

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Patienten

Bei der Fallgruppe handelte es sich um 295 an einem Larynxkarzinom erkrankte Patienten, die in der Zeit zwischen Februar 1995 und Juli 2001 in den HNO-Tumorzentren der Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Mitte und Virchow-Klinikum behandelt wurden.

Die Kontrollgruppe bestand aus 179 Patienten deutscher Herkunft, die sich in der kardiologischen Abteilung der Klinik für Innere Medizin der Charité – Universitätsmedizin Berlin wegen nichtmaligner Erkrankungen in Behandlung befanden.

Für die vorliegende Genotypisierungsstudie wurde die Genehmigung durch die Ethikkommission der Charité – Universitätsmedizin Berlin eingeholt. Alle Patienten der Fall- bzw. Kontrollgruppe gaben nach ausführlicher Aufklärung über das Studienvorhaben und die Vorgehensweise ihr schriftliches Einverständnis zur Erhebung und Speicherung ihrer persönlichen Daten sowie zur Genotypisierung. Nach histologischer Sicherung der Diagnose wurden allen teilnehmenden Patienten peripher 10 ml Venenblut abgenommen und bei -20°C gelagert.

#### 2.1.1 Ein- und Ausschlusskriterien

Für den Einschluss in die Fallgruppe der Larynxkarzinompatienten galten folgende Kriterien:

1. Histologisch gesichertes Plattenepithelkarzinom des Larynx
2. Alter der Patienten über 18 Jahre
3. Datum der Erstdiagnose höchstens 5 Jahre vor Einschluss in die Studie
4. deutsche Herkunft

Die Patienten der Kontrollgruppe mussten folgende Kriterien erfüllen:

1. Alter der Patienten über 18 Jahre
2. Ausschluss einer malignen Erkrankung zum Zeitpunkt der Probenentnahme
3. deutsche Herkunft

### 2.1.2 Datenerhebung

Die Anamnese bei Fall- und Kontrollpatienten erfolgte anhand eines standardisierten Vordrucks. Neben Angaben zu Alter, Geschlecht, diagnostizierten Erkrankungen, Rauchgewohnheiten und Alkoholkonsum wurden in der Gruppe der Larynxkarzinompatienten zusätzlich Daten zur beruflichen Schadstoffexposition erhoben.

Wegen der deutlich erhöhten Inzidenz von Larynxkarzinomen ab dem 45. Lebensjahr und unter Berücksichtigung des Altersgipfels im 6. Lebensjahrzehnt wurden drei Altersgruppen gebildet, die die Fall- bzw. Kontrollpatienten jüngeren ( $\leq 45$  Jahre), mittleren ( $>45-65$  Jahre) und höheren Alters ( $>65$  Jahre) zusammenfassten (Bertz, 2004; Heidemann und Bokemeyer, 1998). Diese Stratifizierung nach Lebensalter war Grundlage für die Subgruppenanalyse bei der statistischen Auswertung.

Der Tabakkonsum wurde in Form von Packungsjahren (PJ) angegeben. Ein PJ entsprach dabei dem täglichen Konsum von 20 Zigaretten über ein Jahr. Als Nichtraucher galten nur die Patienten, die noch nie geraucht hatten. Für die Auswertung wurden in der Gruppe der Raucher noch Untergruppen gebildet: sehr starke Raucher mit  $>50$  PJ, starke Raucher mit 30-50 PJ und Raucher, mit weniger als 30 PJ. Diese Stratifizierung erfolgte in Anlehnung an die Heidelberger Fall-Kontroll-Studien zur Epidemiologie des Larynxkarzinoms (Maier et al., 1992a; Maier und Tisch, 1997).

Der Alkoholkonsum wurde ebenfalls durch Befragung der Patienten erfasst, die daraufhin in vier verschiedene Gruppen eingeteilt wurden. Unterschieden wurden Nichttrinker (Gruppe 0), Patienten mit gelegentlichem (Gruppe I), täglich mäßigem (Gruppe II) und täglich starkem Alkoholkonsum bzw. einer Alkoholkrankheit (Gruppe III).

Die Einteilung der Larynxkarzinompatienten in Gruppen mit und ohne Schadstoffexposition erfolgte nach ihren ausgeübten Berufe. Dieser Einteilung lagen mehrere epidemiologische Studien zugrunde, die kausale Zusammenhänge zwischen beruflicher Exposition gegenüber bestimmten Schadstoffen und erhöhtem Larynxkarzinomrisiko feststellten. Zu den Berufsgruppen mit einem erhöhten Kehlkopfkrebsrisiko zählen u.a. Schlosser, Werkzeugmacher, Maurer, Tischler, Maschinisten, Drucker, Kraftfahrer, Hütten- und Gießereiarbeiter, Arbeiter der Glas-, Porzellan- und Quarzindustrie, der Land- und Forstwirtschaft, der Chemieindustrie sowie Angestellte des Hotel- und Gaststättenwesens (Maier et al., 1990; Maier et al., 1992c).

## 2.1.3 Tumorklassifikation

Tabelle 1: TNM-Klassifikation der Larynxkarzinome (1997)

	<b>Supraglottis</b>	<b>Glottis</b>	<b>Subglottis</b>
<b>T1</b>	Tumor auf einen Unterbezirk der Supraglottis begrenzt, mit normaler Stimmlippenbeweglichkeit	Tumor auf Stimmlippe(n) begrenzt (kann auch vordere oder hintere Kommissur befallen), mit normaler Beweglichkeit; 1a: Befall einer Stimmlippe, 1b: Befall beider Stimmlippen	Tumor auf die Subglottis begrenzt
<b>T2</b>	Tumor infiltriert Schleimhaut von mehr als einem benachbarten Unterbezirk der Supraglottis oder Glottis oder eines Areals außerhalb der Supraglottis (z.B. Schleimhaut von Zungengrund, Vallecula, mediale Wand des Sinus piriformis), ohne Fixation des Larynx	Tumor breitet sich auf Supraglottis und/oder Subglottis aus und/oder Tumor mit eingeschränkter Stimmlippenbeweglichkeit (phonatorisch), ohne Fixation	Tumor breitet sich auf eine Stimmlippe oder beide Stimmlippen aus; diese mit normaler oder eingeschränkter Beweglichkeit (ohne Fixation)
<b>T3</b>	Tumor auf den Larynx begrenzt, mit Stimmlippenfixation, und/oder Tumor mit Infiltration des Postkrikoidbezirks, des präepiglottischen Gewebes und/oder geringgradiger Erosion des Schildknorpels (innerer Kortex)	Tumor auf den Larynx begrenzt, mit Stimmlippenfixation und/oder Invasion der Postkrikoidgegend und/oder des präepiglottischen Gewebes und/oder des paraglottischen Raumes mit geringgradiger Erosion des Schildknorpels (innerer Kortex)	Tumor auf den Larynx begrenzt, mit Stimmlippenfixation
<b>T4</b>	<b>T4a</b> Tumor infiltriert durch den Schildknorpel und/oder breitet sich außerhalb des Kehlkopfs aus, z.B. Trachea, Weichteile des Halses eingeschlossen äußere Muskulatur der Zunge (M. genioglossus, M. hyoglossus, M. palatoglossus und M. styloglossus), gerade Halsmuskulatur, Schilddrüse, Ösophagus <b>T4b</b> Tumor infiltriert den Prävertebralraum, mediastinale Strukturen oder umschließt die A. carotis interna		
<b>TX</b>	Primärtumor kann nicht beurteilt werden		
<b>N0</b>	Keine regionären Lymphknotenmetastasen		
<b>N1</b>	Metastase(n) in solitärem ipsilateralem Lymphknoten, 3 cm oder weniger in größter Ausdehnung		
<b>N2</b>	<b>N2a</b> Metastase(n) in solitärem ipsilateralem Lymphknoten, mehr als 3 cm, aber nicht mehr als 6 cm in größter Ausdehnung <b>N2b</b> Metastasen in multiplen ipsilateralen Lymphknoten, keiner mehr als 6 cm in größter Ausdehnung <b>N2c</b> Metastasen in bilateralen oder kontralateralen Lymphknoten, keiner mehr als 6 cm in größter Ausdehnung		
<b>N3</b>	Metastase(n) in Lymphknoten, mehr als 6 cm in größter Ausdehnung		
<b>NX</b>	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden		
<b>M0</b>	Keine Fernmetastasen		
<b>M1</b>	Fernmetastasen		
<b>MX</b>	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden		

Die Tumorklassifikation (Tabelle 1) und die Stadieneinteilung (Tabelle 2) in der Fallgruppe erfolgte nach histologischer Sicherung anhand der TNM-Klassifikation und Stadieneinteilung für Larynxkarzinome nach der UICC.

Tabelle 2: Stadieneinteilung der Larynxkarzinome nach der UICC (1997)

<b>Stadieneinteilung der Larynxkarzinome nach der UICC</b>			
Stadium 0	TIS	N0	M0
Stadium I	T1	N0	M0
Stadium II	T2	N0	M0
Stadium III	T1, T2	N1	M0
	T3	N0, N1	M0
Stadium IVa	T1, T2, T3	N2	M0
	T4a	N0, N1, N2	M0
Stadium IVb	T4b	jedes N	M0
	jedes T	N3	M0
Stadium IVc	jedes T	jedes N	M1

Darüber hinaus wurden alle Patienten abhängig von der Lokalisation ihres Tumors in vier Gruppen eingeteilt. Je nach Befallsmuster anatomischer Strukturen unterschied man dabei folgende drei Typen des Larynxkarzinoms:

supraglottisch: Befall der laryngealen Epiglottisoberfläche einschließlich des freien Epiglottisrandes, der Arytaenoiden, der aryepiglottischen Falten, der Taschenfalten und der Morganischen Ventrikel

glottisch: Befall der Stimmlippen mit Processus vocales, vorderer und hinterer Kommissur

subglottisch: Befall 2 mm unterhalb des freien Stimmlippenrandes an der vorderen Kommissur bis 7 mm in Höhe des Processus vocalis (Jahnke, 1995).

In die vierte Gruppe wurden diejenigen Patienten eingeteilt, bei denen mehrere anatomische Ebenen befallen waren.

## **2.2 Genotypisierung**

### **2.2.1 Verwendete Geräte, Verbrauchsmaterialien, Reagenzien und Lösungen**

In den folgenden Tabellen sind alle verwendeten Geräte (Tabelle 3), Verbrauchsmaterialien (Tabelle 4), Lösungen (Tabelle 5) und Reagenzien (Tabelle 6) aufgeführt, die für die Genotypisierung der Fall- und Kontrollpatienten benötigt wurden.

Tabelle 3: Geräte

Bezeichnung	Typ	Hersteller
DNA-Extraktor	MagNA Pure LC <sup>®</sup> System	Roche, Mannheim, Deutschland
Elektrophoresekammern	protrans Flachbett- elektrophoresekammern	Protrans medizinische diagnostische Produkte GmbH, Ketsch, Deutschland
Fotodokumentationssystem	Eagle Eye II	Stratagene, La Jolla, USA
Gelfiltrationssäule	Sephadex G 50	Pharmacia, Freiburg, Deutschland
Halbautomatische Schüttler	Reax 2000 VF2	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
Horizontalwipptisch	Red Rocker	Hoefler Scientific Instruments, San Francisco, USA
Inkubationsschrank	OV3	Biometra, Göttingen, Deutschland
Magnetrührer	RCT basic	IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
Mikrowellenherd	Dimension 4	Panasonic, Berlin, Deutschland
PCR-Geräte	Gene Amp PCR System 9700	Perkin Elmer Applied Biosystems, Foster City, USA
Photometer	Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetten	BioPhotometer Pipetten Impact Finnpipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland Eppendorf, Hamburg, Deutschland Matrix, Hudson, USA Thermo Labsystems, Woburn, USA
Plattenzentrifuge	GS-6R Centrifuge	Beckman, Fullerton, USA
Sequenziergerät	ABI Prism 310 Genetic Analyzer	Perkin Elmer Applied Biosystems, Foster City, USA
Spannungsgeräte	Electrophoresis power supply 500/500 Power Pac 200	Molecularbiology-Cytology-Immunology, Darmstadt, Germany Bio-Rad, Hercules, USA
Thermomixer	5436	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifugen	Centrifuge 5415C MINI Centrifuge C1200	Eppendorf, Hamburg, Deutschland National Labnet Co, Woodbridge, USA
Waage	Owalabor	VEB Wägetechnik Rapido, Dresden, Deutschland (DDR)

Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Einmalküvetten	Uvetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
PCR-Platten	Thermo-Fast <sup>®</sup> 96 Non-Skirted, Thermo-Fast <sup>®</sup> 48, 12 Flat Cap Strips, 8 Flat Cap Strips	ABgene, Epsom, Großbritannien
Pipettenspitzen	Pipet Tips, Combitips plus Pipet Tips Tip Stands, Reaction Tips large/small	Eppendorf, Hamburg, Deutschland Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland Roche, Mannheim, Deutschland
Reaktionsgefäße	0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml Reagent Tubs 20/large, Tub Lids small/medium, Processing Cartridges	Eppendorf, Hamburg, Deutschland Roche, Mannheim, Deutschland

Tabelle 5: Lösungen

Lösung	Bestandteile
10x PCR-Puffer	100 mM Tris-HCl; pH 8,3; 500 mM KCl
10x TBE-Puffer, Konzentrat	900 mM Tris 900 mM Borsäure 25 mmol/l EDTA; mit HCl auf pH 8,0 eingestellt
1x TBE-Puffer	10x TBE 1:10 mit aqua bidest. verdünnt
Magnesiumlösung	50 mM MgCl <sub>2</sub>

Tabelle 6: Reagenzien

Reagenz	Bezeichnung	Hersteller
Agarose Auftragepuffer	Qualex Gold™ 0,25 g Bromphenolblau 15 g Ficoll-400 (Pharmacia) ad 100 ml mit 1x TBE, bei 4° C lagern	Thermo Hybaid, Ashford, Großbritannien
Desoxyribonukleotid- triphosphate DNA-Farbstoff	dGTP, dTTP, dATP, dCTP, Gebrauchslösung: 2 µM SYBR®-Green	Rapidozym, Berlin, Deutschland  Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
DNA-Größenstandards	Hpa II-pBS-DNA-Marker Gene Ruler™50 bp DNA Ladder, 0,5 mg DNA/ml Gene Ruler™100 bp DNA Ladder, 0,1 mg DNA/ml	GeneCraft, Munster, Deutschland Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
PCR-Primer	DNA-Oligonukleotidprimer (10,2 mM)	TIB Molbiol, Berlin, Deutschland
Restriktionsendonukleasen	Cfr9I (SmaI), PaeI, MboII, PdmI, LweI, Eam1104I (Ksp632I) BsrDI, Tsp509I	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland New England Biolabs, Beverly, USA
RFLP-Puffer	Buffer Y+/Tango: (0,33 M Tris- Acetat, 0,1 M Magnesiumacetat, 0,66 M Kaliumacetat, 1 mg/ml BSA); Buffer B+; NE Buffer 1: 10x (10 mM Bis- Tris-Propan-HCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM Dithiothreitol, pH 7,0 bei 25°C); NE Buffer2: 10x (50 mM Bis-Tris- Propan-HCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM Dithiothreitol, pH 7,9 bei 25°C)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland  New England Biolabs, Beverly, USA
<i>Taq</i> -Polymerase Sequenzierkit	BioTherm™ (5 units/µl) ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	GeneCraft, Munster, Deutschland Perkin Elmer, Weiterstadt, Deutschland
DNA-Extraktionskit	MagNA Pure LC Isolation Kit I (Wash Buffer I u. II, Lysis/Binding Buffer, Proteinase K, Elution Buffer, Magnetic Glass Particles Solution)	Roche, Mannheim, Deutschland

### 2.2.2 DNA-Extraktion und DNA-Konzentrationsbestimmung

Von 241 Patienten des Larynxkarzinomkollektivs und allen Patienten des Kontrollkollektivs waren zu Beginn dieser Studie bereits DNA-Proben vorhanden, die nach der Methode von Sambrook extrahiert wurden (Sambrook, 1989). Von 24 dieser ersten 241 Patienten wurden im Laufe dieser Studie zusätzlich neue DNA-Proben extrahiert. Von den letzten 54 Patienten des Larynxkarzinomkollektivs standen bereits aus Vollblut extrahierte DNA-Proben in ausreichender Menge zur Verfügung. Die DNA-Extraktion erfolgte mithilfe des MagNA Pure LC® Systems (MagNA Pure Isolation Kit, Roche Mannheim). Dabei handelt es sich um ein vollautomatisches

System zur Extraktion von Nukleinsäuren aus Probenmaterialien wie Blut, Gewebe oder Zellen. Alle benötigten Reagenzien sowie Pufferlösungen sind Bestandteile des MagNA Pure LC DNA Isolation Kit I. Für diese Arbeit wurden für 24 der 474 Proben (295 Fälle und 179 Kontrollen) neue DNA-Proben aus jeweils 200 µl EDTA-Blut nach Herstellerprotokoll extrahiert.

Anschließend wurde die DNA-Konzentration spektrophotometrisch gemessen, die Proben wurden einheitlich auf eine Konzentration von 30 ng/µl eingestellt und bei 4°C gelagert.

### 2.2.3 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) dient der gezielten Vervielfachung (Amplifikation) eines spezifischen DNA-Abschnittes. Grundlage dieses Verfahrens ist die Fähigkeit der hitzestabilen DNA-Polymerase des thermophilen Bakteriums *Thermus aquaticus* (*Taq*-Polymerase), DNA-Sequenzen in multiplen Zyklen exponentiell zu vervielfältigen, ohne dabei ihre Enzymaktivität in den wiederkehrenden Schritten der Hitzedenaturierung bei 94-95°C zu verlieren. Spezifische Oligonukleotidprimer (PCR-Primer) bilden die Start- und Endpunkte für die PCR und umfassen den amplifizierten Genabschnitt.

Für die Amplifikation der Genabschnitte um die neun untersuchten Polymorphismen in den vier Reparaturenzymen ERCC1, XPC, XPF(ERCC4) und PCNA wurden acht verschiedene Polymerasekettenreaktionen etabliert bzw. optimiert. Die Sequenzen der PCR-Primer für PCNA(C<sub>1661</sub>G)/(C<sub>1684</sub>A), ERCC1(A<sub>19007</sub>G), ERCC1(C<sub>8092</sub>A), XPF(G<sub>17103</sub>A), XPF(T<sub>26729</sub>C), XPF(A<sub>30147</sub>G) und XPC(Poly-AT) wurden der Literatur entnommen (siehe Tabelle 7); die Primer-Sequenzen für XPF(G<sub>30258</sub>A) wurden mithilfe der Oligo-Software (Version 6.66, Molecular Biology Insights Inc., USA) ermittelt. Einen Überblick über Sequenz, Richtung und Position der einzelnen Primer gibt Tabelle 8.

Tabelle 7: Übersicht über alle untersuchten Polymorphismen

DNA-Reparaturenzym	detektierter Polymorphismus	Aminosäure-austausch	rs-Nummer <sup>i</sup>	F-Primer und R-Primer	Referenzsequenz <sup>j</sup>
PCNA Intron 1	C <sub>1661</sub> G	--	<a href="#">rs3730418</a>	PC1_F <sup>a</sup> 5'-AcgTTCgCCCgCTCgCTCTg-3'	gi189681 <a href="#">J04718</a>
PCNA Intron 1	C <sub>1684</sub> A	--	<a href="#">rs17348</a>	PC1_R 5'-gATgCCCACgCCAACCAATgA-3'	
ERCC1 Exon 4	A <sub>19007</sub> G	--	<a href="#">rs11615</a>	ERCC1_E4_F <sup>b</sup> 5'-TCATCCCCTATTgATggCTTCTgCCC-3'	gi188616 <a href="#">M63796</a>
ERCC1 3' UTR	C <sub>8092</sub> A	--	<a href="#">rs3212986</a>	ERCC1_E4_R 5'-gACCATgCCCgAggCTTCTCATAg-3'	gi188616 <a href="#">M63796</a>
ERCC1 3' UTR	C <sub>8092</sub> A	--	<a href="#">rs3212986</a>	ERCC1_UTR_F01 <sup>c</sup> 5'-TgAgCCAATTCaGCCACT-3'	gi188616 <a href="#">M63796</a>
ERCC1 3' UTR	C <sub>8092</sub> A	--	<a href="#">rs3212986</a>	ERCC1_UTR_R01 5'-TagTTCCTCagTTTCCCg-3'	gi188616 <a href="#">M63796</a>
XPF(ERCC4) Exon 8	G <sub>17103</sub> A	Arg/Gln	<a href="#">rs1800067</a>	ERCC4_067_068_F01 <sup>d</sup> 5'-CTTCgggTgAAggAATAAagg-3'	gi1905925 <a href="#">L76568</a>
XPF(ERCC4) Exon 8	G <sub>17103</sub> A	Arg/Gln	<a href="#">rs1800067</a>	ERCC4_067_068_R01 5'-CTgTgCAACTgAAAgCTgTg-3'	gi1905925 <a href="#">L76568</a>
XPF(ERCC4) Exon 10	T <sub>26729</sub> C	Ser/Pro	<a href="#">rs2020955</a>	ERCC4_955_F01 <sup>e</sup> 5'-TTgTTTCagAAgTgTTgACAATg-3'	gi1905925 <a href="#">L76568</a>
XPF(ERCC4) Exon 10	T <sub>26729</sub> C	Ser/Pro	<a href="#">rs2020955</a>	ERCC4_955_R01 5'-AACTTCACAgCCCCCTTg-3'	gi1905925 <a href="#">L76568</a>
XPF(ERCC4) Exon 11	A <sub>30147</sub> G	Glu/Gly	<a href="#">rs1800124</a>	ERCC4_069_PL_F01 <sup>f</sup> 5'-TtTagAgTTCCTCCCAgTgA-3'	gi1905925 <a href="#">L76568</a>
XPF(ERCC4) Exon 11	A <sub>30147</sub> G	Glu/Gly	<a href="#">rs1800124</a>	ERCC4_069_PL_R01 5'-gACCTATgATgTCTggCAAagg-3'	gi1905925 <a href="#">L76568</a>
XPF(ERCC4) Exon 11	G <sub>30258</sub> A	Gly/Glu	<a href="#">rs2020956</a>	2020956F <sup>g</sup> 5'-ggCCATTACAgCAgATTCTgAA-3'	gi1905925 <a href="#">L76568</a>
XPF(ERCC4) Exon 11	G <sub>30258</sub> A	Gly/Glu	<a href="#">rs2020956</a>	2020956_R02 5'-CATCACTgTTCACCTTTTCCCTCTT-3'	gi1905925 <a href="#">L76568</a>
XPC Intron 9	Poly-AT (bp1457-1539), gTAAC- Deletion (bp1457-1461)	--		N1m <sup>h</sup> 5'-TagCACCCAgCagTCAAAg-3'	gi6910979 <a href="#">AF156539</a> (PAT+)
XPC Intron 9	Poly-AT (bp1457-1539), gTAAC- Deletion (bp1457-1461)	--		N2n 5'-TgTgAATgTgCTTAATgCTg-3'	gi4406114 <a href="#">AF076952</a> (PAT-)

<sup>a</sup>(Ma et al., 2000); <sup>b</sup>(Tomescu et al., 2001); <sup>c</sup>(Chen et al., 2000); <sup>d</sup>(Wong, 2000a); <sup>e</sup>(Wong, 2000c); <sup>f</sup>(Wong, 2000b); <sup>g</sup>Primersequenzen wurden mithilfe der Oligo-Software (Version 6.66, Molecular Biology Insights Inc., USA) ermittelt, die unterstrichene Base entspricht einer Mismatch-Base, die zur Generierung einer neuen Schnittstelle für das Restriktionsenzym Eam 1104I (Ksp 632I) in den Rückwärtsprimer 2020956\_R02 eingebaut wurde. <sup>h</sup>(Khan et al., 2000); <sup>i</sup>die rs-Nummern beziehen sich auf die SNP-Datenbanken des *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Snip>); <sup>j</sup>die Referenzsequenzen beziehen sich auf die *nucleotide*-Datenbanken des *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide>)

Tabelle 8: Primer-Richtung und -Positionen für die PCR-Reaktionen

Primer	Sequenz	Richtung	Position	Referenz-Sequenz <sup>i</sup>
PC1_F	5'-AcgTTCgCCCgCTCgCTCTg-3 <sup>ca</sup>	F	1330-1349	gi 189681
PC1_R	5'-gATgCCCACgCCAgCCAATgA-3 <sup>ca</sup>	R	1743-1723	gi 189681
ERCC1_E4_F	5'-TCATCCCTATTgATggCTTCTgCCC-3 <sup>cb</sup>	F	19055-19079	gi 188616
ERCC1_E4_R	5'-gACCATgCCCAgAggCTTCTCATAg-3 <sup>cb</sup>	R	18852-18828	gi 188616
ERCC1_UTR_F01	5'-TgAgCCAATTCAgCCACT-3 <sup>cc</sup>	F	7887-7904	gi 188616
ERCC1_UTR_R01	5'-TAgTTCCTCAgTTTCCCg-3 <sup>cc</sup>	R	8141-8124	gi 188616
ERCC4_067_068 F01	5'-CTTCgggTgAAggAATAAagg-3 <sup>cd</sup>	F	16989-17008	gi 1905925
ERCC4_067_068 R01	5'-CTgTgCAACTgAAAgCTgTg-3 <sup>cd</sup>	R	17706-17687	gi 1905925
ERCC4_955 F01	5'-TTgTTTCAgAAgTgTTgACAATg-3 <sup>ce</sup>	F	26614-26636	gi 1905925
ERCC4_955 R01	5'-AACTTCACAgCCCCCTTTg-3 <sup>ce</sup>	R	26818-26800	gi 1905925
ERCC4_069_PL F01	5'-TtAgAgTTCTTCCCCAgTgA-3 <sup>cf</sup>	F	29497-29517	gi 1905925
ERCC4_069_PL R01	5'-gACCTATgATgTCTggCAAagg-3 <sup>cf</sup>	R	30342-30322	gi 1905925
2020956F	5'-ggCCATTACAgCAgATTCTgAA-3 <sup>ch</sup>	F	30010-30031	gi 1905925
2020956_R02	5'-CATCACTgTTCACTTTTCCCTCTT-3 <sup>ch</sup>	R	30283-30259	gi 1905925
N1m	5'-TAgCACCCAgCAGTCAAAg-3 <sup>es</sup>	F	1258-1276	gi 6910979
N2n	5'-TgTgAATgTgCTTAATgCTg-3 <sup>es</sup>	R	1523-1504	gi 6910979

<sup>a</sup>(Ma et al., 2000); <sup>b</sup>(Tomescu et al., 2001); <sup>c</sup>(Chen et al., 2000); <sup>d</sup>(Wong, 2000a); <sup>e</sup>(Wong, 2000c); <sup>f</sup>(Wong, 2000b); <sup>g</sup>(Khan et al., 2000); <sup>h</sup>Die Primersequenzen wurden mithilfe der Oligo-Software (Version 6.66, Molecular Biology Insights Inc., USA) ermittelt; die unterstrichene Base entspricht einer Mismatch-Base, die zur Generierung einer neuen Schnittstelle für das Restriktionsenzym Eam 1104I (Ksp 632I) in den Rückwärtsprimer 2020956\_R02 eingebaut wurde; <sup>i</sup>die Referenzsequenzen beziehen sich auf die *nucleotide*-Datenbanken des *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide>)

Für jede PCR-Reaktion wurde zunächst ein Ansatz hergestellt, der die nötigen Ausgangssubstanzen 10x PCR-Puffer, 2 mM dNTP-Lösung, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, DNA-*Taq*-Polymerase und den entsprechenden Vorwärts- und Rückwärtsprimer (10,2 µM) in den für den jeweiligen PCR-Ansatz vorgesehenen Konzentrationen enthielt. Dazu wurden die bei -20°C gelagerten Lösungen zunächst langsam aufgetaut, auf Eis gestellt und in ein 2-ml-Reaktionsgefäß gegeben. Der Ansatz wurde mit Aqua bidest. auf das vorgesehene Volumen aufgefüllt, durch mehrmaliges Schütteln und Zentrifugieren gemischt und anschließend auf die einzelnen PCR-Reaktionsgefäße verteilt. In jedes dieser Einzelreaktionsgefäße wurden 2 µl DNA-Lösung (30 ng/µl) hinzupipettiert, geschüttelt und zentrifugiert. Bei jeder Reaktion wurden ein Ansatz ohne DNA (Negativkontrolle) und ein Ansatz mit einer Referenz-DNA (Positivkontrolle) mitgeführt, um Kontamination auszuschließen und das Stattfinden der PCR zu belegen. Die Reaktion fand in einem temperaturgesteuerten PCR-Gerät statt, in dem der Ansatz das jeweils optimale Temperaturprogramm in mehreren Schritten durchlief. Dabei wurde die DNA zunächst einmalig bei 94°C über 2 min denaturiert. Danach folgten 30-35 Zyklen einer dreischrittigen Temperaturabfolge: Zunächst wurde der Ansatz noch weitere 40 s bei 94°C denaturiert, dann erfolgte die Hybridisierung der PCR-Primer mit den DNA-Einzelsträngen bei einer Temperatur nahe dem Schmelzpunkt der jeweiligen Oligonukleotidprimer zwischen 57°C

und 68°C für 40 s (Hybridisierungstemperatur). Im dritten Schritt des Zyklus wurden die Primer mit Hilfe der DNA-*Taq*-Polymerase und den sich anlagernden dNTPs bei 72°C über 90 bzw. 120 s verlängert und so neue DNA-Doppelstränge synthetisiert (Extension). Dieser Schritt wurde erst durch den folgenden Denaturierungsschritt des nächsten Zyklus unterbrochen. Nach Beendigung des letzten Zyklus folgte ein weiterer Extensionsschritt bei 72°C für 7 min, bevor der Ansatz auf 4°C abgekühlt und damit die Reaktion endgültig gestoppt wurde.

### 2.2.3.1 Optimierung der Reaktionsbedingungen

Zur Optimierung der Bedingungen für die PCR-Reaktionen wurden die Ausgangssubstanzen des PCR-Ansatzes in wechselnden Konzentrationen eingesetzt, die Hybridisierungs- und die Extensionstemperatur optimiert und die Anzahl der Zyklen für das jeweilige Temperaturprogramm festgelegt. Das Ansatzvolumen für die PCR-Reaktionen PCNA(C<sub>1661</sub>G) bzw. (C<sub>1684</sub>A) und ERCC1(A<sub>19007</sub>G) war 20 µl, dasjenige für alle anderen PCR-Reaktionen 40 µl. Tabelle 9 gibt einen Überblick über das Resultat der Optimierung.

Tabelle 9: Übersicht über die variablen Komponenten der PCR-Ansätze

PCR	Ansatzvolumen	MgCl <sub>2</sub> -Konzentration	dNTP-Konzentration	Primer-Konzentration
PCNA(C <sub>1661</sub> G)/(C <sub>1684</sub> A)	20 µl	1,25 mM	0,20 mM	0,26 µM
ERCC1(A <sub>19007</sub> G)	20 µl	2,25 mM	0,20 mM	0,26 µM
ERCC1(C <sub>8092</sub> A)	40 µl	1,50 mM	0,05 mM	0,26 µM
XPF(G <sub>17103</sub> A)	40 µl	1,00 mM	0,20 mM	0,19 µM
XPF(T <sub>26729</sub> C)	40 µl	1,25 mM	0,10 mM	0,26 µM
XPF(A <sub>30147</sub> G)	40 µl	1,00 mM	0,20 mM	0,19 µM
XPF(G <sub>30258</sub> A)	40 µl	2,25 mM	0,05 mM	0,13 µM
XPC(Poly-AT)	40 µl	1,75 mM	0,20 mM	0,26 µM

Jeder PCR-Ansatz durchlief zu Beginn einmalig ein Temperaturprogramm in einem speziellen PCR-Thermocycler (Gradienten-Cycler), der es ermöglichte, bei sonst exakt gleichen Reaktionsbedingungen nur die Hybridisierungstemperatur zu variieren und eine Reihe von Einzelproben des PCR-Ansatzes einem Temperaturgradienten zwischen 53°C und 73°C auszusetzen. Die Temperatur, die dabei zur Synthese eines stabilen und zugleich spezifischen PCR-Produkts führte, wurde für das oben beschriebene Cycler-Programm übernommen. Neben der Hybridisierungstemperatur wurden auch die Extensionszeit und die Zahl der zu durchlaufenden Temperaturzyklen jeder Reaktion individuell angepasst. Das PCR-Produkt XPF(G<sub>17103</sub>A) wurde mit Hilfe der so genannten *touchdown*-Technik amplifiziert. Bei dieser Technik wird die Hybridisierungstemperatur zur Erhöhung der Spezifität im ersten Zyklus zunächst etwa 10°C über der Idealtemperatur gewählt und dann in den folgenden 10 Zyklen um

jeweils 1°C herabgesetzt (Don et al., 1991). Alle Ansätze enthielten *Taq*-Polymerase, 10x PCR-Puffer in 1:10 Verdünnung und jeweils 2 µl der auf 30 ng/µl eingestellten DNA-Lösung.

Tabelle 10 fasst alle Variablen der Temperaturprogramme für die einzelnen PCR-Reaktionen zusammen.

Tabelle 10: Übersicht über die Variablen der Temperaturprogramme

PCR	Hybridisierungstemperatur	Extensionszeit	Anzahl der Zyklen
PCNA(C <sub>1661</sub> G)/(C <sub>1684</sub> A)	68°C	120 S	35
ERCC1(A <sub>19007</sub> G)	68°C	120 s	30
ERCC1(C <sub>8092</sub> A)	58°C	90 s	35
XPF(G <sub>17103</sub> A) <sup>a</sup>	66°C, -1°C/Zyklus	90 s	10
	56°C	90 s	25
XPF(T <sub>26729</sub> C)	63°C	120 s	35
XPF(A <sub>30147</sub> G)	57°C	90 s	35
XPF(G <sub>30258</sub> A)	60°C	120 s	35
XPC(Poly-AT)	63°C	120 s	30

<sup>a</sup>XPF(G<sub>17103</sub>A) wurde mit der so genannten *touchdown*-Technik (Don et al., 1991) (s.o.) durchgeführt, bei der die Hybridisierungstemperatur von 66°C ausgehend über zehn Zyklen um je 1°C verringert wurde, und die resultierende Hybridisierungstemperatur von 56°C für weitere 25 Zyklen beibehalten wurde.

#### 2.2.4 DNA-Sequenzierung

Zur Überprüfung der Spezifität wurden fünf der acht PCR-Produkte sequenziert (PCNA(C<sub>1661</sub>G)/(C<sub>1684</sub>A), ERCC1(C<sub>8092</sub>A), XPF(G<sub>17103</sub>A), XPF(T<sub>26729</sub>C) und XPF(A<sub>30147</sub>G)). Die Ergebnisse wurden mit den in Tabelle 7 (S. 25) angegebenen Referenzsequenzen verglichen. Grundlage der DNA-Sequenzierung ist die Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977). Sie erfolgte unter Verwendung von fluoreszenzmarkierten Didesoxyribonukleosidtriphosphaten (ddNTPs), die bei der DNA-Synthese nach Einbau durch die DNA-Polymerase zum Kettenabbruch führen. In dieser Arbeit wurde das *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (Applied Biosystems) verwendet. Es enthält eine modifizierte *Taq*-Polymerase, Desoxynukleotide und fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide in Konzentrationen, die laut Angaben des Herstellers die Sequenzierung von PCR-Produkten zwischen 10 und 700 bp ermöglichen. Für die Sequenzierungsreaktion wurden aufgereinigte PCR-Produkte verwendet, die mit einem Reinigungskit desselben Herstellers aufbereitet wurden. In einem Standardansatz für die Sequenzierungsreaktion wurden 0,4 µl PCR-Primer und 2,3 µl *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* mit Aqua bidest. in einem Endvolumen von 7 µl gemischt, mit 2 µl aufgereinigtem PCR-Produkt versetzt und anschließend folgendem Temperaturprogramm in einem Thermocycler ausgesetzt: 2 min 94°C, dann 25 Zyklen mit 15 s 96°C, 15 s 50°C, 4 min 60°C, danach 10°C zur Abkühlung und Beendigung der Reaktion. Zur weiteren Aufbereitung und

Abtrennung überschüssiger Terminatoren wurden die Proben anschließend auf eine vorzentifugierte Gelfiltrationssäule (Sephadex G 50) aufgetragen und zentrifugiert. Der Durchlauf wurde anschließend mit dem *Sequencer ABI Prism 310* sequenziert.

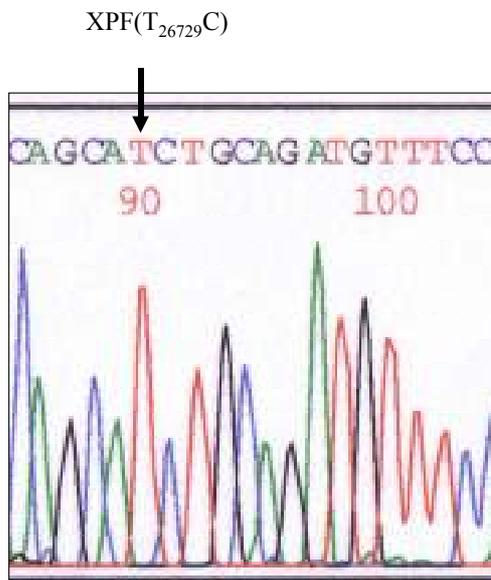


Abbildung 2: Ausschnitt aus den Sequenzierdaten des PCR-Produkts XPF(T<sub>26729</sub>C)

Die Basensequenz im oberen Teil der Abbildung ergibt sich aus der Abfolge der im unteren Teil dargestellten Peaks. Die Position des Polymorphismus XPF(T<sub>26729</sub>C) ist mit einem Pfeil markiert. Der Beispielpatient ist in diesem Fall homozygot für den Referenztyp (TT).

Alle Sequenzierdaten wurden mit dem Computerprogramm Chromas (Version: Chromas Lite 2.0) dargestellt und analysiert. Exemplarisch wird in Abbildung 2 ein Ausschnitt der Sequenzierdaten des PCR-Produkts XPF(T<sub>26729</sub>C) dargestellt.

### 2.2.5 Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus (RFLP)

Der Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus nach Inkubation mit spezifischen Restriktionsenzymen erlaubt die Erfassung von Genvarianten in genomischer DNA. Dabei wird die DNA mithilfe bakterieller Restriktionsendonukleasen in Fragmente zerlegt. Jedes dieser Enzyme erkennt eine spezifische Nukleotidsequenz, bei der es den DNA-Doppelstrang zerschneidet. Ändert sich die Sequenz eines Genabschnitts durch Punktmutationen, führt das zum Neuauftreten oder Wegfall von Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen. Die nach Inkubation von voramplifizierter DNA mit einem Restriktionsenzym resultierenden DNA-Fragmentlängen geben Aufschluss über das Vorhandensein der untersuchten Variante.

In dieser Studie wurden die Polymorphismen in den DNA-Reparaturenzymen PCNA, ERCC1 und XPF(ERCC4) mit Hilfe des Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus genotypisiert. Tabelle 11 gibt einen Überblick über die verschiedenen RFLP-Ansätze mit Angabe der eingesetzten Restriktionsendonuklease, Länge des ursprünglichen PCR-Produkts und den resultierenden Fragmentlängen.

Tabelle 11: RFLP-Ansätze, Restriktionsendonukleasen und die resultierenden Fragmentlängen

RFLP	Restriktions- endonuklease	PCR- Produkt (bp)	Fragmentlängen (bp)		
			Referenztyp	Heterozygoter Typ	Variante
PCNA(C <sub>1661</sub> G) <sup>a</sup>	Cfr 9I (SmaI)d	414	332, 82	414, 332, 82	414
PCNA(C <sub>1684</sub> A) <sup>a</sup>	Pae I (SphI)d	414	414	414, 357, 57	357, 57
ERCC1(A <sub>19007</sub> G) <sup>b</sup>	Bsr DI	252	178, 74	252, 178, 74	252
ERCC1(C <sub>8092</sub> A) <sup>b</sup>	Mbo II	255	157, 92, 6	157, 117, 92, 40, 6	117, 92, 40, 6
XPF(G <sub>17103</sub> A) <sup>c</sup>	Pdm I	718	598, 120	718, 598, 120	718
XPF(T <sub>26729</sub> C) <sup>c</sup>	Lwe I	205	123, 82	205, 123, 82	205
XPF(A <sub>30147</sub> G) <sup>c</sup>	Tsp509I	846	555, 195, 96	750, 555, 195, 96	750, 96
XPF(G <sub>30258</sub> A) <sup>c</sup>	Eam1104I (Ksp632I)	275	248, 27	275, 248, 27	275

<sup>a</sup>Positionierung bezieht sich auf J04718; <sup>b</sup>Positionierung bezieht sich auf M63796; <sup>c</sup>Positionierung bezieht sich auf gi 1905925; <sup>d</sup>(Ma et al., 2000)

Der Polymorphismus in XPC wurde mit Hilfe einer anderen Methode genotypisiert, die weiter unten beschrieben wird. Die Restriktionsendonukleasen für die Polymorphismen C<sub>1661</sub>G und C<sub>1684</sub>A im Intron 1 von PCNA wurden der Literatur entnommen (Ma et al., 2000). Die Restriktionsendonukleasen für die Polymorphismen A<sub>19007</sub>G und C<sub>8092</sub>A in ERCC 1 und G<sub>17103</sub>A, T<sub>26729</sub>C, A<sub>30147</sub>G und G<sub>30258</sub>A in XPF(ERCC 4) wurden mithilfe einer Restriktionsanalyse der Annhyp-Software (Version 3.5 beta 15, ©1997-2001 Olivier Friard, Free Software Foundation, USA) ermittelt.

Für jeden RFLP wurde ein Reaktionsansatz hergestellt, der die Ausgangssubstanzen Aqua bidest., Restriktionsenzym und den vom Hersteller mit dem jeweiligen Enzym mitgelieferten 10x-Puffer enthielt. Die Ansätze wurden bis zum Beginn der Inkubationszeit bei 0°C gelagert. Für die Detektion des Polymorphismus A<sub>19007</sub>G in ERCC 1 wurde dem Reaktionsansatz außerdem 0,02 µl bovines Serumalbumin (BSA) nach Herstellerprotokoll des Restriktionsenzym hinzugefügt. Die Puffer wurden in 1:10 Verdünnungen eingesetzt und die Enzymkonzentration wurde für jeden RFLP in mehreren parallelen Ansätzen optimiert. Die Reaktionsansätze wurden auf je 10 µl mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Nach dem Verteilen auf Einzelreaktionsgefäße wurde jedem Einzelansatz voramplifiziertes PCR-Produkt

hinzugefügt. Die optimale Menge an eingesetztem PCR-Produkt wurde ebenfalls in mehreren parallelen Ansätzen ermittelt. Danach wurden die Ansätze bei 37°C über Nacht (PCNA(C<sub>1661</sub>G), PCNA(C<sub>1684</sub>A), ERCC1(C<sub>8092</sub>A), XPF(G<sub>17103</sub>A), XPF(T<sub>26729</sub>C) und XPF(G<sub>30258</sub>A)), bei 65°C über sieben Stunden (ERCC1(A<sub>19007</sub>G)) beziehungsweise bei 65°C über vier Stunden (XPF(A<sub>30147</sub>G)) inkubiert (Tabelle 12).

Tabelle 12: Ergebnis der Optimierung der RFLP-Bedingungen

RFLP	Inkubation		Eingesetztes PCR-Produkt	Puffer
	Temperatur	Dauer		
PCNA(C <sub>1661</sub> G)	37°C	über Nacht	10 µl	Buffer Y+/Tango
PCNA(C <sub>1684</sub> A)	37°C	über Nacht	10 µl	Buffer Y+/Tango
ERCC1(A <sub>19007</sub> G)	65°C	7 h	10 µl	NE Buffer 2
ERCC1(C <sub>8092</sub> A)	37°C	über Nacht	8 µl	Buffer B+
XPF(G <sub>17103</sub> A)	37°C	über Nacht	10 µl	Buffer Y+/Tango
XPF(T <sub>26729</sub> C)	37°C	über Nacht	20 µl	Buffer Y+/Tango
XPF(A <sub>30147</sub> G)	65°C	4 h	10 µl	NE Buffer 1
XPF(G <sub>30258</sub> A)	37°C	über Nacht	7 µl	Buffer Y+/Tango

### 2.2.6 Agarosegelelektrophorese

Durch ihre negative Ladung wandern DNA-Fragmente in einem elektrischen Feld abhängig von ihrer Länge unterschiedlich schnell in Richtung Kathode durch ein Agarosegel und werden so voneinander getrennt. Für den Nachweis der hier amplifizierten PCR-Produkte (PCR-Kontrolle) und die Detektion der durch die Inkubation der PCR-Produkte mit den Restriktionsenzymen entstandenen DNA-Fragmente wurden die Reaktionsprodukte elektrophoretisch aufgetrennt.

#### 2.2.6.1 Herstellung des Agarosegels

Für 250 ml 1,5%-iges Gel wurden in einem abgedeckten Glasgefäß 3,75 g Agarose (*Qualex Gold*, Gibco BRL) in 250 ml 1x TBE-Puffer unter Rühren und mehrmaligem Aufkochen im Mikrowellenherd vollständig gelöst. Sobald die Lösung nach Rühren mit dem Magnetrührer leicht abgekühlt, klar und blasenfrei war, wurde sie in einen Elektrophoreseschlitten gegossen und mit Elektrophoresekämmen bestückt. Die Käme wurden nach vollständigem Erkalten und Aushärten des Gels wieder entfernt. Nicht sofort verwendete Agarosegellplatten wurden bei 4°C gelagert.

Für die Herstellung 2%-iger, 2,5%-iger bzw. 3%-iger Agarosegele wurde entsprechend verfahren und jeweils 5 g, 6,25 g bzw. 7,5 g Agarose in 250 ml 1x TBE-Puffer gelöst.

### 2.2.6.2 Elektrophoresebedingungen

Für die Elektrophorese wurden die Agarosegelplatten in eine mit 1x TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt und nach Beladen der Gelkammern mit einer Mischung aus Reaktionsprodukt und Bromphenolaufragepuffer einem elektrischen Feld mit einer Spannung von 120 Volt ausgesetzt. Um die Fragmentlängen der Reaktionsprodukte bei der Auswertung abschätzen zu können, wurden parallel DNA-Standards mit bekannten Fragmentlängen aufgetragen. Nach Beendigung des Elektrophoreselaufs wurden die Gele in einem Bad aus in 1x TBE-Puffer gelöstem SYBR<sup>®</sup>-Green Farbstoff (Biozym Diagnostik GmbH) gefärbt und anschließend bei UV-Durchleuchtung für die Auswertung fotografiert und dokumentiert.

Tabelle 13 fasst die Elektrophoresebedingungen für die PCR-Kontrollen und die Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismen zusammen.

Tabelle 13: Elektrophoresebedingungen für PCR-Kontrollen und RFLPs

	Agarosegel	Auftragsvolumina	Spannung	Dauer
PCR-Kontrolle	3 %	20 µl PCR-Produkt	120 V	42 min
PCNA(C <sub>1661</sub> G)	1,5 %	20 µl RFLP-Produkt	120 V	54 min
PCNA(C <sub>1684</sub> A)	1,5 %	20 µl RFLP-Produkt	120 V	54 min
ERCC1(A <sub>19007</sub> G)	2 %	20 µl RFLP-Produkt	120 V	1 h 12 min
ERCC1(C <sub>8092</sub> A)	2,5 %	18 µl RFLP-Produkt	120 V	1 h 12 min
XPF(G <sub>17103</sub> A)	3 %	20 µl RFLP-Produkt	120 V	1 h 12 min
XPF(T <sub>26729</sub> C)	3 %	30 µl RFLP-Produkt	120 V	1 h 12 min
XPF(A <sub>30147</sub> G)	3 %	20 µl RFLP-Produkt	120 V	1 h 12 min
XPF(G <sub>30258</sub> A)	2,5 %	17 µl RFLP-Produkt	120 V	2 h

<sup>a</sup>Dem PCR-Produkt wurden vor dem Auftragen jeweils 10 µl Bromphenolaufragepuffer zugesetzt.

### 2.2.7 Nachweis der Genvarianten in PCNA, ERCC1 und XPF(ERCC4)

In den folgenden Abbildungen (Abbildung 3 bis Abbildung 8) werden die Banden- und Restriktionsmuster dargestellt, die sich nach Auftrennung der RFLP-Produkte in der Gelelektrophorese ergaben. Die Genvarianten XPF(T<sub>26729</sub>C) und XPF(G<sub>30258</sub>A) traten weder im Larynxkarzinom- noch im Kontrollkollektiv auf. Die zugehörigen elektrophoretisch aufgetrennten RFLP-Produkte werden deshalb hier nicht dargestellt. Die Längen der resultierenden Fragmente sind an der Seite jeder Abbildung angegeben. Zur Abschätzung der Fragmentlängen wurde neben die RFLP- und PCR-Produkte jeweils ein geeigneter DNA-Größenstandard aufgetragen.

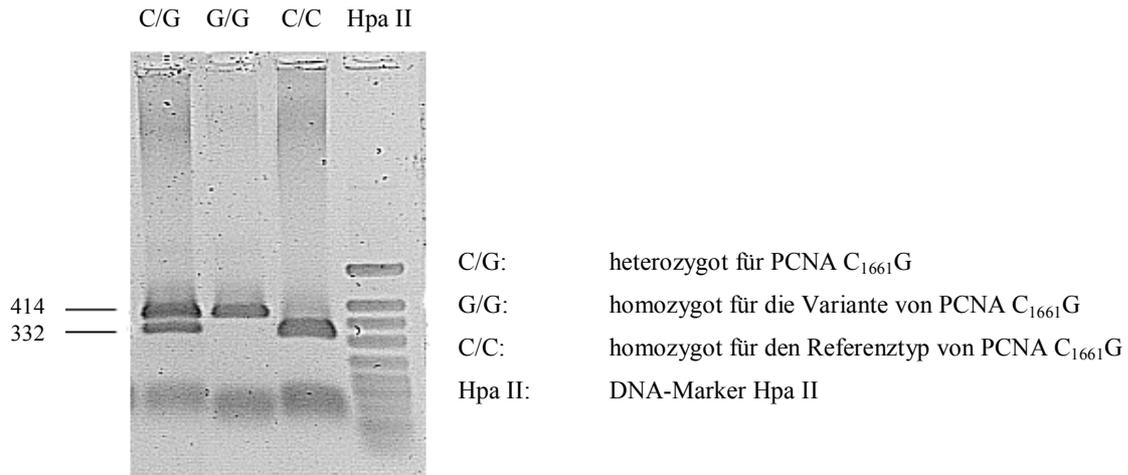


Abbildung 3: Nachweis der PCNA-Variante C<sub>1661</sub>G

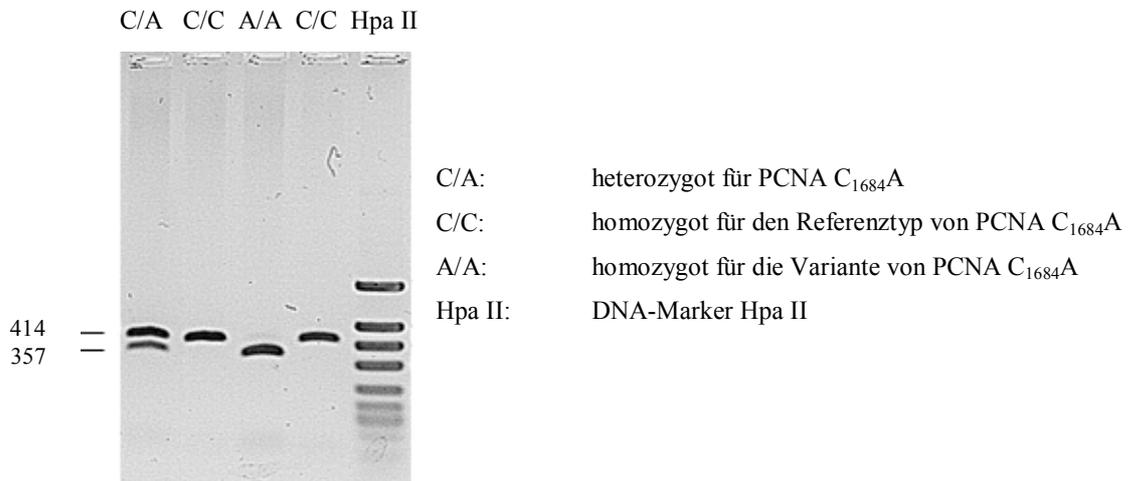


Abbildung 4: Nachweis der PCNA-Variante C<sub>1684</sub>A

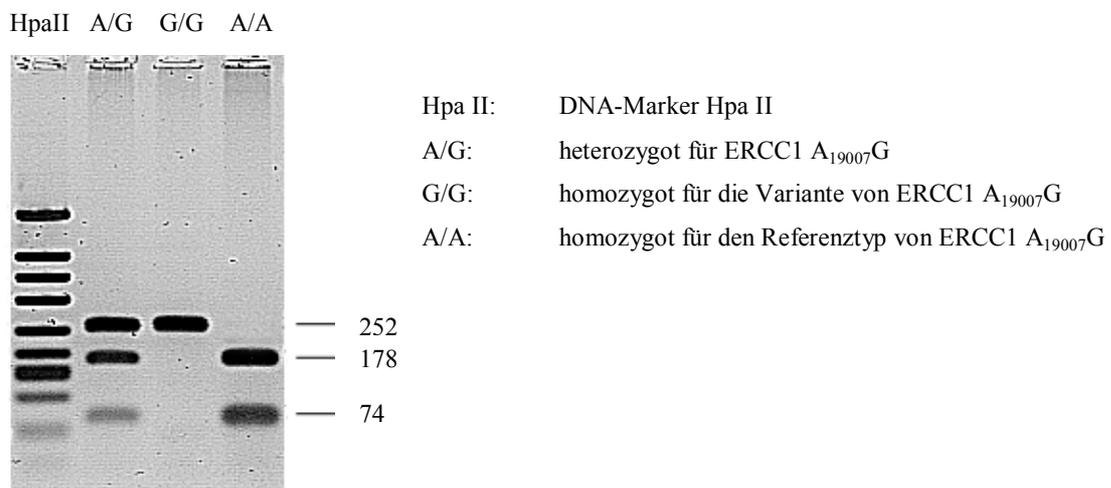


Abbildung 5: Nachweis der ERCC1-Variante A<sub>19007</sub>G

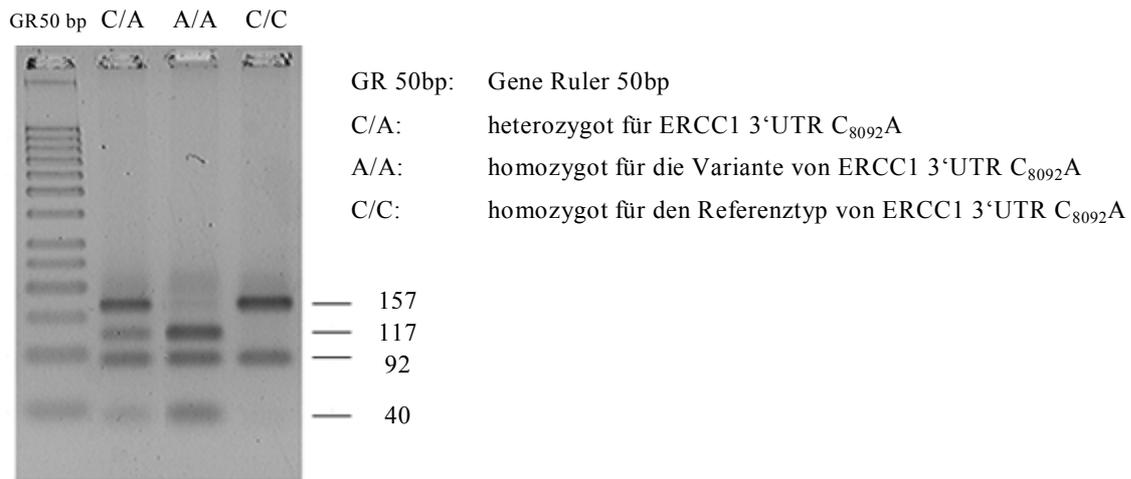


Abbildung 6: Nachweis der ERCC1-Variante C<sub>8092</sub>A

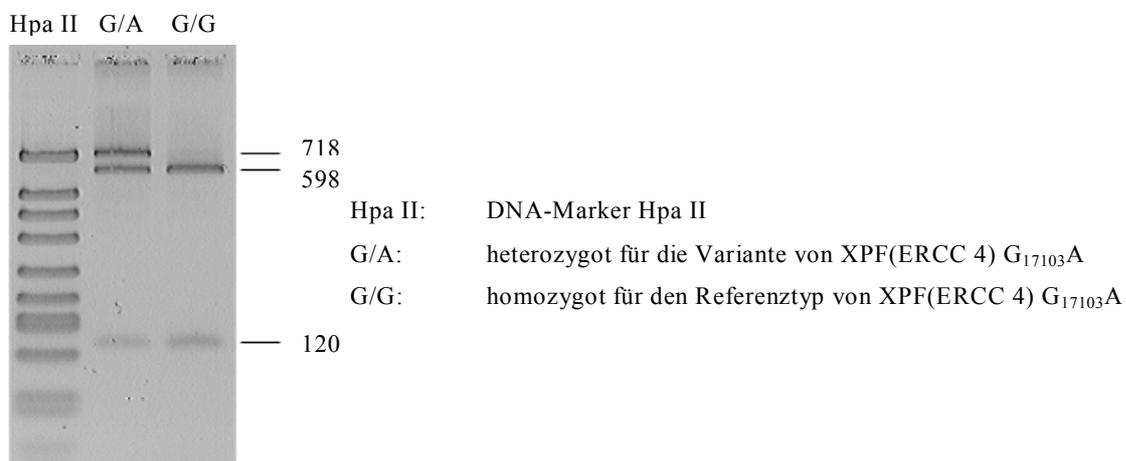


Abbildung 7: Nachweis der XPF(ERCC 4)-Variante G<sub>17103</sub>A

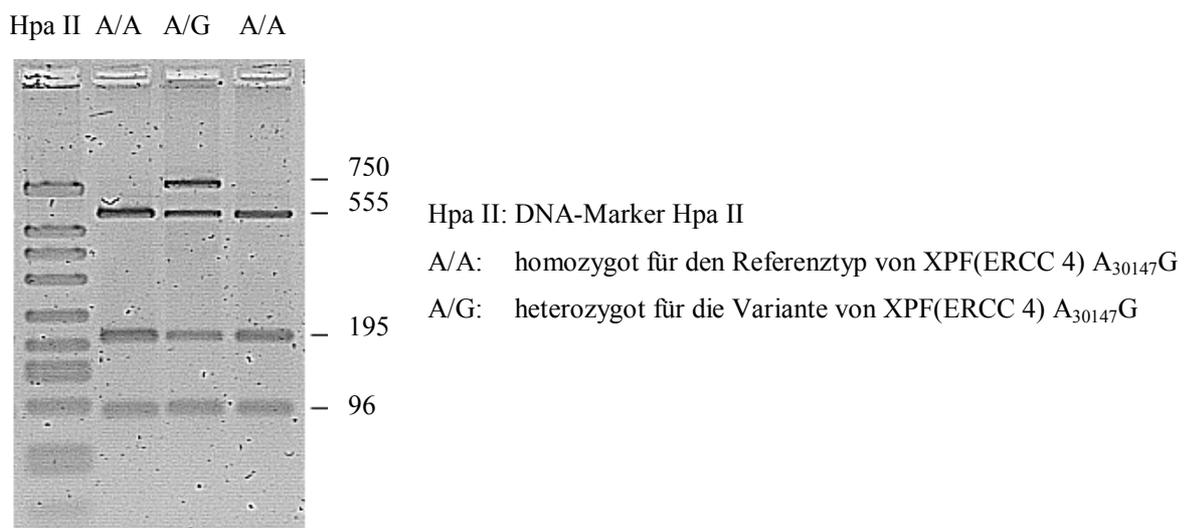


Abbildung 8: Nachweis der XPF(ERCC 4)-Variante A<sub>30147</sub>G

### 2.2.8 Nachweis des Poly-AT-Polymorphismus in XPC

Die Poly-AT-Insertion in Intron 9 von XPC besteht aus 83 bp und tritt in Kombination mit einer Deletion von 5 bp auf (Tabelle 7). Khan und Mitarbeiter etablierten eine PCR-Methode zur Erfassung dieses Polymorphismus (Khan et al., 2000). Danach entstanden bei der Amplifikation je nach Genotyp verschieden lange PCR-Produkte. Bei Vorhandensein der 83 bp langen Poly-AT-Insertion und der 5 bp langen Deletion (PAT+) entstand ein um 78 bp längeres PCR-Produkt als bei deren Abwesenheit (PAT-). Nach Auftragen des entstandenen Amplifikats auf ein 3%-iges Agarosegel und einer Elektrophoreselaufzeit von 1 h 12 min bei 120 V mit anschließender Färbung konnte der entsprechende Genotyp abgelesen werden. Beim homozygoten Referenztyp entstand nur ein Produkt der Länge 266 bp, der heterozygote Typ wies zwei Fragmente der Länge 266 bp bzw. 344 bp auf, und bei dem für die Variante homozygoten Typ wurde nur ein Produkt der Länge 344 bp nachgewiesen (Tabelle 14).

Tabelle 14: Poly-AT-Polymorphismus in XPC

Detektierter Polymorphismus	PCR-Prod. (bp)	Länge des PCR-Produkts (bp)		
		Referenztyp (PAT-/PAT-)	Heterozygoter Typ (PAT+/PAT-)	Variante (PAT+/PAT+)
XPC(Poly-AT) 83-bp-Ins./gTAAC-Del. (5 bp)	344 (PAT+) bzw. 266 (PAT-) <sup>a</sup>	266	344, 266	344

<sup>a</sup>PAT+: Das Allel trägt die 83-bp-Insertion und die 5-bp-Deletion; PAT-: Das Allel trägt weder die 83-bp-Insertion noch die 5-bp-Deletion

In Abbildung 9 sind die Bandenmuster aller drei Genotypen abgebildet, die nach elektrophoretischer Auftrennung der PCR-Produkte von XPC(Poly-AT) entstanden sind.

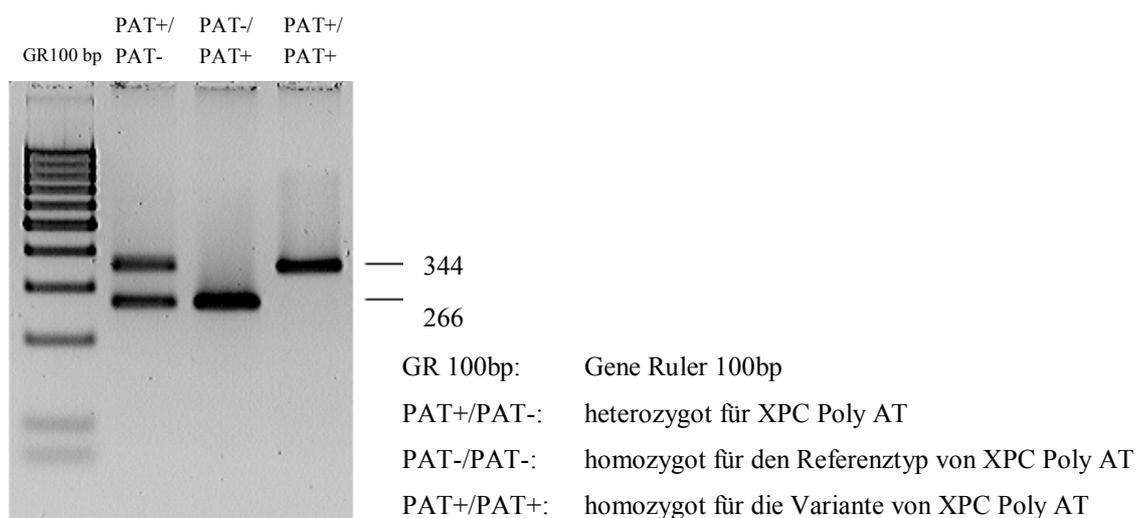


Abbildung 9: Nachweis des Poly-AT-Polymorphismus in XPC

## 2.3 Statistik

Die statistische Analyse erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS (Version 12.0.1, SPSS Inc., 1989-2003). Die Fall- und Kontrollgruppe wurden mit Chi-Quadrat-Tests auf Homogenität hinsichtlich der Geschlechterverteilung, des Tabak- und des Alkoholkonsums untersucht. Die Altersverteilung beider Gruppen wurde mit dem Mann-Whitney-Test verglichen. Es wurden die absoluten und relativen Häufigkeiten der kategorialen Merkmale in Patienten- und Kontrollkollektiv bestimmt. Bei unvollständigen bzw. fehlenden Angaben oder Ergebnissen wurden adjustierte relative Häufigkeiten angegeben. Nach den beobachteten Allelfrequenzen innerhalb der Kontrollgruppe wurden die erwarteten Allelfrequenzen mit dem Hardy-Weinberg-Gesetz berechnet. Mit Chi-Quadrat-Tests nach Pearson wurden beobachtete und erwartete Allelhäufigkeiten auf Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht untersucht.

Die Vergleiche bezüglich der Häufigkeit des Auftretens der Polymorphismen in Fall- und Kontrollkollektiv wurden mithilfe des Chi-Quadrat-Tests nach Pearson (beidseitig geprüft), gegebenenfalls mit dem exakten Fisher-Test (beidseitig geprüft) durchgeführt. Beide Gruppen wurden in der Gesamtheit und in den gebildeten Subgruppen auf Unabhängigkeit bzw. Homogenität untersucht. Als Schätzgröße für das relative Risiko wurde die Odds-Ratio gewählt und mit dem 95%-Vertrauensbereich angegeben.

Für die zwei auf Chromosom 19 befindlichen SNPs A<sub>19007</sub>G und C<sub>8092</sub>A in ERCC1 und die zwei auf Chromosom 16 befindlichen SNPs G<sub>17103</sub>A und A<sub>30147</sub>G in XPF(ERCC4) wurden Haplotypenanalysen mithilfe des Computerprogramms PHASE 2.1 durchgeführt. Diese Software bedient sich eines auf einem Bayes-Verfahren beruhenden Algorithmus (Stephens und Scheet, 2005; Stephens et al., 2001). Bei gegebenem Genotyp wurde das jeweils wahrscheinlichste zugehörige Haplotypenpaar eines jeden Individuums rekonstruiert. Neben der Zuordnung der Haplotypenpaare zu den verschiedenen Genotypen wurde die relative Häufigkeit der vier möglichen Haplotypen in Fall- und Kontrollkollektiv berechnet. Darüber hinaus wurde mit dem Chi-Quadrat-Test beidseitig geprüft, ob sich die Häufigkeitsverteilung der verschiedenen Haplotypen im Patienten- und Kontrollkollektiv unterschied.

Einheitlich wurde für das Signifikanzniveau  $p=0,05$  festgelegt.