Xeroderma pigmentosum^{*}

Xeroderma Pigmentosum

Autor

S. Emmert

Institut

Universitäts-Hautklinik der Georg-August-Universität Göttingen

Bibliografie

DOI 10.1055/s-2007-966521
Akt Dermatol 2007; 33:
205–209 © Georg Thieme
Verlag KG Stuttgart · New York
ISSN 0340-2541

Korrespondenzadresse

Univ.-Prof. Dr. med.

Steffen Emmert

Oberarzt an der Universitäts-
Hautklinik der
Georg-August-Universität
Göttingen
Von-Siebold-Straße 3
37075 Göttingen
semmert@gwdg.de

Zusammenfassung

Im Rahmen einer Festveranstaltung zum 75. Geburtstag von Herrn Professor Dr. med. E. G. Jung fand im Universitätsklinikum Mannheim eine Vortragsreihe zur Würdigung des Jubilars statt. Herr Prof. Dr. Jung ist der Pionier der molekular-

lar-genetischen Xeroderma pigmentosum-Forschung in Deutschland. Der Vortrag Xeroderma pigmentosum stellte anhand von 3 ausgewählten Studienbeispielen die Bedeutung der molekular-genetischen Diagnostik von Xeroderma pigmentosum-Patienten für die Abschätzung des Hautkrebsrisikos in der allgemeinen Bevölkerung dar.

Einleitung

Die Haut ist ständig exogenen und endogenen Noxen ausgesetzt, die sie schädigen. Zu den wichtigsten exogenen Noxen gehört sicherlich die ultraviolette Strahlung, die eng mit dem Hautkrebsrisiko assoziiert ist. Aber auch endogene Noxen, die zum Beispiel durch physiologische Zellstoffwechselprozesse entstehen (reaktive Sauerstoffspezies und andere), können die Haut schädigen.

Glücklicherweise besitzt der Organismus jedoch Mechanismen, um diese durch endogene und exogene Noxen ausgelösten Schäden wieder zu reparieren und damit die genomische Integrität des Organismus, aber auch der einzelnen Zelle aufrecht zu erhalten [1]. Dies wirkt der (Haut-) Kanzerogenese aber auch anderen Zellprozessen wie der Alterung entgegen. **Abb. 1** zeigt wichtige zelluläre DNA-Reparaturmechanismen. Alle Reparatursysteme für sich genommen sind bereits sehr komplex, können größtenteils nochmals unterteilt werden und führen bei einem Funktionsverlust zu verschiedenen klinischen Erkrankungen. Diese genetischen Erkrankungen ermöglichen Rückschlüsse auf die Funktionen des jeweiligen Reparatursystems beim Menschen [2]. Sicher ist, dass jedes Reparatursystem für sich genommen nicht alleine arbeitet, sondern es mannigfaltige Überlappungen und Ergänzungen

unter den einzelnen Reparatursystemen gibt. Für den Dermatologen sehr interessant ist sicher die Nukleotid-Exzisions-Reparatur. Dieses Reparatursystem eliminiert eine Vielzahl verschiedener DNA-Schäden, unter anderem auch UV-induzierte DNA-Schäden [3]. Die Nukleotid-Exzisions-Reparatur besteht aus einem mehrschrittigen Prozess, an dem alle 7 bisher bekannten Xeroderma pigmentosum-Gene in einer festen Abfolge beteiligt sind (**Abb. 2**). Zunächst wird der Schaden durch das XPC-Protein erkannt und dann weiter demarkiert. Hier spielen die beiden XP-Proteine XPB und XPD mit ihrer gerichteten Helikaseaktivität eine entscheidende Rolle. Im Folgenden wird rechts und links des DNA-Schadens der schadentragende DNA-Strang jeweils durch die XPG- und XPF-Proteine eingeschnitten. Nach Entfernung des immer etwa 26 Basen langen DNA-Stückes erfolgt die Wiederauffüllung der Lücke mit Hilfe des komplementären DNA-Stranges. Fällt bereits eines der XP-Gene aus, kommt es zu einem Ausfall der kompletten Nukleotid-Exzisions-Reparaturkaskade. Daraus resultiert das klinische Krankheitsbild Xeroderma pigmentosum [4].

Anhand von 3 Studienbeispielen soll im Folgenden aufgezeigt werden, wie Grundlagenforschung um die Modellerkrankung Xeroderma pigmentosum wichtige Erkenntnisse auch für die allgemeine Bevölkerung liefern kann und wie diese Erkenntnisse möglicherweise direkt in der Klinik zum Einsatz kommen können.

^{*} Vortrag im Rahmen des Festsymposiums zu Ehren des 75. Geburtstages von Herrn Prof. Jung.

Abb. 1 Konzert wichtiger zellulärer DNA-Reparaturmechanismen, die der Aufrechterhaltung der genomischen Integrität dienen.

Abb. 2 Schema des Ablaufs der Nukleotid-Exzisions-Reparatur für Schäden im gesamten Genom; I) Schadenerkennung, II) Schadendemarkierung, III) Einschnitten des DNA-Stranges, IV) Entfernung des schadentragenden Oligonukleotids, V) Auffüllen der Lücke nach Vorlage des komplementären Stranges.

Genotyp-Phänotyp Korrelation von XP-Patienten

Mit dem ersten Studienbeispiel, einer Genotyp-Phänotyp-Korrelationsstudie, soll das Vorgehen der molekulargenetischen Diagnostik von Patienten mit den klinischen Symptomen von Xeroderma pigmentosum veranschaulicht werden. In einer Kooperation mit der Universitäts-Hautklinik in Leipzig und dem National Cancer Institute in Bethesda, MD, USA, führten wir eine molekulargenetische Diagnostik bei 2 Geschwistern, einem 9-jährigen Jungen und seiner 6-jährigen Schwester, durch [5]. Beide Kinder stammen aus einer irakischen Familie, die jetzt in Deutschland

lebt. Die Eltern der beiden Kinder sind blutsverwandt, Cousin und Cousine. Bei beiden Kindern fiel bereits seit der Geburt eine extrem starke Sonnenempfindlichkeit auf. Dann entwickelten sie im Weiteren bräunliche Hyperpigmentierungen in den sonnenbelichteten Hautarealen etwa ab dem 6. Lebensmonat. Vor Sonne geschützte Haut war nicht betroffen. Der Junge entwickelte bereits 2 Basalzellkarzinome und ein Plattenepithelkarzinom und das Mädchen ein Plattenepithelkarzinom mit 4 Jahren. In der Detailansicht der Haut (Abb. 3) zeigt sich eine trockene Haut (Xeroderm, Xerosis cutis), eine Hautatrophie und die XP-typischen Hyperpigmentierungen, die insbesondere auf das

Abb. 3 Detailansicht XP-typischer Hautbefunde: Xerosis cutis, Hautatrophie und Hyperpigmentierungen, die auch das Lippenrot betreffen.

Lippenrot übergreifen. Ansonsten war die körperliche und geistige Entwicklung der beiden Kinder völlig normal, sie zeigten keine neurologischen Symptome. Etwa 20% aller XP-Patienten zeigen zusätzlich zu den XP-typischen Hautsymptomen Sonnenempfindlichkeit, Hyperpigmentierungen und Hautkrebs auch progrediente neurologische Auffälligkeiten wie reduzierte Sehnenreflexe, Innenohrschwerhörigkeit oder Gang- und Sprachstörungen [6, 7].

Zur molekulargenetischen Diagnostik wurden zunächst ausgehend von einer Hautbiopsie Fibroblasten der beiden Kinder angezüchtet. Zuerst wurde das zelluläre Überleben nach UV-Bestrahlung bestimmt. Hier zeigte sich, dass die Fibroblasten der Patienten einen deutlich rascheren Abfall ihres Überlebens schon nach sehr niedrigen UV-Dosen im Vergleich zu normalen Kontrollfibroblasten aufwiesen. Dies kann als Hinweis auf die stark erhöhte Sonnenempfindlichkeit der beiden Kinder gewertet werden. Mit einem Plasmid-basierten Wirtszell-Reaktivierungs-Assay kann dann die zelluläre Nukleotid-Exzisions-Reparaturfähigkeit bestimmt werden (Abb. 4). Ein Reporter-gen-Plasmid, welches für das Luciferaseenzym kodiert, wird zunächst in vitro mit UV-Licht bestrahlt. Dadurch werden UV-induzierte DNA-Schäden in der Plasmid-DNA generiert. Danach wird das Schaden-tragende Plasmid in Patientenfibroblasten transfiziert. Nach 2 Tagen werden die Zellen lysiert und die Menge an Luciferaseenzym kann im Zelllysate mittels Lumineszenz gemessen werden. Da Fibroblasten Luciferase nur exprimieren können, wenn sie zuvor erfolgreich sämtliche Plasmid-DNA-Schäden erfolgreich reparieren konnten, ist die Höhe der produzierten Luciferasemenge ein Maß für die Nukleotid-Exzisions-Reparaturfähigkeit der Wirtsfibroblasten [8]. Eine im Vergleich zu Kontrollfibroblasten erniedrigte Luciferaseexpression weist auf eine defekte Nukleotid-Exzisions-Reparatur hin. Nun stellt sich die Frage, welches der 7 XP-Gene (XPA-XPG) denn defekt ist. Man kann zeitgleich mit dem Luciferaseplasmid ein zweites Plasmid in die Fibroblasten kotransfizieren, welches für ein XP-Gen kodiert. Wird das XP-Gen eingebracht, wofür in den Fibroblasten ein Defekt besteht, wird der zelluläre Reparaturdefekt ausgeglichen (komplementiert). Dies resultiert dann in einem signifikanten Anstieg der Luciferasemenge [9]. Wir konnten mithilfe dieses Testsystems den Nukleotid-Exzisions-Reparaturdefekt bei den beiden Kindern nachweisen. Darüber hinaus zeigte sich, dass sich nur nach Einbringen des XPC-Gens ein deutlicher Anstieg der Luciferasemenge ergab. Damit ist ein Defekt im XPC-

Abb. 4 Prinzip des Wirtszell-Reaktivierungs-Assays.

Gen bei den beiden Kindern bewiesen, und sie konnten der XP-Komplementationsgruppe C zugewiesen werden.

Die nachfolgende Messung der XPC mRNA Expression mittels quantitativer real-time PCR ergab eine um 66% reduzierte XPC mRNA Expression im Vergleich zu normalen Zellen. Dies beruht wohl auf dem Mechanismus des „nonsense mediated message decay“ und liegt in der erwarteten Größenordnung [10]. Mittels Western Blot Analyse war keine XPC-Protein-Expression bei den Patientenfibroblasten erkennbar.

Der exakte genetische Defekt wurde durch Basensequenzanalyse des XPC-Gens festgestellt. Hierbei ergab sich eine ungewöhnliche, homozygote, komplexe Insertions/Deletionsmutation innerhalb des Exon 9 des XPC-Gens. 12 Basen wurden deletiert und durch 25 neue Basen ersetzt. Das Interessante der Mutation ist, dass die reverse Wildtypsequenz Teil der neuen Insertion ist und dass diese Sequenz homolog zu einer Sequenz des X-Chromosoms ist. Damit war wohl ein Rekombinationsereignis Auslöser für diese ungewöhnliche Mutation.

Bedeutung von XP-Genpolymorphismen für die Hautkanzerogenese in der normalen Bevölkerung

Mit dem zweiten Studienbeispiel [11] soll aufgezeigt werden, wie Ergebnisse aus Genotypisierungsstudien von XP-Patienten wichtige Erkenntnisse für das Hautkrebsrisiko der allgemeinen, gesunden Bevölkerung liefern können [12]. Drei neue XPC-Genpolymorphismen konnten so entdeckt werden. Der PAT-Polymorphismus besteht aus einer Insertion von 83 Basen (nur As und Ts, Poly-AT) und liegt im Intron 9 des XPC-Gens. Ein weiterer Polymorphismus (A2920C) liegt im Exon 15 des XPC-Gens und führt zu einem Basenaustausch (Lys 939 Gln). Der dritte Polymorphismus C-6A liegt an der Splice-Akzeptorstelle des Intron 11, gerade einmal 6 Basen vor Beginn des Exon 12. Es konnte gezeigt werden, dass bei Vorliegen des „A“ vermehrt Exon 12 aus der XPC mRNA herausgespleit wird. Mit Hilfe des Wirtszell-Re-

Marker	Genotyp	Patienten (%)	Kontrollen (%)	OR	95 % CI	P-Wert
Int. 9 PAT	andere	242 (82,3)	352 (87,1)	1,87 ^a	1,10 – 3,19 ^a	0,022 ^a
	+/+	52 (17,7)	48 (12,9)			
Int. 11C-6A	andere	241 (82,2)	324 (86,9)	1,83 ^a	1,07 – 3,11 ^a	0,026 ^a
	A/A	52 (17,8)	49 (13,1)			
Ex. 15 A2920C	andere	241 (82,0)	323 (86,6)	1,82 ^a	1,07 – 3,08 ^a	0,026 ^a
	C/C	53 (18,0)	50 (13,4)			

^a Multivariate logistische Regressionsanalyse kontrolliert für Alter, Hauttyp und Anzahl der Muttermale mit exaktem 2-seitigen P-Wert.

Tab. 1 Ergebnisse der Populationsstudie mit deutlicher Assoziation des funktionsrelevanten XPC Haplotypes mit dem Risiko einer Melanomerkrankung in der Bevölkerung

aktivierungs-Assays konnte gezeigt werden, dass Zellen mit dem AA Genotyp eine verminderte Nukleotid-Exzisions-Reparaturfähigkeit besitzen [13]. Wir haben nun die Assoziation dieser 3 XPC-Polymorphismen mit dem Risiko der Melanomentwicklung bei 294 Melanompatienten und 375 gesunden Kontrollprobanden aus Deutschland untersucht. Es zeigte sich, dass die 3 Polymorphismen immer zusammen vorkommen, also auf einem Allel liegen müssen, im Kopplungsungleichgewicht zueinander liegen und einen Haplo- typ bilden. Außerdem lag die Frequenz des funktionsrelevanten Intron 11 – 6AA Haplotypes bei fast 40%. Es handelt sich also um einen sehr häufigen Polymorphismus in der Bevölkerung. Die statistische Auswertung, die für die in unserem Studienkollektiv identifizierten klinischen Melanomrisikofaktoren „Anzahl der Muttermale“, „Alter“ und „Hauttyp“ korrigierte, ergab eine signifikante Assoziation des funktionell relevanten Haplotypes mit dem Risiko einer Melanomerkrankung in der allgemeinen Bevölkerung ($p=0.026$). Das Risiko einer Melanomentwicklung war bei Vorliegen des Haplotypes fast verdoppelt (🔵 **Tab. 1**).

Hautkrebsvorsorge in der Bevölkerung

Im dritten und letzten Studienbeispiel soll aufgezeigt werden, wie derartige molekulare Genmarker in der Zukunft direkt in der Klinik eingesetzt werden können, zum Beispiel bei der Hautkrebsvorsorge in der Bevölkerung [14]. Wir haben einen Untersuchungsalgorithmus zur Muttermal- kontrolle entworfen (🔵 **Abb. 5**). Bei der Erstvorstellung wird

der Patient in eine von 3 Risikogruppen aufgrund klinischer Zeichen eingeteilt: multiple Nävi, atypisches Mole Syndrome und FAMMM (familiäre atypische Muttermale und multiple Melano- me). Dann erfolgt die Muttermalkontrolle mit dem bloßen Auge und der Standardauflichtmikroskopie (ELM). Unauffällige Mut- termale werden weiter kontrolliert und bei Melanomverdacht wird natürlich sofort exzidiert. Besteht kein Melanomverdacht, aber eine gewisse klinische Atypie des Muttermals, wird dieser Nävus einer weiteren Untersuchungstechnik zugeführt, der DELM (digitale Epilumineszenzmikroskopie) [15,16]. Hierbei wird ein Bild des Nävus in 20-facher Vergrößerung im Computer digital gespeichert. Der Patient wird in halb- oder ganzjährigen Abständen wieder einbestellt, zunächst befragt, ob er selbst Ver- änderungen an den Muttermalen bemerkt hat, und dann der Un- tersuchung mit dem bloßen Auge und der Auflichtmikroskopie zugeführt. Danach werden alle vormalis im Computer dokumen- tierten Nävi erneut aufgenommen. So kann ein Bildschirmver- gleich der alten und neuen Bilder auf einem Split-Screen erfol- gen. Dies eröffnet eine weitere Dimension der Nävuskontrolle, nämlich eine dynamische Kontrolle über einen Zeitraum [17,18]. Nävi, die eine definierte Dynamik zeigen [19,20], werden exzi- diert, die unveränderten Nävi werden weiter kontrolliert. Wir haben insgesamt 530 Patienten mit diesem Algorithmus untersucht und mehr als 7000 Nävi digital dokumentiert. Der mediane Beobachtungszeitraum pro Patient lag bei knapp 3 Jah- ren. Wir fanden, dass die DELM-Technik die Sensitivität der Me- lanomerkennung noch erhöhen konnte. Das heißt, wir fanden mit Hilfe der DELM noch zusätzliche Melanome. Darüber hinaus hat die DELM-Technik im Zusammenwirken mit den Standard-

Abb. 5 Untersuchungsalgorithmus zur Muttermalkontrolle.

untersuchungstechniken (bloßes Auge, Auflichtmikroskopie) auch die Spezifität der Melanomerkennung erhöht. Das heißt, wir mussten weniger häufig gutartige Muttermale entfernen. Melanome, die durch die DELM erkannt wurden, hatten die dünnste Tumordicke und damit die bessere Prognose. Und schlussendlich profitierten die Hochrisikopatienten am meisten von der DELM-Technik. Der Anteil der mit der DELM-Methode gefundenen Melanoma war bei den Patienten mit multiplen atypischen Nävi und familiären atypischen Nävi und multiplen Melanomen am höchsten. Wenn man bedenkt, dass dies nur eine grobe und ungenaue Risikoeinteilung alleine aufgrund von unsicheren klinischen Zeichen ist, wird klar, dass eine engere, genauere und spezifischere Risikogruppeneinteilung sehr wünschenswert wäre. Möglicherweise ließe sich durch die Addition von molekularen Risikomarkern wie dem vorgestellten XPC-Genpolymorphismus die Risikogruppe besser definieren. Dadurch müssten weniger Patienten der doch sehr zeitaufwendigen und damit kostenintensiven DELM-Technik zugeführt werden, was deren Effizienz deutlich steigern würde.

Danksagung

Der Autor wird von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt (EM 63/3 – 1 und GRK 1034).

Abstract

Xeroderma Pigmentosum

To honor the 75th birthday of Professor Dr. med. E. G. Jung a symposium was held at the University Clinic Mannheim. Prof. Dr. E. G. Jung is the pioneer of molecular-genetic xeroderma pigmentosum research in Germany. The lecture xeroderma pigmentosum highlighted the impact of molecular-genetic testing of xeroderma pigmentosum patients for risk evaluation of skin cancerogenesis in the general population.

Literatur

- 1 Emmert S, Leibel D, Runger TM. Syndromes with genetic instability: Model diseases for (skin) cancerogenesis. *JDDG* 2006; 4: 721 – 733
- 2 Thoms KM, Kuschal C, Emmert S. Lessons learned from DNA repair defective syndromes. *Exp Dermatol* 2007; 16: 532 – 544
- 3 Petit C, Sancar A. Nucleotide excision repair: from E. coli to man. *Biochimie* 1999; 81: 15 – 25
- 4 Leibel D, Laspe P, Emmert S. Nucleotide excision repair and cancer. *J Mol Histol* 2006; 37: 225 – 238
- 5 Emmert S, Wetzig T, Imoto K, Khan SG, Oh KS, Laspe P, Zachmann K, Simon JC, Kraemer KH. A Novel Complex Insertion/Deletion Mutation in the XPC DNA Repair Gene Leads to Skin Cancer in an Iraqi Family. *J Invest Dermatol* 2006; 126: 2542 – 2544
- 6 Bootsma D, Kraemer KH, Cleaver JE, Hoeijmakers JH. Nucleotide excision repair syndromes: xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome,

and trichothiodystrophy. In: Vogelstein B, Kinzler KW (eds). *The Genetic Basis of Human Cancer*. New York: McGraw-Hill, 2002

- 7 Jung EG, Bohnert E, Fischer E. Heterogeneity of xeroderma pigmentosum (XP); variability and stability within and between the complementation groups C, D, E, I and variants. *Photodermatol* 1986; 3: 125 – 132
- 8 Protic-Sabljic M, Kraemer KH. One pyrimidine dimer inactivates expression of a transfected gene in xeroderma pigmentosum cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82: 6622 – 6626
- 9 Emmert S, Slor H, Busch DB, Batko S, Albert RB, Coleman D, Khan SG, Abu-Libdeh B, DiGiovanna JJ, Cunningham BB, Lee MM, Crollick J, Inui H, Ueda T, Hedayati M, Grossman L, Shahavi T, Cleaver JE, Kraemer KH. Relationship of Neurologic Degeneration to Genotype in Three Xeroderma Pigmentosum Group C Patients. *J Invest Dermatol* 2002; 118: 972 – 982
- 10 Khan SG, Oh KS, Shahavi T, Ueda T, Busch DB, Inui H, Emmert S, Imoto K, Muniz-Medina V, Baker CC, Di Giovanna JJ, Schmidt D, Khadavi A, Metin A, Gozukara E, Slor H, Sarasin A, Kraemer KH. Reduced XPC DNA repair gene mRNA levels in clinically normal parents of xeroderma pigmentosum patients. *Carcinogenesis* 2006; 27: 84 – 94
- 11 Blankenburg S, König IR, Moessner R, Laspe P, Thoms KM, Krueger U, Khan SG, Westphal G, Berking C, Volkenandt M, Reich K, Neumann C, Ziegler A, Kraemer KH, Emmert S. Assessment of 3 xeroderma pigmentosum group C gene polymorphisms and risk of cutaneous melanoma: a case-control study. *Carcinogenesis* 2005; 26: 1085 – 1090
- 12 Wei Q, Lee JE, Gershenwald JE, Ross MI, Mansfield PF, Strom SS, Wang LE, Guo Z, Qiao Y, Amos CI, Spitz MR, Duvic M. Repair of UV light-induced DNA damage and risk of cutaneous malignant melanoma. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 308 – 315
- 13 Khan SG, Muniz-Medina V, Shahavi T, Baker CC, Inui H, Ueda T, Emmert S, Schneider TD, Kraemer KH. The human XPC DNA repair gene: arrangement, splice site information content and influence of a single nucleotide polymorphism in a splice acceptor site on alternative splicing and function. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: 3624 – 3631
- 14 Haenssle HA, Krueger U, Vente C, Thoms KM, Bertsch HP, Zutt M, Rosenberger A, Neumann C, Emmert S. Results from an observational trial: digital epiluminescence microscopy follow-up of atypical nevi increases the sensitivity and the chance of success of conventional dermoscopy in detecting melanoma. *J Invest Dermatol* 2006; 126: 980 – 985
- 15 Braun RP, Lemonnier E, Guillod J, Skaria A, Salomon D, Saurat JH. Two types of pattern modification detected on the follow-up of benign melanocytic skin lesions by digitized epiluminescence microscopy. *Melanoma Res* 1998; 8: 431 – 437
- 16 Carli P, de Giorgi V, Chiarugi A, Nardini P, Weinstock MA, Crocetti E, Stante M, Giannotti B. Addition of dermoscopy to conventional naked-eye examination in melanoma screening: a randomized study. *J Am Acad Dermatol* 2004; 50: 683 – 689
- 17 Robinson JK, Nickoloff BJ. Digital epiluminescence microscopy monitoring of high-risk patients. *Arch Dermatol* 2004; 140: 49 – 56
- 18 Schiffner R, Schiffner-Rohe J, Landthaler M, Stolz W. Long-term dermoscopic follow-up of melanocytic naevi: clinical outcome and patient compliance. *Br J Dermatol* 2003; 149: 79 – 86
- 19 Pehamberger H, Steiner A, Wolff K. In vivo epiluminescence microscopy of pigmented skin lesions. I. Pattern analysis of pigmented skin lesions. *J Am Acad Dermatol* 1987; 17: 571 – 583
- 20 Ascierto PA, Palmieri G, Celentano E, Parasole R, Caraco C, Daponte A, Chiofalo MG, Melucci MT, Mozzillo N, Satriano RA, Castello G. Sensitivity and specificity of epiluminescence microscopy: evaluation on a sample of 2731 excised cutaneous pigmented lesions. The Melanoma Cooperative Study. *Br J Dermatol* 2000; 142: 893 – 898