

Aus dem
Lehrstuhl für experimentelle Medizin und Therapieverfahren
Prof. Dr. med. Christoph Klein

Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

Identifikation und Genexpressions- analyse disseminierter Tumorzellen des malignen Melanoms

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Veronika Sophie Naimer
aus
Regensburg

Regensburg 2016

Aus dem
Lehrstuhl für experimentelle Medizin und Therapieverfahren
Prof. Dr. med. Christoph Klein

Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

Identifikation und Genexpressions- analyse disseminierter Tumorzellen des malignen Melanoms

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Veronika Sophie Naimer
aus
Regensburg

Regensburg 2016

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Christoph Klein

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Mark Berneburg

Tag der mündlichen Prüfung: 29.11.2016

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Das maligne Melanom.....	1
1.1.1	Epidemiologie und Ätiologie	1
1.1.2	Morphologie	3
1.1.3	Metastasierung	4
1.1.4	Klassifikation.....	4
1.1.5	Diagnostik und Therapie	6
1.1.6	Nachsorge.....	9
1.1.7	Prognose.....	9
1.2	Die melanozytäre Zelllinie in normaler Entwicklung und maligner Entartung	11
1.2.1	Entwicklung von Melanozyten	11
1.2.2	Melanozytäre Stammzellen.....	12
1.2.3	Stammzellen beim Malignen Melanom	12
1.2.4	Differenzierte Zellen beim Malignen Melanom.....	15
1.3	Melanoma-associated Chondroitin Sulfate Proteoglycan	16
2	Material und Methoden	20
2.1	Kooperationspartner.....	20
2.2	Methoden	20
2.2.1	Aufarbeitung der Gewebeprobe.....	20
2.2.2	Immunzytochemische Färbung.....	21
2.2.3	Isolierung einzelner Tumorzellen.....	22
2.2.4	Globale Genomamplifikation von Adhäsions-Objektträgern isolierter Zellen ..	24
2.2.5	Kontroll-PCR	25
2.2.6	Agarose-Gelelektrophorese	26
2.2.7	Isolierung und globale Amplifikation von mRNA und DNA.....	26
2.2.8	Globale Genomamplifikation	29
2.2.9	Etablierung der PCR zum Nachweis spezifischer Markergene.....	30
2.2.10	PCR zum Nachweis der Expression spezifischer Markergene.....	30
2.2.11	Statistische Berechnungen	31
2.3	Verwendete Materialien	31

2.4	Verwendete Abkürzungen.....	35
3	Ergebnisse.....	37
3.1	Patienten	37
3.2	Aufarbeitung der Gewebeproben.....	39
3.2.1	Indirekte Immunfluoreszenzfärbung zum Nachweis des Oberflächenantigens MCSP auf disseminierten Tumorzellen	39
3.2.2	Nachweis gestreuter Tumorzellen durch die Immunzytochemische Färbung zum Nachweis des Antigens HMB-45	43
3.2.3	Vergleich der Ergebnisse aus Immunfluoreszenz und Immunzytochemie mit der Routinediagnostik in der Abteilung für Pathologie	46
3.2.4	Zusammenhang von Patientencharakteristika mit den Ergebnissen aus Pathologie, Immunfluoreszenzfärbung und Immunzytochemie	50
3.3	Isolation disseminierter Tumorzellen, reverse Transkription der mRNA und Einzelzell-PCR	52
3.3.1	Isolation MCSP-positiver Zellen zur Analyse von Transkriptom und Genom	52
3.3.2	Isolation und globale Genomamplifikation von HMB-45-positiven Zellen.....	57
3.4	Analyse der Expression ausgewählter melanomspezifischer Markergene durch PCR.....	58
3.4.1	Analyse histogenetischer Markertranskripte zur Überprüfung der Herkunft und Malignität isolierter MCSP-positiver Zellen.....	58
3.4.2	Expressionsnachweis typischer Stammzellmarkergene als Hinweis für das maligne Potential MCSP-positiver Zellen	65
3.4.3	Expressionsmuster der untersuchten Markergene	68
3.4.4	Bestimmung von Kriterien zum Ausschluss nicht-melanomverdächtiger MCSP-positiver Zellen	69
4	Diskussion.....	75
4.1	Immunfluoreszenzfärbung	75
4.2	MCSP-positive Zellen mit unterschiedlicher Morphologie	76
4.3	Ausbreitung von Tumorzellen und Bildung von Lymphknotenmetastasen	77
4.4	Expression von Markergenen bei MCSP-positiven Zellen.....	79
4.5	Unspezifische Färbung nicht-maligner Zellen durch die MCSP-Färbung.....	83

5	Zusammenfassung	86
6	Literaturverzeichnis.....	89

1 Einleitung

1.1 Das maligne Melanom

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Das maligne Melanom ist eine bösartige Krebserkrankung, die sich aus entarteten Pigmentzellen entwickelt. Die häufigste Lokalisation des malignen Melanoms ist die Dermis, selten treten Melanome jedoch auch im Bereich der Hirnhäute, der Bindehaut und Aderhaut des Auges sowie auf Schleimhäuten auf. Obwohl das maligne Melanom bei Weitem nicht so häufig auftritt wie Basalzell- und spinözelluläre Karzinome, sind nahezu 90 % aller hautkrebsbedingten Todesfälle dem Melanom zuzuschreiben (Riker, Zea, & Trinh, 2010).

Seit 1980 stieg die Inzidenz des Schwarzen Hautkrebs in Deutschland um mehr als das Dreifache des Ausgangswertes, während die Sterberaten jedoch nahezu konstant blieben. Mit einer Inzidenz von 22,1 neuerkrankten Männern auf 100.000 und 21,2 neuerkrankten Frauen auf 100.000 pro Jahr beträgt der Anteil maligner Melanome an allen bösartigen Neubildungen bei Männern 3,6 % und bei Frauen 4,0 %. Somit stellt das maligne Melanom bei Frauen die fünfthäufigste Tumorentität dar, bei Männern steht der Schwarze Hautkrebs an achter Stelle. Etwa 1 % aller krebsbedingten Todesfälle ist auf den Schwarzen Hautkrebs zurückzuführen. Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt bei Frauen (60 Jahre) etwas niedriger als bei Männern (66 Jahre) (Robert Koch Institut, 2012). Die Inzidenz des malignen Melanoms unterscheidet sich nach Bevölkerungsgruppe und Region. Hellhäutige Personen sind häufiger betroffen als Zugehörige lateinamerikanischer (4,68/100.000), asiatischer (1,46/100.000) und afroamerikanischer Bevölkerungsgruppen (1,04/100.000) (Wu et al., 2011). Mit 41,1 (Frauen) und 55,8 (Männer) Neuerkrankungen auf 100.000 Einwohner besteht die höchste Inzidenz des Melanoms in Australien (Aceituno-Madera, Buendia-Eisman, Arias-Santiago, & Serrano-Ortega, 2010).

Es gibt zahlreiche Faktoren, die zu einem erhöhten Risiko führen, an malignem Melanom zu erkranken. Der wichtigste Umweltfaktor, der zur Entstehung eines Melanoms beitragen kann, ist UV-Strahlung. Personen, die in unregelmäßigen Abständen starker UV-Strahlung ausgesetzt sind, weisen ein erhöhtes Risiko auf, ein Melanom

zu entwickeln (MacKie & Aitchison, 1982) (Elwood & Gallagher, 1998). Sowohl UVA- als auch UVB-Strahlung führen durch die Bildung von Pyrimidin-Dimeren in der Basensequenz der DNA zu Mutationen im Erbgut der Zellen (Ravanat, Douki, & Cadet, 2001), (Mouret et al., 2006). Ebenfalls wurde beobachtet, dass der Schwarze Hautkrebs gehäuft bei Personen auftritt, die in der Kindheit häufig starke Sonnenbrände erlitten (Green, Siskind, Bain, & Alexander, 1985; Weinstock et al., 1989). Dies führt zu der Annahme, dass bestimmte Verhaltensweisen, wie ausgeprägtes Sonnenbaden sowie die Benutzung von Solarien zu dem starken Anstieg der Melanominzidenz in den letzten Jahrzehnten geführt hat (MacKie, 1983).

Eine erhöhte Inzidenzrate lässt sich nachweisen bei Personen mit heller Haut, roten oder blonden Haaren und blauen Augen, die zu Sonnenbrand neigen und sich unter UV-Einwirkung kaum bräunen (Rifkin et al., 1988). Obwohl sich der Schwarze Hautkrebs meist auf gesunder Haut und nur in etwa 25 % der Fälle aus schon bestehenden Vorläuferläsionen bildet (Bevona, Goggins, Quinn, Fullerton, & Tsao, 2003), entwickeln Personen mit multiplen (>50), atypischen oder kongenitalen Nävi häufiger diese Krankheit (Holly, Kelly, Shpall, & Chiu, 1987) (Grob et al., 1990).

Das gehäufte Auftreten maligner Melanome in manchen Familien deutet auf eine genetische Komponente in der Entstehung des Schwarzen Hautkrebs hin. Das Syndrom der dysplastischen Nävi (Familial Atypical Multiple Mole-Melanoma Syndrome) ist charakterisiert durch eine hohe Anzahl melanozytärer Nävi, darunter mehrere atypische Nävi (Durchmesser > 6 mm, unregelmäßige Färbung, raue Oberfläche, keine scharfe Begrenzung (Cyr, 2008)), und einem gehäuften Auftreten maligner Melanome in der Familie (mindestens zwei Familienangehörige ersten Grades). Als Ursache wurde eine Mutation des Zellzyklusregulators CDKN2A (p16) identifiziert (Bishop, Harland, Randerson-Moor, & Bishop, 2007). Bezogen auf alle Fälle von Schwarzem Hautkrebs macht die erbliche Form einen geringen Anteil von 5 – 10 % aus (de Snoo et al., 2007).

1.1.2 Morphologie

Es existieren vier Unterformen des malignen Melanoms, die sich in Entwicklung, Verhalten und Aussehen der malignen Läsion unterscheiden: das superfiziell spreitende Melanom, das noduläre Melanom, das Lentigo-maligna-Melanom sowie das akro-lentiginöse Melanom. Amelanotische Melanome, Schleimhaut- oder extrakutane Melanome stellen klinische Sonderfälle dar und machen etwa 5 % aller Melanome aus (Barnhill & Mihm, 1993).

Superfiziell spreitendes Melanom

Das superfiziell spreitende Melanom ist mit 65 % die häufigste Unterform des malignen Melanoms (Barnhill & Mihm, 1993). Es zeigt scharf begrenzte Ränder, ist jedoch teilweise auch unregelmäßig geformt mit Einziehungen oder halbinselförmigen Ausläufern. Durch seine erhabene, ungleichmäßige Oberfläche ist ein superfiziell spreitendes Melanom meist leicht tastbar. Gelegentlich sind auf der Oberfläche gräuliche Tumorknötchen sichtbar. Typisch ist die inhomogene Pigmentierung. Lokalisiert ist das superfiziell spreitende Melanom bei Männern meist am Rumpf und bei Frauen an den Beinen (Clark, From, Bernardino, & Mihm, 1969).

Noduläres Melanom

Die zweithäufigste (20 %) Form des malignen Melanoms ist das noduläre Melanom (Barnhill & Mihm, 1993). Von den vier Unterformen des malignen Melanoms entwickelt es sich am schnellsten und neigt zur frühen Metastasierung. Kennzeichnend für das noduläre Melanom ist eine einheitliche dunkle blauschwarze Färbung der konvex über das Hautniveau erhabenen Läsion (Clark, et al., 1969). Es tritt sowohl an sonnenexponierten wie auch an unexponierten Hautarealen und Schleimhäuten auf (McGovern et al., 1973).

Lentigo-maligna-Melanom

Das Lentigo-maligna-Melanom wird leicht verwechselt mit einem superfiziell spreitenden Melanom. Es ist jedoch gänzlich irregulär begrenzt und nicht über die Epidermis erhaben (Clark, et al., 1969). Das Lentigo-maligna-Melanom entwickelt sich über eine lange Zeitspanne von 5 bis 15 Jahren (Krementz et al., 1982) an sonnenexponierter Haut wie Gesicht, Hals und Extremitäten aus einer Vorgängerläsion, der Lentigo maligna, die eine obligate Präkanzerose darstellt (McGovern, et al., 1973).

Akro-lentiginöses Melanom

Die vierte Untergruppe des malignen Melanoms bildet das akro-lentiginöse Melanom, welches an Fuß- und Handtellern sowie im Bereich von Finger- und Zehennägeln auftritt. Die Entstehung beruht nicht auf einem aktinischen Schaden der Haut. Angehörige stark pigmentierter Bevölkerungsgruppen sind häufiger von akro-lentiginösen Melanomen betroffen als hellhäutige (Krementz, et al., 1982).

1.1.3 Metastasierung

Das maligne Melanom metastasiert schon frühzeitig sowohl lymphogen als auch hämatogen. Bei 50,2 % aller Patienten mit Metastasierung treten zunächst regionäre Lymphknotenmetastasen auf. 21,7 % der Patienten entwickeln Metastasen in Form von Satellitenmetastasen (in einem Umfang von 2 cm um den Primärtumor) oder In-transit-Metastasen (zwischen Primärtumor und der ersten regionären Lymphknotenstation) und bei 28,1 % können primär Fernmetastasen diagnostiziert werden (Meier et al., 2002). Hämatogen metastasiert das maligne Melanom in nahezu alle Organe, am häufigsten betroffen sind jedoch Lunge (18 – 36 %), Gehirn (12 – 20 %), Leber (14 – 20 %) und Knochen (11 – 17 %) (Tas, 2012).

1.1.4 Klassifikation

Um Patienten mit malignem Melanom in ein Behandlungsschema einordnen zu können, wurden die TNM-Klassifikation sowie eine Stadieneinteilung erstellt. Therapeutische Optionen und auch die Prognose der Patienten hängen stark von diesen Einteilungen ab.

Die derzeit gültige TNM-Klassifikation für das maligne Melanom wurde im Jahre 2009 vom American Joint Committee on Cancer (AJCC) veröffentlicht (Balch et al., 2009) (siehe Tabelle 1.1).

Tabelle 1.1 TNM-Klassifikation des Primärtumors bei malignem Melanom

T-Kategorie	Tumordicke	weitere prognostische Parameter
Tis		Melanom in Situ, kein invasives Wachstum
T1	≤ 1,00 mm	a) keine Ulzeration, Mitoserate <1/mm ² b) Ulzeration oder Mitoserate ≥1/mm ²
T2	1,01 mm – 2,00 mm	} a) keine Ulzeration b) mit Ulzeration
T3	2,01 mm – 4,00 mm	
T4	> 4,00 mm	

N-Kategorie	Anzahl befallener Lymphknoten	Ausmaß der Metastasierung
N0	keine Lymphknotenmetastasen	
N1	1	a) ausschließlich mikroskopische Metastase(n), klinisch okkult b) makroskopische Metastase(n), klinisch feststellbar
N2	2 – 3	a) Mikrometastase(n) b) Makrometastase(n) c) In-transit-Metastase(n) oder Satelliten-Metastase(n) ohne regionäre Lymphknotenmetastasen
N3	≥ 4 oder verbackene Lymphknoten oder In-transit-Metastase(n) oder Satellitenmetastase(n) mit regionären Lymphknotenmetastasen	

M-Kategorie	Art der Fernmetastasen
M0	keine Fernmetastasen
M1a	Metastase(n) in Haut, Subkutis oder Lymphknoten jenseits der regionären Lymphknoten
M1b	Lungenmetastase(n)
M1c	Fernmetastase(n) anderer Lokalisation oder Fernmetastase(n) jeder Lokalisation mit erhöhten Serumwerten der LDH

Die derzeit gültige Stadieneinteilung wurde im Rahmen der Erstellung der TNM-Klassifikation vom AJCC vorgeschlagen und von der Union for International Cancer Control (UICC) akzeptiert (siehe Tabelle 1.2).

Tabelle 1.2 Stadieneinteilung des malignen Melanoms

Stage	T	N	M
0	Tis	N0	M0
IA	T1a	N0	M0
IB	T1b	N0	M0
IIA	T2a	N0	M0
	T2b	N0	M0
	T3a	N0	M0
IIB	T3b	N0	M0
	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
IIIA	T1-T4a	N1a	M0
	T1-T4a	N2a	M0
IIIB	T4b	N1a	M0
	T4b	N2a	M0
	T1-T4a	N1b	M0
	T1-T4a	N2b	M0
	T1-T4a	N2c	M0
IIIC	T4b	N1b	M0
	T4b	N2b	M0
	T4b	N2c	M0
VI	Alle T	N3	M0
	Alle T	Alle N	M1

1.1.5 Diagnostik und Therapie

Klinische Untersuchung

Am Anfang der Diagnostik des malignen Melanoms steht die klinische Untersuchung. Eine gängige Methode, suspekta Pigmentmale zu beurteilen, ist die ABCD-Regel (A- Asymmetrie, B- Begrenzung unregelmäßig, C- Colorit inhomogen und D- Durchmesser > 5 mm), die bereits 1985 etabliert wurde (Friedman, Rigel, & Kopf, 1985). Mithilfe der Dermatoskopie können Hautläsionen durch eine Lupe vergrößert dargestellt werden (Menzies & Zalaudek, 2006). Durch dieses Verfahren wird eine größere Genauigkeit der Melanomdiagnostik gewährleistet (Bafounta, Beauchet, Aegerter, & Saiag, 2001).

Exzision und histologische Untersuchung

Der nächste Schritt in der Diagnostik des malignen Melanoms ist die komplette Exzision der verdächtigen Läsion, um eine histologische Untersuchung zu ermöglichen. Dabei sollten möglichst sowohl die seitlichen Ränder wie auch der Absetzungsrand in der Tiefe im Gesunden liegen. Empfohlen wird ein seitlicher Sicherheitsabstand von 2 mm, in der Tiefe sollte der Exzisionsrand im Fettgewebe liegen. Histologisch wird

die Diagnose malignes Melanom gesichert, der Melanomtyp bestimmt sowie die Einordnung in die T-Klassifikation vorgenommen.

Nach Abschluss der histologischen Diagnostik, besonders wenn primär nur eine Teilrezektion vorgenommen worden war, sollte eine Nachrezektion erfolgen, die Sicherheitsabstände dabei variieren je nach Tumordicke. In einer R1 (mikroskopischer Residualtumor) oder R2 (makroskopischer Residualtumor) Situation sollte nachreseziert werden, wenn dadurch tumorfreie Ränder erreicht werden können. Ist eine operative Therapie nicht möglich, so besteht die Möglichkeit der Radiotherapie des Primärtumors (Malignes Melanom, S3-Leitlinie).

Ausbreitungsdiagnostik

Als weiterführende Untersuchungen zur Ausbreitungsdiagnostik stehen je nach Stadium unterschiedliche Möglichkeiten zur Verfügung. Bis zum Stadium IIB werden eine Ganzkörperuntersuchung, Palpation aller Lymphabstromgebiete sowie Lymphknotenstationen, Sonographie regionärer Lymphknoten sowie die Bestimmung des Tumormarkers S100B durchgeführt. In Stadium IIC bis IIIC treten ein MRT Kopf, eine Schnittbildgebung (vorzugsweise PET/CT) des gesamten Körpers ohne Kopf und die Bestimmung des Tumormarkers LDH dazu. Ab Stadium IV werden zusätzlich eine Abdomensonographie sowie eine Skelettszintigraphie empfohlen (Malignes Melanom, S3-Leitlinie).

Entfernung des Wächterlymphknotens

Der Wächterlymphknoten ist der erste Lymphknoten im Abstromgebiet des Tumors und filtert somit als erste Station gestreute Tumorzellen. Eine regionäre Lymphknotenmetastasierung kann schon in frühen Stadien des malignen Melanoms auftreten und ist prognostisch ungünstig (Balch et al., 2001) (Morton, Wanek, Nizze, Elashoff, & Wong, 1991). Die Etablierung der Entnahme des Wächterlymphknotens hat ermöglicht, Patienten initial eine komplette Lymphadenektomie zu ersparen und die damit verbundenen Komplikationen zu vermindern (Kretschmer et al., 2008). Gleichzeitig bedeutet es für die Patienten im Gegensatz zu einer rein klinischen Überwachung der Lymphabflussgebiete einen Überlebensvorteil (Morton et al., 2006). Ab einer Tumordicke von ≥ 1 mm sollte leitliniengerecht der Wächterlymphknoten entfernt werden, wenn kein klinischer Hinweis auf Metastasierung vorliegt. Ebenso bei dünneren Primärtumoren, wenn Risikofaktoren bestehen (Ulzeration des Primärtumors, erhöhte

Mitoserate, jüngeres Lebensalter < 40 Jahre). Die Wächterlymphknotenbiopsie ist ein kleiner operativer Eingriff. Dabei wird der Lymphabflussweg des Primärtumors durch Lymphoszintigraphie mittels radioaktiv markierter Tracer dargestellt und der Wächterlymphknoten mit einer Gammasonde intraoperativ aufgesucht (Alazraki, Glass, Castronovo, Olmos, & Podoloff, 2002). In manchen Fällen existieren auch mehrere Wächterlymphknoten, die dann alle intraoperativ entfernt werden. Die präoperative Injektion eines lymphgängigen Farbstoffs erleichtert zusätzlich das Auffinden des Wächterlymphknotens. Nach Entfernung sollte der Wächterlymphknoten histopathologisch beurteilt werden. Hierbei werden zusätzlich zu Hämatoxylin-Eosin-Färbungen von Gewebeschnitten immunhistochemische Färbungen mit den Antikörpern HMB-45, S100B und Melan-A durchgeführt. Beim Fund von Melanomzellen werden zusätzlich prognostisch wichtige Parameter (Eindringtiefe von Melanomzellen in das Lymphknotenparenchym, Lymphknotenkapselinfiltration und -durchbruch und Lymphangiosis carcinomatosa) und der größte Durchmesser der Mikrometastase angegeben (Malignes Melanom, S3-Leitlinie).

Lymphadenektomie

Die Lymphadenektomie beim malignen Melanom findet immer in therapeutischer und nicht in prophylaktischer Absicht statt. Der Nachweis einer lymphogenen Metastasierung kann dabei zytologisch, histologisch, durch Lymphknotensonographie, CT oder PET/CT erfolgen. Wurde im Wächterlymphknoten eine Mikrometastase nachgewiesen, so sollte je nach Tumorlast und nach Beurteilung weiterer Risikofaktoren wie Tumordicke, Ulzeration, Mitoserate, Anzahl positiver Wächterlymphknoten und Lokalisation des Primärtumors ebenfalls eine komplettierende Lymphadenektomie vorgenommen werden.

Therapeutisches Vorgehen bei Satelliten-, In-transit-, und Fernmetastasen

Die operative Entfernung sollte erfolgen, wenn eine R0-Resektion technisch möglich ist und keine gravierenden funktionellen Defizite bedingt. Eine geringe Anzahl an Metastasen sowie ein langes metastasenfreies Intervall stellen günstige Voraussetzungen für ein operatives Vorgehen dar (Malignes Melanom, S3-Leitlinie). Liegt eine BRAF- oder c-KIT-Mutation vor, so steht eine medikamentöse Therapie mit spezifischen Inhibitoren (BRAF: Vemurafenib, c-KIT: Imatinib) zur Verfügung (Chapman et al., 2011) (Guo et al., 2011). Eine weitere therapeutische Möglichkeit im Stadium IV

stellt die Immuntherapie mit dem monoklonalen Antikörper Ipilimumab dar (Hodi et al., 2010). Ist die Tumormetastase irresektabel, kann eine Chemotherapie zum Einsatz kommen, in ausgewählten Fällen auch eine lokale Radiotherapie. Je nach Lokalisation der Metastasen stehen auch noch weitere Therapien zur Verfügung, wie zum Beispiel Bisphosphonate bei Knochenmetastasen (Malignes Melanom, S3-Leitlinie).

Adjuvante Therapiemöglichkeiten

Eine adjuvante Bestrahlung des Lymphabflussgebietes nach Lymphadenektomie führt zu einer verbesserten postoperativen Tumorkontrolle, weist jedoch auch toxische Nebenwirkungen auf (Bibault, Dewas et al. 2011). Ebenfalls in der adjuvanten Therapie eingesetzt wird Interferon-alpha (Molife & Hancock, 2002). Durch den Einsatz von pegyliertem Interferon-alpha kann ein verlängertes rezidivfreies Überleben bei Patienten im Stadium III erreicht werden (Eggermont et al., 2008). Dennoch werden durch die systemischen Therapiemöglichkeiten des metastasierten malignen Melanoms keine zufriedenstellenden Erfolge erzielt, sodass die Entwicklung neuer Therapiestrategien von besonderer Bedeutung ist.

1.1.6 Nachsorge

Im Rahmen der Nachsorge, die beim malignen Melanom über 10 Jahre erfolgen sollte, werden je nach Stadium eine körperliche Untersuchung, eine Lymphknotenultraschalluntersuchung, eine Bestimmung des Tumormarkers S100B und eine Schnittbildgebung durchgeführt. Die Selbstuntersuchung wird auch über diese 10 Jahre hinweg empfohlen (Malignes Melanom, S3-Leitlinie).

1.1.7 Prognose

Das prognostisch wichtigste Kriterium stellt beim malignen Melanom bezüglich der T-Klassifikation die Tumordicke dar. Im klinischen Alltag wird dafür die Tumordicke nach Breslow angegeben (siehe Tabelle 1.3). Weitere, jedoch nicht so aussagekräftige prognostische Faktoren sind die Eindringtiefe in das Gewebe (Clarks Level, siehe Tabelle 1.4) sowie die Ulzeration des Primärtumors (Balch et al., 1978).

Tabelle 1.3 Tumordicke nach Breslow

Tumordicke nach Breslow

I	(< 0,75 mm)
II	(0,76 mm - 1,5 mm)
III	(1,51 mm - 4,0 mm)
IV	(> 4,0 mm)

Tabelle 1.4 Eindringtiefe nach Clark

Eindringtiefe nach Clark

1	Basalmembran intakt, entspricht einem Tumor in situ
2	Durchbruch der Basalmembran, Infiltration des Stratum papillare
3	Infiltration des gesamten Stratum papillare bis hin zur Grenze des Stratum reticulare
4	Infiltration des Stratum reticulare
5	Infiltration des subcutanen Fettgewebes

Im Rahmen der N-Klassifikation ist ein tumorzellbefallener Wächterlymphknoten prognostisch ungünstig. Weiterhin ist eine hohe Anzahl metastatisch befallener Lymphknoten mit einem signifikanten Überlebensnachteil assoziiert, ebenso wie das Auftreten klinisch apparenter Lymphknotenmetastasen. Bezüglich der M-Klassifikation haben Patienten mit viszerale Metastasen sowie einem erhöhten Serumwert der LDH eine ungünstige Prognose (Balch, et al., 2001).

Das 5-Jahres-Überleben von Patienten mit malignem Melanom ist stark vom initialen Tumorstadium abhängig (siehe Tabelle 1.5) (Balch, et al., 2009).

Tabelle 1.5 5-Jahres-Überlebensraten gemäß Tumorstadium

Stadium	Prozentualer Anteil
I	> 90 %
II	53 - 79 %
III	40 - 78 %
VI	< 20 %

1.2 Die melanozytäre Zelllinie in normaler Entwicklung und maligner Entartung

1.2.1 Entwicklung von Melanozyten

Beim Menschen sind Melanozyten größtenteils in der Epidermis sowie in den Haarfollikeln zu finden. Während der Embryonalzeit entwickeln sich Melanoblasten, Vorläuferzellen der Melanozyten, aus SOX10 exprimierenden Progenitorzellen des Neuroektoderms. Melanoblasten zeichnen sich zusätzlich zur Expression des Transkriptionsfaktors SOX10 durch die Bildung von MITF (Microphthalmia-assoziiertes Transkriptionsfaktor), dem Enzym TRP2 (Dopachromtautomerase) und dem Stammzellfaktorrezeptor c-KIT (CD117) aus. Differenzierung sowie Proliferation von Melanozyten werden über einen aktiven Wnt-Signalweg reguliert (Ikeya, Lee, Johnson, McMahon, & Takada, 1997). Während der Migration zu ihrem Bestimmungsort in der Epidermis entwickeln sich die Melanoblasten zu TRP2 und TYR (Tyrosinase) positiven Melanozyten.

In der Epidermis erfolgt schließlich die Reifung zu differenzierten, Melanin produzierenden Melanozyten. Ausdifferenzierte Melanozyten stellen eine sehr stabile, kaum proliferierende Zellpopulation dar.

In der Histologie weisen Melanozyten eine ovale oder fusiforme dendritische Zellform auf. Melanozyten sind kleiner als die umgebenden Keratinozyten. Im Zytoplasma befinden sich die Melanin-produzierenden Zellorganellen, die Melanosomen (Seiji & Fitzpatrick, 1961). Es existieren zwei Arten von Melanin: Pheomelanin, das gelb bis rötlich erscheint, sowie das bräunlich-schwarze Eumelanin.

Durch das Enzym Tyrosinase wird Tyrosin über die Zwischenstufe DOPA zu DOPAquinon umgewandelt. Ist Cystein vorhanden, so erfolgt die Synthese von Pheomelanin. Ist kein Cystein vorhanden, so erfolgt über Zwischenschritte, katalysiert durch die Enzyme TRP2 und TRP1, die Synthese von Eumelanin (Simon, Peles, Wakamatsu, & Ito, 2009).

1.2.2 Melanozytäre Stammzellen

Ein geringer Anteil der Melanoblasten entdifferenziert durch den Verlust der MITF- und c-KIT-Expression und bildet eine Population melanozytärer Stammzellen, die sich im Bereich des Haarfollikels (Baxter, Moreland, Nguyen, Wolfsberg, & Pavan; Nishimura, 2011) sowie im Bereich der Schweißdrüsen (Okamoto et al., 2014) einnistet. Diese Zellen erreichen durch die Expression von TGF β (Tumor Growth Factor β) einen Ruhezustand, gekennzeichnet durch die Inhibition von Differenzierungsgenen sowie durch eine Bcl2-abhängige Verzögerung des Zellzyklus (Nishimura et al., 2010). Melanozytäre Stammzellen zeichnen sich durch eine geringe Transkriptionsrate aus (Freter, Osawa, & Nishikawa, 2010). Im Gegensatz zu differenzierenden Melanozyten ist bei melanozytären Stammzellen die Signalübertragung durch Wnt unterdrückt (Osawa et al., 2005). Melanozytäre Stammzellen können bei Bedarf, wie zum Beispiel nach Verletzung der Haut oder auch nach UV-bedingten Strahlenschäden, zu ausdifferenzierten Melanozyten reifen und mit der Melaninsynthese beginnen (Cui, Shen, & Wang, 1991).

1.2.3 Stammzellen beim Malignen Melanom

Die Identifikation von Tumorstammzellen, einer Population von Tumorzellen, die die Fähigkeit zur Selbsterneuerung sowie zur Zelldifferenzierung besitzen (Reya, Morrison, Clarke, & Weissman, 2001), eröffnete neue Perspektiven zum Verständnis der Tumorentwicklung sowie neue Angriffspunkte der Krebstherapie. Tumorstammzellen wurden zunächst bei hämatologischen Tumorentitäten identifiziert (Bonnet & Dick, 1997; Lapidot et al., 1994). Inzwischen konnten Tumorstammzellen bei Brust- (Al-Hajj, Wicha, Benito-Hernandez, Morrison, & Clarke, 2003), Pankreas- (Li et al., 2007), Colon- (Dalerba et al., 2007; O'Brien, Pollett, Gallinger, & Dick, 2007; Ricci-Vitiani et al., 2007), Spindelzell- (Prince et al., 2007), Gehirn- (Kondo, Setoguchi, & Taga, 2004; Singh et al., 2003) und Lungencarcinomen (Ho, Ng, Lam, & Hung, 2007) nachgewiesen werden. Auch beim malignen Melanom wurden Subpopulationen von Zellen identifiziert, die die Möglichkeit zur Selbsterneuerung und Zelldifferenzierung besitzen. Diese Zellen exprimieren bestimmte zelluläre Marker, durch die sie identifiziert werden können.

Zu den Markern für Tumorstammzellen des Malignen Melanoms zählen die membranständigen Marker CD20 (Schmidt et al.), CD133 (Rappa, Fodstad, & Lorico) und CD166 (Swart, Lunter, Kilsdonk, & Kempen, 2005).

Auch ABCB5, ein Mitglied der Familie ATP-bindender transmembraner Transporter, wurde bei Stammzellen des Malignen Melanoms gefunden. Bei ABCB5 handelt es sich um ein Transmembranprotein mit zwölf Transmembrandomänen, das Zellen des malignen Melanoms in einem signifikant höheren Ausmaß bilden als normale melanozytäre Zellen. Lymphknotenmetastasen bilden mehr ABCB5 als Primärtumore (Schatton et al., 2008). ABCB5, das in normalen Zellen das Membranpotential bestimmt und Zellfusionen reguliert, steht beim Melanom in Verbindung mit der Resistenz gegen das Chemotherapeutikum Doxorubicin. Durch ABCB5 kommt es zu einer erhöhten Ausschleusung dieses Medikaments aus der Zelle (Frank et al., 2005). ABCB5 tritt auch in gutartigen Vorläuferzellen der Haut auf und zeigt in diesen Zellen eine Korrelation zur Expression des Stammzellmarkers CD133 (Frank et al., 2003).

Weiterhin wurde bei Zellen des Malignen Melanoms ein Zusammenhang der Expression von ABCB5 mit der Expression des Intermediärfilaments Nestin aufgezeigt (Schatton, et al., 2008). Nestin, ein Klasse VI Intermediärfilament, ist bekannt als Marker neuronaler Stammzellen. Zellen des Neuroektoderms exprimieren Nestin während der Entwicklung, weswegen Nestin als Marker für Proliferation und Migration gilt (Lendahl, Zimmerman, & McKay, 1990). In ausdifferenzierten Zellen wird die Expressionsrate von Nestin abgesenkt, jedoch wurde gezeigt, dass es beim malignen Melanom zur Re-Expression von Nestin kommt (Brychtova, Fiuraskova, Hlobilkova, Brychta, & Hirnak, 2007; Ehrmann, Kolar, & Mokry; Florenes, Holm, Myklebost, Lendahl, & Fodstad, 1994; W. M. Klein et al., 2007). In einer Studie an Zelllinien wurden Zellen mit einem stammzellähnlichen Erscheinungsbild identifiziert, die eine Korrelation mit der Expression des Antigens Nestin aufwiesen (Grichnik et al., 2006).

Ein weiterer Marker von Tumorstammzellen des Malignen Melanoms ist CD271 (Low-affinity nerve growth factor receptor, LNGFR). CD271 befindet sich auf der Oberfläche von Zellen ektodermalen Ursprungs und dient als Rezeptor für Nervenzellwachstumsfaktoren, die die neuronalen Zellen zu Wachstum und Differenzierung anregen. Weiterhin charakterisiert CD271 eine Zellpopulation, die in xenotransplantierten Mäusen zur Tumorbildung führt. Auch sind CD271-positive Zellen für ein stetes Tumorzellwachstum nötig (Civenni et al., 2011). Es wurde weiterhin gezeigt, dass CD271-positive Zellen eine Zellpopulation hervorbringen, die fähig ist zur Bildung von Metastasen (Boiko et al., 2010).

Auch die Histondemethylase Jarid1B (Jumonji AT-rich interactive domain 1B) wurde als Marker bei stammzellähnlichen Zellen des Malignen Melanoms beschrieben. Die Expression von Jarid1B führt zu einer positiven Zellzykluskontrolle, somit wirkt Jarid1B möglicherweise gleichzeitig als Tumorsuppressor (Roesch et al., 2006; Roesch et al., 2008). Einzelne Jarid1B-positive Zellen stellen in Metastasen eine langsam proliferierende Zellpopulation dar, die jedoch spontan die Jarid1B Expression reduzieren und in einen Zustand rascher Proliferation eintreten kann. Dadurch können diese langsam proliferierenden Zellen auf lange Zeit gesehen das Tumorstadium erhalten. Eine strenge Hierarchie im Sinne des Krebsstammzellmodells lässt sich bei der Expression von Jarid1B nicht erkennen, da sowohl Jarid1B-positive als auch -negative Zellen Jarid1B-positive und -negative Tochterzellen hervorbringen können, was auf einen dynamischen Prozess in der Expression dieses Markers hinweist. Jarid1B-positive Zellen sind also von Bedeutung für den Erhalt des Tumorstadiums, jedoch nicht für die Tumorbildung (Roesch et al., 2010). Jarid1B stellt somit keinen typischen Stammzellmarker im Sinne einer hierarchischen Ordnung bei Tumorzellen dar, es markiert jedoch eine Zellpopulation, die das Tumorstadium auf lange Sicht erhält.

Der Nachweis von Tumorstammzellen bei Malignen Melanom ist somit zu hinterfragen. Abhängig von den Voraussetzungen, unter denen die Versuche durchgeführt wurden, zeigten sich beim Malignen Melanom unterschiedliche Frequenzen von Zellen, die zu einem Tumorstadium führen. Während bei Studien an NOD/SCID Mäusen nur eine extrem geringe Anzahl (0,0001%) der übertragenen Melanomzellen zur Entstehung eines Tumors führte, konnten in einer weiteren Studie mit stärker immunsupprimierten NOD/SCID IL2 γ ^{null} Mäusen bis zu 25% der übertragenen Melanomzellen einen Tumor bilden (Quintana et al., 2008; Schatton, et al., 2008). Auch zeichneten sich diese in hoher Anzahl auftretenden tumorbildenden Zellen nicht durch die Expression bestimmter histogenetischer Marker aus. Die hohe Frequenz tumorbildender Zellen sowie der fehlende Nachweis von Biomarkern sprechen dafür, dass die Fähigkeit zur Tumorgenese unter Melanomzellen weit verbreitet ist und gleichzeitig gegen das Vorhandensein von Tumorstammzellen beim Malignen Melanom. Histogenetische Marker, die für eine hierarchische Organisation stehen sind also möglicherweise irrelevant beim Malignen Melanom. Bestenfalls reichern diese Zellen Jarid1B-positive Zellen, die das Tumorstadium aufrechterhalten, an.

1.2.4 Differenzierte Zellen beim Malignen Melanom

Differenzierte Zellen stellen den Hauptanteil der Tumormasse dar. Sie können nur gleichartige Tochterzellen hervorbringen und haben nicht die Fähigkeit in andere Zellarten zu differenzieren.

S100B war der erste Biomarker, der für melanozytäre Tumore gefunden wurde (Gaynor, Irie, Morton, & Herschman, 1980). Das kalziumbindende Protein befindet sich im Zytoplasma zahlreicher Zellen und steuert unterschiedliche Zellfunktionen, darunter auch die Zelldifferenzierung. S100B weist unter den in der Routinediagnostik verwendeten Markern (S100B, Melan-A und HMB-45) die höchste Sensitivität auf, jedoch gleichzeitig die geringste Spezifität (Cochran et al., 1983; Cochran, Wen, & Herschman, 1984; Messina et al., 1999). Im Lymphknoten reagieren mit dem Antikörper gegen S100B nicht nur Zellen des malignen Melanoms, sondern auch benigne Melanozyten, aktivierte Makrophagen, dünne Nervenfasern, Adipozyten und dendritische Zellen (Shidham et al., 2001).

Der in immunhistochemischen Färbungen verwendete Antikörperklon HMB-45 (**H**uman **M**elanoma **B**lack-45) ist gegen das im Zytoplasma der Zelle lokalisierte Antigen gp100 gerichtet, das als Bestandteil der melanosomalen Oxidoreduktase in die Melaninsynthese eingebunden ist. Während bei immunhistochemischen Färbungen gp100 bei malignen Melanomen in nahezu 100% der Fälle nachgewiesen werden konnte (Blessing, Sanders, & Grant, 1998; Fitzgibbons, Chaurushiya, Nichols, Chandrasoma, & Martin, 1989; Jungbluth et al., 1998), sind gutartige Nävi und ruhende Melanozyten generell negativ (Abrahamsen, Hamilton-Dutoit, Larsen, & Steiniche, 2004; Gown, Vogel, Hoak, Gough, & McNutt, 1986). Auch gutartige Melanozyteneinschlüsse in Lymphknoten bilden kein gp100 (Shidham, et al., 2001). Gp100 ist ein spezifischer, jedoch nicht sehr sensibler Marker für Zellen des malignen Melanoms, der in der Diagnostik zur Unterscheidung zwischen gutartigen und bösartigen melanozytären Läsionen verwendet wird.

Ein weiteres Markergen, das differenzierte Zellen des malignen Melanoms charakterisiert, ist Melan-A (MART-1). Melan-A kodiert ein Antigen, das von zytotoxischen T-Lymphozyten erkannt wird. Als Markergen für differenzierte Melanozyten lässt sich Melan-A sowohl in benignen Melanozyten als auch in Zellen des malignen Melanoms nachweisen (Abrahamsen, et al., 2004).

Als wichtiges Enzym der Melaninsynthese ist TRP2 ein Marker differenzierter Melanozyten, der schon früh im Prozess der Zelldifferenzierung auftritt. Durch den Nachweis der Expression von TRP2 kann demnach eine Zelldifferenzierung gezeigt werden, noch bevor es zur Expression anderer Differenzierungsmarkergene kommt (Steel, Davidson, & Jackson, 1992).

1.3 Melanoma-associated Chondroitin Sulfate Proteoglycan

Ein weiteres, dieser Arbeit zugrunde liegendes Markergen für differenzierte Zellen des malignen Melanoms, ist MCSP.

Während frühe Stadien des malignen Melanoms durch die vollständige Exzision zu einem hohen Prozentsatz heilbar sind, erwiesen sich die Therapiemöglichkeiten im fortgeschrittenen Stadium bislang als wenig wirksam, sodass die Entwicklung neuer Behandlungsstrategien, wie Immuntherapien, immer mehr an Bedeutung gewann. Eine Voraussetzung einer möglichen Immuntherapie ist die Identifikation eines Antigens, das von einem Großteil der malignen Zellen, gleichzeitig in gesundem Gewebe jedoch kaum ausgebildet wird. Im Rahmen dieser Bestrebungen kam es zur Identifikation unterschiedlicher mit Melanomzellen in Verbindung stehender Zellantigene, die als Angriffspunkt antikörpergestützter Therapien dienen können. Darunter auch das Melanoma-associated Chondroitin Sulfate Proteoglycan (MCSP), ein in die Zellmembran integriertes, stark glykosyliertes Chondroitinsulfat-Proteoglykan, bestehend aus einer 280 kDa und einer 450 kDa Untereinheit (Ross et al., 1983). MCSP, auch bekannt als High Molecular Weight-Melanoma-Associated Antigen (HMW-MAA, Homolog bei Ratten: NG2), weist eine hohe Expressionsrate in Melanomzellen, sowie bei aktivierten Perizyten in deren Nachbarschaft auf (Schlingemann, Rietveld, de Waal, Ferrone, & Ruiter, 1990), (M. R. Campoli et al., 2004). Während man anfangs von einer stark eingeschränkten Expressionsrate von MCSP in gesundem Gewebe ausging, konnten im Laufe der vergangenen Jahre immer mehr MCSP-bildende Gewebearten identifiziert werden: die interfollikuläre Epidermis, die basale Schicht der Mundschleimhaut, verschiedene Anteile des Haarfollikels (Legg, Jensen, Broad, Leigh, & Watt, 2003), Chondrozyten des Gelenkknorpels (Midwood & Salter, 1998), glatte Muskelzellen (Tordsson et al., 2000), Microgliazellen, mesangiale Zellen des

renalen Glomerulus (Pouly, Becher, Blain, & Antel, 1999), Vorgängerzellen verschiedener Gewebe wie Oligodendrozyten, Neuroglia, Kapillarendothelien oder Muskelzellen (Stallcup & Huang, 2008) sowie multipotente Zellen des Knochenmarks (Kozanoglu et al., 2009). Auch zahlreiche bösartige Neubildungen exprimieren MCSP mit einem Anteil von mehr als 50 %. Dazu zählen das Astrozytom, Gliom, Neuroblastom, Plattenepithelkarzinom, Mesotheliom, Mammakarzinom, Pancreaskarzinom und das Nierenzellkarzinom (Wang et al., 2010).

Bei Untersuchungen an gutartigen Nävi sowie bösartigen Melanomen konnte bei einem Anteil von mehr als 90 % eine Expression von MCSP nachgewiesen werden (Natali et al., 1983). Die MCSP-Expressionsrate ist ähnlich hoch bei der Lentigo maligna, dem superfiziell spreitenden Melanom sowie dem nodulären Melanom. Eine niedrigere Expressionsrate findet sich beim uvealen sowie akro-lentiginösen Melanom (Kageshita et al., 1991) (Nishi, Inoue, Kageshita, Takata, & Ihn, 2010).

MCSP ist verbunden mit Tumorzellproliferation, Beweglichkeit und Invasion von Tumorzellen beim malignen Melanom (Yang et al., 2004). Es überträgt Signale, die intrazellulär zu einer Aktivierung oder Veränderung von Signalwegen führen, die für diese Zellfunktionen von Bedeutung sind (siehe Tabelle 1.6). Die Signalwege, mit denen MCSP in Verbindung steht, betreffen das Zusammenspiel mit GTPasen, Integrinen, Metalloproteinasen und die Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalwege. Während der radialen Wachstumsphase begünstigt die Expression von MCSP die Veränderung von einem epidermalen zu einem mesenchymalen Zelltyp (epithelial to mesenchymal transition, EMT), einhergehend mit einer veränderten Zellmorphologie und einem erhöhten Potential zur Metastasierung.

Tabelle 1.6 Zelluläre Veränderungen durch die Expression von MCSP

Funktion von MCSP	Folge
Rezeptor der Wachstumsfaktoren bFGF (basic fibroblast growth factor) und PDGF-AA (platelet derived growth factor-AA) (Goretzki, Burg, Grako, & Stallcup, 1999)	→ erhöhte Zellproliferation und -differenzierung
Korezeptor für $\alpha 4\beta 1$ - Integrin (Yang, et al., 2004) und dadurch verstärkte Phosphorylierung von FAK (focal adhesion kinase) und ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2) (Yang, et al., 2004)	→ ausbreitendes Tumorwachstum → Modulation von Regulatoren des Zellzyklus, Eintritt in den Zellzyklus, Zellteilung → Aktivierung des Transkriptionsfaktors MITF, Melanogenese → Verhinderung des Zelltods → Expression von Matrixmetalloproteinasen Gewebsinvasion (Smalley, 2003)
Interaktion mit Komponenten der extrazellulären Matrix wie Laminin, Kollagen II, V und VI (Fang et al., 1999)	→ Veränderungen des Zytoskeletts, Tumorzellausbreitung und -migration
Komplexbildung mit der Metalloproteinase MT3-MMP (membrane type 3 matrix metalloproteinase) (Iida et al., 2001)	→ Proteolyse von Kollagen I, Gewebsinvasion in der vertikalen Wachstumsphase
Aktivierung von GTPasen der Rho Familie (Rho, Rac, Cdc42) sowie des Adaptorproteins p130 ^{Cas} (Eisenmann et al., 1999) (Stallcup & Huang, 2008)	→ Veränderungen des Zytoskeletts, Migration → Modulation von Regulatoren des Zellzyklus, Zellteilung
Stimulation von Transkriptionsfaktoren (NFkB, STAT3) (Fletcher, Drewry, Shahani, Page, & Gunning, 2009) (Grivennikov & Karin, 2010)	→ Transkription antiapoptotischer Proteine und Zykline → Transkription von Oncogenen (c-myc) → Unterdrückung des Tumorsuppressors p53 → Transkription von VEGF, Angiogenese → Herabregulation proinflammatorischer Zyto- und Chemokine (H. Yu, Pardoll, & Jove, 2009)
Expression von HGF (hepatocyte growth factor) und c-Met (Boccaccio et al., 2005)	→ Verlust von E-Cadherin (Gruss & Herlyn, 2001), EMT (epithelial to mesenchymal transition), Motilität, systemische Streuung von malignen Zellen
Erhöhte Expression der EMT-Marker Fibronectin und Vimentin (Yang et al., 2009)	→ Motilität, Invasion

MCSP führt je nach Situation zu einer Lösung der durch Integrine bedingten Zell-Matrix-Kontakte oder zu einer verstärkten Zelladhäsion. Dadurch kann die Wanderung der Zelle in den Lymphknoten sowie die Besiedlung und Bildung von Metastasen gesteuert werden. Zellen, die MCSP exprimieren, haben in ungünstigem Umfeld und auch in Konkurrenzsituationen einen Überlebensvorteil, da MCSP die Signalübertragung zahlreicher extrazellulärer Liganden verstärkt. Weiterhin begünstigt MCSP durch verschiedene zelluläre Mechanismen Zellproliferation und Tumorwachstum und verhindert den Zelltod (siehe Tabelle 1.6). Diese Faktoren begünstigen die Einnistung einer gestreuten Zelle in einem neuen Umfeld sowie eine durch Zellwachstum und Zellteilung bedingte Bildung von Kolonien und schließlich Metastasen (M. Campoli, Ferrone, & Wang, 2010).

Weiterhin wurde durch immunhistochemische Färbungen gezeigt, dass MCSP ein hochspezifisches wie auch ein hochempfindliches Markermolekül für Zellen des malignen Melanoms in Lymphknoten darstellt. MCSP zeigte sich in immunhistochemischen Färbungen an Metastasen in Wächterlymphknoten als sensibler und spezifischer als die etablierten Marker S100B, MelanA und HMB-45 (Goto et al., 2008). Die Lokalisation von MCSP als Transmembranmolekül erlaubt eine Färbung, ohne die Membran der Zelle dafür aufzulösen. Somit stellt die indirekte Immunfluoreszenzfärbung gegen das Antigen MCSP eine Möglichkeit dar, mit hoher Sensitivität und Spezifität lebensfähige gestreute Tumorzellen des malignen Melanoms mit der Fähigkeit zu Wachstum, Beweglichkeit und Invasion zu erkennen und zu isolieren.

2 Material und Methoden

2.1 Kooperationspartner

Die operativ gewonnenen Wächterlymphknoten, die in dieser Dissertation untersucht wurden, sowie die klinischen Daten zu den Patienten wurden von klinischen Kooperationspartnern der Abteilung für Dermatologie des Universitätsklinikums Regensburg zur Verfügung gestellt. In der Abteilung für Pathologie des Universitätsklinikums Regensburg wurde die Routinediagnostik im Rahmen des Staging der Krebserkrankung durchgeführt. Das Ergebnis wurde bereitgestellt für Vergleiche im Rahmen dieser und der Doktorarbeit von Sebastian Scheitler.

2.2 Methoden

2.2.1 Aufarbeitung der Gewebeproben

Herstellen einer Zellsuspension

Um eine Zellsuspension zu erhalten, wird die Gewebeprobe zunächst in Stücke von etwa 2 x 2 x 2 mm zerkleinert. Die mechanische Auflösung der Gewebestücke erfolgt mithilfe der Medimachine, in der das Gewebe bei einer konstanten Geschwindigkeit von 100 rpm aufgelöst wird. Als Flüssigkeit zum Auffangen der einzelnen Zellen dient das Nährmedium RPMI1640 ohne L-Glutamin. Die Flüssigkeit mit den gelösten Zellen wird in ein 50 ml Falcon-Gefäß überführt. Nach der Auflösung des letzten Gewebestückes in der Medimachine wird mit Nährmedium nachgespült, um Lymphknotenzellen, die am Gerät haften, zu sammeln.

Percoll-Dichtegradientenzentrifugation

Das Falcon-Gefäß mit den in Nährmedium gelösten Lymphknotenzellen wird dann mit Hanks` Salzlösung auf 50 ml aufgefüllt und mit 200 g 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert, um grobe Verunreinigungen wie Fett und Thrombozyten zu entfernen. Der Überstand wird bis auf etwa 8 ml abgenommen und verworfen. Das Zellpellet befindet sich am Boden des Gefäßes und wird in den restlichen 8 ml resuspendiert.

In einem 15 ml Falcon-Gefäß werden 7 ml Percoll 60 % vorgelegt und mit den 8 ml Zellsuspension überschichtet. Die Dichte des Percollgradienten wird auf 1,077 g/ml eingestellt, so dass Zellen höherer Dichte (Erythrozyten) bei der Zentrifugation den Gradienten durchwandern, während mononukleäre Zellen auf dem Percoll eine Interphase bilden. Bei der darauffolgenden Zentrifugation (1000 g, 20 Minuten) trennen sich dadurch Erythrozyten von mononukleären Zellen. Um die Zellen ein weiteres Mal aufzureinigen und Percollreste zu entfernen wird die Interphase in ein 50 ml Falcon-Gefäß überführt, mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und erneut zentrifugiert (500 g, 10 Minuten). Der Überstand wird komplett verworfen, das Zellpellet in 2 ml PBS resuspendiert. In einer Neubauer-Zählkammer wird die Anzahl der Zellen bestimmt. Für die MCSP-Immun-Fluoreszenzfärbung werden 2×10^6 Zellen in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Die restliche Zellsuspension wird mit PBS auf eine Konzentration von 500.000 Zellen pro ml aufgefüllt und ungefärbt auf Adhäsions-Objektträger gegeben, mit einer Dichte von 250.000 Zellen pro Feld. Nach einer Stunde sind die Zellen sedimentiert und der Überstand kann abgekippt werden. Über Nacht trocknet der Adhäsions-Objektträger in einer bedeckten, jedoch nicht abgedichteten Kammer. Bis zur weiteren Bearbeitung werden die Adhäsions-Objektträger bei -20°C gelagert.

2.2.2 Immunzytochemische Färbung

MCSP-Immunfluoreszenzfärbung lebender Zellen in Suspension

Nach der Aufarbeitung der Gewebeprobe werden nun 2×10^6 Zellen mit dem Antikörperklon 9.2.27 gefärbt, der gegen das Oberflächenantigen MCSP gerichtet ist. Dazu werden 2×10^6 Zellen in ein Eppendorf-Gefäß überführt und zentrifugiert (1500 rpm, 5 Minuten). Der Überstand wird abgenommen und das Zellpellet wird in 95 μl 10 % AB-Serum in PBS/Pepton (2 % Pepton in PBS) resuspendiert. Um unspezifische Bindungen zu blockieren, bleiben die in 10 % AB-Serum gelösten Zellen 10 Minuten bei ständiger Bewegung auf einem Rollgerät. Danach werden 5 μl des Primärantikörpers (monoklonaler muriner Antikörperklon 9.2.27, 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) zugegeben und die Zellsuspension wird für weitere 10 Minuten auf dem Rollgerät belassen. Im Anschluss wird bei 1500 rpm für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand abgenommen, das Zellpellet in 500 μl PBS/Pepton gewaschen und erneut zentrifugiert (1500 rpm, 5 Minuten). Nun wird das Zellpellet in 98 μl AB-PBS gelöst, 2 μl des Sekundärantikörpers (Cy3-gekoppelter Anti-Maus Antikörper aus der Ziege, 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

zugegeben und wiederum für 10 Minuten auf dem Rollgerät im Dunklen inkubiert. Erneut wird die Zellsuspension zentrifugiert (1500 rpm, 5 Minuten), mit 500 µl PBS/Pepton gewaschen und zentrifugiert (1500 rpm, 5 Minuten). Nach einem letzten Waschschrift mit 500 µl PBS wird der Überstand abgenommen und das Zellpellet für den Nachweis MCSP-positiver Zellen in 210 µl PBS gelöst.

HMB-45-APAAP-Färbung auf Adhäsions-Objektträgern

Zunächst werden die Adhäsions-Objektträger aufgetaut und getrocknet. Unspezifische Bindungen werden nun für 30 Minuten mit 10 % AB-Serum in PBS blockiert. Im Anschluss werden die Zellen für 45 Minuten mit dem Primärantikörper Monoclonal Mouse Anti-Human Melanosome Clone: HMB451 (19 µg/ml, Verdünnung 1/50) inkubiert. Nun wird der Primärantikörper über den Brückenantikörper, einen Rabbit-anti-Maus-Antikörper (30 Minuten, 125 µg/ml, Verdünnung 1:20 in 10 % AB-Serum) mit dem APAAP-Komplex verbunden (30 Minuten, 1,5 µg/ml, Verdünnung 1:100 in 10 % AB-Serum). Der enzymatischen Entwicklung mit dem AP Conjugate Substrate Kit für 10 Minuten folgt die Fixierung mit 1,35 ml 37 % Formaldehydlösung in 100 ml PBS für 5 Minuten. Zwischen den einzelnen Arbeitsschritten wird jeweils dreimal eine Minute mit PBS pH 7,4 gewaschen. Als Positivkontrolle dient bei jeder Färbung ein Adhäsions-Objektträger mit Zellen der Melanomzelllinien Mel-Juso oder Mel-Wei, der parallel zu den Lymphknotenpräparaten gefärbt wird. Als Negativkontrolle wird von jedem Patienten je ein Adhäsions-Objektträger statt mit dem Primärantikörper HMB451 mit dem Antikörper MOPC 21 versetzt (45 Minuten, 1 mg/ml, Verdünnung 1/2600) und anschließend mit dem APAAP-Komplex entwickelt. MOPC 21 dient als Isotypkontrolle, da es wie auch der HMB-451-Antikörper vom IgG₁-Typ ist, jedoch keine menschlichen Epitope bindet.

2.2.3 Isolierung einzelner Tumorzellen

Isolierung aus Suspension

Nach der MCSP-Färbung befinden sich 2×10^6 Zellen gelöst in 210 µl PBS in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß. Zum Mikroskopieren der Zellsuspension wird ein 8-Felder-Objektträger zunächst mit Rinderserumalbumin beschichtet, um ein Anhaften der Zellen zu verhindern. Ein Feld wird als Pickfeld mit 200 µl PBS aufgefüllt, auf die restlichen sieben Felder werden je 170 µl PBS und 30 µl der Zellsuspension

gegeben. Nach dem Absinken der Zellen (15 – 20 Minuten) werden die Felder nach fluoreszierenden Zellen durchsucht. MCSP-positive Zellen werden mithilfe einer Glaskapillare aufgesogen und in das nur mit PBS angefüllte Pickfeld überführt. Im Pickfeld werden nochmals die Färbung sowie die Intaktheit der Zelle überprüft, bevor die gefärbte Einzelzelle unter mikroskopischer Kontrolle mit einer 2 µl Pipette aufgenommen wird. Die isolierte Zelle wird in ein 200 µl Reaktionsgefäß überführt, in das 4 µl mTRAP Lysis-Buffer und 0,4 µl tRNA vorgelegt werden. Nach Möglichkeit werden bei jeder positiven Gewebeprobe fünf MCSP-positive und zwei MCSP-negative Zellen sowie ein Zellpool isoliert. Bis zur weiteren Bearbeitung werden die Zellen bei -80°C eingefroren. Die Gewebeaufarbeitung, MCSP-Färbung, Isolation sowie die weitere Bearbeitung der MCSP-positiven Einzelzellen der Patienten 1-57 wurde von Sebastian Scheitler im Rahmen seiner Doktorarbeit durchgeführt.

Isolierung von Adhäsions-Objektträgern

Um die gefärbten Zellen mittels Mikromanipulation von den Adhäsions-Objektträgern isolieren zu können, werden diese zunächst mit PBS + 0,5 % Igepal überschichtet und in ein Invertmikroskop eingespannt. Mit einer Glaskapillare werden die einzelnen Zellen nun vorsichtig von der Oberfläche des Adhäsions-Objektträgers gelöst und aufgesaugt. Ein Feld eines 8-Feld-Objektträgers wird als Pickfeld mit PBS + 0,5 % Igepal überschichtet. Isolierte Einzelzellen werden in das Pickfeld überführt, wo sie unter Sicht mit einer 2 µl Pipette in 1 µl PBS + 0,5 % Igepal aufgenommen werden. In einem 200 µl Reaktionsgefäß werden 2 µl Proteinase K-Mix vorgelegt:

OnePhorAll plus Puffer	0,2 µl
Igepal 10 %	0,13 µl
Tween 10 %	0,13 µl
Proteinase K (10 mg/ml)	0,26 µl
H ₂ O dest	1,27 µl

Die isolierte Zelle wird in dieses 200 µl Reaktionsgefäß überführt und bei 42°C über 10 Stunden in der PCR-Maschine inkubiert. In dieser Zeit findet der Verdau zellulärer Proteine statt. Danach erfolgt die Inaktivierung der Proteinase K für 10 Minuten bei 80°C. Diese Temperatur verhindert eine Denaturierung des DNA-Doppelstranges.

2.2.4 Globale Genomamplifikation von Adhäsions-Objektträgern isolierter Zellen

Das Restriktionsenzym Mse I mit der Schnittstelle T/TAA führt zur Fragmentation der genomischen DNA in gleichmäßigen Abständen, so dass die Fragmente etwa gleich lang sind und später gleichmäßig amplifiziert werden können. Mse I lässt sich bei einer Temperatur von 65°C inaktivieren, wodurch die Intaktheit der DNA-Doppelstränge gewährleistet ist. Nach Zugabe von 2 µl des Ansatzes zum Mse-Verdau läuft dieser in der PCR-Maschine bei 37°C für drei Stunden:

OnePhorAll plus Puffer	0,2 µl
Mse I (50.000 U/µl)	0,2 µl
H ₂ O dest	1,6 µl

Im Anschluss wird das Enzym für 5 Minuten bei 65°C inaktiviert. Durch den Verdau werden an den 5'-Enden TA-Überhänge generiert, an die nun ein Adapter aus den beiden Oligonukleotiden LIB1 und ddMSE11 ligiert wird. Durch ein langsames Abkühlen in der PCR Maschine nach einem programmierten Gradienten (von 65°C auf 15°C in Temperaturschritten von 1°C pro Minute) kommt es zu der Basenpaarung der beiden Primer vor der Ligation, wodurch doppelsträngige Adaptoren gebildet werden. Der Ligationsansatz wird in einem 200 µl Reaktionsgefäß vorbereitet und die Basenpaarung der beiden Primer wird in einer zweiten PCR-Maschine parallel zum Mse-Verdau durchgeführt. Pro Probe befinden sich im Ansatz:

OnePhorAll plus Puffer	0,5 µl
LIB1 Primer (100 mM)	0,5 µl
ddMse11 Primer (100 mM)	0,5 µl
H ₂ O dest	1,5 µl

Um die Ligation des Adapters an die fragmentierte DNA zu ermöglichen, werden dem Ligationsansatz pro Probe 1 µl ATP (10 mM) sowie 1 µl T4 DNA-Ligase (hochkonzentriert) zugegeben. Den Reaktionsgefäßen mit der fragmentierten DNA werden dann je 5 µl des Ligationsansatzes beigefügt. Die Ligation erfolgt über Nacht in der PCR-Maschine bei 15°C. Im Anschluss an die Ligation des Adapters erfolgt die Amplifikation der genomischen DNA. Dazu muss zunächst der Hilfsprimer abgespalten werden (3 Minuten bei 68°C), um eine Auffüllreaktion am 3'-Ende zu ermöglichen.

Der Ansatz zur primären Amplifikation ist zusammengefügt aus:

Expand-Long-Template Puffer 1	3,0 µl
dNTPs (10 mM)	2,0 µl
Expand-Long-Template PolMix (3,5 U/µl)	1,0 µl
H ₂ O dest	35,0 µl

Jedem Reaktionsgefäß werden 40 µl des Ansatzes zugegeben, dann wird das Programm zur Primäramplifikation gestartet:

	1 Zyklus	15 Zyklen	8 Zyklen	22 Zyklen	1 Zyklus
94°C		40 sec	40 sec	40 sec	
57°C		30 sec	30 sec + 1°C/Zyklus		
65°C				30 sec	
68°C	3 min	1 min 30 sec + 1 sec/Zyklus	1 min 45 sec + 1 sec/Zyklus	1 min 53 sec + 1 sec/Zyklus	3 min 40 sec

Das PCR-Produkt ist bei -20°C stabil und wird bis zur weiteren Bearbeitung für Analysen der genomischen DNA aufbewahrt.

2.2.5 Kontroll-PCR

Zur Bestimmung der Qualität des Produkts der Primäramplifikation werden zwei spezifische genomische Mse I-Fragmente nachgewiesen. Von weiteren Analysen ausgeschlossen werden Proben, bei denen keines der beiden Fragmente nachgewiesen werden kann. Der PCR-Ansatz (pro Probe 10 µl) zum Nachweis einer spezifischen Sequenz besteht aus:

PCR-Puffer	1,0 µl
Primer 1	0,5 µl
Primer 2	0,5 µl
BSA	0,25 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,1 µl
H ₂ O dest	7,65 µl

Für jede isolierte Einzelzelle werden zwei der folgenden Primerpaare überprüft: TP53 Exon 2/3 oder TP53 Exon 8/9 sowie CK19 (Zytokeratin). Jedem Ansatz werden 0,5 µl der zu überprüfenden Probe zugegeben.

Das Programm der Kontroll-PCR läuft wie folgt ab:

	1 Zyklus	15 Zyklen	25 Zyklen	1 Zyklus
94°C	2 min	15 sec	15 sec	
58°C	30 sec	30 sec	30 sec	
72°C	2 min	20 sec	30 sec	2 min

2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese

Das Produkt der Kontroll-PCR wird durch Gelelektrophorese aufgetrennt. Dazu werden 1,5 g Agarose durch Erhitzen in 100 ml TBE-Puffer gelöst und dann 3 µl Ethidiumbromid zugegeben. Wenn das Gel ausgehärtet ist, werden jeder Probe der Kontroll-PCR 2 µl Ladepuffer zugemischt und die Proben sowie ein Marker (1 kb-Leiter) in die Geltaschen geladen. In einem Gelelektrophorese-System werden die Proben bei 160 V und 400 mA über 45 Minuten aufgetrennt. Das Ergebnis der Gelelektrophorese wird mit UV-Licht ausgewertet und abfotografiert.

2.2.7 Isolierung und globale Amplifikation von mRNA und DNA

Nach dem Auftauen der bei -80°C aufbewahrten Einzelzellen werden in jedes Reaktionsgefäß 1 µl biotinkoppelte Oligo-dT-PNAs und 1 µl mTRAP Lysis-Puffer + Protease im Verhältnis 20/1 zugegeben. In der PCR-Maschine erfolgt die Lyse der Zelle (10 min 45°C, 1 min 70°C). Nach der Auflösung der zellulären Membranen wird das Reaktionsgefäß zur Bindung der biotinylierten Polynukleotide an den Poly-A-Schwanz der mRNA für weitere 15 min bei 22°C in der PCR-Maschine belassen. Anschließend werden in jedes Reaktionsgefäß 4 µl mTRAP Beads (magnetische Streptavidin-gekoppelte Beads) hinzugefügt und die Proben für 45 Minuten auf einem Rollgerät in ständiger Bewegung gehalten. Die hohe Affinität der Streptavidin-Biotin-Bindung ermöglicht nun die Isolierung der mRNA mithilfe eines Magneten. Nach den 45 Minuten auf dem Rollgerät folgt die Zugabe von 10 µl Igepal-Waschpuffer. Die Reaktionsgefäße werden in einen mit Magneten versehenen Ständer platziert, wodurch die magnetischen Beads mit der daran gebundenen mRNA am Gefäßrand immobilisiert werden. Die genomische DNA befindet sich im Überstand, der abgenommen und in ein silanisierendes 200 µl Reaktionsgefäß mit 0,8 µl Polyacrylamid-Carrier überführt wird. Das Pellet mit den magnetischen Beads wird in 20 µl Tween-Waschpuffer vorsichtig resuspendiert, das Reaktionsgefäß wieder im magnetischen Ständer platziert und der Überstand in das gleiche Reaktionsgefäß wie im

vorgegangenen Schritt überführt und mit diesem vereinigt. Dieser Waschschrift wird mit 20 µl Igepal-Waschpuffer wiederholt. Bevor sie bis zur weiteren Bearbeitung bei - 20°C eingefroren werden, wird den Überständen zur Fällung der DNA 120 µl eiskaltes Ethanol 100 % zugefügt.

Die Beads werden nun in 10 µl des RT-Mix1 resuspendiert:

5x RT-Puffer	2,0 µl
DTT (0,1 M)	1,0 µl
Igepal (10 %)	0,5 µl
H ₂ O dest	0,5 µl
CFL15CT24 (100 µM)	3,0 µl
CFL15CN8 (200 µM)	3,0 µl

Zur Bindung der Primer (CGL15CT24 und CFL15CN8) zur reversen Transkription inkubieren die Reaktionsgefäße für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Dann erfolgt die Zugabe von 10 µl des RT-Mix2:

5x RT-Puffer	2,0 µl
DTT (0,1 M)	1,0 µl
dNTPs (je 10 mM)	1,0 µl
H ₂ O dest	5,0 µl
SS II RT	1,0 µl

Während der folgenden 45 Minuten rotieren die Reaktionsgefäße bei 44°C. In dieser Zeit katalysiert das Enzym SS II RT die reverse Transkription der mRNA in cDNA. Nach der cDNA-Synthese folgt das Tailing, wobei an die cDNA ein Poly-G-Schwanz synthetisiert wird, der im nächsten Schritt, der Primäramplifikation, zur Bindung des Primers CP2 dient. Dazu wird im Magnetständer der Überstand abgenommen und verworfen. Es folgt ein Waschschrift mit Tailing-Waschpuffer, der Überstand wird wiederum verworfen. Anschließend werden die Beads in 10 µl des Tailing-Mix resuspendiert:

MgCl ₂	1,0 µl
DTT (1 mM)	1,0 µl
dGTP (2 mM)	1,0 µl
KH ₂ PO ₄ (0,2 M)	0,5 µl
H ₂ O dest	6,5 µl

Der Ansatz wird mit 40 µl PCR-Öl überschichtet und in einer auf 94°C vorgeheizten PCR-Maschine für 4 Minuten denaturiert. Danach werden die Proben auf Eis gelagert und zu jedem Ansatz werden 0,8 µl TdT zugegeben. Die Tailingreaktion erfolgt in der PCR-Maschine bei 37°C für 60 Minuten, dann wird das Enzym TdT für 5 Minuten bei 70°C inaktiviert. Anschließend werden in jedes Reaktionsgefäß 35 µl des PCR-Mix1 zugegeben:

Puffer 1	4,0 µl
Formamid (20 %)	7,5 µl
H ₂ O dest	24,0 µl

Danach werden die Reaktionsgefäße in die PCR-Maschine gestellt und das PCR-Programm zur Amplifikation der cDNA gestartet. Bei Erreichen von 78°C werden jedem Ansatz 5,5 µl des PCR-Mix2 zugefügt:

CP2 (24 µM)	2,5 µl
dNTPs (je 10 mM)	1,75 µl
PolMix	1,5 µl

Dann wird das PCR-Programm für die cDNA-Primäramplifikation gestartet:

	1 Zyklus	20 Zyklen	21 Zyklen	1 Zyklus
94°C		15 sec	15 sec	
65°C		30 sec	30 sec	
68°C		2 min	2 min 30 sec	7 min
			+ 10 sec/Zyklus	
78°C	30 sec			

Das PCR-Produkt ist bei -20°C stabil und wird für weitere Analysen zur Genexpression konserviert. Wie in 2.2.5 für die Produkte der Primäramplifikation der globalen Genomamplifikation beschrieben, wird auch mit den Produkten der cDNA-Primäramplifikation eine Kontroll-PCR durchgeführt. Um die Qualität des PCR-Produkts zu bestimmen, wird mit passenden Primern die Sequenz spezifischer Haushaltsgene nachgewiesen. Es werden alle Proben auf die Sequenzen von EF1α sowie β-Actin getestet. Proben, die für mindestens eines der beiden Haushaltsgene positiv sind, werden des Weiteren auf die Sequenz von GAPDH überprüft. Der PCR-Ansatz sowie das Programm sind wie in 2.2.5 beschrieben. Die Gelelektrophorese wird durchgeführt wie in 2.2.6 dargestellt.

2.2.8 Globale Genomamplifikation

Die globale Amplifikation der genomischen DNA kann auch mit den bei der mRNA-Isolierung gesammelten Überständen (siehe 2.2.7) durchgeführt werden. In den ersten beiden Arbeitsschritten unterscheidet sich die Vorgehensweise von der Methode bei kompletten Einzelzellen. Die gesammelten und mit Ethanol versetzten Überstände werden zunächst aufgetaut. Nach der Zentrifugation der Reaktionsgefäße (14000 rpm für 45 Minuten bei 4°C) wird der Überstand abgenommen und verworfen. Es werden nun 180 µl Ethanol 70 % zugegeben und die Reaktionsgefäße werden für 10 Minuten mit 350 rpm bei 18°C in einem Thermoblock geschüttelt. Danach werden die Reaktionsgefäße wiederum zentrifugiert (14000 rpm für 45 Minuten bei 4°C). Dieser Waschschrift wird noch zweimal wiederholt. Nach dem letzten Waschschrift wird das Pellet mit der genomischen DNA der Zelle in 3,48 µl H₂O dest gelöst und über Nacht im Thermoblock bei 18°C und 350 rpm inkubiert. Nun folgt auch hier der Proteinase K-Verdau, bei dem ein anderer Ansatz verwendet wird als bei Einzelzellen. Pro Reaktionsgefäß wird 1 µl zugegeben:

OnePhorAll plus Puffer	0,5 µl
Igepal 10 %	0,13 µl
Tween 10 %	0,13 µl
Proteinase K (10 mg/ml)	0,26 µl

Der Verdau wird für 15 Stunden bei 42°C in der PCR-Maschine durchgeführt. Danach erfolgt die Inaktivierung der Proteinase K bei 80°C für 10 Minuten. Im nächsten Schritt, dem MSE I-Verdau, wird der folgende Ansatz (0,5 µl pro Reaktionsgefäß) benötigt:

MSE I (50.000 U/µl)	0,25 µl
H ₂ O dest	0,25 µl

Die Ligation und primäre Amplifikation werden durchgeführt wie in 2.2.4, die Kontroll-PCR und die Gelelektrophorese erfolgen wie in 2.2.5 und 2.2.6 beschrieben.

2.2.9 Etablierung der PCR zum Nachweis spezifischer Markergene

Im ersten Schritt wird in einer PCR (Ansatz und PCR-Programm siehe 2.2.5) mit der cDNA verschiedener Melanom-Zelllinien eine passende Positivkontrolle für den im nächsten Schritt durchgeführten Temperaturgradienten bestimmt. Beim Temperaturgradienten wird die Wärme in einem Block der PCR-Maschine so abgestuft, dass jedes Reaktionsgefäß zum Primerannealing auf eine andere Temperatur eingestellt wird. Der Temperaturgradient wird mit einer passenden Temperaturspanne (55°C – 65°C) durchgeführt.

Die optimale Temperatur zum Annealing der Primer wird durch die stärkste Bande bei der Agarose-Gelelektrophorese bestimmt. Im letzten Schritt wird eine PCR bei der optimalen Temperatur mit der cDNA verschiedener Einzelzellen von Melanomzelllinien durchgeführt, um für die folgende PCR zum Nachweis der Expression der Markergene eine Positivkontrolle zu bestimmen. Der Ansatz erfolgt bei allen PCR-Analysen wie in 2.2.5 beschrieben, die verschiedenen PCR-Programme sind in 2.2.10 aufgeführt. Die Gelelektrophorese wird durchgeführt wie in 2.2.6 dargestellt.

2.2.10 PCR zum Nachweis der Expression spezifischer Markergene

Zum Nachweis der Expression spezifischer Markergene wird das Primäramplifikat der cDNA zunächst mit H₂O dest im Verhältnis 1(cDNA)/ 5(H₂O dest) verdünnt. Für den Nachweis der mRNA werden für jedes Markergen spezifische Primersequenzen verwendet. Dem PCR-Ansatz (siehe 2.2.5) werden 0,5 µl der verdünnten cDNA-Probe zugegeben. Die PCR-Programme unterscheiden sich je nach der passenden Temperatur zur Hybridisierung der einzelnen Primerpaare. Die PCR für MCSP, HMB-45, Melan-A, S100B, ABCB5, Jarid1B, Nestin und CD271 läuft bei 62°C nach folgendem Schema:

	1 Zyklus	15 Zyklen	25 Zyklen	1 Zyklus
94°C	2 min	15 sec	15 sec	
62°C	30 sec	30 sec	30 sec	
72°C	2 min	20 sec	30 sec	30 sec

Die PCR für TRP2 läuft bei 58°C ab:

	1 Zyklus	15 Zyklen	25 Zyklen	1 Zyklus
94°C	2 min	15 sec	15 sec	
58°C	30 sec	30 sec	30 sec	
72°C	2 min	20 sec	30 sec	2 min

Die Gelelektrophorese wird durchgeführt, wie in 2.2.6 dargelegt.

2.2.11 Statistische Berechnungen

Der Chi-Quadrat-Test wurde angewandt, um zwei Kollektive in Bezug auf eine Eigenschaft zu vergleichen. Um einen Zusammenhang von zwei Ereignissen darzustellen, wurde der Korrelationskoeffizient nach Spearman berechnet. Die Verteilung einer Größe in verschiedenen Gruppen wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test verglichen. Um eine Verfälschung der Ergebnisse durch extrem abweichende Werte zu vermeiden, wurde zum Vergleich von Mittelwerten nicht der Durchschnitt, sondern der Median bestimmt.

Alle in dieser Arbeit durchgeführten statistischen Berechnungen wurden mit dem Statistikprogramm PASW Statistics 18 für Windows durchgeführt.

2.3 Verwendete Materialien

Enzyme und Antikörper

APAAP-Komplex	DAKO Diagnostica, Hamburg
Brückenantikörper Rabbit-anti-Maus (Z259)	DAKO Diagnostica, Hamburg
Cy3 Ziege-anti-Maus	Dianova, Hamburg
HMB451	DAKO Diagnostica, Hamburg
MCSP, Klon 9.2.27	Becton Dickinson, Heidelberg
MOPC 21	Sigma Aldrich, Deisenhofen
MSE I	New England Biolabs, Frankfurt
PolMix (Expand Long Template PCR System)	Roche, Mannheim
Protease (mTRAP midi Kit)	Active Motif, La Hulpe, Belgien
Proteinase K	Roche, Mannheim
SS II RT	Invitrogen, Karlsruhe
T4-DNA-Ligase	Roche, Mannheim

Taq-Polymerase
TdT

Roche, Mannheim
USB Europe, Staufen

Chemikalien

2-Log DNA Ladder
5x RT-Puffer
AB-Serum
Acrylamid Fertiglösung 40 %
Agarose
Ammoniumpersulfat
AP Conjugate Substrate Kit
ATP
Borsäure
BSA
BSA solution
Dinatriumhydrogenphosphat
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
DTT
EDTA
EDTA - Lösung pH 8,0
Ethanol
Ethidiumbromid
Formaldehydlösung 37 %
Formamid
Hanks` Salzlösung
Igepal
Kaliumchlorid
Kaliumdihydrogenphosphat
Magnesiumchlorid
mTRAP Lysispuffer (mTRAP midi Kit)
Natriumchlorid
Natriumacetat
One-Phor-all PLUS Puffer
PCR-Öl
Pepton
Percoll
PNA (mTRAP midi Kit)

New England Biolabs, Frankfurt
Invitrogen, Karlsruhe
Bio-Rad Medical Diagnostics, Dreieich
VWR International, Ismaning
Sigma Aldrich, Deisenhofen
AppliChem, Darmstadt
BioRad Laboratories, München
Roche, Mannheim
AppliChem, Darmstadt
Roche, Mannheim
Sigma Aldrich, Deisenhofen
VWR International, Ismaning
GE Healthcare Europe, Freiburg
Invitrogen, Karlsruhe
CLN, Niederhummeln
AppliChem, Darmstadt
CLN, Niederhummeln
Sigma Aldrich, Deisenhofen
VWR International, Ismaning
Sigma Aldrich, Deisenhofen
Biochrom, Berlin
Sigma Aldrich, Deisenhofen
Sigma Aldrich, Deisenhofen
VWR International, Ismaning
AppliChem, Darmstadt
Active Motif, La Hulpe, Belgien
AppliChem, Darmstadt
Fluca, Deisenhofen
GE Healthcare Europe, Freiburg
Sigma Aldrich, Deisenhofen
Becton Dickinson, Heidelberg
GE Healthcare Europe, Freiburg
Active Motif, La Hulpe, Belgien

RPMI 1640 ohne L-Glutamin	Pan Biotech, Aidenbach
Puffer 1 (Expand Long Template PCR System)	Roche, Mannheim
Silanisierungslösung	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Streptavidin Beads (mTRAP midi Kit)	Active Motif, La Hulpe, Belgien
TEMED	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Tris HCl	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Tris-Puffer pH 8,0	AppliChem, Darmstadt
tRNA	Roche, Mannheim
Tween 20	Sigma Aldrich, Deisenhofen

Puffer

Polyacrylamid-Carrier:	Acrylamid (5 %), Tris-HCl pH 7-8 (40 mM), Natriumacetat pH 7,8 (20 mM), EDTA pH 7,8-8,0 (1 mM), Ammoniumpersulfat (1 %), TEMED (0,1 %)
PBS:	Na ₂ HPO ₄ (8,5 mM), KH ₂ PO ₄ (2 mM), NaCl (150 mM); pH 7,4
PCR-Puffer:	Tris (100 mM), MgCl ₂ (10 mM), KCl (500 mM), dNTPs (1 mM); pH 8,5
cDNA-Igepal-Waschpuffer:	Tris-HCl pH 8,0 (50 mM), KCl (75 mM), DTT (10 mM), Igepal (0,25 %)
cDNA-Tween-Waschpuffer:	Tris-HCl pH 8,0 (50 mM), KCl (75 mM), DTT (10 mM), Tween (0,5 %)
Tailing-Waschpuffer:	KH ₂ PO ₄ pH 7,0 (50 mM), DTT (1 mM), Igepal (0,25 %)
TBE-Puffer:	Tris (89 mM), Borsäure (89 mM), EDTA (2 mM); pH 8,3

Oligonukleotide und Primer

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion in München synthetisiert.

Oligonukleotide und Primer für cDNA-Primäramplifikation

CFL5CN8	CCC CCC CCC CCC CCC GTC TAG ANN NNN NNN
CFL5CT24	CCC CCC CCC CCC CCC GTC TAG ATT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TVN
CP2	TCA GAA TTC ATG CCC CCC CCC CCC CCC

Oligonukleotide und Primer für humane genomische DNA

ddMSE11	TAA CTG ACA G-dideoxy-C
LIB1	AGT GGG ATT CCT GCT GTC AGT

Gen	3'	5'
CK19	TTC ATG CTC AGC TGT GAC TG	GAA GAT CCG CGA CTG GTA C
TP53 Exon 2/3	CAG CCC AAC CCT TGT CCT TA	GAA GCG TCT CAT GCT GGA TC
TP53 Exon 8/9	GAG GTC CCA AGA CTT AGT AC	AGG ACC TGA TTT CCT TAC TGC

Primer für genspezifische PCR, humane cDNA

Gen	3'	5'
β-Aktin	CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC	GTG GGG CGC CCC AGG CAC CA
EF1α	CTG TGT CGG GGT TGT AGC CA	TGC CCC AGG ACA CAG AGA CT
GAPDH	GCC ATC ACG CCA CAGT TTC C	AAT CCC ATC ACC ATC TTC CAG
ABCB5	TTC ATC CTC CGT GGC TTA TC	CAT AGG CGA TGT TCT CAG CA
CD271	GCT GTT CCA CCT CTT GAA GG	GAG GCA CCT CCA GAA CAA GA
HMB-45	CCT CTT GCT CAT TCC AGC TC	TCC AAA GTC CCA GGT GTA GG
Jarid1B	AAT CAC AAA CTC CCC AGC AC	GGT GAG CCA AAA ACC TGG TA
MCSP	CTG TGT GAC CTG GAA GAG CA	GTC TTT TGA GGC TGC CTG TC
Melan-A	ATA AGC AGG TGG AGC ATT GG	GCT CAT CGG CTG TTG GTA TT
Nestin	TGG GAG CAA AGA TCC AAG AC	CAG GAG AAA CAG GGC CTA CA
S100B	CGT GGC AGG CAG TAG TAA CC	ATT CTG GAA GGG AGG GAG AC
TRP2	AAC CCT TCC AAA GCA TTC CT	CCA GCT GGG AAA CTG TCT GT

Geräte

DNA Engine Thermal Cycler	BioRad Laboratories, München
Floureszenzmikroskop Axiovert 200M	Zeiss, Göttingen
Geldokumentation	INTAS, Göttingen
Gelkammer	BioRad Laboratories, München
Invertmikroskop Olympus BX 41	Olympus, Hamburg
Medimaschine	DAKO Diagnostica, Hamburg
Mikromanipulator	Eppendorf, Hamburg
Zentrifugen (Centrifuge 5424 und 5810 R)	Eppendorf, Hamburg
MJ Research Thermal Cycler	BioRad Laboratories, München

Verbrauchsgegenstände

Acht-Felder-Objektträger	Fisher Scientific, Ingolstadt
Adhäsions-Objektträger	CLN, Niederhummeln
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim
Pipettenspitzen	CLN, Niederhummeln
Reaktionsgefäße 1,5 ml	CLN, Niederhummeln
Reaktionsgefäße 0,2 ml	ABgene House, Surrey, UK
Zentrifugenröhrchen 15 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifugenröhrchen 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht

2.4 Verwendete Abkürzungen

Formelgrößen wurden mit den international gebräuchlichen SI-Einheiten und chemische Elemente gemäß ihrer Bezeichnung im Periodensystem abgekürzt. Die Abkürzung gebräuchlicher Wörter der deutschen Sprache erfolgte nach dem Duden.

A	Adenin
AB	Albumin
ABCB5	ATP-binding cassette sub-family B member 5
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
APAAP	Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP/NBT	5-Bromo-4-chloroindol-3-ol Dihydrogenphosphatester-Mono-p-toluidiniumsalz Substratlösung
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serum Albumin
C	Cytosin
cDNA	komplementäre Desoxyribonucleinsäure
CGH	Komparative genomische Hybridisierung
CK	Zytokeratin
CTP	Cytidintriphosphat
Cy3	Cyanine Dye 3
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
dT	Desoxythymidin
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
DTZ	Disseminierte Tumorzelle
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF	Elongationsfaktor
g	Normfallbeschleunigung $g = 9,80665 \text{ m/s}^2$
G	Guanin

GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
Gp100	Glycoprotein 100
GTP	Guanosintriphosphat
HCl	Chlorwasserstoff
HE	Hämatoxylin-Eosin
HMB-45	Human Melanoma Black, Antikörper gegen gp100
H ₂ O dest	destilliertes Wasser
IgG ₁	Immunglobulin G ₁ (Isotypkontrolle)
Jarid1B	Jumonji AT-rich interactive domain 1B
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
LK	Lymphknoten
MCSP	Melanoma-associated Chondroitin Sulfate Proteoglycan
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MOPC 21	Mouse Oocyte Plasmocytom, IgG ₁ -Isotyp-AK
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Natriumhydrogenphosphat
PBS	Phosphate buffered Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PNA	Peptide Nucleic Acid (Peptid-Nukleinsäure)
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	Revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Reverse Transkriptase
SS II RT	SuperScript II Reverse Transkriptase
T	Thymin
TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
TdT	Terminale deoxynucleotidyl Transferase
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Trishydroxymethyl
tRNA	Transfer Ribonukleinsäure
TRP2	Tyrosinase-related protein 2
TTP	Tymidintriphosphat
U	Uracil
UTP	Uridintriphosphat

3 Ergebnisse

3.1 Patienten

Im Rahmen dieser Arbeit wurden vom 22. Juli 2009 bis zum 17. März 2010 Gewebeproben aus den Wächterlymphknoten von 51 an malignem Melanom erkrankten Patienten isoliert. Des Weiteren fließen in diese Arbeit Gewebeproben von 57 Melanompatienten mit ein, die im Vorfeld im Rahmen der biologischen Doktorarbeit von Sebastian Scheitler isoliert wurden (09. September 2008 bis 10. Juli 2009). Bei 83 der insgesamt 108 Patienten wurde intraoperativ je ein Wächterlymphknoten identifiziert und entfernt, bei 24 Patienten waren zwei und bei einem Patienten drei Wächterlymphknoten vorhanden, sodass insgesamt 134 Gewebeproben für die weiteren Analysen zur Verfügung standen. Die Biopsie der Wächterlymphknoten wurde jeweils nach kompletter Resektion des Primärtumors vorgenommen. Da die Resektion des Primärtumors nicht in allen Fällen am Universitätsklinikum Regensburg durchgeführt wurde, fehlten bei manchen Patienten verschiedene Angaben zu den klinischen Daten des Primärtumors. Eine Ulzeration des Primärtumors war nur bei Patienten aufgeführt, bei denen diese klinisch beobachtet wurde. Daher wurde der Primärtumor aller Patienten, bei denen zu diesem prognostischen Faktor keine Angabe gemacht worden war, als nicht ulzeriert eingestuft. Neun Gewebeproben enthielten nicht genügend Zellen für die Immunfluoreszenzfärbung und wurden aus der folgenden Analyse ausgeschlossen. In drei dieser Fälle war ein zweiter Wächterlymphknoten vorhanden, der bearbeitet werden konnte, die anderen sechs Patienten wurden aus der weiteren Auswertung ausgeschlossen, sodass am Ende 102 Patienten in die vorliegende Studie eingeschlossen werden konnten (siehe Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1 Klinische Merkmale aller 102 Patienten

	Anzahl der Patienten	Median	Bereich	Interquartilenbereich
Geschlecht				
männlich	50 (49,0 %)			
weiblich	52 (51,0 %)			
Alter (Jahre)		53,0	19-79	25
Tumordicke nach Breslow (mm)		1,65	0,2-11,0	1,68
keine Angabe	6 (5,9 %)			
I (<0,75 mm)	9 (8,8 %)			
II (0,76 mm-1,5 mm)	35 (34,3 %)			
III (1,51 mm-4,0 mm)	38 (37,3 %)			
IV (>4,0 mm)	14 (13,7 %)			
Ulzeration				
ja	24 (23,5 %)			
nein	78 (76,5 %)			
Clark Level				
keine Angabe	13 (12,7 %)			
1	0 (0,0 %)			
2	5 (4,9 %)			
3	25 (24,5 %)			
4	57 (55,9 %)			
5	2 (2,0 %)			
Tumor-Stage				
keine Angabe	28 (27,5 %)			
T1a	8 (7,8 %)			
T1b	1 (1,0 %)			
T2a	25 (24,5 %)			
T2b	4 (3,9 %)			
T3	1 (1,0 %)			
T3a	13 (12,7 %)			
T3b	10 (9,8 %)			
T4	1 (1,0 %)			
T4a	4 (3,9 %)			
T4b	7 (6,9 %)			
MCSP				
positiv	64 (62,7 %)			
negativ	38 (37,3 %)			
HMB-45 (84 Patienten)				
positiv				
negativ	38 (45,2 %)			
	46 (54,8 %)			
DCCD MCSP		5	1-400000	10
DCCD HMB-45		2	1-500000	36

3.2 Aufarbeitung der Gewebeprobe

3.2.1 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung zum Nachweis des Oberflächenantigens MCSP auf disseminierten Tumorzellen

Nach der Lymphknotenentnahme wurde die Gewebeprobe aufgeteilt. Während eine Hälfte der Gewebeprobe die Routinediagnostik in der Abteilung für Pathologie durchlief, wurde bei der anderen Hälfte zum Nachweis disseminierter Tumorzellen (DTZ) die indirekte Immunfluoreszenzfärbung zum Nachweis des Antigens Melanoma-associated Chondroitin Sulfate Proteoglycan (MCSP) durchgeführt. Da MCSP ein Oberflächenantigen ist, war es nicht nötig, die Zellmembran zu zerstören, um das Antigen für die Antikörper der Immunfluoreszenzfärbung zugänglich zu machen. Dadurch konnten bei der MCSP-Immunfluoreszenzfärbung lebende Zellen gewonnen werden, in denen neben der Analyse der genomischen DNA zusätzlich die Untersuchung der Expression von mRNA möglich war. Hier lag der Vorteil dieser Färbung im Gegensatz zu anderen, wie der Färbung gegen das intrazelluläre Antigen gp100 mit dem Antikörper HMB-45.

Vor der MCSP-Immunfluoreszenzfärbung wurde die Gewebeprobe mechanisch in Einzelzellen zerteilt und eine Zellsuspension hergestellt. Zur Detektion MCSP-positiver Zellen kam ein monoklonaler Antikörper aus der Maus zum Einsatz, der im darauf folgenden Schritt mit einem Cy3-konjugierten Sekundärantikörper fluoreszierend markiert wurde (Abbildung 3.1).

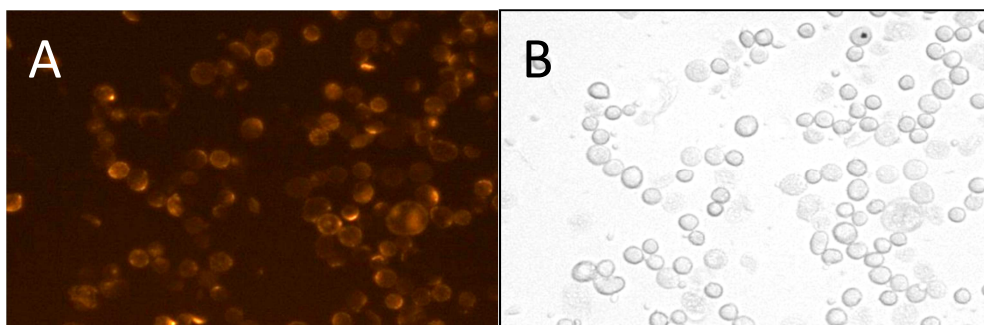


Abbildung 3.1 MCSP-Immunfluoreszenzfärbung von Zellen der Melanomzelllinie Mel-Juso

A Orangefarben fluoreszierende Zellen in einer Zellsuspension nach Färbung mit dem Cy3-gekoppelten Antikörperklon 9.2.27 gegen MCSP. Gut erkennbar ist die Lokalisation von MCSP an der Zelloberfläche. *B* Durchlicht-Mikroskopie des gleichen Bildausschnitts.

Enthielt der Lymphknoten eine ausreichende Anzahl von Zellen (>2 Millionen), so wurden pro Gewebeprobe zwei Millionen Zellen gefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Mithilfe eines Mikromanipulators wurden diese positiven Zellen für weitere Analysen aus der Zellsuspension isoliert. Das Protokoll dieser Färbung wurde im Rahmen der Doktorarbeit von Sebastian Scheitler etabliert und an den Gewebeproben aller 102 ausgewerteten Patienten gleich ausgeführt (Ergebnisse siehe Tabelle 3.1).

3.2.1.1 Anzahl MCSP-positiver Zellen in befallenen Lymphknoten

Im Regelfall wurden zwei Millionen Zellen gefärbt und unter dem Mikroskop bewertet, was jedoch nicht bei allen Gewebeproben möglich war. Um einen vergleichbaren Wert zu erhalten, wurde die Zahl gefundener MCSP-positiver Zellen in jedem bearbeiteten Lymphknoten auf eine Million betrachteter Zellen extrapoliert. Dieser Wert ging als „Disseminated Cancer Cell Density“ (DCCD) in die Auswertung mit ein. Die Zahl MCSP-positiver Zellen befand sich im Bereich zwischen 1 und 400 000 pro Million mit einem Median von 5 MCSP-positiven Zellen pro Million in befallenen Lymphknoten (siehe Abbildung 3.2). Der DCCD wurde während des Mikroskopierens ausgezählt, einzig der Wert bei 400 000 entstand durch eine prozentuale Bestimmung, da eine Zählung aufgrund der großen Zellzahl nicht mehr praktikabel war.

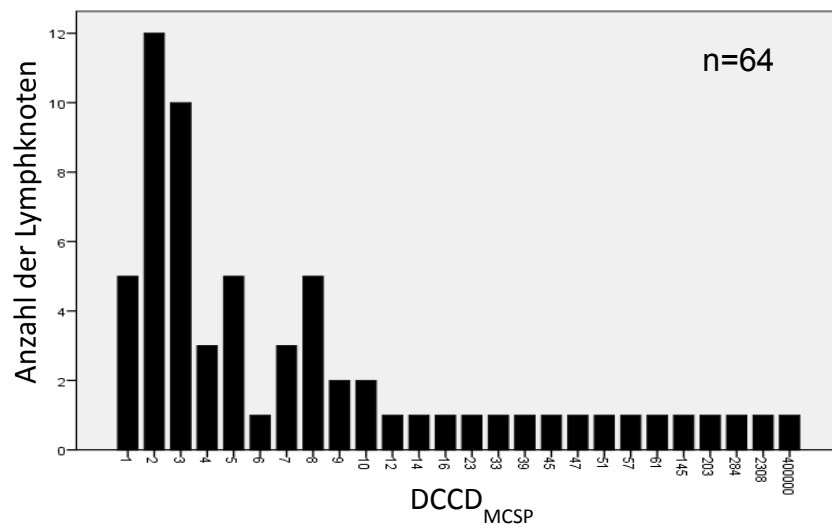


Abbildung 3.2 Verteilung der Anzahl MCSP-positiver Zellen

Verteilung der Anzahl MCSP-positiver Zellen in den 64 positiven Lymphknoten pro 10⁶ Lymphknoten-zellen

3.2.1.2 Unterscheidung MCSP-positiver Zellen nach ihrer Morphologie

Beim Mikroskopieren der Zellsuspensionen fiel die heterogene Morphologie MCSP-positiver Zellen auf. Ein Teil der Lymphknoten mit verdächtigen Zellen enthielt schwach bis kräftig fluoreszierende Zellen, die der Größe der umgebenden Lymphozyten entsprachen (Mittelwert 7,54 μm , Standardabweichung 0,94 μm). Der andere Teil enthielt kräftig fluoreszierende Zellen mit in etwa dem doppelten Durchmesser der Lymphozyten (Mittelwert 14,63 μm , Standardabweichung 2,07 μm) (siehe Abbildung 3.3). Für die Bestimmung der Größe wurden je 25 große und 25 kleine Zellen gemessen und der Mittelwert gebildet. Elf Lymphknoten enthielten große Zellen, 48 wiesen kleine Zellen auf und in den Zellsuspensionen von fünf Lymphknoten wurden beide Zellarten gefunden.

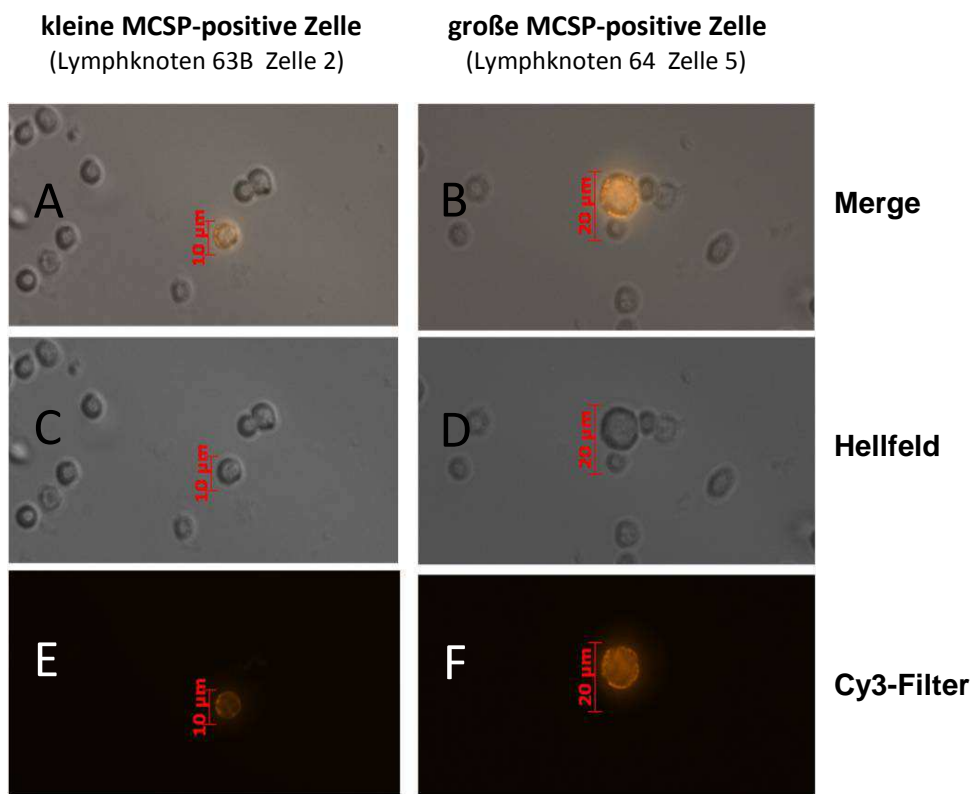


Abbildung 3.3 Kleine und große MCSP-positive Zelle in einem Wächterlymphknoten

In jeder Spalte wird exemplarisch je eine kleine und eine große MCSP-positive Zelle dargestellt. **A,C,E** Lymphknoten 63B Zelle 2: Die kleine Zelle ist im Cy3-Filter (F) deutlich als MCSP-positiv zu erkennen. Im Hellfeld (C) lässt sich die kleine Zelle nicht von umgebenden Zellen unterscheiden. Legt man beide Filter übereinander (A), so lässt sich die Position der kleinen MCSP-positiven Zelle im Bezug zu den nicht angefärbten Zellen bestimmen. **B,D,F** Lymphknoten 64 Zelle 5: Im Cy3-Filter (F) stellt sich die große MCSP-positive Zelle kräftig fluoreszierend dar. Die Zelle mit etwa dem doppelten Durchmesser wie die umgebenden Zellen erkennt man an der gleichen Position auch in der Durchlichtmikroskopie (D). Die Position wird bestätigt wenn beide Filter übereinandergelegt werden (B).

In Lymphknoten, die große Zellen enthielten, lag die Anzahl MCSP-positiver Zellen (Median 51) signifikant höher als bei einem Fund von kleinen MCSP-positiven Zellen (Median drei) (Chi-Quadrat, $p < 0,001$). Lymphknoten mit sowohl kleinen als auch großen MCSP-positiven Zellen lagen mit der Anzahl der MCSP-positiven Zellen (Median zwölf) zwischen diesen beiden Gruppen (siehe Abbildung 3.4). Für eine bessere Vergleichbarkeit von Gewebeproben mit morphologisch unterschiedlichen Zellen wurden die Gewebeproben mit beiden Zellarten in der weiteren Auswertung den Proben mit großen Zellen zugerechnet.

Der Median des $DCCD_{MCSP}$ aller 64 MCSP-positiven Lymphknoten lag bei fünf positiven Zellen pro Million. Alle elf Lymphknoten mit großen Zellen wiesen einen $DCCD_{MCSP}$ auf, der höher war als der Median der Gesamtheit MCSP-positiver Lymphknoten (siehe Tabelle 3.2).

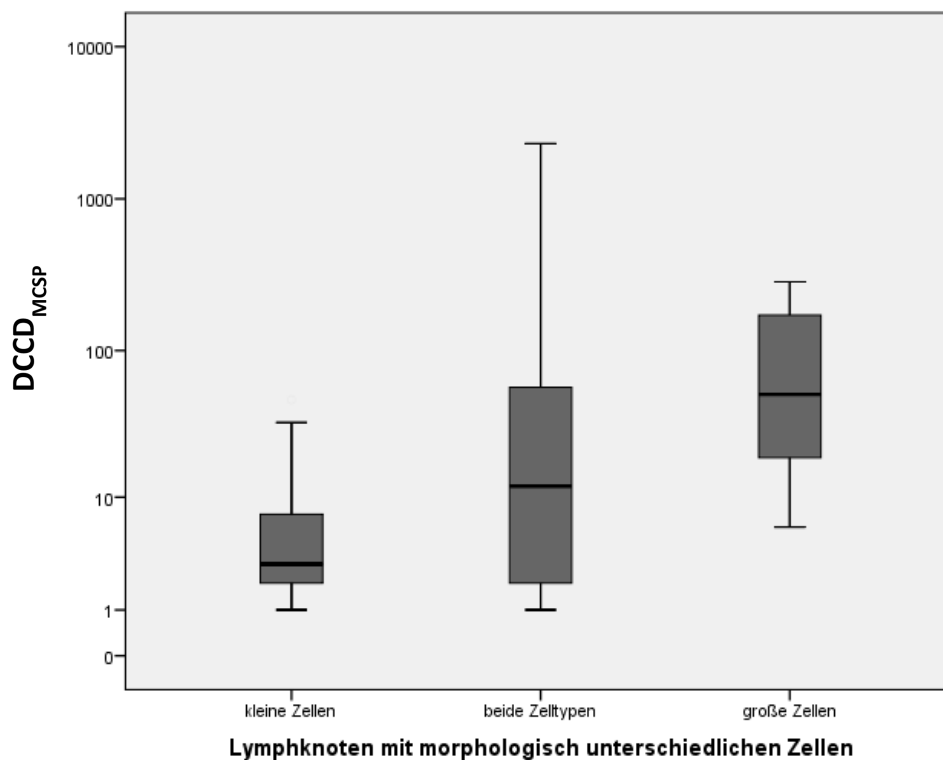


Abbildung 3.4 Verteilung des $DCCD_{MCSP}$ in Lymphknoten mit morphologisch unterschiedlichen Zellen

Die Balken schließen den $DCCD_{MCSP}$ von je 50 % der betrachteten Lymphknoten mit morphologisch unterschiedlichen Zelltypen ein, die Linien markieren die Spannweite. Der Median wird durch die schwarze Linie markiert und lag bei großen Zellen signifikant höher als bei kleinen Zellen (Chi-Quadrat, $p < 0,001$). Um die Darstellung übersichtlich zu halten, sind Ausreißer mit über 10000 positiven Zellen pro Million in dieser Abbildung nicht dargestellt. In die Berechnungen wurden diese Werte miteinbezogen.

Tabelle 3.2 Anzahl MCSP-positiver Zellen in Lymphknoten mit morphologisch unterschiedlichen Zellen

	große Zellen n=11	beide Zelltypen n=5	kleine Zellen n=48
DCCD_{MCSP} >5	11 (100 %)	3 (60 %)	15 (31,3 %)
DCCD_{MCSP} <5	0	2 (40 %)	33 (68,7 %)
DCCD_{MCSP} Median	51	12	3
Spannweite des DCCD_{MCSP}	6-400.000	1-2308	1-47

3.2.2 Nachweis gestreuter Tumorzellen durch die Immunzytochemische Färbung zum Nachweis des Antigens HMB-45

In einer dieser Studie vorausgegangenen Arbeit (Promotionsarbeit von Isabelle Hodak) diente eine immunzytochemische Färbung mit dem Antikörper HMB-45 gegen das intrazelluläre Antigen gp100 zum Nachweis gestreuter Melanomzellen im Wächterlymphknoten. Um die Ergebnisse aus der MCSP-Immunfluoreszenzfärbung zu überprüfen, wurde parallel eine Färbung mit HMB-45 durchgeführt. Für den immunzytochemischen Nachweis disseminierter Tumorzellen wurden Adhäsionsobjektträger mit der aus der Gewebeprobe gewonnenen Zellsuspension beschichtet. Da bei 22 Patienten die Zellzahl der Gewebeprobe so gering war, dass sie nur zur Auswertung der MCSP-Färbung ausreichte, konnte in diesen Fällen die Immunzytochemie gegen gp100 nicht durchgeführt werden. Wenn möglich, wurden in der HMB-45-Färbung eine Million Zellen bewertet. In manchen Fällen standen für die Auswertung jedoch nur noch eine halbe Million Zellen zur Verfügung, daher wurde in diesen Fällen das Ergebnis auf eine Million Zellen hochgerechnet. Um eine unspezifische Färbung auszuschließen, wurde parallel bei jeder Gewebeprobe auch immer eine Negativkontrolle (IgG₁-Isotypkontrolle mit MOPC21) mitgeführt. Bei zwei Patienten wurden in dieser Negativkontrolle unspezifisch gefärbte Zellen gefunden, weshalb diese Gewebeproben aus der weiteren Auswertung der HMB-45-Färbung ausgeschlossen wurden. Letztlich war der Vergleich beider Färbungen bei 84 von 108 Patienten

(77,8 %) möglich. Bei diesen 84 Patienten war die Gewebeprobe in 64,3 % der Fälle positiv für MCSP-gefärbte Zellen, der Anteil MCSP-positiver Gewebeproben war bei den 84 Gewebeproben somit fast gleich dem Anteil bei allen 102 Gewebeproben (62,7 %), sodass die Ergebnisse vergleichbar sind. Insgesamt befanden sich in den Gewebeproben von 38 der 84 auswertbaren Patienten HMB-45-positive Zellen.

Lymphknoten mit MCSP-positiven Zellen enthielten signifikant oft auch HMB-45-positive Zellen (Chi-Quadrat, $p < 0,001$) (siehe Tabelle 3.3).

Tabelle 3.3 Nachweis HMB-45-positiver Zellen bezogen auf die Ergebnisse der MCSP-Färbung

		HMB-45-Färbung		
		negativ	positiv	Gesamt
MCSP-Färbung	negativ	26	4	30
	positiv	20	34	54
	Gesamt	46	38	84

Chi-Quadrat, $p < 0,001$

Der größte Unterschied beim Nachweis gestreuter Tumorzellen durch die beiden Färbemethoden bestand bei Gewebeproben, die kleine MCSP-positive Zellen enthielten. In diesen Fällen konnten bei 42,5 % keine HMB-45-positiven Zellen gefunden werden. Bei Lymphknoten mit großen MCSP-positiven Zellen zeigte sich jedoch ein Trend zu einem positiven Ergebnis in der HMB-45-Färbung (Chi-Quadrat, $p = 0,160$). Auch zeigte sich ein Zusammenhang zwischen morphologisch großen MCSP-positiven Zellen und einer hohen Anzahl HMB-45-positiver Zellen (siehe Abbildung 3.5). Es bestand ein signifikanter Unterschied in der Verteilung der Anzahl HMB-45-positiver Zellen in Lymphknoten mit großen und kleinen MCSP-positiven Zellen (Mann-Whitney-U-Test, $p = 0,003$).

In Vergleichen zwischen Routinediagnostik und HMB-45-Färbung konnte in einer Studie gezeigt werden, dass ab einem $DCCD > 100$ von der Bildung von Lymphknotenkolonien auszugehen ist (Scheitler, Hodak et al., Manuskript eingereicht, bislang unveröffentlicht). In der HMB-45-Färbung trat ein $DCCD > 100$ bei neun Lymphknoten auf. Von diesen neun Lymphknoten enthielten sieben Lymphknoten (77,8 %) große und zwei Lymphknoten (22,2 %) kleine MCSP-positive Zellen. Bei alle Lymphknoten mit einem $DCCD_{HMB-45} > 100$ wurde in der Routinediagnostik eine Lymphknotenbeteiligung nachgewiesen.

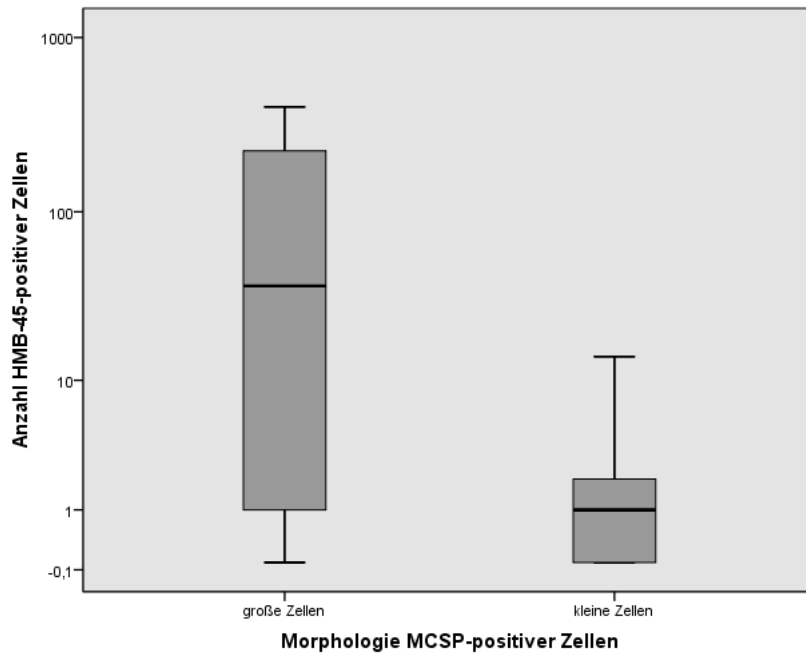


Abbildung 3.5 Verteilung der Anzahl HMB-45-positiver Zellen in Lymphknoten mit großen und kleinen MCSP-positiven Zellen

Der Median HMB-45-positiver Zellen lag bei Lymphknoten mit großen (Median 93,5) signifikant höher als bei Lymphknoten mit kleinen MCSP-positiven Zellen (Median eins).

Für eine Analyse der genomischen DNA der HMB-45-positiven disseminierten Tumorzellen, welche Gegenstand der Arbeit von Isabelle Hodak und Sebastian Scheitler war, wurden diese Zellen durch Mikromanipulation mit einer Glaskapillare isoliert (siehe Abbildung 3.6). Das ermöglichte eine vergleichende Untersuchung der genomischen Veränderungen von MCSP- und HMB-45-positiven Zellen des gleichen Patienten.

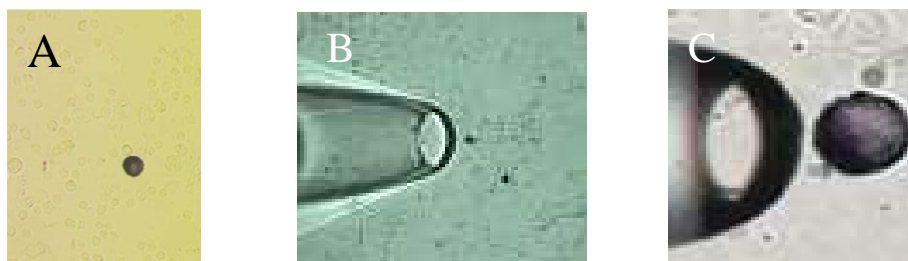


Abbildung 3.6 Isolation einer HMB-45-positiven Zelle

A Die blau angefärbte Zelle unterscheidet sich in ihrer Größe deutlich von den umgebenden Zellen, die die Färbung nicht angenommen haben. **B, C** Mithilfe einer Glaskapillare wird die HMB-45-positive Zelle isoliert.

HMB-45-positive Zellen wiesen keinen Unterschied bezüglich ihrer Morphologie auf. Alle HMB-45-positiven Zellen waren größer als die umgebenden Lymphozyten und stark gefärbt. Die Anzahl positiver Zellen lag im Bereich zwischen eins und 500 000 mit einem Median von zwei HMB-45-positiven Zellen pro Million. Die Anzahl HMB-45-positiver Zellen pro Million korrelierte positiv mit der Anzahl MCSP-positiver Zellen (Spearman $\rho=0,543$, $p<0,001$) (siehe Abbildung 3.7).

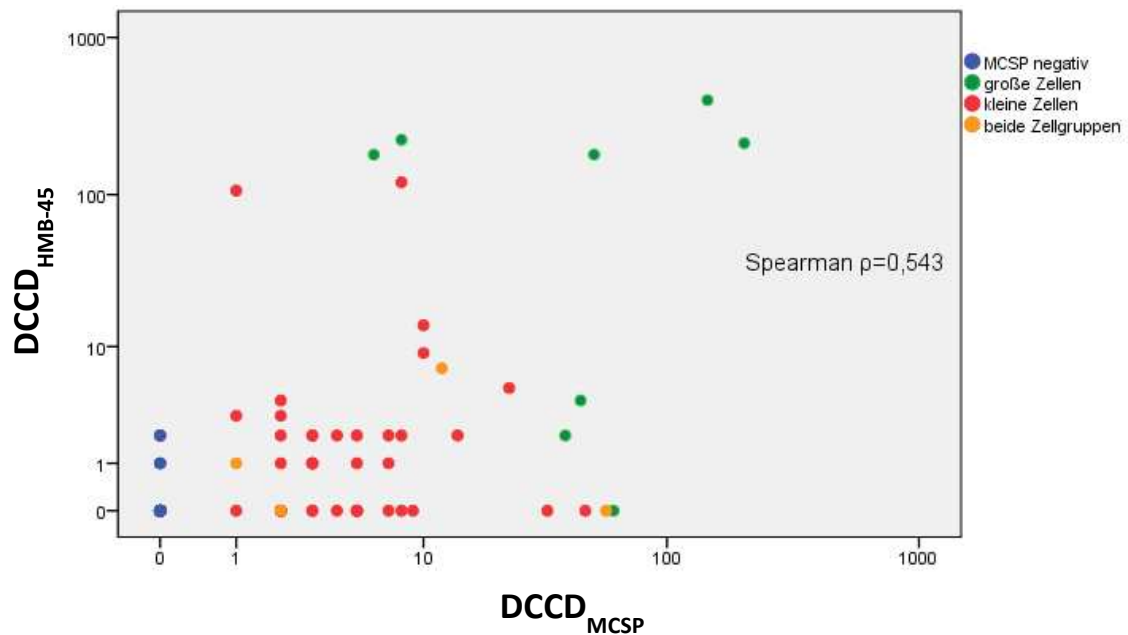


Abbildung 3.7 Verteilung des DCCD bei HMB-45- und MCSP-positiven Lymphknoten

Positive Korrelation HMB-45-positiver Zellen mit der Anzahl MCSP-positiver Zellen (Spearman $\rho=0,543$, $p<0,001$).

3.2.3 Vergleich der Ergebnisse aus Immunfluoreszenz und Immunzytochemie mit der Routinediagnostik in der Abteilung für Pathologie

Die Zellsuspension für die Immunfluoreszenzfärbung zum Nachweis von MCSP-positiven Zellen wie auch für die Immunzytochemie zum Nachweis HMB-45-positiver Zellen wurde aus einer Hälfte des Wächterlymphknotens hergestellt. Die andere Hälfte der Gewebeprobe durchlief die Routinediagnostik in der Abteilung für Pathologie. Diese Aufteilung der Gewebeprobe ermöglichte einen Vergleich der Ergebnisse von drei unterschiedlichen Methoden der Lymphknotenaufarbeitung. Die Aufarbeitung der Gewebeprobe in der Abteilung für Pathologie bestand aus der Anfertigung von

Gewebeblöcken im Abstand von 1 mm. Aus jedem Block wurde je ein Gewebeschnitt von 3-5 µm Dicke immunhistochemisch mit Antikörpern gegen HMB-45, S100B und Melan-A gefärbt. Zusätzlich wurde aus jedem Block ein Schnitt, bei einem negativen Ergebnis zur Kontrolle mehrere Schnitte, mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Die Diagnose pN1 erhielten Patienten, in deren Gewebeprobe Einzelzellen, Mikro- (bis 0,2 cm) oder Makrometastasen (größer 0,2 cm) nachgewiesen werden konnten.

Die Routinediagnostik in der Abteilung für Pathologie zeigte bei 26 von 102 Patienten (25,5 %) eine Lymphknotenbeteiligung der malignen Erkrankung. Durch die Methode der Immunfluoreszenzfärbung konnten bei 64 Patienten (62,7 %) MCSP-positive Zellen nachgewiesen werden. Die Methode der Immunfluoreszenzfärbung ermöglichte somit scheinbar signifikant häufiger den Nachweis eines Lymphknotenbefalls (Chi-Quadrat, $p=0,028$). Hier stellte sich jedoch die Frage, ob wirklich alle MCSP-positiven Zellen disseminierten Tumorzellen entsprachen, was weiter abgeklärt werden musste (siehe 3.3.1).

Insgesamt wurden MCSP-positive Zellen 2,46-fach häufiger gefunden als eine Lymphknotenbeteiligung durch die Routinediagnostik in der Abteilung für Pathologie nachgewiesen werden konnte (siehe Abbildung 3.8).

Bei den 84 der 108 Patienten, bei denen zusätzlich zur MCSP-Immunfluoreszenz auch die HMB-45-Immunzytochemie durchgeführt werden konnte, zeigte sich, dass die HMB-45-Färbung wie auch die MCSP-Färbung im Vergleich zur Routinediagnostik signifikant häufiger gefärbte Zellen in den Lymphknoten zeigten (Chi-Quadrat, $p=0,001$) (siehe Abbildung 3.8). Ebenfalls korrelierte eine hohe Anzahl HMB-45-positiver Zellen mit der Diagnose pN1 (Mann-Whitney-U-Test, $p<0,001$). Wies die Gewebeprobe mehr HMB-45-positive Zellen als den Median von zwei auf, so erbrachte die Routinediagnostik signifikant häufiger ein positives Ergebnis (Chi-Quadrat, $p<0,001$).

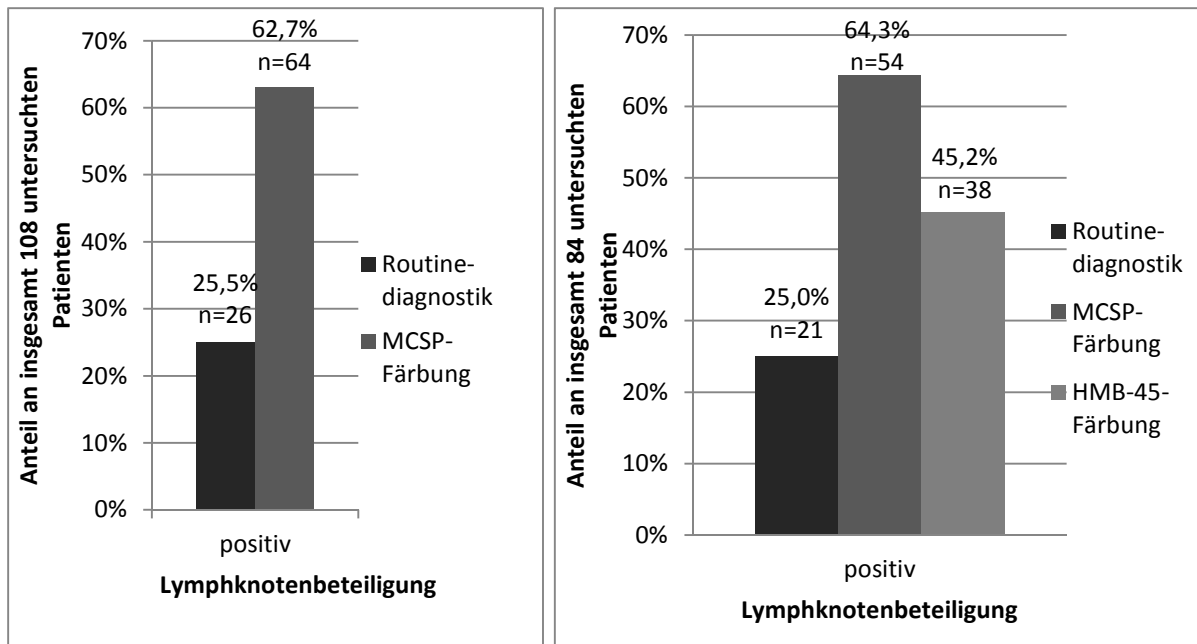


Abbildung 3.8 Nachweis einer Lymphknotenbeteiligung bei Routinediagnostik und MCSP-Färbung sowie HMB-45-Färbung

Dargestellt sind die Ergebnisse aus Routinediagnostik und MCSP-Färbung sowie HMB-45-Färbung. MCSP-positive Zellen traten 2,46-fach häufiger auf als verdächtige Zellen in der Routinediagnostik. HMB-45-positive Zellen traten 1,81-fach häufiger auf als verdächtige Zellen in der Routinediagnostik.

Bei der Auswertung des $DCCD_{MCSP}$ fiel ein Zusammenhang zwischen einer hohen Zellzahl und einem positiven Ergebnis in der Routinediagnostik auf. Die mediane Anzahl MCSP-positiver Zellen pro Million bei einem negativen Resultat in der Routinediagnostik war 2, während bei einem positiven Ergebnis im Median 8 MCSP-positive Zellen gefunden wurden (siehe Abbildung 3.9). Die Verteilung der Anzahl MCSP-positiver Zellen unterschied sich signifikant in Lymphknoten mit der Diagnose pN1 und pN0 (Mann-Whitney-U-Test, $p=0,001$).

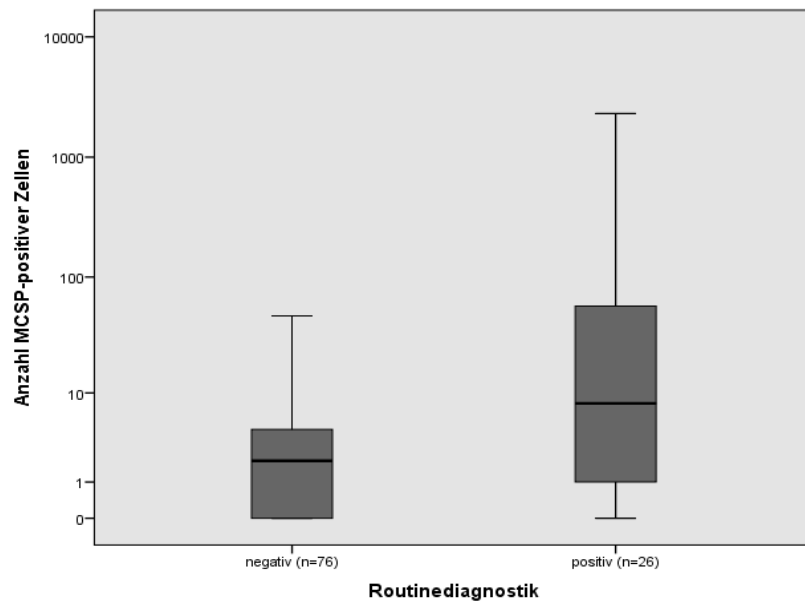


Abbildung 3.9 Verteilung des $DCCD_{MCSP}$ in Lymphknoten, die in der Routinediagnostik positiv beziehungsweise negativ waren

Signifikanter Unterschied der Verteilung der Anzahl MCSP-positiver Zellen in Routinediagnostik-positiven und -negativen Lymphknoten (Mann-Whitney-U-Test, $p=0,001$).

Auch die Morphologie der MCSP-positiven Zellen zeigte einen Zusammenhang mit den Ergebnissen in der Abteilung für Pathologie. So wurden alle elf Gewebeproben mit großen MCSP-positiven Zellen in der Pathologie positiv befundet, von den 48 Lymphknoten mit kleinen Zellen erhielten nur acht die Diagnose pN1 (siehe Abbildung 3.10). Daraus folgt, dass Patienten, deren Lymphknoten ausschließlich große MCSP-positive Zellen enthielten, signifikant häufiger die Diagnose pN1 erhielten (Chi-Quadrat, $p<0,001$). Bei Lymphknoten, welche sowohl große als auch kleine MCSP-positive Zellen enthielten konnte in der Routinediagnostik bei 2 von 5 ein Lymphknotenbefall nachgewiesen werden.

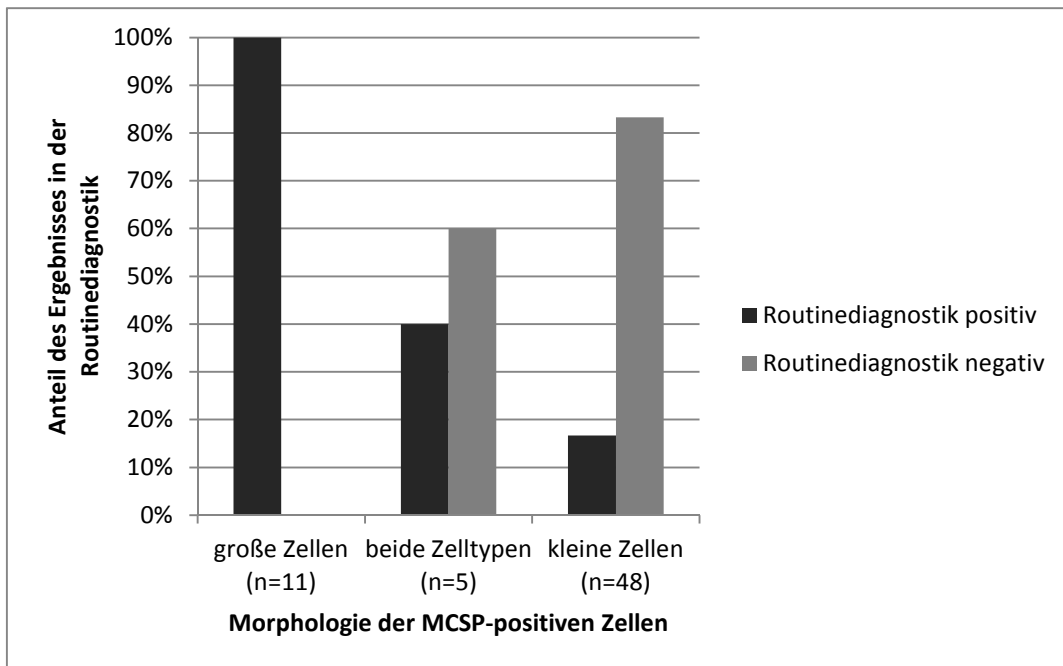


Abbildung 3.10 Auftretenshäufigkeit der Ergebnisse der Routinediagnostik bei Lymphknoten mit morphologisch unterschiedlichen MCSP-positiven Zellen

Alle Lymphknoten, die große MCSP-positive Zellen enthielten, wurden in der Routinediagnostik als positiv eingestuft. Lymphknoten mit beiden Zelltypen waren zu 40 % in der Routinediagnostik positiv, während Lymphknoten mit kleinen Zellen nur in 16,7 % der Fälle die Diagnose pN1 erhielten.

3.2.4 Zusammenhang von Patientencharakteristika mit den Ergebnissen aus Pathologie, Immunfluoreszenzfärbung und Immunzytochemie

Einige klinische Daten des Tumors, darunter auch der Status des Wächterlymphknotens, sind von prognostischer Bedeutung für den Patienten. Daher war es von Interesse, ob ein Zusammenhang zwischen verschiedenen Charakteristika von Patient und Primärtumor und den Ergebnissen der drei Nachweismethoden für disseminierte Tumorzellen den Wächterlymphknoten betreffend bestand. Die betrachteten Eigenschaften des Patienten waren Geschlecht und Alter bei Lymphknotenentnahme. Als Charakteristika des Primärtumors wurden Ulzeration, Clark Level und die Tumordicke nach Breslow gewählt.

Die Ergebnisse der Pathologie korrelierten positiv mit der Tumordicke nach Breslow (Mann Whitney-U-Test, $p < 0,001$). Patienten mit einem Primärtumor dicker als der Median von 1,65 mm erhielten signifikant häufiger die Diagnose pN1 in der Routinediagnostik (Chi-Quadrat $p = 0,02$). Der Nachweis MCSP-positiver Zellen korrelierte

nicht mit der Tumordicke, auch nicht die Anzahl MCSP-positiver Zellen in der Gewebeprobe (Spearman $\rho=0,154$, $p=0,134$). In der HMB-45-Immunzytochemie zeigte sich wie bei der MCSP-Immunfluoreszenz kein Zusammenhang zur Tumordicke. Für die weiteren untersuchten Charakteristika von Patient und Primärtumor konnte sowohl für die Routinediagnostik als auch für die Immunfluoreszenzfärbung und die Immunzytochemie kein Zusammenhang nachgewiesen werden (siehe Tabelle 3.4).

Tabelle 3.4 Zusammenhang von Patientencharakteristika mit den Ergebnissen der drei Nachweismethoden für disseminierte Tumorzellen

		Routine-diagnostik n=102			MCSP-Färbung n=102			HMB-45-Färbung n=84		
		positiv	negativ	p-Wert	positiv	negativ	p-Wert	positiv	negativ	p-Wert
Geschlecht	m	11	39		27	23		21	20	
	w	15	37	0,428 ^a	37	15	0,073 ^a	17	26	0,282 ^a
Alter	Median (Jahre)	55,5	53,0	0,806 ^b	51,0	55,0	0,060 ^b	56,0	48,2	0,200 ^b
Ulzeration		9	15	0,123 ^a	18	6	0,156 ^a	9	10	0,832 ^a
Clark Level	1	0	0		0	0		0	0	
	2	0	5		1	4		1	3	
	3	6	19	0,491 ^a	17	8	0,234 ^a	8	13	0,675 ^a
	4	15	42		36	21		23	23	
	5	1	1		1	1		1	1	
Tumordicke nach Breslow	Median (mm)	2,6	1,4	<0,001 ^b	1,8	1,4	0,082 ^b	1,8	1,4	0,122 ^b

^a Chi-Quadrat

^b Mann-Whitney-U

Es konnte jedoch ein Zusammenhang zwischen Zellmorphologie und der Tumordicke nach Breslow (Mann-Whitney-U-Test, $p=0,049$) aufgezeigt werden. Große Zellen traten signifikant häufiger auf, wenn der Durchmesser des Primärtumors größer war als der Median von 1,65 mm (Chi-Quadrat, $p=0,050$). Außerdem waren große Zellen signifikant mit einem höheren Patientenalter assoziiert (Mann-Whitney-U-Test, $p=0,043$) (siehe Tabelle 3.5).

Tabelle 3.5 Zusammenhang von Patientencharakteristika mit der Zellmorphologie MCSP-positiver Zellen

		MCSP-positiv n=64	
		groß	klein
Geschlecht	m	8	19
	w	8	29
Chi-Quadrat		p=0,534	
Alter	Median (Jahre)	61,5	46,0
	Mann-Whitney-U		p=0,043
Ulzeration		5	13
	Chi-Quadrat		p=0,103
Clark Level	1	0	0
	2	0	1
	3	6	11
	4	7	29
	5	1	0
Chi-Quadrat		p=0,185	
Tumordicke nach Breslow	Median (mm)	2,8	1,6
	Mann-Whitney-U		p=0,049

3.3 Isolation disseminierter Tumorzellen, reverse Transkription der mRNA und Einzelzell-PCR

3.3.1 Isolation MCSP-positiver Zellen zur Analyse von Transkriptom und Genom

Da sich die Detektionsraten in der Routinediagnostik und bei beiden Färbemethoden so stark unterschieden, stellte sich die Frage, ob wirklich alle Zellen, die durch die MCSP-Färbung und die HMB-45-Immunzytochemie gefunden wurden, disseminierte Tumorzellen waren. In Analysen des Genoms HMB-45-positiver Zellen, die im Rahmen einer anderen Arbeit durchgeführt wurden, konnte gezeigt werden, dass

HMB-45-positive Zellen melanomtypische Veränderungen aufweisen (Ulmer et al., 2014; Ulmer et al., 2005).

Um die Bedeutung der MCSP-positiven Zellen zu klären, wurden Analysen des Transkriptoms dieser Zellen durchgeführt. Für die molekulare Analyse der MCSP-positiven Zellen mussten die einzelnen fluoreszenzmarkierten Zellen aus der Suspension isoliert werden. Dazu wurde die Zellsuspension auf einen Objektträger aufgebracht und so verteilt, dass die Zellen gut mit einer Glaskapillare unter mikroskopischer Kontrolle einzeln aufgesogen werden konnten. Fluoreszierende Zellen wurden dann in ein leeres Feld überführt, wo nochmals die Färbung und die Intaktheit der Zelle überprüft wurden. So konnte sichergestellt werden, dass wirklich einzelne lebende MCSP-positive Zellen isoliert wurden. Bei jedem Lymphknoten mit MCSP-positiven Zellen wurden als Kontrolle auch Zellpools und einzelne ungefärbte Zellen entnommen und parallel mit den positiven Zellen weiter bearbeitet.

Der nächste Schritt nach der Isolation einzelner disseminierter Tumorzellen war die Extraktion von mRNA und DNA. Nach der Auflösung der zellulären Membranen wurde die mRNA isoliert. Die DNA der Zelle wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für genomische Analysen konserviert. Die mRNA diente als Vorlage zur Synthese von cDNA, welche im letzten Schritt, der globalen Amplifikation, vervielfältigt wurde, um über genügend Material für PCR-Analysen zu verfügen. Abschließend musste überprüft werden, dass die Zelle bei der Überführung in das Reaktionsgefäß nicht verloren wurde und dass die mRNA der isolierten Zelle nicht geschädigt oder ungenügend amplifiziert war. Dazu diente eine Kontroll-PCR auf drei Haushaltsgene, also Gene, welche unabhängig von Zellzyklus und Zelltyp weitgehend konstant exprimiert werden. Die Expression des zellulären Strukturproteins β -Aktin, des Elongationsfaktors EF-1 α und des Enzyms Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) wurden als Kontrolle gewählt.

Insgesamt wurden 333 MCSP-positive Zellen isoliert, 140 davon im Rahmen der Doktorarbeit von Sebastian Scheitler. Um eine gute Qualität der mRNA analysierter Zellen zu garantieren, gingen in die weitere Genexpressionsanalyse nur Zellen ein, die nachweislich wenigstens zwei der drei Haushaltsgene EF-1 α , β -Aktin und GAPDH exprimierten. War eine Zelle sowohl für EF-1 α als auch für β -Aktin negativ, wurde die Expression von GAPDH nicht mehr überprüft, da die Zelle bei der Vereinzelung verloren gegangen oder die mRNA so geschädigt oder unzureichend

vervielfältigt war, dass sie für eine weitere Analyse der Genexpression nicht mehr in Frage kam. Insgesamt wiesen 126 der 333 MCSP-positiven Zellen eine gute Qualität der isolierten mRNA auf (siehe Tabelle 3.6).

Tabelle 3.6 Kontroll-PCR zum Nachweis der Expression der Haushaltsgene EF-1 α (E), β -Aktin (A) und GAPDH (G) bei MCSP-positiven Zellen

	E A G +++	E A G ++-	E A G +-+	E A G -++	E A G +--	E A G -+-	E A G --- --+ ---
MCSP- positive Zellen (n=333)	70 (21,0 %)	36 (10,8 %)	19 (5,7 %)	1 (0,3 %)	75 (22,5 %)	7 (2,1 %)	125 (37,5 %)

MCSP-negative Kontrollzellen wurden nur auf die Expression zweier Haushaltsgene untersucht (Tabelle 3.7). Für Negativkontrollen im weiteren Verlauf der Auswertung wurden nur Kontrollzellen verwendet, die nachweislich sowohl EF-1 α als auch β -Aktin exprimierten.

Tabelle 3.7 Kontroll-PCR zum Nachweis der Expression der Haushaltsgene EF-1 α (E) und β -Aktin (A) bei MCSP-negativen Zellen

	E A ++	E A +-	E A -+	E A --
MCSP-negative Zellen (n=127)	47 (37,0 %)	41 (32,3 %)	1 (0,8 %)	38 (29,9 %)

Auffällig war ein Unterschied in der Expression der Haushaltsgene bei morphologisch unterschiedlichen MCSP-positiven Zellen. Insgesamt waren 60 große und 66 kleine MCSP-positive Zellen in der Kontroll-PCR für wenigstens zwei Haushaltsgene positiv. Bei großen Zellen war davon die Kontroll-PCR in 80,0 % für die mRNA aller drei Haushaltsgene positiv. War die Zelle nur für zwei der drei Haushaltsgene positiv, fiel in den meisten Fällen (75 %) das Haushaltsgen GAPDH aus. Anders war das Verhältnis bei den kleinen Zellen. Hier waren von den 66 weiter analysierten Zellen nur 33,3 % in der Kontroll-PCR dreifach positiv (siehe Tabelle 3.8). Somit exprimierten die großen Zellen signifikant häufiger alle drei Haushaltsgene (Chi-Quadrat $p < 0,001$).

Tabelle 3.8 Expression der Haushaltsgene bei morphologisch unterschiedlichen Zellen, bezogen auf die 126 weiter analysierten Zellen

	drei Haushaltsgene	zwei Haushaltsgene
Große Zellen (n=60)	48 (80 %)	12 (20 %)
Kleine Zellen (n=66)	22 (33,3 %)	44 (66,7 %)

Chi-Quadrat, p<0,001

Neben der cDNA wurde bei den isolierten disseminierten Tumorzellen auch die DNA gewonnen, indem sie mit 100 % Ethanol aus den Überständen bei der Aufreinigung der mRNA gefällt wurde. Für die weitergehende genomische Analyse dieser Einzelzellen ist es genauso wie auch für die Genexpressionsanalyse nötig, das Ausgangsmaterial zunächst zu amplifizieren. Dies wurde mithilfe der globalen Genomamplifikation durchgeführt, die speziell für die Analyse von Einzelzellen entwickelt worden war (C. A. Klein et al., 1999). Diese globale Genomamplifikation basiert auf einer gleichmäßigen Fragmentation der gesamten DNA, der darauffolgenden Ligation eines Adapters und schließlich der Amplifikation des gesamten Genoms mithilfe eines einzigen Primers. Zur Kontrolle des Gelingens der Adapter-Linker-PCR wurde eine PCR zum Nachweis von zwei spezifischen MSE-Fragmenten (TP53 Exon 8/9 und CK19) durchgeführt (siehe Abbildung 3.11).

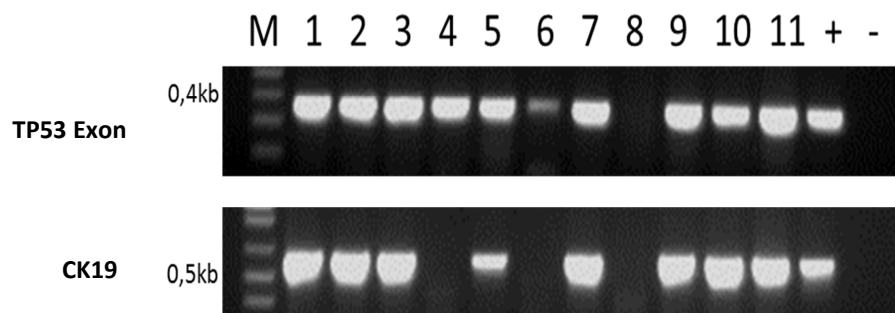


Abbildung 3.11 PCR zur Kontrolle der Adapter-Linker-PCR MCSP-positiver Zellen

Neben dem Marker (1kb-Leiter) sind von links nach rechts elf PCR-Amplifikate von Zellen, die im Zuge der MCSP-Immunfluoreszenzfärbung gewonnen worden waren, sowie Positiv- und Negativkontrolle aufgetragen.

Es zeigte sich, dass manche Zellen, die bei der Kontroll-PCR der cDNA keine Banden aufwiesen, trotzdem DNA enthielten und somit für die genomische Analyse

verwendet werden konnten. Andererseits traten auch Zellen auf, die mRNA enthielten, jedoch in der Kontroll-PCR der Adapter-Linker-PCR keine Banden aufwiesen (siehe Tabelle 3.9).

Tabelle 3.9 Vergleich der Ergebnisse der Kontroll-PCR für mRNA und DNA

	mRNA + DNA +	mRNA + DNA –	mRNA – DNA +	mRNA – DNA –	DNA verloren durch Stromaus- fall
Isolierte MCSP- positive Zellen (n= 333)	89 (26,7 %)	31 (9,3 %)	81 (24,3 %)	108 (32,4 %)	24 * (7,2 %)

* von diesen Zellen enthielten 6 mRNA

War die Kontroll-PCR für mRNA wie auch DNA mehrfach positiv, so war die isolierte Zelle intakt. Traten bei der Kontroll-PCR nur wenige Banden auf, deutete das auf einen schlechten Zustand der Zelle hin. Von einem Verlust der Zelle war auszugehen, wenn sowohl die Kontroll-PCR für mRNA als auch die Kontroll-PCR für DNA negativ ausfiel (siehe Abbildung 3.12).

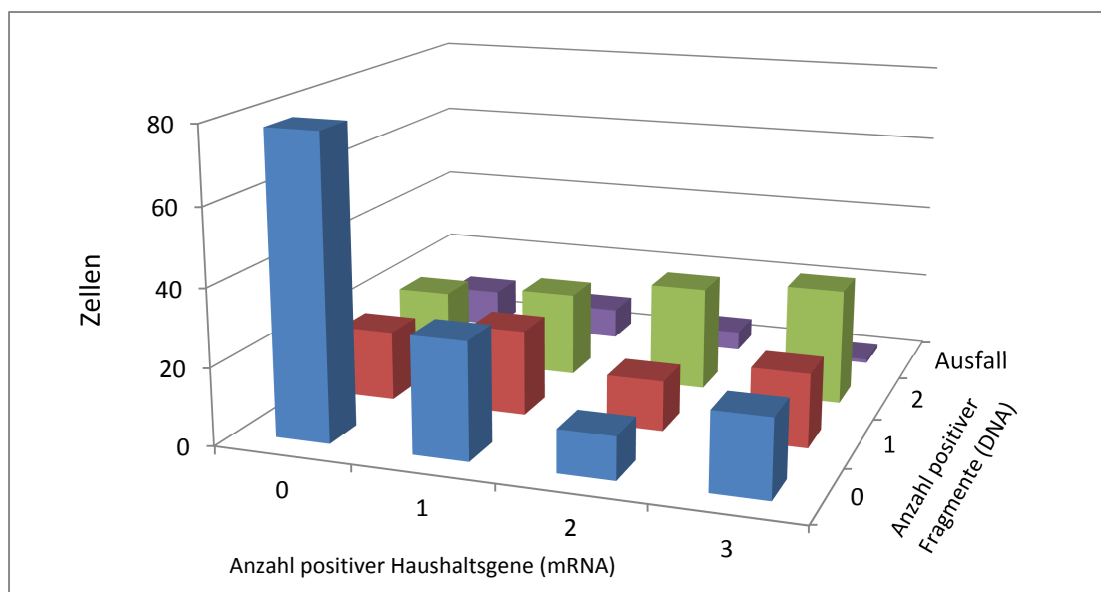


Abbildung 3.12 Vergleich der Ergebnisse der Kontroll-PCR auf m-RNA und DNA

Dargestellt sind die Anzahl gleichzeitig nachweisbarer Haushaltsgene und DNA-Fragmente der untersuchten MCSP-positiven Zellen. Bei Zellen mit einer mehrfach positiven Kontroll-PCR für mRNA und DNA ist von einer guten Qualität von Genom und Transkriptom auszugehen.

Insgesamt waren bei der Kontroll-PCR für DNA 170 von 333 Zellen positiv für wenigstens ein Fragment. 24 Zellen gingen für die weitere Analyse aufgrund eines längeren Stromausfalls während der Ligation der Adapter verloren (siehe Tabelle 3.10).

Tabelle 3.10 Ergebnisse der Kontroll-PCR der Adapter-Linker-PCR MCSP-positiver Zellen auf die beiden MSE-Fragmente TP53 Exon8/9 (T) und CK19 (C)

	T C ++	T C +-	T C -+	T C --	DNA verloren durch Stromaus- fall
Isolierte MCSP- positive Zellen (n= 333)	98 (29,4 %)	43 (12,9 %)	29 (8,7 %)	139 (41,7 %)	24 (7,2 %)

3.3.2 Isolation und globale Genomamplifikation von HMB-45-positiven Zellen

Bei den disseminierten Tumorzellen, die im Zuge der HMB-45-Immunzytochemie von Adhäsionsobjektträgern gewonnen worden waren, war keine Genexpressionsanalyse möglich. Die globale Genomamplifikation wurde bei diesen Zellen ohne eine vorge-schaltete Extraktion der mRNA durchgeführt. In der Kontroll-PCR wurde auf zwei spezifische MSE-Fragmente getestet, wobei bei 32 Zellen die MSE-Fragmente CK19 und TP53 Exon2/3 und bei 64 Zellen die MSE-Fragmente CK19 und TP53 Exon8/9 überprüft wurden (siehe Abbildung 3.13).

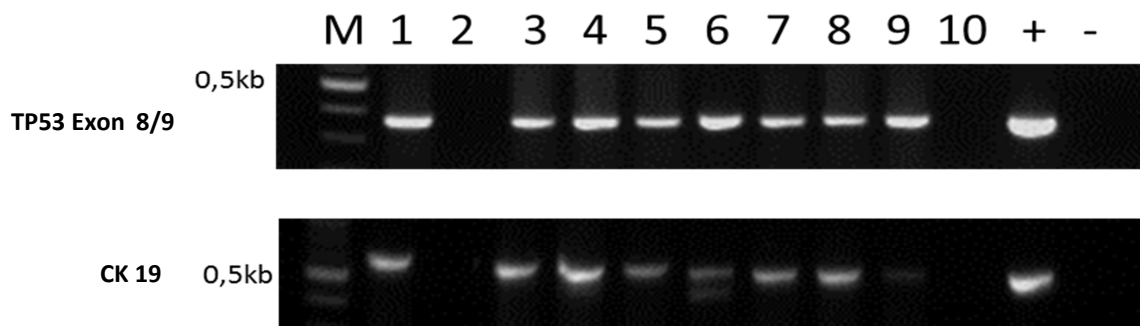


Abbildung 3.13 PCR zur Kontrolle der Adapter-Linker-PCR

Neben dem Marker (1kb-Leiter) sind von links nach rechts zehn PCR-Amplifikate der DNA HMB-45-positiver Zellen sowie Positiv- und Negativkontrolle aufgetragen.

Von 96 isolierten HMB-45-positiven Zellen zeigten 61 in der Kontroll-PCR Banden für zwei spezifische MSE-Fragmente, 17 waren für ein Fragment positiv und 18 wiesen keine Banden auf (siehe Tabelle 3.11). Bei jeder Gewebeprobe, die disseminierte Tumorzellen aufwies, wurden zur Kontrolle HMB-45-negative Zellen und Zellpools entnommen. Die Analyse der genomischen DNA dieser HMB-45-positiven Zellen mittels CGH (comparative genome hybridization) war, wie auch die genomische Analyse der MCSP-positiven Zellen, Gegenstand der Doktorarbeit von Sebastian Scheitler.

Tabelle 3.11 Kontroll-PCR der Adapter-Linker-PCR HMB-45-positiver Zellen auf die MSE-Fragmente CK19, Exon2/3 und Exon8/9

	CK19 + TP53 Exon2/3 +	CK19 + TP53 Exon8/9 +	nur CK19 +	nur TP53 Exon2/3 +	nur TP53 Exon8/9 +	Doppelt negativ
HMB-45-positive Zellen (n=96)	20 (20,8 %)	41 (42,7 %)	6 (6,3 %)	4 (4,2 %)	7 (7,3 %)	18 (18,8 %)

3.4 Analyse der Expression ausgewählter melanomspezifischer Markergene durch PCR

3.4.1 Analyse histogenetischer Markertranskripte zur Überprüfung der Herkunft und Malignität isolierter MCSP-positiver Zellen

Der Fund MCSP-positiver Zellen in Lymphknoten, die in der Abteilung für Pathologie negativ eingestuft worden waren sowie der fehlende Zusammenhang mit Patienten- und Tumorcharakteristika führte zu dem Schluss, dass nicht alle isolierten MCSP-positiven Zellen malignen Ursprungs waren. Um Herkunft und Malignität der isolierten Zellen zu überprüfen, wurde nun im nächsten Schritt die Expression ausgewählter Gene überprüft.

Um die isolierten MCSP-positiven Zellen auf molekularer Ebene zu charakterisieren und ihre melanozytäre Abstammung zu beweisen, wurde die extrahierte, in cDNA umgeschriebene und amplifizierte mRNA der Einzelzellen durch eine PCR auf die Expression ausgewählter, mit ausdifferenzierten Melanozyten und Melanomzellen

assoziierter Markergene überprüft (siehe Abbildung 3.14). In der Routinediagnostik der Pathologie werden immunhistochemische Färbungen gegen die Antigene gp100 (Antikörper: HMB-45), Melan-A und S100B ausgewertet, weshalb sie für diese PCR gewählt wurden. Zusätzlich untersucht wurde die Expression von TRP2, einem Marker, der schon früh in der melanozytären Entwicklung auftritt (Steel, Davidson, & Jackson, 1992). Als fünftes Markergen wurde MCSP gewählt. Der Nachweis des Antigens MCSP war durch die Immunfluoreszenzfärbung gezeigt worden, nun sollte die Genexpression von MCSP nachgewiesen werden.

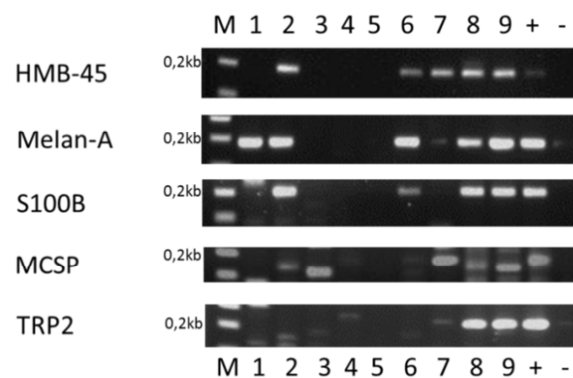


Abbildung 3.14 PCR zum Nachweis der Expression der Markergene für ausdifferenzierte Melanozyten und Zellen des malignen Melanoms

Neben dem Marker (1kb-Leiter) sind von links nach rechts die PCR-Amplifikate der cDNA von neun MCSP-positiven Zellen aufgetragen, sowie Positiv- und Negativkontrolle.

Die PCR zum Nachweis der Expression der Markergene HMB-45, Melan-A, S100B und MCSP wurde bereits im Rahmen der Doktorarbeit von Sebastian Scheitler etabliert, die PCR zum Nachweis der Expression von TRP2 im Rahmen dieser Arbeit (siehe Abbildung 3.15). Eine passende Primersequenz wurde hierfür über eine freie Software aus der Gensequenz ermittelt. In einem Restriktionsverdau des in der PCR amplifizierten Abschnitts wurde durch die spezifische Länge der erzeugten Teilabschnitte bestätigt, dass von den gewählten Primern die richtige Sequenz abgegriffen wird. Als nächster Schritt wurde mittels PCR mit Kontrollzellpools verschiedener Melanomzelllinien eine passende Positivkontrolle für die Durchführung des Temperaturgradienten bestimmt. Die optimale Temperatur zur Hybridisierung der ausgewählten Primer wurde mithilfe dieser Positivkontrolle durch einen Temperaturgradienten ermittelt. Dafür erfolgte die PCR mit identischem Ansatz bei abgestuften Temperaturen

einer Spanne von 55,0°C bis 65,0°C. Starke Signale traten bei Temperaturen von 55,0°C bis 61°C auf. Für die Kontroll-PCR auf TRP2 wurde im Weiteren eine Annealing-Temperatur von 58°C gewählt. Im letzten Schritt konnte nach Bestimmung der passenden Temperatur eine geeignete Positivkontrolle aus einer Auswahl verschiedener Einzelzellen von Melanomzelllinien ermittelt werden. Die deutlichste Bande markierte die Zelle Mel28(1) (siehe Abbildung 3.16), die weiterhin als Positivkontrolle der Kontroll-PCR auf TRP2 diente.

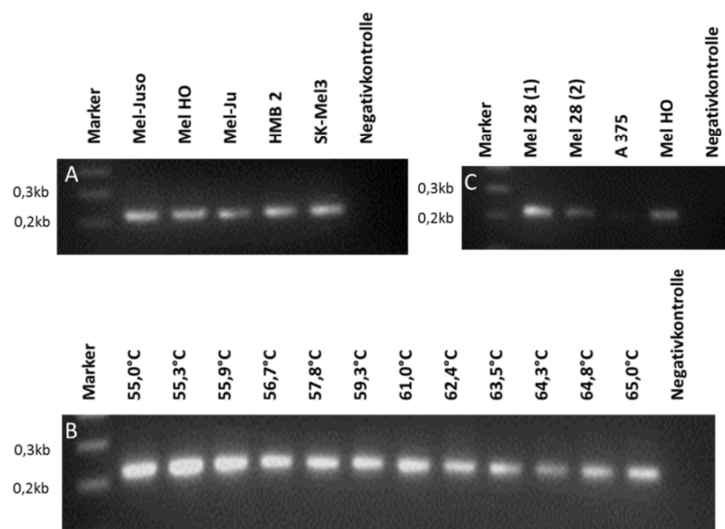


Abbildung 3.15 Etablierung der PCR zu Nachweis der Expression des Markergens TRP2

A PCR mit Kontrollpools verschiedener Melanomzelllinien zur Bestimmung einer passenden Kontrolle für die Durchführung des Temperaturgradienten.

B Temperaturgradient zur Bestimmung der optimalen Temperatur für die Hybridisierung der Primer.

C Bestimmung einer passenden Positivkontrolle aus einer Auswahl verschiedener Einzelzellen von Melanomzelllinien.

Um sicherzustellen, dass die Expression aller überprüften Markergene nur bei den MCSP-positiven Zellen nachgewiesen werden konnte, wurden 10 der MCSP-negativen Kontrollzellen auf die Expression der Markergene untersucht (siehe Abbildung 3.16). Dabei zeigte sich, dass neun der MCSP-negativen Kontrollzellen negativ für die Expression aller Markergene waren. Eine Zelle war positiv für die Expression der Markergene Melan-A, S100B und TRP2. Sie stammte aus einem Lymphknoten mit einem $DCCD_{MCSP}$ von 45 MCSP-positiven Zellen pro Million, in dem in der Abteilung für Pathologie eine Mikrometastase diagnostiziert wurde. Möglicherweise

handelte es sich bei dieser Zelle also um eine MCSP-negative gestreute Tumorzelle, die im Rahmen der MCSP-Immunfluoreszenzfärbung als negative Kontrollzelle isoliert wurde.

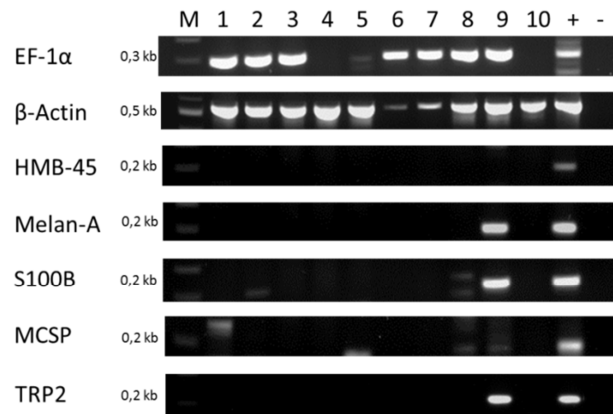


Abbildung 3.16 PCR zum Nachweis der Expression der Markergene für ausdifferenzierte Melanozyten und Melanomzellen bei MCSP-negativen Kontrollzellen

Neben dem Marker (1kb-Leiter) sind von links nach rechts zehn PCR-Amplifikate von negativen Kontrollzellen aufgetragen sowie Positiv- und Negativkontrolle. Nur Zelle 9 zeigt die Expression der Markergene Melan-A, S100B und TRP2.

3.4.1.1 Expression der Differenzierungsmarkergene bei MCSP-positiven Zellen

Insgesamt konnte bei 87 der 126 isolierten MCSP-positiven Zellen (69,0%) die Expression von wenigstens einem der gewählten Markergene nachgewiesen werden. Auffällig war, dass MCSP nur von 17 Zellen exprimiert wurde. Somit war die mRNA des Markergens, gegen dessen Proteinprodukt gefärbt wurde, mit 13,5% am seltensten nachweisbar (siehe Abbildung 3.17). Manche Zellen exprimierten mehrere Markergene gleichzeitig (siehe Tabelle 3.12).

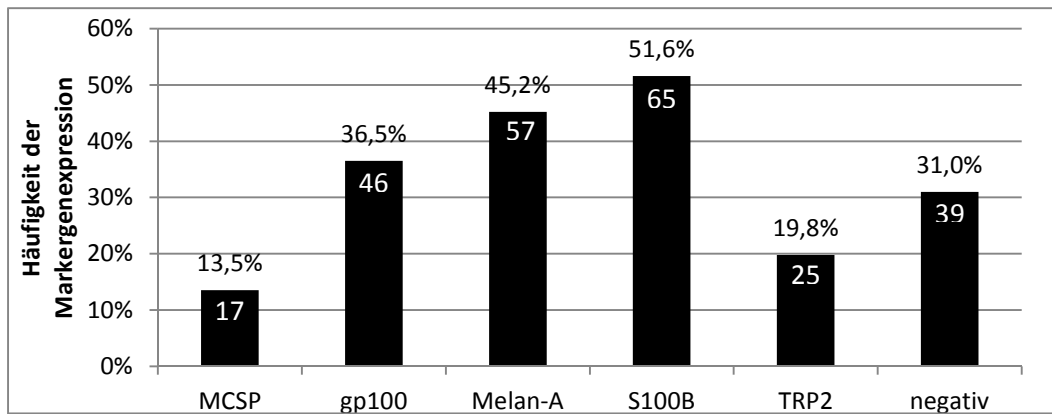


Abbildung 3.17 Häufigkeit der Expression der Differenzierungsmarkergene

Dargestellt ist die Häufigkeit der Markergenexpression bezogen auf alle 126 MCSP-positiven Zellen. Insgesamt exprimierten 69,0 % der MCSP-positiven Zellen wenigstens eines der Markergene, während 31,0 % negativ waren. Die absoluten Zahlen der Expressionshäufigkeiten sind in den Säulen aufgeführt.

Tabelle 3.12 Anzahl der von den einzelnen Zellen co-exprimierten Markergene

	Anzahl co-exprimierter Markergene					
	Keine Markergenexpression	1	2	3	4	5
Isolierte MCSP-positive Zellen n=126	39 (31,0 %)	26 (20,6 %)	23 (18,3 %)	16 (12,7 %)	20 (15,9 %)	2 (1,6 %)

3.4.1.2 Unterschied in der Differenzierungsmarkergen-Expression bei großen und kleinen MCSP-positiven Zellen

In die weiteren Analysen gingen auch die zuvor beschriebenen morphologischen Unterschiede MCSP-positiver Zellen mit ein. In vorausgehenden Abschnitten wurden signifikante Unterschiede bei Lymphknoten mit kleinen und großen Zellen dargelegt den $DCCD_{MCSP}$, das Ergebnis der Routinediagnostik sowie der HMB-45-Färbung betreffend. Nun sollte überprüft werden, ob signifikante Unterschiede der Markergenexpression bestanden.

In Anbetracht der beiden Untergruppen MCSP-positiver Zellen zeigten die Ergebnisse der PCR, dass signifikant mehr große als kleine MCSP-positive Zellen wenigstens eines der fünf Markergene exprimierten (Chi-Quadrat $p < 0,001$). Von den 60 großen

Zellen konnte in 51 Fällen mRNA für wenigstens einen der Marker nachgewiesen werden, während nur 36 von 66 kleinen Zellen die mRNA wenigstens eines Markergens bildeten (Abbildung 3.18).



Abbildung 3.18 Markergenexpression bei großen und kleinen MCSP-positiven Zellen

Dargestellt ist die Expression mindestens eines Markergens bei kleinen und großen MCSP-positiven Zellen.

Ein ähnliches Bild ergab sich für die Expression der einzelnen Markergene. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen großen und kleinen Zellen in der Expression der Marker gp100, Melan-A, S100B und TRP2 (Chi Quadrat $p < 0,001$). Einzig in der Genexpression von MCSP bestand kein signifikanter Unterschied zwischen großen und kleinen MCSP-positiven Zellen (Chi Quadrat $p = 0,129$) (siehe Tabelle 3.13).

Tabelle 3.13 Expression der Differenzierungsmarkergene bei großen und kleinen MCSP-positiven Zellen

	gp100	Melan-A	S100B	TRP2	MCSP
Große Zellen n=60	33 (55,0 %)	45 (75,0 %)	44 (73,3 %)	21 (35,0 %)	11 (18,3 %)
Kleine Zellen n=66	13 (19,7 %)	12 (18,2 %)	21 (31,8 %)	4 (6,0 %)	6 (9,1 %)
Chi-Quadrat	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p=0,129

Der Unterschied zwischen großen und kleinen MCSP-positiven Zellen zeigte sich auch in der Anzahl der co-exprimierten Markergene einzelner Zellen. Während Differenzierungsmarkergen-positive kleine Zellen lediglich in 8,4 % der Fälle mehr als zwei Markergene gleichzeitig exprimierten, trat bei großen MCSP-positiven Zellen in 68,7% die Co-Expression von drei oder mehr Markergenen zur gleichen Zeit auf (siehe Abbildung 3.19).

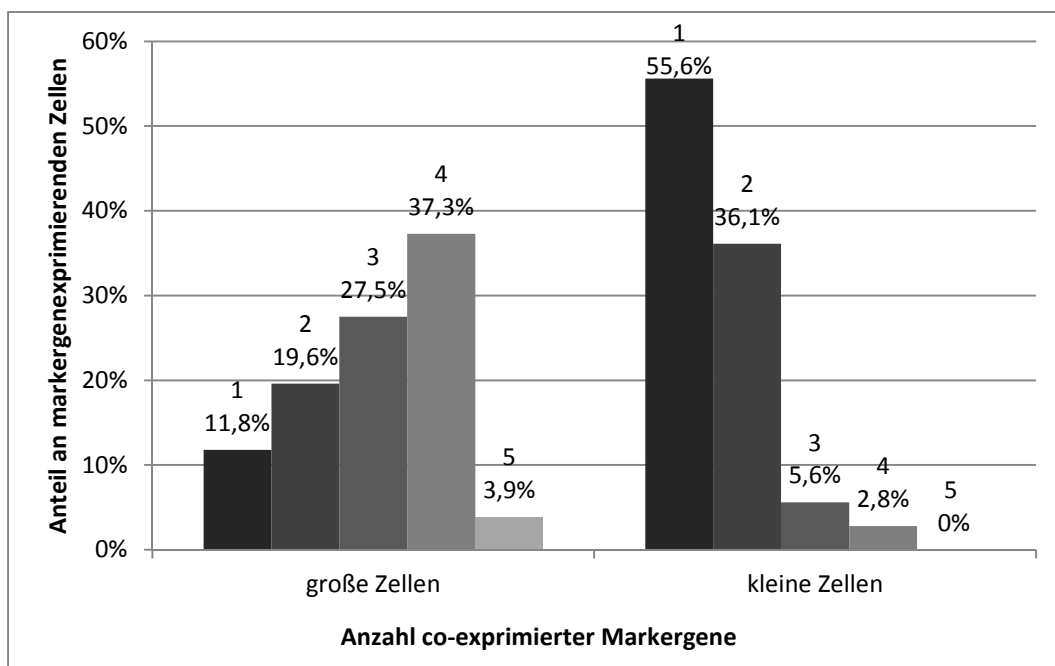


Abbildung 3.19 Anzahl co-exprimierter Markergene bei großen und kleinen MCSP-positiven Zellen

Dargestellt ist der Anteil von Zellen, die mehrere Markergene gleichzeitig exprimierten, bezogen auf große und kleine MCSP-positive Zellen, die mindestens ein Markergen bildeten.

3.4.2 Expressionsnachweis typischer Stammzellmarkergene als Hinweis für das maligne Potential MCSP-positiver Zellen

Wie zuvor gezeigt, exprimierten sowohl die großen als auch die kleinen MCSP-positiven Zellen – wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß – Markergene für ausdifferenzierte Melanomzellen. Von Interesse war nun, ob sich in beiden Gruppen Zellen mit dem Potential zur Bildung von Metastasen befanden oder ob sich dieses Charakteristikum auf die Zellen einer Untergruppe MCSP-positiver Zellen beschränkte.

Durch genspezifische PCR wurde die Expression von vier Markergenen überprüft, die einen Stammzell-ähnlichen Zustand von Melanomzellen anzeigen: ABCB5, Nestin, Jarid1B und CD271 (siehe Abbildung 3.20).

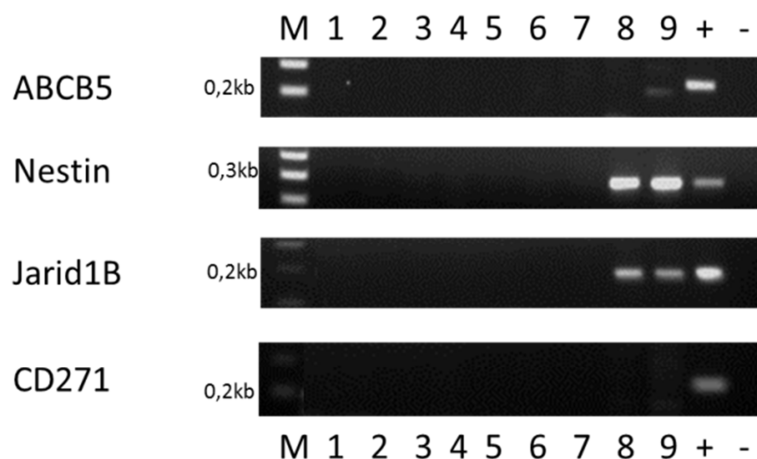


Abbildung 3.20 PCR zum Nachweis der Expression der Stammzellmarkergene ABCB5, Nestin, Jarid1B und CD271

Neben dem Marker (1kb-Leiter) sind von links nach rechts die PCR Amplifikate der cDNA von neun MCSP-positiven Zellen aufgetragen, sowie Positiv- und Negativkontrolle.

48 der 126 überprüften MCSP-positiven Zellen bildeten die mRNA mindestens eines der Stammzellmarkergene (siehe Tabelle 3.14).

Tabelle 3.14 Häufigkeit der Expression der Stammzellmarkergene bei MCSP-positiven Zellen

	Stammzellmarker-positiv				Stammzellmarker-negativ
	48 (38,1 %)				78 (61,9 %)
Isolierte MCSP-positive Zellen n=126	ABCB5	Nestin	Jarid1B	CD271	
	9 (7,1 %)	16 (12,7 %)	32 (25,4 %)	6 (4,8 %)	

Von den Markergenen für melanozytäre Stammzellen wurde meist nur eines pro Zelle gebildet (siehe Tabelle 3.15).

Tabelle 3.15 Anzahl der von den einzelnen MCSP-positiven Zellen co-exprimierten Stammzellmarkergene

	Anzahl co-exprimierter Stammzellmarkergene				
	Keine Markergen-expression	1	2	3	4
Isolierte MCSP-positive Zellen n=126	78 (61,9 %)	35 (27,8 %)	11 (8,7 %)	2 (1,6 %)	0

In der Expression der Stammzellmarkergene CD271 und Nestin bestand ein signifikanter Unterschied zwischen großen und kleinen MCSP-positiven Zellen (CD271: Chi Quadrat $p=0,008$ und Nestin: Chi Quadrat $p=0,001$) (siehe Tabelle 3.16).

Tabelle 3.16 Expression der Stammzellmarkergene bei großen und kleinen MCSP-positiven Zellen

	ABCB5	Nestin	Jarid1B	CD271
Große Zellen n=60	3 (5,0 %)	14 (23,3 %)	17 (28,3 %)	6 (10,0 %)
Kleine Zellen n=66	6 (9,1 %)	2 (3,0 %)	15 (22,7 %)	0 (0 %)
Chi-Quadrat	$p=0,373$	$p=0,001$	$p=0,470$	$p=0,008$

Wurden alle Stammzellmarkergene zusammengefasst, so bestand ein tendenzieller Unterschied in der Expression zwischen großen und kleinen MCSP-positiven Zellen (Chi Quadrat $p=0,059$). Nach Ausschluss der Differenzierungsmarkergen-negativen kleinen Zellen aus der weiteren Auswertung bestand kein Unterschied mehr in der Expression von Stammzellmarkergenen zwischen den Differenzierungsmarkergen-positiven kleinen und großen MCSP-positiven Zellen (Chi-Quadrat $p=0,63$) (siehe Abbildung 3.21). Dadurch konnte gezeigt werden, dass diese beiden Zellgruppen sich bezüglich der Expression von Stammzellmarkergenen gleichen, ein Hinweis auf das maligne Potential dieser beiden Untergruppen MCSP-positiver Zellen.

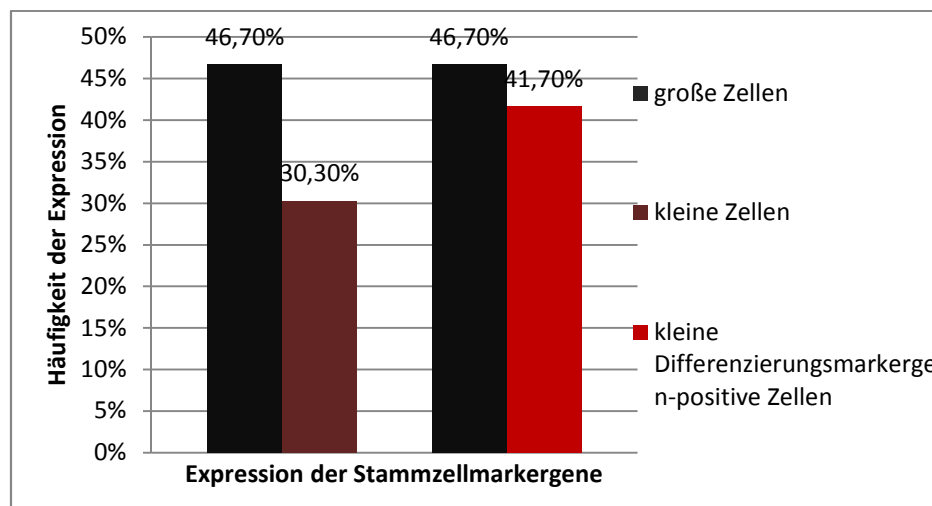


Abbildung 3.21 Expression der Stammzellmarkergene bei großen und kleinen MCSP-positiven Zellen

Dargestellt ist die Stammzellmarkergenexpression bei kleinen und großen MCSP-positiven Zellen, links bezogen auf alle kleinen MCSP-positiven Zellen, rechts bezogen auf Differenzierungsmarkergen-positive kleine Zellen.

Bezogen auf alle MCSP-positiven Zellen zeigte sich für die Stammzellmarkergene gemeinsam, dass Differenzierungsmarkergen-positive Zellen signifikant häufiger auch Stammzellmarkergene bildeten (Chi Quadrat $p<0,001$) (siehe Tabelle 3.17).

**Tabelle 3.17 Expression von Stammzellmarkergenen bei Differenzierungs-
markergen-positiven und -negativen Zellen**

	Stammzellmarkergen- positiv	Stammzellmarkergen- negativ
Differenzierungsmarkergen- positive Zellen (n=87)	42 (48,3 %)	45 (51,7 %)
Differenzierungsmarkergen- negative Zellen (n=39)	6 (15,4 %)	33 (84,6 %)
Chi-Quadrat	p<0,001	

Bei Betrachtung der einzelnen Stammzellmarkergene ließ sich für Nestin und Jarid1B ein signifikanter Unterschied der Expression zwischen Differenzierungsmarkergen-positiven und -negativen Zellen aufzeigen (Nestin: Chi Quadrat p=0,004 und Jarid1B: Chi Quadrat p=0,030) (siehe Tabelle 3.18).

**Tabelle 3.18 Expression der einzelnen Stammzellmarkergene bei Differenzie-
rungsmarkergen-positiven und -negativen Zellen**

	ABCB5	Nestin	Jarid1B	CD271
Differenzierungsmarkergen- positive Zellen (n=87)	8 (9,2 %)	16 (18,4 %)	27 (31,0 %)	5 (5,7 %)
Differenzierungsmarkergen- negative Zellen (n=39)	1 (2,6 %)	0	5 (12,8 %)	1 (2,6 %)
Chi-Quadrat	p=0,373	p=0,004	p=0,030	p=0,438

3.4.3 Expressionsmuster der untersuchten Markergene

In verschiedenen Studien wurde von einer Koexpression verschiedener Markergene berichtet (Grichnik, et al., 2006; Schatton, et al., 2008). Aus diesem Grund wurde auch bei den MCSP-positiven Zellen überprüft, ob ein Zusammenhang in der Expression verschiedener Markergene bestand. Dafür wurden das Signifikanzniveau sowie die Korrelation nach Spearman für alle Kombinationen von Markergenen berechnet (siehe Tabelle 3.19). Auffällig war, dass die Expression von ABCB5 als einziges Markergen weder positive noch negative signifikante Korrelationen mit der

Expression anderer Markergene aufwies. Signifikante Korrelationen sind in Tabelle 3.19 blau hinterlegt.

Tabelle 3.19 Zusammenhang der Expression der verschiedenen Markergene (Signifikanzniveau, Korrelation nach Spearman)

	gp100	Melan-A	S100B	TRP2	MCSP	ABCB5	Nestin	Jarid1B
Melan-A	p<0,001 ρ=0,470							
S100B	p<0,001 ρ=0,537	p<0,001 ρ=0,466						
TRP2	p<0,001 ρ=0,408	p<0,001 ρ=0,467	p=0,001 ρ=0,203					
MCSP	p=0,335 ρ=0,087	p=0,230 ρ=0,108	p=0,525 ρ=0,057	p=0,373 ρ=-0,080				
ABCB5	p=0,611 ρ=0,046	p=0,460 ρ=-0,066	p=0,104 ρ=0,145	p=0,499 ρ=-0,061	p=0,830 ρ=-0,019			
Nestin	p=0,021 ρ=0,206	p<0,001 ρ=0,324	p<0,001 ρ=0,322	p<0,001 ρ=0,348	p=0,026 ρ=0,198	p=0,054 ρ=0,172		
Jarid1B	p=0,002 ρ=0,277	p=0,023 ρ=0,202	p=0,008 ρ=0,237	p=0,401 ρ=0,075	p=0,686 ρ=0,036	p=0,574 ρ=0,051	p=0,237 ρ=0,106	
CD271	p=0,305 ρ=-0,092	p=0,812 ρ=0,021	p=0,113 ρ=0,142	p=0,843 ρ=-0,018	p=0,817 ρ=0,021	p=0,357 ρ=0,083	p=0,005 ρ=0,251	p=0,618 ρ=-0,045

3.4.4 Bestimmung von Kriterien zum Ausschluss nicht-melanomverdächtiger MCSP-positiver Zellen

Die naheliegende Vermutung, dass nicht alle MCSP-positiven Zellen malignen Ursprungs waren, erforderte die Definition von Kriterien, um aus den isolierten Zellen die tatsächlichen gestreuten Tumorzellen herauszufiltern. Eine große Zellform zeigte einen Zusammenhang mit einem hohen $DCCD_{MCSP}$, einem positiven Ergebnis in der Routinediagnostik sowie einer hohen Anzahl gleichzeitig exprimierter Markergene. Aus diesem Grund wurde eine große Zellform als Kriterium für gestreute Tumorzellen gewählt.

Weiterhin zeigte sich ein Zusammenhang kleiner Differenzierungsmarkergen-positiver Zellen mit einem höheren $DCCD_{MCSP}$ (Median 8, Spannweite 1-57 Zellen) als bei kleinen Differenzierungsmarkergen-negativen Zellen (Median 4,5, Spannweite 1-47 Zellen). Die Verteilung MCSP-positiver Zellen in den beiden Untergruppen unterschied sich signifikant (Mann-Whitney-U-Test, $p<0,001$). Wurde als Kriterium die Expression von mindestens zwei Differenzierungsmarkergenen gefordert, so glichen

sich die Unterschiede der beiden Untergruppen kleiner MCSP-positiver Zellen wieder an. Aus diesem Grund wurde als zweites Kriterium für disseminierte Tumorzellen bei kleinen MCSP-positiven Zellen die Expression wenigstens eines Differenzierungsmarkergens gefordert.

In der Doktorarbeit von Sebastian Scheitler wurde bei Analysen mit Normalzellen aus Kontrolllymphknoten gezeigt, dass die Expression von S100B nicht spezifisch für melanozytäre Zellen war. Eine alleinige Expression dieses Markergens wurde daher als weiteres Ausschlusskriterium gewählt. Zellen, die als einziges Differenzierungsmarkergens S100B exprimierten wurden aus der Gruppe gestreuter Tumorzellen ausgeschlossen.

Nach Anwendung dieser Kriterien (große Zellform, Expression mindestens eines Differenzierungsmarkergens, keine alleinige Expression von S100B) wurden 28 Lymphknoten mit MCSP-positiven Zellen für die weitere Auswertung als negativ eingestuft, 36 Lymphknoten wurden als positiv gewertet. Bei den nun als positiv definierten Lymphknoten bestand ein $DCCD_{MCSP}$ mit einer Spannweite von 1 bis 400000 und einem Median von 8 MCSP-positiven Zellen (siehe Abbildung 3.22).

Bezogen auf die untersuchten Einzelzellen wurden 39 kleine Zellen ausgeschlossen, welche kein Differenzierungsmarkergens oder als einziges Differenzierungsmarkergens S100B exprimierten.

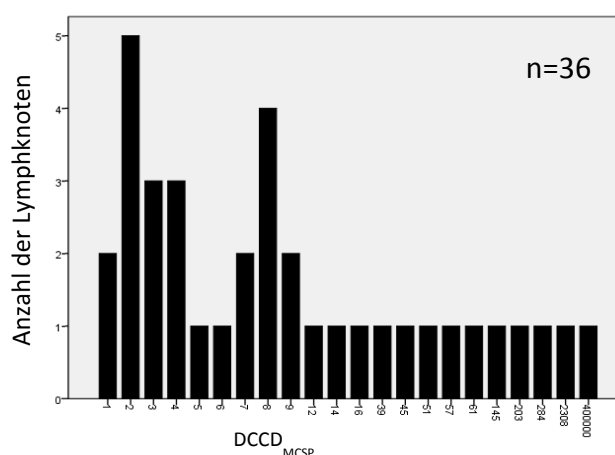


Abbildung 3.22 Verteilung der Anzahl MCSP-positiver Zellen nach Anwendung der Ausschlusskriterien

Verteilung der Anzahl MCSP-positiver Zellen pro 10^6 Lymphknoten in den 36 Lymphknoten, die nach Anwendung der Ausschlusskriterien als positiv definiert wurden.

Von den 36 Lymphknoten enthielten 11 Lymphknoten (30,6 %) große MCSP-positive Zellen und 20 Lymphknoten (55,6 %) kleine Zellen. In fünf Lymphknoten (13,9 %) kamen beide Zelltypen vor.

Es zeigte sich weiterhin ein signifikanter Zusammenhang eines positiven Ergebnisses der MCSP-Färbung mit einem positiven Ergebnis in der HMB-45-Färbung (Chi-Quadrat $p=0,001$). Die Anzahl HMB-45-positiver Zellen pro Million korrelierte positiv mit der Anzahl MCSP-positiver Zellen (Spearman $\rho=0,539$, $p=0,003$) (siehe Abbildung 3.23).

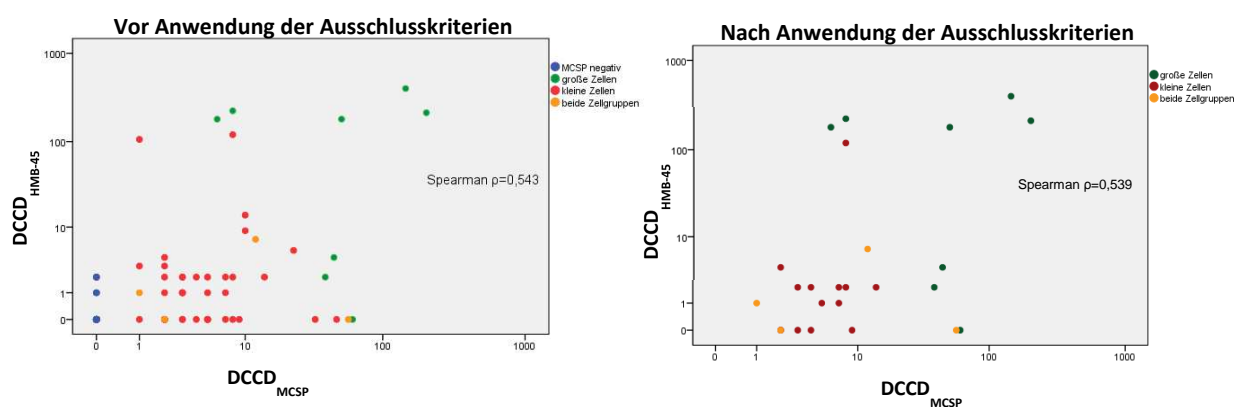


Abbildung 3.23 Verteilung des DCCD bei HMB-45- und MCSP-positiven Lymphknoten vor und nach Anwendung der Ausschlusskriterien

Nach Anwendung der Ausschlusskriterien weiterhin positive Korrelation HMB-45-positiver Zellen mit der Anzahl MCSP-positiver Zellen (Spearman $\rho=0,539$, $p=0,003$).

Nach Anwendung der Ausschlusskriterien zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang der MCSP-Färbung mit dem Ergebnis der Routinediagnostik (Chi-Quadrat, $p<0,001$), ebenso wie ein signifikanter Zusammenhang von HMB-45-Färbung und Routinediagnostik (Chi-Quadrat, $p<0,001$) (siehe Tabelle 3.20). Bei der HMB-45-Färbung war nach Korrektur häufiger eine Lymphknotenbeteiligung nachweisbar als bei der MCSP-Färbung. Es waren nach Anwendung der Ausschlusskriterien aber weiterhin Lymphknoten vorhanden, die MCSP- jedoch keine HMB-45-positiven Zellen enthielten (siehe Abbildung 3.24).

Tabelle 3.20 Vergleich der Ergebnisse der MCSP-Färbung und der Routinediagnostik sowie der HMB-45-Färbung und der Routinediagnostik nach Anwendung der Ausschlusskriterien

		MCSP-Färbung					HMB-45-Färbung		
		negativ	positiv	Gesamt			negativ	positiv	Gesamt
Routine- diagnostik	negativ	57	19	76	Routine- diagnostik	negativ	41	22	63
	positiv	9	17	26		positiv	5	16	21
	Gesamt	66	36	102		Gesamt	46	38	84
Chi-Quadrat, $p < 0,001$					Chi-Quadrat, $p < 0,001$				

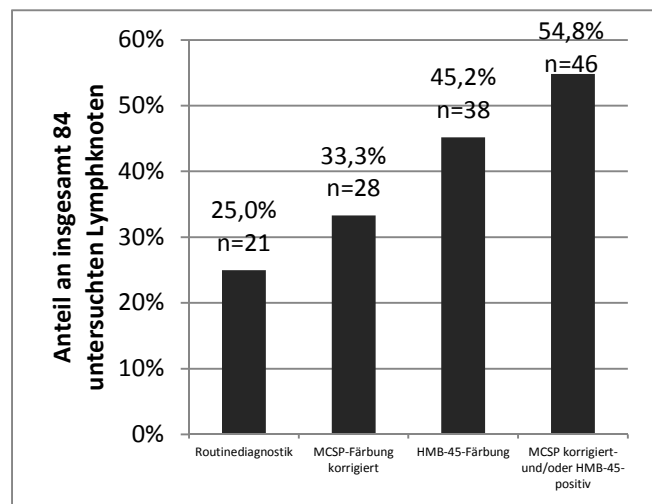
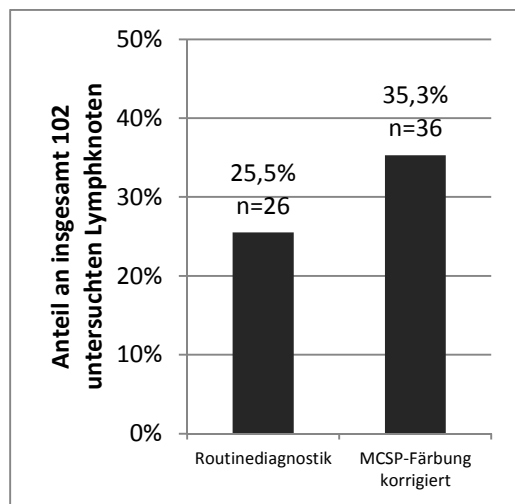


Abbildung 3.24 Nachweis einer Lymphknotenbeteiligung bei Routinediagnostik und MCSP-Färbung_{korrigiert} sowie HMB-45-Färbung

Dargestellt sind die Ergebnisse aus Routinediagnostik und MCSP-Färbung nach Korrektur sowie HMB-45-Färbung.

Ein signifikanter Zusammenhang der MCSP-Färbung mit Charakteristika der Patienten und Primärtumore konnte auch nach Anwendung der Ausschlusskriterien nicht nachgewiesen werden (siehe Tabelle 3.21).

Tabelle 3.21 Zusammenhang von Patientencharakteristika mit den Ergebnissen der MCSP-Färbung nach Anwendung der Ausschlusskriterien

		MCSP-Färbung vor Anwendung der Ausschlusskriterien n=102			MCSP-Färbung nach Anwendung der Ausschlusskriterien n=102		
		positiv	negativ	p-Wert	positiv	negativ	p-Wert
Geschlecht	m	27	23	0,073 ^a	16	34	0,495 ^a
	w	37	15		20	32	
Alter	Median (Jahre)	51,0	55,0	0,060 ^b	52,0	53,0	0,531 ^b
Ulzeration		18	6	0,156 ^a	12	12	0,085 ^a
Clark Level	1	0	0	0,234 ^a	0	0	0,193 ^a
	2	1	4		0	5	
	3	17	8		12	13	
	4	36	21		19	38	
	5	1	1		1	1	
Tumordicke nach Breslow	Median (mm)	1,8	1,4	0,082 ^b	1,4	2,1	0,113 ^b

^a Chi-Quadrat

^b Mann-Whitney-U

Nach Anwendung der Ausschlusskriterien glichen sich die zuvor signifikanten Unterschiede der Markergenexpression zwischen kleinen und großen MCSP-positiven Zellen an. Es bestanden weiterhin signifikante Unterschiede in der Expression von Melan-A, S100B und Nestin (siehe Tabelle 3.22). Bezogen auf alle Differenzierungsmarkergene, wurden diese weiterhin signifikant häufiger von großen Zellen exprimiert (Chi-Quadrat $p=0,034$). Bei der Expression der Stammzellmarkergene bestand kein Unterschied zwischen beiden Zellgruppen (Chi-Quadrat $p=0,847$).

Tabelle 3.22 Verteilung der Markergenexpression nach Anwendung der Ausschlusskriterien

Differenzierungsmarkergene	gp100	Melan-A	S100B	TRP2	MCSP
Gesamt	46 (52,9%)	57 (65,5%)	56 (64,4%)	25 (28,7%)	17 (19,5%)
Große Zellen n=60	33 (55,0 %)	45 (75,0 %)	44 (73,3 %)	21 (35,0 %)	11 (18,3 %)
Kleine Zellen n=27	13 (48,1 %)	12 (44,4 %)	12 (44,4 %)	4 (6,0 %)	6 (22,2 %)
p-Wert (Chi-Quadrat)	0,554	0,006	0,009	0,054	0,672

Stammzellmarkergene	ABCB5	Nestin	Jarid1B	CD271
Gesamt	6 (6,9%)	15 (17,2%)	26 (29,9%)	6 (6,9%)
Große Zellen n=60	3 (5,0 %)	14 (23,3 %)	17 (28,3 %)	6 (10,0 %)
Kleine Zellen n=27	3 (11,1 %)	1 (3,7 %)	9 (33,3 %)	0 (0 %)
p-Wert (Chi-Quadrat)	0,298	0,025	0,637	0,089

4 Diskussion

4.1 Immunfluoreszenzfärbung

Aufgrund seiner prognostischen Aussagekraft gewinnt der Nachweis disseminierter Tumorzellen in Lymphknoten von Patienten mit malignen Erkrankungen immer mehr an Bedeutung. Aus diesem Grund sollten in der vorliegenden Arbeit gestreute Tumorzellen aus Lymphknoten von Patienten mit malignem Melanom durch den Nachweis spezifischer mRNA genomisch charakterisiert werden.

In vorausgehenden Studien wurde zur Isolation einzelner disseminierter Tumorzellen (DTZ) eine immunzytochemische Färbung gegen das im Zytoplasma lokalisierte Antigen gp100 durchgeführt (Ulmer, et al., 2005). Bei der Färbung mit dem Antikörper HMB-45 können jedoch keine intakten, lebensfähigen DTZs gewonnen werden, da die Plasmamembran der Zelle aufgelöst werden muss, um das Antigen für den Antikörper zugänglich zu machen. Somit ist bei dieser Färbung eine Analyse der Genexpression durch den Nachweis spezifischer mRNA nicht möglich. Um die Genexpressionsanalyse zu ermöglichen, wurde eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung gegen MCSP, ein an der Zelloberfläche befindliches Antigen, durchgeführt.

Hohe Detektionsrate von Tumorzellen durch MCSP-Immunfluoreszenzfärbung sowie HMB-45-Immunzytochemie

In der vorliegenden Arbeit wurden Gewebeproben aus Lymphknoten von 102 Patienten mit malignem Melanom auf das Auftreten disseminierter Tumorzellen untersucht. Die MCSP-Immunfluoreszenzfärbung wurde parallel durchgeführt zur Routinediagnostik der Abteilung für Pathologie, bestehend aus immunhistochemischen Färbungen mit den Antikörpern HMB-45, S100B und Melan-A, zusätzlich zu Hämatoxylin-Eosin-Färbungen von Gewebeschnitten. Zur Bestätigung der Ergebnisse der MCSP-Immunfluoreszenz wurde die HMB-45-Immunzytochemie nach dem gleichen Protokoll wie in vorausgegangenen Veröffentlichungen (Ulmer, et al., 2014; Ulmer, et al., 2005) ausgeführt, um eine Vergleichbarkeit der Studien zu gewährleisten.

Mit 25,5 % lag die Auftretenshäufigkeit positiv diagnostizierter Gewebeproben in der Routinediagnostik im gleichen Rahmen wie in veröffentlichten Studien, in welchen bei immunhistochemischen Färbungen in 9 % bis 34 % ein Lymphknotenbefall nachgewiesen wurde (Abrahamsen, et al., 2004; Cook et al., 2003; Gogel et al., 1998; L. L. Yu et al., 1999). Der Anteil an HMB-45-positiven Gewebeproben zeigte sich mit 45,2 % ebenfalls übereinstimmend mit Studien, in welchen die Rate HMB-45-positiver Gewebeproben bei 44,4 % beziehungsweise 51,1 % lag (Ulmer, et al., 2014; Ulmer, et al., 2005). Die höchste Erkennungsrate befallener Lymphknoten trat bei der MCSP-Immunfluoreszenzfärbung mit 62,7 % auf, passend zu der höheren Sensitivität von MCSP im Vergleich zu HMB-45 (Goto, et al., 2008).

Eine mögliche Erklärung der höheren Erkennungsrate disseminierter Tumorzellen durch die HMB-45-Immunzytochemie und die MCSP-Immunfluoreszenz im Gegensatz zur Routinediagnostik ist die unterschiedliche Aufarbeitung der Gewebeproben. Während für die immunzytochemischen Färbungen eine Zellsuspension hergestellt wurde und somit ein Querschnitt aller im Lymphknoten befindlichen Zellen beurteilt wurde, ist die Immunhistochemie der Routinediagnostik auf Schnittebenen beschränkt. Befinden sich nur einzelne gestreute Tumorzellen oder kleine Zellaggregate im Lymphknoten, so ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass diese Zellen zwischen den Schnittebenen der immunhistochemischen Färbungen liegen und nicht entdeckt werden. Sind jedoch Mikro- oder Makrometastasen im Lymphknoten vorhanden, verbunden mit einer hohen Tumor-Zellzahl, ist die Wahrscheinlichkeit eines positiven Ergebnisses in der Routinediagnostik hoch (Ulmer, et al., 2005). Dieser Ansatz wurde bestätigt durch den Zusammenhang eines hohen $DCCD_{MCSP}$ mit einem positiven Ergebnis in der Routinediagnostik (siehe Abbildung 3.9).

4.2 MCSP-positive Zellen mit unterschiedlicher Morphologie

Auffällig bei der MCSP-Färbung war das Auftreten morphologisch unterschiedlicher MCSP-positiver Zellen. Es traten schwach fluoreszierende, kleine MCSP-positive Zellen auf, und kräftig fluoreszierende Zellen mit einem etwa doppelten Durchmesser im Gegensatz zu den umgebenden Lymphozyten. Bei einem Auftreten großer MCSP-positiver Zellen bestand ein signifikanter Zusammenhang zu einem positiven

Ergebnis der Routinediagnostik sowie zu einem positiven Ergebnis der HMB-45-Färbung. Weiterhin korrelierten große Zellen mit einem hohen $DCCD_{MCSP}$. Große Zellen zeigten außerdem einen Zusammenhang mit einer zunehmenden Tumordicke nach Breslow. Diese Zusammenhänge führten zunächst zu der Annahme, dass möglicherweise lediglich die großen MCSP-positiven Zellen disseminierten Tumorzellen entsprechen könnten. In genomischen Analysen der Doktorarbeit von Sebastian Scheitler wurde jedoch gezeigt, dass sowohl große als auch kleine MCSP-positive Zellen genomische Aberrationen aufweisen können.

4.3 Ausbreitung von Tumorzellen und Bildung von Lymphknotenmetastasen

Nachweis von DTZ in einem frühen Tumorstadium

In der vorliegenden Arbeit wurden disseminierte Tumorzellen gefunden bei Primärtumoren mit einer Tumordicke zwischen 0,5 mm und 11,0 mm, übereinstimmend mit einer kürzlich verfassten Arbeit (Scheitler, Hodak et al., Manuskript eingereicht, bislang unveröffentlicht). Gleichzeitig war der Wächterlymphknoten eines Tumors mit einer Dicke von 10,0 mm negativ für gestreute Tumorzellen. Diese Ergebnisse zeigen, dass disseminierte Tumorzellen schon bei Primärtumoren mit einer geringen Tumordicke nach Breslow auftreten können, während auch Wächterlymphknoten von Tumoren mit einer großen Tumordicke negativ für DTZ sein können.

Tumordicke nach Breslow als wichtigster prognostischer Faktor des Primärtumors

Dennoch konnten durch multivariate Analysen sowie Bootstrapping des $DCCD$, die Tumordicke nach Breslow sowie die Ulzeration des Primärtumors als aussagekräftigste prognostische Faktoren für Patienten mit malignem Melanom nachgewiesen werden (Ulmer, et al., 2014). Obwohl die Streuung von Tumorzellen schon bei einer geringen Tumordicke nach Breslow stattfinden kann (Scheitler, Hodak et al., Manuskript eingereicht, bislang unveröffentlicht), haben Patienten mit einer geringen Tumordicke eine sehr gute Überlebensprognose (Leiter, Buettner, Eigentler, & Garbe,

2004). Möglicherweise führt also nicht jede Lymphknotenbesiedelung mit nur einzelnen gestreuten Tumorzellen zwingend zur Bildung von Lymphknotenmetastasen (Scheitler, Hodak et al., Manuskript eingereicht, bislang unveröffentlicht). Diese Annahme wird gestützt durch die Ergebnisse der Routinediagnostik. Hier wurde mit zunehmender Dicke des Primärtumors signifikant häufiger eine Lymphknotenbeteiligung diagnostiziert und so die Rolle der Tumordicke als wichtigster prognostischer Faktor des Primärtumors (Balch, et al., 2001) bestätigt. Ausgehend von der Annahme, dass in der Routinediagnostik eher größere Zellansammlungen als einzelne gestreute Tumorzellen nachgewiesen werden, ist dies ein weiterer Hinweis darauf, dass bei Tumoren mit einer geringen Dicke eher einzelne gestreute Tumorzellen im Lymphknoten vorhanden sind, während bei einer größeren Tumordicke schon Zellkolonien im Sinne von Lymphknotenmetastasen bestehen.

Prognostische Faktoren für die Detektion gestreuter Tumorzellen

Ein signifikanter Zusammenhang von Tumordicke und Ergebnis der immunhistochemischen Färbungen der Routinediagnostik, wie auch in einer anderen Studie beschrieben (Abrahamsen, et al., 2004), konnte gezeigt werden. Für HMB-45-Immunzytochemie und MCSP-Immunfluoreszenz war der Zusammenhang nicht signifikant, es zeigte sich jedoch ein Trend ($p_{\text{HMB45}}=0,122$ und $p_{\text{MCSP}}=0,082$). Außer der Tumordicke zeigten die weiteren analysierten Charakteristika von Patient (Alter, Geschlecht) und Primärtumor (Clark Level, Ulzeration) keine Korrelation zu den Ergebnissen der drei Methoden zur Detektion disseminierter Tumorzellen.

Bildung von Lymphknotenmetastasen nicht durch alle verdächtigen Zellen

Obwohl gestreute Tumorzellen schon bei einer geringen Tumordicke auftreten, haben Patienten eine schlechtere Prognose, je dicker der Primärtumor bei Entfernung ist (Balch, et al., 2001). Das legt die Vermutung nahe, dass einzelne disseminierte Tumorzellen nicht zwangsweise eine Lymphknotenmetastase bilden. Des Weiteren können in Lymphknoten auch gutartige Melanozyten im Sinne eines Nävus auftreten (Abrahamsen, et al., 2004; Baisden, Askin, Lange, & Westra, 2000; McCarthy, Palmer, Bale, & Hirst, 1974; Ridolfi, Rosen, & Thaler, 1977). Aus diesen Gründen war ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit, die aus den Wächterlymphknoten isolierten Zellen auf molekularer Ebene zu charakterisieren, ihren melanozytären Ur-

sprung und ihre Malignität sowie ihr Potential zur Lymphknotenkolonisation betreffend. Hierfür wurde eine Analyse der Genexpression der einzelnen isolierten Zellen durchgeführt, ermöglicht durch die Entwicklung einer Methode zur Analyse des Transkriptoms einer Einzelzelle (C. A. Klein et al., 2002).

4.4 Expression von Markergenen bei MCSP-positiven Zellen

Die melanozytäre Abstammung der aus den Lymphknoten isolierten Zellen sowie ihre Malignität sollten durch Untersuchungen des Transkriptoms der Zellen nachgewiesen werden. Für Zellen des malignen Melanoms sind zahlreiche histogenetische Marker bekannt. Es wurden fünf dieser Marker für ausdifferenzierte Melanozyten beziehungsweise Melanomzellen bestimmt, deren mRNA und somit die Genexpression mittels einer PCR nachgewiesen werden sollte.

Geringe Transkriptionsrate von MCSP

Zunächst wurde die Genexpression von MCSP überprüft. Die durch MCSP bedingten zellulären Veränderungen ermöglichen Tumorzellproliferation, Beweglichkeit und Gewebsinvasion von Tumorzellen. Durch die in dieser Arbeit durchgeführte Färbung gegen das Antigen MCSP war sichergestellt, dass das Proteinprodukt in allen Zellen vorhanden war. Auffallend war daher die geringe Expressionsrate von MCSP auf Ebene der Transkription. Während das Proteinprodukt in 100 % der Zellen vorhanden war, konnte die mRNA nur in 13,5 % der isolierten Zellen nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung ist, dass MCSP ein sehr stabiles Protein mit einer langen Halbwertszeit darstellt, das nicht permanent neu gebildet werden muss. Eine weitere mögliche Erklärung ist, dass es zu falsch negativen Ergebnissen der PCR kam, zum Beispiel durch die Bildung von Sekundärstrukturen der mRNA, und somit die mRNA von MCSP nur unvollständig nachweisbar war.

Im weiteren Text ist, wenn nicht anders gekennzeichnet, die Bezeichnung MCSP-positiv gleichzusetzen mit dem immunhistochemischen Nachweis des Proteins MCSP.

Häufige Expression der Differenzierungsmarkergene gp100, Melan-A S100B und TRP2 bei großen MCSP-positiven Zellen

Das Markergen, das erwartungsgemäß mit dem höchsten Anteil (51,6 %) exprimiert wurde, war S100B. Mit einer Expressionsrate von 45,2 % war Melan-A nach S100B das am zweithäufigsten exprimierte Markergen. Gp100 zeigte eine Expressionsrate von 36,5 %. Mit 19,8 % wurde TRP2 von nur wenigen Zellen gebildet, hauptsächlich von großen MCSP-positiven Zellen. Von den 25 TRP2-positiven Zellen waren 23 gleichzeitig auch für die Expression weiterer Differenzierungsmarkergene positiv und schienen somit schon weiter fortgeschritten im Prozess der Zelldifferenzierung.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass große MCSP-positive Zellen diese vier Markergene signifikant häufiger exprimierten als kleine, was den Schluss nahelegte, dass große disseminierte Tumorzellen sich schon zunehmend im Prozess der Differenzierung befinden und eher das Vorhandensein einer Lymphknotenmetastase anzeigen. Unter den kleinen isolierten MCSP-positiven Zellen befinden sich möglicherweise auch gutartige Melanozyten und andere Zellen, die einzelne der überprüften Markergene bilden.

Fortgeschrittene Zelldifferenzierung bei großen MCSP-positiven Zellen

In der Genexpressionsanalyse konnten alle Markergene für ausdifferenzierte Melanozyten und Melanomzellen sowohl bei kleinen als auch bei großen MCSP-positiven Zellen nachgewiesen werden. Das lässt den Schluss zu, dass beide Gruppen Melanomzellen enthalten. Bestätigt wurde diese Annahme durch CGH-Analysen im Rahmen der Doktorarbeit von Sebastian Scheitler, die genomische Aberrationen bei kleinen wie auch großen Zellen aufzeigten. Ein Unterschied zwischen beiden Gruppen zeigte sich jedoch deutlich durch signifikante Unterschiede in der Anzahl MCSP- und HMB-45-positiver Zellen, des Ergebnisses in der Routinediagnostik sowie durch signifikante Unterschiede in der Expression der Markergene gp100, Melan-A, S100B und TRP2. Außer MCSP wurden alle Markergene signifikant häufiger bei großen Zellen exprimiert. Ausserdem bestand bei großen Zellen signifikant häufiger eine Coexpression von mehreren Differenzierungsmarkergenen. Große Zellen schienen also im Vergleich zu kleinen Zellen weiter fortgeschritten in ihrer Differenzierung zu Zellen des malignen Melanoms, entsprechend einer weiter fortgeschrittenen Tumorerkrankung. Große Zellen traten häufiger bei Primärtumoren mit großer Tumordicke auf, zeigten einen signifikanten Zusammenhang zu einem positiven Ergebnis der Routi-

nediagnostik und mit einem höheren Patientenalter. Außerdem waren große MCSP-positive Zellen mit einem höheren $DCCD_{MCSP}$ assoziiert als kleine Zellen. Der DCCD beim Auftreten großer Zellen lag zwischen sechs und 400.000 mit einem Median von 51 MCSP-positiven Zellen pro Million. In Vergleichen zwischen Routinediagnostik und HMB-45-Färbung konnte in einer Studie gezeigt werden, dass ab einem DCCD >100 von der Bildung von Lymphknotenkolonien auszugehen ist (Scheitler, Hodak et al., Manuskript eingereicht, bislang unveröffentlicht). Ein DCCD >100 trat bei der MCSP-Färbung lediglich bei fünf Proben auf. In allen fünf Fällen waren große Zellen vorhanden, während beim Auftreten kleiner MCSP-positiver Zellen immer ein DCCD <100 bestand. In der HMB-45-Färbung trat ein DCCD >100 bei neun Lymphknoten auf. Von diesen neun Lymphknoten enthielten sieben Lymphknoten große und zwei Lymphknoten kleine MCSP-positive Zellen. Beim Auftreten großer Zellen ist also mit einer höheren Wahrscheinlichkeit bereits eine Lymphknotenkolonie vorhanden.

Gleichzeitig stellen somit die kleinen Zellen möglicherweise eine weitgehend undifferenzierte Zellpopulation dar, die noch nicht zur Bildung von Lymphknotenkolonien geführt hat. Kleine Zellen könnten somit den einzelnen gestreuten Tumorzellen entsprechen, die in den Wächterlymphknoten wandern, um dort Metastasen zu bilden. Dort entwickeln sie sich dann weiter zu morphologisch großen, differenzierten Zellen des malignen Melanoms und proliferieren zu Lymphknotenmetastasen.

Diese Möglichkeit wurde auch in einer Studie an Zelllinien beschrieben (Grichnik, et al., 2006). In dieser Studie konnten Zellen identifiziert werden, die einen stammzellähnlichen Charakter aufwiesen. Diese langsam proliferierenden Zellen zeigten eine kleine Zellform und entwickelten sich im Laufe der Differenzierung zu großen Zellen. Um zu untersuchen, ob die isolierten MCSP-positiven kleinen Zellen möglicherweise einen stammzellähnlichen Charakter aufweisen, wurde in der vorliegenden Arbeit eine Expressionsanalyse von Markergenen, die mit einem stammzellähnlichen Status der Zelle in Verbindung stehen, durchgeführt.

Expression von Markergenen, die einen stammzellartigen Zustand der Zelle anzeigen

Der Stammzellmarker ABCB5 wird von Zellen des malignen Melanoms in einem signifikant höheren Ausmaß gebildet als von gutartigen Nävi. In der vorliegenden Arbeit bestand eine Expressionshäufigkeit von 7,1 %. Kleine Zellen exprimierten häufiger ABCB5 als große MCSP-positive Zellen, was für einen stammzellähnlichen Charakter kleiner MCSP-positiver Zellen spricht. Gleichzeitig exprimierten 88,9 % der ABCB5-positiven Zellen gleichzeitig Markergene der melanozytären Differenzierung, lediglich eine der kleinen Zellen war Differenzierungsmarkergen-negativ.

Es wurde ein Zusammenhang der Expression von ABCB5 mit der Expression des Stammzellmarkers Nestin beschrieben (Schatton, et al., 2008). Des Weiteren zeigten Nestin-positive Zellen in einer Studie einen Zusammenhang mit einer kleinen Zellform (Grichnik, et al., 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde eine Genexpression von Nestin bei 12,7 % der isolierten MCSP-positiven Zellen gefunden. Von diesen Zellen waren jedoch nur zwei aus der Gruppe der kleinen Zellen, während 14 große Zellen Nestin-positiv waren. Der Zusammenhang der Expression von Nestin mit einer kleinen Zellform konnte in der vorliegenden Arbeit also nicht nachvollzogen werden. Auch eine signifikante Coexpression von ABCB5 und Nestin konnte nicht nachvollzogen werden. Alle Nestin-positiven Zellen exprimierten gleichzeitig auch Differenzierungsmarkergene. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass in vivo aus Patienten gewonnene Zellen ein dynamischeres Genexpressionsprofil aufweisen als Zelllinien.

Des Weiteren wurde in der Studie von Grichnik eine Expression des Stammzellmarkers nerve growth factor receptor (NFGR, CD271) vor allem bei morphologisch großen Zellen beschrieben. Die Beobachtung von Grichnik konnte durch die Genexpressionsanalyse in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden, die eine Genexpression von CD271 ausschließlich bei großen Zellen zeigte.

Vor Kurzem wurde als Erklärung für die Heterogenität von Melanomzellen und den Erhalt des Tumorwachstums eine dynamische Expression verschiedener Marker für Melanomzellen vorgeschlagen (Roesch, et al., 2010). Dieser Erklärung liegen Beobachtungen der Expression der Histondemethylase Jarid1B (Jumonji AT-rich interactive domain 1B) zugrunde. In der Studie von Roesch et al. wurde eine morphologisch kleine Zellform Jarid1B-positiver Zellen beschrieben (Roesch, et al., 2010).

In der vorliegenden Arbeit war Jarid1B mit 25,4 % das am häufigsten exprimierte Stammzellmarkergen. Des Weiteren wies Jarid1B unter den Stammzellmarkergenen die höchste Expressionsrate bei kleinen Zellen auf. Trotz der hohen Expressionsrate bei kleinen MCSP-positiven Zellen (22,7 %) zeigte sich in dieser Arbeit eine ebenfalls hohe Expressionsrate bei großen MCSP-positiven Zellen (28,3 %). Jarid1B-positive Zellen stellen möglicherweise ausgestreute Zellen dar, die nur langsam proliferieren, dadurch jedoch gleichzeitig eine längere Lebenserwartung aufweisen. Wenn sich diese Zellen im Lymphknoten eingemischt haben, kann die Expression von Jarid1B reduziert werden und die Zellen proliferieren schneller. Ein kleiner Prozentsatz der Zellen, möglicherweise auch große Zellen, bleibt jedoch immer Jarid1B-positiv, um das Tumorwachstum zu erhalten.

4.5 Unspezifische Färbung nicht-maligner Zellen durch die MCSP-Färbung

Es besteht die Möglichkeit, dass es sich nicht bei allen MCSP-positiven Zellen um Zellen malignen Ursprungs handelt, was zu einer falsch hohen Detektionsrate führen würde. Das Oberflächenantigen MCSP wird in zahlreichen Gewebearten wie Epidermis, Mundschleimhaut, Haarfollikel, Nervengewebe, Knorpel, Muskel und Knochenmark in gesundem Zustand exprimiert (Legg, et al., 2003; Midwood & Salter, 1998; Stallcup & Huang, 2008; Tordsson, et al., 2000).

Auch die unterschiedliche Zellmorphologie MCSP-positiver Zellen mit großem und kleinem Erscheinungsbild spricht für unterschiedliche Zellpopulationen mit möglicherweise abweichendem malignem Potential.

Bei HMB-45-positiven Zellen konnte durch CGH-Analysen bereits für einen großen Anteil der Zellen (80 % bis 97 %) eine maligne Abstammung mit genomischen Aberrationen nachgewiesen werden (Ulmer, et al., 2014; Ulmer, et al., 2005). Auch MCSP-positive Zellen wiesen in CGH-Analysen genomische Veränderungen auf. Durch den Nachweis genomischer Aberrationen bei sowohl kleinen (53 %) als auch großen (78 %) MCSP-positiven Zellen (Doktorarbeit von Sebastian Scheitler) konnte gezeigt werden, dass beide Zellgruppen maligne Zellen enthielten.

Definition von Ausschlusskriterien für die Identifikation gestreuter Tumorzellen

Um falsch positive MCSP-positive Zellen aus weiteren Analysen ausschließen zu können wurde Ausschlusskriterien bestimmt. Alle Lymphknoten, die große MCSP-positive Zellen enthielten, wurden als positiv definiert, da diese Zellen einen Zusammenhang mit einem hohen $DCCD_{MCSP}$, einem positiven Ergebnis in der Routinediagnostik sowie einer hohen Anzahl gleichzeitig exprimierter Markergene aufwiesen. Zusätzlich wurden Lymphknoten, die kleine Zellen enthielten, die mindestens ein Differenzierungsmarkergen exprimierten, als positiv eingestuft. Lediglich Zellen, die als einziges Differenzierungsmarkergen S100B bildeten, wurden ausgeschlossen, da in der Doktorarbeit von Sebastian Scheitler gezeigt wurde, dass die Expression von S100B nicht spezifisch für melanozytäre Zellen war.

Nach Korrektur zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen MCSP-Färbung und Ergebnis der Routinediagnostik. Außerdem bestand nach Ausschluss der Differenzierungsmarkergen-negativen kleinen Zellen kein Unterschied mehr zwischen kleinen und großen Zellen in der Expression der Stammzellmarkergene. Dies unterstützt die Annahme, dass sich die Metastasen-bildenden Zellen unter den kleinen MCSP-positiven Zellen befinden.

In vivo isolierte Zellen weisen ein dynamisches Genexpressionsprofil auf

Die isolierten MCSP-positiven Zellen zeigten ein heterogenes Bild, die Expression der überprüften Markergene betreffend, sowohl für differenzierte als auch für stammzellähnliche Melanomzellen. In der Expression der Stammzellmarkergene zeigten sich bei kleinen und großen Zellen keine so deutlichen Unterschiede wie in der Expression der Differenzierungsmarkergene. Während die Expression der Stammzellmarkergene generell geringer war als die Expression der Differenzierungsmarkergene, schienen sich unter den kleinen Zellen also mehr stammzellähnliche Zellen zu befinden als differenzierte Melanomzellen. Das stützte die Annahme, dass kleine Zellen aus dem Primärtumor in die Lymphknoten wandern, um sich dort einzunisten und zu großen Zellen zu differenzieren. In den Lymphknoten geht jedoch ein Großteil der kleinen disseminierten Tumorzellen zugrunde, bevor sie sich dort einnisten und proliferieren können.

Wie auch von Roesch et al. vorgeschlagen, könnte die Heterogenität der isolierten Zellen auf einen dynamischen Prozess in der Expression der Markergene zurückzuführen sein, sodass auch differenzierte Zellen in der Lage sind, Stammzellmarker auszubilden (Roesch, et al., 2010).

Um die Ergebnisse, die im Rahmen dieser Studie erhoben wurden, zu bestätigen und sie weiter interpretieren zu können, sind noch ausgedehnte Untersuchungen nötig. So sollte das Potential zur Tumorbildung sowohl kleiner als auch großer MCSP-positiver Zellen in fortführenden Studien in vitro durch das Wachstum von Sphären sowie in vivo durch die Bildung von Metastasen in Mäusen überprüft werden.

5 Zusammenfassung

Das maligne Melanom ist eine Krebserkrankung mit deutlich steigender Inzidenz. Das Auftreten von Lymphknotenmetastasen ist mit einer ungünstigen Prognose für den Patienten verbunden, sodass die Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten des metastasierten Melanoms von großer Bedeutung ist.

Das Ziel dieser Arbeit war die Isolation und molekulare Charakterisierung gestreuter Tumorzellen beim malignen Melanom. Es wurden insgesamt 333 durch Immunfluoreszenz markierte MCSP-positive Zellen aus den Wächterlymphknoten von 102 Patienten mit malignem Melanom isoliert. Eine Färbung gegen das intrazelluläre Antigen gp100 (Antikörper HMB-45) wurde, wenn möglich, parallel durchgeführt. Gleichzeitig wurde an diesen Wächterlymphknoten die Routinediagnostik in der Abteilung für Pathologie durchgeführt. Bei Vergleichen der unterschiedlichen Aufarbeitungsmethoden zeigte sich, dass durch die MCSP- (62,7 %) und die HMB-45-Färbung (45,2 %) häufiger malignomsuspekte Zellen nachgewiesen werden konnten, als durch die Routinediagnostik (25,5 %). Aufgrund dieser Diskrepanz stellte sich die Frage, ob alle MCSP- und HMB-45-positiven Zellen malignen Ursprungs waren. Weiterhin wurde das Auftreten MCSP-positiver Zellen auch in Kontrolllymphknoten gesunder Spender beschrieben. Zur Klärung der Malignität MCSP-positiver Zellen schlossen sich weitere molekulare Analysen dieser Zellen an. Bei HMB-45-positiven Zellen waren genomische Aberrationen bereits in vorausgegangenen Studien nachgewiesen worden.

MCSP-positive Zellen unterschieden sich morphologisch in ihrer Größe. Große Zellen traten in 16 Lymphknoten (15,7 %) auf und waren assoziiert mit einem hohen DCCD sowie mit einem positiven Ergebnis der HMB-45-Färbung und der Routinediagnostik. Des Weiteren bestand ein signifikanter Zusammenhang der Tumordicke nach Breslow mit dem Auftreten großer Zellen und mit einem fortgeschrittenen Patientenalter. Kleine Zellen traten in 48 der untersuchten Lymphknoten (47,1 %) auf und gingen häufig mit einem geringen DCCD und einem negativen Ergebnis der Routinediagnostik einher.

Um die Bedeutung MCSP-positiver Zellen zu klären wurden PCR-basierte Analysen des Transkriptoms dieser Zellen durchgeführt. Hierfür wurde die mRNA der isolierten

Einzelzellen extrahiert, was bei 126 der 333 Zellen erfolgreich durchgeführt werden konnte. Zur Charakterisierung der Zellen dienten ausgewählte, mit Zellen des malignen Melanoms assoziierte Markergene für ausdifferenzierte Melanomzellen (HMB-45, Melan-A, S100B, MCSP, TRP2) sowie für melanozytäre Stammzellen (ABCB5, Nestin, Jarid1B, CD271), deren Expression mittels PCR getestet wurde. Signifikant mehr große (86,7 %) als kleine (62,1 %) MCSP-positive Zellen exprimierten mindestens ein Markergen. Weiterhin exprimierten große Zellen häufiger mehrere Markergene gleichzeitig. Die Markergene HMB-45, Melan-A, S100B, TRP2, Nestin und CD271 wurden signifikant häufiger von großen Zellen gebildet. Kein signifikanter Unterschied zeigte sich in der Expression von MCSP, ABCB5 und Jarid1B. Das einzige Markergen, das häufiger von kleinen als von großen Zellen gebildet wurde war ABCB5.

Es ist bekannt, dass MCSP-positive Zellen auch ohne malignen Hintergrund in Lymphknoten gesunder Probanden auftreten. Hierdurch ist auch die deutlich höhere Anzahl MCSP-positiver Lymphknoten im Gegensatz zum Nachweis einer Lymphknotenbeteiligung der malignen Erkrankung in der Routinediagnostik erklärbar. Um nicht-maligne MCSP-positive Zellen herauszufiltern wurden Kriterien definiert, um diese Zellen auszuschließen. Eine große Zellform zeigte einen Zusammenhang mit einem hohen $DCCD_{MCSP}$, einem positiven Ergebnis in der Routinediagnostik sowie einer hohen Anzahl gleichzeitig exprimierter Markergene. Aus diesem Grund wurde eine große Zellform als Kriterium für gestreute Tumorzellen gewählt. Weiterhin zeigte sich ein Zusammenhang kleiner Differenzierungsmarkergen-positiver Zellen mit einem höheren $DCCD_{MCSP}$ und mit einer höheren Expressionsrate von Stammzellmarkergenen als bei kleinen Differenzierungsmarkergen-negativen Zellen, sodass kleine Differenzierungsmarkergen-negativen Zellen als nicht-maligne eingestuft wurden. Die alleinige Expression des Markers S100B, der nicht spezifisch für melanozytäre Zellen ist, wurde als weiteres Ausschlusskriterium gewählt. Ausgeschlossen wurden von den 126 MCSP-positiven Zellen also kleine MCSP-positive Zellen, die kein Markergen oder als einziges Markergen S100B exprimierten.

Nach Anwendung dieser Ausschlusskriterien wurden schließlich 87 MCSP-positive Zellen aus 36 Lymphknoten als maligne eingestuft. Nun zeigte sich auch ein signifikanter Zusammenhang von positiven Ergebnissen in MCSP-Färbung und Routinediagnostik. Außerdem glichen sich die zuvor signifikanten Unterschiede der Marker-

genexpression zwischen kleinen und großen MCSP-positiven Zellen an. Es bestanden weiterhin signifikante Unterschiede in der Expression von Melan-A, S100B und Nestin. In der Expression der Stammzellmarkergene bestand kein Unterschied mehr zwischen beiden Zellgruppen.

Die Ergebnisse unserer Analysen weisen auf eine dynamische und heterogene Entwicklung gestreuter Tumorzellen bei der Bildung von Lymphknotenmetastasen hin. Sowohl unter den großen als auch unter den kleinen MCSP-positiven Zellen befinden sich Melanomzellen. Das Auftreten einzelner MCSP-positiver Zellen ist jedoch nicht zwingend mit der Bildung von Lymphknotenmetastasen verbunden. Großen MCSP-positiven Zellen, die in Zusammenhang mit einem hohen DCCD, einem positiven Ergebnis der Routinediagnostik sowie einer größeren Tumordicke nach Breslow auftreten, kommt eine entscheidende Bedeutung bei der Bildung von Metastasen zu. Kleine MCSP-positive Zellen sind möglicherweise als Vorstufe großer Zellen zu sehen, die sich noch im Prozess der Entwicklung befinden.

Die weitere Analyse der in den Lymphknoten gestreuten Tumorzellen, mit besonderem Augenmerk auf die großen MCSP-positiven Zellen, kann neue Ansatzpunkte für die systemische Therapie beim metastasierten Melanom liefern.

6 Literaturverzeichnis

- Abrahamsen, H. N., Hamilton-Dutoit, S. J., Larsen, J., & Steiniche, T. (2004). Sentinel lymph nodes in malignant melanoma: extended histopathologic evaluation improves diagnostic precision. *Cancer*, *100*(8), 1683-1691.
- Aceituno-Madera, P., Buendia-Eisman, A., Arias-Santiago, S., & Serrano-Ortega, S. (2010). [Changes in the incidence of skin cancer between 1978 and 2002]. *Actas Dermosifiliogr*, *101*(1), 39-46.
- Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J., & Clarke, M. F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *100*(7), 3983-3988.
- Alazraki, N., Glass, E. C., Castronovo, F., Olmos, R. A., & Podoloff, D. (2002). Procedure guideline for lymphoscintigraphy and the use of intraoperative gamma probe for sentinel lymph node localization in melanoma of intermediate thickness 1.0. *J Nucl Med*, *43*(10), 1414-1418.
- Bafounta, M. L., Beauchet, A., Aegerter, P., & Saiag, P. (2001). Is dermoscopy (epiluminescence microscopy) useful for the diagnosis of melanoma? Results of a meta-analysis using techniques adapted to the evaluation of diagnostic tests. *Arch Dermatol*, *137*(10), 1343-1350.
- Baisden, B. L., Askin, F. B., Lange, J. R., & Westra, W. H. (2000). HMB-45 immunohistochemical staining of sentinel lymph nodes: a specific method for enhancing detection of micrometastases in patients with melanoma. *Am J Surg Pathol*, *24*(8), 1140-1146.
- Balch, C. M., Gershenwald, J. E., Soong, S. J., Thompson, J. F., Atkins, M. B., Byrd, D. R., . . . Sondak, V. K. (2009). Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol*, *27*(36), 6199-6206.
- Balch, C. M., Murad, T. M., Soong, S. J., Ingalls, A. L., Halpern, N. B., & Maddox, W. A. (1978). A multifactorial analysis of melanoma: prognostic histopathological features comparing Clark's and Breslow's staging methods. *Ann Surg*, *188*(6), 732-742.
- Balch, C. M., Soong, S. J., Gershenwald, J. E., Thompson, J. F., Reintgen, D. S., Cascinelli, N., . . . Morabito, A. (2001). Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. *J Clin Oncol*, *19*(16), 3622-3634.
- Barnhill, R. L., & Mihm, M. C., Jr. (1993). The histopathology of cutaneous malignant melanoma. *Semin Diagn Pathol*, *10*(1), 47-75.
- Baxter, L. L., Moreland, R. T., Nguyen, A. D., Wolfsberg, T. G., & Pavan, W. J. *A curated online resource for SOX10 and pigment cell molecular genetic pathways: Database* (Oxford). 2010;2010:baq025. doi:10.1093/database/baq025.
- Bevona, C., Goggins, W., Quinn, T., Fullerton, J., & Tsao, H. (2003). Cutaneous melanomas associated with nevi. *Arch Dermatol*, *139*(12), 1620-1624.
- Bishop, J. N., Harland, M., Randerson-Moor, J., & Bishop, D. T. (2007). Management of familial melanoma. *Lancet Oncol*, *8*(1), 46-54.
- Blessing, K., Sanders, D. S., & Grant, J. J. (1998). Comparison of immunohistochemical staining of the novel antibody melan-A with S100 protein and HMB-45 in malignant melanoma and melanoma variants. *Histopathology*, *32*(2), 139-146.
- Boccaccio, C., Sabatino, G., Medico, E., Girolami, F., Follenzi, A., Reato, G., . . . Comoglio, P. M. (2005). The MET oncogene drives a genetic programme linking cancer to haemostasis. *Nature*, *434*(7031), 396-400.
- Boiko, A. D., Razorenova, O. V., van de Rijn, M., Swetter, S. M., Johnson, D. L., Ly, D. P., . . . Weissman, I. L. (2010). Human melanoma-initiating cells express neural crest nerve growth factor receptor CD271. *Nature*, *466*(7302), 133-137.
- Bonnet, D., & Dick, J. E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*, *3*(7), 730-737.
- Brychtova, S., Fiuraskova, M., Hlobilkova, A., Brychta, T., & Hirnak, J. (2007). Nestin expression in cutaneous melanomas and melanocytic nevi. *J Cutan Pathol*, *34*(5), 370-375.

- Campoli, M., Ferrone, S., & Wang, X. (2010). Functional and clinical relevance of chondroitin sulfate proteoglycan 4. *Adv Cancer Res*, 109, 73-121.
- Campoli, M. R., Chang, C. C., Kageshita, T., Wang, X., McCarthy, J. B., & Ferrone, S. (2004). Human high molecular weight-melanoma-associated antigen (HMW-MAA): a melanoma cell surface chondroitin sulfate proteoglycan (MSCP) with biological and clinical significance. *Crit Rev Immunol*, 24(4), 267-296.
- Chapman, P. B., Hauschild, A., Robert, C., Haanen, J. B., Ascierto, P., Larkin, J., . . . McArthur, G. A. (2011). Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med*, 364(26), 2507-2516.
- Civenni, G., Walter, A., Kobert, N., Mihic-Probst, D., Zipser, M., Belloni, B., . . . Sommer, L. (2011). Human CD271-positive melanoma stem cells associated with metastasis establish tumor heterogeneity and long-term growth. *Cancer Res*, 71(8), 3098-3109.
- Clark, W. H., Jr., From, L., Bernardino, E. A., & Mihm, M. C. (1969). The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res*, 29(3), 705-727.
- Cochran, A. J., Holland, G. N., Wen, D. R., Herschman, H. R., Lee, W. R., Foos, R. Y., & Straatsma, B. R. (1983). Detection of cytoplasmic S-100 protein in primary and metastatic intraocular melanomas. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 24(8), 1153-1155.
- Cochran, A. J., Wen, D. R., & Herschman, H. R. (1984). Occult melanoma in lymph nodes detected by antiserum to S-100 protein. *Int J Cancer*, 34(2), 159-163.
- Cook, M. G., Green, M. A., Anderson, B., Eggermont, A. M., Ruiter, D. J., Spatz, A., . . . Powell, B. W. (2003). The development of optimal pathological assessment of sentinel lymph nodes for melanoma. *J Pathol*, 200(3), 314-319.
- Cui, J., Shen, L. Y., & Wang, G. C. (1991). Role of hair follicles in the repigmentation of vitiligo. *J Invest Dermatol*, 97(3), 410-416.
- Cyr, P. R. (2008). Atypical moles. *Am Fam Physician*, 78(6), 735-740.
- Dalerba, P., Dylla, S. J., Park, I. K., Liu, R., Wang, X., Cho, R. W., . . . Clarke, M. F. (2007). Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(24), 10158-10163.
- de Snoo, F. A., Kroon, M. W., Bergman, W., ter Huurne, J. A., Houwing-Duistermaat, J. J., van Mourik, L., . . . Gruis, N. A. (2007). From sporadic atypical nevi to familial melanoma: risk analysis for melanoma in sporadic atypical nevus patients. *J Am Acad Dermatol*, 56(5), 748-752.
- Eggermont, A. M., Suci, S., Santinami, M., Testori, A., Kruit, W. H., Marsden, J., . . . Keilholz, U. (2008). Adjuvant therapy with pegylated interferon alfa-2b versus observation alone in resected stage III melanoma: final results of EORTC 18991, a randomised phase III trial. *Lancet*, 372(9633), 117-126.
- Ehrmann, J., Kolar, Z., & Mokry, J. *Nestin as a diagnostic and prognostic marker: immunohistochemical analysis of its expression in different tumours*: J Clin Pathol. 2005 Feb;58(2):222-3.
- Eisenmann, K. M., McCarthy, J. B., Simpson, M. A., Keely, P. J., Guan, J. L., Tachibana, K., . . . Iida, J. (1999). Melanoma chondroitin sulphate proteoglycan regulates cell spreading through Cdc42, Ack-1 and p130cas. *Nat Cell Biol*, 1(8), 507-513.
- Elwood, J. M., & Gallagher, R. P. (1998). Body site distribution of cutaneous malignant melanoma in relationship to patterns of sun exposure. *Int J Cancer*, 78(3), 276-280.
- Fang, X., Burg, M. A., Barritt, D., Dahlin-Huppe, K., Nishiyama, A., & Stallcup, W. B. (1999). Cytoskeletal reorganization induced by engagement of the NG2 proteoglycan leads to cell spreading and migration. *Mol Biol Cell*, 10(10), 3373-3387.
- Fitzgibbons, P. L., Chaurushiya, P. S., Nichols, P. W., Chandrasoma, P. T., & Martin, S. E. (1989). Primary mucosal malignant melanoma: an immunohistochemical study of 12 cases with comparison to cutaneous and metastatic melanomas. *Hum Pathol*, 20(3), 269-272.
- Fletcher, S., Drewry, J. A., Shahani, V. M., Page, B. D., & Gunning, P. T. (2009). Molecular disruption of oncogenic signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) protein. *Biochem Cell Biol*, 87(6), 825-833.

- Florenes, V. A., Holm, R., Myklebost, O., Lendahl, U., & Fodstad, O. (1994). Expression of the neuroectodermal intermediate filament nestin in human melanomas. *Cancer Res*, *54*(2), 354-356.
- Frank, N. Y., Margaryan, A., Huang, Y., Schatton, T., Waaga-Gasser, A. M., Gasser, M., . . . Frank, M. H. (2005). ABCB5-mediated doxorubicin transport and chemoresistance in human malignant melanoma. *Cancer Res*, *65*(10), 4320-4333.
- Frank, N. Y., Pendse, S. S., Lapchak, P. H., Margaryan, A., Shlain, D., Doeing, C., . . . Frank, M. H. (2003). Regulation of progenitor cell fusion by ABCB5 P-glycoprotein, a novel human ATP-binding cassette transporter. *J Biol Chem*, *278*(47), 47156-47165.
- Freter, R., Osawa, M., & Nishikawa, S. (2010). Adult stem cells exhibit global suppression of RNA polymerase II serine-2 phosphorylation. *Stem Cells*, *28*(9), 1571-1580.
- Friedman, R. J., Rigel, D. S., & Kopf, A. W. (1985). Early detection of malignant melanoma: the role of physician examination and self-examination of the skin. *CA Cancer J Clin*, *35*(3), 130-151.
- Gaynor, R., Irie, R., Morton, D., & Herschman, H. R. (1980). S100 protein is present in cultured human malignant melanomas. *Nature*, *286*(5771), 400-401.
- Gogel, B. M., Kuhn, J. A., Ferry, K. M., Fisher, T. L., Preskitt, J. T., O'Brien, J. C., . . . Krag, D. N. (1998). Sentinel lymph node biopsy for melanoma. *Am J Surg*, *176*(6), 544-547.
- Goretzki, L., Burg, M. A., Grako, K. A., & Stallcup, W. B. (1999). High-affinity binding of basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor-AA to the core protein of the NG2 proteoglycan. *J Biol Chem*, *274*(24), 16831-16837.
- Goto, Y., Ferrone, S., Arigami, T., Kitago, M., Tanemura, A., Sunami, E., . . . Hoon, D. S. (2008). Human high molecular weight-melanoma-associated antigen: utility for detection of metastatic melanoma in sentinel lymph nodes. *Clin Cancer Res*, *14*(11), 3401-3407.
- Gown, A. M., Vogel, A. M., Hoak, D., Gough, F., & McNutt, M. A. (1986). Monoclonal antibodies specific for melanocytic tumors distinguish subpopulations of melanocytes. *Am J Pathol*, *123*(2), 195-203.
- Green, A., Siskind, V., Bain, C., & Alexander, J. (1985). Sunburn and malignant melanoma. *Br J Cancer*, *51*(3), 393-397.
- Grichnik, J. M., Burch, J. A., Schulteis, R. D., Shan, S., Liu, J., Darrow, T. L., . . . Seigler, H. F. (2006). Melanoma, a tumor based on a mutant stem cell? *J Invest Dermatol*, *126*(1), 142-153.
- Grivennikov, S. I., & Karin, M. (2010). Dangerous liaisons: STAT3 and NF-kappaB collaboration and crosstalk in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*, *21*(1), 11-19.
- Grob, J. J., Gouvernet, J., Aymar, D., Mostaque, A., Romano, M. H., Collet, A. M., . . . Bonerandi, J. J. (1990). Count of benign melanocytic nevi as a major indicator of risk for nonfamilial nodular and superficial spreading melanoma. *Cancer*, *66*(2), 387-395.
- Gruss, C., & Herlyn, M. (2001). Role of cadherins and matrixins in melanoma. *Curr Opin Oncol*, *13*(2), 117-123.
- Guo, J., Si, L., Kong, Y., Flaherty, K. T., Xu, X., Zhu, Y., . . . Qin, S. (2011). Phase II, open-label, single-arm trial of imatinib mesylate in patients with metastatic melanoma harboring c-Kit mutation or amplification. *J Clin Oncol*, *29*(21), 2904-2909.
- Ho, M. M., Ng, A. V., Lam, S., & Hung, J. Y. (2007). Side population in human lung cancer cell lines and tumors is enriched with stem-like cancer cells. *Cancer Res*, *67*(10), 4827-4833.
- Hodi, F. S., O'Day, S. J., McDermott, D. F., Weber, R. W., Sosman, J. A., Haanen, J. B., . . . Urba, W. J. (2010). Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med*, *363*(8), 711-723.
- Holly, E. A., Kelly, J. W., Shpall, S. N., & Chiu, S. H. (1987). Number of melanocytic nevi as a major risk factor for malignant melanoma. *J Am Acad Dermatol*, *17*(3), 459-468.
- Iida, J., Pei, D., Kang, T., Simpson, M. A., Herlyn, M., Furcht, L. T., & McCarthy, J. B. (2001). Melanoma chondroitin sulfate proteoglycan regulates matrix metalloproteinase-dependent human melanoma invasion into type I collagen. *J Biol Chem*, *276*(22), 18786-18794.
- Ikeya, M., Lee, S. M., Johnson, J. E., McMahon, A. P., & Takada, S. (1997). Wnt signalling required for expansion of neural crest and CNS progenitors. *Nature*, *389*(6654), 966-970.

- Jungbluth, A. A., Busam, K. J., Gerald, W. L., Stockert, E., Coplan, K. A., Iversen, K., . . . Chen, Y. T. (1998). A103: An anti-melan-a monoclonal antibody for the detection of malignant melanoma in paraffin-embedded tissues. *Am J Surg Pathol*, 22(5), 595-602.
- Kageshita, T., Nakamura, T., Yamada, M., Kuriya, N., Arai, T., & Ferrone, S. (1991). Differential expression of melanoma associated antigens in acral lentiginous melanoma and in nodular melanoma lesions. *Cancer Res*, 51(6), 1726-1732.
- Klein, C. A., Schmidt-Kittler, O., Schardt, J. A., Pantel, K., Speicher, M. R., & Riethmuller, G. (1999). Comparative genomic hybridization, loss of heterozygosity, and DNA sequence analysis of single cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(8), 4494-4499.
- Klein, C. A., Seidl, S., Petat-Dutter, K., Offner, S., Geigl, J. B., Schmidt-Kittler, O., . . . Riethmuller, G. (2002). Combined transcriptome and genome analysis of single micrometastatic cells. *Nat Biotechnol*, 20(4), 387-392.
- Klein, W. M., Wu, B. P., Zhao, S., Wu, H., Klein-Szanto, A. J., & Tahan, S. R. (2007). Increased expression of stem cell markers in malignant melanoma. *Mod Pathol*, 20(1), 102-107.
- Kondo, T., Setoguchi, T., & Taga, T. (2004). Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(3), 781-786.
- Kozanoglu, I., Boga, C., Ozdogu, H., Sozer, O., Maytalan, E., Yazici, A. C., & Sahin, F. I. (2009). Human bone marrow mesenchymal cells express NG2: possible increase in discriminative ability of flow cytometry during mesenchymal stromal cell identification. *Cytotherapy*, 11(5), 527-533.
- Kremetz, E. T., Reed, R. J., Coleman, W. P., 3rd, Sutherland, C. M., Carter, R. D., & Campbell, M. (1982). Acral lentiginous melanoma. A clinicopathologic entity. *Ann Surg*, 195(5), 632-645.
- Kretschmer, L., Thoms, K. M., Peeters, S., Haenssle, H., Bertsch, H. P., & Emmert, S. (2008). Postoperative morbidity of lymph node excision for cutaneous melanoma-sentinel lymphonodectomy versus complete regional lymph node dissection. *Melanoma Res*, 18(1), 16-21.
- Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., . . . Dick, J. E. (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*, 367(6464), 645-648.
- Legg, J., Jensen, U. B., Broad, S., Leigh, I., & Watt, F. M. (2003). Role of melanoma chondroitin sulphate proteoglycan in patterning stem cells in human interfollicular epidermis. *Development*, 130(24), 6049-6063.
- Leiter, U., Buettner, P. G., Eigentler, T. K., & Garbe, C. (2004). Prognostic factors of thin cutaneous melanoma: an analysis of the central malignant melanoma registry of the German dermatological society. *J Clin Oncol*, 22(18), 3660-3667.
- Lendahl, U., Zimmerman, L. B., & McKay, R. D. (1990). CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell*, 60(4), 585-595.
- Li, C., Heidt, D. G., Dalerba, P., Burant, C. F., Zhang, L., Adsay, V., . . . Simeone, D. M. (2007). Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res*, 67(3), 1030-1037.
- Mackie, R. M. (1983). The pathogenesis of cutaneous malignant melanoma: Br Med J (Clin Res Ed). 1983 Nov 26;287(6405):1568-9.
- Mackie, R. M., & Aitchison, T. (1982). Severe sunburn and subsequent risk of primary cutaneous malignant melanoma in Scotland. *Br J Cancer*, 46(6), 955-960.
- McCarthy, S. W., Palmer, A. A., Bale, P. M., & Hirst, E. (1974). Naevus cells in lymph nodes. *Pathology*, 6(4), 351-358.
- McGovern, V. J., Mihm, M. C., Jr., Bailly, C., Booth, J. C., Clark, W. H., Jr., Cochran, A. J., . . . Milton, G. W. (1973). The classification of malignant melanoma and its histologic reporting. *Cancer*, 32(6), 1446-1457.
- Meier, F., Will, S., Ellwanger, U., Schlagenhaupt, B., Schitteck, B., Rassner, G., & Garbe, C. (2002). Metastatic pathways and time courses in the orderly progression of cutaneous melanoma. *Br J Dermatol*, 147(1), 62-70.
- Menzies, S. W., & Zalaudek, I. (2006). *Why perform dermoscopy? The evidence for its role in the routine management of pigmented skin lesions*: Arch Dermatol. 2006 Sep;142(9):1211-2.

- Messina, J. L., Glass, L. F., Cruse, C. W., Berman, C., Ku, N. K., & Reintgen, D. S. (1999). Pathologic examination of the sentinel lymph node in malignant melanoma. *Am J Surg Pathol*, 23(6), 686-690.
- Midwood, K. S., & Salter, D. M. (1998). Expression of NG2/human melanoma proteoglycan in human adult articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*, 6(5), 297-305.
- Molife, R., & Hancock, B. W. (2002). Adjuvant therapy of malignant melanoma. *Crit Rev Oncol Hematol*, 44(1), 81-102.
- Morton, D. L., Thompson, J. F., Cochran, A. J., Mozzillo, N., Elashoff, R., Essner, R., . . . Wang, H. J. (2006). Sentinel-node biopsy or nodal observation in melanoma. *N Engl J Med*, 355(13), 1307-1317.
- Morton, D. L., Wanek, L., Nizze, J. A., Elashoff, R. M., & Wong, J. H. (1991). Improved long-term survival after lymphadenectomy of melanoma metastatic to regional nodes. Analysis of prognostic factors in 1134 patients from the John Wayne Cancer Clinic. *Ann Surg*, 214(4), 491-499.
- Mouret, S., Baudouin, C., Charveron, M., Favier, A., Cadet, J., & Douki, T. (2006). Cyclobutane pyrimidine dimers are predominant DNA lesions in whole human skin exposed to UVA radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(37), 13765-13770.
- Natali, P. G., Giacomini, P., Russo, C., Steinbach, G., Fenoglio, C., & Ferrone, S. (1983). Antigenic profile of human melanoma cells. Analysis with monoclonal antibodies to histocompatibility antigens and to melanoma-associated antigens. *J Cutan Pathol*, 10(4), 225-237.
- Nishi, H., Inoue, Y., Kageshita, T., Takata, M., & Ihn, H. (2010). The expression of human high molecular weight melanoma-associated antigen in acral lentiginous melanoma. *Biosci Trends*, 4(2), 86-89.
- Nishimura, E. K. (2011). Melanocyte stem cells: a melanocyte reservoir in hair follicles for hair and skin pigmentation. *Pigment Cell Melanoma Res*, 24(3), 401-410.
- Nishimura, E. K., Suzuki, M., Igras, V., Du, J., Lonning, S., Miyachi, Y., . . . Fisher, D. E. (2010). Key roles for transforming growth factor beta in melanocyte stem cell maintenance. *Cell Stem Cell*, 6(2), 130-140.
- O'Brien, C. A., Pollett, A., Gallinger, S., & Dick, J. E. (2007). A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*, 445(7123), 106-110.
- Okamoto, N., Aoto, T., Uhara, H., Yamazaki, S., Akutsu, H., Umezawa, A., . . . Nishimura, E. K. (2014). A melanocyte-melanoma precursor niche in sweat glands of volar skin. *Pigment Cell Melanoma Res*, 27(6), 1039-1050.
- Osawa, M., Egawa, G., Mak, S. S., Moriyama, M., Freter, R., Yonetani, S., . . . Nishikawa, S. (2005). Molecular characterization of melanocyte stem cells in their niche. *Development*, 132(24), 5589-5599.
- Pouly, S., Becher, B., Blain, M., & Antel, J. P. (1999). Expression of a homologue of rat NG2 on human microglia. *Glia*, 27(3), 259-268.
- Prince, M. E., Sivanandan, R., Kaczorowski, A., Wolf, G. T., Kaplan, M. J., Dalerba, P., . . . Ailles, L. E. (2007). Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(3), 973-978.
- Quintana, E., Shackleton, M., Sabel, M. S., Fullen, D. R., Johnson, T. M., & Morrison, S. J. (2008). Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature*, 456(7222), 593-598.
- Rappa, G., Fodstad, O., & Lorico, A. *The Stem Cell-Associated Antigen CD133 (Prominin-1) Is a Molecular Therapeutic Target for Metastatic Melanoma: Stem Cells*. 2008 Dec;26(12):3008-17. Epub 2008 Sep 18 doi:10.1634/stemcells.2008-0601.
- Ravanat, J. L., Douki, T., & Cadet, J. (2001). Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *J Photochem Photobiol B*, 63(1-3), 88-102.
- Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., & Weissman, I. L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 414(6859), 105-111.

- Ricci-Vitiani, L., Lombardi, D. G., Pilozzi, E., Biffoni, M., Todaro, M., Peschle, C., & De Maria, R. (2007). Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*, *445*(7123), 111-115.
- Ridolfi, R. L., Rosen, P. P., & Thaler, H. (1977). Nevus cell aggregates associated with lymph nodes: estimated frequency and clinical significance. *Cancer*, *39*(1), 164-171.
- Rifkin, R. M., Thomas, M. R., Mughal, T. I., Kaur, J. S., Krebs, L. U., & Robinson, W. A. (1988). Malignant melanoma--profile of an epidemic. *West J Med*, *149*(1), 43-46.
- Riker, A. I., Zea, N., & Trinh, T. (2010). The epidemiology, prevention, and detection of melanoma. *Ochsner J*, *10*(2), 56-65.
- Roesch, A., Becker, B., Schneider-Brachert, W., Hagen, I., Landthaler, M., & Vogt, T. (2006). Re-expression of the retinoblastoma-binding protein 2-homolog 1 reveals tumor-suppressive functions in highly metastatic melanoma cells. *J Invest Dermatol*, *126*(8), 1850-1859.
- Roesch, A., Fukunaga-Kalabis, M., Schmidt, E. C., Zabierowski, S. E., Brafford, P. A., Vultur, A., . . . Herlyn, M. (2010). A temporarily distinct subpopulation of slow-cycling melanoma cells is required for continuous tumor growth. *Cell*, *141*(4), 583-594.
- Roesch, A., Mueller, A. M., Stempf, T., Moehle, C., Landthaler, M., & Vogt, T. (2008). RBP2-H1/JARID1B is a transcriptional regulator with a tumor suppressive potential in melanoma cells. *Int J Cancer*, *122*(5), 1047-1057.
- Ross, A. H., Cossu, G., Herlyn, M., Bell, J. R., Steplewski, Z., & Koprowski, H. (1983). Isolation and chemical characterization of a melanoma-associated proteoglycan antigen. *Arch Biochem Biophys*, *225*(1), 370-383.
- Schatton, T., Murphy, G. F., Frank, N. Y., Yamaura, K., Waaga-Gasser, A. M., Gasser, M., . . . Frank, M. H. (2008). Identification of cells initiating human melanomas. *Nature*, *451*(7176), 345-349.
- Schlingemann, R. O., Rietveld, F. J., de Waal, R. M., Ferrone, S., & Ruiters, D. J. (1990). Expression of the high molecular weight melanoma-associated antigen by pericytes during angiogenesis in tumors and in healing wounds. *Am J Pathol*, *136*(6), 1393-1405.
- Schmidt, P., Kopecky, C., Hombach, A., Zigrino, P., Mauch, C., & Abken, H. *Eradication of melanomas by targeted elimination of a minor subset of tumor cells*: Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Feb 8;108(6):2474-9. Epub 2011 Jan 31 doi:10.1073/pnas.1009069108.
- Seiji, M., & Fitzpatrick, T. B. (1961). The reciprocal relationship between melanization and tyrosinase activity in melanosomes (melanin granules). *J Biochem*, *49*, 700-706.
- Shidham, V. B., Qi, D. Y., Acker, S., Kampalath, B., Chang, C. C., George, V., & Komorowski, R. (2001). Evaluation of micrometastases in sentinel lymph nodes of cutaneous melanoma: higher diagnostic accuracy with Melan-A and MART-1 compared with S-100 protein and HMB-45. *Am J Surg Pathol*, *25*(8), 1039-1046.
- Simon, J. D., Peles, D., Wakamatsu, K., & Ito, S. (2009). Current challenges in understanding melanogenesis: bridging chemistry, biological control, morphology, and function. *Pigment Cell Melanoma Res*, *22*(5), 563-579.
- Singh, S. K., Clarke, I. D., Terasaki, M., Bonn, V. E., Hawkins, C., Squire, J., & Dirks, P. B. (2003). Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res*, *63*(18), 5821-5828.
- Smalley, K. S. (2003). A pivotal role for ERK in the oncogenic behaviour of malignant melanoma? *Int J Cancer*, *104*(5), 527-532.
- Stallcup, W. B., & Huang, F. J. (2008). A role for the NG2 proteoglycan in glioma progression. *Cell Adh Migr*, *2*(3), 192-201.
- Steel, K. P., Davidson, D. R., & Jackson, I. J. (1992). TRP-2/DT, a new early melanoblast marker, shows that steel growth factor (c-kit ligand) is a survival factor. *Development*, *115*(4), 1111-1119.
- Swart, G. W., Lunter, P. C., Kilsdonk, J. W., & Kempen, L. C. (2005). Activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM/CD166): signaling at the divide of melanoma cell clustering and cell migration? *Cancer Metastasis Rev*, *24*(2), 223-236.
- Tas, F. (2012). Metastatic behavior in melanoma: timing, pattern, survival, and influencing factors. *J Oncol*, *647684*(10), 27.

- Tordsson, J. M., Ohlsson, L. G., Abrahmsen, L. B., Karlstrom, P. J., Lando, P. A., & Brodin, T. N. (2000). Phage-selected primate antibodies fused to superantigens for immunotherapy of malignant melanoma. *Cancer Immunol Immunother*, *48*(12), 691-702.
- Ulmer, A., Dietz, K., Hodak, I., Polzer, B., Scheitler, S., Yildiz, M., . . . Klein, C. A. (2014). Quantitative measurement of melanoma spread in sentinel lymph nodes and survival. *PLoS Med*, *11*(2).
- Ulmer, A., Fischer, J. R., Schanz, S., Sotlar, K., Breuninger, H., Dietz, K., . . . Klein, C. A. (2005). Detection of melanoma cells displaying multiple genomic changes in histopathologically negative sentinel lymph nodes. *Clin Cancer Res*, *11*(15), 5425-5432.
- Wang, X., Wang, Y., Yu, L., Sakakura, K., Visus, C., Schwab, J. H., . . . Ferrone, S. (2010). CSPG4 in cancer: multiple roles. *Curr Mol Med*, *10*(4), 419-429.
- Weinstock, M. A., Colditz, G. A., Willett, W. C., Stampfer, M. J., Bronstein, B. R., Mihm, M. C., Jr., & Speizer, F. E. (1989). Nonfamilial cutaneous melanoma incidence in women associated with sun exposure before 20 years of age. *Pediatrics*, *84*(2), 199-204.
- Wu, X. C., Eide, M. J., King, J., Saraiya, M., Huang, Y., Wiggins, C., . . . Kim, J. (2011). Racial and ethnic variations in incidence and survival of cutaneous melanoma in the United States, 1999-2006. *J Am Acad Dermatol*, *65*(5 Suppl 1), 034.
- Yang, J., Price, M. A., Li, G. Y., Bar-Eli, M., Salgia, R., Jagedeeswaran, R., . . . McCarthy, J. B. (2009). Melanoma proteoglycan modifies gene expression to stimulate tumor cell motility, growth, and epithelial-to-mesenchymal transition. *Cancer Res*, *69*(19), 7538-7547.
- Yang, J., Price, M. A., Neudauer, C. L., Wilson, C., Ferrone, S., Xia, H., . . . McCarthy, J. B. (2004). Melanoma chondroitin sulfate proteoglycan enhances FAK and ERK activation by distinct mechanisms. *J Cell Biol*, *165*(6), 881-891.
- Yu, H., Pardoll, D., & Jove, R. (2009). STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer*, *9*(11), 798-809.
- Yu, L. L., Flotte, T. J., Tanabe, K. K., Gadd, M. A., Cosimi, A. B., Sober, A. J., . . . Duncan, L. M. (1999). Detection of microscopic melanoma metastases in sentinel lymph nodes. *Cancer*, *86*(4), 617-627.

Danksagung

Recht herzlich danken möchte ich meinem Betreuer, Herrn Prof. Dr. med Christoph Klein, für die Bereitstellung des Themas, die hervorragende Anleitung sowie die regelmäßigen Treffen zur Besprechung aktueller Fragen und des Fortschreitens des Projektes. Ein weiterer großer Dank geht an das gesamte Team der Onkogenomik Regensburg und insbesondere an Herrn Dr. Sebastian Scheitler, der mich während meiner Zeit im Labor mit großem Engagement mitbetreute. Vielen Dank für die Geduld und Beantwortung all meiner Fragen. Ein abschließender Dank geht an meine Familie und an meinen Partner, Herrn Thomas Fuchs, für die Unterstützung, die sie mir bei all meinen Vorhaben entgegenbringen.

Lebenslauf

■ Persönliche Daten

Geburtsdatum: 18.12.1986
Geburtsort: Bogen
Nationalität: deutsch
Religion: römisch-katholisch
Familienstand: ledig

■ Schulausbildung

09/1997-06/2006 Veit-Höser-Gymnasium Bogen, Abschluss: Abitur, Note 1,3

■ Hochschulausbildung

10/2006-05/2013 Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg
05/2013 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note „sehr gut“
09/2008 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note „sehr gut“

■ Berufserfahrung

09/2013-12/2015 Assistenzärztin der Abteilung für Allgemein- und Viszeralchirurgie am
Klinikum St. Barbara, Schwandorf
davon 5 Monate Notaufnahme und 6 Monate Intensivstation
seit 01/2016 Assistenzärztin der Abteilung für Neurologie am Klinikum der Barm-
herzigen Brüder Regensburg

ERKLÄRUNG ZUM PROMOTIONSVERFAHREN

nach § 3 Abs. 3 und 4 der Promotionsordnung
der Fakultät für Medizin der Universität Regensburg

Name: Naimer

Vorname: Veronika

geb. am: 18.12.1986

in: Bogen

Ich erkläre,

- dass ich den **Doktorgrad der Medizin / Zahnheilkunde*** nicht schon an einer Hochschule der Bundesrepublik Deutschland erworben habe
- dass ich nicht an anderer Stelle zu einem Promotionsverfahren zum Erwerb des **medizinischen / zahnmedizinischen Doktorgrades*** zugelassen bin
- dass ich die **medizinische / zahnmedizinische Doktorprüfung*** nicht schon an einer Hochschule der Bundesrepublik Deutschland endgültig nicht bestanden habe

Außerdem erkläre ich,

- dass mir keine Tatsachen bekannt sind, die mich zur Führung eines akademischen Grades im Sinne des Gesetzes über die Führung akademischer Grade unwürdig erscheinen lassen
- dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

(Ort, Datum)

(Unterschrift)

Die einmalige Rücknahme des Promotionsgesuches ist bis zur Bestellung der Gutachter zulässig.