

**Aus der Universitäts-Hautklinik Tübingen
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Röcken**

***Bestätigung des Single Nucleotide Polymorphism
rs7023329 in MTAP als Risikofaktor
für die Melanomentstehung in Deutschland***

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Angela Einfalt
aus
Bad Friedrichshall**

2013

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. J. Bauer

2. Berichterstatter:

Privatdozent Dr. P. Adam

Meinen Eltern

gewidmet

Inhalt

1	Einleitung.....	10
1.1	Definition des malignen Melanoms	10
1.2	Klinisch-histologische Subtypen des Melanoms.....	11
1.2.1	Das superfiziell spreitende Melanom	11
1.2.2	Das primäre noduläre Melanom.....	12
1.2.3	Das Lentigo maligna Melanom	12
1.2.4	Das akrolentiginöse Melanom.....	12
1.3	Klassifikation und Metastasen.....	13
1.4	Epidemiologie und Prognose des malignen Melanoms.....	14
1.5	Melanomentstehung.....	16
1.5.1	Umweltfaktoren.....	16
1.5.2	Risikofaktoren des Pigmentsystems	17
1.5.3	Lentiginos	18
1.5.4	Weitere Ursachen	18
1.6	Genetische Risikofaktoren des malignen Melanoms	18
1.6.1	MC1R (Melanocortin-1-Rezeptor).....	19
1.6.2	MTAP und SNP rs7023329	20
1.6.3	CDKN2A (Cyclin-dependant-kinase-inhibitor 2a).....	22
1.7	Somatische Mutationen im malignen Melanom.....	23
1.7.1	BRAF (Viral-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1):	23
1.7.2	NRAS (Neuroblastoma RAS v-ras oncogene homolog)	24
1.7.3	KIT	25
1.7.4	TYR, TYRP und DCT.....	25
1.8	Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit.....	27
2	Material und Methoden	28

2.1	Patientengruppe	28
2.2	Kontrollgruppe	28
2.3	DNS Isolierung aus den Paraffinschnitten	29
2.4	DNS Isolierung aus dem Blut der Kontrollgruppe	29
2.5	PCR der Proben	30
2.5.1	Verwendete Reagenzien und Hersteller	31
2.5.2	Primer	31
2.5.3	Gelelektrophorese	32
2.6	EXO-SAP-Verdau	33
2.6.1	Reagenzien und Firmen	33
2.7	Sequenzierung der PCR Produkte	33
2.8	Statistische Auswertung	34
2.9	Ethik	34
3	Ergebnisse	35
3.1	Vergleich der SNP-Verteilung im untersuchten Kollektiv mit anderen Populationen	35
3.1.1	Vergleich der Prävalenz der Genotypen AA und AG in beiden Kohorten	36
3.1.2	Vergleich der Genotypen AA und GG in beiden Kohorten	38
3.1.3	Vergleich der BRAF-mutierten Melanom-Subkohorte mit der Kontrollgruppe	39
3.1.4	Vergleich BRAF-mutierter Melanome mit BRAF-wt-Melanomen ..	40
3.1.5	Vergleich NRAS-mutierter Melanome mit der Kontrollgruppe	42
3.1.6	Vergleich NRAS-mutierter Melanome mit NRAS-wt-Melanomen ..	43
3.2	Zusammenfassung der Ergebnisse	44
4	Diskussion	46

4.1	SNP-Varianten in verschiedenen Populationen	47
4.2	Vergleich der Genotypen zwischen der Melanom- und der Kontrollgruppe.....	48
4.3	Vergleich zwischen BRAF-mutierten und BRAF-wt-Melanomen.....	49
4.4	Vergleich der NRAS-mutierten mit der Kontrollgruppe und den NRAS- wt Melanomen.....	49
4.5	Zusammenfassung der Diskussion	49
5	Zusammenfassung	51
6	Literaturverzeichnis.....	53
7	Danksagung.....	58

Abkürzungsverzeichnis

A	ALM:	Akrolentiginöses Melanom
	α -MSH:	Alpha-melanozyten-stimulierendes Hormon
B	BRAF:	V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
	Bp:	Basenpaare
	BSA:	Bovine Serum Albumin
	Bzw.:	beziehungsweise
C	cAMP:	zyklisches Adenosinmonophosphat
	CDKN2A	Cyclin dependent kinase inhibitor 2A
	CDK 4:	Cyclin dependant kinase 4
	COPD:	chronisch obstruktive Lungenerkrankung
D	dd:	doppelt destilliert
	DM:	Diabetes mellitus
	DNS:	Desoxyribonukleinsäure
	DOPA:	Dihydroxyphenylalanin
E	EDTA:	Ethylendiamin-Tetraacetat
	EGFR:	Epidermal Growth Factor Receptor
G	GIST:	Gastrointestinaler Stromatumor
	Glu:	Glutaminsäure
	GTP:	Guanosintriphosphat
	GWAS:	Genome Wide Association Study
J	JÜR:	Jahres-Überlebensrate
K:	KI:	Konfidenzintervall
L	LDH:	Laktat-Dehydrogenase
	Lys:	Lysin
M	MAP:	Mitogen activated protein
	MEK:	MAP-Kinase, Extracellular signal regulated kinase
	MCR1:	Melanocortin 1 Rezeptor
	MTAP:	Methylthioadenosin-Phosphorylase
	μ l:	Mikroliter

N	NM:	Noduläres Melanom
	Nm:	Nanometer
	NRAS:	Neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog
O	OCA1:	Okulokutaner Albinismus Typ 1
	OR:	Odds Ratio
P	PCR:	Polymerase Chain Reaction
	PLX:	Plexxikon
	p16:	Protein 16
R	RB:	Retinoblastom-Protein
	RKI:	Robert-Koch-Institut
	rs:	reference SNP
S	SAP:	Shrimp Alkaline Phosphatase
	SNP:	Single Nucleotide Polymorphism
	SSM:	superfiziell spreitendes Melanom
T	TYR:	Tyrosinase
U	UV:	Ultraviolett
W	Wt:	Wildtyp

Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1: Superfiziell spreitendes Melanom.....	11
Abbildung 2: Primäres noduläres Melanom.....	12
Abbildung 3: Lentigo maligna Melanom	12
Abbildung 4: Akrolentiginöses Melanom	12
Abbildung 5: Verteilung der Melanomtypen in Deutschland	13
Abbildung 6: SNP-Verteilung.....	21
Abbildung 7: Melaninsynthese.....	26
Abbildung 8: Verteilung der BRAF- und NRAS-Mutationen im Patientenkollektiv	45

Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1: TNM-Klassifikation des Melanoms.....	13
Tabelle 2: Invasionstiefe nach Clark.....	15
Tabelle 3: Hauttypen nach Fitzpatrick	17
Tabelle 4: Allelfrequenzen des SNP rs7023329 in verschiedenen Populationen	35
Tabelle 5: Vergleich der Genotypen AA/AG in beiden Kohorten	36
Tabelle 6: Vergleich der Genotypen AA/GG in beiden Kohorten.....	38
Tabelle 7: Vergleich BRAF-mutierter Melanome mit der Kontrollgruppe	39
Tabelle 8: Vergleich BRAF-mutierter Melanome mit BRAF-wt-Melanomen	40
Tabelle 9: Vergleich NRAS-mutierter Melanome mit der Kontrollgruppe.....	42
Tabelle 10: Vergleich NRAS-mutierter Melanome mit NRAS-wt-Melanomen...	43
Tabelle 11: Verteilung der Genotypen in der untersuchten Kohorte und der GWAS	44

1 Einleitung

1.1 Definition des malignen Melanoms

Das maligne Melanom der Haut ist ein von Melanozyten ausgehender Tumor, welcher ein invasives Wachstum und eine frühe lymphogene, regionäre, sowie hämatogene Metastasierung zeigt. In seltenen Fällen tritt auch ein Melanom der Schleimhäute, Meningen oder Lymphknoten auf. (Garbe 2006)

Melanozyten stammen embryologisch von Melanoblasten ab, welche wiederum aus Neuralleistenzellen entstehen und während der Embryonalentwicklung in das Stratum basale der Epidermis einwandern. Außerhalb der Haut sind Melanozyten in Haarfollikeln, den Meningen, der Aderhaut der Augen und in Schleimhäuten angesiedelt. Dort bilden sie Melanin, dessen Menge und Art die Pigmentierung bestimmt. (Moore 2007) Das Melanin wird über dendritische Ausläufer in die Keratinozyten abgegeben, welche um Melanozyten herum angesiedelt sind und circa 35 mal häufiger vorkommen als Melanozyten.

Obwohl das maligne Melanom nur circa 4% der Tumoren der Haut ausmacht, hat es eine besondere Wichtigkeit durch seine hohe Malignität und die steigende Inzidenz in den letzten Jahrzehnten in der weißen Bevölkerung. (Garbe 2006) Klinisch lässt sich eine maligne Veränderung manchmal nur schwer von einem benignen Nävus unterscheiden. Die sogenannte ABCDE-Regel bietet eine Hilfestellung bei der Dignitätseinordnung der Pigmentmale (Sterry and Paus 2000):

A = Asymmetrie

B = Begrenzung (unregelmäßig)

C = Color (unterschiedliche Farbtöne)

D = Durchmesser > 5 mm

E = Erhabenheit

1.2 Klinisch-histologische Subtypen des Melanoms

Man unterscheidet histologisch verschiedene Subtypen des Melanoms. Nach absteigender Häufigkeit sind dies das superfiziell spreitende (SSM), das primäre noduläre (NM), das lentigo maligna (LMM) und das akrolentiginöse (ALM) maligne Melanom. (Garbe and Orfanos 1992; Weyers, Euler et al. 1999)

Neben weiteren Untertypen, sowie amelanotischem Auftreten der Melanome, bestehen auch unklassifizierbare sowie extrakutane Tumorarten, die insgesamt circa 5% der Melanome ausmachen. Bei Männern tritt das maligne Melanom bevorzugt am Rücken, bei Frauen bevorzugt an den Unterschenkeln auf. (Rassner 2002)

1.2.1 Das superfiziell spreitende Melanom



Dieser Subtyp mit einem Anteil von 57% ist bevorzugt im Bereich der Beine, Schultern und Rücken lokalisiert. Es weist ein flächenhaftes makulo-papulöses Wachstum und unterschiedliche Farbgebung (braun-schwarz, rosa etc.) auf und wird in einem medianen Alter von 51 Jahren diagnostiziert.

Abbildung 1: Superfiziell spreitendes Melanom

1.2.2 Das primäre noduläre Melanom



Abbildung 2: Primäres noduläres Melanom

Charakteristisch für das noduläre Melanom ist sein knotiges Wachstum mit teilweise kurzer Anamnese und einem häufig amelanotischen Auftreten. Das mediane Patientenalter liegt bei 56 Jahren. Das noduläre Melanom ist mit 21% der zweithäufigste Melanomtyp und neigt zur früher Ulzeration.

1.2.3 Das Lentigo maligna Melanom



Abbildung 3: Lentigo maligna Melanom

Dieser Subtyp entwickelt sich auf dem Boden eines In-situ-Melanoms (Lentigo maligna) und zeigt ein spätes ulzerierendes Wachstum. Bevorzugt angesiedelt ist es an Kopf und Gesicht. Das mediane Alter bei Diagnosestellung liegt bei 68 Jahren und der prozentuale Anteil an den Melanomsubtypen liegt bei 9%.

1.2.4 Das akrolentiginöse Melanom



Abbildung 4: Akrolentiginöses Melanom

Dieser Subtyp findet sich bevorzugt an den Handflächen, Fußsohlen und Nägeln. Dies ist der häufigste Melanomtyp der schwarzen Bevölkerung und erschwert durch sein häufig amelanotisches Auftreten die Diagnosestellung. Das mediane Alter beträgt 63 Jahre bei Erstdiagnose. Das akrolentiginöse Melanom kommt mit einem Anteil von 4% in der deutschen Bevölkerung vor. (Stolz and Landthaler 1994)

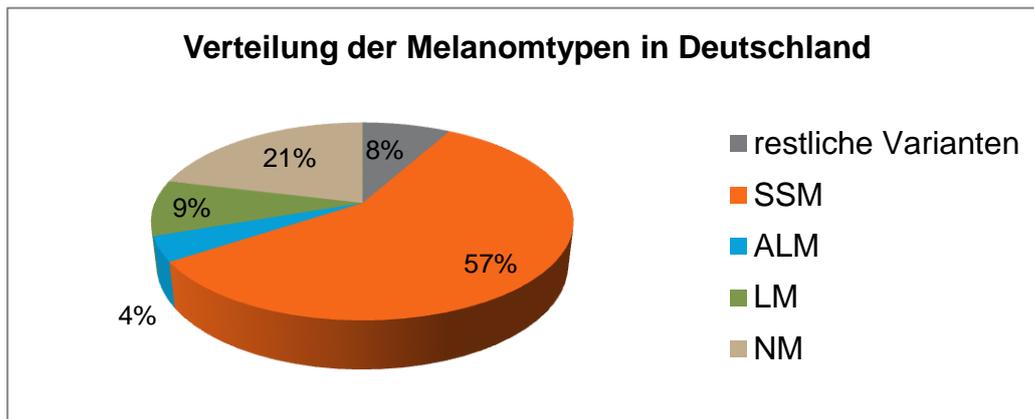


Abbildung 5: Verteilung der Melanomtypen in Deutschland

(Garbe and Orfanos 1992)

1.3 Klassifikation und Metastasen

Das maligne Melanom neigt bereits sehr früh zur Metastasierung, was seine hohe Malignität ausmacht. Es zeigt sowohl eine primär hämatogene als auch primär lymphogene Streuung. Circa 2/3 der Metastasen sind durch den Lymphabfluss primär peritumoral lokalisiert. Die Klassifikation erfolgt nach dem TNM-System. (Balch, Gershenwald et al. 2009)

Tabelle 1: TNM-Klassifikation des Melanoms

T-Klassifikation	Tumordicke	Ulzerationen/ Mitosen
T1	<= 1,00 mm	a: ohne Ulzeration und Mitosen <1/mm ² b: mit Ulzeration oder Mitosen > 1/mm ²
T2	1,01-2,00mm	a: ohne Ulzeration b: mit Ulzeration
T3	2,01-4,00mm	a: ohne Ulzeration b: mit Ulzeration
T4	> 4mm	a: ohne Ulzeration b: mit Ulzeration

N-Klassifikation	Zahl befallender Lymphknoten	Ausmaß der Metastasierung
N1	1 LK	a: Mikrometastasen b: Makrometastasen
N2	2-3 LK	a: Mikrometastasen b: Makrometastasen c: Satelliten oder in-transit-Metastasen
N3	> 4 LK	Satelliten oder in-transit-Metastasen, mit LK- Beteiligung

M-Klassifikation	Art	LDH
M1a	Haut, Subkutis, LK	normal
M1b	Lunge	normal
M1c	Andere Organe, Fernmetastasen	normal erhöht

(Balch, Gershenwald et al. 2009)

Fernmetastasen des Melanoms sind mit einer besonders ungünstigen Prognose verbunden und haben eine mittlere Überlebensdauer, je nach Organbefall, von circa sechs Monaten. Am häufigsten sind Lymphknoten, Lunge, Leber, Gehirn, Skelett und der Gastrointestinaltrakt befallen. (Goehl and Meyer 2008)

1.4 Epidemiologie und Prognose des malignen Melanoms

Charakteristisch für das maligne Melanom ist die stetig steigende Inzidenz mit den höchsten Inzidenzraten in Australien und Neuseeland und den niedrigsten in Afrika und Asien. (Desmond and Soong 2003)

Während die Inzidenz von drei Fällen pro 100.000 Einwohnern in den 70er Jahren des 20. Jahrhunderts auf 10-12 pro 100.000 Einwohnern Ende des 20.

Jahrhunderts in Mitteleuropa angestiegen ist, blieb die Mortalität nahezu unverändert, was vor allem an einer besseren Frühdiagnostik und Therapie liegt. Laut Robert-Koch-Institut erkrankten geschätzt 8470 Frauen und 7360 Männer im Jahr 2006 in Deutschland an einem Melanom. Damit lag der Anteil an allen bösartigen Erkrankungen in Deutschland für das maligne Melanom bei 4,3% bei den Frauen und 3,2% bei den Männern. Die 5-JÜR lag bei den Frauen mit über 90% über der der Männer, die bei 85% lag. (Husmann 2010)

Das maligne Melanom betrifft am häufigsten die mittlere Altersgruppe mit einem mittleren Erkrankungsalter von 58 Jahren bei Frauen und 64 Jahren bei Männern. (Garbe and Orfanos 1992)

Die Prognose ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Entscheidend ist die Früherkennung, da die Tumordicke einen wichtigen Einfluss auf die Mortalität hat. Die Tumordicke ist nach Breslow als die maximale Ausdehnung des Tumors in Millimetern definiert. Die Invasionsstiefe nach Clark beschreibt die Tumorausdehnung in Relation zu den Hautschichten. (Breslow 1970; Clark and Jacobs 1998)

Das Überleben hängt entscheidend von der Metastasierung ab, welche wiederum mit dem vertikalen Wachstum der Melanome assoziiert ist. Deshalb sind die Tumordicke, sowie die Bestimmung der Invasionsstiefe bedeutend für die Prognose des malignen Melanoms.

Tabelle 2: Invasionsstiefe nach Clark

Level I	Auf die <i>Epidermis</i> beschränkt
Level II	Ins <i>Stratum papillare</i> hineinreichend
Level III	Bis in die Dermis hineinreichend
Level IV	Ins <i>Stratum reticulare</i> hineinreichend
Level V	Ins subkutane Fettgewebe hineinreichend

1.5 Melanomentstehung

Sowohl genetische als auch Umweltfaktoren spielen eine Rolle bei der Entstehung des malignen Melanoms und es besteht eine große Heterogenität an Ursachen und Mutationen, die Einfluss auf die Progression nehmen. (Dahl and Guldberg 2007; Meyle and Guldberg 2009)

Jede Zelle des menschlichen Organismus steht in einem physiologischen Gleichgewicht zwischen Zellneubildung, Differenzierung und Zelltod. Wird dieses Gleichgewicht gestört durch z.B. verminderten Zelltod, „falsche“ oder unterbliebene Differenzierung oder gesteigertes Zellwachstum, kommt es zur Tumorentstehung. Für diese fehlgeleiteten Mechanismen gibt es unterschiedliche Ursachen. Mutationen in Genen, die bei der Regulation des Zellzyklus eine Rolle spielen, sind hierbei von besonderer Bedeutung. Mutationen können ein An- bzw. Abschalten gewisser Gene bewirken und somit das Gleichgewicht zwischen Zellerneuerung und Zelltod stören. Diese Veränderungen können sowohl durch verschiedene Mutagene (z.B. UV-Strahlung) erworben aber auch erblich bedingt sein. Dazu zählen unter anderem Mutationen in *CDKN2A*. Zu den erworbenen Mutationen gehört die Mutation im *BRAF*-Gen, welche in 60-80% der malignen Melanome zu finden ist. (Davies, Bignell et al. 2002) Einige wichtige Ursachen und Mutationen werden im Folgenden näher beschrieben.

1.5.1 Umweltfaktoren

UV-Strahlung ist für den Menschen essentiell, da sie für die Synthese von Vitamin D benötigt wird. Sie verursacht jedoch auch Schäden in der DNS und kann so zur Tumorentstehung beitragen. (Woodhead, Setlow et al. 1999; de Gruijl 2002)

Man unterscheidet UVB-Strahlung mit einer Wellenlänge von 280-320 nm und langwellige UVA-Strahlung mit einer Wellenlänge von 320-400 nm. (De Fabo, Noonan et al. 2004)

Intermittierende hohe Sonnenbelastung, die oftmals zur Ausbildung eines Sonnenbrandes führt, spielt in der Melanomentstehung eine größere Rolle als chronische moderate UV-Exposition. Den größten Einfluss hat hierbei die UVB-Strahlung. (Osterlind, Tucker et al. 1988; De Fabo, Noonan et al. 2004) Vor allem im Kindesalter ist die akute Sonnenbelastung besonders risikobehaftet und führt zur Entstehung bestimmter Mutationen. (Noonan, Recio et al. 2001) Die verschiedenen Hauttypen sind unterschiedlich fotosensibel. Man unterscheidet nach Fitzpatrick sechs verschiedene Hauttypen, die von I-VI an Lichtempfindlichkeit abnehmen. Bei dem hellen Hauttyp I, der sehr schnell einen Sonnenbrand entwickelt, ist das Melanom-Risiko am höchsten. (De Fabo, Noonan et al. 2004)

Tabelle 3: Hauttypen nach Fitzpatrick

Hauttyp	Beschreibung	Vorkommen
I	Keltischer Typ	v.a. Schottland, Irland
II	Nordischer Typ	Heller Hauttyp in Nordeuropa, selten in Deutschland
III	Mischtyp	Häufigster Hauttyp in Deutschland
IV	Mediterraner Typ	v.a. Südeuropa
V	Dunkler Typ	v.a. Afrika, Arabien
VI	Schwarzer Typ	v.a. Schwarzafrika

(Tanenbaum, Parrish et al. 1975)

1.5.2 Risikofaktoren des Pigmentsystems

Das maligne Melanom kann sowohl auf vorbestehenden Nävi als auch de novo entstehen. Ein erhöhtes Melanomrisiko besteht vor allem bei Patienten mit einer großen Anzahl an Nävi, wobei das Risiko ein Melanom zu entwickeln nahezu linear mit deren Anzahl steigt. Mehr als 100 Nävi erhöhen das Melanomrisiko auf das acht- bis zehnfache gegenüber der Normalbevölkerung. (Bauer and Garbe 2003)

Ebenfalls spielen dysplastische Nävi eine Rolle als Risikoindikatoren. Das relative Risiko für die Entwicklung des Melanoms steigt in Abhängigkeit von der Anzahl dysplastischer Nävi, wobei es für einen dysplastischen Nävus 2,4-fach (Carli, Biggeri et al. 1995) und bei über zehn 32-fach gegenüber der Normalbevölkerung erhöht ist. (Tucker, Halpern et al. 1997) Diese Angaben sind jedoch stark populationsabhängig.

1.5.3 Lentigines

Lentigo simplex ist eine benigne Melanozytenansammlung, welche flach im Hautniveau liegt und einen symmetrischen Aufbau zeigt. Lentigines solares hingegen entstehen im Laufe des Lebens unter Sonneneinstrahlung und sind in der Mehrzahl der Fälle bei Personen über 50 Jahren an besonders lichtexponierten Hautstellen zu finden. Melanome entstehen selten auf präexiszenten Lentigines solares und es besteht kein signifikanter Zusammenhang mit der Melanomentstehung. (Situm, Bulat et al. 2010) (Kaddu, Soyer et al. 1997)

1.5.4 Weitere Ursachen

Es wurde ein erhöhtes Melanomrisiko bei nierentransplantierten und immunsupprimierten Patienten beobachtet. (Hollenbeak, Todd et al. 2005)

1.6 **Genetische Risikofaktoren des malignen Melanoms**

Als *Single Nucleotide Polymorphism* bezeichnet man eine Variation in der Basenfolge der DNS, die nur ein Basenpaar betrifft und in der Bevölkerung große Variabilität zeigt. (Wang, Fan et al. 1998) Diese Punktmutation kann stumm verlaufen, indem der Basenaustausch in einem nicht kodierenden DNS-Abschnitt stattfindet, oder dadurch, dass durch den Austausch das Genprodukt gleich bleibt, da mehrere Basentriplets jeweils für die gleiche Aminosäure kodieren (z.B. GCC→GCA, beide Alanin). Manche SNP beeinflussen jedoch die Genfunktion, da sie in kodierenden Bereichen liegen und so die Eigenschaft der jeweiligen resultierenden Proteine verändern können.

Diese SNP zeigen in der Bevölkerung große Variationen, sowohl zwischen Individuen der gleichen ethnischen Gruppe, als auch zwischen verschiedenen Bevölkerungsgruppen. Diese Variationen spielen in der medizinischen Forschung eine große Rolle, da man sich erhofft herauszufinden, warum manche Personen mehr zur Entwicklung eines gewissen Phänotyps bzw. Erkrankung neigen als andere. Es wurden verschiedene SNP beschrieben, die als Risikofaktoren für das Auftreten bestimmter Erkrankungen, wie COPD, Typ II DM, Atherosklerose anzunehmen sind. (Helgadottir, Thorleifsson et al. 2007; Scott, Mohlke et al. 2007; de Andrade, Li et al. 2011)

Andere liegen in der Nachbarschaft bekannter Risikogene von Tumoren oder auch innerhalb dieser. Diese Eigenschaft ist für die medizinische Forschung von großem Interesse, da so mögliche Assoziationen zwischen bekannten Risikogenen und SNP evaluiert werden können und diese somit als eine Art genetischer Marker eine wichtige Rolle spielen könnten.

Ein Zusammenhang zwischen SNP in verschiedenen Genen, wie *TYR* und *MC1R*, die eine Rolle bei der Pigmentierung von Haut und Haaren spielen, wurde beobachtet. (Sulem, Gudbjartsson et al. 2007)

1.6.1 *MC1R* (Melanocortin-1-Rezeptor)

Das *MC1R*-Gen liegt auf Chromosom 16q 24.3 und kodiert für den Melanocortin 1 Rezeptor. Der *MC1*-Rezeptor gehört zur Familie der G-Proteine, wird auf Melanozyten der Haut und Haarfollikel exprimiert und spielt bei der Festlegung von Haut- und Haarfarbe eine Rolle.

Die Aktivierung erfolgt über das alpha-Melanocortin stimulating hormone (α -MSH), welches von den benachbarten Keratinozyten abgegeben wird und an den *MC1*-Rezeptor der Melanozyten andockt. Dieses Andocken bewirkt über eine Adenylatzyklase den intrazellulären Anstieg von cAMP (zyklisches Adenosin-Monophosphat). cAMP fungiert als second messenger, aktiviert die Proteinkinase A und es kommt im Zusammenspiel mit mehreren Transkriptionsfaktoren zu einem Ablesen der für die Pigmentierung

verantwortlichen Gene *TYR* und somit zur Eumelaninproduktion. Bei Ausbleiben des Stimulus wird Pheomelanin produziert. Eumelanin hat einen UV-protektiven Charakter und führt zu einem dunkleren Phänotyp. (Mountjoy, Robbins et al. 1992; Bataille 2003; Garcia-Borrón, Sanchez-Laorden et al. 2005; Maresca, Flori et al. 2010) *MC1R* spielt somit eine wichtige Rolle bei der Festlegung der Haut- und Haarfarbe. Bei Mutationen kommt es häufig zur Ausbildung eines rothaarigen, hellhäutigen Phänotyps. (Robinson and Healy 2002; Ha, Naysmith et al. 2003) Bei der Melanomentstehung scheint sowohl der Einfluss auf die Pigmentierung als auch nicht pigmentierungsabhängige Signalwege wie eine Asp84Glu-Mutation eine Rolle zu spielen. (Kennedy, ter Huurne et al. 2001; Healy 2004; Raimondi, Sera et al. 2008; Williams, Olsen et al. 2011) Das relative Risiko der RHC-Variante (Red Hair) für die Melanomentstehung beträgt je nach Studie zwischen ein 1,00 und 4,64. Durchschnittlich liegt die Odds Ratio dieser Metaanalyse bei 2,44 (Konfidenzintervall: 1,72-3,46). (Williams, Olsen et al. 2011) Weiterhin besteht ein Zusammenhang zwischen Mutationen im *MC1R*-Gen und der *BRAF*-Mutation. Es konnte gezeigt werden, dass *BRAF*-Mutationen vermehrt in Melanomen mit wenig chronischem Lichtschaden vorkommen, welche zusätzlich Träger einer *MC1R*-Mutation sind. (Landi, Bauer et al. 2006)

1.6.2 *MTAP* und SNP rs7023329

Bestimmte Deletionen auf Chromosom 9 p21 spielen in der Pathogenese des malignen Melanoms und anderen Tumorarten, wie lymphatischen Neoplasien, Endometrium-Ca und Osteosarkomen eine Rolle. (Gursky, Olopade et al. 2001; Christopher, Diegelman et al. 2002) Das *MTAP*-Gen besteht aus 8 Exons und 7 Introns, liegt in der Nähe von *CDKN2A* und wird in normalen Zellen stark exprimiert. Das Genprodukt katalysiert als Methyladenosin-Phosphorylase die Phosphorylierung von MTA (Methyladenosin), was seinerseits eine Rolle bei der Regulation weiterer Enzyme im Zellzyklus spielt. (Hellerbrand, Muhlbauer et al. 2006) Die Menge des Genprodukts korreliert umgekehrt mit der Entstehung eines malignen Melanoms. (Meyer, Wild et al. 2010) Die Regulation von *MTAP* erfolgt in der Mehrzahl der Fälle über die Methylierung der Promoterregion. Bei

der mutierten Variante kommt es zu einer Störung der epigenetischen Regulation und somit zu einer Hypermethylierung der Promoterregion, was wiederum zu einer verminderten Genexpression führt und die Progression zum malignen Melanom fördert. (Behrman, Wallner et al. 2003; Hellerbrand, Muhlbauer et al. 2006)

In einer europäischen Genomweiten Assoziationsstudie (GWAS) wurden drei Melanomrisiko-SNPs identifiziert. Für *MC1R* (rs258322), für *TYR* (rs1393350) und in *MTAP* und der Nähe von *CDK2NA* (rs7023329). (Bishop, Demenais et al. 2009) In einer zweiten Studie wurde für den SNP rs7023329 eine Assoziation mit einer erhöhten Anzahl melanozytärer Nävi beschrieben. (Yang, Liang et al. 2010) Der SNP rs7023329 kommt entweder als A oder als G (minor allele) vor und wurde in der hier vorgestellten Arbeit näher untersucht.

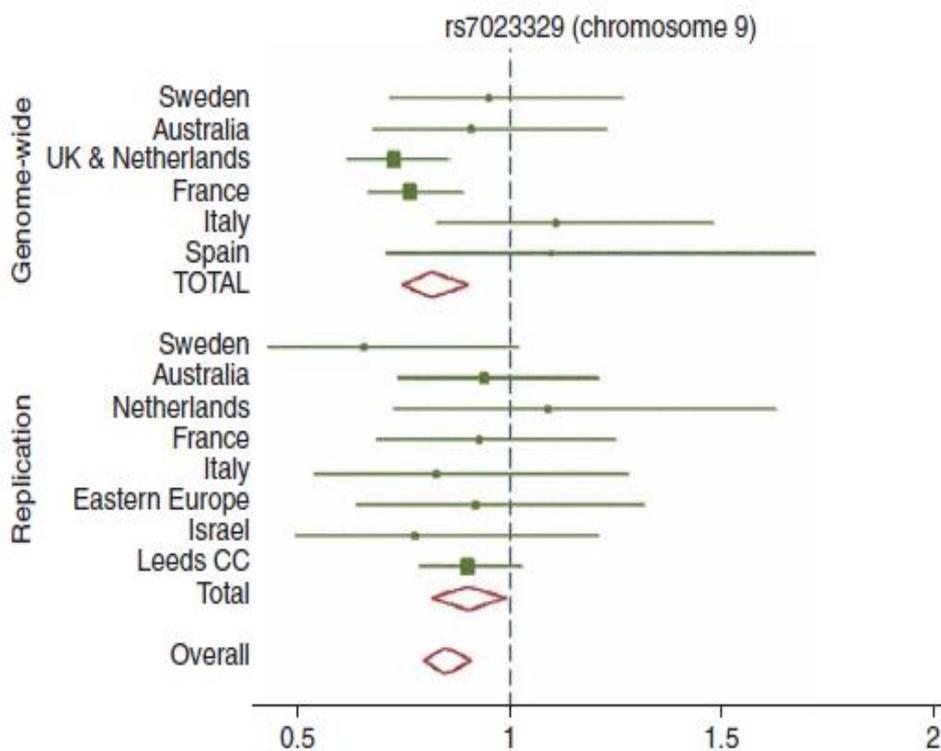


Abbildung 6: SNP-Verteilung
(Bishop, Demenais et al. 2009)

1.6.3 CDKN2A (Cyclin-dependant-kinase-inhibitor 2a)

CDKN2A ist ein Tumor-Supressor-Gen, welches auf dem kurzen Arm von Chromosom 9 liegt, aus 4 Exons besteht und an der Kontrolle des Zellzyklus beteiligt ist. *CDKN2A* ist eines der wichtigsten Gene bei der Melanomentstehung und kodiert für p16 und ARF (alternative reading frame), Proteine, welche wichtige Funktionen im Zellzyklus beinhalten. (Cachia, Indsto et al. 2000) ARF reguliert p53-unabhängig den Zelltod und ist somit wie p16 ein Tumor-Supressor-Protein im normalen Zellzyklus. (Ha, Ichikawa et al. 2007) P16 hat die Aufgabe mit CDK 4 einen Komplex zu bilden. CDK 4 wird inaktiviert und die Phosphorylierung des Retinoblastomproteins unterbleibt. Dieses bleibt inaktiv und ein Übertritt von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus wird verhindert. (Monzon, Liu et al. 1998; Hellerbrand, Muhlbauer et al. 2006) Eine Mutation im *CDKN2A*-Gen führt dazu, dass diese Mechanismen unterbleiben und durch Aktivierung des Retinoblastomproteins eine übermässige Zellproliferation stattfindet. Eine Mutation im *CDKN2A*-Gen gilt als Hochrisiko-Mutation für die Entwicklung des malignen Melanoms, wobei durch Mutation verschiedener Exone die Melanomentstehung in verschiedener Weise beeinflusst wird. (Yang, Liang et al. 2010)

Beim malignen Melanom spielt dieser Mechanismus vor allem bei einem Teil der autosomal dominant vererbten familiären Fälle eine Rolle, und wurde vor allem in Familien beobachtet, bei welchen Melanome gehäuft auftraten. (Newton 1993) Daneben erhöht diese Mutation die Rezidivrate bei Melanompatienten und hat somit auch eine prognostische Bedeutung. (Conway, Beswick et al. 2010) Patienten mit Mutationen im *CDKN2A*-Gen haben im Vergleich zu Patienten ohne diese Mutationen häufiger andere Malignome, wie Pankreas- und Mamma-Karzinome. (Borg, Sandberg et al. 2000)

1.7 Somatische Mutationen im malignen Melanom

Es gibt verschiedene Mutationen, die mit der Entstehung eines Melanoms assoziiert sind. Einige wichtige werden im Folgenden betrachtet.

1.7.1 *BRAF (Viral-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1)*:

Mit einer Häufigkeit von 40-80% der Fälle stellt die *BRAF*-Mutation die häufigste bekannte Mutation des malignen Melanoms dar. (Wellbrock, Ogilvie et al. 2004) Diese wird vor allem in einem jüngeren Patientenkollektiv in Tumoren beobachtet, die wenig chronische Lichtschäden haben. (Bauer, Buttner et al. 2011)

BRAF liegt auf Chromosom 7, beinhaltet 18 Exons mit über 2480 bp und kodiert für eine Serin-/ Threoninkinase. (Domingo, Niessen et al. 2005) Diese spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation des *MAP*-Kinase-Wegs und ist somit in der Regulation des Zellzyklus involviert. *BRAF* fungiert in normalen Zellen als eine Art Schalter und führt zu Proliferation. Aktivierende *BRAF*-Mutationen entkoppeln diese Eigenschaften, führen damit über *MEK* zur gesteigerten Proliferation und wirken anti-apoptotisch. Es gibt verschiedene Varianten dieser Mutation. Circa 80% entstehen durch den Austausch von Valin durch Glutaminsäure an Position 600 (V600) auf Exon 15, was zu einer gesteigerten Kinaseaktivität führt. (Davies, Bignell et al. 2002; McCubrey, Steelman et al. 2007; Rubinstein, Sznol et al. 2010) Diese aktivierende Mutation führt über den *MAP*-Kinase Weg zu einer gesteigerten Zellproliferation und stellt somit ein Onkogen des malignen Melanoms, sowie anderer Tumorarten (papilläres Schilddrüsen-Karzinom, Colon-Karzinom, Ovarial-Karzinom, Lungen-Karzinom) dar. (Brose, Volpe et al. 2002; Wan, Garnett et al. 2004; Conway, Beswick et al. 2010)

Patienten, bei denen eine Keimbahnmutation im *MC1R*-Gen nachgewiesen wurde, haben ein höheres Risiko Träger einer zusätzlichen *BRAF*-Mutation zu sein. (Landi, Bauer et al. 2006; Michaloglou, Vredeveld et al. 2008)

Der im August 2011 in den USA zugelassene Wirkstoff Vemurafenib (PLX4032) ist ein selektiver *BRAF*-Inhibitor und führt bei *BRAF*-V600E-mutierten malignen Melanomen zu einer Regression. (Chapman, Hauschild et al. 2011)

1.7.2 *NRAS (Neuroblastoma RAS v-ras oncogene homolog)*

Aktivierende *RAS*-Mutationen spielen bei der Entstehung verschiedener Tumorarten eine Rolle. Wichtig hierbei sind vor allem Mutationen in *K-RAS*, *H-RAS* und *N-RAS*. In Melanomen ist das *NRAS*-Gen durch Mutationen aktiviert. (Demunter, Stas et al. 2001)

Die *RAS*-Onkogene kodieren für sehr ähnliche Proteine, die eine intrinsische GTPase-Aktivität haben und bei der Signalweitergabe in den Zellkern beteiligt sind. Sie werden von verschiedenen Wachstumsfaktoren stimuliert und geben Signale über die Aktivierung von *MAP*-Kinasen weiter. (Marshall 1991; Schubbert, Shannon et al. 2007)

Eine aktivierende Mutation dieser *RAS*-Gene führt zur gesteigerten Aktivität der Genprodukte und zu einem unkontrollierten Zellwachstum. Die Inzidenz von *RAS*-Mutationen beim malignen Melanom beträgt circa 20% und betrifft vor allem Mutationen des *NRAS*-Gens. (Bos 1989) Dieses befindet sich auf Chromosom 1p13 und besteht aus 7 Exons. *NRAS*-Mutationen finden sich vor allem bei nodulären Melanomen bevorzugt auf chronisch UV-Licht-exponierten Stellen wie Gesicht und Handrücken. (Jiveskog, Ragnarsson-Olding et al. 1998) Eine Assoziation zwischen den familiär gehäuften Melanomen mit einer Mutation im *CDKN2A*-Gen, sowie Vorläuferläsionen und einer *NRAS*-Mutation wurde ebenfalls beschrieben. (Eskandarpour, Hashemi et al. 2003) Die Punktmutationen führen meistens zu einem Austausch von Glutaminsäure (Glu) durch Lysin (Lys) oder Arginin. Die häufigste Mutation von *NRAS* beim malignen Melanom ist in Codon 61. (Omholt, Karsberg et al. 2002)

1.7.3 KIT

KIT ist ein Protoonkogen, welches auf Chromosom 4 liegt und für eine Rezeptor-Tyrosinkinase kodiert. Diese spielt eine Rolle bei der Regulation des Zellzyklus und bei der Pigmentierung der Haut, der Hämatopoese, sowie der Angiogenese. (Roskoski 2005) Durch Bindung des *scf* (stem cell factor) an den *c-KIT*-Rezeptor kommt es zu einer Aktivierung verschiedener Signalwege, darunter auch des *MAP*-Kinase-Weges. (Blume-Jensen, Claesson-Welsh et al. 1991) Mutationen im *c-KIT*-Gen spielen bei verschiedenen Tumorarten eine Rolle, u.a. bei gastrointestinalen Stromatumoren (GIST). (de Silva and Reid 2003)

In der Haut ist der *c-KIT*-Rezeptor, neben der Migration der Melanoblasten während der Embryogenese, auch für die Differenzierung und Proliferation verschiedener Zellen verantwortlich. Beim Melanom sind Mutationen im *c-KIT*-Gen vor allem bei den Schleimhautmelanomen, den konjunktivalen, sowie den akralen Melanomtypen zu finden. (Curtin, Busam et al. 2006) Neben aktivierenden Mutationen konnte eine verminderte Expression des Rezeptors in metastasierten Melanomzellen festgestellt werden. (Lassam and Bickford 1992) Tumorarten mit *KIT*- Mutationen können mit zielgerichteten Medikamenten (z.B. Imatinib) behandelt werden, was einen Einfluss auf das Überleben dieser Patientengruppe hat. (Curtin, Busam et al. 2006).

1.7.4 TYR, TYRP und DCT

Mutationen im *TYR*-Gen spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung von okulokutanem Albinismus (OCA). Tyrosinase (*TYR*), Tyrosinase-related Protein-1 (*TYRP1*) und Dopachrome Tautomerase (*DCT*) sind melanozytenspezifische Genprodukte und spielen bei der Melaninproduktion eine wichtige Rolle. (Fang, Tsuji et al. 2002) Die Melaninproduktion findet in zwei verschiedenen Melanosomenarten statt, welche jeweils für die Produktion von Eu- bzw. Pheomelanin zuständig sind. Während Eumelanin ein dunkles (braunes bis schwarzes) Pigment ist, ist Pheomelanin für einen hellen Phänotyp verantwortlich, da es ein gelbes bis rotes Pigment ist. Die Hautfarbe wird durch

das Zusammenspiel dieser beiden Pigmente festgelegt. Die Tyrosinase katalysiert die ersten beiden Schritte in der Melaninproduktion, also die Hydroxylierung von Tyrosin zu DOPA und die Oxidation von DOPA zu DOPA-Quinon.

Das *TYR*-Gen liegt auf Chromosom 11q14.21 und wird durch verschiedene Mechanismen reguliert. Weiterhin spielen diese Gene eine Rolle in der Regulation des Zellzyklus der Melanozyten. Alpha-MSH

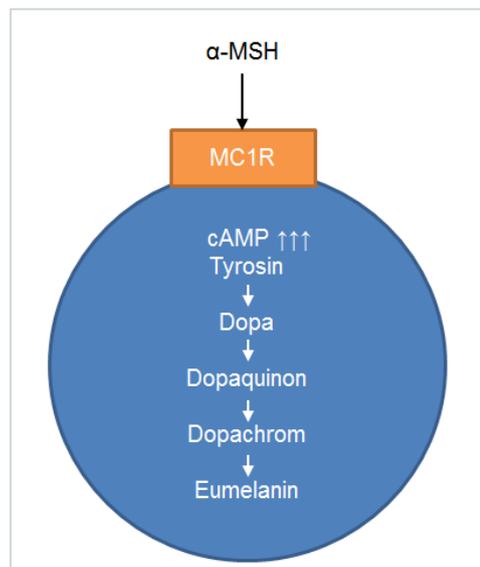


Abbildung 7: Melaninsynthese

veranlasst eine Erhöhung der Tyrosinase-Aktivität und somit der Melanozytendifferenzierung. (Hirobe and Abe 1999; Kobayashi and Hearing 2007) Eine verminderte Expression des *TYR*-Gens führt zu einer Resistenz von Melanomzellen gegenüber T-Killerzellen. (Slingsluff, Colella et al. 2000)

1.8 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

→ *Wie ist die Prävalenz des SNP rs7023329 in einem deutschen Kollektiv?*

Da SNPs eine große Varianz zwischen Populationen zeigen, wird in dieser Studie die Prävalenz des SNP rs7023329 in einem deutschen Melanom-Patientenkollektiv mit der Prävalenz in einer Kontrollkohorte verglichen.

→ *Stellt der SNP einen Risikofaktor für die Entwicklung eines Melanoms dar?*

Zielsetzung dieser Arbeit ist auf der 2009 veröffentlichten Studie basierend herauszufinden, ob Varianten des SNP rs7023329 einen Risikofaktor für die Entwicklung des malignen Melanoms darstellen und diese somit in einem Screening-Verfahren verwendet werden könnten.

→ *Gibt es eine Assoziation des SNP rs7023329 mit BRAF- bzw. NRAS-mutierten Melanomen?*

Weiterhin wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen den bekannten BRAF- und NRAS-Mutationen und dem SNP rs7023329 besteht.

2 Material und Methoden

2.1 Patientengruppe

Die Patientengruppe bestand aus 110 deutschen Melanompatienten der Universitäts-Hautklinik Tübingen zwischen 37 und 94 Jahren (median 66 Jahre). Davon waren 44 Frauen und 66 Männer.

Die Tumordicke lag zwischen 1,55mm und 21,00mm. Die Melanomtypen verteilten sich im Patientenkollektiv histologisch wie folgt: 55 SSM, 25 ALM, 18 NM, 10 LM und 2 unklassifizierte Melanome.

Aus den Paraffinschnitten dieser Melanome wurde für die Analyse des SNP das um die Melanome gelegene gesunde Gewebe mikrodisseziert.

2.2 Kontrollgruppe

Die Kontrollkohorte bestand aus Patienten der Universitäts-Hautklinik Tübingen, die nicht an einem Melanom erkrankt sind oder waren. Die Kohorte, welche sich aus 93 Frauen und 97 Männern zusammensetzte und zwischen 21 und 81 Jahren alt war, hatte ein medianes Alter von 46 Jahren.

Die Auswahl der Patienten erfolgte mittels Fragebogen und klinischer Untersuchung an Patienten, die sich stationär oder ambulant in der Klinik befanden. Der Fragebogen erfasste das Sonnenverhalten der Patienten, sowie Vorerkrankungen und spezifische Medikamenteneinnahme, wie orale Kortisontherapie. Bei der körperlichen Untersuchung wurde der Hauttyp, die Anzahl und Morphologie melanozytärer Nävi, sowie eventuell vorhandene Lichtschäden beurteilt. Waren die Patienten mit der Studienteilnahme einverstanden, erfolgte die venöse Blutentnahme von 7 ml EDTA-Blut.

2.3 DNS Isolierung aus den Paraffinschnitten

Per Mikrodissektion wurde Material von jeder Patientenprobe entnommen. Für die Analyse des SNP wurde das um die Melanome gelegene Normalgewebe mikrodisseziert.

Die stufenweise Entparaffinierung erfolgte über eine zehnminütigen Inkubation in Xylol (100 %), anschließender Zentrifugierung und Absaugen des Überstandes. Danach wurde der gleiche Prozess mit Ethanol (100%) wiederholt.

Die Herstellung einer Pufferlösung zur DNS-Isolierung erfolgte mit einer Lösung aus 90 µl einfachem PCR-Puffer und 10µl Proteinase K (Firma: Qiagen). Täglich wurden 10µl dieser Mischung je well über 3 Tage hinzugegeben und bei 55 Grad Celsius über Nacht inkubiert.

2.4 DNS Isolierung aus dem Blut der Kontrollgruppe

Zur Isolierung der DNS aus dem EDTA-Vollblut der Kontrollpersonen wurde das Maxwell® 16 LEV Blood DNA Kit von Promega verwendet, bestehend aus:

- 1ml Proteinase K (PK)
- 20 ml Lysis-Puffer
- 48 Maxwell® 16 LEV Cartridges (MCD)
- 50 LEV Plungers
- 50 Elution Tubes (0.5 ml)
- 20 ml Elution-Puffer

Weiterhin wurden verwendet:

- Vortex mixer (*neoLab*)
- Pipetten und Pipettenspitzen (*Eppendorf*)
- 1.5–2.0ml Tubes zur Inkubation (*Eppendorf*)
- Thermoblock mit 56°C (*neoLab*)
- 100bp ladder (*Invitrogen*)

Durchführung:

1. Die gefrorenen Blutproben wurden aufgetaut und mindestens 5 Minuten bei Raumtemperatur gemixt.
2. Danach erfolgte die Erwärmung der Tubes in einem Wärmeblock bei 56 °C.
3. Zugabe von 30µl Proteinase K (PK) Lösung in jedes Tube.
4. Von den gewärmten Blutproben wurden je 300µl einer Probe hinzugefügt.
5. Zu dieser Mischung wurden jeweils 300µl des Lysis-Buffer pro Tube pipettiert.
6. Jedes Tube wurde circa 10 Sekunden mit dem Vortex Mixer durchmischt.
7. Danach wurden die Tubes für 20 Minuten bei 56° im Thermoblock inkubiert.
8. Jedes Produkt wurde in Well #1 des jeweiligen Cartridge gebracht. (Well #1 liegt dem Cartridge Label am nächsten)
9. Die Cartridge wurde in das Gerät Maxwell® 16 LEV Cartridge Rack gegeben
10. Ein leeres Elution Tube wurde an die entsprechende Stelle gegeben und 50µl des Elution Puffer in jedes Tube hinzugefügt.
11. Maxwell® 16 wurde angestellt und den Instruktionen auf dem Bildschirm gefolgt.
12. Nach Ende des Programms wurde mit den weiteren Tubes fortgefahren bis die DNS aus allen Proben isoliert war.

2.5 PCR der Proben

Mit der Polymerase Kettenreaktion (PCR) lassen sich durch den Einsatz sequenzspezifischer Primer gezielt bestimmte DNS-Abschnitte vervielfältigen.

Dafür werden folgende Schritte benötigt:

1. *Melting*: Schmelzen des DNS-Doppelstrangs durch Lösen der Wasserstoffbrücken bei ca. 95 Grad.
2. *Annealing*: Anlagerung der Primer an die entsprechenden Stellen an den Einzelsträngen bei einer niedrigeren Temperatur. (Schmelztemperatur abhängig von der Anzahl der Wasserstoffbrücken und damit von der Menge der jeweiligen Basen)
3. *Elongation*: Durch zugestellte hitzestabile Taq-Polymerase (*Thermus aquaticus*) und der Nukleotide erfolgt die Vervielfältigung der DNS-Abschnitte.

2.5.1 Verwendete Reagenzien und Hersteller

Primer:	Eurofins MWG Operon
10x PCR-Puffer:	QIAGEN
MgCl ₂ :	QIAGEN
dNTP:	Invitrogen
BSA:	QIAGEN
Hot-Star Taq Polymerase:	QIAGEN

2.5.2 Primer

Die Primer der Firma Eurofins wurden folgendermaßen verdünnt: 180 µl ddH₂O mit 20 µl der Primer-Lösung.

Für **BRAF**:

BRAF-ex15-Forward-Primer: 5`-TCATAATGCTTGCTCTGATAGGA- 3`

BRAF-ex15-Reverse-Primer: 5`-CCAAAATTTAATCAGTGGA- 3`

Für **NRAS**:

NRAS-Cod12-Forward-Primer: 5`-TGAACCAAATGGAAGGTCACAC- 3`

NRAS-Cod12-Reverse-Primer: 5`-CTCACCTCTATGGTGGGATCA- 3`

NRAS-Cod61-Forward-Primer: 5`-TGGTGAAACCTGTTTGTGGA- 3`

NRAS-Cod61-Reverse-Primer: 5`-TGACTTGCTATTATTGATGG- 3`

Für den SNP **rs7023329**:

rs7023329-Forward-Primer: 5`-TCCCTGGGGTACTCGTTACAA- 3`

rs7023329-Reverse-Primer: 5`-CCACAACAGGACTCATGGAA- 3`

Durchführung:

Herstellung des Mastermix für die PCR (25µl je Well):

20,3 µl dd Wasser, 2,5 µl 10-fach PCR-Puffer, 0,5 µl MgCl₂, 0,25µl dNTP, jeweils 0,625µl Primer F und Primer R, 0,1µl BSA und 0,1µl Hot Star (5 U/µl).

Im Cycler (Eppendorf Mastercycler) wurde vor der Durchführung der PCR die Proteinase K bei 95°C für 15 Minuten inaktiviert. Danach das Programm für die PCR im Menü gestartet.

2.5.3 Gelelektrophorese

Um zu überprüfen, ob die PCR funktioniert hatte und ohne Verunreinigung abgelaufen war, wurden die PCR-Produkte auf ein 1,5 prozentiges Agarose-Gel aufgetragen, welches zur Auftrennung der PCR-Produkte nach ihrer Größe entlang eines elektrischen Feldes diente. Dabei hängt die Wanderungsgeschwindigkeit von der Molmasse der DNS-Fragmente ab.

Zur Herstellung des Gels wurden 6g Agarose ultra pure (Invitrogen) in 400ml dd H₂O, 8ml TAE 50X (GIBCO®), sowie unter Zugabe von 40 µl GelRed™ Nucleic Acid Stain (BioTRend) in der Mikrowelle gelöst. Nach leichtem Abkühlen des flüssigen Gels, erfolgte das Gießen des Gels.

Das Gel wurde mit jeweils 1 µl Loading Dye (Fermentas) und 5 µl der PCR-Produkte pro Kammer geladen. Eine 100bp-Leiter (3 µl; Invitrogen) wurde in

jeweils eine Kammer pro Reihe gefüllt. Nach 35-40 Minuten erfolgte die Ergebniskontrolle unter einer UV-Lampe und Aufnahme des Bildes mit einer Fotokamera.

2.6 EXO-SAP-Verdau

Um von den vervielfältigten PCR-Produkten die Primer und die dNTPs zu entfernen, wurde der Exo-SAP-Verdau verwendet.

2.6.1 Reagenzien und Firmen

EXO-SAP: USB

Durchführung:

5µl PCR-Produkt wurden mit 2µl EXO-SAP-Lösung vermischt (1µl Shrimp alkaline phosphatase (SAP), 0,9µl H₂O, 0,1µl Exonuclease). Nach Mischen und Zentrifugieren der Proben erfolgte der EXO-SAP-Verdau in der Multifuge (Eppendorf). Der erste Schritt diente der Entfernung der Primer, der zweite Schritt der Enzym-Inaktivierung.

Danach wurden die Proben verdünnt: 1,5µl EXO-SAP-Produkt mit 20µl ddH₂O und verpackt.

2.7 Sequenzierung der PCR Produkte

Um die genaue Basenabfolge darzustellen, erfolgte die Sequenzierung der amplifizierten Produkte mit der Kettenbruchmethode nach Sanger (Sanger, Nicklen et al. 1977) durch die Firma Quintara Biosciences in Albany (California).

Die Analyse der Sequenzdaten erfolgte mit der Software Mutation Surveyor V3.23 (Soft Genetics; State College, Pennsylvania)

2.8 Statistische Auswertung

Mit dem Tabellenprogramm Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation) wurden die statistischen Daten aufgearbeitet und in Form von Diagrammen dargestellt. Es erfolgte mittels des Statistikprogrammes SPSS (SPSS 8.0 für Windows, München, Deutschland) die Auswertung anhand von Kreuztabellen und Berechnung des p-Wertes, sowie Konfidenzintervalle und Odds Ratio. Für die Berechnung von P trend wurden der Cochran-Armitage trend test und die Statistik-Software R verwendet (www.r-project.org). Für die deskriptive Statistik wurden die Daten nach Medianen und Häufigkeiten analysiert und grafisch oder tabellarisch dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Christoph Meisner aus dem Institut für Medizinische Biometrie der Universität Tübingen.

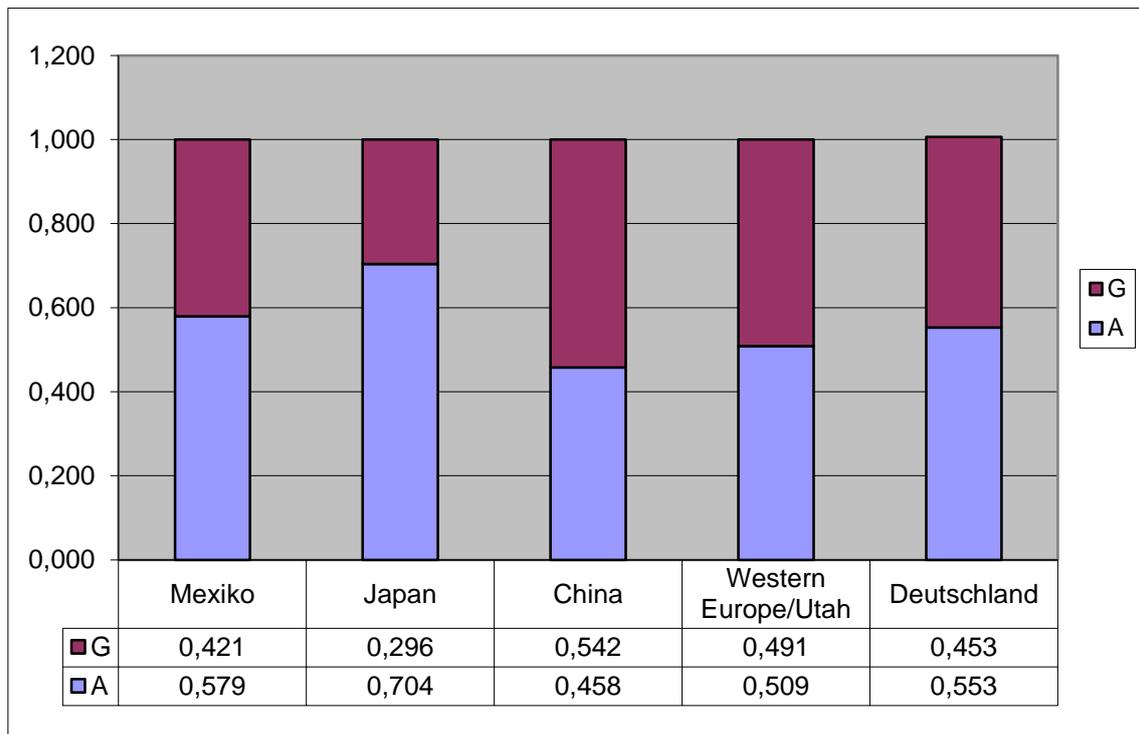
2.9 Ethik

Das positive Votum der Ethikkommission der Universität Tübingen lag vor. Die Einhaltung ethischer Grundsätze erfolgte unter Berücksichtigung der Deklaration von Helsinki.

3 Ergebnisse

3.1 Vergleich der SNP-Verteilung im untersuchten Kollektiv mit anderen Populationen

Tabelle 4: Allelfrequenzen des SNP rs7023329 in verschiedenen Populationen



Frequenz von A: 0,553

Frequenz von G: 0,453

Dieses Diagramm zeigt die Verteilung des SNP rs7023329 in verschiedenen Populationen. Die Gruppe „Deutschland“ stellt dabei die in dieser Studie untersuchte Kohorte dar. Die Häufigkeiten der beiden Varianten Adenosin und Guanin des Single Nucleotide Polymorphism rs7023329 sind in der Gruppe nahezu ausgeglichen verteilt und ähneln der Verteilung in Mexiko. In Japan ist die Allelfrequenz von Adenosin mit 0,704 weit über der von Guanin, die einen Anteil von 0,296 ausmacht. In China ist hingegen die Base Guanin etwas häufiger als Adenosin. (Thorisson, Smith et al. 2005)

3.1.1 Vergleich der Prävalenz der Genotypen AA und AG in beiden Kohorten

Tabelle 5: Vergleich der Genotypen AA/AG in beiden Kohorten

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Kohorte * rs7023329	238	100,0%	0	,0%	238	100,0%

Kohorte * rs7023329 Crosstabulation

			rs7023329		Total
			AA	AG	
Kohorte	Kontrolle	Count	54	96	150
		% within Kohorte	36,0%	64,0%	100,0%
	MM	Count	40	48	88
		% within Kohorte	45,5%	54,5%	100,0%
Total		Count	94	144	238
		% within Kohorte	39,5%	60,5%	100,0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	2,075 ^a	1	,150	,170	,097
Continuity Correction ^b	1,698	1	,193		
Likelihood Ratio	2,064	1	,151	,170	,097
Fisher's Exact Test				,170	,097
N of Valid Cases	238				

a. 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 34,76.

b. Computed only for a 2x2 table

Risk Estimate

	Value	95% Confidence Interval	
		Lower	Upper
Odds Ratio for Kohorte (Kontrolle / MM)	,675	,395	1,154
For cohort rs7023329 = AA	,792	,579	1,083
For cohort rs7023329 = AG	1,173	,937	1,470
N of Valid Cases	238		

In der aufgeführten Tabelle werden die Ergebnisse, welche mit dem statistischen Programm SPSS berechnet wurden, dargestellt. Es wird jeweils in der ersten Tabelle die bei dieser Berechnung einbezogene Kohorte in der

Absolutzahl (N), sowie dem prozentualen Anteil (Percent) an dem Gesamtkollektiv angegeben. Die zweite Tabelle ist eine Kreuztabelle, in welcher der Vergleich zwischen den untersuchten Patientengruppen auf der y-Achse und die entsprechenden Genotypen auf der x-Achse veranschaulicht wird, jeweils mit Angaben über Absolutzahlen (Count) und prozentualen Anteilen (% within Cohort) der Untergruppen. Die folgende Tabelle zeigt jeweils die Berechnung der statistischen Signifikanz in Form des p-Wertes. Die aus der Kreuztabelle berechnete Odds Ratio, sowie die Konfidenzintervalle sind in der letzten Tabelle dargestellt.

Bei dieser Betrachtung werden die Genotypen AA und AG in den beiden Kohorten miteinander verglichen. Die Anzahl der Personen bei diesem Vergleich liegt bei $n=238$ von insgesamt 300 untersuchten Patienten. „MM“ bezeichnet in der dargestellten Tabelle, sowie auch in den weiteren Vergleichen, die Melanomkohorte und die Gruppe „Kontrolle“ steht für die Kontrollgruppe. Vergleicht man nun die Genotypen AA und AG des SNP rs7023329 zwischen den beiden Populationen, so ergibt sich folgende Verteilung in der Melanomgruppe: 36,4% der Patienten der Melanomgruppe haben den Genotyp AA ($n=40$), 43,6% den Genotyp AG ($n=48$). Im Vergleich dazu sind 28,4% der gesunden Kontrollgruppe mit dem Genotyp AA ($n=54$) und 50,5% mit AG ($n=96$) ausgestattet.

Die OR für AG beträgt 0,675 mit einem 95%-Konfidenzintervall zwischen 0,395 und 1,154. Das Ergebnis ist bei einem p-Wert von 0,170 statistisch nicht signifikant.

3.1.2 Vergleich der Genotypen AA und GG in beiden Kohorten

Tabelle 6: Vergleich der Genotypen AA/GG in beiden Kohorten

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Kohorte * rs7023329	156	100,0%	0	,0%	156	100,0%

Kohorte * rs7023329 Crosstabulation

			rs7023329		Total
			AA	GG	
Kohorte	Kontrolle	Count	54	40	94
		% within Kohorte	57,4%	42,6%	100,0%
	MM	Count	40	22	62
		% within Kohorte	64,5%	35,5%	100,0%
Total		Count	94	62	156
		% within Kohorte	60,3%	39,7%	100,0%

Risk Estimate

	Value	95% Confidence Interval	
		Lower	Upper
Odds Ratio for Kohorte (Kontrolle / MM)	,742	,383	1,439
For cohort rs7023329 = AA	,890	,691	1,148
For cohort rs7023329 = GG	1,199	,796	1,806
N of Valid Cases	156		

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	,780 ^a	1	,377	,407	,238
Continuity Correction ^b	,512	1	,474		
Likelihood Ratio	,784	1	,376	,407	,238
Fisher's Exact Test				,407	,238
N of Valid Cases	156				

a. 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 24,64.

b. Computed only for a 2x2 table

Untersucht werden hierbei 156 Patienten der Studiengruppe bezüglich ihrer Verteilung der homozygoten Varianten AA und GG in beiden Kohorten.

Vergleicht man diese Genotypen, so beträgt der Anteil von AA in der Melanomkohorte 36,4% (n=40) und der des Genotyps GG 20% (n=22). Der Risikogenotyp AA ist demnach fast doppelt so oft in dieser Gruppe vertreten im Vergleich zu GG.

28,4% der Kontrollpersonen den Genotyp AA (n=54) und 21,1% GG (n=40). Die OR für den homozygoten Genotyp GG ergibt einen Wert von 0.742 bei einem 95% Konfidenzintervall von 0,383-1,439 für $p=0,407$.

3.1.3 Vergleich der BRAF-mutierten Melanom-Subkohorte mit der Kontrollgruppe

Tabelle 7: Vergleich BRAF-mutierter Melanome mit der Kontrollgruppe

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Kohorte * rs7023329	236	100,0%	0	,0%	236	100,0%

Kohorte * rs7023329 Crosstabulation

			rs7023329			Total
			AA	AG	GG	
Kohorte	Kontrolle	Count	54	96	40	190
		% within Kohorte	28,4%	50,5%	21,1%	100,0%
	MM	Count	17	19	10	46
		% within Kohorte	37,0%	41,3%	21,7%	100,0%
Total		Count	71	115	50	236
		% within Kohorte	30,1%	48,7%	21,2%	100,0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	1,551 ^a	2	,460	,450
Likelihood Ratio	1,532	2	,465	,450
Fisher's Exact Test	1,605			,450
N of Valid Cases	236			

a. 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 9,75.

In der dargestellten Tabelle stellt die Gruppe „MM“ nun nicht mehr die gesamte Melanomkohorte dar, sondern bezieht sich auf die Melanome, welche eine

nachgewiesene *BRAF*-Mutation beinhalten. Dies ist bei 41,8% (n=46) der untersuchten Melanome der Fall. Von diesen *BRAF*-positiven Patienten ist die Genotypen-Verteilung bezüglich des SNP rs7023329 wie folgt: 38,8% enthalten den Genotyp AG (n=19), 37,0% AA (n=17) und 21,7% die Variante GG (n=10) bei p=0,450.

3.1.4 Vergleich *BRAF*-mutierter Melanome mit *BRAF*-wt-Melanomen

Tabelle 8: Vergleich *BRAF*-mutierter Melanome mit *BRAF*-wt-Melanomen

Notes

Output Created					
Comments					

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
BRAF? * rs7023329	110	100,0%	0	,0%	110	100,0%

BRAF? * rs7023329 Crosstabulation

			rs7023329			Total
			AA	AG	GG	
BRAF?	BRAF	Count	17	19	10	46
		% within BRAF?	37,0%	41,3%	21,7%	100,0%
wt	wt	Count	23	29	12	64
		% within BRAF?	35,9%	45,3%	18,8%	100,0%
Total	Total	Count	40	48	22	110
		% within BRAF?	36,4%	43,6%	20,0%	100,0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	,226 ^a	2	,893	,907
Likelihood Ratio	,225	2	,893	,907
Fisher's Exact Test	,274			,907
N of Valid Cases	110			

a. 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 9,20.

Es wurden die Verteilungen der SNP-Varianten in den *BRAF*-mutierten Melanomen mit den *BRAF*-wt-Melanomen verglichen. Die *BRAF*-wt-Gruppe beinhaltet sowohl die Melanome mit einer nachgewiesenen *NRAS*-Mutation als

auch diejenigen ohne weitere nachgewiesene Mutationen. 58,2% der Melanompatienten enthalten demnach keine nachgewiesene *BRAF*-Mutation (n=64). Von denen wiederum sind 45,3% mit dem Genotyp AG (n=29), 35,9% mit AA (n=23) und 18,8% mit GG (n=12) ausgestattet bei $p=0,907$.

Vergleicht man dies nun mit der *BRAF*-Gruppe, so kommt man zu einer ähnlichen Verteilung der beschriebenen Genotypen in den beiden Gruppen. Bei beiden ist der Genotyp GG am seltensten vertreten und der heterozygote Genotyp AG derjenige mit dem größten Anteil. Es lässt sich somit keine unterschiedliche Genotypen-Verteilung zwischen den *BRAF*-mutierten Melanomen und den nicht *BRAF*-mutierten Melanomen feststellen.

3.1.5 Vergleich *NRAS*-mutierter Melanome mit der Kontrollgruppe

Tabelle 9: Vergleich *NRAS*-mutierter Melanome mit der Kontrollgruppe

Notes

Output Created					
Comments					

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Kohorte * rs7023329	212	100,0%	0	,0%	212	100,0%

Kohorte * rs7023329 Crosstabulation

			rs7023329			Total
			AA	AG	GG	
Kohorte	Kontrolle	Count	54	96	40	190
		% within Kohorte	28,4%	50,5%	21,1%	100,0%
	MM	Count	7	11	4	22
		% within Kohorte	31,8%	50,0%	18,2%	100,0%
Total		Count	61	107	44	212
		% within Kohorte	28,8%	50,5%	20,8%	100,0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	,158 ^a	2	,924	,957
Likelihood Ratio	,159	2	,923	,957
Fisher's Exact Test	,195			,914
N of Valid Cases	212			

a. 1 cells (16,7%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 4,57.

Bei dem Vergleich der *NRAS*-mutierten Melanome mit der gesunden Kontrollgruppe wird in der dargestellten Tabelle nun die *NRAS*-Gruppe mit „MM“ bezeichnet. 20% der 110 Melanom-Proben enthalten eine *NRAS*-Mutation (n=22). Die Genotypen des SNP rs7023329 sind wie folgt in dieser Gruppe verteilt: 31,8% AA (n=7), 50% AG (n=11) und 18,2% GG (n=4) bei p=0,957. Sowohl in den gesunden Kontrollen, als auch bei den *NRAS*-mutierten Melanomproben ist der heterozygote Genotyp AG am häufigsten anzutreffen, während GG in beiden Gruppen am seltensten vorkommt.

3.1.6 Vergleich *NRAS*-mutierter Melanome mit *NRAS*-wt-Melanomen

Tabelle 10: Vergleich *NRAS*-mutierter Melanome mit *NRAS*-wt-Melanomen

Notes

Output Created					
Comments					

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
NRAS? * rs7023329	110	100,0%	0	,0%	110	100,0%

NRAS? * rs7023329 Crosstabulation

			rs7023329			Total
			AA	AG	GG	
NRAS?	NRAS	Count	7	11	4	22
		% within NRAS?	31,8%	50,0%	18,2%	100,0%
wt	Count	33	37	18	88	
	% within NRAS?	37,5%	42,0%	20,5%	100,0%	
Total	Count	40	48	22	110	
	% within NRAS?	36,4%	43,6%	20,0%	100,0%	

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	,457 ^a	2	,796	,821
Likelihood Ratio	,455	2	,797	,821
Fisher's Exact Test	,454			,821
N of Valid Cases	110			

a. 1 cells (16,7%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 4,40.

In der dargestellten Tabelle werden nun, wie zuvor mit *BRAF*, *NRAS*-mutierte Melanome mit dem Rest der Melanomkohorte in Bezug auf die SNP-Varianten verglichen. 80% der Melanomproben sind ohne nachgewiesene *NRAS*-Mutation, was einer Anzahl von 88 Proben entspricht. Bei diesen Melanomen weisen 37,5% den Genotyp AA (n=33), 42,0% AG (n=37) und 20,5%GG (n=18) auf bei einem p-Wert von 0,821. Die Häufigkeitsverteilung der Genotypen ist bei beiden Kohorten ähnlich.

3.2 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Verteilung der Allele A und G des SNP rs7023329 differiert in verschiedenen Populationen. In Mexiko, Europa, Utah und in der hier untersuchten Kohorte kommt das Allel G etwas häufiger vor als A. Insgesamt betrachtet lässt sich jedoch feststellen, dass in diesen Populationen das Verhältnis von A zu G nahezu ausgeglichen ist. China hat einen geringfügig höheren Anteil von A, ist jedoch auch eher ausgeglichen bezüglich der Allelverteilung. Eine Ausnahme bildet in diesem Vergleich Japan, da in dieser Kohorte das Verhältnis von A:G 2,4:1 beträgt und damit die Allelfrequenz von A deutlich über der von G liegt.

In der hier vorgestellten Studie wird bei den verschiedenen Vergleichen deutlich, dass in allen der Genotyp GG am seltensten vorkommt, während die heterozygote Variante AG bei allen die häufigste ist.

Tabelle 11: Verteilung der Genotypen in der untersuchten Kohorte und der GWAS

	Tübingen Kohorte					Bishop et al., 2009	
	OR	KI	p	Fälle	Kontrollen	OR	KI
AA	1			40 (36,4%)	54 (28,4%)	1	
AG	0,68	0,40-1,15	0,17	48 (43,6%)	96 (50,5%)	0,89	0,81-0,99
GG	0,74	0,38-1,44	0,407	22 (20,0%)	40 (21,1%)	0,73	0,64-0,82

Insgesamt ist von den untersuchten Mutationen die *NRAS*-Mutation mit einem Anteil von 20% der Melanomproben seltener als die *BRAF*-Mutation vertreten, die in 42% der Proben zu finden ist. Es konnte hinsichtlich der Verteilung der Genotypen kein Unterschied zwischen der *BRAF*-Gruppe und der *wildtyp*-Melanomgruppe (bezüglich *BRAF*) festgestellt werden. Das Gleiche gilt für die *NRAS*-Mutationen und der restlichen Melanomgruppe.

**Verteilung der untersuchten Mutationen
im Patientenkollektiv (n=110)**

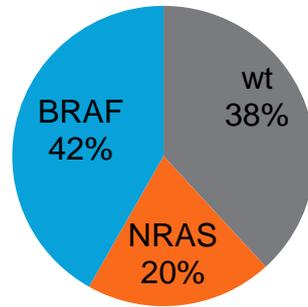


Abbildung 8: Verteilung der *BRAF*- und *NRAS*-Mutationen im Patientenkollektiv

4 Diskussion

In einer genomweiten Studie wurde der Single Nucleotide Polymorphism rs7023329, welcher in der Nähe von *CDKN2A* und in *MTAP* liegt, als Risikofaktor für die Entstehung eines malignen Melanoms identifiziert. (Bishop, Demenais et al. 2009)

Die Ergebnisse der zitierten Studie zeigen bei einer OR von 0,85 (95% KI: 0,80-0,91) ein reduziertes Melanomrisiko für den das Minorallel G, hingegen ein erhöhtes für das Allel A.

Die Ergebnisse sind aufgrund der großen Fall- und Kontrollzahl von 1650 Fällen und 4336 Kontrollen statistisch signifikant mit einem $p < 0,01$.

Eine andere Studie beschrieb einen Zusammenhang zwischen einer erhöhten Nävusanzahl und dem SNP rs7023329. (Yang, Liang et al. 2010)

Da SNP eine große Varianz in der Bevölkerung zeigen, ging es in dieser Studie darum zu untersuchen, wie die Verteilung der Genotypen AA, AG und GG des Single Nucleotide Polymorphism rs7023329 in einer deutschen Kohorte ist und dies mit den bekannten Allelfrequenzen zu vergleichen.

Weiterhin wurde untersucht, ob auch in der deutschen Kohorte ein Zusammenhang zwischen einem erhöhten Melanomrisiko und dem SNP rs7023329 besteht. Die Inzidenz der bekannten *BRAF*- und *NRAS*-Mutationen in der Melanomgruppe wurde eruiert und in einem zweiten Schritt nach einer möglichen Assoziation zwischen den SNP-Varianten und diesen Mutationen gesucht.

Die Prognose des malignen Melanoms hängt entscheidend von der Früherkennung ab. Um Patienten und Risikogruppen möglichst früh zu erkennen, ist die Forschung ständig auf der Suche, geeignete Screening- und Früherkennungsverfahren zu entwickeln. Da der Nachweis von Single Nucleotide Polymorphismen technisch nicht sehr aufwendig ist, wäre eine Screening-Methode, die auf dem Nachweis einer spezifischen SNP-Variante beruht, eine sehr elegante Methode für die Melanom-Früherkennung.

Das maligne Melanom tritt am häufigsten in einer Altersgruppe zwischen 40 und 50 Jahren auf. (Garbe and Orfanos 1992) Das Erkrankungsalter in der untersuchten Patientengruppe, bestehend aus 110 Melanopatienten der Universitäts-Hautklinik Tübingen, liegt zwischen 37-94 Jahren (Median 66 Jahre). Das mediane Alter der untersuchten Patientengruppe liegt somit höher als das durchschnittliche Alter der Melanopatienten in Deutschland.

Die Verteilung der verschiedenen Melanom-Subtypen entspricht in der Patientengruppe, bis auf eine Ausnahme, der Verteilung der Melanomsubtypen in Deutschland. Der häufigste Subtyp ist in beiden Gruppen das superfiziell spreitende Melanom, gefolgt von dem akro-lentiginösen Melanom. In der untersuchten Gruppe kommt das Lentigo maligna Melanom am seltensten vor, während in der gesamtdeutschen Verteilung das noduläre Melanom den seltensten Subtyp darstellt. (Garbe and Orfanos 1992)

4.1 SNP-Varianten in verschiedenen Populationen

Durch die schrittweise Entschlüsselung des genetischen Codes und der Schaffung des Human Genome Project wurden große Variabilitäten der Basenfolge zwischen verschiedenen Personen entdeckt. (Chakravarti 1999) Großen Stellenwert haben hierbei, neben Mutationen, auch der Austausch einzelner Basen und somit die Beschreibung der Single Nucleotide Polymorphismen, die in kodierenden Genbereichen einen Einfluss auf die Genfunktion und Expression nehmen können. Aufgrund der Redundanz des genetischen Codes führt nicht jeder Basenaustausch zu einem veränderten Genprodukt, (Hinds, Kloek et al. 2006) und nicht jede veränderte Aminosäure führt zwangsläufig zu einer Änderung der Proteinfunktion.

SNP könnten eine Erklärung liefern, warum es trotz gleicher Genausstattung eine große Varianz zwischen Individuen gibt, und auch eine Rolle als Genmarker bei der Früherkennung und Risikostratifikation von verschiedenen spielen.

In unseren Ergebnissen ist die Verteilung in der deutschen Kohorte bezüglich der Allele G und A mit 0,485 und 0,585 fast ausgeglichen. Das Gleiche gilt für andere Staaten wie Mexiko und der Gruppe Utah / Westeuropa. In Japan fällt hingegen auf, dass das Verhältnis von A:G 2,4:1 und damit das Risikoallel A deutlich häufiger vorkommt als G. Verglichen mit der Melanominzidenz in Europa sind die Raten in Japan deutlich niedriger. (Qiu and Tanaka 2006) In Japan kommt das akrolentiginöse Melanom am häufigsten vor. (Kogushi-Nishi, Kawasaki et al. 2009) Weiterhin ist eine jährliche Inzidenzsteigerung beim Basalzellkarzinom in Japan zu beobachten, was dort auch gleichzeitig das am häufigsten vorkommende Malignom der Haut darstellt. (Ishihara, Saida et al. 2008) Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass die Varianten dieser SNP zwar einen protektiven bzw. Risikofaktor darstellen, jedoch scheint der Einfluss auf die tatsächliche Melanomentstehung keine hundertprozentige Penetranz zu besitzen. Ebenfalls scheint der SNP nicht auf alle Melanomarten den gleichen Einfluss zu haben. In wieweit dieser Polymorphismus das Melanomrisiko erhöht, müsste in einer größeren Studie und gezielter untersucht werden.

4.2 Vergleich der Genotypen zwischen der Melanom- und der Kontrollgruppe

Bei diesen Gruppen konnte man feststellen, dass die SNP-Variante A ein Risikoallel für die Entstehung eines Melanoms darstellt und SNP-Varianten mit G eher protektiv sind. Die Ergebnisse sind aufgrund der kleinen Fall- und Kontrollzahl statistisch nicht signifikant. Es wird jedoch der gleiche Trend wie in der zitierten Studie beschrieben. (Bishop, Demenais et al. 2009) Sowohl bei der heterozygoten Form AG, als auch bei der homozygoten Variante GG ist das Melanomrisiko im Vergleich zum Genotyp AA vermindert. Aufgrund der verfügbaren Fallzahl konnte das in unserer Studie nicht mit der erwünschten statistischen Signifikanz gezeigt werden, was mit einer Fall- und Kontrollzahl von geschätzt jeweils 570 Personen der Fall gewesen wäre.

4.3 Vergleich zwischen *BRAF*-mutierten und *BRAF*-wt-Melanomen

Der Vergleich dieser Gruppen hinsichtlich ihrer SNP-Varianten zeigte, dass kein Unterschied bezüglich der SNP-Verteilung besteht. Der protektive Genotyp GG ist in beiden Kohorten am seltensten vertreten. Die Wildtyp-Gruppe ist sehr heterogen und beinhaltet auch die *NRAS*-Mutationen. Die Anzahl der Patienten in den beiden Kohorten ist für eine statistische Signifikanz zu klein.

4.4 Vergleich der *NRAS*-mutierten mit der Kontrollgruppe und den *NRAS*-wt Melanomen

NRAS-Mutationen sind in der untersuchten Melanomkohorte mit einem Anteil von 20% selten. Dies wurde auch in größeren Studien beobachtet. Im Vergleich mit der Kontrollgruppe lässt sich trotz der großen Differenz bezüglich der Kohortengrößen die gleiche SNP-Verteilung in beiden Gruppen erkennen.

Generell war der protektive Genotyp GG am seltensten vertreten, während AG der häufigste Genotyp in beiden Gruppen war. *NRAS*-Mutationen kommen häufig an chronisch lichtexponierten Stellen, wie z.B. im Gesicht, vor und sind auch in Vorläuferläsionen von Melanomen zu finden. Die SNP-Verteilung in der *NRAS*-Gruppe ist ähnlich zu der Verteilung in der *NRAS*-wt Gruppe, als auch der Kontrollkohorte. Jedoch ist dies aufgrund der geringen Anzahl dieser Mutationen in dem untersuchten Kollektiv nicht signifikant.

4.5 Zusammenfassung der Diskussion

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der SNP rs7023329 mit dem Genotyp GG einen protektiven Einfluss auf die Melanomenstehung hat im Vergleich zu einem erhöhten Melanomrisiko für den Genotyp AA.

In der hier vorgestellten Studie wird der gleiche Trend in einer deutschen Kohorte gesehen, wie in der zitierten genomweiten Studie. Es konnte keine statistische Assoziation zwischen dem Risiko für *BRAF*-mutierte und *NRAS*-mutierte Melanome und dem SNP rs7023329 festgestellt werden. Die Ergebnisse sind jedoch aufgrund der zu kleinen Fall- und Kontrollzahl statistisch

nicht signifikant. Um eine statistische Signifikanz zu erreichen müsste man die Probenzahl jeweils auf 570 anheben. Um als Screeningmethode für das maligne Melanom zu fungieren kann man abschließend feststellen, dass gängige Methoden, wie Beurteilung und Kontrolle melanozytärer Nävi, besser geeignet sind als ein DNS-Screening auf Varianten des SNP. Gegen eine Screeninguntersuchung spricht auch der hohe Kostenaufwand einer Sequenzierung im Hinblick auf das nur leicht erhöhte Risiko bei einer Variation des SNP rs7023329. Da jede Diagnostik mit Hinblick auf eine therapeutische Konsequenz indiziert ist, wäre diese aufgrund des nur gering erhöhten Risikos dabei nicht gerechtfertigt. Trotzdem ist eine weitere Untersuchung dieser Polymorphismen notwendig und sinnvoll, da mit ihnen vielleicht eine Erklärung für die Heterogenität der Melanomentstehung zu finden ist und neue Zusammenhänge, auch mit bekannten Risikogenen, erforscht werden könnten.

5 Zusammenfassung

Das maligne Melanom ist ein bösartiger Tumor der Haut, dessen Inzidenz in den letzten 20 Jahren stark angestiegen ist.

Früherkennung ist essentiell für die Prognose und das Überleben betroffener Patienten. In familiär belasteten Familien spielt die regelmäßige Kontrolle melanozytärer Nävi per Auflichtmikroskopie eine wichtige Rolle, um Melanome früh in einem heilbaren Stadium zu erkennen.

Intensive Forschung hat in den letzten Jahrzehnten entscheidend dazu beigetragen die Prognose und Früherkennung des malignen Melanoms zu verbessern und lieferte wichtige pathophysiologische Einblicke.

Es wurden verschiedene Risikomutationen entdeckt, die wie *CDKN2A* familiär gehäuft vorkommen und entscheidend für das Erkrankungsrisiko sind. Bekannt ist, dass ein heller Hauttyp mit einem erhöhten Melanomrisiko assoziiert ist, weswegen auch Gene wie *MC1R* und *TYR*, die entscheidend für die Pigmentierung sind, intensiv untersucht werden.

SNP sind Veränderungen der Basenfolge, die eine große Varianz in der Bevölkerung zeigen und daher für die medizinische Forschung von großem Interesse sind.

Für den SNP rs7023329, welcher auf Chromosom 9 in der Nähe von *MTAP* und *CDKN2A* liegt, wurde in einer aktuellen Studie ein Zusammenhang mit einem erhöhten Melanomrisiko beschrieben. Eine weitere Studie zeigte, dass rs7023329 mit einer erhöhten Anzahl melanozytärer Nävi assoziiert ist.

In dieser Arbeit wurde bei 110 deutschen Melanompatienten und bei einer Kontrollgruppe von 190 Nicht-Melanompatienten der Universitäts-Hautklinik Tübingen die Prävalenz der Genotypen in beiden Kohorten, das mit den Genotypen assoziierte Melanomrisiko und mögliche Assoziationen mit den bekannten *BRAF*- und *NRAS*-Mutationen beim malignen Melanom untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass der Genotyp AA mit einem erhöhten Melanom-Risiko assoziiert ist und der Genotyp GG eher protektiv ist. Die Ergebnisse zeigen den selben Trend wie die genomweite Studie, wenn auch aufgrund der kleinen Fall- und Kontrollzahl keine statistische Signifikanz zu erkennen war. Weiterhin konnte kein Zusammenhang zwischen der *BRAF*-Mutation und der Verteilung der unterschiedlichen Genotypen bezüglich des SNP rs7023329 festgestellt werden. Das gleiche gilt für *NRAS*.

Abschließend lässt sich feststellen, dass die Erforschung der Single Nucleotide Polymorphismen weitere wichtige Einblicke in das humane Genom erlaubt und in Zukunft mögliche Erklärungen für die interindividuelle Variabilität der Krankheitsentstehung liefern könnte.

6 Literaturverzeichnis

- Balch, C. M., J. E. Gershenwald, et al. (2009). "Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification." J Clin Oncol **27**(36): 6199-6206.
- Bataille, V. (2003). "Genetic epidemiology of melanoma." Eur J Cancer **39**(10): 1341-1347.
- Bauer, J., P. Buttner, et al. (2011). "BRAF mutations in cutaneous melanoma are independently associated with age, anatomic site of the primary tumor, and the degree of solar elastosis at the primary tumor site." Pigment Cell Melanoma Res **24**(2): 345-351.
- Bauer, J. and C. Garbe (2003). "Acquired melanocytic nevi as risk factor for melanoma development. A comprehensive review of epidemiological data." Pigment Cell Res **16**(3): 297-306.
- Behrmann, I., S. Wallner, et al. (2003). "Characterization of methylthioadenosin phosphorylase (MTAP) expression in malignant melanoma." Am J Pathol **163**(2): 683-690.
- Bishop, D. T., F. Demenais, et al. (2009). "Genome-wide association study identifies three loci associated with melanoma risk." Nat Genet **41**(8): 920-925.
- Blume-Jensen, P., L. Claesson-Welsh, et al. (1991). "Activation of the human c-kit product by ligand-induced dimerization mediates circular actin reorganization and chemotaxis." EMBO J **10**(13): 4121-4128.
- Borg, A., T. Sandberg, et al. (2000). "High frequency of multiple melanomas and breast and pancreas carcinomas in CDKN2A mutation-positive melanoma families." J Natl Cancer Inst **92**(15): 1260-1266.
- Bos, J. L. (1989). "ras oncogenes in human cancer: a review." Cancer Res **49**(17): 4682-4689.
- Breslow, A. (1970). "Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma." Ann Surg **172**(5): 902-908.
- Brose, M. S., P. Volpe, et al. (2002). "BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma." Cancer Res **62**(23): 6997-7000.
- Cachia, A. R., J. O. Indsto, et al. (2000). "CDKN2A mutation and deletion status in thin and thick primary melanoma." Clin Cancer Res **6**(9): 3511-3515.
- Carli, P., A. Biggeri, et al. (1995). "Malignant melanoma in Italy: risks associated with common and clinically atypical melanocytic nevi." J Am Acad Dermatol **32**(5 Pt 1): 734-739.
- Chakravarti, A. (1999). "Population genetics--making sense out of sequence." Nat Genet **21**(1 Suppl): 56-60.
- Chapman, P. B., A. Hauschild, et al. (2011). "Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation." N Engl J Med **364**(26): 2507-2516.
- Christopher, S. A., P. Diegelman, et al. (2002). "Methylthioadenosine phosphorylase, a gene frequently codeleted with p16(cdkN2a/ARF), acts as a tumor suppressor in a breast cancer cell line." Cancer Res **62**(22): 6639-6644.
- Clark, L. C. and E. T. Jacobs (1998). "Environmental selenium and cancer: risk or protection?" Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **7**(10): 847-848; discussion 851-842.
- Conway, C., S. Beswick, et al. (2010). "Deletion at chromosome arm 9p in relation to BRAF/NRAS mutations and prognostic significance for primary melanoma." Genes Chromosomes Cancer **49**(5): 425-438.
- Curtin, J. A., K. Busam, et al. (2006). "Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma." J Clin Oncol **24**(26): 4340-4346.
- Dahl, C. and P. Guldberg (2007). "The genome and epigenome of malignant melanoma." APMIS **115**(10): 1161-1176.
- Davies, H., G. R. Bignell, et al. (2002). "Mutations of the BRAF gene in human cancer." Nature **417**(6892): 949-954.

- de Andrade, M., Y. Li, et al. (2011). "Genetic Variants Associated with the Risk of Chronic Obstructive Pulmonary Disease with and without Lung Cancer." Cancer Prev Res (Phila).
- De Fabo, E. C., F. P. Noonan, et al. (2004). "Ultraviolet B but not ultraviolet A radiation initiates melanoma." Cancer Res **64**(18): 6372-6376.
- de Grujil, F. R. (2002). "Photocarcinogenesis: UVA vs. UVB radiation." Skin Pharmacol Appl Skin Physiol **15**(5): 316-320.
- de Silva, C. M. and R. Reid (2003). "Gastrointestinal stromal tumors (GIST): C-kit mutations, CD117 expression, differential diagnosis and targeted cancer therapy with Imatinib." Pathol Oncol Res **9**(1): 13-19.
- Demunter, A., M. Stas, et al. (2001). "Analysis of N- and K-ras mutations in the distinctive tumor progression phases of melanoma." J Invest Dermatol **117**(6): 1483-1489.
- Desmond, R. A. and S. J. Soong (2003). "Epidemiology of malignant melanoma." Surg Clin North Am **83**(1): 1-29.
- Domingo, E., R. C. Niessen, et al. (2005). "BRAF-V600E is not involved in the colorectal tumorigenesis of HNPCC in patients with functional MLH1 and MSH2 genes." Oncogene **24**(24): 3995-3998.
- Eskandarpour, M., J. Hashemi, et al. (2003). "Frequency of UV-inducible NRAS mutations in melanomas of patients with germline CDKN2A mutations." J Natl Cancer Inst **95**(11): 790-798.
- Fang, D., Y. Tsuji, et al. (2002). "Selective down-regulation of tyrosinase family gene TYRP1 by inhibition of the activity of melanocyte transcription factor, MITF." Nucleic Acids Res **30**(14): 3096-3106.
- Garbe, C. (2006). "Management des malignen Melanoms."
- Garbe, C. and C. E. Orfanos (1992). "Epidemiology of malignant melanoma in central Europe: risk factors and prognostic predictors. Results of the Central Malignant Melanoma Registry of the German Dermatological Society." Pigment Cell Res Suppl 2: 285-294.
- Garcia-Borron, J. C., B. L. Sanchez-Laorden, et al. (2005). "Melanocortin-1 receptor structure and functional regulation." Pigment Cell Res **18**(6): 393-410.
- Goehl, J. and T. Meyer (2008). "Therapie Handbuch: Malignes Melanom."
- Gursky, S., O. I. Olopade, et al. (2001). "Identification of a 1.2 Kb cDNA fragment from a region on 9p21 commonly deleted in multiple tumor types." Cancer Genet Cytogenet **129**(2): 93-101.
- Ha, L., T. Ichikawa, et al. (2007). "ARF functions as a melanoma tumor suppressor by inducing p53-independent senescence." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(26): 10968-10973.
- Ha, T., L. Naysmith, et al. (2003). "Defining the quantitative contribution of the melanocortin 1 receptor (MC1R) to variation in pigmentary phenotype." Ann N Y Acad Sci **994**: 339-347.
- Healy, E. (2004). "Melanocortin 1 receptor variants, pigmentation, and skin cancer susceptibility." Photodermatol Photoimmunol Photomed **20**(6): 283-288.
- Helgadottir, A., G. Thorleifsson, et al. (2007). "A common variant on chromosome 9p21 affects the risk of myocardial infarction." Science **316**(5830): 1491-1493.
- Hellerbrand, C., M. Muhlbauer, et al. (2006). "Promoter-hypermethylation is causing functional relevant downregulation of methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) expression in hepatocellular carcinoma." Carcinogenesis **27**(1): 64-72.
- Hinds, D. A., A. P. Kloek, et al. (2006). "Common deletions and SNPs are in linkage disequilibrium in the human genome." Nat Genet **38**(1): 82-85.

- Hirobe, T. and H. Abe (1999). "Genetic and epigenetic control of the proliferation and differentiation of mouse epidermal melanocytes in culture." *Pigment Cell Res* **12**(3): 147-163.
- Hollenbeak, C. S., M. M. Todd, et al. (2005). "Increased incidence of melanoma in renal transplantation recipients." *Cancer* **104**(9): 1962-1967.
- Husmann, G., Kaatsch, P., Katalinic, A., (2010). Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends. 7. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg). Berlin, 2010
- Ishihara, K., T. Saida, et al. (2008). "Statistical profiles of malignant melanoma and other skin cancers in Japan: 2007 update." *Int J Clin Oncol* **13**(1): 33-41.
- Jiveskog, S., B. Ragnarsson-Olding, et al. (1998). "N-ras mutations are common in melanomas from sun-exposed skin of humans but rare in mucosal membranes or unexposed skin." *J Invest Dermatol* **111**(5): 757-761.
- Kaddu, S., H. P. Soyer, et al. (1997). "[Reticular lentigo]." *Hautarzt* **48**(3): 181-185.
- Kennedy, C., J. ter Huurne, et al. (2001). "Melanocortin 1 receptor (MC1R) gene variants are associated with an increased risk for cutaneous melanoma which is largely independent of skin type and hair color." *J Invest Dermatol* **117**(2): 294-300.
- Kobayashi, T. and V. J. Hearing (2007). "Direct interaction of tyrosinase with Tyrp1 to form heterodimeric complexes in vivo." *J Cell Sci* **120**(Pt 24): 4261-4268.
- Kogushi-Nishi, H., J. Kawasaki, et al. (2009). "The prevalence of melanocytic nevi on the soles in the Japanese population." *J Am Acad Dermatol* **60**(5): 767-771.
- Landi, M. T., J. Bauer, et al. (2006). "MC1R germline variants confer risk for BRAF-mutant melanoma." *Science* **313**(5786): 521-522.
- Lassam, N. and S. Bickford (1992). "Loss of c-kit expression in cultured melanoma cells." *Oncogene* **7**(1): 51-56.
- Maresca, V., E. Flori, et al. (2010). "MC1R stimulation by alpha-MSH induces catalase and promotes its re-distribution to the cell periphery and dendrites." *Pigment Cell Melanoma Res* **23**(2): 263-275.
- Marshall, C. J. (1991). "Tumor suppressor genes." *Cell* **64**(2): 313-326.
- McCubrey, J. A., L. S. Steelman, et al. (2007). "Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance." *Biochim Biophys Acta* **1773**(8): 1263-1284.
- Meyer, S., P. J. Wild, et al. (2010). "Methylthioadenosine phosphorylase represents a predictive marker for response to adjuvant interferon therapy in patients with malignant melanoma." *Exp Dermatol* **19**(8): e251-257.
- Meyle, K. D. and P. Guldberg (2009). "Genetic risk factors for melanoma." *Hum Genet* **126**(4): 499-510.
- Michaloglou, C., L. C. Vredeveld, et al. (2008). "BRAF(E600) in benign and malignant human tumours." *Oncogene* **27**(7): 877-895.
- Monzon, J., L. Liu, et al. (1998). "CDKN2A mutations in multiple primary melanomas." *N Engl J Med* **338**(13): 879-887.
- Moore, K. (2007). "Embryologie: Entwicklungsstadien- Frühentwicklung- Organogenese-Klinik."
- Mountjoy, K. G., L. S. Robbins, et al. (1992). "The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptors." *Science* **257**(5074): 1248-1251.
- Newton, J. A. (1993). "Familial melanoma." *Clin Exp Dermatol* **18**(1): 5-11.
- Noonan, F. P., J. A. Recio, et al. (2001). "Neonatal sunburn and melanoma in mice." *Nature* **413**(6853): 271-272.

- Omholt, K., S. Karsberg, et al. (2002). "Screening of N-ras codon 61 mutations in paired primary and metastatic cutaneous melanomas: mutations occur early and persist throughout tumor progression." *Clin Cancer Res* **8**(11): 3468-3474.
- Osterlind, A., M. A. Tucker, et al. (1988). "The Danish case-control study of cutaneous malignant melanoma. IV. No association with nutritional factors, alcohol, smoking or hair dyes." *Int J Cancer* **42**(6): 825-828.
- Qiu, D. and S. Tanaka (2006). "International comparisons of cumulative risk of stomach cancer, from Cancer Incidence in Five Continents Vol. VIII." *Jpn J Clin Oncol* **36**(2): 123-124.
- Raimondi, S., F. Sera, et al. (2008). "MC1R variants, melanoma and red hair color phenotype: a meta-analysis." *Int J Cancer* **122**(12): 2753-2760.
- Rassner, G. (2002). "Dermatologie, Lehrbuch und Atlas."
- Robinson, S. J. and E. Healy (2002). "Human melanocortin 1 receptor (MC1R) gene variants alter melanoma cell growth and adhesion to extracellular matrix." *Oncogene* **21**(52): 8037-8046.
- Roskoski, R., Jr. (2005). "Structure and regulation of Kit protein-tyrosine kinase--the stem cell factor receptor." *Biochem Biophys Res Commun* **338**(3): 1307-1315.
- Rubinstein, J. C., M. Sznol, et al. (2010). "Incidence of the V600K mutation among melanoma patients with BRAF mutations, and potential therapeutic response to the specific BRAF inhibitor PLX4032." *J Transl Med* **8**: 67.
- Sanger, F., S. Nicklen, et al. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(12): 5463-5467.
- Schubbert, S., K. Shannon, et al. (2007). "Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer." *Nat Rev Cancer* **7**(4): 295-308.
- Scott, L. J., K. L. Mohlke, et al. (2007). "A genome-wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants." *Science* **316**(5829): 1341-1345.
- Situm, M., V. Bulat, et al. (2010). "Senile lentigo--cosmetic or medical issue of the elderly population." *Coll Antropol* **34 Suppl 2**: 85-88.
- Slingluff, C. L., Jr., T. A. Colella, et al. (2000). "Melanomas with concordant loss of multiple melanocytic differentiation proteins: immune escape that may be overcome by targeting unique or undefined antigens." *Cancer Immunol Immunother* **48**(12): 661-672.
- Sterry, W. and R. Paus (2000). "Checkliste Dermatologie, Venerologie Allergologie, Phlebologie, Andrologie."
- Stolz, W. and M. Landthaler (1994). "[Classification, diagnosis and differential diagnosis of malignant melanoma]." *Chirurg* **65**(3): 145-152.
- Sulem, P., D. F. Gudbjartsson, et al. (2007). "Genetic determinants of hair, eye and skin pigmentation in Europeans." *Nat Genet* **39**(12): 1443-1452.
- Tanenbaum, L., J. A. Parrish, et al. (1975). "Tar phototoxicity and phototherapy for psoriasis." *Arch Dermatol* **111**(4): 467-470.
- Thorisson, G. A., A. V. Smith, et al. (2005). "The International HapMap Project Web site." *Genome Res* **15**(11): 1592-1593.
- Tucker, M. A., A. Halpern, et al. (1997). "Clinically recognized dysplastic nevi. A central risk factor for cutaneous melanoma." *JAMA* **277**(18): 1439-1444.
- Wan, P. T., M. J. Garnett, et al. (2004). "Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF." *Cell* **116**(6): 855-867.
- Wang, D. G., J. B. Fan, et al. (1998). "Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome." *Science* **280**(5366): 1077-1082.

- Wellbrock, C., L. Ogilvie, et al. (2004). "V599EB-RAF is an oncogene in melanocytes." Cancer Res **64**(7): 2338-2342.
- Weyers, W., M. Euler, et al. (1999). "Classification of cutaneous malignant melanoma: a reassessment of histopathologic criteria for the distinction of different types." Cancer **86**(2): 288-299.
- Williams, P. F., C. M. Olsen, et al. (2011). "Melanocortin 1 receptor and risk of cutaneous melanoma: a meta-analysis and estimates of population burden." Int J Cancer **129**(7): 1730-1740.
- Woodhead, A. D., R. B. Setlow, et al. (1999). "Environmental factors in nonmelanoma and melanoma skin cancer." J Epidemiol **9**(6 Suppl): S102-114.
- Yang, X. R., X. Liang, et al. (2010). "Associations of 9p21 variants with cutaneous malignant melanoma, nevi, and pigmentation phenotypes in melanoma-prone families with and without CDKN2A mutations." Fam Cancer **9**(4): 625-633.

7 Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr.med. Jürgen Bauer für die Bereitstellung des Themas, die Betreuung und Unterstützung, sowie Diskussionsbereitschaft während der gesamten Studiendauer.

Weiterhin möchte ich Jeanette Gogel und Diana Meckbach danken für ihre Unterstützung und Hilfe, sowie Dr. Thomas Eigentler und seinem Team für die studienübergreifende Zusammenarbeit.

Großen Dank gilt meinen Eltern, die mich während des gesamten Studiums unterstützt haben.