melanomas  <i>Holland, E .A., 1999</i> <sup>32</sup>
48 Fälle, Frankreich	44%	2%	Prevalence of p16 and <i>CDK4</i> germline mutations in 48 melanoma-prone families in France. The French Familial Melanoma Study Group  <i>Soufir, N., 1998</i> <sup>55</sup>
27 familiäre Fälle, England	22%	0%	Germline mutations of the <i>CDKN2A</i> gene in UK melanoma families  <i>Harland, M., 1997</i> <sup>27</sup>
31 familiäre Fälle, USA / Australien	-	6,5%	Germline mutations in the p16INK4a binding domain of <i>CDK4</i> in familial melanoma  <i>Zuo, L., 1996</i> <sup>65</sup>
28 familiäre Fälle, USA / Australien	5%	-	Analysis of the p16 gene ( <i>CDKN2A</i> ) as a candidate for the chromosome 9p melanoma susceptibility locus  <i>Kamb, A., 1994</i> <sup>34</sup>

## 5 Zusammenfassung

Keimbahnmutationen in den Tumorsuppressorgenen *CDK4* und *CDKN2A* spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung des malignen Melanoms. Dabei kommt vor allem dem *CDKN2A*-Gen eine besondere Bedeutung als Melanomsuszeptibilitäts-gen zu. Eine Assoziation zwischen genetischen Veränderungen in den Genen *CDN2A* und *CDK4* und der Melanomdisposition ist vor allem bei familiären Melanompatienten zu beobachten.

Um den Beitrag der Gene *CDKN2A* und *CDK4* zur Melanomsuszeptibilität in einem deutschen Studienkollektiv zu beleuchten, wurden 207 Melanompatienten mit molekulargenetischen Methoden auf Sequenzvarianten in den Genen untersucht. Am Melanom erkrankte Patienten wurden anhand klinischer Merkmale mit Stammbaumanalysen in Risikogruppen des familiären (43 Patienten), multiplen (19 Patienten) und sporadischen Melanoms (145 Patienten) eingeteilt. Trotz der klinischen Charakteristika der Risikogruppen und des Einsatzes der hochsensitiven DHPLC-Analytik zur Mutationsdetektion konnten keine krankheitsassoziierten Mutationen in einem der beiden Gene dargestellt werden. Aufgrund des Fehlens von Mutationen muss davon ausgegangen werden, dass die Gene in dem hier untersuchten Risikokollektiv keinen wesentlichen Beitrag zur Krankheitsdisposition leisten. Varianten in *CDK4* sind weltweit in nur drei Hochrisikofamilien nachgewiesen worden, so dass das negative Ergebnis hier nicht überrascht. Es ließen sich aber Polymorphismen in allen drei Exons des *CDKN2A* Gens nachweisen. Die nachgewiesenen Polymorphismen sind größtenteils aus der Literatur bekannt und sind nicht direkt an der Melanomentstehung beteiligt. Sie könnten allenfalls als modifizierende Faktoren auf genetischer Ebene an der Krankheitsposition mitwirken. Krankheitsverursachende Mutationen im *CDKN2A* Gen sind wahrscheinlich nur in Familien mit hoher Penetranz und somit vielen Betroffenen nachzuweisen.

Vor allem aber lässt das Ergebnis der vorliegenden Studie vermuten, dass weitere Gene im Zusammenspiel mit Umweltfaktoren an der Melanomsuszeptibilität beteiligt sein müssen.

## 6 Anhang

### 6.1 Literaturverzeichnis

- 1 Aitken J, Welch J, Duffy D, Milligan A, Green A, Martin N, Hayward N. CDKN2A variants in a population-based sample of Queensland families with melanoma. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 446-52.
- 2 Anderson DE. Clinical characteristics of the genetic variety of cutaneous melanoma in man. *Cancer* 1971; 28: 721-5.
- 3 Bergman W, Gruis N. Familial melanoma and pancreatic cancer. *N Engl J Med* 1996; 334: 471-2.
- 4 Bishop DT, Demenais F, Goldstein AM, Bergman W, Bishop JN, Bressac-de Paillerets B, Chompret A, Ghiorzo P, Gruis N, Hansson J, Harland M, Hayward N, Holland EA, Mann GJ, Mantelli M, Nancarrow D, Platz A, Tucker MA. Geographical variation in the penetrance of CDKN2A mutations for melanoma. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94: 894-903.
- 5 Bunn CF, Lintott CJ, Scott RS, George PM. Comparison of SSCP and DHPLC for the detection of LDLR mutations in a New Zealand cohort. *Hum Mutat* 2002; 19: 311.
- 6 Cannon-Albright LA, Goldgar DE, Neuhausen S, Gruis NA, Anderson DE, Lewis CM, Jost M, Tran TD, Nyguen K, Kamb A, . Localization of the 9p melanoma susceptibility locus (MLM) to a 2-cM region between D9S736 and D9S171. *Genomics* 1994; 23: 265-8.
- 7 Cawley, E. Genetic aspects of malignant melanoma. *Arch Dermatol* 1952; 65: 440-50.
- 8 Choy YS, Dabora SL, Hall F, Ramesh V, Niida Y, Franz D, Kasprzyk-Obara J, Reeve MP, Kwiatkowski DJ. Superiority of denaturing high performance liquid chromatography over single-stranded conformation and conformation-sensitive gel electrophoresis for mutation detection in TSC2. *Ann Hum Genet* 1999; 63: 383-91.
- 9 Clark WH, Jr., Reimer RR, Greene M, Ainsworth AM, Mastrangelo MJ. Origin of familial malignant melanomas from heritable melanocytic lesions. 'The B-K mole syndrome'. *Arch Dermatol* 1978; 114: 732-8.
- 10 Della TG, Pasini B, Frigerio S, Donghi R, Rovini D, Delia D, Peters G, Huot TJ, Bianchi-Scarra G, Lantieri F, Rodolfo M, Parmiani G, Pierotti MA. CDKN2A and CDK4 mutation analysis in Italian melanoma-prone families: functional characterization of a novel CDKN2A germ line mutation. *Br J Cancer* 2001; 85: 836-44.

- 11 FitzGerald MG, Harkin DP, Silva-Arrieta S, MacDonald DJ, Lucchina LC, Unsal H, O'Neill E, Koh J, Finkelstein DM, Isselbacher KJ, Sober AJ, Haber DA. Prevalence of germ-line mutations in p16, p19ARF, and CDK4 in familial melanoma: analysis of a clinic-based population. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 8541-5.
- 12 Ford D, Bliss JM, Swerdlow AJ, Armstrong BK, Franceschi S, Green A, Holly EA, Mack T, MacKie RM, Osterlind A, . Risk of cutaneous melanoma associated with a family history of the disease. The International Melanoma Analysis Group (IMAGE). *Int J Cancer* 1995; 62: 377-81.
- 13 Foulkes WD, Flanders TY, Pollock PM, Hayward NK. The CDKN2A (p16) gene and human cancer. *Mol Med* 1997; 3: 5-20.
- 14 Fung DC, Holland EA, Becker TM, Hayward NK, Bressac-de Paillerets B, Mann GJ. eMelanoBase: an online locus-specific variant database for familial melanoma. *Hum Mutat* 2003; 21: 2-7.
- 15 Garbe C. [The sun and malignant melanoma]. *Hautarzt* 1992; 43: 251-7.
- 16 Garbe C, Blum A. Epidemiology of cutaneous melanoma in Germany and worldwide. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2001; 14: 280-90.
- 17 Garbe C, Buttner P, Weiss J, Soyer HP, Stocker U, Kruger S, Roser M, Weckbecker J, Panizzon R, Bahmer F, . Risk factors for developing cutaneous melanoma and criteria for identifying persons at risk: multicenter case-control study of the Central Malignant Melanoma Registry of the German Dermatological Society. *J Invest Dermatol* 1994; 102: 695-9.
- 18 Garbe C, McLeod GR, Buettner PG. Time trends of cutaneous melanoma in Queensland, Australia and Central Europe. *Cancer* 2000; 89: 1269-78.
- 19 Gillanders E, Hank Juo SH, Holland EA, Jones M, Nancarrow D, Freas-Lutz D, Sood R, Park N, Faruque M, Markey C, Kefford RF, Palmer J, Bergman W, Bishop DT, Tucker MA, Bressac-de Paillerets B, Hansson J, Stark M, Gruis N, Bishop JN, Goldstein AM, Bailey-Wilson JE, Mann GJ, Hayward N, Trent J. Localization of a novel melanoma susceptibility locus to 1p22. *Am J Hum Genet* 2003; 73: 301-13.
- 20 Greene MH. The genetics of hereditary melanoma and nevi. 1998 update. *Cancer* 1999; 86: 2464-77.
- 21 Greene MH, Sanders RJ, Chu FC, Clark WH, Jr., Elder DE, Cogan DG. The familial occurrence of cutaneous melanoma, intraocular melanoma, and the dysplastic nevus syndrome. *Am J Ophthalmol* 1983; 96: 238-45.
- 22 Gruis NA, Sandkuijl LA, van der Velden PA, Bergman W, Frants RR. CDKN2 explains part of the clinical phenotype in Dutch familial atypical

- multiple-mole melanoma (FAMMM) syndrome families. *Melanoma Res* 1995; 5: 169-77.
- 23 Gruis NA, van der Velden PA, Sandkuijl LA, Prins DE, Weaver-Feldhaus J, Kamb A, Bergman W, Frants RR. Homozygotes for CDKN2 (p16) germline mutation in Dutch familial melanoma kindreds. *Nat Genet* 1995; 10: 351-3.
  - 24 Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Frye C, Eeles R, Orlow I, Lacombe L, Ponce-Castaneda V, Lianes P, Latres E, . Genetic evidence in melanoma and bladder cancers that p16 and p53 function in separate pathways of tumor suppression. *Am J Pathol* 1995; 146: 1199-206.
  - 25 Guan KL, Jenkins CW, Li Y, Nichols MA, Wu X, O'Keefe CL, Matera AG, Xiong Y. Growth suppression by p18, a p16INK4/MTS1- and p14INK4B/MTS2-related CDK6 inhibitor, correlates with wild-type pRb function. *Genes Dev* 1994; 8: 2939-52.
  - 26 Haluska FG, Hodi FS. Molecular genetics of familial cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 1998; 16: 670-82.
  - 27 Harland M, Holland EA, Ghiorzo P, Mantelli M, Bianchi-Scarra G, Goldstein AM, Tucker MA, Ponder BA, Mann GJ, Bishop DT, Newton BJ. Mutation screening of the CDKN2A promoter in melanoma families. *Genes Chromosomes Cancer* 2000; 28: 45-57.
  - 28 Hashemi J, Platz A, Ueno T, Stierner U, Ringborg U, Hansson J. CDKN2A germ-line mutations in individuals with multiple cutaneous melanomas. *Cancer Res* 2000; 60: 6864-7.
  - 29 Hayward N. New developments in melanoma genetics. *Curr Oncol Rep* 2000; 2: 300-6.
  - 30 Hayward N. New developments in melanoma genetics. *Curr Oncol Rep* 2000; 2: 300-6.
  - 31 Hayward N. New developments in melanoma genetics. *Curr Oncol Rep* 2000; 2: 300-6.
  - 32 Holland EA, Schmid H, Kefford RF, Mann GJ. *Genes Chromosomes Cancer* 1999; 25: 339-48.
  - 33 Kamb A. Human melanoma genetics. *J Investig Dermatol Symp Proc* 1996; 1: 177-82.
  - 34 Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavitigian SV, Stockert E, Day RS, III, Johnson BE, Skolnick MH. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 1994; 264: 436-40.

- 35 Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavtigian SV, Stockert E, Day RS, III, Johnson BE, Skolnick MH. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 1994; 264: 436-40.
- 36 Kamb A, Shattuck-Eidens D, Eeles R, Liu Q, Gruis NA, Ding W, Hussey C, Tran T, Miki Y, Weaver-Feldhaus J, . Analysis of the p16 gene (CDKN2) as a candidate for the chromosome 9p melanoma susceptibility locus. *Nat Genet* 1994; 8: 23-6.
- 37 Kefford R, Bishop JN, Tucker M, Bressac-de Paillerets B, Bianchi-Scarra G, Bergman W, Goldstein A, Puig S, MacKie R, Elder D, Hansson J, Hayward N, Hogg D, Olsson H. Genetic testing for melanoma. *Lancet Oncol* 2002; 3: 653-4.
- 38 Klein AP, Hruban RH, Brune KA, Petersen GM, Goggins M. Familial pancreatic cancer. *Cancer J* 2001; 7: 266-73.
- 39 Knudson AG. Chasing the cancer demon. *Annu Rev Genet* 2000; 34: 1-19.
- 40 Kohn KW, Jackman J, O'Connor PM. Cell cycle control and cancer chemotherapy. *J Cell Biochem* 1994; 54: 440-52.
- 41 Lamperska K, Karezewska A, Kwiatkowska E, Mackiewicz A. Analysis of mutations in the p16/CDKN2A gene in sporadic and familial melanoma in the Polish population. *Acta Biochim Pol* 2002; 49: 369-76.
- 42 Liggett WH, Jr., Sidransky D. Role of the p16 tumor suppressor gene in cancer. *J Clin Oncol* 1998; 16: 1197-206.
- 43 Lynch HT, Fritchot BC, III, Lynch JF. Familial atypical multiple mole-melanoma syndrome. *J Med Genet* 1978; 15: 352-6.
- 44 Mao L, Merlo A, Bedi G, Shapiro GI, Edwards CD, Rollins BJ, Sidransky D. A novel p16INK4A transcript. *Cancer Res* 1995; 55: 2995-7.
- 45 Mitchell EL, White GR, Santibanez-Koref MF, Varley JM, Heighway J. Mapping of gene loci in the Q13-Q15 region of chromosome 12. *Chromosome Res* 1995; 3: 261-2.
- 46 Nancarrow DJ, Mann GJ, Holland EA, Walker GJ, Beaton SC, Walters MK, Luxford C, Palmer JM, Donald JA, Weber JL, . Confirmation of chromosome 9p linkage in familial melanoma. *Am J Hum Genet* 1993; 53: 936-42.
- 47 Nobori T, Miura K, Wu DJ, Lois A, Takabayashi K, Carson DA. Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* 1994; 368: 753-6.

- 48 Norris, W. A case of fungoid disease. *Edinburgh Med Surg* 1820; 16: 562-65.
- 49 O'Donovan MC, Oefner PJ, Roberts SC, Austin J, Hoogendoorn B, Guy C, Speight G, Upadhyaya M, Sommer SS, McGuffin P. Blind analysis of denaturing high-performance liquid chromatography as a tool for mutation detection. *Genomics* 1998; 52: 44-9.
- 50 Orlow I, Roy P, Barz A, Canchola R, Song Y, Berwick M. Validation of denaturing high performance liquid chromatography as a rapid detection method for the identification of human INK4A gene mutations. *J Mol Diagn* 2001; 3: 158-63.
- 51 Palmieri G, Cossu A, Ascierto PA, Botti G, Strazzullo M, Lissia A, Colombino M, Casula M, Floris C, Tanda F, Pirastu M, Castello G. Definition of the role of chromosome 9p21 in sporadic melanoma through genetic analysis of primary tumours and their metastases. The Melanoma Cooperative Group. *Br J Cancer* 2000; 83: 1707-14.
- 52 Pollock PM, Stark MS, Palmer JM, Walters MK, Aitken JF, Martin NG, Hayward NK. Mutation analysis of the CDKN2A promoter in Australian melanoma families. *Genes Chromosomes Cancer* 2001; 32: 89-94.
- 53 Salopek TG, Marghoob AA, Slade JM, Rao B, Rigel DS, Kopf AW, Bart RS. An estimate of the incidence of malignant melanoma in the United States. Based on a survey of members of the American Academy of Dermatology. *Dermatol Surg* 1995; 21: 301-5.
- 54 Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 1993; 366: 704-7.
- 55 Seykora J, Elder D. Dysplastic nevi and other risk markers for melanoma. *Semin Oncol* 1996; 23: 682-7.
- 56 Soufir N, Avril MF, Chompret A, Demenais F, Bombléd J, Spatz A, Stoppa-Lyonnet D, Benard J, Bressac-de Paillerets B. Prevalence of p16 and CDK4 germline mutations in 48 melanoma-prone families in France. The French Familial Melanoma Study Group. *Hum Mol Genet* 1998; 7: 209-16.
- 57 Spruck CH, III, Gonzalez-Zulueta M, Shibata A, Simoneau AR, Lin MF, Gonzales F, Tsai YC, Jones PA. p16 gene in uncultured tumours. *Nature* 1994; 370: 183-4.
- 58 Stone S, Dayananth P, Jiang P, Weaver-Feldhaus JM, Tavtigian SV, Cannon-Albright L, Kamb A. Genomic structure, expression and mutational analysis of the P15 (MTS2) gene. *Oncogene* 1995; 11: 987-91.



- 59 Tsao H, Zhang X, Kwitkiwski K, Finkelstein DM, Sober AJ, Haluska FG. Low prevalence of germline CDKN2A and CDK4 mutations in patients with early-onset melanoma. *Arch Dermatol* 2000; 136: 1118-22.
- 60 van der Velden PA, Sandkuijl LA, Bergman W, Pavel S, van Mourik L, Frants RR, Gruis NA. Melanocortin-1 receptor variant R151C modifies melanoma risk in Dutch families with melanoma. *Am J Hum Genet* 2001; 69: 774-9.
- 61 Wallace DC, Beardmore GL, Exton LA. Familial malignant melanoma. *Ann Surg* 1973; 177: 15-20.
- 62 Weiss J, Garbe C, Bertz J, Biltz H, Burg G, Hennes B, Jung EG, Kreysel HW, Orfanos CE, Petzold D, . [Risk factors for the development of malignant melanoma in West Germany. Results of a multicenter-case control study]. *Hautarzt* 1990; 41: 309-13.
- 63 Wolfel T, Hauer M, Schneider J, Serrano M, Wolfel C, Klehmann-Hieb E, De Plaen E, Hankeln T, Meyer zum Buschenfelde KH, Beach D. A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science* 1995; 269: 1281-4.
- 64 Xiao W, Oefner PJ. Denaturing high-performance liquid chromatography: A review. *Hum Mutat* 2001; 17: 439-74.
- 65 Xiao W, Oefner PJ. Denaturing high-performance liquid chromatography: A review. *Hum Mutat* 2001; 17: 439-74.
- 66 Yakobson E, Shemesh P, Azizi E, Winkler E, Lassam N, Hogg D, Brookes S, Peters G, Lotem M, Zlotogorski A, Landau M, Safro M, Shafir R, Friedman E, Peretz H. Two p16 (CDKN2A) germline mutations in 30 Israeli melanoma families. *Eur J Hum Genet* 2000; 8: 590-6.
- 67 Zuo L, Weger J, Yang Q, Goldstein AM, Tucker MA, Walker GJ, Hayward N, Dracopoli NC. Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial melanoma. *Nat Genet* 1996; 12: 97-9.

## 6.2 Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitrit
bp (base pairs)	Basenpaare
CDK	Cyclin-abhängige Kinase
Denat.	Denaturation
DHPLC	Denaturing High Performance Liquid Chromatography
DNS	Dysplastisches Nävussyndrom
dNTP	Desoxy-Nukleotid-Triphosphat
ddNTP	Di-Desoxy-Nukleotid-Triphosphat
Elong.	Elongation
FDRc	First Degree Relative with cancer
FMM	Familiäres malignes Melanom
HUGO	Human Genome Organisation
LOH	Loss of Heterozygosity
MMM	Multiples malignes Melanom
Nt	Nukleotid
RBCL	Red blood cell lysis
PCR	Polymerasekettenreaktion
PPL	Protein prescipation lysis
RPM	Rotations per minute
Primer-For.	Primer Forward
Primer-Rev.	Primer Reverse
TEAA	Triethylammoniumacetat
UTR	Untranslated Region
WBCL	white blood cell lysis

### 6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	PCR-Bedingungen <i>CDKN2A</i> , Exon1
Tabelle 2	PCR-Bedingungen <i>CDKN2A</i> , Exon2
Tabelle 3	PCR-Bedingungen <i>CDKN2A</i> , Exon3
Tabelle 4	PCR-Bedingungen <i>CDK4</i> , Exon2
Tabelle 5	DHPLC-Bedingungen <i>CDKN2A</i> , Exon1
Tabelle 6	DHPLC-Bedingungen <i>CDKN2A</i> , Exon2
Tabelle 7	DHPLC-Bedingungen <i>CDKN2A</i> , Exon3
Tabelle 8	DHPLC-Bedingungen <i>CDK4</i> , Exon2
Tabelle 9	Positivkontrollen: <i>CDKN2A</i> und <i>CDK4</i>
Tabelle 10	Mutationsstudien im <i>CDKN2A</i> Gen und im <i>CDK4</i> Gen – Literatúrauswahl
Tabelle 11	Ergebnisübersicht der Polymorphismen in <i>CDKN2A</i> mit Anzahl und Frequenz dieser in den Risikogruppen.

## 6.4 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Topographie des Chromosoms 9. Genlocus 9p21 ist rot markiert.
Abbildung 2	Stammbäume der Risikogruppen FMM, MMM, FDRc.
Abbildung 3	Gensequenzen <i>CDK4</i> . Die jeweiligen Primer sind grün markiert, die codierende Exonsequenz ist rot markiert.
Abbildung 4	Gensequenzen <i>CDKN2A</i> . Die jeweiligen Primer sind grün markiert, die codierenden Exonsequenzen sind rot markiert.
Abbildung 5	Schmelzkurven <i>CDKN2A</i> , Exon 1, 2, 3 und <i>CDK4</i> , Exon 2
Abbildung 6	Anzahl der Melanompatienten innerhalb der Risikogruppen Familiäres Melanom (43), Multiples Melanom (19) und Patienten mit an Krebs erkrankten erstgradigen Verwandten (149)
Abbildung 7	DHPLC-Verlauf <i>CDKN2A</i> , Exon 1, bei 68°C
Abbildung 8	DHPLC-Verlauf <i>CDKN2A</i> , Exon 3, bei 64°C, 67°C und 70°C
Abbildung 9	DHPLC-Verlauf <i>CDKN2A</i> , Exon 3, bei 62°C
Abbildung 10	DHPLC-Verlauf <i>CDK4</i> , Exon 2, bei 63°C

## 6.5 Danksagung

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. med. Claus Garbe für die Überlassung des interessanten Themas sowie für die Möglichkeit, diese Arbeit an der Universitäts-Hautklinik in der unter seiner Leitung stehenden Sektion für dermatologische Onkologie durchführen zu können. Er hat mir die Möglichkeit gegeben, dort die Patientenbefragung durchzuführen und die Proben der Melanompatienten zu akquirieren. Außerdem konnte die Arbeit durch seine Unterstützung und sein Engagement fertig gestellt werden.

Besonders danke ich auch Herrn Dr. med. Peter Meyer. Durch seine engagierte Betreuung des Themas hatte ich die Gelegenheit, mich auf vielfältige Art und Weise mit dem komplexen Thema der Onkogenetik zu beschäftigen. In zahlreichen gemeinsamen Diskussionen habe ich prägende Einblicke in das Fach der Humangenetik erhalten und ließ mich so für die Bedeutung von Genen im Rahmen der Krebsentstehung begeistern. Durch seine Anleitung und konstante Betreuung und in der Zusammenarbeit bei mehreren Publikationen förderte er mein Interesse an wissenschaftlichen Arbeiten.

Für die tatkräftige Unterstützung und wichtige Hinweise bei der Laborarbeit möchte ich mich gerne auch bei Herrn Dr. med. Rüdiger Klaes bedanken.

Mein besonderer Dank gilt den zahlreichen Patienten der Universitäts-Hautklinik, die durch ihr Vertrauen und ihre Mitarbeit diese Studie überhaupt erst ermöglichten.

## 6.6 Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Christina Maria Schmitt  
 Geburtsdatum: 4. November 1978  
 Geburtsort: Hannover  
 Familienstand: ledig  
 Eltern: Dr. rer. nat. F.-U. Schmitt, Dipl. Chemiker  
 Dr. phil. A. Schmitt-Kaufhold

### Schulbildung:

1985 - 1989 Breitwiesen-Grundschule, Gerlingen  
 1989 - 1998 Gymnasium Gerlingen  
 1998 Abitur

### Studium:

Oktober 1998 Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen  
 August 2000 Ärztliche Vorprüfung  
 August 2001 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
 Juli 2001 Beginn des Promotionsvorhabens an der Universitäts-Hautklinik in der Sektion für Dermatologische Onkologie bei Herrn Prof. Dr. med. Garbe  
 September 2003 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
 Oktober 2003 Beginn des Praktischen Jahres  
 30. November 2004 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
 Seit 01. Januar 2005 Assistenzärztin an der Klinik für Urologie und Kinderurologie, Klinikum Fulda

## 6.7 Eigene Publikationen

**Schmitt C**, Klaes R, Stapelmann H, Garbe C, Meyer P. "Melanoma Susceptibility Genes *CDKN2A* and *CDK4*: Lack of Germline Mutations in German Melanoma Patients". Poster presented at the 14<sup>th</sup> 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)

Stapelmann H, Varon R, **Schmitt C**, Garbe C, Sperling K, Meyer P. "Is *NBS1* a Melanoma Susceptibility Gene?". Poster presented at the 14<sup>th</sup> 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 182).

Meyer P, Klaes R, **Schmitt C**, Boettger MB, Garbe C.  
 "Exclusion of *BRAF*<sup>V599E</sup> as a melanoma susceptibility mutation"  
*Int J Cancer*. 2003; 106: 78-80.

Meyer P, **Schmitt C**, Schwarz M, Boettger MB, Garbe C.  
 "The Spectrum of Cancers in First Degree Relatives of Sporadic, Familial and Multiple Melanoma Patients compared with Control Families". Poster presented at the joint meeting of the European Association of Dermato-Oncology (EADO) and the 11th annual meeting of the working group Dermatological Oncology (ADO) in Vienna, Austria, September 27-29, 2001 (Dermato-Oncology – Clinical. Abstract number P-22).

Meyer P, **Schmitt C**, Stroebel W, Boettger MB, Garbe C.  
 "Sequence variants in the melanoma susceptibility genes (*cdkn2a*, *cdk4*): Melanoma Gene Mutation Database (*MGMdb*)". Poster presented at the joint meeting of the European Association of Dermato-Oncology (EADO) and the 11th annual meeting of the working group Dermatological Oncology (ADO), in

Vienna, Austria, September 27-29, 2001 (Dermato-Oncology – Experimental. Abstract number P-21).

Meyer P, Shi MM, Roth R, **Schmitt C**, Kammerer S, Sergi C, Nelson MR, Stapelmann H, Martin NG, James MR, Montgomery GW, Hayward NK, Stark MJ, Braun A, Garbe C, Duffy DL. "BRAF variants and melanocyte neoplasia". Invited lecture held at the first International Melanoma Research Congress in Philadelphia, USA, June 21-24, 2003.

Meyer P, Shi MM, Roth R, **Schmitt C**, Kammerer S, Sergi C, Nelson MR, Stapelmann H, Martin NG, James MR, Montgomery GW, Hayward NK, Stark MJ, Braun A, Garbe C, Duffy DL. "BRAF polymorphisms and risk of melanocytic neoplasia". Invited lecture held at the fifth annual meeting of the Mutagenesis and Experimental Pathology Society of Australia in Sydney, Australia, November 26-28, 2003.