

**Darstellung genetischer Heterogenität und genetischer Instabilität
in malignen Melanomen mittels
Mikrodissektion und Mikrosatelliten-PCR**

Von der Medizinischen Fakultät der Rheinisch-Westfälischen Technischen
Hochschule Aachen zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Philipp Babilas

aus Aachen

Berichter: Herr Privatdozent Dr. med. Albert Rübben
Herr Universitätsprofessor Dr. med. Gerhard Jakse

Tag der mündlichen Prüfung: 30. April 2003

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

Gewidmet meinen Eltern, Martin und Felix

INHALTSVERZICHNIS

1	EINLEITUNG	9
2	SCHRIFTTUM	10
2.1	Onkogene und Tumorsuppressorgene in der Karzinogenese	10
2.1.1	Onkogene.....	10
2.1.2	Tumorsuppressorgene.....	12
2.2	Das maligne Melanom.....	16
2.2.1	Das maligne Melanom im Spiegel der Zeit	16
2.2.2	Das maligne Melanom – Epidemiologie und Klinik.....	17
2.3	Molekulare Pathogenese des malignen Melanoms	22
2.3.1	Genetik des familiären malignen Melanoms (FAMMM-Syndrom).....	22
2.3.2	Tumorsuppressorgene beim malignen Melanom.....	22
2.3.3	Mehrstufenmodell der Melanomgenese nach Healy	28
2.4	Methodische Grundlagen zur Mutationsanalyse in malignen Tumoren.....	29
2.4.1	Methoden zur Darstellung von Punktmutationen, Deletionen und Insertionen kurzer Sequenzmotive	29
2.4.2	Methoden zur Darstellung chromosomaler Instabilität.....	31
2.4.3	Die Bedeutung der Mikrodissektion beim Mutationsnachweis in malignen Tumoren.....	34
3	PROBLEMSTELLUNG.....	36
4	MATERIAL UND METHODEN	37
4.1	Patientenmaterial.....	37
4.2	Methodendarstellung	37
4.3	Histologische Aufarbeitung	38
4.3.1	Hämatoxylin-Eosin Färbung (HE-Färbung).....	38
4.3.2	MIB-I-Färbung.....	39
4.4	Mikrodissektion	43
4.5	Molekularbiologische Analyse.....	44
4.5.1	DNA-Extraktion und Reinigung.....	44
4.5.2	Die Polymerase Ketten Reaktion (PCR).....	45
4.5.3	Gelelektrophorese.....	46

4.5.4	Temperaturgradienten-Single-Strand-Conformation-Polymorphism (TG-SSCP).....	47
5	ERGEBNISSE	52
5.1	Handhabung der Mikrodissektion	52
5.2	Bedeutung der Dissektatgröße für die Mikrosatellitenanalyse	53
5.3	Reproduzierbarkeit der Mikrosatellitenanalyse	56
5.4	Genetische und phänotypische Heterogenität im malignen Melanom.....	57
5.5	Genetische Instabilität in den untersuchten Tumoren	65
6	DISKUSSION	73
6.1	Methodische Aspekte der Mikrodissektion	73
6.2	Genetische Heterogenität und Instabilität in den untersuchten Tumoren.....	74
7	ZUSAMMENFASSUNG.....	81
8	ANHANG	82
8.1	Literaturverzeichnis	82
8.2	Abkürzungen.....	96
8.3	Danksagung	99
8.4	Lebenslauf.....	100

1 Einleitung

„... tausende und abertausende von kohlschwarzen, runden, unterschiedlich großen Flecken auf den mukösen, serösen und fibrösen Häuten der inneren Organe. Es war der beeindruckendste Anblick, den es für einen anatomischen Pathologen je gegeben hatte. Ich werde nie den angenehmen Schauer der Erregung vergessen, als ich dies sah. Selbst der begabteste Redner wäre in Verlegenheit geraten, um einer Darstellung dieser neuartigen und eindrucksvollen Erkrankung gerecht zu werden, die sich überall in so prächtigem Überfluss zeigte.“

William Norris (1792-1877)

Schon im frühen 19. Jahrhundert zeigte sich der Pathologe William Norris von der starken Invasivität und Metastasierungsneigung des malignen Melanoms beeindruckt. Rasch wurde das maligne Melanom als eines der bösartigsten Malignome erkannt. Eine kennzeichnende Eigenschaft des Melanoms ist die histologische Vielgestaltigkeit, die auf eine hohe Mutationsrate der Melanomzellen schließen lässt. Die genetische Instabilität wird als ein Grund für die besondere Malignität und Therapieresistenz des malignen Melanoms angesehen [Takata et al., 2000; Böni et al., 1998b; Fidler, 1996].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll die genetische Instabilität von Tumoren des malignen Melanoms dargestellt werden.

Die Analyse der genetischen Instabilität soll hierbei unter Berücksichtigung des heterogenen histologischen Bildes des malignen Melanoms erfolgen. Um der phänotypischen Heterogenität der Tumore Rechnung zu tragen, soll die molekulare Analyse an mikrodissezierten Gewebearealen durchgeführt werden. Hiermit können verschieden gestaltete Zellnester, die Ausdruck unterschiedlicher Genotypen sein können, getrennt voneinander analysiert werden. Die gewonnenen mikrodissezierten Tumorareale sollen mittels Mikrosatelliten-PCR und anschließender TG-SSCP-Analyse molekularbiologisch untersucht werden.

2 Schrifttum

2.1 Onkogene und Tumorsuppressorgene in der Karzinogenese

Mit dem Wissen um die Bedeutung genetischer Aspekte bei der Karzinogenese wurden auch die Onkogene und die Tumorsuppressorgene beschrieben. Ihnen wird eine zentrale Bedeutung in der Ätiologie des Krebses zugeschrieben.

2.1.1 Onkogene

Protoonkogene sind Gene, deren Produkte an der Steuerung des Zellzyklusses beteiligt sind. Sie nehmen an der Transduktionskaskade vom Zelläußeren über die Zellmembran zum Zellkern teil. Protoonkogene kodieren für Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren und steuern somit maßgeblich die Zellvermehrung. Werden durch bestimmte Mutationen (bzw. Chromosomentranslokationen) oder durch Infektion mit Retroviren die dominant wirkenden Protoonkogene aktiviert, so kann es zu einer nicht zyklusgerechten und ungebremsten Genexpression kommen. Diese kann eine unkontrollierte, autonome Zellproliferation zur Folge haben. Die aktivierenden Mutationen in Onkogenen sind im Gegensatz zu Mutationen in Tumorsuppressorgenen fast immer somatische Ereignisse. Konstitutionelle Mutationen sind wahrscheinlich letal [Murken, 1996].

Im einzelnen kommen die Onkoproteine folgenden Aufgaben nach:

- 1.) *Wachstumsfaktoren*: Diese binden an Rezeptoren der Zelloberfläche und führen zu DNA-Replikation und Zellteilung.
- 2.) *Wachstumsfaktorenrezeptoren*: Einige Onkogene kodieren für Zellrezeptoren. Bei Onkogenaktivierung kommt es auch ohne adäquates Substrat zur Rezeptorstimulation.
- 3.) *GTP-bindende Proteine*: Zu ihnen zählen die ras-Onkoproteine, sie vermitteln die Übertragung der Rezeptorinformation mittels Adenylatcyclase an die Effektorproteine der Zelle. Bei Fehlfunktion dieser protoonkogenen

Vermittlerproteine ist kein Ligand mehr von Nöten, der die Zellaktivierungskette in Bewegung setzt. Das Onkoprotein übernimmt eine Dauerstimulation in der Signaltransduktionskette.

- 4.) *Proteinkinasen*: Sie dienen der zytoplasmatischen Signalübertragung.
- 5.) *Proteine des Zellkerns*: Transkriptionsfaktoren oder Transkriptionsaktivatoren überwachen die Transkriptionsfrequenzen aller Gene. Replikationsfaktoren arbeiten unmittelbar bei der Replikation mit, indem sie die DNA-Polymerase unterstützen.

In Tabelle 2-1 sind einige relevante Onkogene aufgelistet.

Onkogen	Chromosomale Lokalisation	Funktion	Onkogene Wirkung
Sis	22q13	PDGF, Wachstumsfaktor	
ErB-2	17q11	Wachstumsfaktorrezeptor	Mammakarzinom
Fms	5q34	Wachstumsfaktorrezeptor	
Int-2, hst	11q13	Wachstumsfaktorrezeptor	
Met	7q22	Wachstumsfaktorrezeptor	
Src	20q13	Proteinkinase	
Abl	9q34	Proteinkinase	ALL, AML, CML
Fes	15q25	Proteinkinase	
Yes	18q21	Proteinkinase	
Mos, mil	8q11	Proteinkinase	
Raf	7p14	Proteinkinase	
Ras	6q11	GTP-bindendes Protein	Kolorektales Adenom/Karzinom, Lungenkarzinom, Prostatakarzinom
Fos	14q2	Transkriptionsfaktor	
Jun	1p31	Transkriptionsfaktor	
c-myc		DNA-Replikationsfaktor	Burkitt-Lymphom

n-myc l-myc			Neuroblastom Kleinzelliges Lungenkarzinom
Myb	6p22	DNA-Replikationsfaktor	

Tabelle 2-1: Überblick über einige wichtige Onkogene

2.1.2 Tumorsuppressorgene

Als Tumorsuppressorgene werden Gene bezeichnet, die unter physiologischen Bedingungen die Zellproliferation bremsen, den Zellen ihre weitere Differenzierung ermöglichen und das Genom vor Mutationen schützen. Da es sich um rezessive Gene handelt, müssen beide Allele mutiert vorliegen, damit die Tumorsuppressorfunktion ausfällt. Ein Wildtyp-Allel alleine reicht aus, um der physiologischen Funktion der Tumorsuppressorgene nachzukommen. Die „Two-Hit“ Hypothese nach Knudson vergleicht die Mutationen der Tumorsuppressorgene mit zwei Schlägen: Der erste Schlag erfolgt entweder als somatische Mutation oder schon in der Keimbahn. Das Wildtyp-Allel kann die Aufgabe der Tumorsuppression übernehmen, es liegt ein heterozygoter Zustand vor. Wird das Wildtyp-Allel durch eine chromosomale Deletion (durch den „zweiten Schlag“) eliminiert, so sprechen wir vom Heterozygotie-Verlust (Loss of Heterozygosity, LOH). Der Loss of Heterozygosity führt zum Funktionsverlust beider Tumorsuppressorgene, die proliferationshemmende Wirkung des Genprodukts fällt weg [Knudson, 1971; Happle, 1999].

Sind bei einer Keimbahnmutation alle Körperzellen mutiert, so entsteht bei einer weiteren Mutation eine Zelle, der das Tumorsuppressorgen fehlt und welche somit die Wachstumskontrolle entbehren muss. Die Wahrscheinlichkeit eines frühzeitigen onkogenen Ereignisses ist bei diesen Patienten sehr hoch.

In Tabelle 2-2 sind einige relevante Tumorsuppressorgene aufgelistet.

Tumorsuppressorgen	Chromosomale Lage	Assoziierter Tumor
RB	13q14	Retinoblastom, Mammakarzinom
p53	17p12	Li-Fraumeni-Syndrom
NF1	17q11	Neurofibromatose Typ I
NF2	22q12	Neurofibromatose Typ II
APC	5q21	Familiäre Polyposis Coli
MCC	5q21	Kolorektalkarzinom
DCC	18q21	Kolorektalkarzinom
NM23	17q21	Kolorektalkarzinom
MEN I	11q13	Wermer-Syndrom

Tabelle 2-2: Überblick über einige wichtige Tumorsuppressorgene

2.1.2.1 Mismatch-Repair Gene

Eine für die Karzinogenese relevante Gruppe der Tumorsuppressorgene sind die sogenannten mismatch-repair Gene [Loeb et Loeb, 2000]. Diese kodieren für Proteine, die das mismatch-repair System bilden. Dieses System ist verantwortlich für die Erhaltung der Integrität des Genoms, es überwacht die Zuverlässigkeit und Korrektheit des Replikationsablaufs [Lothe, 1997]. Treten bei Mitose oder Meiose in der DNA-Replikation Fehler auf, so werden diese von dem mismatch-repair System entdeckt und beseitigt. Der Funktionsverlust der mismatch-repair Gene durch Mutationen kann so zu einem ineffektiven und fehlerhaften Ablauf der Replikationskontrolle und der DNA-Reparatur führen. Mutationen in diesen Genen führen zu einer 100- bis 1000-fachen Steigerung der allgemeinen Mutationsrate und auf diesem Wege zur genetischen Instabilität [Parsons et al., 1993]. Auffallend ist eine enorme Steigerung der Anzahl der Punktmutationen [Bhattacharyya et al., 1995].

Durch eine Mutation der mismatch-repair Gene erhöht sich auch die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Mutationen in anderen Genen, welche mit der Onkogenese bestimmter Tumore assoziiert sein können [Aaltonen et al., 1993; Lothe, 1997]. So wird durch den mismatch-repair Defekt, die Zellen werden auch als RER+

(replication error positiv) bezeichnet, der Prozess der Mutation und Selektion beschleunigt, eine Tumorgenese wird wahrscheinlicher [Claij et te Riele, 1999].

Zu beachten ist jedoch, dass dieser mismatch-repair Defekt für sich gesehen noch keine erhöhte Zellproliferation oder gar eine maligne Entgleisung verursacht. Durch eine Erhöhung der Gesamtmutationsrate machen sie jedoch eine Mutation in den entsprechenden Tumorsuppressorgenen oder Onkogenen wahrscheinlicher [Lothe, 1997].

Als Tumorsuppressorgene sind die mismatch-repair Gene rezessiv und erfordern somit ebenfalls den von Knudson postulierten Two-Hit-Mechanismus zur Inaktivierung [Knudson, 1971]. Patienten mit bestimmten familiären Krebsleiden sind durch eine Keimbahnmutation im Bereich der mismatch-repair Gene konstitutionell hemizygot für das Fehlerkorrektursystem. Ihre Zellen verfügen jedoch kraft des noch vorhandenen Allels über ein funktionsfähiges Reparatursystem und zeigen somit keine genetische Instabilität. Kommt es durch eine somatische Mutation zu einem Ausfall des zweiten Allels, so büßen die Zellen die Reparaturfunktion vollends ein. Es kommt zur stochastischen Akkumulation von weiteren Mutationen in verschiedenen Genen dieser Zelle [Liu et al., 1997].

2.1.2.2 Mikrosatelliteninstabilität

Das menschliche Genom besteht nur zu ca. 20 % aus Genen (incl. Exons und Introns). Der restliche, weitaus größere Anteil des Genoms besitzt keine Kodierungsfunktion und besteht maßgeblich aus Einzelkopiesequenzen, SINE- und LINE-Abschnitten und Satelliten-DNA. In diesen Bereich fallen auch die für molekularbiologische Untersuchungen wichtigen Mikrosatelliten. Diese DNA-Abschnitte bestehen aus kurzen Nukleotidsequenzen (ein bis zehn Basenpaare), die sich zehn bis 50 mal wiederholen und über das ganze Genom verteilt sind [Weber et May, 1989; Dib et al., 1996; Naidoo et Chetty, 1998; Talwalkar et al., 1998; Lothe, 1997]. Aufgrund ihres repetitiven Charakters neigen diese DNA-Abschnitte eher zu Mutationen, als andere Genabschnitte. So liegen in der Bevölkerung die Mikrosatelliten sehr häufig mit verlängerten oder verkürzten DNA-Sequenzen vor [Perucho et al., 1996]. Diese Unregelmäßigkeiten werden als Mikrosatelliteninstabilität (MSI) bezeichnet [Thibodeau et al., 1993].

Mikrosatelliteninstabilität ist definiert als genetische Instabilität, assoziiert mit einer Mutation und konsekutivem Funktionsverlust der mismatch-repair Gene [Boland et al., 1998]. Das Maß der MSI kann als indirekter Marker des defekten mismatch-repair Systems verstanden werden. Es scheint ein kausaler Zusammenhang zwischen mismatch-repair Genen und Onkogenese vorzuliegen [Loeb et Loeb, 2000].

1993 wurde das Phänomen der MSI in Zusammenhang mit Kolonkarzinomen im Rahmen des hereditären nicht polypösen kolorektalen Karzinoms (HNPCC, Lynch-Syndrom) entdeckt [Ionov et al., 1993]. Dieses Syndrom ist eine autosomal-dominante Erkrankung mit einer Penetranz von mehr als 90%. Es ist eines der häufigsten Tumordispositionssyndrome, gekennzeichnet durch ein vergleichsweise früh auftretendes Erstmalignom (<50 Lj). Betroffene haben im Vergleich zur Normalbevölkerung ein ca. siebenfach erhöhtes Risiko, an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken. Ungefähr jedes zehnte Kolorektalkarzinom ist diesem familiären Syndrom zuzurechnen, oft tritt es vergesellschaftet mit anderen primären Malignomen des Kolons, des Endometriums, des Ovars, des kleinen Beckens, des Magens oder des Urogenitaltraktes auf [Loeb, 1994; Lynch et al., 1993].

In Tumoren von HNPCC-Patienten werden, neben zytogenetisch sichtbaren Chromosomenanomalien und Allelverlusten, bei molekularbiologischen Untersuchungen in repetitiven Mikrosatelliten-Sequenzen Insertionen und Deletionen identifiziert. Diese führten erstmals zur Diagnose der Mikrosatelliteninstabilität. Die wichtigsten mismatch-repair Gene bei HNPCC sind das hMSH2 Gen, kartiert bei 2p16, das hMLH1 Gen, kartiert bei 3p21, das hPMS2 Gen, kartiert bei 7p22 und das hPMS1 Gen (Chr. 2) [Papadopoulos et al., 1994; Prolla, 1998]. Studien ergaben eine Mikrosatelliteninstabilität in 40-100% aller getesteten Mikrosatellitenorte bei ca. 70% aller getesteten HNPCC Patienten [Arzimanoglou et al., 1998; Claij et te Riele, 1999].

Auch bei vielen anderen sporadischen oder familiär bedingten Tumorarten, wie bei Pankreas-Karzinom, Magenkarzinom, Endometrialkarzinom, nicht kleinzelliges Lungenkarzinom und sporadischen Kolonkarzinom, wurde die MSI beobachtet [Arzimanoglou et al., 1998; Claij et te Riele, 1999; Thibodeau et al., 1993].

Beim malignen Melanom wird das Phänomen der MSI ebenfalls beobachtet. Eine umfangreichere Studie ergab in 29% der untersuchten Fälle das Vorliegen von MSI in Zellen des malignen Melanoms [Talwalkar et al., 1998].

2.2 Das maligne Melanom

2.2.1 Das maligne Melanom im Spiegel der Zeit

Als „*krebsiges, pilzartiges Gewächs, teilweise weiß, teilweise schwammartig weich und schwarz*“ beschrieb John Hunter (1728-1793) im Jahre 1787 erstmals die Hautveränderung, die wir heute als malignes Melanom bezeichnen. Bei dem Tumor, den John Hunter damals untersuchte und beschrieb, handelte es sich um eine mehrfach rezidivierendes Geschwulst im Unterkieferwinkel eines 35-jährigen Mannes. Die histologische Untersuchung des Originalpräparates, heute ein Museumsexponat im Royal College of Surgeons/England, bestätigte die Diagnose [Bodenham et al., 1968].

Mit dem Erstbeschreiber John Hunter beginnt der dokumentierte Teil der Geschichte des malignen Melanoms, dessen Entdeckung und Erforschung bis heute andauert.

René Laennec (1781-1826) war es, der als erster den Begriff „*Melanosis*“ (melanos [griech]: schwarz) prägte. Er schrieb 1812 in einer Publikation in der „Bulletin de la Faculté de Médecine de Paris“: „*Diese Erkrankung entging offensichtlich der Aufmerksamkeit der Anatomen und sonstigen Ärzte, die Sektionen durchführen.*“ [Laennec, 1812]. Von nun an entwickelte sich das Bewusstsein, dass auch diese kleine, harmlos erscheinende Hautveränderung zerstörerische Auswirkungen auf den Organismus haben kann.

William Norris (1792-1877) wertete die ihm bekannten Kasuistiken über das maligne Melanom aus und veröffentlichte schließlich eine Abhandlung über die Grundsätze der Epidemiologie, der Pathologie, des klinischen Bildes sowie der klinischen Therapie des malignen Melanoms, die in vielen Punkten mit den heutigen Erkenntnissen übereinstimmt [Davis, 1980].

Durch weitere Beobachtung und Dokumentation erschloss sich den Wissenschaftlern in den folgenden Jahrzehnten mehr und mehr die außerordentliche Malignität und die Metastasierungsneigung des malignen Melanoms. Die frühzeitige und großzügige chirurgische Exzision wurde als alleinige Chance gegen das maligne Melanom angesehen. So betonte Joseph Coats 1885 in einem Artikel des Glasgow Medical Journal die Wichtigkeit, „*dass auch Gewebe in einigem Abstand neben den makroskopischen Grenzen des Tumors entfernt wird*“ [Coats, 1885]. Schon damals

erkannte man die Problematik der lymphogenen Metastasierung und den damit verbundenen Lymphknotenbefall, die entsprechende Lymphadenektomie wurde damals ebenso kontrovers diskutiert wie teilweise heute noch. Als Verfechter der Radikaloperation schrieb E. Snow 1892 in der Zeitschrift „Lancet“ über die *„absolute Nutzlosigkeit von chirurgischen Maßnahmen, die sich nur auf den Primärtumor beschränken. Wir sehen darüber hinaus die ausschlaggebende Wichtigkeit, die naturgemäß zuerst befallenen Lymphknotenstationen völlig auszuräumen, wo immer möglich. Bevor sie sich vergrößern, ist die radikale Entfernung (...) eine sichere und einfache Maßnahme“* [Snow, 1892].

William Sampson Handley (1872-1962) setzte sich mit zahlreichen Veröffentlichungen und Skizzen weiter für die radikale Operationstechnik ein, seine Empfehlungen aus dem Jahre 1907 stellten in der Melanombehandlung das Dogma für die nächsten 50 Jahre dar [Handley, 1907; Ackerman et Schreiner, 1983].

In den 60er Jahren verlor die Radikaloperation zunehmend an Anhängern, es wurde sparsamer reseziert. Durch die Einführung eines Klassifizierungssystems durch Pathologen wie Clark und Breslow können Patienten mit individuellen Tumorleiden differenzierter eingestuft werden. Die Etablierung der Chemotherapie stellt eine weitere Therapiesäule dar.

In der aktuellen Entwicklung wird der Kampf gegen das Melanom auch im Labor ausgefochten. Molekularbiologische, immunologische und virologische Untersuchungen helfen bei der Entwicklung neuer Therapieformen. So werden neben der Immunintervention mit der Gen- und Vakzinierungstherapie neue, ermutigende Erfolge verzeichnet [Neslste et al., 1999; Kirkwood et al., 2002; Brown et Kirkwood, 2001].

2.2.2 Das maligne Melanom – Epidemiologie und Klinik

Das maligne Melanom ist ein hochmaligner Tumor, der durch eine bemerkenswert frühzeitige lymphogene und hämatogene Metastasierungstendenz gekennzeichnet ist (etwa 65% aller Erstmetastasierungen betreffen das regionäre Lymphabflusssystem). Die maligne Entartung geht von den Melanozyten aus, die in der Basalzellschicht der Epidermis beheimatet sind.

Als neuroektodermaler Tumor befällt das maligne Melanom neben Haut und Schleimhaut auch Augen und Hirnhaut.

Mit einer Inzidenz von 10-12 pro 100000 Einwohner pro Jahr (1995, Deutschland) [Garbe et Blum, 2001] zählt das Melanom zu den fünf häufigsten Krebsarten bei Mann und Frau in Deutschland. Das maligne Melanom befällt Frauen und Männer im Verhältnis 1 zu 0,82 (Deutschland, 1995) [Grabe et Blum, 2001]. Während es bei Frauen meistens auf den Extremitäten erscheint, ist die häufigste Lokalisation beim Manne der Rumpf [Grabe et Blum, 2001; Taylor et Gore, 1995]. Auffallend ist insbesondere die starke Zunahme der Morbidität des malignen Melanoms, so hat sich in England die Häufigkeit der Melanome von 1971 bis 1989 um 190 Prozent (Männer) bzw. 137 Prozent (Frauen) erhöht. Die Steigerungsrate der Melanominzidenz ist zur Zeit höher als die aller anderen Malignome [Nakayama et al., 2000].

Ein erster Hinweis auf eine bestehende Malignität ist die Veränderung des Erscheinungsbildes einer pigmentierten Hautveränderung. Hierzu zählt in erster Linie die Größenzunahme (horizontales Wachstum), wobei insbesondere eine Größenverdoppelung in einem Zeitraum von drei bis acht Monaten für einen malignen Prozess spricht. Weitere wichtige Symptome sind Asymmetrie, unregelmäßige Begrenzung, Höhenwachstum (vertikales Wachstum) sowie Knoten- oder Blasenbildung, Blutungen, Ulzerationen oder Juckreiz der entstandenen Hautveränderung bzw. des bereits bestehenden NZN. Die mögliche Farbveränderung ist ebenfalls zu beachten, sie schwankt von schwarz über braun bis hin zu bläulichen Färbungen und kann in einem einzelnen Herd unregelmäßig ausfallen. Seltener werden völlig pigmentfreie Melanome beobachtet (amelanotisches malignes Melanom, AMM).

Auch spontane Regressionen werden beobachtet. Die Regression ist Zeichen eines Entzündungsprozesses, repräsentiert durch ein starkes lymphozytäres Infiltrat zwischen den untergehenden Melanomzellen. Nach Phagozytose des freigewordenen Pigments und nach Abklingen der Entzündungsreaktion bleibt eine Fibrose zurück. Durch vollständige Regression des Primärtumors bei bereits diagnostizierten Metastasen erklärt sich das Phänomen des okkulten Melanoms. Hier ist der Primärtumor nicht mehr nachweisbar [Mc Govern, 1972; Smith et Stehlin, 1965].

Das maligne Melanom ist somit durch eine starke Variabilität des äußeren Erscheinungsbildes gekennzeichnet. Dieser diagnostischen Hürde steht der einfache

Zugriff in Form von optischer Begutachtung gegenüber. Grundsätzlich muss eine histologische Analyse der endgültigen Diagnosestellung vorausgehen.

Obligate Angaben des Histologiebefundes sind der klinisch-histologische Subtyp, der maximale vertikale Tumordurchmesser (Breslow) sowie die Invasionstiefe (Clark-Level). Diese Angaben bilden mit der Diagnose einer eventuellen Metastasierung die TNM-Klassifikation, die zur Therapiefindung beiträgt und prognostische Aussagen zulässt. Als prognostisch wichtigster Faktor gilt die Eindringtiefe nach Breslow [Grabe 2001].

Klinisch-histologische Subtypen

Modifiziert nach W.H. Clark, werden die Melanome, entsprechend ihrer Histologie, in verschiedene Subtypen eingeteilt [Clark et al., 1975]. Auffallend ist das unterschiedliche Durchschnittsalter der Patienten bei Diagnosestellung [Grabe et Blum, 2001]. Die vier häufigsten Wachstumsformen des malignen Melanoms sind das superfiziell-spreitende Melanom (SSM), das noduläre Melanom (NM), das lentigo-maligna Melanom (LMM) und das akral-lentiginöse Melanom (ALM). 91,6 % aller primären malignen Melanome können einem dieser Subtypen zugeordnet werden [Grabe et Blum, 2001].

Superfiziell-spreitendes Melanom: Bei den meisten malignen Melanomen handelt es sich um ein SSM (57,4% in Deutschland, 1983-2000) [Grabe et Blum, 2001]. Die Wachstumsform ist hier primär horizontal. Das Durchschnittsalter bei Diagnosestellung ist 51 Jahre (Deutschland, 1983-2000) [Grabe et Blum, 2001].

Noduläres Melanom: Das noduläre Melanom ist der zweithäufigste Melanomtyp (21,4% in Deutschland, 1983-2000) [Grabe et Blum, 2001]. Der Tumor weist in der Regel ein primär vertikales Wachstum auf [Clark et al., 1975; McGovern, 1972]. Das NM ist gewöhnlich erhaben und knotig, oft fehlt eine horizontale Ausbreitung. Das Durchschnittsalter bei Diagnosestellung ist 56 Jahre (Deutschland, 1983-2000) [Grabe et Blum, 2001].

Lentigo-maligna Melanom: Das Durchschnittsalter bei Diagnosestellung des LMM ist 68 Jahre (Deutschland, 1983-2000) [Grabe et Blum, 2001]. Das lentigo-maligna Melanom ist meist auf das Gesicht und den Hals beschränkt. Dem LMM geht als Präkanzerose eine Melanosis praeblastomatosa Dubreuilh voraus, die Jahrzehnte

bestehen kann, bevor der Tumor maligne Anteile entwickelt. Bei dem seltenen LMM (8,8 % in Deutschland, 1983-2000) [Grabe et Blum, 2001] besteht eine lange horizontale Wachstumsphase (durchschnittlich 10 Jahre), bevor der Tumor vertikale Anteile ausbildet. Durch häufige Regressionszonen können die Tumoren in späteren Stadien landkartenähnliche Formen annehmen [Clark et al., 1975; McGovern, 1972].

Akral-lentiginöses Melanom: Dieser Melanomtyp (4,0 % in Deutschland, 1983-2000) [Grabe et Blum, 2001] ähnelt klinisch und histologisch dem LMM, ist jedoch aggressiver und neigt frühzeitiger zur Metastasierung. Die Lokalisation ist vornehmlich auf die Akren beschränkt, überdurchschnittlich häufig ist die Fußsohle betroffen. Auch eine subunguale Ausbildung wird beobachtet, so entsteht das ALM oftmals an Stellen, die der Beobachtung nicht ohne weiteres zugänglich sind. Dies erklärt die verhältnismäßig große Durchschnittsausdehnung (Durchmesser: 3 cm) des Tumors bei Diagnosestellung [Coleman et al., 1980; Kremenz et al., 1980; Sondergaard et Olsen, 1980]. Das Durchschnittsalter bei Diagnosestellung ist 63 Jahre (Deutschland, 1983-2000) [Grabe et Blum, 2001].

Im folgenden ist die Einteilung der Invasionstiefe (Clark-Level) (1.), die TNM-Klassifikation (2.) sowie die klinische Stadieneinteilung (3.) tabellarisch zusammengefasst [Garbe et al., 1990; Häffner et al., 1992].

1. Invasionstiefe (Clark-Level)

- Level I:** Tumorzellen befinden sich ausschließlich in der Epidermis
- Level II:** Tumorzellen durchbrechen die Basalmembran bis in das Stratum papillare
- Level III:** Tumorzellen befinden sich im gesamten Stratum papillare bis zur Grenzzone des Stratum reticulare
- Level IV:** Tumorzellen befinden sich im mittleren und unteren Korium
- Level V:** Tumorzellen befinden sich im subkutanen Fettgewebe

2. TNM Klassifikation

pTis	→ in situ	<i>Invasionslevel I</i>
pT	→ Primärtumor	
pT1	→ Tumordicke < 0.75 mm	<i>Invasionslevel II</i>
pT2	→ Tumordicke 0.75-1,5 mm	<i>Invasionslevel III</i>
pT3	→ Tumordicke 1,51-4,0 mm	<i>Invasionslevel IV</i>
pT4	→ Tumordicke > 4,0mm	<i>Invasionslevel V</i>
pTaa	→ Satellitenmetastasen innerhalb von 2 cm vom Primärtumor	
pTba	→ In-Transit-Metastasen vor der regionären Lymphknotenstation	

N0	keine Lymphknotenmetastasen nachweisbar
N	Regionäre Lymphknotenmetastasen
N1	Metastasen < 3 cm in regionären Lymphknoten
N2	Metastasen > 3 cm in regionären Lymphknoten
M0	keine Fernmetastasen nachweisbar
M	Fernmetastasen
M1a	Befall von Haut, Subkutis oder Lymphknoten jenseits der regionären Lymphknoten
M1b	Viszerale Metastasen

3. Klinische Stadieneinteilung mit 10-Jahre-Überlebensrate

Klinische Stadieneinteilung:				10-JÜR
Stadium Ia:	pT1	NO	MO	97%
Stadium Ib:	pT2	NO	MO	90%
Stadium IIa:	pT3	NO	MO	67%
Stadium IIb:	pT4	NO	MO	43%
Stadium IIIa:	pTa, pTb	NO	MO	28%
Stadium IIIb:	jedes pT	N1, N2	MO	19%
Stadium IV:	jedes pT	jedes N	M1	3%

[Garbe et al., 1990; Häffner et al., 1992]

2.3 Molekulare Pathogenese des malignen Melanoms

2.3.1 Genetik des familiären malignen Melanoms (FAMMM-Syndrom)

Familiäre Melanome nehmen einen Anteil von 8 bis 12% aller Melanome ein [Cavanee et al., 1983]. Anhand familiärer Melanome wurden die ersten Anstrengungen bezüglich der Aufdeckung von Kandidatengenen der Melanomgenese unternommen. Ursprünglich wurde ein Gen-Locus auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 als ursächliches Gen beim FAMMM beschrieben [Greene et al., 1983; Greene, 1998], welcher in weiteren Arbeiten auf die Region 1p36 eingegrenzt wurde [Bale et al., 1989]. Weitere Studien dokumentieren die Region 9p21 als relevanten Genbezirk, dass entsprechende Protein p16 wird vielfach als Schlüssel-Tumorsuppressorgen bei der Tumorentstehung bezeichnet [Böni et al., 1998b; Cannon-Albright et al., 1992; Park et al., 1998]. Genetische Kopplungsanalysen weisen auf eine Kombination beider Genorte hin und postulieren zwei Genloci für familiäre Melanome auf den Chromosomen 1p36 bzw. 9p21 [Cannon-Albright et al., 1992; Fountain et al., 1992; Goldstein et al., 1993, 1994; Kamb et al., 1994; Kamb, 1996; Kraehn et al., 1994; Wallace et al., 1971].

2.3.2 Tumorsuppressorgene beim malignen Melanom

2.3.2.1 Genloci auf Chromosom 9

Ein bedeutendes Gen auf Chromosom 9 ist das **p16-Gen** (CDKN2-/MTS1-Gen). Es zählt neben dem p53-Gen und dem rb-Gen zu den besterforschten Genen der Karzinogenese. Sie sind nicht gewebespezifisch wirksam; bei einer Vielzahl von soliden und hämatologischen Neoplasien wurde ihre Inaktivierung als bedeutender pathogenetischer Mechanismus erkannt. Die gemeinsame Fähigkeit dieser Gene liegt in der Initiierung eines Mitosestopps bei einer Schädigung des Zellgenoms. Dadurch wird die DNA-Reparatur ermöglicht oder - bei irreversibler DNA-Schädigung - die Apoptose der Zelle herbeigeführt. Den Genen kommt somit eine wichtige Kontrollfunktion im Rahmen der Zellproliferation zu.

Das p16-Gen kartiert bei der chromosomalen Region 9p21 und spielt eine Schlüsselrolle in der Zellzykluskontrolle. Das Protein besteht aus 148 Aminosäuren und weist ein Molekulargewicht von 15845 Da auf. Dieses bindet sich an das CDK4 Protein (cyclin dependent kinase 4) und inhibiert die Phosphorylierung verschiedener Substrate, welche die Zelle stimulieren, in die praemitotische S-Phase des Zellzyklusses einzutreten [Serrano et al., 1993]. Das Fehlen von p16-Protein durch eine Deletion des Gens oder durch die Expression von mutanten und damit inaktiven Proteinspezies kann somit ein abnormes Zellwachstum zur Folge haben [Kamb et al., 1996].

Das p16-Gen ist nachweislich in einer Vielzahl von sporadischen Melanomzelllinien verloren oder mutiert, in mehreren Melanomfamilien konnte eine Keimzellmutation im p16-Gen nachgewiesen werden [Holland et al., 1995; Hussussain et al., 1994; Kamb et al., 1994; Nobori et al., 1994; Funk et al., 1998]. Insgesamt in 75% der untersuchten, aus metastasierenden sporadischen Melanomen kultivierten Zelllinien ist das p16-Gen inaktiviert [Kamb, 1994].

Es ist nicht ausgeschlossen, dass neben Punktmutationen auch andere molekulare Mechanismen wie eine Methylierung des p16-Gens dessen Inaktivierung bewirken können [Merlo et al., 1995; Gonzalez-Zuluteta et al., 1995].

Trotz dieser Erkenntnisse ist der konkrete Zusammenhang zwischen der Pathogenese des malignen Melanoms und dem p16-Gen noch nicht abschließend geklärt. So werden verschiedene Aspekte kontrovers diskutiert. Anstoß liefert hier die relativ seltene Alteration des p16-Gens in sporadischen Melanomen im Vergleich zum FAMMM-Syndrom [Flores et al., 1996; Glendening et al., 1995; Gruis et al., 1995; Healy et al., 1996; Malandsmo et al., 1996; Ohta et al., 1994].

Auch der Zeitpunkt der Inaktivierung des p16-Gens bleibt umstritten. Insbesondere das häufige Auftreten der Mutationen in dysplastischen Nävi sowie der Nachweis der p16-Mutation in 25% aller Fälle des FAMMM-Syndroms lassen ein frühes Einsetzen des p16-Genverlustes sehr wahrscheinlich werden [Goldstein et al., 1993; Healy et al., 1995; Lee et al., 1997; Matsumura et al., 1998; Walker et al., 1995].

Andererseits ergaben zahlreiche Analysen, dass der p16-Funktionsausfall maßgeblich den invasiven oder metastasierenden Melanomen vorbehalten bleibt und keine unabdingbare Voraussetzung zur Melanomgenese ist [Reed et al., 1995; Rübber et al., 2000; Talve et al., 1997]. Interessanterweise ist im sporadischen malignen Melanom der vorherrschende, den p16 Verlust bedingende Mutationstyp die

chromosomale Deletion und seltener die Punktmutation. Dies entspricht dem Konzept des späten Progressionsgens, welches in einem bereits genetisch instabilen malignen Zellklon auftritt.

Auch das **p19-Gen** wird in Zusammenhang mit der Melanomgenese gebracht. Hier wurde insbesondere bei einer Kombination von Melanom und Astrozytom ein Ausfall beobachtet [Greene, 1998]. P16 und p19 induzieren in gleicher Form einen Arrest des Zellzyklus. Auch wenn der Wirkmechanismus des p19-Proteins noch nicht genau bekannt ist, so scheint sicher zu sein, dass beide Proteine an unterschiedlicher Stelle des Zellzyklus wirken.

Das **p15-Gen** liegt 35 kb zentromerwärts neben CDKN2 [Goldstein et Tucher, 1997; Hannon et Beach, 1994; Jen et al., 1994]. Das p15-Gen kodiert für ein dem Ink4a sehr verwandtes Protein von 137 Aminosäuren und mit einem Gewicht von 14700 Da. Trotz ihrer Ähnlichkeit scheint das p15-Gen in einem anderen Funktionskontext der Tumorsuppression zu stehen als das p16-Gen. Zum einen kann die p15 Genexpression, im Gegensatz zur p16 Expression, durch TGF- β induziert werden und zum anderen funktioniert das p15 Gen, anders als das p16-Gen, unabhängig vom Retinoblastomgen [Hannon et Beach, 1994; Stone et al., 1995]. Durch die räumliche Nähe des p16- und p15-Gens kommt es häufig zum Verlust beider Gene, was für die Entwicklung gewisser Tumorarten eine entscheidende Bedeutung haben könnte. Teilweise wird postuliert, dass im kombinierten Verlust beider Gene eine zusätzliche Triggerfunktion der Karzinogenese liegt [Hannon et Beach, 1994].

Ein weiteres Tumorsuppressorgen scheint im Bereich von D9S259 zu kartieren, der Verlust scheint unabhängig von dem Verlust des p16-Gens zu erfolgen [Rübgen 2000].

Auch an Mikrosatellitenmarker D9S736 (9p22) wurde eine signifikant erhöhte Frequenz des LOH (Loss of Heterozygosity) festgestellt. Es wurde eine Korrelation zwischen der Häufigkeit des LOH auf Chromosom 9 und dem Alter der Patienten postuliert. Aus den Untersuchungen ging hervor, dass die Patientengruppe älter 72 Jahre signifikant öfter einen LOH aufweist als jüngere Patienten [Smeds et al., 2000].

Die relative Position einiger wichtiger Tumorsuppressorgene und Mikrosatelliten auf Chromosom 9 ist in Abbildung 2-1 dargestellt (Quelle: The Genome Database, Johns Hopkins University, School of Medicine, 1996).

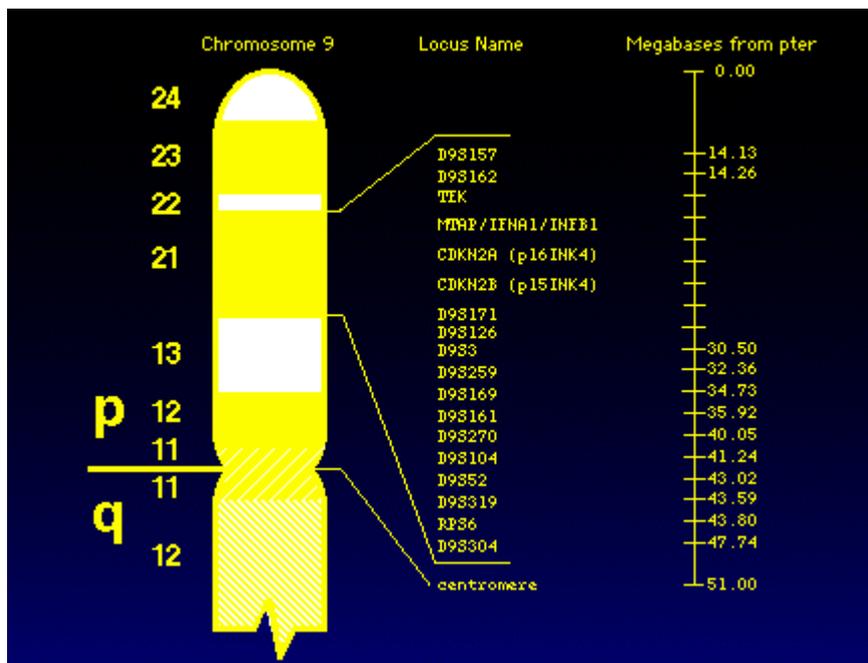


Abbildung 2-1: Relative Position einiger wichtiger Tumorsuppressorgene und Mikrosatelliten auf Chromosom 9

2.3.2.2 Genloci auf Chromosom 10

Die chromosomalen Verluste des Chromosoms 10 betreffen in einer Vielzahl der Fälle größere Abschnitte und lassen sich so meist nicht auf eine bestimmte chromosomale Region begrenzen. Ein Bereich liegt telomer auf dem langen Arm des zehnten Chromosoms im Bereich 10q22-10qter. Zahlreiche Studien belegen, dass Alterationen in diesem Bereich einen frühzeitig eintretenden Prozess in der Tumorevolution darstellen. Der Verlust erfolgt hier oft durch größere Deletionen, beobachtet werden Verluste eines der homologen Chromosome oder eines kompletten langen Armes des

Chromosoms 10 [Cowan et al., 1988; Indsto et al., 1998; Palmiter et al., 1988; Richmond et al., 1986].

In anderen Studien wird eine Mutation auf Chromosom 10 als ein im Evolutionsverlauf eher späteres Geschehnis beschrieben. Besondere Bedeutung wird Deletionen der PTEN/MMAC1 Region (10q23.3) beigemessen [Poetsch et al., 2001; Saida, 2001; Herbst et al., 1994; Böni et al., 1998a]. Ebenso wurden bei zahlreichen Hirntumoren die Veränderungen erst in späteren Stadien gefunden. Auch hier war meist mehr als eine Region betroffen [Tada et al., 2001; Jin et al., 2000].

2.3.2.3 Genloci auf Chromosom 11

Auch das Chromosom 11 wird in Zusammenhang mit der Melanomgenese gebracht. So zeigten Studien, dass bei Melanompatienten eine kürzere Überlebenszeit mit dem Nachweis von zytogenetischen Veränderungen auf dem Chromosom 11 assoziiert ist. Dementsprechend gelang es, in Melanomzelllinien die Tumorprogression durch den Transfer eines intakten Chromosoms 11 deutlich zu verringern [Trent et al., 1990]. Herbst et al. beschreiben einen im Verlauf der Tumorprogression stattfindenden Allelverlust im Bereich 11q23 [Herbst et al., 1995]. Andere Studien ergaben Allelverluste auf 11q22 [Tomlinson et al., 1996]. Die Region 11q13 wurde insbesondere beim akral-lentiginösen Melanom (ALM) gehäuft mutiert nachgewiesen (47%), der Autor geht von einer Assoziation mit einer frühen Entwicklungsphase des Melanoms aus [Bastian et al., 2000].

Eine weitere relevante chromosomale Bande findet sich im Bereich 11q13. Hier finden sich zwei potentielle Tumorsuppressorgene, MEN Typ1 (Multiple Endokrine Neoplasie Typ 1) und ST3 (suppressor of tumorigenicity) sowie die beiden Onkogene FAU (FBR-MuSV assoziiertes Gen) und INT2 [Tomlinson et al., 1993, 1996; Morse et al., 1992].

2.3.2.4 Genloci auf Chromosom 14

Rübben et al. konnten in einem Melanom eine Selektion für LOH von D14S53 nachweisen [Rübben et al., 2000]. Pathak et al. beschreiben zwei potentielle Tumorsuppressorgene bei 14q12-12 und 14q32 [Pathak 1991].

2.3.2.5 Genloci auf Chromosom 17

Ein wichtiges Tumorsuppressorgen auf Chromosom 17 ist das TP 53-Gen, kartiert bei 17p13.1. Es kodiert das nukleär wirkende p53-Protein. Für den normalen Zellzyklus und die physiologische Zelldifferenzierung ist die p53-Funktion von untergeordneter Bedeutung. Die Funktion von p53 wird im Zusammenhang mit DNA-Schädigungen erkennbar, hier hat es als Tumorsuppressorgen Bedeutung für die Bewahrung der Integrität des Genoms. So bewirken chemische oder physikalische Karzinogene ein Anstieg der intrazellulären p53-Konzentration.

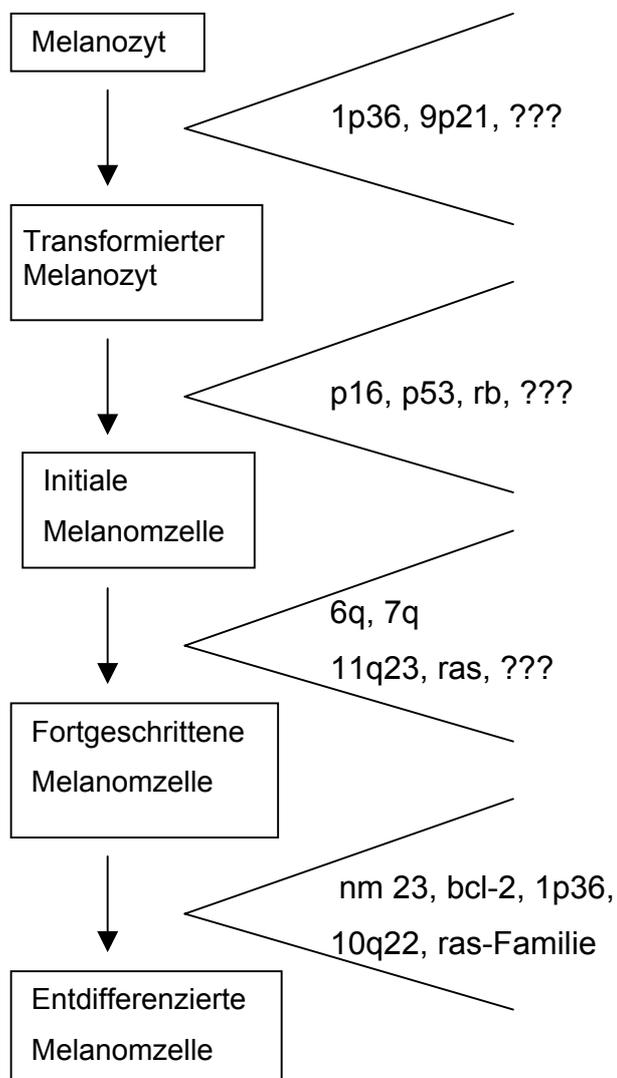
Benigne und auch maligne melanozytäre Tumoren der Haut zeigen eine Überexpression von p53-Protein. Studien zeigten in 45% der Naevi und in 70% der malignen Melanome eine p53 Überexpression, es wurde die abnorme p53-Expression als seltenes und eher frühes Ereignis der Entstehung melanozytärer Tumoren postuliert [Weiss et al., 1995, 1993]. Eine Assoziation zwischen der p53-Mutation und der Eindringtiefe, dem klinischen Stadium sowie der Prognose wurde nicht konstatiert [Healy et al., 1995; Weiss et al., 1995, 1993].

Eine weitere relevante Struktur, in Chromosomenbande 17q22 gelegen, ist das Metastasierungsgen nm23. Das Protein nm23 hat Einfluss auf die Prävention der Metastasierung des malignen Melanoms [Healy et al., 1995; Welch et al., 1994]. So wird es als Antimetastasierungsprotein bezeichnet und als prognostischer Marker bewertet.

Neben den hier genannten chromosomalen Regionen gibt es noch weitere Gene und DNA-Abschnitte, die im Zusammenhang mit der Melanomgenese beschrieben werden. Einige davon finden im Mehrstufenmodell nach Healy Erwähnung.

2.3.3 Mehrstufenmodell der Melanomgenese nach Healy

Das Mehrstufenmodell von Healy ist ein Versuch, eine molekularbiologische Kausalkette vom Melanozyten zur Melanomzelle zu etablieren. Modelle dieser Art sind für das Kolorektalkarzinom bekannt [Fearon et Vogelstein, 1990]. Auch wenn die an der Karzinogenese konkret beteiligten Gene für das maligne Melanom noch nicht so detailliert bekannt sind wie für das Kolorektalkarzinom, so liefert das Mehrstufenmodell von Healy einen wichtigen zusammenfassenden Überblick über die bisher dargestellte Mutationskaskade:



2.4 Methodische Grundlagen zur Mutationsanalyse in malignen Tumoren

2.4.1 Methoden zur Darstellung von Punktmutationen, Deletionen und Insertionen kurzer Sequenzmotive

Eine DNA-Mutation ist eine stoffliche Veränderung der DNA, die auf den DNA-Tochterstrang übertragen wird. Je nach Auftreten in Keimzellen oder in Körperzellen spricht man von einer gametischen bzw. einer somatischen Mutation. Mutationen kurzer Sequenzmotive wie Genmutationen treten meist als somatische Mutation auf. Sie treten mit einer Häufigkeit von 10^5 bis 10^7 pro Gen und Generation in Erscheinung und lassen so ein genetisches Mosaik entstehen. Wichtige Mutationen kurzer Sequenzmotive sind Punktmutationen, Deletionen und Insertionen [Murken, 1996]. Es stehen verschiedene Methoden zur Darstellung solcher Mutationen zur Verfügung:

Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus

Restriktionsendonukleasen, prokaryontische Enzyme, zerschneiden doppelsträngige DNA an definierten Stellen. Liegen Mutationen im Bereich der Erkennungssequenz vor, so wird die Sequenz nicht durch die Restriktionsendonukleasen erkannt und nicht an der entsprechenden Stelle geschnitten. Die Fragmentgröße unterscheidet sich somit bei einem mutierten und einem nicht-mutierten DNA-Abschnitt. Liegen Deletionen oder Amplifikationen der DNA-Sequenz zwischen zwei Schnittstellen vor, so verändert dies ebenfalls die Größe der DNA-Fragmente. Die Längenvariabilität der DNA-Fragmente wird als Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP) bezeichnet.

Oligonukleotid-Sonden

Neben diesem enzymatischen Nachweisverfahren steht auch der direkte Nachweis von Punktmutationen durch spezifische Oligonukleotid-Sonden zur Verfügung. Meist werden zwei verschiedene Oligonukleotid-Sonden verwendet. Eine Oligonukleotidsonde ist komplementär zur Normalsequenz des zu untersuchenden DNA-Abschnittes, die andere Oligonukleotidsonde ist komplementär zur mutierten

Sequenz. Die Basenfehlpaarung zwischen Wildtyp-DNA-Sonde und mutierter Sequenz verhindert eine Hybridisierung dieser, während die „Mutations“-Sonde an den mutierten DNA-Bereich binden kann. Eine ausbleibende Hybridisierung von Wildtyp-DNA-Sonde und zu untersuchender Sequenz zeigt so eine Mutation an. Dieses Prinzip wird auch für Mutationsnachweise mittels Mikroarray-Analyse verwendet, wobei hier die Sonden auf einem Träger in Chip-Format gebunden sind.

Single-Strand-Conformation-Polymorphism (SSCP)-Gelelektrophorese

Ein weiteres Verfahren zum Nachweis von Punktmutationen ist die SSCP-Gelelektrophorese, der eine Amplifikation des zu untersuchenden DNA-Abschnittes mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR) voraus geht. Die PCR-Produkte werden denaturiert, auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Ein mutierter DNA-Einzelstrang kann aufgrund veränderter Laufeigenschaften im Polyacrylamidgel detektiert werden. Die veränderten Laufeigenschaften eines mutierten DNA-Moleküls resultieren aus mutationsbedingten Konformationsänderungen des Einzelstranges. Mutationen bedingen Änderungen der Primärstruktur, diese finden Ausdruck in einer veränderten Sekundärstruktur. Die unterschiedlichen Sekundärstrukturen eines DNA-Moleküls sind durch unterschiedliche elektrophoretische Beweglichkeit in der Gelmatrix ausgezeichnet, da ihre elektrophoretische Mobilität, wie die jedes Moleküls, von seiner Größe, seiner Ladung sowie seiner Form abhängt. Dieses Prinzip begründet die SSCP-Analyse: Mutationen werden auf der Gelmatrix als sogenannte "band-shifts" erkennbar. Durch den Vergleich der Auftrennungsmuster von Einzelsträngen verschiedener Proben mit einer Wildtyp-Sequenz wird das Vorhandensein einer Mutation nachgewiesen.

Temperatur-Gradienten-Gel-Elektrophorese (TGGE)

Eine weitere Methode zum Nachweis von Punktmutationen, die Temperatur-Gradienten-Gel-Elektrophorese (TGGE), beruht auf der Tatsache, dass unterschiedliche DNA-Doppelstränge unterschiedliche Temperaturen benötigen, um zu denaturieren. Der Zeitpunkt der Denaturierung ist abhängig von der Basenzusammensetzung des DNA-Fragmentes; nach einer Mutation weicht in der Regel die erforderliche Denaturierungstemperatur des Mutationsstrangs von der des

Wildtypstrangs ab. Durch die Konfigurationsänderung der DNA-Moleküle ändert sich auch deren elektrophoretische Mobilität, dies kommt auf der Gelmatrix durch eine Verschiebung des Bandenmusters zum Ausdruck. Durch einen Vergleich mit einem Wildtyp-Fragment wird die Veränderung festgestellt, die genaue Lokalisation der Mutation kann jedoch nicht bestimmt werden.

Sequenzierung

Nur die Sequenzierung ermöglicht die Darstellung der genauen Basenaufeinanderfolge von zu untersuchenden DNA-Abschnitten. Sie ist somit das genaueste Verfahren zum Nachweis von Punktmutationen.

Die beschriebenen Methoden zum Nachweis von Punktmutationen, Deletionen und Insertionen können auch zur Darstellung von Mikrosatelliteninstabilität (→ 2.1.2.2) angewendet werden, da in Mikrosatelliten Punktmutationen, Deletionen und Insertionen als häufige Mutationsform beobachtet werden [Iacopetta et Hamelin, 1998].

In der vorliegenden Arbeit wurde die Mikrosatelliteninstabilität mit Hilfe der Temperaturgradienten-Single-Strand-Conformation-Polymorphism-Analyse (TG-SSCP-Analyse) untersucht. Die TG-SSCP-Analyse stellt eine Kombination der Temperaturgradienten-Gelelektrophorese und der Single-Strand-Conformation-Polymorphism-Analyse dar, die durch einen parallel zum elektrischen Gradienten geschaffenen Temperaturgradienten ausgezeichnet ist. Die Kombination erwies sich als sensitiver als die jeweiligen Einzelverfahren [Rübber et al., 1995].

2.4.2 Methoden zur Darstellung chromosomaler Instabilität

Neben Mutationen, die kurze DNA-Sequenzen betreffen, werden auch Mutationen großer DNA-Abschnitte beobachtet. Diese Chromosomenmutationen gehen mit strukturellen Chromosomenveränderungen einher und können lichtmikroskopisch sichtbare Veränderungen hervorrufen. Sie entstehen durch Umbauten innerhalb eines Chromosoms (intrachromosomal) oder zwischen verschiedenen Chromosomen (interchromosomal). Die wichtigsten Chromosomenstrukturaberrationen sind

Translokationen, Inversion, Duplikation, Deletion, Insertion, Isochromosom und Ringchromosom [Murken, 1996]. Bedingt werden Chromosomenmutationen in der Regel durch eine Störung in der Mitose oder in der Meiose; erfolgen sie in der Meiose, können sie als konstitutionelle Mutationen von Generation zu Generation weitergegeben werden.

Es stehen verschiedene Methoden zur Darstellung von Chromosomenmutationen zur Verfügung:

Zytogenetische Diagnostik

Anders als bei Mutationen kleiner DNA-Abschnitte (wie bspw. Punktmutationen), kann der Nachweis bei den Chromosomenmutationen zytogenetische erfolgen. Die Voraussetzung für zytogenetische Untersuchungen wurde 1970 mit der Entdeckung der Chromosomenbanden durch Caspersson und Zech geschaffen [Caspersson et al., 1970]. So wurde die Analyse von Strukturveränderungen menschlicher Metaphase-Chromosomen an kultivierten Zellen (meist Lymphozyten) möglich [Murken, 1996].

Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung und Chromosomen-in situ-Suppressions-Hybridisierung

Deutlich genauer ist die später entwickelte Technik der Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (FISH) bzw. der Chromosomen-in situ-Suppressions- (CISS-) Hybridisierung, die es durch molekularzytogenetische Techniken erlauben, bestimmte Chromosomen oder auch feinste Chromosomenstrukturen bis hin zu einzelnen Genen in der Metaphase und im Interphasekern spezifisch zu markieren. Das Prinzip der FISH ist die direkte Hybridisierung von chemisch markierten Sonden mit den Chromosomenpräparaten. Die Sonden und damit der gesuchte Chromosomenabschnitt lassen sich durch Fluoreszenzsignale detektieren.

Der Weg zur Anwendung in der Routinechromosomendiagnostik wurde mit der CISS-Hybridisierung geebnet. Durch eine Blockierung unspezifischer DNA-Sequenzen mittels Vorhybridisierung der markierten DNA-Sonden können unspezifische Signale unterdrückt werden. Die FISH und CISS-Hybridisierung stellen sowohl in der Chromosomendiagnostik als auch in der Tumorzytogenetik eine Ergänzung zur konventionellen Chromosomenbänderungstechnik dar [Pack et al., 1998].

Comparative-Genomic-Hybridisation

Ein ähnliches Prinzip liegt der Comparative-Genomic-Hybridisation (CGH) zugrunde. Tumor-DNA wird mit einem grünen Fluorochrom gekennzeichnet, Wildtyp-DNA mit einem roten Fluorochrom. Beide DNA-Sonden werden in gleichem Verhältnis mit Metaphase-Chromosomen hybridisiert. Nach Hybridisierung der Sonden mit dem komplementären Chromosomenabschnitt kann die Fluoreszenz der Sonden gemessen werden. Das Verhältnis von roter zu grüner Fluoreszenz entlang des Chromosoms ermöglicht eine Aussage über Deletion oder Amplifikation von genetischem Material. Die CGH dient dem Nachweis umfangreicherer Chromosomenmutationen in der Größenordnung von 1-20 MB [Weiss et al., 1999].

Southern-Hybridisierungstechnik

Eine weitere Methode zur Detektion chromosomaler Mutationen ist die Southern-Hybridisierungstechnik (Southern Blot). Die zu untersuchende DNA wird mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen spezifisch geschnitten. Die Fragmente werden elektrophoretisch nach Molekulargewicht aufgetrennt. Die aufgetrennten Fragmente werden von dem Gel auf eine Trägermembran übertragen (southern blotting). Es erfolgt eine Hybridisierung mit einer DNA-Sonde, die komplementär zu dem zu untersuchenden DNA-Fragment ist. Das Hybridisierungssignal wird schließlich durch Fluoreszenz oder über ein Autoradiogramm dargestellt [Southern et al., 1979].

In Rahmen der vorliegenden Untersuchungen wurden zur Darstellung von Chromosomenmutationen Mikrosatelliten genutzt. Verschiedene Eigenschaften der Mikrosatelliten machen diese für die Darstellung von Chromosomenmutationen besonders geeignet:

- Die repetitiven Sequenzen sind kurz (< wenige 100 bp) und treten im Genom häufig auf.
- Die repetitiven Sequenzen sind von nichtvariablen Sequenzen flankiert, die eine spezifische Amplifikation der Mikrosatellitensequenzen mittels PCR ermöglichen.

- Die repetitiven Sequenzen sind variable, mutieren leicht und unterscheiden sich bei verschiedenen Individuen häufig in ihrer Länge. Die Mikrosatelliten mutieren insbesondere, wenn MMR-Gene ausfallen (→ 2.1.2.1).
- Das häufige Vorkommen in Verbindung mit der leichten Amplifizierbarkeit der Mikrosatelliten ermöglicht den Nachweis eines Genverlustes durch solche Mikrosatelliten, die das entsprechende Gen flankieren, da die flankierenden Mikrosatelliten bei Verlust des Gens mit deletiert sein können.

So kann der LOH-Nachweis mit Hilfe der Mikrosatelliten-PCR durchgeführt werden (→ 2.1.2; → 2.1.2.2; →2.4.1). Der LOH-Nachweis eignet sich zur Darstellung von chromosomalen Verlusten und zur Darstellung von Verlusten von Tumorsuppressorgenen. Diese Technik wurde erstmalig von Cavenee angewendet und als diagnostisches Verfahren genutzt. Cavenee zeigte den somatischen Verlust chromosomaler Regionen in unmittelbarer Nähe der Lokalisation des Retinoblastom-Gens und legte damit die Basis zur Tumordiagnostik mit Hilfe dieser Methode [Cavenee et al., 1983].

2.4.3 Die Bedeutung der Mikrodissektion beim Mutationsnachweis in malignen Tumoren

Der Mutationsnachweis in malignen Tumoren dient der Identifikation von potentiellen Tumorsuppressorgenen und Onkogenen, er hat Bedeutung bei der Klassifizierung bestimmter Malignome wie bspw. bei den hämatologischen Neoplasien mit den entsprechenden Markerchromosomen.

Viele maligne Tumore erscheinen phänotypisch heterogen. Verschiedene Untersuchungen legen nahe, dass sich diese phänotypische Heterogenität auf eine genetische Heterogenität zurückführen lässt [Takata et al., 2000; Böni et al., 1998b; Tollenaar et al., 1997; Healy et al., 1998]. Die genetische Heterogenität kann den Mutationsnachweis in malignen Tumoren verfälschen, da durch das Mischen genetisch unterschiedlicher Areale eines Tumors Mutationen verschiedener Tumoreale wechselseitig kompensiert werden können und es so zu einer Fehleinschätzung bezüglich der genetischen Alterationen eines Tumors kommen kann. Somit ist eine sich an den histologischen Strukturen des Tumors orientierende

Arealauswahl erforderlich. Diese Möglichkeit bietet die Mikrodissektion. Der Mikrodissektion geht eine histologische Analyse des Präparates voraus.

Die verschiedenen Methoden der Mikrodissektion können sich in ihrer Präzision unterscheiden:

Eine Methode der Mikrodissektion besteht im manuellen Herausschneiden ausgewählter Tumorbezirke unter dem Mikroskop. Die entfernten Gewebstücke sind meist zu groß und können so mehrere Zellklone enthalten.

Bei der etwas genaueren Ink-PCR (ink [engl]: Tinte) werden die ausgewählten Tumorareale mittels einer Nadel mit schwarzer Tinte beträufelt. Im Anschluss wird der Schnitt mit UV-Licht bestrahlt. Dadurch sollen jene Zellen zerstört werden, welche nicht durch eine Tintenabdeckung geschützt sind. Somit fließt nach UV-Inkubation nur noch die DNA der abgedeckten Zellen als funktionstüchtige DNA in die Analyse ein, die DNA der restlichen Tumorzellen ist zerstört [Shibata et al., 1992].

Bei der Klebstoff-Mikrodissektion werden die ausgewählten Tumorareale mit Hilfe einer Nadel mit handelsüblichem Papierkleber beträufelt. Durch Verwendung sehr feiner Nadeln können auch kleine Tumorareale ausgewählt werden. Der getrocknete Kleber lässt sich leicht abhebeln. An dem Klebstoffleck haften dann die selektierten Zellen [Turbett et al., 1996].

Eine genauere Methode der Materialgewinnung ist die Laserdissektion. Die ausgesuchten Zellareale werden hierbei per Laser ausgeschnitten. Die Größe der Zellareale lässt sich mit dieser Methode auf Einzelzellen reduzieren.

In der vorliegenden Arbeit kommt die Klebstoff-Mikrodissektion zum Einsatz. Unter dem inversen Mikroskop werden die Tumorareale mittels Mikromanipulator gezielt angesteuert, markiert und isoliert (→ 4.4). Die mittels Mikrodissektion gewonnenen Tumorareale besitzen einen Umfang von ca. 5000-10000 Zellen. So lassen sich kleiner Tumorareale von benachbarten Arealen trennen und vergleichend molekularbiologisch aufarbeiten.

3 Problemstellung

Krebs und damit auch das maligne Melanom wird als eine genetische Erkrankung angesehen, bei der aus ursprünglich gesunden Zellen über genetische Alterationen verschiedene maligne Zellklone und so ein maligner Tumor entsteht [Nowell, 1976; Vogelstein et Kinzer, 1993]. Die unterschiedlichen Zellklone prägen das genetisch und histologisch heterogene Bild eines Tumors [Nowell, 1976; Tollenaar et al., 1997].

Gerade Primärtumore können phänotypisch heterogen imponieren. Es kann vermutet werden, dass sie genetisch heterogen sind und dass im Rahmen einer genetischen Instabilität verschiedene Entwicklungsstufen der einzelnen Tumorzellklone parallel auftreten können [Dracopoli et al., 1987; Böni et al., 1998b].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Mikrodissektion und die genetische Analyse mikrodissezierter Gewebeareale als Technik etabliert und evaluiert werden.

Es sollte untersucht werden, ob die Mikrosatellitenanalyse mikrodissezierter Tumore den Nachweis von Mutationen in Mikrosatelliten-DNA ermöglicht. In diesem Zusammenhang sollte evaluiert werden, ob die Mikrosatellitenanalyse mikrodissezierter Tumore der Mikrosatellitenanalyse nicht mikrodissezierter Tumore überlegen ist.

Insbesondere sollte untersucht werden, ob die in den untersuchten Tumoren erwartete genetische Heterogenität durch die Mikrosatellitenanalyse von mikrodissezierten Tumorarealen dargestellt werden kann.

In diesem Zusammenhang sollte geklärt werden, ob in malignen Melanomen als Mechanismus der genetischen Instabilität chromosomale Instabilität oder Mikrosatelliteninstabilität vorherrschen.

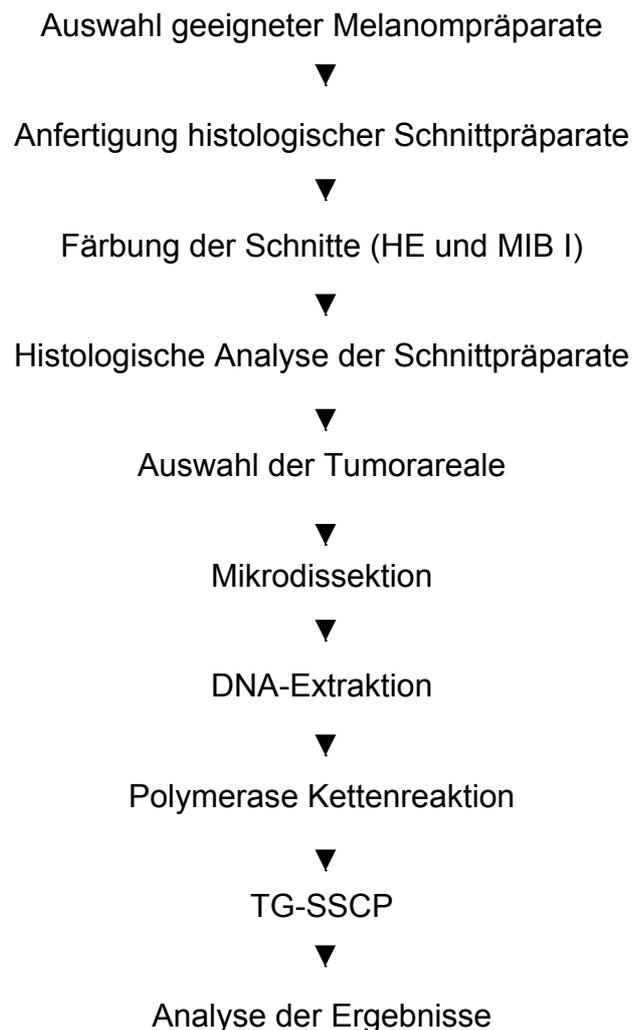
4 Material und Methoden

4.1 Patientenmaterial

In die Untersuchungen einbezogen wurden die Primärtumore und Metastasen von acht Melanompatienten, sechs Männern und zwei Frauen. Das Gewebe wurde in den Jahren 1987 bis 1998 in der Hautklinik des Universitätsklinikums Aachen gewonnen, in Paraffin eingebettet und histologisch untersucht.

Durch die gezielte Auswahl verschiedener pleomorpher Areale bei den einzelnen Tumoren mittels Mikrodissektion standen insgesamt 92 Gewebeproben zu molekularbiologischen Analysen zur Verfügung.

4.2 Methodendarstellung



4.3 Histologische Aufarbeitung

Die in Paraffin eingebetteten Gewebsblöcke wurden zur histologischen Aufarbeitung und zur Mikrodissektion zunächst per Mikrotom geschnitten. Die Schnittdicke variierte dabei, je nach Verwendungszweck, zwischen drei μm (Immunhistochemie) und 10 μm (Mikrodissektion). Die gewonnenen Schnitte wurden in einem 41°C warmen Wasserbad schwimmend auf die Objektträger gezogen (sialinisierte SuperFrost+ OT für die Immunhistochemie) und zur Trocknung 24 h bei RT belassen.

Material:

- Leica Schlittenmikrotom SM 2000 R
- OT Menzel-Glas, 76 x 26 mm, Süsse GmbH, bestrichen mit
- Eiweiß-Glycerin, Chroma Gesellschaft
- OT SuperFrost+, Fa Menzel, bestrichen mit Poly-L-Lysin

4.3.1 Hämatoxylin-Eosin Färbung (HE-Färbung)

Bei Paraffinpräparaten muss jeder Färbung eine Deparaffinierung vorausgehen, um das Gewebe hydrophil und somit den Farbstoffen zugänglich zu machen. Dies geschieht in einer Xylol-Alkohol-Reihe, unter Berücksichtigung der folgenden Konzentrationen und Zeiten:

- 2 x 20 min Xylol
- 2 x 5 min 100% Alkohol
- 2 x 5 min 95% Alkohol
- 2 x 5 min 70% Alkohol
- 2 x 5 min 50% Alkohol
- Spülen mit aqdest

Es liegen deparaffinierte, hydrophile Schnittpräparate vor. Die Schnitte dürfen von nun an nicht mehr austrocknen. Im Anschluss daran erfolgt die Färbung nach folgendem Schema:

- 5 min Spülen mit aqdest
- 5-10 min Färben mit Mayers Hämalaun 50%

- Spülen mit Leitungswasser
- 1 min Färben mit Eosin 1%
- 3 min Spülen mit aqdest
- Alkoholreihe zur Entwässerung
- 2 min Karbol-Xylol
- 2 x 5 min Xylol
- Eindecken der Schnitte mit DPX

- Material:
- Xylol 100%
 - Karbolxylol, 9220, Fa Merck
 - Mayers Hämalunlösung, Fa. Merck
 - Eosin
 - DPX Mountant, 44581, Fa. Fluka
 - Deckgläser 24x24 mm, Fa. Menzel-Gläser

4.3.2 MIB-I-Färbung

Bei der immunhistochemischen MIB Färbung kommt der monoklonale Antikörper MIB-I zum Einsatz. Dieser weist das nukleäre, zellproliferationsassoziierte Antigen Ki-67 nach, welches in allen aktiven Phasen des Zellzyklus exprimiert wird. So wird eine Anfärbung der Kerne proliferierender Zellen erreicht. Dieses Färbeverfahren kann die mikroskopische Analyse von histologischen Melanompräparaten und die Auswahl der Tumorareale, die mittels Mikrodissektion entfernt werden sollen, erleichtern.

Die Färbeprozedur wird mit der ABC-Methode (Avidin-Biotin Komplex) durchgeführt. Nach Inkubation des Präparates mit dem unmarkierten Primärantikörper MIB-I wird das Gewebe mit dem biotinylierten Zweitantikörper inkubiert. Die Antikörper verbinden sich. Darauf erfolgt die Zugabe des Avidin-Biotin-Komplexes, der am Avidin-Molekül mit einem alkalischen Phosphatase-Molekül verbunden ist. Das Avidin-Molekül des Komplexes verbindet sich mit dem Biotin-Molekül des Sekundärantikörpers. An das alkalische Phosphatase-Molekül, das gewissermaßen das letzte Glied in der entstandenen Kette ist, lagert sich dann der zugegebene Farbstoff an, es erfolgt der chromogene Umsatz. Zur Farbreaktion bietet sich, als Kontrast zum braunen Pigment im Gewebe, ein roter Farbstoff an.

Auch dieser Färbung geht eine Deparaffinierung voraus (→ 4.3.1).

Der nächste Arbeitsschritt besteht in einer Mikrowellenvorbehandlung zur Antigendemaskierung. Hierbei werden Plastikkuvetten verwendet, die mit den Präparaten bestückt und mit Citratpuffer aufgefüllt werden. Die Mikrowellenleistung beträgt 600 Watt.

→ 3 x 5 min bei 600 Watt in der Mikrowelle sprudelnd kochen

Zwischendurch muss Citratpuffer nachgefüllt werden, damit die Schnitte nicht austrocknen. Nach der Antigendemaskierung in der Mikrowelle müssen die Schnitte vor der Weiterbehandlung zunächst abkühlen.

→ Küvetten mit den Schnitten in 20-30 min auf RT abkühlen lassen

→ kurzes Spülen in TBS

Zur weiteren Bearbeitung werden die Objektträger in Coverplates gespannt, welche eine einfache und präzise Applikation der Arbeitslösungen ermöglichen. 1 ml PBS wird als Flüssigkeitsfilm auf die Objektträger gegeben. Die Coverplates werden in die entsprechende Feuchte Kammer gehängt.

→ Objektträger mit jeweils 1 ml PBS auf die Coverplates ziehen

Nun erfolgt eine Inkubation der Präparate mit einem proteinblockierenden Blocking-Serum, welches eine unspezifische Bindung der Antikörper verhindert. Pro Schnitt werden 100 µl des Blocking-Serums in die Cover-Plates gefüllt. Das Blocking-Serum wird 1:10 mit Milch-PBS verdünnt.

→ 15 min Inkubation mit 100 µl Blocking-Serum

Im Anschluss daran wird ohne vorhergehendes Spülen der Antikörper eingefüllt. Da die Inkubation bei 37,5°C erfolgen muss, sollte die Feuchte Kammer in einen Brutschrank gestellt werden. Der Antikörper wird mit Milch-PBS 1:10 verdünnt.

→ 60 min Inkubation mit 100 µl Primärantikörperlösung bei 37,5°C

→ 5 min Spülen mit 2 ml Milch-PBS (wieder bei RT)

Sodann erfolgt die Inkubation mit dem Sekundärantikörper, der sich an den Primärantikörper anlagert und als Zielmolekül für den AB-Komplex biotinyliert ist. Der Sekundärantikörper wird mit einer Verdünnung von 1:100 mit Milch-PBS verwendet.

→ 30 min Inkubation mit 100 µl Sekundärantikörper

→ 5 min Spülen mit PBS

Darauf wird der AB-Komplex eingefüllt, welcher 30 min vor der Inkubation angesetzt werden muss. Der AB-Komplex wird mit normalem PBS-Puffer angefertigt, die Verdünnungsfaktor ist 1:100.

- 30 min Inkubation mit 100 µl AB-Komplex
- 5 min Spülen mit TBS

Jetzt kann die Färbelösung eingefüllt werden, welche wegen ihrer Lichtempfindlichkeit bis zum Ende der Inkubation im Dunkeln aufbewahrt werden muss. Die Feuchte Kammer wird daher bei diesem Arbeitsschritt an einem lichtabgeschiedenen Ort deponiert.

- 30 min Inkubation mit 200 µl Färbelösung im Dunkeln

Nach der Färbereaktion werden die OT aus den Coverplates entnommen und in aqdest gespült.

- 3 min Spülen in aqdest
- kurzes Gegenfärben in Hämalaun (vier bis fünfmaliges eintauchen)
- Bläuen und gründliches Spülen mit Leitungswasser
- Trocknung und Entwässerung im Wärmeschrank bei 60°C
- Eindecken mit DPX

Rezepturen: - Citratpuffer:

- Stammlösung A:

21,01 g 0,1 M Zitronensäure ad 1000 ml aqdest

- Stammlösung B:

29,41 g 0,1 M Natriumcitrat ad 1000 ml aqdest

9 ml der Stammlösung A und 41 ml der Stammlösung B mit 450 ml aqdest mischen, pH-Wert 6,0 einstellen. Es entsteht 10 mM Citratpuffer. Die Stammlösungen bei 2-8 °C aufbewahren.

- TBS-Puffer:

- 53 g NaCl

- 12 g Tris base

- ad 1000 ml aqdest

Das entstandene Konzentrat vor Gebrauch 1:10 verdünnen und den pH-Wert auf 7,4 einstellen.

- PBS-Puffer:

- 1,3 g Natriumhydrogenphosphat

- 0,2 g Kaliumdihydrogenphosphat

- 0,8 g NaCl

- ad 1000 ml aqdest

Den Puffer auf pH-Wert 7,4 einstellen. Für den Milch-PBS Puffer werden 2 g Magermilchpulver in 100 ml PBS aufgelöst.

- Tris-HCl:

- 3,028 g 100 mM Tris HCl

- ad 250 ml aqdest

Die Lösung auf den pH-Wert 8,2 einstellen. Sie wird zur Herstellung der Färbelösung benötigt.

Material:

- Xylol, abs., Ethanol, 100 %
- handelsüblicher Mikrowellenherd (mind. 600 Watt)
- Plastikkuvetten, 44208, Fa. Scienceware, USA
- Brutschrank, B 5042 E, Fa. Hareaus
- Coverplates, 7211013, Fa. Shandon, USA
- Feuchte Kammer
- Abimed Pipetten, Fa. Gilson
- pH-Meter, CG 711, Fa. Schott, Mainz
- Blocking-Serum, S-2000, Fa. Vector
- Primärantikörper monoclonal, MIB I, DIA 505, Fa. Dianova
- Sekundärantikörper, BA-2000, Fa. Vector
- ABC-Kit, Vectastain, Alkaline Phosphatase Standard, AK-5000, Fa. Vector
- Färbung: Alkaline Phosphatase Substrate Kit I, SK-5100, Fa. Vector
- Zitronensäure, 244, Fa. Merck
- Natriumcitrat, 6449, Fa. Merck
- NaCl, 1.06404, Fa. Merck
- Tris base T-8524, Fa. Sigma
- Natriumhydrogenphosphat-2-hydrat, 6580, Fa. Merck
- Kaliumdihydrogenphosphat, 4873, Fa. Merck
- Tris-HCl, T-3253, Fa. Sigma
- handelsübliches Magermilchpulver
- Mayers Hämalaunlösung, Fa. Merck
- DPX Mountant, 44581, Fa. Fluka
- Deckgläser 24x48 mm, Fa. Menzel-Gläser

4.4 Mikrodissektion

Die Mikrodissektion bietet die Möglichkeit, Tumorareale, die beim Studium des histologischen Schnittes ausgewählt wurden, unter dem inversen Mikroskop gezielt anzusteuern, zu markieren und zu isolieren. Die Vorteile der Mikrodissektion treten bei pleomorphen Tumoren besonders eindrucksvoll in Erscheinung, da gerade hier die morphologisch stark verschiedenen Tumorareale genetische Divergenzen vermuten lassen. Die mittels Mikrodissektion gewonnenen Tumorareale besitzen einen Umfang von ca. 5000-10000 malignen Zellen.

Die von einem Paraffinblock angefertigten Schnitte (→4.3.1) werden auf einen Objektträger gezogen und mit der HE-Färbung eingefärbt. Jeweils ein Schnitt der Schnittfolge wird eingedeckt und dient damit der histologischen Betrachtung, während die anderen Schnitte der Schnittfolge -ohne Deckglas- zur Mikrodissektion verwendet werden. Unter dem inversen Mikroskop wird nun mit Hilfe eines Mikromanipulators, an dem eine sehr feine Akupunkturnadel befestigt ist, ein wenig Klebstoff auf die ausgewählten Tumorareale gebracht. Nach zweitägiger Trockenzeit kann der Klebstoff unter Verwendung einer Akupunkturnadel vorsichtig abgehoben werden. Die zur Analyse benötigten und ausgewählten Zellen haften an dem Klebstoffleck. Die selektierten Zellen werden mit dem Klebstoffleck in einem Eppendorfgesäß konserviert.

Material:

- Mikroskop AXIOVERT 25, Fa. Zeiss
- Klebstoff Papier fix, 876T, Fa. Pelikan
- Akupunkturnadel, 7102801, Fa. Seirin
- Eppendorfgesäß

4.5 Molekularbiologische Analyse

4.5.1 DNA-Extraktion und Reinigung

Das durch die Mikrodissektion gewonnene Tumormaterial wird in dem Eppendorfgefäß mit 25 µl ATL sowie mit 5 µl Proteinase K versetzt und mit wenigen Tropfen Paraffin luftdicht versiegelt. Dieses Inkubationsgemisch wird zur Lyse für mindestens 12 h im Wärmeschrank (37,5°C) unter sanftem rütteln belassen. Nach der Lysierungsphase schließen sich zur DNA-Extraktion folgende Schritte an:

- mit einer Pipette das Paraffin entfernen
- 100 µl AL pro Probe hinzufügen
- kurz aufschütteln, dann in 70°C heißem Wasserbad unter sanftem Rütteln inkubieren
- 105 µl Ethanol (100%) hinzupipettieren, kurz aufschütteln
- umpipettieren des Reagenz in Eppendorfgefäß
- 1 min bei 8000 U/min zentrifugieren
- in ein Eppendorfgefäß abpipettieren
- 250 µl AW Waschpuffer hinzufügen
- 1 min bei 8000 U/min zentrifugieren
- in ein Eppendorfgefäß abpipettieren
- erneut 250 µl Puffer AW hinzufügen
- 3 min bei 14000 U/min zentrifugieren
- in ein Eppendorfgefäß abpipettieren
- 50 µl aqdest (70°C) in das Eppendorfgefäß einfüllen
- bei 70°C im Wasserbad 5 min erwärmen
- 1 min bei 14000 U/min zentrifugieren
- erneut 50µl aqdest (70°C) in das Eppendorfgefäß einfüllen
- erneut erwärmen und zentrifugieren
- DNA entnehmen und in einem Eppendorfgefäß auffangen

Die so gewonnene DNA wird bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt und steht den entsprechenden molekulargenetischen Analyseverfahren zur Verfügung.

- Material:
- Eppendorfcentrifuge 5402
 - Abimed Pipetten
 - Qi Amp Tissue Kit (250), 29306, Fa. Qiagen
 - Eppendorfgefäße
 - QIAamp Tissue Kit, 29306, Fa. Qiagen

4.5.2 Die Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Die im Jahre 1985 von Kary Mullis entwickelte Polymerase Kettenreaktion basiert auf einer enzymatischen Reaktion, die uns die Möglichkeit der in vitro Amplifikation von DNA-Sequenzen bietet [Mullis et Falloona, 1987]. Sie ermöglicht den Nachweis von spezifischen Sequenzen innerhalb des Genoms.

Im ersten Schritt dieses zyklischen Verfahren wird die DNA-Doppelhelix mittels hoher Temperatur denaturiert (93-100°C), um den spezifisch auf eine Sequenz gerichteten Primern die Anlagerung an die dann vorliegenden Einzelstränge zu ermöglichen. Das Anlagern der Primer, die Primerhybridisierung, das sogenannte Annealing, geschieht bei einer Temperatur von 37-65°C, der Reaktionstemperatur im zweiten Schritt des Zyklus. Im dritten Reaktionsschritt wird die Temperatur auf 72°C erhöht, hier katalysiert die hitzestabile taq-Polymerase unter Anlagerung der dNTPs die Elongation des entstehenden Stranges. Aus den zwei Einzelsträngen entstehen zwei Doppelstränge.

Diese drei Schritte stellen die Grundlage PCR dar, die unendlich oft wiederholt, Amplikons in unbegrenzter Anzahl liefern könnte. In der Praxis findet sie in 20 bis 40-facher Abfolge Verwendung und vermehrt damit die Menge der Zielsequenz in exponentieller Weise nach der Formel: $(2^n - 2n) \times$

(n = Anzahl der Vermehrungszyklen; x = Anzahl der Kopien der ursprünglichen DNA-Matrize).

Nach 35 PCR-Zyklen sollte somit der ausgewählte DNA-Abschnitt in 2^{35} -facher Ausführung vorliegen. Es wird jedoch nur 70% dieser theoretisch ermittelten Menge erreicht.

Durchführung:

Das bei der DNA-Extraktion und Reinigung (→ 4.5.1) gewonnene Material findet bei der PCR weitere Verwendung. Zunächst wird ein MasterMix angefertigt, der sich in seiner Zusammensetzung nach dem Primer richtet, der in der jeweiligen PCR verwendet werden soll. Dieser MasterMix beinhaltet in aqudest gelöste dNTPs, einen PCR-Reaktionspuffer, $MgCl_2$ sowie die Primer in beiden Ausrichtungen. Mg^{2+} -Ionen bilden mit den dNTPs einen löslichen Komplex, der für den dNTP-Einbau erforderlich ist. Darüber hinaus erhöhen sie die Polymeraseaktivität. Von jeder DNA-Probe werden 2 μ l in ein beschriftetes Eppendorfgefäß gegeben. Jedes Eppendorfgefäß wird darüber hinaus mit 30 μ l des MasterMixes sowie 2 μ l GoldTaqPolymerase-Ansatz versetzt. Zusätzlich wird als Negativkontrolle ein Ansatz ohne DNA-Material erstellt. Die Eppendorfgefäße werden in den Thermocycler überführt, der die 35 PCR-Zyklen mit 94°C Denaturierungstemperatur beginnen lässt. Die Annealing- und Elongationstemperaturen variieren je nach Primer.

4.5.3 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese stellt eine einfache Methode zum Nachweis der erfolgreichen PCR dar. Durch dieses Verfahren werden die in der PCR gebildeten Amplikons nachgewiesen und nach ihrer Größe aufgetrennt sichtbar gemacht. Hierzu werden geringe Mengen der PCR-Produkte mit einem Beladungspuffer vermischt und in die Slots des vorher gegossenen Agarosegels gegeben. Wird nun über dem Agarosegel ein elektrisches Feld erzeugt, so wandert die DNA, beschwert durch den Beladungspuffer, von der Kathode zur Anode. Die Wanderungsrichtung ergibt sich aus der negativen Ladung, welche die DNA durch ihre hydrophilen Phosphatgruppen im neutralen bzw. alkalischen Milieu aufweist.

Zur Größen und Mengenbestimmung genügen 10 μ l der PCR-Produkte, die, versetzt mit 2,5 μ l Beladungspuffer, in die Slots des 1,8 %-igen Agarosegels einpipettiert werden. Zur Orientierung wird in einen Slot der DNA-Molekulargewichtsmarker einpipettiert. Hier findet auch die Negativkontrolle der PCR Verwendung. Diese wird, ebenfalls mit Beladungspuffer versetzt, in einen definierten Slot einpipettiert. Nach einer Laufzeit von 80 Minuten bei 190 Volt und 240 mA sind die Proben differenziert dargestellt. Das dem Gel zugesetzte Ethidiumbromid interkaliert in die DNA ein und

ermöglicht als fluoreszierender Farbstoff eine Bandenanalyse. Diese erfolgt mittels photographischer Dokumentation mit einer Polaroidkamera auf einem ultravioletten Tisch-Transilluminator.

- Rezepturen:
- Agarosegel: 2,7 g Agarose und 2,7 g NuSieve GTG Agarose in 300 ml 1-fach TBE aufkochen und abkühlen lassen.
Die Gellösung mit 18 µl Ethidiumbromidlösung vermischen und in die vorbereitete Gelkammer füllen.
Nach 30 min ist das Gel gebrauchsfertig.
 - TBE-Puffer: siehe SSCP-Rezepturen (→4.5.7)
 - DNA-Molekulargewichtsmarker: - 4 µl DNA-Marker mit 2,5 µl loading-solution und 6 µl aqdest vermischen.

- Material:
- Elektrophoresekammer mit Transformator, Fa. AGS, Heidelberg
 - Gelkämme
 - Abimed Pipetten
 - Qualex Gold Agarose, 10575, AGS, Heidelberg
 - NuSieve GTG Agarose, 50080, fMC BioProducts
 - Beladungspuffer, G 2526, Fa. Sigma
 - Ethidiumbromidlösung, 1%-ig, Fa. Boehringer Mannheim
 - DNA Molekulargewichtsmarker, D-8397, Fa. Sigma

4.5.4 Temperaturgradienten-Single-Strand-Conformation-Polymorphism (TG-SSCP)

Die TG-SSCP-Analyse ist eine Synthese der Single-Strand-Conformation-Polymorphism (SSCP) Analyse und der Temperaturgradienten-Gelelektrophorese (TGGE) (→ 2.4.1).

Die Kombination dieser Verfahren erwies sich als sensitiver als die jeweiligen Einzelverfahren [Rübben et al., 1995]. Das Wesen dieses Kombinationsverfahrens liegt in der Analyse mittels SSCP mit einem parallel zum elektrischen Gradienten geschaffenen Temperaturgradienten von 19°C bis 23°C.

Zur Auswertung der SSCP-Analyse ist die Kenntnis um die folgenden, die Sensitivität beeinflussenden Faktoren von großer Bedeutung:

- Fragmentlänge: Die Amplikons sollten eine Länge von 400 Basenpaaren nicht überschreiten, die Sensitivität nimmt mit Länge der Amplikons ab. In der Literatur sind 155 bp als optimale Arbeitsgröße angegeben.
- Mutationen: Mutation ist nicht gleich Mutation: Je nach Art und Position der Mutation sowie in Abhängigkeit der angrenzenden Basensequenzen variieren auch die sterischen Konsequenzen dieser Mutationen.
- Gelzusammensetzung: Fünf bis zehn Prozent Glycerin in der Gelzusammensetzung wirken sich positiv auf die Sensitivität aus.

Die Apparatur, die bei beiden Einzelverfahren Verwendung findet, wurde dazu gemäß der Erfordernisse des Kombinationsverfahrens umgebaut. Auf der Gelmatrix muss demnach eine elektrische Spannung und ein Temperaturgefälle erzeugt werden.

Den Temperaturgradienten erzeugen ein Thermo- und ein Kryostat, welche die Glasplatte, auf der sich die Gelmatrix befindet, erwärmen bzw. kühlen. Dabei wird die Anodenseite auf 19°C gekühlt, während die Kathodenseite auf 23°C erwärmt wird. Der sich daraufhin linear aufbauende Temperaturgradient verläuft parallel zum elektrischen Feld.

Das elektrische Feld wird mittels zweier Elektrodenbüchsen auf die Gelmatrix gebracht. Dazu werden die mit TBE-Puffer gefüllten Puffertanks mit Hilfe der Elektrodenbüchsen mit der Gelmatrix verbunden; so ist der Elektronenfluss von Anode über Gelmatrix zur Kathode gewährleistet.

Durchführung:

Die zur Untersuchung gelangenden PCR-Produkte werden zu jeweils 7 µl mit 4 µl Stop Solution in einem Eppendorfgefäß vermischt. Dieses Gemisch wird zunächst fünf Minuten in kochendem Wasser erhitzt, die DNA liegt anschließend als Einzelstrang vor. Unmittelbar im Anschluss werden die Proben für 5 min in Eis gekühlt, jetzt nimmt jeder DNA-Einzelstrang eine seiner Sequenz entsprechende Konfiguration ein. Dann werden die Proben in die Slots des SSCP-Gels pipettiert. Die anzulegende Spannung beträgt 300 kV bei 500 mA Stromstärke sowie 150 Watt Leistung. Die Laufzeit variiert zwischen 120 und 240 Minuten.

Die kontaktschaffenden Elektrodenücher werden vor Gebrauch 30 min in kochendem Wasser gereinigt.

Nach Ende der Laufzeit wird die Gelmatrix der Apparatur entnommen und für die folgende Silberfärbung in eine Plastikwanne gelegt. Die Färbereaktion wird auf einem Rüttler durchgeführt und verläuft nach folgendem Schema:

- 1) *Fixierung*: In Puffer A 2 x 5 min inkubieren (250 ml pro Durchgang)
- 2) *Färbung*: In Puffer B 10 min inkubieren
- 3) zweimaliges kurzes Waschen mit aqdest
- 4) *Gegenfärbung*: In Puffer C 15 min inkubieren
- 5) *Neutralisierung*: In Puffer D 10 min inkubieren

Nach der Neutralisierung steht das Gel zur Analyse und Photodokumentation bereit und sollte zur Konservierung eingeschweißt werden. Es ermöglicht die Analyse der Mikrosatelliteninstabilität und die Analyse des Loss of Heterozygosity.

Rezepturen:

- Der TBE Puffer wird in 0,6 facher Verdünnung benötigt, insgesamt werden 3 l fällig, für jeden Puffertank 1,5 l.
- TBE-Puffer Konzentrat:
 - 216 g Tris base
 - 110 g Borsäure
 - 80 ml 0,5% EDTA, pH 8
 - ad 3000 ml aqdest

Zur Herstellung des SSCP-Gels wird eine Gelbondfolie auf eine Glasplatte gebracht, darauf wird als Randmarkierung das Spacegummi gelegt. Auf die so präparierte Glasplatte wird die Slottglasplatte mit Hilfe von Stahlklammern fixiert. In diesen nach oben offenen Plattenaufbau kann mit einer Spritze das Gelgemisch eingefüllt werden. Nach 3 h in das Gel fest, die Glasplatten werden getrennt, und die Gelmatrix kann in die Apparatur gelegt werden.

- Gelzusammensetzung:
 - 12,5 ml MDE-Gel
 - 34,5 ml aqdest
 - 3 ml TBE-Konzentrat
 - 20 µl TEMED
 - 220 µl APS 10%

Das Gemisch wird in einem sterilen Urinbecher angesetzt und sollte zügig zwischen die Glasplatten gegeben werden.

Bei der Silberfärbung kommen vier Puffer zum Einsatz:

- Puffer A:
 - 50 ml Ethanol abs.
 - 2,5 ml Essigsäure
 - mit aqdest auf 500 ml auffüllen
- Puffer B:
 - 250 mg Silbernitrat
 - 250 ml aqdest
- Puffer C:
 - 3,75 g NaOH Plätzchen
 - 0.025 g Natriumborhydrid
 - 250 ml aqdest
 - 1 ml Formaldehyd
- Puffer D:
 - 1,9 g Natriumcarbonat
 - 250 ml aqdest
- Stop Solution:
 - 9,5 ml Formamid 100%
 - 0.5 ml BPB 1%
 - 0,02 ml NaOH, 5 mol

Die Reagentien sind zu mischen und bei 4°C aufzubewahren

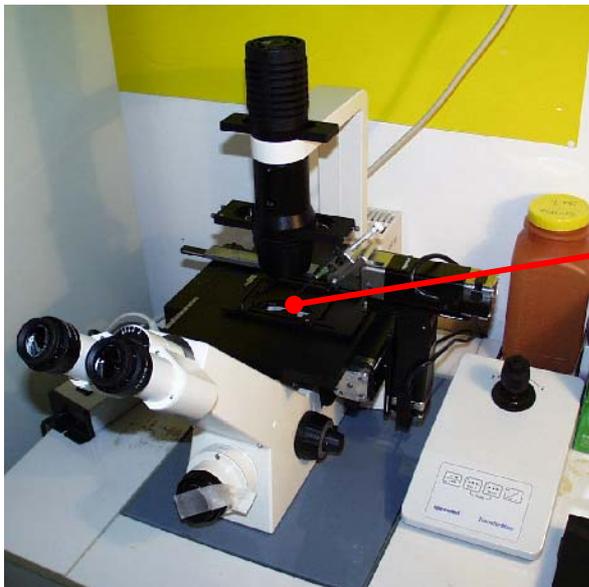
- Material:
- SSCP-Apparatur, Fa Qiagen, Düsseldorf
 - Elektrodentücher
 - Eppendorfggefäße
 - Abimed Pipetten
 - Glasplatten und Stahlklammern, Fa. Qiagen, Hilden
 - GelBond PAG Film, 54780, Fa. fMC BioProduct
 - Spacegummi, Fa Qiagen, Hilden
 - Spritze mit Hohnadel
 - MDE-Gel Solution, 50620, Fa FMC BioProducts
 - TEMED: N,N,N',N'-Tetramethyl-Ethylenediamine, T-8133, Fa Sigma
 - Amoniumpersulfat, 13375, Fa. Serva, Heidelberg
 - Tris base, T-8524, Fa. Sigma
 - Borsäure, 1.12015.1000, Fa Merck
 - EDTA, E-5134, Fa. Sigma

- Ethanol abs, UN 1170, Fa. Merck
- Essigsäure, 63.1000, Fa. Merck
- Silbernitrat, 1.01512, Fa. Merck
- NaOH Plätzchen, 1.06469, Fa. Merck
- Natriumborhydrid, 6371, Fa. Merck
- Formaldehyd, 4001, Fa. Merck
- Natriumcarbonat, 6398.1000, Fa. Merck
- Formamid 100%, F-7503, Fa. Sigma
- BPB 1%, Bromphenolblau, B-5525, Fa. Sigma
- Xylencyanol, X-4126, Fa. Sigma

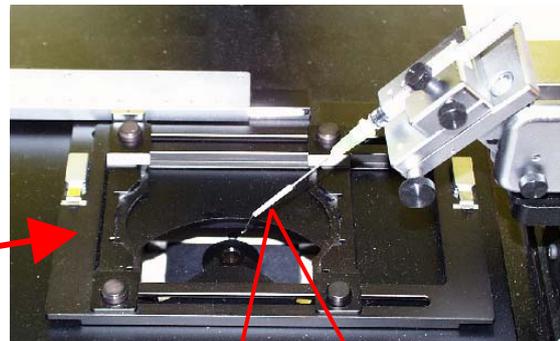
5 Ergebnisse

5.1 Handhabung der Mikrodissektion

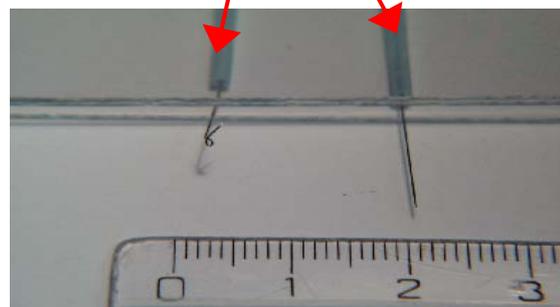
Für die praktische Durchführung der Mikrodissektion erwies sich ein inverses Mikroskop als besonders geeignet (Abbildung 5-1, A). In Verbindung mit einem Mikromanipulator, der mit einer sehr feinen Akupunkturnadel bestückt war (Abbildungen 5-1, B), C); 5-2), wurde eine hohe Präzision beim Markieren der Tumorzellareale erreicht. Die Etablierung der Methodik wurde durch eine vergleichende Untersuchung zwischen der Ink-PCR [Shibata et al., 1992] und der Klebstoff-PCR [Turbett et al., 1996] (→ 2.4.3, → 4.4) ergänzt. Die Klebstoff-PCR erwies sich als das praktikablere Verfahren, da sich das Auftragen des Klebstoffes genauer durchführen lässt, als die Applikation der dünnflüssigen Tinte. Bei der Ink-PCR kann sich darüber hinaus ein störender Einfluss durch den UV-geschädigten Zelldetritus ergeben, so dass mit der einfacher durchführbaren Klebstoff-PCR zuverlässigere Ergebnisse erzielt werden konnten. Bei den Untersuchungen stellte sich der Klebstoff als nicht störend für die molekularbiologische Analyse dar. Zelluläres Material, welches die PCR stören oder verfälschen könnte, wird vom Hersteller bei der Klebstoffproduktion nicht verwendet.



A) Arbeitsplatz

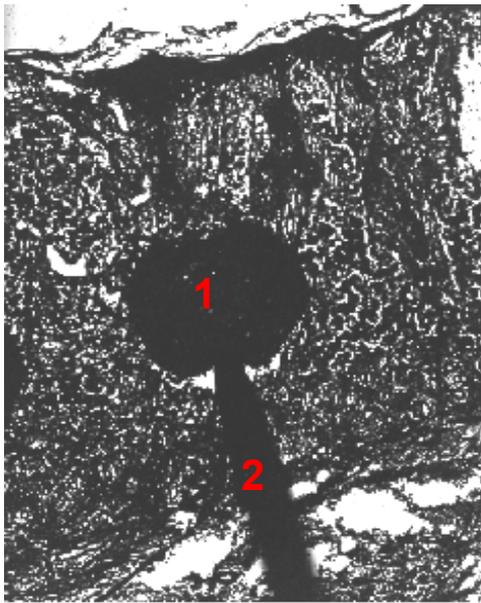


B) Objektisch mit Mikromanipulator

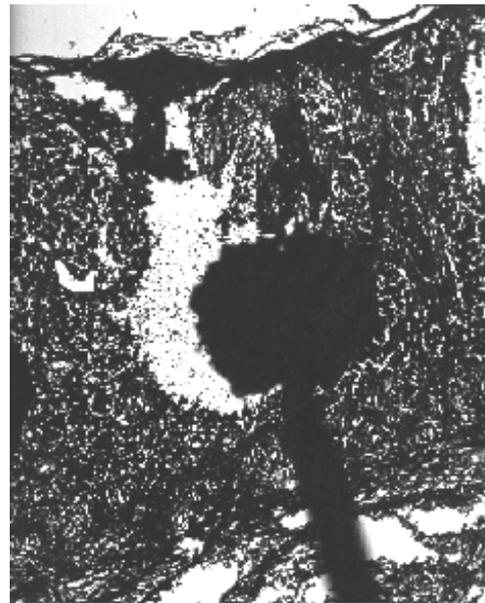


C) Akupunkturnadeln zur Applikation des Klebstoffes

Abbildung 5-1: A) Arbeitsplatz mit inversem Mikroskop, B) Objektisch mit Mikromanipulator und Nadel zur präzisen Klebstoffapplikation. C) Darstellung der Akupunkturadel zur Klebstoffapplikation vor Zentimeterskala



A) Applikation des Klebstoffes



B) Abheben des Klebstoffes

Abbildung 5-2: A) Applikation des Klebstoffes (1) mit einer Akupunkturadel (2) auf das ausgewählte Tumorzellareal eines histologischen Schnittpräparates. B) Abheben des getrockneten Klebstoffes und den daran haftenden Zellen mit Hilfe einer Akupunkturadel

5.2 Bedeutung der Dissektatgröße für die Mikrosatellitenanalyse

Im Laufe der Untersuchungen stellte sich heraus, dass die Größe des isolierten Tumorzellareals einen Einfluss auf das Ergebnis der anschließend durchgeführten Mikrosatellitenanalyse hat. In Abbildung 5-3 ist ein repräsentatives Beispiel dargestellt.



Abbildung 5-3: Tumorausschnitt aus Tumor 2/Patient DB. Roter Kreis: Areal 102, gelbe Kreise: Areale A, B und C.

Die Abbildung zeigt einen Tumorausschnitt (Tumor 2/Patient DB). Der rote Kreis markiert ein Areal, welches als ein in sich abgeschlossenes Tumorzellnest (102) imponierte. Das Tumorareal wurde mittels Mikrodissektion isoliert und molekularbiologisch analysiert. Die durchgeführte PCR und anschließende TG-SSCP ergab ein Bandenmuster (102), welches im Vergleich zum Normalgewebe (NG) des Patienten keine Auffälligkeiten bot (Abbildung 5-4).

Bei weitergehender Betrachtung der im Schnittband folgenden histologischen Präparate war innerhalb des Tumorareals 102 eine zarte Unterteilung in drei kleinere Zellnester erkennbar, symbolisiert durch die gelben Kreise in Abbildung 5-3. Diese wurden an einem weiteren Serienschnitt mittels Mikrodissektion isoliert. Bei der molekularbiologischen Analyse der drei kleineren Proben ergaben sich Bandenmuster (A und C), die sich sowohl untereinander als auch im Vergleich zum Normalgewebe (NG) und zur Gesamtprobe (102) unterschieden (Abbildung 5-4).

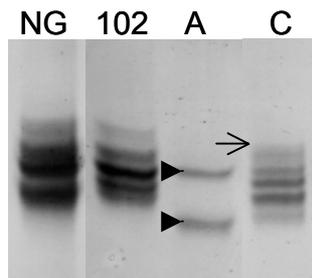


Abbildung 5-4: SSCP-Gel mit PCR-amplifizierter Mikrosatelliten-DNA (D9S162) aus mikrodissezierten Arealen aus Tumor 2/Patient DB. Dünne Pfeile repräsentieren Allelverlust, fette Pfeile repräsentieren Mikrosatelliteninstabilität. (NG: Normalgewebe, 102: Gesamtprobe, A und C: kleinere Tumoreale)

Eine der Proben zeigte Mikrosatelliteninstabilität (Probe A, ►), während Probe C einen LOH des oberen Allels aufwies (→).

Vor diesem Hintergrund erfolgte die Mikrodissektion der Tumore in möglichst kleine Areale gemäß der histologisch zu differenzierenden Tumorzellklone. Abbildung 5-5 zeigt ein histologisches Präparat von Tumor 2/Patient DB nach erfolgter Mikrodissektion.

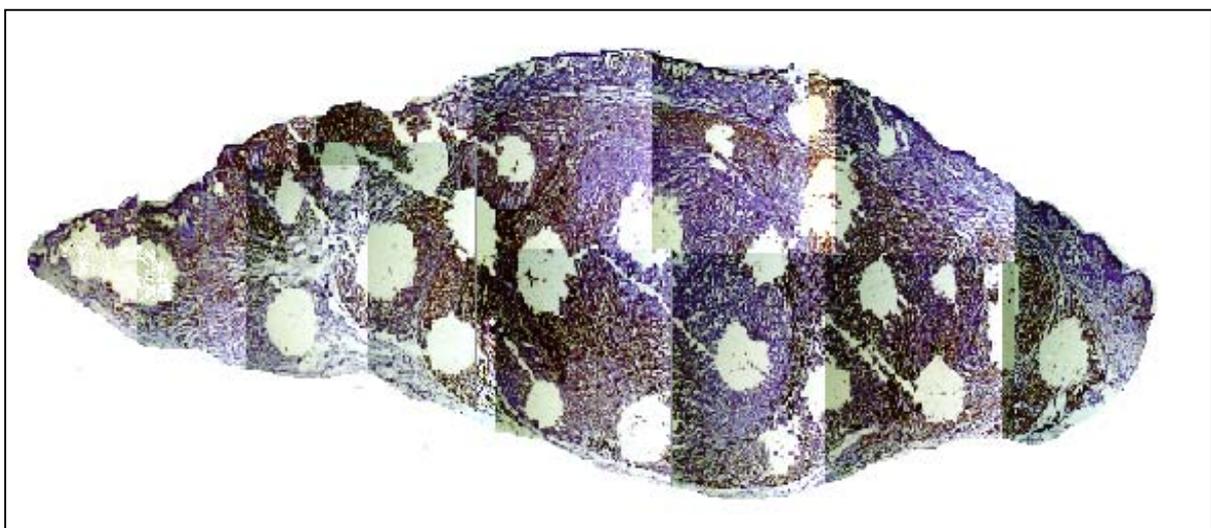


Abbildung 5-5: Histologisches Schnittpräparat von Tumor 2/Patient DB nach erfolgter Mikrodissektion.

5.3 Reproduzierbarkeit der Mikrosatellitenanalyse

Alle erzielten Ergebnisse zeigten ein hohes Maß an Reproduzierbarkeit. Alle DNA-Proben wurden mit den jeweiligen Versuchsansätzen mehrfach getestet. In der Abbildung 5-6 sind exemplarisch für Patienten DB und Patienten FR SSCP-Gelausschnitte dargestellt, welche die Reproduzierbarkeit der molekularbiologischen Analyse dokumentieren.

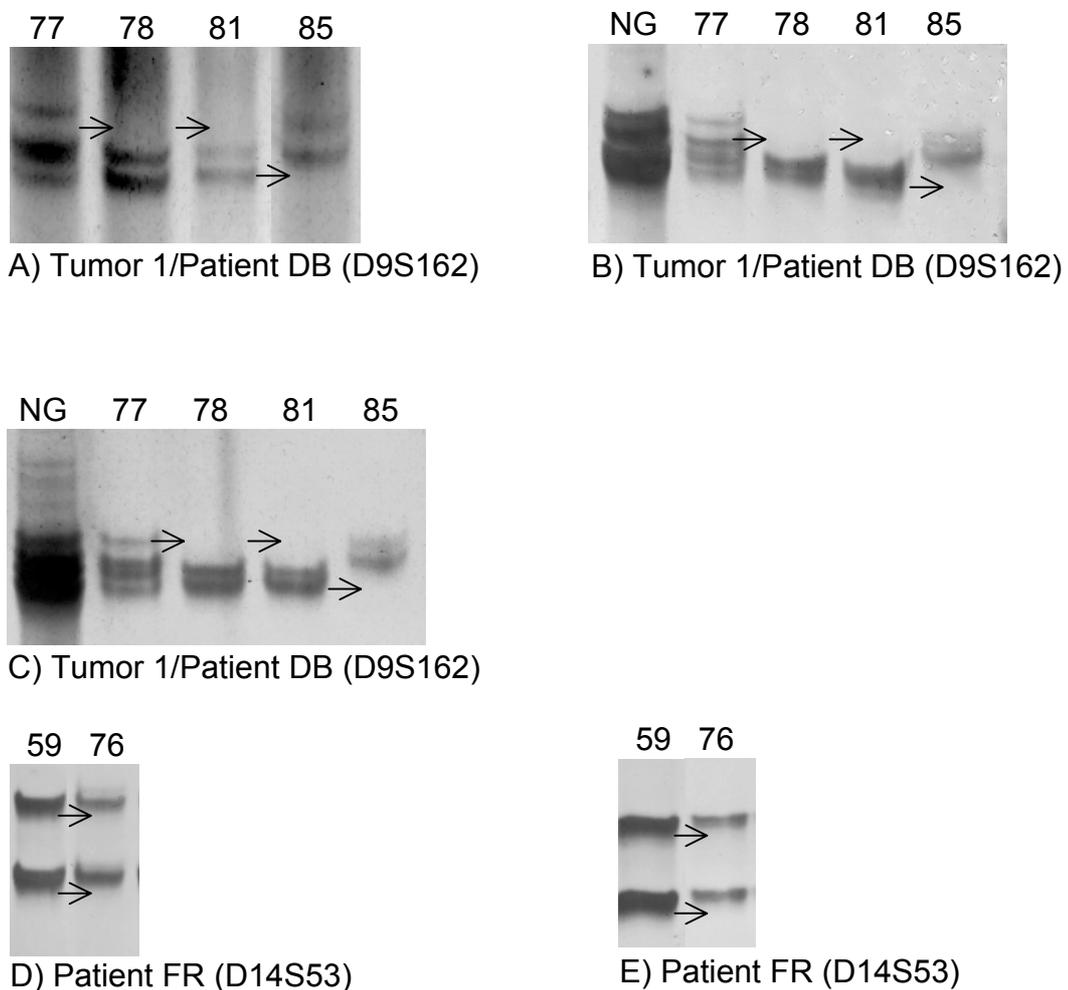


Abbildung 5-6: SSCP-Gel mit PCR-amplifizierter Mikrosatelliten-DNA (Patient DB: D9S162, Patient FR: D14S53) aus mikrodisssezierten Arealen aus Tumor1/Patient DB (A-C) und von Patient FR (D-E). Dünne Pfeile repräsentieren Allelverlust. (NG: Normalgewebe)

Die Proben wurden in unterschiedlichen Versuchsansätzen analysiert und lieferten übereinstimmende Ergebnisse. Die Abbildungen A-C zeigen die TG-SSCP-Gele drei verschiedener Versuchsansätze der DNA-Proben 77, 78, 81 und 85, die mit dem Mikrosatellitenmarker D9S162 analysiert wurden. Parallel wurde Normalgewebe getestet. Die Gel-Darstellung zeigt vier untereinanderliegende Banden, die den zwei Allelen des entsprechenden Genabschnittes entsprechen. Die zwei Allele kommen als vier Banden zur Darstellung, da sie sich in ihrer Sequenz und damit auch in ihrer Größe voneinander unterscheiden. Durch diesen Molekulargrößenunterschied variiert die Wanderungsgeschwindigkeit der Proben im Gel, das größere und damit langsamer wandernde Allel findet in der Gelmatrix somit über dem kleineren und schneller wandernden Allel seine Abbildung. Wir stellen einen Verlust der oberen Banden in Proben 78 und 81 fest (→), Probe 85 weist einen Verlust der unteren Banden auf (→), bei Probe 77 ist kein Verlust darstellbar, diese stimmt mit der Blutkontrolle überein. So können wir bei Probe 85 von einem Verlust des kleineren Allels ausgehen, während bei den Proben 78 und 81 ein LOH durch Verlust des größeren Allels aufgetreten ist. Auch Abbildung D-E dokumentieren die Reproduzierbarkeit des Verfahrens an zwei DNA-Proben von Patient FR. Hier wurde eine Testung auf Mikrosatellitenmarker D14S53 durchgeführt. In diesem Fall konnte in beiden Versuchsansätzen bei DNA-Probe 76 ein Verlust der unteren Bande (→) dargestellt werden. Probe 59 zeigt jeweils Wildtypcharakter.

5.4 Genetische und phänotypische Heterogenität im malignen Melanom

In der vorliegenden Untersuchung wurden die Tumore von 8 Patienten analysiert. Patient DB bot zwei Primärtumore, bei Patient CL wurden neben dem Primärtumor noch 4 Metastasen untersucht. Von den Patienten WL, SZ, KU, HO, FR und WO wurde der Primärtumor mikrodissenziert. Die nach der Mikrodissenktion eloierten Proben wurden mittels PCR amplifiziert, verwendet wurden die Mikrosatellitenmarker D9S162, D9S171, D9S259, D9S270, D14S53, D14S75, D14S288, D14S51 und D14S267. Im Anschluss an die PCR wurden die Proben mittels TG-SSCP auf Mikrosatelliteninstabilität und LOH analysiert.

Als phänotypisch besonders heterogen erwiesen sich die beiden Primärtumore von Patient DB sowie die Tumore von Patient CL und WL. Die übrigen fünf Patienten waren durch eine geringe phänotypische Heterogenität gekennzeichnet.

In Abbildung 5-7 sind als Beispiel für die phänotypische Heterogenität der Tumore histologische Darstellungen der vier mikrodisssezierten Tumorzellareale des Primärtumors von Patient CL dargestellt.

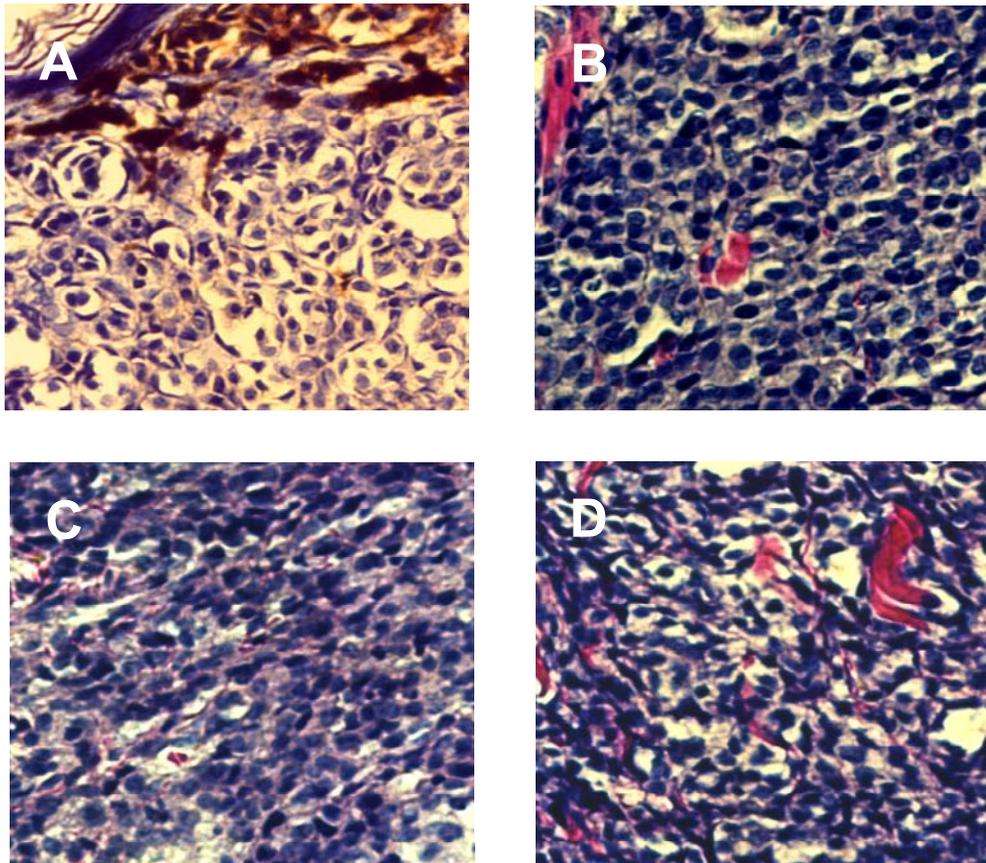


Abbildung 5-7: Vier Ausschnitte aus einem histologischen Schnittpräparat (HE-Färbung) des Primärtumors von Patient CL.

A) Tumorareal 34,

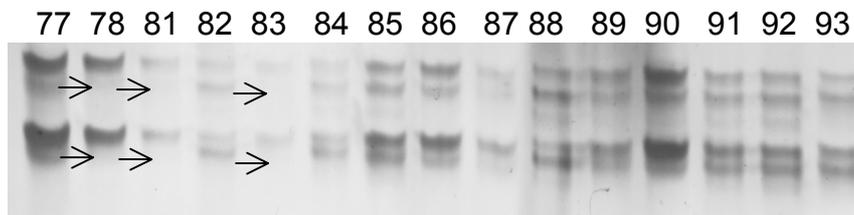
B) Tumorareal 35,

C) Tumorareal 36,

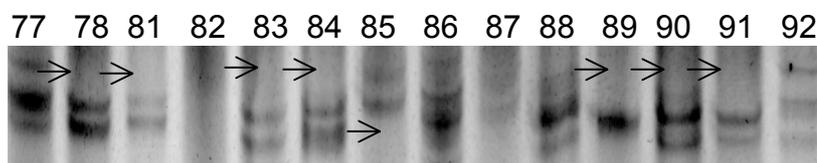
D) Tumorareal 33

Bei **Patient DB** kamen unabhängig voneinander zwei phänotypisch sehr heterogene Primärtumore zur Ausbildung. Durch Mikrodissektion konnten 51 verschiedene Tumorareale isoliert werden (15 Areale in Tumor 1, 36 Areale in Tumor 2). Die

Analyse der DNA-Proben dieser Tumore zeigte, dass es sich bei beiden Primärtumoren von Patient DB um genetisch ausgesprochen heterogene maligne Melanome handelt. In Abbildung 5-8 sind Ergebnisse der TG-SSCP-Analyse an zwei verschiedenen Mikrosatellitenorten (A: D14S53 und B: D9S162) für Tumor1/Patient DB exemplarisch dargestellt.



A) Patient DB, Tumor 1, D14S53



B) Patient DB, Tumor 1, D9S162

Abbildung 5-8: SSCP-Gel mit PCR-amplifizierter Mikrosatelliten-DNA aus mikrodisssezierten Arealen aus Tumor1/Patient DB.

A: Mikrosatellitenort D14S53, B: Mikrosatellitenort D9S162

Dünne Pfeile (→) repräsentieren Allelverlust.

Es können eine Vielzahl von Allelverlusten (→) registriert werden. Die Allelverluste sind nicht in allen Arealen des Tumors zu verzeichnen und sie betreffen in den verschiedenen Tumorarealen unterschiedliche Allele. So ist es bei Mikrosatellitenort D14S53 in Tumorareal 78, 81 und 83 zu einem Verlust des kleineren Allels (A) gekommen. Die Tumorareale 82, 84, 85, 86, 88, 89, 91, 92 und 93 zeigen Wildtypcharakter. Auch bei Mikrosatellitenmarker D9S162 sind die Allelverluste nicht in allen Arealen des Tumors zu verzeichnen und sie betreffen in den verschiedenen Tumorarealen unterschiedliche Allele. Darüber hinaus unterscheidet sich das Muster der Allelverluste an beiden Mikrosatellitenorten. Bei Mikrosatellitenort D9S162 ist in Tumorareal 78, 81, 83, 84, 89, 90 und 91 das größere Allel verloren während in Tumorareal 85 ein Verlust des kleineren Allels verzeichnet werden kann (B). Die

Tumorareale 77, 82, 86, 87, 88 und 92 zeigen Wildtypcharakter. So weist Tumor 1/Patient DB an beiden Mikrosatelliten eine ausgeprägte genetische Heterogenität auf.

Diese Beobachtungen wurden durch die Ergebnisse der Mikrosatellitenanalyse bei Tumor2/Patient DB bestätigt. Auch hier erfolgten Untersuchungen an den Mikrosatellitenorten D9S162 und D14S53 (Abbildung 5-9).



Abbildung 5-9: SSCP-Gel mit PCR-amplifizierter Mikrosatelliten-DNA aus mikrodissezierten Arealen aus Tumor2/Patient DB.

A: Mikrosatellitenort D9S162, B: Mikrosatellitenort D14S53

Dünne Pfeile (→) repräsentieren Allelverlust, fette Pfeile (▶) repräsentieren Mikrosatelliteninstabilität.

Bei Tumor 2/Patient DB kann eine hohe Rate an Allelverlusten (→) und Mikrosatelliteninstabilität (▶) registriert werden. Auch bei Tumor 2 sind die Allelverluste und die Mikrosatelliteninstabilität nicht in allen Arealen des Tumors zu verzeichnen, wieder sind in den verschiedenen Tumorarealen unterschiedliche Allele betroffen. Bei Mikrosatellitenort D9S162 ist in Tumorareal 106, 109, 113 und 114 das größere Allel verloren während in Tumorareal 110 ein Verlust des kleineren Allels verzeichnet werden kann. Mikrosatelliteninstabilität wird in Areal 111 und 112 beobachtet (A). Das Muster der Allelverluste und der Mikrosatelliteninstabilität ist an

beiden Mikrosatellitenorten unterschiedlich. Bei Mikrosatellitenort D14S53 kam es in Tumorareal 107, 116 und 117 zu einem Verlust des größeren Allels, in Areal 106 und 114 zu einem Verlust des kleineren Allels und in Areal 115 zu Mikrosatelliteninstabilität.

Der heterogene Aspekt der Primärtumore konnte auch bei den anderen untersuchten Mikrosatellitenorten dargestellt werden (Abbildung 5-10). Viele Tumorareale scheinen unterschiedliche Tumorzellklon zu repräsentieren, molekularbiologisch gleicht kaum ein Tumorareal dem anderen.

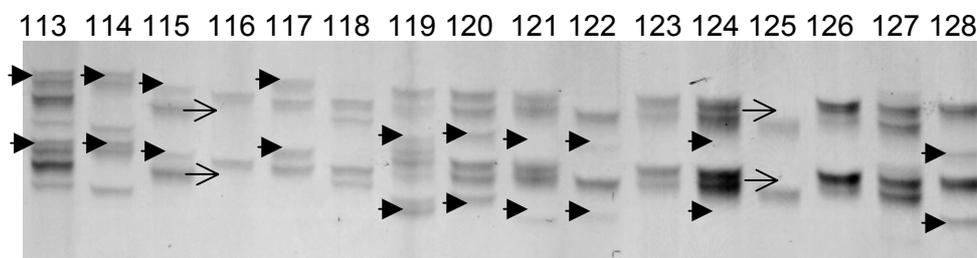


Abbildung 5-10: SSCP-Gel mit PCR-amplifizierter Mikrosatelliten-DNA (D9S171) aus mikrodisssezierten Arealen aus Tumor2/Patient DB.

Dünne Pfeile (→) repräsentieren Allelverlust, fette (▶) Pfeile repräsentieren Mikrosatelliteninstabilität.

Abbildung 5-10 zeigt Ergebnisse der Mikrosatellitenanalyse bei Tumor 2/Patient DB an dem Mikrosatellitenort D9S171. Zahlreiche Tumorareale (113, 114, 115, 117, 119, 120, 121, 122, 124 und 128) weisen Mikrosatelliteninstabilität beider Allele auf (▶). Einen Verlust des unteren Allels zeigt Tumorareal 116, eine Deletion des oberen Allels zeigt Tumorareal 125.

Insgesamt fanden sich bei Tumor 1 und Tumor 2 von Patient DB bei allen untersuchten Mikrosatellitenorten mutierte Allele (MSI) und verlorene Allele (LOH). Einen Überblick über alle Ergebnisse zeigt Tabelle 5-1.

Patient CL bot einen phänotypisch heterogenen Primärtumor und phänotypisch heterogene Metastasen. Mit Hilfe der Mikrodissektion des Primärtumors und der 4 Metastasen konnten 16 DNA-Proben bereitgestellt und analysiert werden. Die Analyse der DNA-Proben ergab einen ähnlich heterogenen Eindruck wie die Analyse bei Patient DB.

In Abbildung 5-11 sind Ergebnisse der TG-SSCP-Analyse vier verschiedener Mikrosatellitenorte (A: D9S162, B: D9S171, C: D9S259 und D: 14S53) für Patient CL exemplarisch dargestellt. Proben 33, 34 und 36 sind Tumorareale des Primärtumors, 7, 19, 32, 37 und 38 sind Tumorareale aus Metastasen von Patient CL.

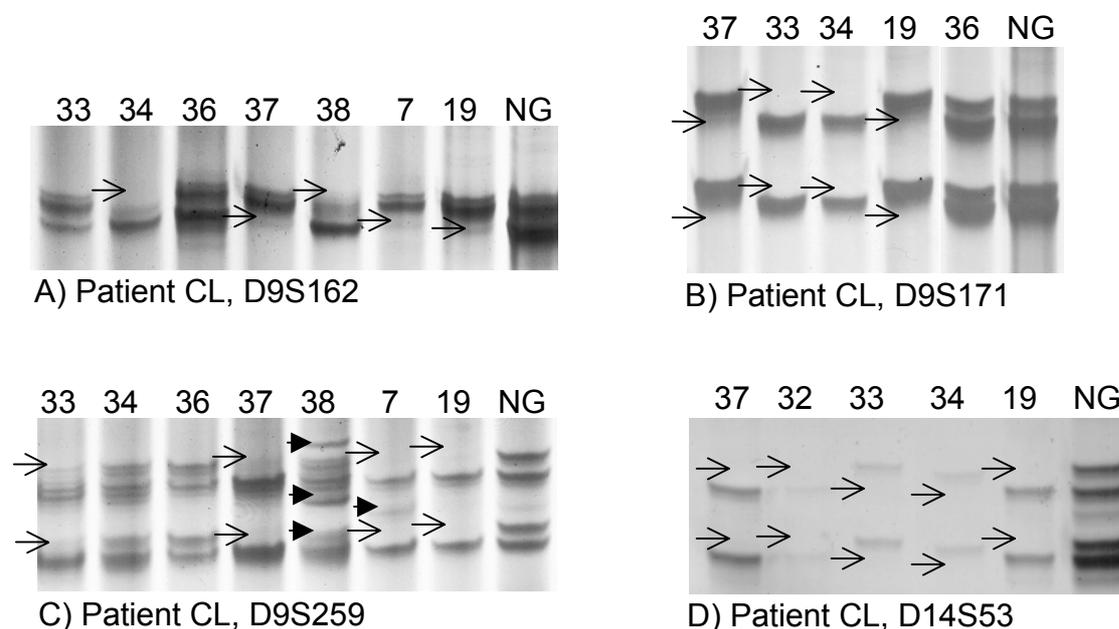


Abbildung 5-11: SSCP-Gel mit PCR-amplifizierter Mikrosatelliten-DNA aus mikrodissezierten Arealen von Patient CL.

A) Mikrosatellitenort D9S162, B) Mikrosatellitenort D9S171,
C) Mikrosatellitenort D9S259, D) Mikrosatellitenort D14S53

Dünne Pfeile (→) repräsentieren Allelverlust, fette Pfeile (▶) repräsentieren Mikrosatelliteninstabilität. (NG: Normalgewebe)

In allen Tumoren können Allelverluste (→) und Mikrosatelliteninstabilität (▶) registriert werden. Wie bei Patient DB beobachtet sind die Allelverluste nicht in allen Arealen der Tumore zu verzeichnen. Die einzelnen Areale weisen bei den verschiedenen

Mikrosatellitenorten unterschiedliche Muster der Allelverluste oder der Mikrosatelliteninstabilität auf. Das Areal 33 (Primärtumor) zeigt bei Mikrosatellitenort D9S162 Wildtypcharakter. Bei den Mikrosatellitenorten D9S171 und D9S259 zeigt das Areal 33 einen Verlust des größeren Allels und bei Mikrosatellitenort D14S53 einen Verlust des kleineren Allels. Das Areal 19 (Metastase) zeigt bei den Mikrosatellitenorten D9S162 und D9S171 einen Verlust des kleineren Allels, bei den Mikrosatellitenorten D9S259 und D14S53 hingegen einen Verlust des größeren Allels. Das Areal 38 (Metastase) zeigt bei Mikrosatellitenort D9S162 einen Verlust des größeren Allels, bei Mikrosatellitenort D9S259 hingegen Mikrosatelliteninstabilität. Die Ergebnisse bestätigen das bei Patient DB dargestellte Phänomen, dass die verschiedenen Tumoreale an den untersuchten Mikrosatelliten ein unterschiedliches Muster an Allelverlusten (LOH) und mutierten Allelen (MSI) aufweisen. Die untersuchten PCR-Produkte weisen ein hohes Maß an genetischer Heterogenität auf. Einen Überblick über alle Ergebnisse zeigt Tabelle 5-1.

Die Analyse der DNA-Proben des phänotypisch heterogenen mikrodisszezierten Primärtumors von **Patient WL** zeigte, dass es sich auch bei diesem Tumor um ein genetisch heterogenes malignes Melanom handelt. In Abbildung 5-12 sind Ergebnisse der TG-SSCP-Analyse an zwei verschiedenen Mikrosatellitenorten (A: D9S162 und B: D9S259) exemplarisch dargestellt.

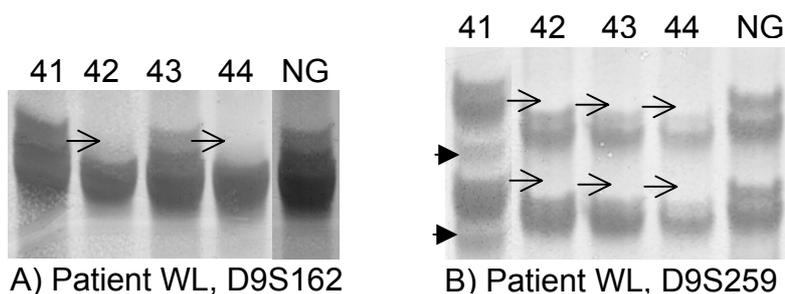


Abbildung 5-12: SSCP-Gel mit PCR-amplifizierter Mikrosatelliten-DNA aus mikrodisszezierten Arealen von Patient WL.

A) Mikrosatellitenort D9S162, B) Mikrosatellitenort D9S259

Dünne Pfeile (→) repräsentieren Allelverlust, fette Pfeile (▶) repräsentieren Mikrosatelliteninstabilität. (NG: Normalgewebe)

Auch bei Patient WL können sowohl Allelverluste (\rightarrow) als auch Mikrosatelliteninstabilität (\blacktriangleright) registriert werden, was auf ein hohes Maß an genetischer Instabilität schließen lässt. Wie bei den Patienten DB und CL beobachtet sind Allelverluste und Mikrosatelliteninstabilität nicht in allen Arealen des Tumors zu verzeichnen. Bei Mikrosatellitenort D9S162 ist in Tumorareal 42 und 44 das größere Allel verloren. Areale 41 und 43 zeigen Wildtypcharakter. Bei Mikrosatellitenort D9S259 kam es in Tumorareal 42, 43 und 44 zu einem Verlust des größeren Allels, in Areal 41 wurde Mikrosatelliteninstabilität nachgewiesen. So bieten die einzelnen Areale des malignen Melanoms von Patient WL bei den verschiedenen Mikrosatellitenorten unterschiedliche Muster der Allelverluste oder der Mikrosatelliteninstabilität.

Einen Überblick über alle Ergebnisse zeigt Tabelle 5-1.

Es wurde ergänzend untersucht, ob zwischen einer gesteigerten Proliferationsrate der Tumorzellen und dem Vorliegen genetischer Instabilität in dem entsprechenden Tumorareal ein Zusammenhang besteht. Dazu wurde die immunhistochemische MIB-Färbung mit Nachweis des proliferationsassoziierten Antigens Ki67 durchgeführt (Abbildung 5-13) und mit den Ergebnissen der TG-SSCP-Analyse verglichen.

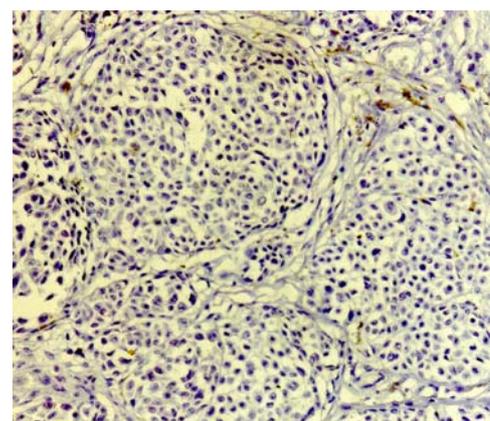
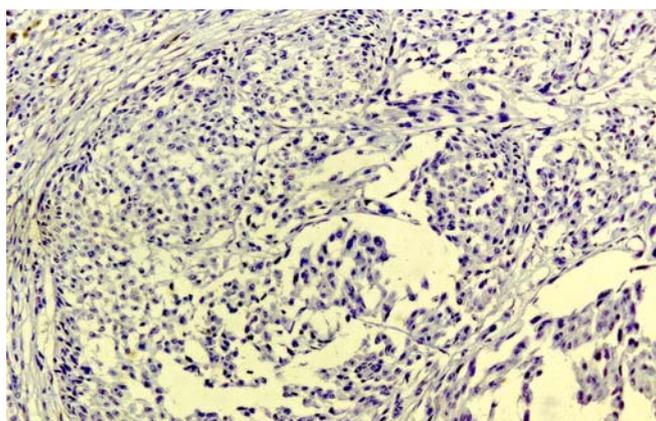
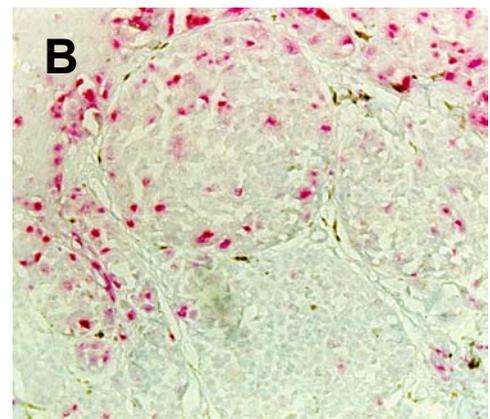
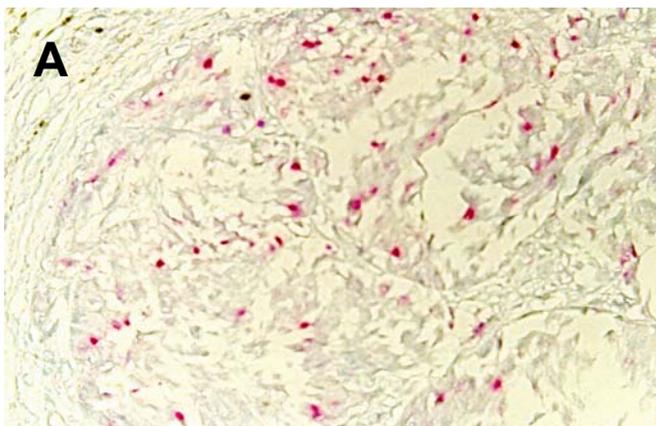


Abbildung 5-13: MIB-Färbung (obere Reihe) histologischer Schnittpräparate des Primärtumors Patient CL mit korrespondierenden HE-Färbungen (untere Reihe). Die Ki67-positiven Zellen wurden mit rotem Farbstoff gegengefärbt.

A) Tumorareal 34

B) Tumorareal 36

Beide Tumorzellareale scheinen aufgrund der positiven MIB-Färbung eine gesteigerte Proliferationsrate aufzuweisen. Bei Betrachtung der Instabilitätsanalyse imponiert das Tumorareal 34 als instabil, es zeigt bei Mikrosatellitenort D9S162, D9S171 und D14S53 Allelverluste. Das Tumorareal 36 bietet bei allen untersuchten Mikrosatellitenorten Wildtypcharakter. Auf molekularbiologischer Ebene finden sich folglich grundlegende Unterschiede, die durch die MIB-Färbung nicht darstellbar sind. Auch das histologische Erscheinungsbild in der HE-Färbung zeigt bei beiden Tumorarealen deutliche Unterschiede.

Die von Böni et al. beschriebene Korrelation der Instabilitätsverteilung im Tumor und der Aktivität des Ki67-Antigens der MIB-Färbung in den einzelnen Tumorzellnestern konnte somit nicht beschrieben werden [Böni et al., 1998b].

Die von Healy et al. beobachtete gesteigerte Expression des Ki67-Antigens in Tumorzellen im Vergleich zum Normalgewebe konnte bestätigt werden [Healy et al., 1998].

5.5 Genetische Instabilität in den untersuchten Tumoren

Die Mikrosatellitenanalyse an mikrodissiziertem Material zeigte eine genetische Heterogenität innerhalb der untersuchten Tumore. Es konnte gezeigt werden, dass beide Arten der genetischen Instabilität, Mikrosatelliteninstabilität und chromosomale Instabilität, innerhalb eines Tumors vorkommen können.

Die Betrachtung der einzelnen Tumore vermittelt den Eindruck, dass Mutationsart und -häufigkeit in den betrachteten Mikrosatelliten in den einzelnen Tumoren unterschiedlich waren. Einen Überblick über die Ergebnisse aller Tumorareale an allen Mikrosatellitenloci sortiert nach Patienten liefert die folgende Tabelle (Tabelle 5-1).

Patient	Patient DB, Tumor 1												
Tumorareal	77	78	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91
Mikrosatelliten													
D9S162	o/o	●/o	●/o	KP	●/o	●/o	o/o	o/o	KP	o/o	●/o	●/o	●/o
D9S171	●/o	o/o	KP	KP	KP	●/o	KP						
D9S259	o/●	l/l	●/o	l/l	l/l	o/l	o/o	o/●	KP	o/●	o/o	o/o	o/l
D9S270	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP
D14S53	o/●	o/●	o/●	o/o	o/●	o/o	o/o	o/o	o/●	o/o	o/o	o/●	o/o
D14S75	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP
D14S288	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
D14S51	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP
D14S267	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Patient	Tumor 1		Patient DB, Tumor 2										
Tumorareal	92	93	102	A	B	C	103	104a	104b	105	106	107	108
Mikrosatelliten													
D9S162	o/o	o/●	o/o	l/l	KP	o/o	o/o	l/l	●/o	o/o	●/o	o/o	o/o
D9S171	●/o	KP	●/l	●/o	o/●	l/o	l/l	l/l	l/l	l/l	●/o	●/o	l/l
D9S259	●/o	o/o	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP
D9S270	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	l/l	KP	KP	KP
D14S53	o/o	o/o	o/o	KP	o/●	o/●	o/o	l/o	KP	l/l	o/●	o/o	o/o
D14S75	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	●/o	KP	●/o	●/o	KP	●/o
D14S288	ND	ND	KP	KP	KP	KP	●/o	KP	KP	●/o	KP	KP	KP
D14S51	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	l/l	KP	KP	KP	KP	KP
D14S267	ND	ND	KP	KP	KP	KP	o/●	KP	KP	o/●	o/●	o/●	o/●

Legende: o/o = heterozygot; o/● = Verlust des Allels mit kleinerem Molekulargewicht

●/o = Verlust des Allels mit größerem Molekulargewicht

l = mutiertes Allel, Mikrosatelliteninstabilität

ND = nicht durchgeführt

KP = kein PCR-Produkt

Patient	Patient DB, Tumor 2												
Tumorareal	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121
Mikrosatelliten													
D9S162	o/o	●/o	o/o	l/●	●/o	●/o	o/o	●/o	●/o	o/o	●/o	o/o	●/o
D9S171	l/●	o/●	o/●	KP	l/l								
D9S259	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	l/l	KP	KP	KP	KP
D9S270	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP
D14S53	o/o	l/o	KP	o/o	o/o	o/●	o/l	o/o	o/o	o/o	o/o	o/o	o/o
D14S75	KP	o/●	KP	o/●	●/o	●/o	●/o	●/o	KP	KP	o/o	o/o	o/o
D14S288	KP	KP	o/●	o/●	●/o	KP	KP	KP	●/o	KP	o/o	o/o	●/o
D14S51	KP	KP	KP	KP	o/o								
D14S267	KP	KP	o/●	KP	●/o	KP	●/o	KP	KP	●/o	o/o	KP	KP

Patient	Patient DB, Tumor 2												
Tumorareal	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	
Mikrosatelliten													
D9S162	●/o	o/o	o/o	ND	ND	ND	KP	KP	KP	KP	KP	KP	
D9S171	●/o	l/l	l/l	●/o	l/l	o/o	o/l	●/o	o/l	o/o	o/l	o/l	
D9S259	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	
D9S270	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	
D14S53	o/o	o/o	o/●	o/o	ND	ND	KP	KP	KP	KP	KP	KP	
D14S75	o/o	KP	KP	ND	ND	ND	KP	KP	KP	KP	KP	KP	
D14S288	●/o	●/o	ND	ND	ND	ND	KP	KP	KP	KP	KP	KP	
D14S51	o/l	o/o	o/o	KP									
D14S267	KP	KP	●/o	ND	ND	ND	KP	KP	KP	KP	KP	KP	

Legende: o/o = heterozygot; o/● = Verlust des Allels mit kleinerem Molekulargewicht
 ●/o = Verlust des Allels mit größerem Molekulargewicht
 l = mutiertes Allel, Mikrosatelliteninstabilität
 ND = nicht durchgeführt
 KP = kein PCR-Produkt

Patient	Patient CL; Primärtumor			
Tumorareal	33	34	35	36
Mikrosatelliten				
D9S162	o/o	●/o	ND	o/o
D9S171	●/o	●/o	ND	o/o
D9S259	●/o	o/o	o/o	o/o
D14S53	o/●	o/●	ND	o/o

Patient	Patient CL, Metastasen											
Tumorareal	5	6	7	19	21	29	30	31	32	37	38	39
Mikrosatelliten												
D9S162	ND	o/o	o/●	o/●	o/o	ND	ND	l/●	ND	o/●	●/o	ND
D9S171	ND	o/o	●/o	o/●	o/o	ND	ND	KP	ND	o/●	o/o	KP
D9S259	ND	●/o	●/l	●/o	KP	●/l	o/o	o/o	o/o	●/o	l/l	●/o
D14S53	●/o	ND	ND	●/o	ND	ND	ND	KP	●/o	●/o	ND	ND

Legende: o/o = heterozygot; o/● = Verlust des Allels mit kleinerem Molekulargewicht

●/o = Verlust des Allels mit größerem Molekulargewicht

l = mutiertes Allel, Mikrosatelliteninstabilität

ND = nicht durchgeführt

KP = kein PCR-Produkt

Patient	Patient WL				Patient SZ			Patient KU					
Tumorareal	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53
Mikrosatelliten													
D9S162	o/o	●/o	o/o	●/o	o/o	o/o	o/o	o/o	o/o	o/o	KP	KP	o/o
D9S171	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	o/o	KP	KP	KP
D9S259	o/1	●/o	●/o	●/o	o/o	o/o	o/o	o/o	o/o	o/o	o/o	o/o	o/o
D14S53	ND	o/o	o/o	o/o	o/o	o/o	ND	ND	ND	ND	ND	ND	o/o

Patient	Patient KU		Patient HO			Patient FR					Patient WO	
Tumorareal	54	55	56	57	58	59	60	63	70	76	94	95
Mikrosatelliten												
D9S162	ND	o/o	ND	ND	ND	ND	ND	ND	o/o	ND	ND	ND
D9S171	KP	KP	ND	ND	ND	ND	ND	ND	o/o	ND	ND	ND
D9S259	o/o	o/o	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
D14S53	ND	ND	o/o	o/●	o/●	o/o	o/●	●/o	KP	o/●	o/o	o/o

Legende: o/o = heterozygot; o/● = Verlust des Allels mit kleinerem Molekulargewicht
 ●/o = Verlust des Allels mit größerem Molekulargewicht
 1 = mutiertes Allel, Mikrosatelliteninstabilität
 ND = nicht durchgeführt
 KP = kein PCR-Produkt

Tabelle 5-1: Ergebnisse aller Tumorareale an allen Mikrosatellitenloci
 sortiert nach Patienten

So zeigten die TG-SSCP-Analysen bei Patient DB/Tumor 1 in 11 % aller untersuchten PCR-Amplifikate Mikrosatelliteninstabilität, 50 % der PCR-Amplifikate zeigten einen Allelverlust. Der andere Primärtumor (Tumor 2) von Patient DB zeigte in 25 % der untersuchten PCR-Amplifikate Mikrosatelliteninstabilität und in 39 % der untersuchten PCR-Amplifikate Allelverluste. Die beiden Primärtumore des Patient DB scheinen in

der Mutationsart und –häufigkeit tumorspezifische Unterschiede aufzuweisen. Auch im Vergleich mit Patient CL werden tumorspezifische Unterschiede erkennbar. Bei Patient CL zeigen sich in 10 % aller untersuchten PCR-Amplifikate Mikrosatelliteninstabilität, 60 % der untersuchten PCR-Amplifikate wiesen Allelverluste auf. Bei Patient WL zeigen 9 % aller untersuchten PCR-Amplifikate Mikrosatelliteninstabilität, 45 % der PCR-Amplifikate zeigten Allelverluste.

Bei Betrachtung der einzelnen Mikrosatellitenmarker fällt bei Patient DB/Tumor 1 auf, dass sich die Mikrosatelliteninstabilität nur an einem der untersuchten Mikrosatellitenorte darstellen lässt. Der Marker D9S259 ist in 5 von 14 untersuchten Fällen mutiert, während alle anderen Marker keine Mikrosatelliteninstabilität zeigen. An Mikrosatellitenmarker D9S171 konnte keine Mikrosatelliteninstabilität gezeigt werden, jedoch die häufigsten Allelverluste (75 %). Im Gegensatz dazu lässt sich bei Tumor 2 (Patient DB) an Mikrosatellitenort D9S171 die höchste Rate an Mikrosatelliteninstabilität darstellen (68 %). Bei Patient CL finden sich an Mikrosatellitenort D9S171 keine Mikrosatelliteninstabilität, jedoch in 56 % der untersuchten DNA-Proben Allelverluste. Bei Patient WL zeigte sich an Mikrosatellitenort D9S259 die höchste Rate an Mikrosatelliteninstabilität, Allelverluste konnten hier in 50 % der untersuchten DNA-Proben nachgewiesen werden. Die häufigsten Allelverluste wurden bei Patient WL an Mikrosatellitenort D14S53 dargestellt (86 %).

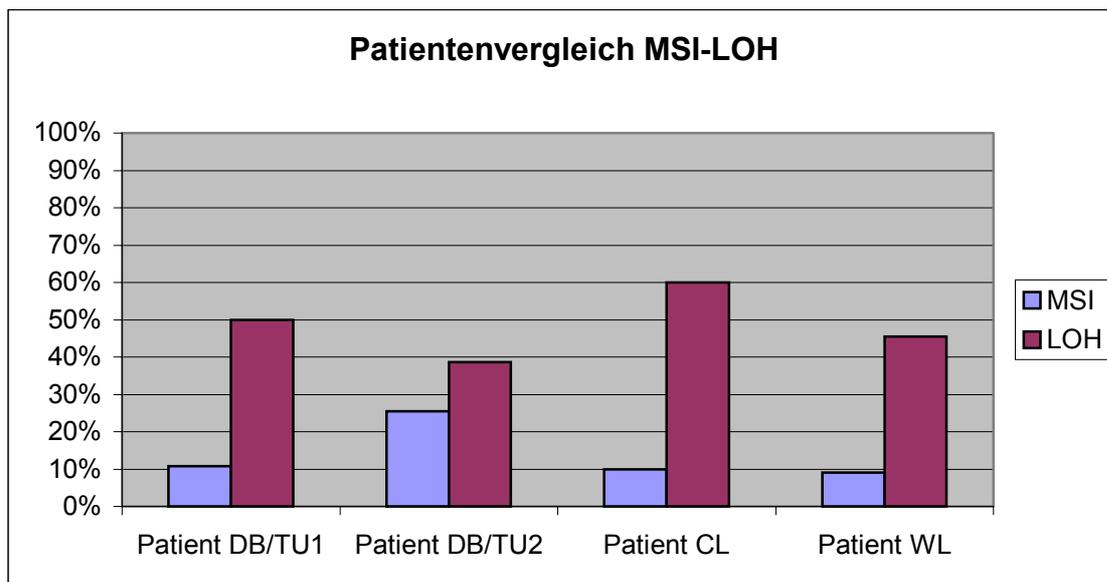
In den Tabellen 5-2 sowie in Diagramm 5-1 sind einige Ergebnisse nach Patienten und Mikrosatelliten zusammengefasst dargestellt.

Tabelle 5-2: Ergebnisse Mikrosatelliteninstabilität – Allelverlust der Gesamttumore an ausgesuchten Mikrosatellitenorten und an allen Mikrosatellitenorten aufsummiert.

Primer	Patient DB/Tumor 1			
	MSI		LOH	
D9S162	0 / 13	0 %	9 / 13	69,2 %
D9S171	0 / 4	0 %	3 / 4	75 %
D9S259	5 / 14	35,7 %	5 / 14	35,7 %
D14S53	0 / 15	0 %	6 / 15	40 %
Gesamt	5 / 46	10,8 %	23 / 46	50 %
Primer	Patient DB/Tumor 2			
	MSI		LOH	
D9S162	3 / 26	11,5 %	11 / 26	42,3 %
D9S171	24 / 35	68,5 %	8 / 35	22,8 %
D14S53	4 / 25	16 %	5 / 25	20 %
D14S75	0 / 14	0 %	10 / 14	71,4 %
D14S288	0 / 11	0 %	9 / 11	81,8 %
D14S51	2 / 13	15,4 %	0 / 13	0 %
D14S267	0 / 11	0 %	10 / 11	91 %
Gesamt	35 / 137	25,5 %	53 / 137	38,7 %
Primer	Patient CL			
	MSI		LOH	
D9S162	1 / 10	10 %	6 / 10	60 %
D9S171	0 / 9	0 %	5 / 9	55,6 %
D9S259	3 / 14	21,4 %	7 / 14	50 %
D14S53	0 / 7	0 %	6 / 7	85,7 %
Gesamt	4 / 40	10 %	24 / 40	60 %

Primer	Patient WL			
	MSI		LOH	
D9S162	0 / 4	0 %	2 / 4	50 %
D9S259	1 / 4	25 %	3 / 4	75 %
D14S53	0 / 3	0 %	0 / 3	0 %
Gesamt	1 / 11	9 %	5 / 11	45,5 %

Diagramm 5-1: Ergebnisse Mikrosatelliteninstabilität – Allelverlust der Gesamttumore an allen Mikrosatellitenorten (in Prozent) für Patient DB (Tumor 1, Tumor 2), Patient CL und Patient WL.



6 Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Etablierung und Evaluierung der Mikrodissektion und der genetischen Analyse mikrodissezierter Gewebeareale. Zu klären galt, ob diese Technik zum Nachweis von Mikrosatelliteninstabilität und chromosomaler Instabilität geeignet ist. Insbesondere sollte dargestellt werden, welche der Formen der genetischen Instabilität beim malignen Melanom vorherrschen.

6.1 Methodische Aspekte der Mikrodissektion

Die Technik der Mikrodissektion mit Hilfe von Klebstoff hat sich als gut funktionierend erwiesen. Der Klebstoff störte die molekularbiologischen Untersuchungen nicht, es wurde keine Verfälschung der Ergebnisse beobachtet. Das Applizieren des Klebstoffes, auch auf kleinere Tumorzellareale, war dank der feinen Akupunkturnadeln und dank der Viskosität des Klebers gut möglich. Das Abhebeln der Klebstoff-Gewebe-Partikel gelang problemlos, es entstanden sauber abgrenzbare Dissektionsinseln im Bereich der verschiedenen Tumoreareale. Als konkurrierende Methode erwies sich die Ink-PCR als weniger geeignet. Offensichtlich wird hier auch DNA der abgedeckten Zellen unter der Bestrahlung zerstört, während unbedeckte Zellen trotz UV-Bestrahlung nicht beeinträchtigt wurden und so die Ergebnisse verfälschten.

Die Notwendigkeit einer genauen, an histologischen Strukturen orientierten Mikrodissektion wird in der Literatur beschrieben [Giercksky et al., 1997, Loeb et Loeb, 2000] und konnte anhand der eigenen Ergebnisse bestätigt werden. Insbesondere bei genetisch heterogenen Tumoren ist die Gefahr groß, bei zu undifferenzierter genetischer Analyse oder bei Mikrodissektion zu großer Areale genetisch unterschiedliche Zellklone zu vermischen und so zu einer Fehleinschätzung bezüglich der genetischen Alterationen der Tumore zu gelangen [Loeb et Loeb, 2000]. Allerdings haben die Untersuchungen von Sieben et al. ergeben, dass die Größe der mikrodissezierten Tumoreareale nicht zu klein sein darf, da sich sonst falsch positive Ergebnisse ergeben können [Sieben et al., 2000].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die verwendete Methodik der Mikrodissektion mit anschließender Mikrosatelliten-PCR und TG-SSCP-Analyse gut geeignet ist, um bei Tumoren des malignen Melanoms Mikrosatelliteninstabilität und Loss of Heterozygosity zu dokumentieren und so genetische Heterogenität und genetische Instabilität darzustellen.

Ein Nachteil der Methodik ist der hohe manuelle Aufwand; dadurch wird die Technik zeitaufwendig und nur durch den geschulten Anwender nutzbar. Dieser Nachteil und die fehlende Standardisierung machen die verwendete Methodik für Routineanwendungen wenig geeignet.

6.2 Genetische Heterogenität und Instabilität in den untersuchten Tumoren

Im Rahmen der Untersuchungen wurde gezeigt, dass die untersuchten Tumore des malignen Melanoms phänotypisch und genotypisch eine ausgesprochene Heterogenität aufweisen und sowohl Mikrosatelliteninstabilität als auch chromosomale Instabilität zeigen.

In der Literatur finden sich viele Hinweise auf genetische Instabilität in Tumoren des malignen Melanoms. So haben zytogenetische Untersuchungen Verluste oder Zugewinne von chromosomalem Material gezeigt; in vielen Studien wird durch einen LOH-Nachweis ein häufiger Allelverlust bestätigt [Rees et Healy, 1996; Trent et al., 1990; Fountain et al., 1992; Herbst et al., 1994; Healy et al., 1995, 1996b, 1998; Takata et al., 2000; Boeni et al., 1998b; Dracopoli et al., 1987]. Auch das Auftreten von Mikrosatelliteninstabilität wird beim malignen Melanom beobachtet [Peris et al., 1995; Quinn et al., 1995; Healy et al., 1996b; Tomlinson et al., 1996; Kroiss et al., 2001; Rübben et al., 2000; Birindelli et al., 2000; Alvino et al., 2002].

Bezüglich der Häufigkeit der Mikrosatelliteninstabilität in sporadischen Melanomen gibt es unterschiedliche Angaben. Quinn et al. beobachten in 5 % der Fälle MSI [Quinn et al., 1995] während andere Autoren MSI-Raten von bis zu 25 % beschreiben [Healy et al., 1996b, Tomlinson et al., 1996, Matsumura et al., 1998; Peris et al., 1995].

In der vorliegenden Arbeit konnte ein Divergieren der Häufigkeit der nachgewiesenen Mikrosatelliteninstabilität von Tumor zu Tumor dokumentiert werden. Ein Grund für die unterschiedlichen Mikrosatellitenhäufigkeiten könnte in den ungleichen

Patientenkollektiven liegen. Es wird eine Assoziation des Tumorstadiums mit der Häufigkeit der Mikrosatelliteninstabilität beschrieben [Kroiss et al.,2001].

Es werden auch Divergenzen innerhalb eines Tumors beobachtet. So können in der vorliegenden Arbeit von Mikrosatellitenlocus zu Mikrosatellitenlocus und von Tumorzellnest zu Tumorzellnest unterschiedliche Ausmaße genetischer Instabilität dargestellt werden. Dies betont die starke genetische Heterogenität der untersuchten Tumore. Es liegt nahe, dass eine ausreichende Präzision der Analyse eher bei einer Untersuchung möglichst vieler Mikrosatellitenloci gewährleistet ist [Fujimoto et al., 1999; Morita et al., 1998]. So ist die Häufigkeit der dokumentierten Mikrosatelliteninstabilität abhängig von der Art und der Anzahl der untersuchten Mikrosatellitenloci. Auch von der Art der Probengewinnung hängt die Genauigkeit der Untersuchung und der Grad der nachweisbaren genetischen Instabilität offensichtlich ab. So ergaben sich in der vorliegenden Untersuchung mit kleiner werdender Untersuchungseinheit präzisere Ergebnisse.

Diese Beobachtungen decken sich mit denen anderer Studien [Quinn et al., 1995; Talwalkar et al., 1998]. Die quantitativen Ergebnisse anderer Studien lassen sich jedoch nicht unmittelbar mit denen der vorliegenden Arbeit vergleichen. Nur wenn sowohl die Mikrosatellitenart und -anzahl als auch die Genauigkeit der Mikrodissektion standardisiert sind, lassen sich vergleichbare Studien durchführen. Somit müssen Angaben zu Häufigkeiten von Mikrosatelliteninstabilität und chromosomaler Instabilität verschiedener Studien immer vor dem Hintergrund der verwendeten Mikrosatellitenmarker und der durchgeführten Mikrodissektion diskutiert werden, denn eine höhere Anzahl verwendeter Mikrosatellitenmarker und eine genauere Mikrodissektion ermöglichen den Nachweis eines höheren Maßes genetischer Instabilität.

Auffallend ist die Beobachtung, dass bei den untersuchten Tumoren teilweise gehäuft MSI an einem bestimmten Mikrosatellitenort nachgewiesen werden kann. So zeigt bei Tumor 1/Patient DB der Mikrosatellitenmarker D9S259 in 36 % der untersuchten Tumorareale Mikrosatelliteninstabilität, bei Tumor 2/Patient DB wird MSI am häufigsten bei Mikrosatellitenmarker D9S171 beobachtet (68 % der untersuchten Tumorareale). Matsumura beschreibt bei diesem Mikrosatellitenmarker keine MSI, sondern bei Mikrosatellitenmarker D2S71 (75% der Fälle) [Matsumura et al., 1998]. So findet man von Tumor zu Tumor unterschiedliche chromosomale Regionen, in denen

ein auffallend hohes Maß an instabilen Mikrosatellitenorten vorliegt. Beim Lynch-Syndrom werden solche Regionen ebenfalls beobachtet und als MSI-hot spots bezeichnet [Arzimanoglou et al., 1998].

Welche Prozesse die Mikrosatelliteninstabilität beim malignen Melanom verursachen, ist noch nicht genau bekannt. Teilweise wird ein MMR-Defekt als pathogenetisch relevant angesehen [Peris et al., 1995; Quinn et al., 1995], der unabhängig von der Deletion p15 und p16 auftreten kann und als Bestandteil der frühen Tumorprogression angesehen wird [Matsumura 1998]. Alvino et al. beschreiben in einer von fünf untersuchten Zelllinien Mutationen in den mismatch-repair Genen hMLH1 und hPMS2. Dieser MMR-Defekt ist bei der entsprechenden Zelllinie mit einer hohen Frequenz an Mikrosatelliteninstabilität assoziiert [Alvino et al., 2002].

Die mismatch-repair Gene hMLH1 und hPMS2 sind, neben den mismatch-repair Gene hMSH2 und hMSH6, bekannte mismatch-repair Gene beim Lynch-Syndrom [Arzimanoglou 1998] und entsprechen den zuvor entdeckten Mutatorgenen bei Bakterien [Claij et te Riele, 1999]. Auch beim Lynch-Syndrom findet sich ein spezielles Muster der Mikrosatelliteninstabilität, dessen Erkennen bei der Diagnose des Lynch-Syndroms helfen kann und die Zuordnung zu diesem familiären Krebsyndrom, insbesondere bei Patienten mit einem unvollständigen Kriterienkanon, erleichtern kann [Jass et al., 1995; Muta et al., 1996].

Beim Lynch-Syndrom ist eine Keimbahnmutation eines mismatch-repair Gens ursächlich naheliegend und wurde in fast allen Tumoren von HNPCC-Patienten nachgewiesen [Lothe et al., 1997; Nicolaidis et al., 1994; Arzimanoglou et al., 1998]. Interessanterweise ist die MSI beim sporadischen, nicht erblichen Kolorektalkarzinom nicht mit Mutationen der mismatch-repair Gene, die für das HNPCC identifiziert wurden, assoziiert. Es sind vermutlich andere MMR-Gene für die Mikrosatelliteninstabilität verantwortlich. Denkbar ist aber, ähnlich wie beim malignen Melanom, bei dem ebenfalls Mikrosatelliteninstabilität ohne nachweisbare Mutation der MMR-Gene beobachtet wird, ein alternativer Geneseweg der MSI.

In Malignomen anderer Organsysteme treten die mismatch-repair Gene hMSH2, hMSH6, hMLH1 und hPMS2 kaum auf. Sie scheinen für die erbliche Form des Kolonkarzinoms charakteristisch zu sein [Arzimanoglou et al., 1998]. Somit kann beim HNPCC ein neu diagnostizierter Tumor anhand der mutierten MMR-Gene als

spontanes Ereignis oder als Malignome im Rahmen eines Krebsyndroms eingeordnet werden [Risinger et al., 1996].

Zur besseren Reproduzierbarkeit und zur einfacheren klinischen Anwendung ist man beim Kolorektalkarzinom dazu übergegangen, die Ergebnisse der Mikrosatellitenbestimmung zu quantifizieren. Empfohlen wird zunächst eine einheitliche Untersuchung von fünf Mikrosatelliten als Referenzgröße. Auf fünf Mikrosatelliten getestet, werden die Tumoren dann in MSI-H, MSI-L und MSS kategorisiert: MSI-H bedeutet eine Instabilität von zwei oder mehr der fünf Marker, MSI-L sind Tumoren mit einem instabilen Marker und MSS bedeutet keine MSI (Differenzierung MSI-L und MSS nur bei umfangreichen Studien mit hohen Fallzahlen). 60-70% der Tumorproben entfallen auf MSS (mikrosatellitenstabil), der Rest teilt sich zu gleichen Teilen in MSI-H bzw. MSI-L [Boland et al., 1998]. Einige klinische und pathologische Phänotypen werden mit den MSI-H Tumoren in Verbindung gebracht, etwa 15% der HNPCC-Tumore treffen diese Kategorie. Sie liegen im proximalen Kolon, haben spezielle histologische Merkmale und sind weniger aggressiv. MSI-L und MSS scheinen phänotypisch ähnlich zu sein, es wird eine gesteigerte Resistenz gegen Cytotoxine beobachtet [Boland 1998]. Beim Kolorektalkarzinom können also konkrete diagnostische und prognostische Aussagen an die Ergebnisse der Mikrosatellitenanalyse gekoppelt werden.

In der vorliegenden Arbeit kann eine Unterteilung der Tumorzellareale in MSI-L und MSI-H nicht vorgenommen werden, da die Untersuchung mit relativ niedrigen Fallzahlen nicht auf ein quantitatives Ergebnis ausgerichtet ist. Darüber hinaus müssen - wie eingangs erwähnt - verschiedenen Studien standardisierte Bedingungen zugrunde liegen, um sie vergleichen zu können. Dies gilt sowohl für die Mikrosatellitenart und -anzahl als auch für die Genauigkeit der Mikrodissektion.

Es bleibt unklar, welchen Einfluss die Mikrosatelliteninstabilität auf die Karzinogenese hat. Die stark unterschiedliche Ausprägung der genetischen Instabilität bei verschiedenen Tumoren könnte ein Hinweis sein, dass die Mikrosatelliteninstabilität bei bestimmten Tumoren eine entscheidende, bei anderen Tumoren nur eine untergeordnete Rolle für die Tumorprogression spielt. Denkbar ist die Interpretation, dass die MSI bei Tumoren mit einem hohen Maß an genetischer Instabilität einen möglichen Geneseweg der Tumorentstehung darstellt. So könnte bei Tumor 2/ Patient DB, der durch eine hohe genetische Instabilität mit einer Häufigkeit der MSI von 25 %

ausgezeichnet ist, die Mikrosatelliteninstabilität ein entscheidender Mechanismus der Karzinogenese gewesen sein. Im Vergleich dazu fällt eine niedrige Häufigkeit der MSI bei Tumor 1/ Patient DB auf, der jedoch in 50 % der untersuchten Tumorareale einen Allelverlust zeigte (Tumor 2: 39 % LOH). Für die Progression dieses Tumors wie auch bei den Tumoren Patient CL (10 % MSI, 60 % LOH) und Patient WL (9 % MSI, 45 % LOH) könnte der LOH der für die Karzinogenese bedeutendere Mutationsprozess gewesen sein. Als gesichert gilt, dass der Defekt im MMR-Gen eine geringere Genauigkeit des Replikationsablaufs und konsekutiv eine erhöhte Mutationsrate bewirkt, die häufiger auftretende Alterationen in Tumorsuppressorgenen und Onkogenen hervorruft, ohne dass MMR-Defekte für sich gesehen bereits eine erhöhte Zellproliferation oder eine maligne Entgleisung verursachen [Perucho et al., 1996; Aalton et al., 1993].

Untersuchungen über die spontane Mutationsrate bei normalen menschlichen Zellen haben ergeben, dass zur Ausprägung der Fülle von Mutationen, die zur Krebsentstehung notwendig sind, ein Mutatorphänotyp Voraussetzung ist. Die normale Mutationsrate würde nicht genug genetische Alterationen hervorbringen [Quinn et al., 1995; Loeb, 1991]. So induzieren Mutationen in MMR-Genen Tumorwachstum bei Mäusen [Prolla, 1998]. Trotz dieser Kausalität ist in Tumoren mit MSI eine niedrigere Mutationsfrequenz von Tumorsuppressorgenen und Onkogenen beschrieben, als in Tumoren ohne MSI [Ionov et al., 1993, Thibodeau et al., 1993]. Einige Untersuchungen zeigten sogar einen umgekehrt proportionalen Zusammenhang zwischen MSI und Tumorsuppressorausfall bzw. Onkogenaktivierung [Ionov et al., 1993; Thibodeau et al., 1993]. Diese Tendenz konnte jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden.

Die Mikrosatelliteninstabilität, als besonderes Charakteristikum eines Tumors, scheint mit verschiedenen klinischen Parametern assoziiert zu sein.

Die Korrelation der Art genetischer Instabilität und bestimmter histologischer Merkmale wird kontrovers diskutiert [Arzimanoglou et al., 1998; Caduff et al., 1996]. Während einige Studien keinen nennenswerten Zusammenhang aufzeigen [Caduff et al., 1996; Shinmura et al., 1995], sprechen andere Untersuchungen von signifikanten Korrelationen. So wurde in bestimmten Subspezifitäten aus der Gruppe der Ovarial-, Intestinal-, Magen- und Ösophagealkarzinomen eine deutlich erhöhte MSI-Frequenz entdeckt als in den Hauptgruppen. Im Falle des sporadischen Kolonkarzinoms ist die

Mikrosatelliteninstabilität mit histologischen Eigenschaften wie Entzündungsreaktion im Stroma, muzinöse Komponente und geflechtartiges Wachstumsmuster vergesellschaftet [Risio et al., 1996; Chong et al., 1994].

Darüber hinaus wird eine Korrelation der genetischen Instabilität mit der Tumorlokalisierung beschrieben [Thibodeau et al., 1993; Lothe et al., 1993; Lothe, 1997]. Genetisch instabile Magenkarzinome sind gehäuft im Magenantrum lokalisiert, genetisch instabile Kolonkarzinome finden sich vorzugsweise im oralwärts gelegenen Kolonanteil. [Thibodeau et al., 1993; Lothe et al., 1993; Lothe, 1997]. Des Weiteren sind diese Tumortypen meist wenig differenziert [Ionov et al., 1993; Lothe et al., 1993; Lothe, 1997; Han, 1993]. Eine weitere Gemeinsamkeit liegt in dem häufigen Auftreten von Rundzellinfiltraten bei gesteigerter Immunantwort und in der verhältnismäßig höheren Überlebensrate der Patienten mit genetisch instabilen Tumoren. In der starken Immunantwort und der relativ guten Prognose dieser Patienten könnte ein Zusammenhang liegen [Lothe et al., 1993; Lothe, 1997; Thibodeau et al., 1993; Seruca et al., 1995; Risinger et al., 1993].

Die genaue zeitliche Einordnung der MSI in die Mutationskaskade der Malignome wird kontrovers diskutiert [Arzimanoglou 1998]. Der überwiegende Teil der Studien beschreibt die MSI eher als einen Prozess der frühen Tumorstadien und der prognostisch günstigeren Tumore, errechnet werden längere Überlebensraten bei Patienten mit RER+ positiven Kolorektal- bzw. Magenkarzinom [Lothe, 1997]. Der Nachweis von MSI in präkanzerösen Läsionen unterstützt die These, dass die Mikrosatelliteninstabilität ein Bestandteil der frühen Tumorentwicklung ist und vielleicht eine Bahnung des malignen Wachstums darstellt. Verwiesen wird auf den konsekutiven Anstieg der Mutationsrate mit Befall der onkogenetisch relevanten Gene [Lothe, 1997]. So fand man in 74% der untersuchten dysplastischen Magenpolypen und in 75% der Dickdarmpolypen bei Patienten mit eigenanamnestischem Magen- bzw. Kolonkarzinom, in dysplastischen Tumoren des Magens, beim Barrettsyndrom des Ösophagus und auch bei dysplastischen Nävi Mikrosatelliteninstabilität [Arzimanoglou et al., 1998; Perucho et al., 1996]. Malignome des gleichen Organs weisen dann eine weitere Zunahme der Mikrosatelliteninstabilität auf, entwickelt an deutlich mehr Orten, als ihre Vorläufer. Bei Adenomen und Präkanzerosen beobachtet

man oftmals eine Steigerung der Mikrosatelliteninstabilitätsfrequenz mit zunehmender Tumorgröße [Lothe, 1997].

Es gibt jedoch auch Untersuchungen, die Mikrosatelliteninstabilität als späte genetische Modifikation in der malignen Entartung einer Zelle ansehen. So wurde die Mikrosatelliteninstabilität im Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom sowie im sporadischen Mamakarzinom in späten Wachstumsphasen entdeckt [Chong, 1994; Risio et al., 1996].

Eine therapeutisch relevante Entdeckung beschreibt Tomas Prolla in seiner Arbeit [Prolla, 1998]: Zellen, die MMR-Mutationen aufweisen, zeigen Resistenzen gegen zahlreiche zytotoxische Agentien. Menschliche Zelllinien, die in der Lage sind, die zytotoxischen Wirkungen von N-Methyl-N-Nitro-N-Nitrosoguanidine (MNNG) zu überleben, zeigen überdurchschnittlich häufig Defekte in mismatch-repair Genen [Prolla, 1998]. So erwiesen sich Zelllinien, die entweder eine Mutation im hMLH1 (humane Zellen) oder im MSH2 (Mauszellen) aufwiesen, als MNNG resistent. Vermutlich erkennt das intakte MMR-System die durch Chemotherapeutika modifizierten DNA-Moleküle und leitet einen Zell-Arrest oder Apoptose ein. Offensichtlich besteht ebenso eine Assoziation zwischen MMR-Defekten und Chemotherapieresistenzen gegen Cisplatin und Derivate [Aebi et al., 1996, Liu et al., 1997]. So scheint eine funktionierende, suffiziente chemotherapeutische Bekämpfung des Tumors ein intaktes mismatch-repair System vorauszusetzen [Claij et te Riele, 1999; Karran et Bignami, 1994; Karran et Hampsom, 1996]. Hier könnte ein Grund für den unterschiedlichen Verlauf von vergleichbar eingestuft und gleich behandelten Melanompatienten liegen [Takata et al., 2000].

Dies hat Konsequenzen für die Therapie. Durch die Zytotoxinresistenz können MMR-defekte Zellen selektioniert werden. Dies könnte zu einer rezidivierenden Tumorentwicklung oder zu einer verzögerten Tumorelimination führen [Prolla, 1998]. Durch eine Analyse des MMR-Status vor einer Therapie könnten solche Chemotherapeutika a priori ausgeschlossen werden [Prolla, 1998].

Ebenfalls interessant ist eine signifikant höhere Zellüberlebensrate der MMR-defekten Zellen nach ionisierender Bestrahlung [Prolla, 1998]. Vermutlich erkennt das defekte MMR-System die durch die Bestrahlung modifizierten DNA-Moleküle nicht mehr und kann keinen Zell-Arrest oder keine Apoptose einleiten.

7 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Tumore von neun Patienten molekularbiologisch analysiert. Nach erfolgter Mikrodissektion standen 92 DNA-Proben zur Verfügung, die mittels Mikrosatelliten-PCR und anschließender TG-SSCP-Analyse genetisch untersucht wurden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Primärtumore des malignen Melanoms phänotypisch und genotypisch eine ausgesprochene Heterogenität aufweisen können und sowohl Mikrosatelliteninstabilität als auch chromosomale Instabilität zeigen können. Es wird deutlich, dass nur durch Analyse multipler mikrodissezierter Areale eines Tumors ein realistischer Eindruck über die genetische Heterogenität und über den Instabilitätsmechanismus des Tumors geliefert werden kann.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit etablierte Methodik der Mikrodissektion mit anschließender Mikrosatelliten-PCR und TG-SSCP-Analyse erwies sich als gut geeignet für Untersuchungen dieser Zielsetzung. Die verwendete Methodik ist jedoch, insbesondere aufgrund einer fehlenden Standardisierung und wegen des hohen manuellen Aufwands, für Routineanwendungen wenig geeignet.

Zahlreiche Untersuchungen legen nahe, dass beide Faktoren, die Art der genetischen Heterogenität und der genetischen Instabilität, für die Prognose und therapeutische Beeinflussbarkeit von Tumoren von erheblicher Bedeutung sein können. Dies zu verifizieren setzt voraus, weitere Studien unter standardisierten Bedingungen zur Mikrosatellitenanalyse von primären mikrodissezierten Tumoren durchzuführen.

8 Anhang

8.1 Literaturverzeichnis

- 1) Aaltonen LA, Peltomaki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkanen L, Mecklin JP, Jarvinen H, Powell SM, Jen J, Hamilton SR (1993) Clues to the pathogenesis of a familial colorectal cancer. *Science* 260:812-816
- 2) Ackerman AB, Schreiner AM (1983) How wide and deep is wide and deep enough? A critique of surgical practice in excision of primary cutaneous malignant melanoma. *Human Pathol* 14:743-744
- 3) Aebi S, Kurdi-Haidar B, Gordon R, Cenni B, Zheng H, Fink D, Christen RD, Boland CR, Koi M, Fishel R, Howell SB (1996) Loss of DNA mismatch repair in acquired resistance to cisplatin. *Cancer Res* 56:3087-3090
- 4) Alvino E, Marra G, Pagani E, Falcinelli S, Pepponi R, Perrera C, Haider R, Castiglia D, Ferranti G, Bonmassar E, Jiricny J, Zambruno G, D'Atri S (2002) High-frequency microsatellite instability is associated with defective DNA mismatch repair in human melanoma. *J Invest Dermatol* 118(1):79-86
- 5) Arzimanoglou I, Gilbert F, Barber HRK (1998) Microsatellite instability in human solid tumors. *Cancer* 82:1808-1820
- 6) Bale SJ, Dracopoli NC, Tucker MA et al. (1989) Mapping the gene for hereditary cutaneous malignant melanoma-dysplastic nevus to chromosome 1p. *N Engl J Med* 320:1367-1372
- 7) Bandera CA, Takahashi H, Behbakht K, Liu PC, LiVolsi VA, Benjamin I, Morgan MA, King SA, Rubin SC, Boyd J (1997) Deletion mapping of two potential chromosome 14 tumor suppressor gene loci in ovarian carcinoma. *Cancer Res* 57:513-515
- 8) Bastian BC, Kashani-Sabet M, Hamm H, Godfrey T, Moore DH 2nd, Brocker EB, LeBoit PE, Pinkel D (2000) Gene amplifications characterize acral melanoma and permit the detection of occult tumor cells in the surrounding skin. *Cancer Res* 60(7):1968-1973
- 9) Bellet RE, Vaisman I, Mastrangelo MJ, Lustbader E (1977) Multiple primary malignancies in patients with cutaneous melanoma. *Cancer* 40:1974-1981
- 10) Beral V, Evans S, Shaw H, Milton G (1983) Cutaneous factors related to the risk of malignant melanoma. *Br J Dermatol* 109:165-172

- 11) Birindelli S, Tragni G, Bartoli C, Ranzani GN, Rilke F, Pierotti MA, Pilotti S (2000) Detection of microsatellite alterations in the spectrum of melanocytic nevi in patients with or without individual or family history of melanoma. *Int J Cancer* 86:255-261
- 12) Bodenham DC (1968) A study of 650 observed malignant melanomas in the south-west region. *Ann R Coll Surg Engl* 43:218-239
- 13) Böni R, Vortmeyer AO, Burg G, Hofbauer G, Zhuang Z (1998a) The PTEN tumor suppressor gene and malignant melanoma. *Melanoma Res* 8:300-302
- 14) Böni R, Matt D, Vortmeyer AO, Burg G, Zhuang Z (1998b) Chromosomal allele loss in primary cutaneous melanoma is heterogenous and correlates with proliferation. *J Invest Dermatol* 110:215-217
- 15) Boland CR, Thibodeau N, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltzer SJ, Rodriguez-Bigas MA, Fodde R, Ranzani GN, Srivastava S (1998) A national cancer institute workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 58:5248-5257
- 16) Brown CK, Kirkwood JM (2001) Targeted therapy for malignant melanoma. *Curr Oncol Rep* 3(4):344-352
- 17) Caduff RF, Johnston CM, Svodova-Newman SM, Poy EL, Merajver SD, Frank TS (1996) Clinical and pathological significance of microsatellite instability in sporadic endometrial carcinoma. *Am J Pathol* 148:5:1671-1678
- 18) Cannon-Albright LA, Goldgar DE, Meyer LJ, Anderson DE, Fountain JW, Hegi ME, Wiseman RW, Petty EM, Bale AE (1992) Assignment of a locus for familial melanoma, MLM, to chromosome 9p13-p22. *Science* 258:1148-1152
- 19) Caspersson T, Zech L, Johansson C, Modest EJ (1970) Identification of human chromosomes by DNA-binding fluorescent agents. *Chromosoma* 30:215-227
- 20) Cavenee WK, Dryja TP, Phillips RA, Benedict WF, Godbout R, Gallie BL, Murphree AL, Strong LC, White RL (1983) Expression of recessive alleles by chromosomal mechanism in retinoblastoma. *Nature* 305:779-784
- 21) Chong J, Fukuyama M, Hayashi Y, Takizawa T, Koike M, Konish M (1994) Microsatellite instability in the progression of gastric carcinoma. *Cancer Res* 54:4595-4597

- 22) Claij N, te Riele H (1999) Microsatellite instability in human cancer: A prognostic marker for chemotherapy? *Exp Cell Res* 246:1-10
- 23) Clark WH Jr, Ainsworth AM, Bernardino EA, Yang C-H, Mihm MC, Reed RJ (1975) The developmental biology of primary human malignant melanomas. *Semin Oncol* 2:83-103
- 24) Clark WH Jr, Reimer RR, Greene M, Ainsworth AM, Mastrangelo MJ (1978) Origin of familial malignant melanomas from heritable melanocytic lesions. 'The B-K mole syndrome. *Arch Dermatol* 114:732-738
- 25) Coats J (1885) On a case of multiple melanotic sarcoma. *Glasgow Med J* 24:92
- 26) Coleman WP III, Loria PR, Reed RJ, Kremenz ET (1980) Acral lentiginous melanoma. *Arch Dermatol* 116:773-776
- 27) Cowan J, Halaban R, Franke U (1988) Cytogenetic analysis of melanocytes from premalignant naevi and melanomas. *J Natl Cancer Inst* 80:1159-1164
- 28) Davis NC (1980) William Norris, M.D.: a pioneer in the study of melanoma. *Med J Aust* 1:52-54
- 29) Dib C, Faure S, Fizames C, Samson D, Drouot N, Vignal A, Millasseau P, Marc S, Hazan J, Seboun E, Lathrop M, Gyapay G, Morissette J, Weissenbach J (1996) A comprehensive genetic map of the human genome based on 5264 microsatellites. *Nature* 380:152-154
- 30) Dracopoli NC, Alhadeff B, Houghton AN, Old LJ (1987) Loss of heterozygosity at autosomal and X-linked loci during tumor progression in a patient with melanoma. *Cancer Res* 47:3995-4000
- 31) Fearon ER, Vogelstein BA (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61:759-767
- 32) Fidler IJ (1996) Critical determinants of melanoma metastasis. *J Invest Dermatol* 1:203-208
- 33) Flores JF, Walder GJ, Glendening M, Haluska FG, Castresana JS, Rubio MP, Pastorfide GC, Boyer LA, Kao WH, Bulyk ML, Barnhill RL, Hayward NK, Housman DE, Fountain JW (1996) Loss of the p16 and p15 genes, as well as neighboring p21 markers, in sporadic melanoma. *Cancer Res* 56:5023-5032
- 34) Fountain JW, Karayiourgou M, Ernsthoff MS, Kirkwood JM, Bouchard B, Houghton AN, Lahti J (1992) Homozygous deletions of human chromosome 9p21 in melanoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:10557-10561

- 35) Fujimoto A, Morita R, Hatta N, Takehara K, Takata M (1999) p16 ink4A inactivation is not frequent in uncultured sporadic primary cutaneous melanoma. *Oncogene* 18:2527-2532
- 36) Funk JO, Schiller PI, Barrett MT, Wong DJ, Kind P, Sander CA (1998) p16INK4a expression is frequently decreased and associated with 9p21 loss of heterozygosity in sporadic melanoma. *J Cutan Pathol* 25:291-296
- 37) Garbe C, Büttner P, Bertz J et al. (1990) Die Prognose des primären malignen Melanoms - eine multizentrische Studie an 5093 Patienten. In: Orfanos CE, Garbe C (Hrsg). *Das maligne Melanom der Haut*. Zuckschwerdt, München, S. 41-59
- 38) Garbe C, Blum A (2001) Epidemiology of cutaneous melanoma in Germany and worldwide. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 14:280-290
- 39) Glendening JM, Flores JF, Walker GJ, Stone S, Albino AP, Fountain JW (1995) Homozygous loss of the p15 (ink4B) gene and not the p16 (INK4A) gene during tumor progression in a sporadic melanoma patient. *Cancer Res* 55:5531-5535
- 40) Giercksky HE, Thorstensen L, Qvist H, Nesland JM, Lothe RA (1997) Comparison of genetic changes in frozen biopsies and microdissected archival material from the same colorectal liver metastases. *Diagn Mol Pathol* 6:318-325
- 41) Goldstein AM, Dracopoli N, Ho E, Fraser M, Kearns K, Bale S, McBride O, Clark W Jr, Tucker M (1993) Further evidence for a locus for cutaneous malignant melanoma-dysplastic nevus (CMM/DN) on chromosome 1p, and evidence for a genetic heterogeneity. *Am J Hum Genet* 52:537-550
- 42) Goldstein AM, Dracopoli NC, Engelstein M, Fraser MC, Clark WJ, Tucker MA (1994) Linkage of cutaneous malignant melanoma/dysplastic nevi to chromosome 9p, and evidence for genetic heterogeneity. *Am J Hum Genet* 54:489-496
- 43) Goldstein AM, Tucker MA. (1997) Screening for CDKN2A mutations in hereditary melanoma. *J Natl Cancer Inst* 89:676-678
- 44) Gonzalez-Zulueta M, Bender CM, Yang AS, Nguyen T, Beart RW, Van Totnout JM, Jones PA (1995) Methylation of the 5 CpG island of the p16/CDKN2 tumor suppressor gene in normal and transformed human tissues correlates with gene silencing. *Cancer Res* 55:4531-4535

- 45) Greene MH, Goldin LR, Clark Jr WH, Lovrien E, Kraemer KH, Trucker MA, Elder DE, Fraser MC, Rowe S (1983) Familial cutaneous malignant melanoma: autosomal dominant trait possibly linked to the rh locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:6071-6075
- 46) Greene MH (1998) The genetics of hereditary melanoma and nevi. *Cancer Sup* 86:2464-2477
- 47) Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Lui Q, Frye C, Eeles R, Orlow I, Lacombe L, Ponce-Castaneda V, Lianes P, Latres E, Skolnick M, Cordon-Cardo C, Kamb A (1995) Genetic evidence in melanoma and bladder cancers that p16 and p53 function in separate pathways of tumor progression. *Am J Pathol* 146:1199-1206
- 48) Haffner AC, Garbe C, Buttner PO, Orfanos CE, Rassner G, Burg G (1992) The prognosis of primary and metastasizing melanoma: an evaluation of the TNM classification in 2495 patients and proposals for their revision. *Br J Cancer* 66:856-861
- 49) Han HJ, Yanagisawa A, Kato Y, Park JG, Nakamura Y (1993) Genetic instability in pancreatic cancer and poorly differentiated type of gastric cancer. *Cancer Res* 53:5087-5089
- 50) Handley WS (1907) The pathology of melanotic growths in relation to their operative treatment. *Lancet* 1:927, 996
- 51) Hannon GJ, Beach D (1994) p15INK4B is a potential effector of TGF- β -induced cell cycle arrest. *Nature* 371:257-261
- 52) Happle R (1999) Loss of heterozygosity in human skin. *J Am Acad Dermatol* 41:143-161
- 53) Healy E, Rehman I, Angus B, Rees JL (1995) Loss of heterozygosity in sporadic primary cutaneous melanoma. *Genes Chromosomes Cancer* 12:152-156
- 54) Healy E, Sikkink S, Rees JL (1996a) Frequent mutation of p16 (INK4A) in sporadic melanoma. *J Invest Dermatol* 107:318-321
- 55) Healy E, Belgaid CE, Takata M, Vahlquist A, Rehman I, Rigby H, Rees JL (1996b) Allelotypes of primary cutaneous melanoma and benign melanocytic nevi. *Cancer Res* 56:589-593
- 56) Healy E, Belgaid CE, Takata M, Harrison D, Zhu NW, Burd DA, Rigby HS, Matthews JN, Rees JL (1998) Prognostic significance of allelic losses in primary melanoma. *Oncogene* 16:2213-2218

- 57) Herbst RA, Larson A, Weiss J, Cavenee WK, Hampton GM, Arden KC (1995) A defined region of loss of heterozygosity at 11q23 in cutaneous malignant melanoma progression. *Cancer Res* 55:2494-2496
- 58) Herbst RA, Weiss J, Ehnis A, Cavenee WK, Arden KC (1994) Loss of heterozygosity for 10q22-10qter in malignant melanoma progression. *Cancer Res* 54:3111-3114
- 59) Holland EA, Beaton SC, Becker TM, Grulet OMC, Peters BA, Rizos H, Kefford RF, Mann GJ (1995) Analysis of the p16 gene, CDKN2, in 17 Australian melanoma kindreds. *Oncogene* 11:2289-2294
- 60) Hussussian CJ, Struewing JP, Goldstein AM, Higgins PAT, Ally DS, Sheahan MD, Clark WN Jr, Tucker MA, Dracopoli NC (1994) Germline p16 mutations in familial melanoma. *Nat Genet* 8:15-21
- 61) Iacopetta B, Hamelin R (1998) Rapid and non isotopic SSCP-based analysis of the BAT-26 mononucleotide repeat for identification of the replication error phenotype in human cancers. *Hum Mutat* 12(5):355-360
- 62) Indsto JO, Holland EA, Kefford RF, Mann GJ (1998) 10q deletions in metastatic cutaneous melanoma. *Cancer Genet Cytogenet* 100:68-71
- 63) Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shiabata S, Perucho M (1993) Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 363:558-561
- 64) Jass JR, Cottier DS, Jeevaratnam P, Pokos V, Holdaway KM, Bowden ML et al. (1995) Diagnostic use of microsatellite instability in hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Lancet* 346:1200-1201
- 65) Jen J, Harper JW, Binger SH, Bigner DD, Papadopoulos N, Markowitz S, Willson JK, Kinzler KW, Vogelstein B (1994) Deletion of p16 and p15 genes in brain tumors. *Cancer Res* 54:6353-6358
- 66) Jin W, Xu X, Yang T, Hua Z (2000) P53 mutation, EGFR gene amplification and loss of heterozygosity on chromosome 10, 17 p in human gliomas. *Chin Med J* 113(7):662-666
- 67) Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Lui Q, Harshman K, Tavtigian SV, Stockert E, Day RS, Johnson BE, Skolnick MH (1994) A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 264:436-440
- 68) Kamb A (1996) Human Melanoma Genetics. *J Invest Dermatol* 1:177-182

- 69) Karg CH, Garbe C, Orfanos CE (1990) Chemotherapie des malignen Melanoms-Gegenwärtiger Stand. *Hautarzt* 41:56-65
- 70) Karran P, Bignami M (1994) DNA damage tolerance, mismatch repair and genome instability. *Bio Essays* 16:833-839
- 71) Karran P, Hampson R (1996) Genomic instability and tolerance to alkylating agents. *Cancer Surv* 28:69-85
- 72) Kirkwood JM, Ibrahim JG, Sondak VK, Ernstoff MS, Ross M (2002) Interferon alfa-2a for melanoma metastases. *Lancet* 359(9310):978-979
- 73) Knudson AG Jr (1971) Mutation and Cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 68:820-823
- 74) Kraehn G, Scharl M, Peter R (1994) Human malignant melanoma: a genetic disease? *Cancer* 75:1228-1237
- 75) Kremenz ET, Coleman WP III, Loria PR, Reed RJ (1980) Acral lentiginous melanoma. *Arch Dermatol* 116:773-776
- 76) Kroiss MM, Vogt TMM, Schlegel J, Landthaler M, Stolz W (2001) Microsatellite instability in malignant melanoma. *Acta Derm Venerol* 81:242-245
- 77) Laennec RTH (1812) Sur les melanosis. *Bulletins de la Faculté de Médecine de Paris* 1:2 ff
- 78) Lee JY, Dong SM, Shin MS, Kim SY, Lee SH, Kang SJ, Lee JD, Kim CS, Kim SH, Yoo NJ (1997) Genetic alterations of p16INK4a and p53 genes in sporadic dysplastic nevus. *Biochem Biophys Res Commun*, 237:667-672
- 79) Li ZH, Aaltonen LA, Shu Q, Srivastava G, Grizzle WE, Shibata D (1996) Effects of mutation and growth rates on patterns of microsatellite instability. *Am J Pathol* 148:1757-1761
- 80) Liu B, Parsons R, Papadopoulos N, Nicolaides NC, Lynch HAT, Watson P, Jass LR, Dunlop M, Wyllie A, Peltomaki P, de la Chapelle A, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW (1996) Analysis of mismatch repair genes in hereditary non polyposis colorectal cancer patients. *Nat Med* 2:169-174
- 81) Liu L, Markowitz S, Gerson SL (1996) Mismatch repair mutations override alkyltransferase in conferring resistance to temozolomide but not to 1,3-bis(2-chloroethyl) nitrosourea. *Cancer Res* 56:5375-5379
- 82) Loeb LA (1991) Mutator phenotyp may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res* 51:3075-3079

- 83) Loeb LA (1994) Microsatellite instability: marker of a mutator phenotype in cancer. *Cancer Res* 54:5059-5063
- 84) Loeb KR, Loeb LA (2000) Significance of multiple mutations in cancer. *Carcinogenesis* 21:379-385
- 85) Lothe RA, Peltomaki P, Meling GI, Aaltonen LA, Nystrom-Lahti M, Pylkkanen L, Heimdal K, Andersen TI, Moller P, Rognum TO (1993) Genomic instability in colorectal cancer: relationship to clinicopathological variables and family history. *Cancer Res* 53:5849-5852
- 86) Lothe RA (1997) Microsatellite instability in human solid tumors. *Mol Med Today* 3:61-68
- 87) Lynch HT, Smyrk TC, Watson P, Lanspa SJ, Lynch JF, Cavalieri RJ, Bolland CR (1993) Genetics, natural history, tumor spectrum and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: an updated review. *Gastroenterology* 104:1535-1549
- 88) Maelandsmo GM, Florenes VA, Hovig E, Oyjord T, Engebraaten O, Holm R, Borresen AL, Fodstad O (1996) Involvement of the pRB/p16/cdk4/cyclin D1 pathway in the tumorigenesis of sporadic malignant melanoma. *Br J Cancer* 73:909-916
- 89) Matsumura Y, Nishigori C, Yagi T, Imamura S, Takebe H (1998) Mutations of p16 and p15 tumor suppressor genes and replication errors contribute independently to the pathogenesis of sporadic malignant melanoma. *Arch Dermatol Res* 290:175-180
- 90) Mc Govern VJ (1972) Growth patterns, multiplicity and regression. In: McCarthy WH (Hrsg). *Melanoma and Skin Cancer*. Blight, Sydney, S 95 ff
- 91) Merlo A, Herman JG, Mao L, Lee DJ, Gabrielson E, Burger PC, Baylin SB, Sidransky D (1995) 5CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumor suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat Med* 1:686-692
- 92) Miyagawa K (1998) Genetic instability and cancer. *Int J Haematol* 67:3-14
- 93) Morita R, Fujimoto A, Hatta N, Takehara K, Takata M (1999) Comparison of genetic profiles between primary melanomas and their metastases reveals genetic alterations and clonal evolution during progression. *J Invest Dermatol* 111:919-924

- 94) Morse H, Gonzalez R, Moore G, Robinson W (1992) Preferential chromosome 11q and 17q aberrations in short term cultures of metastatic melanoma in resections from human brain. *Cancer Genet Cytogenet* 64:118-126
- 95) Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155:335-350
- 96) Murken J, Cleve H (1996) *Humangenetik*. Enke-Verlag
- 97) Muta H, Nogushi M, Perucho M, Ushio K, Sugihara K, Orchiari A (1996) Clinical implications of microsatellite instability in colorectal cancers. *Cancer* 77:265-270
- 98) Naidoo R, Chetty R (1998) The application of microsatellites in molecular pathology. *Pathol Onco Res* 4:310-315
- 99) Nakayama T, Taback B, Nguyen DC, Chi DC, Morton DL, Fujiwara Y, Hoon DSB (2000) Clinical significance of circulating DNA microsatellite markers in plasma of melanoma patients. *Ann N Y Acad Sci* 906:87-98
- 100) Nestle FO, Burg G, Dummer R (1999) New perspectives on immunobiology and immuno-therapy of melanoma. *Immunol Today* 20:5-7
- 101) Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, Wei YF, Carter KC, Ruben SM, Rosen CA, Haseltine WA, Fleischmann RD, Fraser C (1994) Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature* 371:75-80
- 102) Nobori T, Miura K, Wu DJ, Lois A, Takabayashi K, Carson DA (1994) Deletions of the cyclin dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* 368:753-756
- 103) Nowell, PC (1976) The clonal evolution of tumor-cell populations. *Science* 194:23-28
- 104) Ohta M, Nagai H, Simizu M, Rasio D, Berd D, Mastrangelo M, Singh AD, Shields JA, Shields CL, Croce CM, Huebner K (1994) Rarity of somatic and germline mutations of the cyclin-dependent kinase 4 inhibitor gene, CDK4I, in melanoma. *Cancer Res* 54:5269-5272
- 105) Pack S, Böni R, Vortmeyer AO, Zhuang Z. (1998) Detection of gene deletion in single metastatic tumor cells in exzision margin of primary cutaneous melanoma by fluorescent in-situ hybridisation. *J Natl Cancer* 90:782-783
- 106) Parmiter A, Balaban G, Clark W Jr, Nowell P (1988) Possible involvement of the chromosomal region 10q24-q26 in early stages of melanocytic neoplasia. *Cancer Genet Cytogenet* 30:313-317

- 107) Papadopoulos N, Nicolaides NC, Wei YF, Ruben SM, Carter KC, Rosen CA, Haseltine WA, Fleischmann RD, Fraser CM, Adams MD (1994) Mutations of a mutL homolog in hereditary colon cancer. *Science* 18:1625-1629
- 108) Park WS, Vortmeyer AO, Pack S, Duray PH, Boni R, Guerami AA, Emmert-Buck MR, Liotta LA, Zhuang Z (1998) Allelic deletion at chromosome 9p21(p16) and 17p13(p53) in microdissected sporadic dysplastic nevus. *Hum Pathol* 29:127-130
- 109) Parsons R, Li GM, Longley MJ, Fang WH, Papadopoulos N, Jen J, de la Chapelle A, Kinzler KW, Vogelstein B, Modrich P (1993) Hypermutability and mismatch repair deficiency in RER+ tumour cells. *Cell* 75:1227-1236
- 110) Parsons R, Myeroff LL, Liu B, Willson JK, Markowitz SD, Kinzler KW, Vogelstein B (1995) Microsatellite instability and mutations of the transforming growth factor β type ii receptor gene in colorectal cancer, *Cancer Res.* 55:5548-5550
- 111) Pathak S, Staroselsky AN, Fiedler IJ (1991) Specific chromosomal defects associated with metastatic potential in K-1735 melanoma clones. Involvement of chromosomes 4 and 14. *Cancer Genet Cytogenet* 56:209-221
- 112) Perucho M (1996) Microsatellite instability: the mutator that mutates the other mutator. *Nat Med* 2:630-631
- 113) Peris K, Keller G, Chimenti S, Amantea A, Kerl H, Hofler H (1995) Microsatellite instability and loss of heterozygosity in melanoma. *J Invest Dermatol* 105:625-628
- 114) Poetsch M, Dittberner T, Woenckhaus C (2001) PTEN/MMAC1 in malignant melanoma and its importance for tumor progression. *Cancer Genet Cytogenet* 125(1):21-26
- 115) Prolla TA (1998) DNA mismatch repair and cancer. *Curr Opin Cell Biol* 10:311-316
- 116) Quinn AG, Healy E, Rehman I, Sikking S, Rees JL (1995) Microsatellite instability in human non-melanoma and melanoma skin cancer. *J Invest Dermatol* 104:309-312
- 117) Reed JA, Loganzo F Jr, Shea CR, Walker GJ, Shiel HJ, Fountain JW (1995) Loss of expression of the p16/cyclin-dependent kinase inhibitor 2 tumor suppressor gene in melanocytic lesions correlates with invasive stage of tumor progression. *Cancer Res* 55:2713-2718

- 118) Rees JL, Healy E (1996) Molecular genetic approaches to non-melanoma and melanoma skin cancers. *Clin Exp Dermatol* 21:253-263
- 119) Richmond A, Fine R, Murray D, Lawson D, Priest J (1986) Growth factor and cytogenetic abnormalities on cultured nevi and malignant melanomas. *J Invest Dermatol* 86:295-302.
- 120) Risinger JI, Berchuck A, Kohler MF, Watson P, Lynch HT, Boyd J (1993) Genetic instability of microsatellites in endometrial carcinoma *Cancer Res* 53:5100-5103
- 121) Risio M, Reato G, Francia di Celle P, Fizzotti M, Rossini FP, Foa R. (1996) Microsatellite instability is associated with the histological features of the tumor in nonfamilial colorectal cancer. *Cancer Res* 56:5470-5474
- 122) Rubben A, Traidl C, Baron JM, Großendorf-Conen EI (1995) Evaluation of non-radioactive temperature gradient SSCP-analysis and of temperature gradient gel electrophoresis for the detection of HPV 6-variants in condylomata acuminata and Buschke-Loewenstein tumours. *Eur J Epidemiol* 11:501-506
- 123) Rubben A, Babilas P, Baron JM, Hofheinz A, Neis M, Sels F, Sporkert M (2000) Analysis of tumor cell evolution in melanoma: evidence of mutational and selective pressure for loss of p16 (CDKN2) and for microsatellite instability. *J Invest Dermatol* 114:14-20
- 124) Saida T (2001) Recent advances in melanoma research. *J Dermatol Sci* 26(1):1-13
- 125) Serrano M, Hannon GJ, Beach D (1993) A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclic D/CDK4. *Nature* 366:704-707
- 126) Seruca R, Santos NR, David L, Constancia M, Barroca H, Carneiro F, Seixas M, Peltomaki P, Lothe R, Sobrinho-Simoes M (1995) Sporadic gastric carcinomas with microsatellite instability display a particular clinicopathologic profile. *Int J Cancer* 64:32-36
- 127) Shibata D, Hawes D, Li ZH, Hernandez AM, Spruck CH, Nichols PW (1992) Specific genetic analysis of microscopic tissue after selective ultraviolet radiation fractionation and the polymerase chain reaction. *Am J Pathol* 141:539-543
- 128) Shinmura K, Sugimura H, Naito Y, Shields PG, Kino I (1995) Frequent co-occurrence of mutator phenotype in synchronous, independent multiple cancers of stomach. *Carcinogenesis* 16:2989-2993

- 129) Sieben NL, ter Haar NT, Cornelisse CJ, Fleuren GJ, Cleton-Jansen AM (2000) PCR artifacts in LOH and MSI analysis of microdissected tumor cells. *Hum Pathol* 31(11):1414-1419
- 130) Smeds J, Kumar R, Rozell BL, Hemminki K (2000) Increased frequency of LOH on chromosome 9 in sporadic primary melanomas is associated with increased patient age at diagnosis. *Mutagenesis* 15:257-260
- 131) Smith JL Jr, Stehlin JS Jr (1965) Spontaneous regression of primary malignant melanomas with regional metastases. *Cancer* 18:1399-1415
- 132) Snow H (1892) Melanotic cancerous disease. *Lancet* 2:872
- 133) Sondergaard K, Olsen G (1980) Malignant melanoma of the foot. A clinicopathological study of 125 primary cutaneous malignant melanomas. *Acta Pathol Microbiol Scand [A]* 88:275-283
- 134) Southern E (1979) Gel electrophoresis of restriction fragments. *Methods Enzymol* 68:152-176
- 135) Stone S, Dayananth P, Jiang P, Weaver-Feldhaus JM, Tavtigian SV, Cannon-Albright L, Kamb A (1995) Genomic structure, expression and mutational analysis of the p15 gene. *Oncogene* 11:987-991
- 136) Tada K, Shiraishi S, Kamiryo T, Nakamura H, Hirano H, Kuratsu J, Kochi M, Saya H, Ushio Y (2001) Analysis of loss of heterozygosity on chromosome 10 in patients with malignant astrocytic tumors: correlation with patient age and survival. *J Neurosurg* 95(4):651-659
- 137) Takata M, Morita R, Takehara K (2000) Clonal heterogeneity in sporadic melanomas as revealed by loss-of-heterozygosity analysis. *Int J Cancer* 85:492-497
- 138) Talve L, Sauroja I, Collan Y, Punnonen K, Ekfors T (1997) Loss of expression of the p16 INK4/CDKN2 gene in cutaneous malignant melanoma correlates with tumor cell proliferation and invasive stage. *Int J Cancer* 74:255-259
- 139) Talwalkar VR, Schreiner M, Hedges LK, Butler MG, Schwartz HS (1998) Microsatellite instability in malignant melanoma. *Cancer Genet Cytogenet* 15:111-114
- 140) Taylor A, Gore M (1995) Malignant melanoma. *Treatment of cancer*, Chapman & Hall
- 141) Thibodeau SN, Bren G, Schaid D (1993) Microsatellite instability in cancer of the proximal colon *Science* 260:816-819

- 142) Tollenaar RA, Bonsing BA, Kuipers-Dijkshoorn NJ, Hermans J, van de Velde CJ, Cornelisse CJ, Fleuren GJ (1997) Evidence of clonal divergence in colorectal carcinoma. *Cancer* 79(7):1304-1314
- 143) Tomlinson I, Gammak A, Strickland J, Mann G, MacKie R, Kefford R, McGee J (1993) Loss of heterozygosity in malignant melanoma at loci on chromosomes 11 and 17 implicated in the pathogenesis of other cancers. *Genes Chromosomes Cancer* 7:169-172
- 144) Tomlinson IP, Beck NE, Bodmer WF (1996) Allele loss on chromosome 11q and microsatellite instability in malignant melanoma. *Eur J Cancer* 32A:1797-1802
- 145) Trent JM, Meyskens FL, Salmon SE, Ryschon K, Leong SP, Davis JR, McGee DL (1990) Relations of cytogenetic abnormalities and clinical outcome in metastatic melanoma. *N Engl J Med* 322:1508-1511
- 146) Turbett GR, Barnett TC, Dillon EK, Sellner LN (1996) Single-tube protocol for the extraction of DNA or RNA from paraffin-embedded tissues using a starch-based adhesive. *Biotechniques* 20(5):846-853
- 147) Vogelstein B, Fearon ER (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61:759-767
- 148) Vogelstein B, Kinzer KW (1993) The multistep nature of cancer. *Trends Genet* 9:138-141
- 149) Walker GJ, Palmer JM, Walters MK, Hayward NK (1995) A genetic model of melanoma tumorigenesis based on allelic losses. *Genes Chromosomes Cancer* 12:134-141
- 150) Wallace DC, Exton LA, McLeod GRC (1971) Genetic factor in malignant melanoma. *Cancer* 27:1262-1266
- 151) Weber JL, May PE (1989) Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet* 44:388-396
- 152) Weiss J, Heine M, Arden KC, Korner B, Pilch H, Herbst RA, Jung EG (1995) Mutation and expression of p53 in malignant melanomas. *Recent Results Cancer Res* 139:137-154
- 153) Weiss J, Cavenee WK, Herbst RA, Jung EG, Arden KC (1993) Point mutations and allelic loss in the TP53 locus of cutaneous malignant melanomas. *Arch Dermatol Res* 286:417-419

-
- 154) Weiss MM, Hermsen MA, Meijer GA, van Grieken NC, Baak JP, Kuipers EJ, van Diest PJ (1999) Comparative genomic hybridisation. *Mol Pathol* 52(5):243-251
- 155) Welch DR, Chen P, Miele ME, McGary CT, Bower JM, Stanbridge EJ, Weissman BE (1994) Microcell-mediated transfer of chromosome 6 into metastatic human C8161 melanoma cells suppresses metastasis but not inhibit tumorigenicity. *Oncogene* 9:255-262

8.2 Abkürzungen

Abb	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Komplex
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloblastische Leukämie
ALM	Akral-lentiginöses Melanom
AMM	Amelanotisches malignes Melanom
AP	Alkalische Phosphatase
APC	Adenomatöse Polyposis Coli
bp	Basenpaare
bspw	beispielsweise
Ca	Carzinom
Chr	Chromosom
CISS	Chromosomen-in situ-Suppressions-(Hybridisierung)
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
DNA	Desoxyribonucleinsäure (Desoxyribonucleinsäure)
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
Fa	Firma
FAMMM	Familial Atypical Multiple Mole and Melanoma (Syndrom) (Naevusdysplasie-Syndrom)
FISH	Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung
g	Gramm
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
H₂O	Destilliertes Wasser
HE	Hämatoxylin-Eosin
HNPCC	Hereditäres nichtpolypöses Colorectalcarzinom
l	Liter
LINE	Long Interspersed Nuclear Sequences

Lj	Lebensjahr
LMM	Lentigo-maligna-Melanom
LOH	Loss of Heterocycosity
mA	Milliampere
MEN	Multiple endokrine Neoplasie
ml	Milliliter
min	Minute
Mg	Magnesium
MgCl	Magnesiumchlorid
MMR	Mismatch Repair
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NM	Noduläres Melanom
NF	Neurofibromatose
NZN	Naevuszellnaevus
OT	Objektträger
PBS	Phosphat-Buffered-Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase Kettenreaktion)
PDGF	Platelet Derived Growth Factor (Wachstumsfaktor, von Thrombozyten gebildet)
RB	Retinoblastom
RFLP	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
RT	Raumtemperatur
SINE	Short Interspersed Nuclear Sequences
SSCP	Single-Strand-Conformation-Polymorphism
SSM	Superficial-spreading-Melanom
Tab	Tabelle
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethyendiamin
TGGE	Temperaturgradienten-Gelelektrophorese

TG-SSCP	Temperaturgradienten-SSCP
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
U	Unit (Enzymeinheit)
UV	Ultraviolett
VNTR	Variable Number Tandem Repeat
μl	Mikroliter
μg	Mikrogramm

8.3 Danksagung

Ich darf Herrn PD Dr. med. Albert Rübber für die freundliche Überlassung des interessanten Themas und für die wohlwollende Förderung danken. Seine vorbildliche Betreuung, sein Interesse am Fortgang der Untersuchungen und seine Kreativität prägten den Arbeitsgeist in unserem Labor und waren mir Motivation zu weiterer wissenschaftlicher Tätigkeit.

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. G. Jakse danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferates und für sein Interesse an der Arbeit.

Besonderer Dank gebührt Herrn PD Dr. med. Jens Malte Baron für seine freundliche und professionelle Beratung bei allen Fragen und Problemen, die bei der Erstellung der Arbeit und auch darüber hinaus auftraten.

Serah Ischler und Renate Baumann danke ich für ihre Hilfe im Labor sowie für viele praktische Ratschläge bei auftretenden Problemen.

Abschließend danke ich Oliver Zantis und Ingo Meister für die sehr aufmerksame Korrektur des Manuskriptes sowie für die vielen kurzweiligen und engagierten Diskussionen am Rande der Dissertationserstellung.

8.4 Lebenslauf

ANGABEN ZUR PERSON:

Geburtsdatum und -ort: 27. Februar 1974 in Aachen
 Familienstand: ledig
 Staatsangehörigkeit: deutsch

SCHULAUSSBILDUNG:

Katholische Grundschule Geilenkirchen 08/80 - 07/84
 Bischöfliches Gymnasium St. Ursula, Geilenkirchen 08/84 - 06/93
 Allgemeine Hochschulreife 06/93

WEHRDIENST:

Nachschubbataillon Lingen, Niedersachsen 07/93 - 06/94

UNIVERSITÄRE AUSBILDUNG:

Studium der Humanmedizin an der RWTH Aachen 10/94 – 5/01
 Ärztliche Prüfung (Gesamtnote 1,66) 05/01
 Approbation als Arzt im Praktikum 06/01

Praktisches Jahr:

Wahltertial: Hautklinik, Universitätsklinikum Aachen 04/00 - 07/00
 (Univ.-Prof. Dr. med. H. F. Merk)
 Chirurgisches Tertial: Department of General Surgery, 08/00 - 11/00
 Tulane University, New Orleans / USA
 Internistisches Tertial: Medizinische Kliniken I-IV, 12/00 - 03/01
 Universitätsklinikum Aachen (Univ.-Prof. Dr. med. S. Matern)

Wissenschaftliche Tätigkeit:

Mitarbeiter im Onkologischen Forschungslabor 09/97 – 12/00
 Universitätshautklinik Aachen (Leitung: Priv.-Doz. Dr. med. A. Rübber)

BERUFLICHE TÄTIGKEIT:

Arzt im Praktikum, Klinik und Poliklinik für Dermatologie, 07/01 – 12/02
 Universitätsklinik Regensburg (Prof. Dr. med. M. Landthaler)
 Assistenzarzt, Klinik und Poliklinik für Dermatologie, seit 01/03
 Universitätsklinik Regensburg (Prof. Dr. med. M. Landthaler)