

Klonale Diversität und phänotypische Heterogenität bei der Progression maligner Melanome



DISSERTATION

**ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER NATURWISSENSCHAFTEN
(Dr. rer. nat.)**

**DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN DER
UNIVERSITÄT REGENSBURG**

vorgelegt von

Sebastian Scheitler

aus

Amberg

im Jahr 2013

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von März 2008 bis Januar 2013 unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. med. Christoph A. Klein am Lehrstuhl für Experimentelle Medizin und Therapieverfahren am Klinikum der Universität Regensburg.

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 02.10.2013

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. med Christoph A. Klein

Unterschrift:

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender:	Herr Prof. Dr. Reinhard Wirth
1. Gutachter (1. Prüfer):	Herr Prof. Dr. Stephan Schneuwly
2. Gutachter (2. Prüfer):	Herr Prof. Dr. med. Christoph A. Klein
3. Prüfer:	Herr Prof. Dr. Richard Warth

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Das maligne Melanom.....	1
1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie.....	1
1.1.2 Diagnostik	2
1.1.3 Therapie.....	4
1.2 Wächterlymphknotenbiopsie.....	5
1.2.1 Methoden und Staging.....	5
1.2.2 Nachweis einzelner Melanomzellen	7
1.3 Melanozytäre Marker zum Nachweis und zur Isolation von Einzelzellen aus Wächterlymphknoten.....	9
1.3.1 gp100 (HMB45)	9
1.3.2 MCSP	10
1.4 Ziel dieser Arbeit	11
2. Material und Methoden	12
2.1. Kooperationspartner	12
2.2 Methoden	12
2.2.1 Lasermikrodissektion von Gewebe aus Primärtumor und Metastase.....	12
2.2.2 Mutationsanalyse	13
2.2.3 Einzelzellanalyse	14
2.2.3.1 Lymphknotenaufbereitung zur Herstellung einer Einzelzellsuspension.....	14
2.2.3.2.Immunfluoreszenzfärbung gegen MCSP	15
2.2.3.3 Isolation positiver Einzelzellen	16
2.2.4 Isolation und Anreicherung von cDNA und DNA aus Einzelzellen	16
2.2.4.1 Isolierung und Amplifikation von mRNA mit dem PNA-Protokoll	16
2.2.4.2 Einzelzell-PCR	17
2.2.5 Kontroll-PCR.....	19
2.2.5.1 Kontroll-PCR für DNA.....	19
2.2.5.2 Kontroll-PCR für cDNA.....	21
2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese	21

2.2.7 Genexpressionsanalysen	21
2.2.8 <i>in vivo</i> Studien zur Tumorigenität MCSP+ Zellen.....	22
2.2.8.1 Zellkultur von Melanomzelllinien zur Etablierung der Transplantationsmethode	22
2.2.8.2 Beschichtung von Mikrotiterplatten für die Anreicherung der Einzelzellen	22
2.2.8.3 Subkutane Transplantation <i>in vivo</i>	23
2.2.8.4 Tumorverdau und Typisierung von Einzelzellen aus Maustumoren	24
2.2.9 Komparative genomische Hybridisierung (CGH).....	24
2.2.9.1 Lymphozytenkultur und Präparation von Metaphasenchromosomen	24
2.2.9.2 Markierungs-PCR	25
2.2.9.3 Vergleichende genomische Hybridisierung (CGH).....	26
2.2.10 Statistische Berechnungen	28
2.2.11 Hierarchische Ähnlichkeitsanalyse	29
2.3 Verwendete Materialien.....	30
2.4 Abkürzungen	35
3. Ergebnisse	37
3.1 Nachweis und Isolation disseminierter Tumorzellen in Wächterlymphknoten von Patienten mit malignem Melanom	38
3.1.1 Patientenkollektiv und angewendete Methoden für den Nachweis disseminierter Einzelzellen	38
3.1.2 Histopathologischer Nachweis der Tumorlast in Wächterlymphknoten	41
3.1.3 Immunzytochemischer Nachweis von Tumorzellen durch das melanomspezifische Antigen gp100.....	41
3.1.4 Immunfluoreszenznachweis von Tumorzellen durch das melanomspezifische Zelloberflächenantigen MCSP.....	43
3.1.4.1 Etablierung einer Färbung gegen MCSP in Suspension.....	43
3.1.4.2 Untersuchte Patientenproben für den Nachweis MCSP+ Einzelzellen	43
3.1.5 Detektionsraten MCSP+ Zellen in den Patienten und Zellmorphologie.....	44
3.1.6 Vergleich der Analyseverfahren: Detektionsraten und Zellmorphologie	47
3.1.7 MCSP Kontrollfärbung von Lymphknoten gesunder Probanden.....	53
3.2 Überprüfung des melanozytären und malignen Ursprungs isolierter MCSP+ Zellen durch Transkriptomanalyse	56
3.2.1 Einzelzellisolation und Gewinnung von cDNA und DNA für die molekulare Charakterisierung.....	56
3.2.2 Expression Melanom-assoziiierter Marker	58
3.2.3 Expression Stammzell-assoziiierter Marker	59

3.2.4 Korrelation Melanom- und Stammzell-assoziiierter Marker.....	62
3.3 Überprüfung des malignen Ursprungs von MCSP+ und gp100+ Zellen durch Genomanalysen	64
3.3.1 Vergleich des Mutationsstatus der Onkogene <i>BRAF</i> und <i>NRAS</i> zwischen Einzelzellen und Zellpopulationen von MCSP und gp100	64
3.3.2 Überprüfung des Mutationsstatus von <i>BRAF</i> und <i>NRAS</i> an individuellen Paaren von Primärtumor und Metastase	68
3.3.2.1 Patientenkollektiv und experimentelles Vorgehen	68
3.3.2.2 Mutationsstatus von <i>BRAF</i> und <i>NRAS</i> in den gepaarten Proben.....	71
3.3.3 Genomische Charakterisierung MCSP+ und gp100+ Einzelzellen über Metaphasen-CGH	73
3.3.3.1 Patientenkollektive MCSP+ und gp100+ Zellen für die CGH-Analyse.....	73
3.3.3.2 Aberrationsmuster MCSP+ und gp100+ Zellen	75
3.3.3.3 CGH-Aberrationen und DCCD-Wert im Lymphknoten.....	85
3.3.3.4 CGH-Aberrationen und Mutationsstatus des <i>BRAF</i> -Gens.....	87
3.3.3.5 Genomische Heterogenität disseminierter Tumorzellen	88
3.3.3.6 Heterogenität disseminierter Tumorzellen innerhalb einzelner Patienten	92
3.4 Tumor induzierendes Potential MCSP+ Einzelzellen in vivo	94
3.4.1 Protokolletablierung für die subkutane Injektion von Einzelzellen	94
3.4.2 Tumorbildung nach Injektion MCSP+ Patientenzellen	95
3.5 Zusammenhang von Nachweisverfahren gestreuter Melanomzellen im Wächterlymphknoten und klinischen Faktoren	100
3.5.1 Korrelation von Punktmutationen in <i>BRAF</i> und <i>NRAS</i> in DCC mit klinischen Faktoren	100
3.5.2 Korrelation klinischer Faktoren der Patienten mit Befunden von Einzelzellanalyse und Histopathologie	101
3.5.3 Einfluss von Einzelzellnachweis und klinischen Faktoren auf den Krankheitsverlauf.....	103
4. Diskussion	107
4.1 Klonale Diversität von Primärtumor und korrespondierender Metastase beim malignen Melanom	108
4.2 <i>BRAF</i> - und <i>NRAS</i> -Status disseminierter Tumorzellen in Wächterlymphknoten	109
4.3 Nachweis und Isolation disseminierter Tumorzellen aus Wächterlymphknoten von Patienten mit malignem Melanom	110
4.4 Disseminierte Tumorzellen bilden Subpopulationen in Wächterlymphknoten ..	114
4.5 Die prognostische Bedeutung disseminierter Tumorzellen für den Patienten ..	117

Inhaltsverzeichnis

4.6 Tumorigenes Potential vitaler MCSP+ DCC in vivo.....	119
4.7 Hypothetisches Progressionsmodell für DCC in Wächterlymphknoten.....	121
5. Zusammenfassung	124
6. Literaturverzeichnis.....	126
7. Eidesstattliche Erklärung.....	135
8. Danksagung:	136
9. Anhang	137
9.1 Patientenkollektiv Regensburg	137
9.2 MCSP+ Zellen aus dem Regensburger Kollektiv.....	142
9.3 Gesamtübersicht Mutationsanalysen	150
9.4 Klinische Daten der Patienten aus Tübingen	151
9.5 Einteilung der definierten Chromosomenregionen für die CGH-Analyse	152
9.6 CGH-Profile der untersuchten DCC.....	153

1. Einleitung

1.1 Das maligne Melanom

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Das maligne Melanom gehört heute bereits, im Gegensatz zu früheren Jahrzehnten, zu den 10 häufigsten soliden Tumoren (Garbe and Blum, 2001). In Deutschland stieg die Zahl der Neuerkrankungen seit 2004 auf ca. 13000 pro Jahr, mit einer jährlichen Mortalität von etwa 2600 Patienten. Dabei ist, wie auch in anderen Ländern Europas, die Tendenz erkennbar, dass trotz steigender Inzidenz seit den 1990er Jahren eine Stagnation bzw. Stabilisierung der Mortalitätszahlen besteht (Stang et al., 2001).

Garbe (Garbe und Lasithiotakis, 2006 *Epidemiologie des Melanoms der Haut* S. 50 ff.) zeigt den Anstieg der Inzidenzraten für Deutschland anhand von Daten der Dachdokumentation Krebs des Robert Koch Instituts in Berlin. Demnach stieg die Zahl der Neuerkrankungen in Deutschland im Zeitraum von 1970 bis 2000 von 3 auf 12 Fälle je 100.000 Einwohner pro Jahr. Das entspricht einer Vervielfachung der Inzidenz und einer jährlichen Steigerung von 13 %. Die höchsten Inzidenzraten mit bis zu 60 Neuerkrankungen je 100.000 Einwohner pro Jahr werden in Australien und Neuseeland registriert (Marrett et al., 2001). Das Melanom gehört dort zu den häufigsten Tumoren und zeigt, dass weiterhin von einem drastischen Anstieg der Neuerkrankungen in der gesamten hellhäutigen Bevölkerungsgruppe ausgegangen werden muss.

Während das mediane Alter bei Erstdiagnose bei Frauen und Männern (55 bzw. 57 Jahre), sowie die Verteilung der Erkrankung auf die Geschlechter nicht wesentlich variieren (Garbe et al., 1995b), liegt ein deutlicher Unterschied in der Lokalisation der Tumore vor. Melanome finden sich bei Männern meist am Stamm, bei Frauen an den unteren Extremitäten (Garbe et al., 1995a)

Von den unterschiedenen klinisch-histologischen Subtypen hat das superfiziell spreitende Melanom mit 56 % der Fälle den höchsten Anteil, gefolgt vom nodulären Melanom mit 20 %. Lentigo-malignes und akrolentigonöses Melanom weisen dagegen mit 9 bzw. 4 % geringere Werte auf (Garbe et al., 1995b).

Durch Verbesserung der Früherkennung, und sicherlich auch bedingt durch eine höhere Sensibilisierung der Bevölkerung für die Problematik, weisen Neuerkrankungen meist eine relativ geringe Tumordicke auf. Das 10 Jahres Überleben für Patienten mit dünnen Tumoren ist sehr gut und liegt bei rund 97 % (Balch et al., 2009a). In Deutschland sank die mediane Tumordicke seit den 80er Jahren von 1,3 auf 0,8 mm und stagniert seit Ende der 19990er Jahre auf diesem Niveau (Garbe et al., 2000).

Die Ätiologie des Melanoms ist nicht vollständig geklärt. Man geht davon aus, dass genetischen Faktoren, Umwelteinflüssen und das Immunsystem zu Entstehung und Verlauf der Erkrankung beitragen. Etwa 5 bis 12 % der Melanome treten als familiäre Melanome auf (Goldstein and Tucker, 2001) und werden autosomal dominant vererbt (Greene et al., 1983). Als so genannte Melanomsuszeptilitätsgene werden dabei hauptsächlich das Tumorsuppressorgen *CDKN2A* (auf Chromosom 9p21) (Kamb et al., 1994), sowie das Onkogen *CDK4* auf Chromosom 12q13 (Wolfel et al., 1995) beschrieben. Keimbahnmutationen dieser Gene wurden in betroffenen Familien gehäuft nachgewiesen.

Charakteristische Alterationen in Signaltransduktionswegen, denen durch konstitutive Aktivierung bei Entstehung und Progression des malignen Melanoms eine zentrale Funktion zukommt, sind seit längerem im Fokus der Forschung. Prominentestes Beispiel dafür ist die Aktivierung des MAPK-Signalweges durch somatische Mutationen des *B-RAF*-Gens. Durch zielgerichtete Therapieansätze (Flaherty et al., 2010) erhofft man zukünftig Behandlungserfolge auch für weit fortgeschrittene systemische Stadien der Erkrankung.

Unbestritten, allerdings in den molekularen Mechanismen noch nicht vollständig erforscht, ist der Beitrag von UVA- und UVB-Strahlen bei der Entstehung von Melanomen (Gandini et al., 2011)

Insbesondere gilt übermäßige Exposition von Sonnenlicht als einer der Hauptrisikofaktoren für die Erkrankung. Es besteht ein Zusammenhang zwischen Sonnenexposition und Melanomentstehung, sowie zwischen Pigmentierung der Haut und Empfindlichkeit gegenüber Sonnenlicht. Die Inzidenz für Melanome in der hellhäutigen Bevölkerung steigt mit Nähe des Wohnorts zum Äquator und der damit verbundenen höheren Sonnenstrahlung. Melanome werden zunehmend an Stellen der Haut diagnostiziert, die durch das veränderte Freizeitverhalten (Sonnenbaden) verstärkt der Sonneneinstrahlung ausgesetzt wurden. Die Exposition mit Sonnenlicht induziert zudem verstärkt benigne melanozytäre Nävi als potentielle Vorläuferläsionen des Melanoms (Tucker and Goldstein, 2003).

1.1.2 Diagnostik

Werden Melanome frühzeitig diagnostiziert und in einem Stadium exzidiert, in dem der Tumor die Epidermis noch nicht durchwandert hat, besteht für den Patienten nur ein geringes Risiko der Metastasierung. Neben dem klinischen Vorgehen zur Früherkennung über regelmäßige Kontrollen von auftretenden Hautveränderungen und vorhandener Nävi (ABCD-Regel) (Friedman et al., 1985), wird durch die nicht invasive unterstützende Dermatoskopie (Auflichtmikroskopie), eine um 35 % höhere Sicherheit bei der Unterscheidung benignen und malignen Läsionen erzielt (Kittler et al., 2002) und somit unnötige Exzissionen zunehmend vermieden.

Die Einteilung des Tumorstadiums (Staging) erfolgt gemäß der TNM-Klassifikation der AJCC (American Joint Committee on Cancer) (**Tabelle 1**)

Tabelle 1: TNM - Klassifikation des malignen Melanoms (nach AJCC 2009)

T - Primärtumor		
Tis	Primärtumor nicht bestimmbar	
T1	≤ 1,00 mm	a) ohne Ulzeration und Mitose < 1 mm ² b) mit Ulzeration oder Mitose ≥ 1 mm ²
T2	1,01 - 2,00 mm	a) mit Ulzeration b) ohne Ulzeration
T3	2,01 - 4,00 mm	a) mit Ulzeration b) ohne Ulzeration
T4	> 4 mm	a) mit Ulzeration b) ohne Ulzeration
N - Regionäre Lymphknoten		
N0	kein Anzeichen für regionäre Lymphknotenmetastasen	
N1	1 regionärer Lymphknoten betroffen a) Mikrometastase b) Makrometastase	
N2	2 - 3 regionäre Lymphknoten betroffen	
N3	4 oder mehr regionäre Lymphknoten betroffen	
M - Fernmetastasen		
M0	keine Fernmetastasen nachweisbar	
M1a	Fernmetastasen auf der Haut oder in Lymphknoten	
M1b	Lungenmetastasen	
M1c	Alle übrigen Manifestationen	

Beim Melanom werden in der Tumorentwicklung zwei Wachstumsphasen unterschieden, Radiäres- und Tiefenwachstum (Clark et al., 1969). In der radiären Phase findet eine horizontale Ausbreitung der Tumorzellen in der Basalschicht der Epidermis statt. Erst während der zweiten (vertikalen) Ausbreitungsphase des Tumors durchbrechen die malignen Zellen die dermoepidermale Junktionszone und ermöglichen somit die systemische Progression des Melanoms. Dieser Prozess tritt abhängig vom histologischen Typ und äußeren Faktoren unterschiedlich früh im Krankheitsverlauf ein.

Als wichtigster Prognosefaktor für das histopathologische Mikrostaging des Primärtumors dient der vertikale Tumordurchmesser, die sog. Tumordicke nach Breslow (Breslow, 1970), als zweitwichtigster Faktor die Ulzeration des Primärtumors. Diese ist definiert durch das Fehlen der intakten Epidermis oberhalb des Tumors in der histopathologischen Untersuchung (Balch et al., 2001). Von den histologischen Subtypen des Melanoms weisen primär noduläre und akrolentigonöse Melanome eine signifikant schlechtere Prognose auf als superfiziell spreitende oder Lentigo-maligna-Melanome (Garbe et al., 1995a).

Bei Melanomen wird in 70 % der Fälle zunächst eine Metastasierung in den regionären Lymphknoten festgestellt (Leiter et al., 2004). Regionäre Lymphknotenmetastasen sind somit meist die erste Stufe einer systemischen Tumorprogression. Der wichtigste Prognosefaktor für den Patienten im Stadium der systemischen Metastasierung ist der Status des sog. Wächterlymphknotens, des ersten drainierenden Lymphknotens, der den Status der gesamten Lymphknotenregion repräsentiert (Morton et al., 1992). Auf die

anhaltenden Kontroversen zur klinischen Diagnostik des Wächterlymphknotens wird in Abschnitt 1.2 näher eingegangen.

1.1.3 Therapie

Die Exzision des Primärtumors stellt den ersten und entscheidenden Schritt in der Therapie dar (Kaufmann, 2000). Kontrovers diskutiert wurde in der Vergangenheit der nötige Sicherheitsabstand zum umgebenden Gewebe. In den 2004 von ADO (Arbeitsgemeinschaft dermatologischer Onkologie), deutscher Krebsgesellschaft und deutscher Dermatologischen Gesellschaft entwickelten evidenzbasierten Leitlinien zur Versorgung von Melanompatienten wird empfohlen, bei Tumoren mit einer maximalen vertikalen Ausdehnung kleiner oder gleich 2 mm einen allseitigen Sicherheitsabstand von 1 cm, und bei Tumoren mit einer Tumordicke nach Breslow größer als 2 mm einen Abstand von 2 cm einzuhalten.

Liegt nach histologischer und immunhistochemischer Analyse des biopsierten Wächterlymphknotens ein Hinweis auf Metastasierung vor, so wird allgemein noch die komplette Ausräumung der befallenen Lymphstationen empfohlen (Wagner et al., 2000). Kutane Metastasen des Melanoms treten lokoregionär als Satellitenmetastasen (Abstand zum Primärtumor maximal 2 cm) und in-transit Metastasen (Abstand zum Primärtumor größer 2 cm bis zur regionären Lymphknotenregion) sowie als Fernmetastasen auf. Singuläre Läsionen werden dabei in der Regel exzidiert, bei multiplen Metastasen erfolgt eine Abwägung zum Einsatz systemischer Therapien. Singuläre viszerale Fernmetastasen werden ebenfalls wenn möglich kurativ operativ entfernt (Meyer et al., 2000; Wood et al., 2001), bei multiplem Befall beschränken sich Exzissionen auf palliative operative Eingriffe. Prädispositionslokalisationen des malignen Melanoms sind Lunge, Gehirn, Skelett, Leber, Gastrointestinaltrakt und Milz. (Göhl und Meyer, 2006 *Operative Therapie des metastasierten Melanoms* S.258 ff.).

Die adjuvante medikamentöse Therapie des Melanoms wird derzeit meist als adjuvante Immuntherapie mit Interferon α durchgeführt, die in ersten Studien einen Überlebensvorteil für die Patienten zeigte (Tarhini et al., 2012). In der klinischen Anwendung werden noch einige Jahre nötig sein, um diese Ergebnisse sicher verifizieren zu können (Davar et al., 2013).

Grundsätzlich verzeichnen Therapieansätze beim metastasierten Melanom bis heute keine zufrieden stellenden Erfolge für den Patienten. Deshalb wird das Augenmerk in der Forschung und Entwicklung neuer Behandlungsmethoden derzeit verstärkt auf personalisierte und zielgerichtete Strategien auf molekularer Ebene gelegt. Der entscheidende Schritt wäre das Verstehen der zugrunde liegenden Mechanismen für die systemische Streuung des Primärtumors.

Grundlage aller weiteren Therapieentscheidungen, nach Exzision des Primärtumors, ist gegenwärtig die Einstufung des Grades der systemischen Erkrankung der Patienten, aufgrund von Biopsie und Analyse des Wächterlymphknotens.

1.2 Wächterlymphknotenbiopsie

1.2.1 Methoden und Staging

Die lymphogene Streuung von Melanomen wurde bereits früh in der Medizin erkannt. Einer der ersten, der die Metastasierung über die regionären Lymphknoten postulierte war 1892 der Londoner Chirurg Herbert Snow (1847 -1930) (Neuhaus et al., 2004). Er befürwortete deshalb bereits die sogenannte elektive Lymphknotendisektion (ELND), bei der vorsorglich alle Lymphknoten in der Umgebung des Primärtumors entnommen werden. Diese umstrittene Methode wurde lange routinemäßig eingesetzt, um frühe Melanome zu therapieren. Studien zeigten bisweilen ein verbessertes Überleben einzelner Patientengruppen durch ELND (Balch et al., 1996), doch wurde der Nutzen für die Mehrzahl der Patienten in Frage gestellt. Da nur ca. 20 % der Patienten eine regionäre Lymphknotenbeteiligung aufweisen, überwiegen für 80 % der operierten Patienten die teils beträchtlichen Nebenwirkungen des Eingriffs, ohne ihnen einen therapeutischen Vorteil zu verschaffen (Morton et al., 1991).

Auf der Suche minimal invasiver Alternativen für den Patienten, entwickelten Morton und Mitarbeiter zu Beginn der 1990er Jahre die so genannte Wächterlymphknotenbiopsie. Zugrunde liegt die Vorstellung, dass die Dissemination vom Primärtumor zunächst in einer Art Vorstufe zu einer Metastasierung in dem (oder den) ersten, den Tumor drainierenden Lymphknoten, den so genannten Wächterlymphknoten führt. Bei der Biopsie kommt es zu einer selektiven Entnahme einzelner, durch Vitalmarkierung des Lymphabflusses vom Primärtumor markierter, Lymphknoten mit anschließender histologischer Untersuchung (Morton et al., 1992).

Die Biopsie wird heute standardmäßig bei Tumoren mit einem vertikalen Durchmesser (nach Breslow) von mehr als 1 mm empfohlen (Balch et al., 2009b). Die Darstellung des Wächterlymphknotens wird derzeit in den Kliniken meist parallel, sowohl radioaktiv durch sog. Lymphabstromszintigraphie, als auch durch Anfärbung nach Injektion von Patentblau (Bagaria et al., 2010) erreicht.

Trotz Bemühung, die Methode zu standardisieren (Lawrence et al., 2001), gibt es bis heute keine einheitliche Regelung für die anschließende histologische oder kombinierte histologische und immunhistochemische Untersuchung der biopsierten Lymphknoten.

Einleitung

Dadurch schwankt die Rate der positiv diagnostizierten Proben abhängig von der Aufarbeitung in verschiedenen Studien zwischen 9 % (Gogel et al., 1998) und bis zu 34 % (Cook et al., 2003). Das bedeutet: „*the more one looks - the more one finds*“ (Gietema et al., 2004). Somit stellt sich die Frage, ab wie vielen untersuchten histologischen Schnittebenen im Lymphknoten eine maximal sichere Diagnose für den Patienten möglich wird. Hierbei sind in der Klinik die logistische Durchführbarkeit und entstehende Kosten limitierende Faktoren. So zeigt eine Berechnung (van Diest, 1999) dass theoretisch pro Lymphknoten 139 Schnitte nötig sind, um eine Ansammlung von 10 Tumorzellen sicher zu detektieren, was in der Praxis nicht anwendbar ist.

Wie **Abbildung 1** schematisch zeigt, sind Metastasen im Lymphknoten nicht symmetrisch geformt. Einzelne Tumorzellen liegen zudem verstreut vor. Somit läuft die derzeitige Diagnostik Gefahr, einzelne positive Patienten in der Aufarbeitung der histologischen Schnittstufen zu übersehen, bzw. die Tumorlast im Lymphknoten zu unterschätzen (Murali et al., 2012).

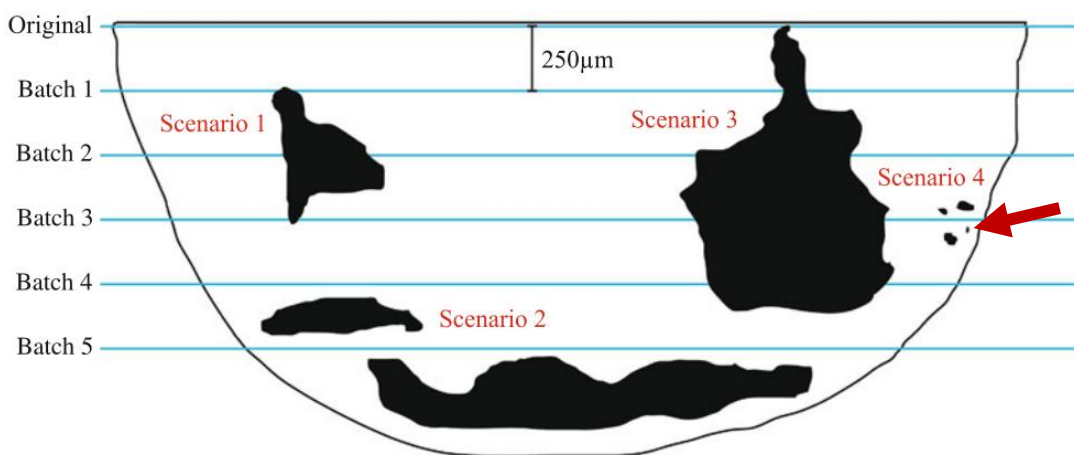


Abbildung 1: Schematische Darstellung von Tumorlast und Verteilung im Lymphknoten (nach Murali et al., 2012).

Dargestellt ist ein halber Lymphknoten mit eingeschlossenen malignen Läsionen. Die blauen Linien zeigen mögliche Schnittstufen für histologische oder immunhistochemische Färbungen. Wie deutlich zu erkennen ist, läuft man bei der Analyse einzelner Schnittebenen Gefahr die Tumorlast zu unterschätzen, bis hin zu möglichen Fehldiagnosen (Schnittebene Original und Batch 5). Ebenfalls nicht mittels der Schnittstufen erfasst werden die verstreut vorliegenden Tumorzellen im Lymphknoten (Pfeil).

Eine Steigerung der Sensitivität versucht man gegenwärtig durch die Anwendung immunhistochemischer Färbungen mit melanomspezifischen Antikörpern wie HMB45, S100 und MelanA zu erzielen (Abrahamsen et al., 2004). Durch diese spezifischen Nachweise werden auch einzelne Zellansammlungen und verstreute Einzelzellen detektiert (**Abb. 2**), die auf den HE-Schnitten der histologischen Untersuchung häufig nicht nachweisbar sind (Baisden et al., 2000).

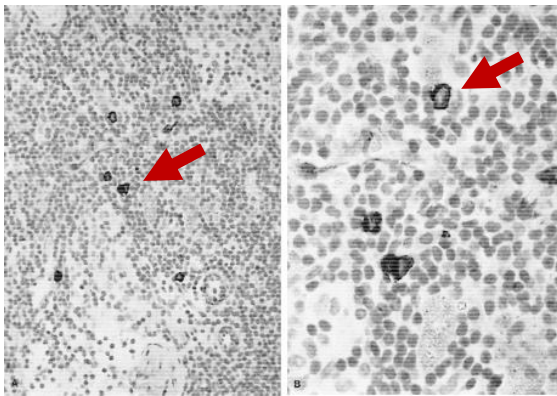


Abbildung 2: Einzelne HMB45 positive Tumorzellen in Schnittstufen von Wächterlymphknoten (nach Baisden et al., 2000)

Immunhistochemische Färbungen histologischer Schnittstufen liefern sensitivere Nachweise als rein histologischen Färbungen. Der Nachweis der Tumorlast wird damit sensitiver, die Wahrscheinlichkeit dass positive Zellen (Pfeile) auf einer histologischen Schnittstufe vorliegen, bleibt jedoch gering.

2007 wurde in einer ersten Langzeitstudie gezeigt, dass selbst detektierte Einzelzellen im Lymphknoten einen signifikanten Effekt auf das Überleben der Patienten zeigen (Scheri et al., 2007). Obwohl die prognostische Bedeutung detektierter Mikrometastasen noch nicht allgemein anerkannt wird, und einige Autoren vorschlagen, Lymphknoten mit Mikrometastasen $< 0,1$ mm als negativ zu betrachten (van Akkooi et al., 2006), wurde der Nachweis einzelner detektierter Tumorzellen in die aktuelle Version des American Joint Committee on Cancer Staging for Cutaneous Melanoma (AJCC 2009) aufgenommen (Balch et al., 2009a).

1.2.2 Nachweis einzelner Melanomzellen

Die derzeitige Diagnostik der Wächterlymphknoten beim malignen Melanom stellt einen Kompromiss dar, aus möglichst hoher Sicherheit für den Patienten und vertretbarem Aufwand in der Analyse. Daher wird nach sensitiven und routinemäßig durchführbaren Alternativen in der Diagnostik gesucht. Die häufig verwendeten PCR-basierten Nachweise Melanom-assoziierten mRNA-Sequenzen von Tyrosinase, gp100 und MelanA weisen eine hohe Sensitivität auf, was zu Positivraten von bis zu 73 % führt und damit erheblich über den Werten der Routinepathologie liegt (Bieligk et al., 1999). Der Nachteil PCR-basierter Analysen ist die geringe Spezifität, mit der damit verbundenen Gefahr falsch positiver Befunde. Dies kann durch Expression der Markergene durch Melanophagen, Nävuszellen und intranodale Nerven, sowie durch sog. „*illegitimate gene expression*“ in nicht melanozytären Zellen geschehen (Chelly et al., 1989). Studien zeigten, dass in RT-PCR positiven aber histologisch negativen Lymphknoten auch durch aufwändige histologische Untersuchung weiterer Schnittebenen in den meisten Fällen keine Tumorzellen nachgewiesen werden können (Blaheta et al., 2001). Die Lysierung des Gewebes ermöglicht

Einleitung

keinen Nachweis intakter Zellen, und keine quantitative Aussage über die tatsächliche Tumorlast im Lymphknoten.

Am Klinikum der Uni Tübingen wurde in Kooperation ein neuer immunzytologischer Ansatz entwickelt, der den Nachweis einzelner okkult disseminierter Melanomzellen im Wächterlymphknoten ermöglicht (Ulmer et al., 2005). Dabei wird das Lymphknotengewebe mechanisch disaggregiert und eine homogene Einzelzellsuspension hergestellt. Der Nachweis der Zellen geschieht mikroskopisch nach immunzytochemischer Färbung gegen gp100 (HMB45) (**Abb. 3**).

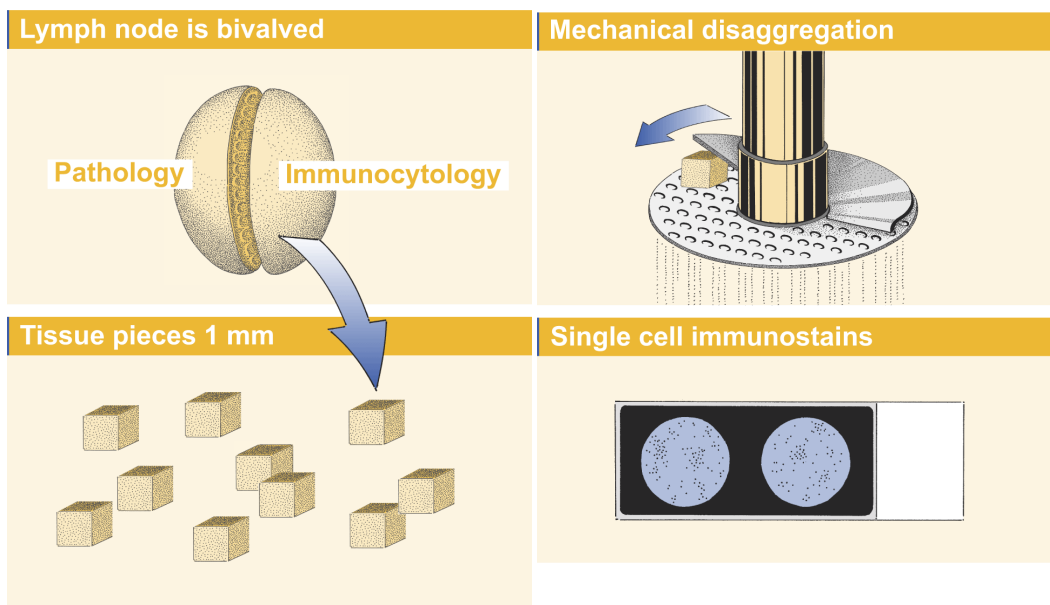


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Lymphknotenaufbereitung zum immunzytochemischen Nachweis einzelner HMB45 positiver Zellen (Nach Ulmer et al., 2013)

Der biopsierte LK wird halbiert, die Hälfte für den Einzelzellnachweis zunächst zerkleinert und über rotierenden Siebplatten mechanisch disaggregiert. Die gereinigte Einzelzellsuspension wird reversibel auf Adhäsionsobjektträgern für die anschließende Immunfärbung fixiert.

Einzelne positive Tumorzellen werden durch Mikromanipulation isoliert. Nach globaler Amplifikation der DNA ist es beispielsweise möglich, genomische Profile der Zellen durch komparative genomische Hybridisierung (CGH) zu erstellen (Klein et al., 1999; Ulmer et al., 2004) oder Mutationsanalysen durchzuführen. Die Methode ermöglicht die quantitative Dokumentation der Tumorlast im Lymphknoten, durch Quantifizierung positiver Zellen pro Million Lymphozyten, dem sogenannten DCCD-Wert (**D**isseminated **C**ancer **C**ell **D**ensity). Sie zeichnet sich durch eine sehr hohe Sensitivität im Vergleich zur Routinepathologie aus (Ulmer et al., 2005) und (Ulmer 2013, eingereicht zur Publikation). Die Spezifität des Nachweises wurde in der genannten Studie auf dreifache Weise belegt: Untersuchte Kontrolllymphknoten wiesen in keinem Fall immunzytochemisch positive Zellen auf. Die retrospektive histologische Aufarbeitung der untersuchten Proben führte in 5 von 7 HMB45 positiven Lymphknoten zur Revision der histopathologischen Diagnose. Bei 24 von 30

untersuchten Tumorzellen konnten genomische Aberrationen nachgewiesen werden, was sie als maligne Zellen bestätigt. Genomische Aberrationen wurden auch in isolierten DCC aus Lymphknotenbiopsien bei Ösophagus-Krebs nachgewiesen. Diese Zellen hatten eine prognostische Bedeutung für die Patienten (Stoecklein et al., 2008).

In der Langzeitstudie (2000 - 2008) des Tübinger Kollektivs mit 1027 Patienten und 1834 untersuchten Lymphknoten konnte gezeigt werden, dass der Nachweis von bis zu drei Tumorzellen pro Million Lymphozyten sich signifikant auf das 5-Jahres Überleben der Patienten auswirkt. (Ulmer 2013, eingereicht zur Publikation). Für den Nachweis der okkulten Melanomzellen im Wächterlymphknoten wurde der melanozytäre Marker gp100 (HMB45) verwendet. In einer vorausgegangenen Studie wurden zirkulierende Melanomzellen immunomagnetisch aus dem Blut der Patienten isoliert und auf genomische Veränderungen hin untersucht (Ulmer et al., 2004). Dazu wurde als Marker das Zelloberflächenantigen MCSP verwendet.

1.3 Melanozytäre Marker zum Nachweis und zur Isolation von Einzelzellen aus Wächterlymphknoten

1.3.1 gp100 (HMB45)

HMB45 ist ein monoklonaler Antikörper, der 1986 erstmals beschrieben wurde (Gown et al., 1986). Er ist gegen das melanozytäre Antigen gp100 gerichtet, ein aus 661 Aminosäuren bestehendes Transmembran Glykoprotein, das in den Melanosomen der Melanozyten angereichert ist, und zur Melanosomenreifung und Melaninsynthese beiträgt (Berson et al., 2001). In immunzytologischen Färbungen zeigte der Antikörper HMB45 eine hohe Spezifität und Sensitivität von 92 % (Walts et al., 1988). Immunhistologische Anwendung von HMB45 zur Diagnostik von Wächterlymphknoten ermöglichten neben dem sensitiveren Nachweis mikrometastatischer Läsionen auch die Detektion einzelner verstreuter Tumorzellen, die in der routinopathologischen Untersuchung des Gewebes mittels HE-Färbung oft nicht erkannt werden (Baisden et al., 2000) und **Abbildung 2**. Dieser Befund deckt sich mit einer weiteren Studie, wonach in 62 % der histologisch negativen Lymphknoten, durch anschließende Immunhistochemie mit HMB45, positive Zellen detektiert wurden (Hatta et al., 1998).

Als Nachteil von HMB45 kann seine geringe Sensitivität gesehen werden. So blieben in Studien 18 bis 35 % der untersuchten Lymphknoten mit Mikrometastasen negativ für den Nachweis mit HMB45 (Abrahamsen et al., 2004; Shidham et al., 2001). HMB45 zeigt zudem die Eigenschaft vorzugsweise proliferierende melanozytäre Zellen zu detektieren (Skelton et al., 1991). Das kann dazu führen, maligne melanozytäre Zellen, die sich im Lymphknoten in

einem Ruhestadium befinden, nicht zu erfassen, und so zum Teil zu falsch negativen Befunden führen. Unterschiedliche Befunde zeigen Studien darüber, inwieweit HMB45 eine sichere Unterscheidung benigner und maligner melanozytärer Zellen ermöglicht. In einer Studie wurden in zwei von 15 Fällen auch Nävuszellen mit HMB45 detektiert (Lohmann et al., 2002), wohingegen in anderen Studien in keinem der Fälle Nävuszellen mit HMB45 nachgewiesen werden (Shidham et al., 2001; Yu et al., 1999).

Weder bei Ulmer noch in einer weiteren Studie (Baisden et al., 2000), konnten in den Kontrolllymphknoten mit HMB45 positive Zellen nachgewiesen werden. Damit zeigt sich der Antikörper für den Nachweis melanozytärer Zellen besser geeignet als Antikörper gegen MelanA (MART1), der in 5,4 % der Fälle in Kontrollproben positive Färbeargebnisse zeigte (Ulmer et al., 2005).

Trotz der hohen Spezifität und Sensitivität des Antikörpers hat er für die molekularen Analysen der detektierten Melanomzellen einen entscheidenden Nachteil. Aufgrund der Lokalisation des Antigens in der Zelle bindet er zytoplasmatisch, was eine Permeabilisierung der Zellmembran notwendig macht. Eine Isolation vitaler Zellen für mRNA-Analysen und funktionale Tests, sind mit dem HMB45-Antikörper nicht möglich.

1.3.2 MCSP

Um vitale Zellen zu detektieren und zu isolieren ist ein membranbindender Antikörper nötig. Der monoklonale Antikörper 9.2.27 (Bumol and Reisfeld, 1982; Morgan et al., 1981) gegen das Melanom spezifische Zelloberflächenantigen MCSP (*Melanoma-associated-chondroitin-sulfate-proteoglycan*), auch als HMW-MAA (*high-molecular-weight-melanoma-associated-antigen*) bezeichnet, wurde dazu in dieser Arbeit verwendet.

MCSP ist ein integrales Membran-Proteoglykan, das in humanen Melanomzellen und Zelllinien zu 90 % exprimiert wird (Bumol and Reisfeld, 1982). Es hat u.a. eine Funktion in der Stabilisierung von Zell-Substrat-Interaktionen während der Zellmigration und Metastasierung (Campoli et al., 2004).

Der Antikörper erwies sich in Studien als geeignet, einzelne zirkulierende Melanomzellen im Blut von Patienten nachzuweisen und zu isolieren (Benez et al., 1999; Ulmer et al., 2004). Im Vergleich der immunhistochemischen Färbungen zeigte sich MCSP sensitiver und spezifischer als MART-1, S-100p und HMB45 zum Nachweis sowohl von Makro- als auch von Mikrometastasen in Wächterlymphknoten (Goto et al., 2008).

Ob sich dieser Antikörper auch dazu eignet, mit der Methode der disaggregierten Wächterlymphknoten (nach Ulmer) einzelne positive disseminierte Zellen (DCC) zu detektieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals untersucht.

1.4 Ziel dieser Arbeit

Ziel der Arbeit war die Charakterisierung disseminierter Tumorzellen (DCC) aus Wächterlymphknoten von Patienten mit malignem Melanom. Der histopathologische Nachweis einzelner gp100-positiver Tumorzellen nach der Lymphknotenbiopsie wird bereits als Kriterium zur Bestimmung des Lymphknotenbefalls eingesetzt und zu Therapieentscheidungen herangezogen. Durch die immunzytochemische Färbung gegen das melanozytäre Zelloberflächenantigen MCSP sollte ein weiterer Marker zur Isolation von DCC aus Wächterlymphknoten etabliert werden. Der Vorteil dieses Oberflächenantigens ist die Isolation vitaler Zellen für globale Untersuchungen des Genoms und Transkriptoms sowie die Möglichkeit für *in vitro* und *in vivo* Studien.

Zu diesem Zweck sollten zunächst MCSP-positive Zellen aus Lymphknoten isoliert, sowie deren DNA und RNA isoliert und amplifiziert werden. Färbungen von Lymphknotenproben gesunder Probanden dienten als Referenz und sollten die Spezifität der Methode testen. Die Expression melanozytärer sowie Stammzell-assoziiierter Marker sollte über PCR-Analyse einen ersten Hinweis auf den melanozytären und malignen Ursprung der Zellen geben. Das Genom der Zellen wurde auf das Vorkommen melanomspezifischer Punktmutationen für die Gene *BRAF* und *NRAS* untersucht. Mittels komparativer Genomhybridisierung (CGH) sollten die Zellen auf chromosomale Veränderungen hin untersucht werden. Es sollte zudem ein erster Test auf die Tumorigenität der Zellen *in vivo* durchgeführt werden. Dazu sollte zunächst ein Protokoll für subkutane Injektion einzelner Melanomzellen aus etablierten Zelllinien in NSG-Mäuse etabliert, und die Tumorbildung dann an Mäusen mit injizierten MCSP-positiven Patientenzellen untersucht werden.

Aus den gesammelten Patientenproben des Kollektivs war es durch die Art der Aufbereitung möglich, parallel gp100-positive Zellen zu isolieren, und somit beide Färbungen innerhalb der Patienten an der gleichen Probe zu vergleichen. Da der zytoplasmatische Marker gp100 ausschließlich die Isolation von DNA ermöglicht, sollte in diesen Zellen der Mutationsstatus sowie die chromosomalen Veränderungen untersucht und mit den MCSP-positiven Zellen verglichen werden.

Daten zu gp100-positiven DCC aus einem Patientenkollektiv der Uniklinik Tübingen lagen aus einer früheren Kooperation bereits vor. Zunächst sollte ein vorläufiger Befund, der eine klonale Diversität zwischen Primärtumor (PT), DCC und Metastase (Met) hinsichtlich des Mutationsstatus des Onkogens *BRAF* beschreibt durch eine Erhöhung der Fallzahlen korrespondierender Paare aus PT und Met statistisch gefestigt werden.

Die DCC aus diesem Kollektiv sollten im Weiteren als Vergleich mit den Regensburger Proben hinsichtlich ihres Mutationsstatus und ihrer chromosomalen Veränderungen zu den Auswertungen hinzugezogen werden.

2. Material und Methoden

2.1. Kooperationspartner

Die für diese Arbeit untersuchten Zellisolate aus Wächterlymphknoten, ebenso wie die Mikrodissektate aus Paraffingewebe, sowie alle dazugehörigen klinischen Daten der jeweiligen Patienten, wurden durch klinische Kooperationspartner bereitgestellt. Die beschriebenen *in vivo* Studien wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Melanie Werner-Klein durchgeführt.

Prof Dr. med C. Hafner	Uniklinik Regensburg Dermatologie 93053 Regensburg
PD Dr. med P. Rümmele	Uniklinik Regensburg Pathologie 93053 Regensburg
Prof Dr. med A. Ulmer	Uniklinik Tübingen Hautklinik 72076 Tübingen
Dr. M. Gerken	Tumorzentrum Regensburg 93053 Regensburg
Dr. rer. nat. M. Werner-Klein	Uniklinik Regensburg Immunologie 93053 Regensburg

2.2 Methoden

2.2.1 Lasermikrodissektion von Gewebe aus Primärtumor und Metastase

Mit Hilfe eines Mikrotoms bzw. Kryotoms werden max. 5 µm dicke Schnitte der in Paraffin eingebetteten Proben von Primärtumor und korrespondierenden Metastasen auf mit Polyethylen-Membran (1,35 µm) bespannten Objektträgern (für Referenzschnitte auf Glasobjektträgern) angefertigt. Die Schnitte werden zunächst 30 min im Trockenschrank bei 60 °C hochkant stehend erwärmt, was dazu dient, eine vollständige Trocknung des Schnittes zu gewährleisten, und damit ein Ablösen während der Färbung zu verhindern. Durch das hochkant stellen der Slides läuft zudem ein Großteil des enthaltenen Paraffins bereits ab, was die folgende Deparaffinisierung begünstigt. Anschließend wird 2 x für je 5 min in

100 % Xylol deparaffinisiert. Die Kernfärbung der Schnitte auf Folienslides erfolgt nach absteigender Alkoholreihe (100 %, 85 %, 70 % je 1 min) und Spülen mit destilliertem Wasser für 30 s in 0,1 % iger Hämatoxylinlösung (Mayer's), mit anschließender Bläuung in Leitungswasser für 5 min. Referenzschnitte werden zusätzlich mit 0,1 % Eosin gefärbt. Nach Spülen mit Aqua dest. werden die Schnitte in ansteigender Alkoholreihe dehydriert und im Fall der Laserschnitte ÜN getrocknet. Referenzschnitte werden für weitere 15 min in Xylol inkubiert und mit Eukitt eingedeckelt.

Die relevanten Tumorareale wurden mit Unterstützung von Frau Dr. Rümmele auf den Referenzschnitten identifiziert und markiert. Die entsprechenden Strukturen auf den Folienschnitten werden mit Hilfe eines Laser-Microbeam-Systems (PALM) dissektiert. Die durch den Laser ausgeschnittenen Folienstücke mit anhaftendem Tumorgewebe werden durch Laserimpulse in den Deckel eines PCR-Tubes katapultiert, in dem zur Anhaftung des Gewebes PCR-Öl vorgelegt ist. Dort findet nochmals eine mikroskopische Überprüfung statt, damit gewährleistet ist, dass die entsprechende Menge Tumormaterial für die folgende Amplifikation der genomischen DNA zur Verfügung steht. Im Idealfall werden pro Tube bis zu fünf Areale dissektiert, mit einer Gesamtfläche von ca. 100000 μm^2 .

Die Amplifikation der DNA erfolgt wie in Abschnitt **2.2.4.2** beschrieben.

Die Überprüfung der Qualität der amplifizierten DNA erfolgt wie in Abschnitt **2.2.5.1** beschrieben.

2.2.2 Mutationsanalyse

Das Genom sowohl mikrodisektierter Areale von PT und Met (Abschnitt **2.2.1**), als auch isolierter MCSP+ und gp100+ DCC wird auf Punktmutationen der Onkogene *BRAF* (Mutation V600E) und *NRAS* (Q61K) untersucht.

Dazu wird das primäre PCR-Produkt (Abschnitt **2.2.4.2**) wenn eine ausreichend gute Qualität der DNA nachgewiesen ist (Abschnitt **2.2.5.1**) als Template für eine PCR mit spezifischen Primern für die entsprechenden Genabschnitte von *BRAF* und *NRAS* eingesetzt.

Der PCR-Ansatz setzt sich zusammen aus:

4 μl	PCR-Puffer (10 mM MgCl_2 , 100 mM Tris (pH 8,5), 500 mM KCl, dNTP 1 mM)
2 μl	Primer 1
2 μl	Primer 2
1 μl	BSA
0,4 μl	Taq-Polymerase 5 U/ μl
31 μl	PCR- H_2O

dazu werden 2 μl Template-DNA gegeben.

Material und Methoden

Als Primer werden verwendet

- **BRAFmut**
- **NRAS61seb**

PCR Programm BRAF:

1	94°C	2 min	
2	60°C	30 s	
3	72°C	2 min	
4	94°C	15 s	
5	60°C	30 s	
6	72°C	20 s	wiederholen 4-6 15x
7	94°C	15 s	
8	60°C	30 s	
9	72°C	30 s	wiederholen 7-9 25x
10	72°C	2 min	

PCR Programm NRAS:

1	94°C	2 min	
2	54°C	30 s	
3	72°C	2 min	
4	94°C	15 s	
5	54°C	30 s	
6	72°C	20 s	wiederholen 4-6 14x
7	94°C	15 s	
8	54°C	30 s	
9	72°C	30 s	wiederholen 7-9 24x
10	72°C	2 min	

Zur Überprüfung der Qualität der PCR werden 2 µl des Amplifikates auf ein 1,5 % iges Agarosegel aufgetragen (Abschnitt **2.2.6**)

Liegt die gewünschte DNA-Bande auf dem Gel vor, wird das verbleibende Amplifikat mit dem PCR-Purification-Kit (Qiagen) nach Herstellerprotokoll aufgereinigt, und in 20 µl Elutions-Puffer des Herstellers aufgenommen.

Die Sequenzierung fand durch die Firmen Sequiserve (Vaterstetten / München) und seqlab (Göttingen) statt.

Die Elektropherogramme der Sequenzen wurden mit dem frei verfügbaren Sequence Alignment Editor BioEdit (www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html) ausgewertet.

2.2.3 Einzelzellanalyse

2.2.3.1 Lymphknotenaufbereitung zur Herstellung einer Einzelzellsuspension

Die Lymphknotenprobe wird im Probeneingangslabor der Pathologie vom diensthabenden Arzt in zwei Hälften geteilt. Eine Hälfte verbleibt zur histologischen Routineuntersuchung in der Pathologie und wird zur Konservierung des Gewebes nach der Aufteilung in Formalin eingelegt.

Die zweite Hälfte der Probe wird für die geplanten Einzelzellnachweise möglichst schnell weiterverarbeitet. Bis zur mechanischen Zerkleinerung zur Herstellung der Zellsuspension, wird die Probe in RPMI 1640 Medium bei 8 °C gelagert. Für die mechanische Zerkleinerung des Gewebes wird dieses zunächst manuell mit Skalpellen in kleine Stücke von ca. 2 x 2 mm geteilt. Dabei wird, wenn nötig überschüssiges Fettgewebe entfernt, welches die Qualität der Aufreinigung behindern könnte. Die Stücke werden einzeln nacheinander in Medicons (BD-Bioscience), Einsätzen der Medimaschine (Dako), disaggregiert. Diese Zerkleinerung wird in Zellkulturmedium (RPMI 1640) durchgeführt. Die Zellsuspension wird zunächst in einem 50 ml Falcon mit Hank's Salzlösung für 10 min bei 200 g und 4 °C von groben Verunreinigungen getrennt, der Überstand bis auf ca. 7 ml abgenommen und verworfen. Das Zellpellet wird resuspendiert, für die Dichtegradientenzentrifugation in ein 15 ml Falcon überführt und dort vorsichtig auf Percoll 60 % geschichtet. Beim Zugabe der Suspension ist darauf zu achten, dass es zu keiner Vermischung der beiden Phasen kommt, und sich eine klare Trennlinie bildet. Die Zentrifugation erfolgt für 20 min bei 1000 g und 4 °C. Die mononukleären Zellen trennen sich dabei von den Erythrozyten und sammeln sich in der Interphase. Sie werden in ein neues 50 ml Falcon überführt und mit PBS für weiter 10 min bei 500 g und 4 °C gewaschen, um verbliebene Percollreste zu entfernen. Das Zellpellet wird nach Abnahme des Überstandes je nach Größe in 0,5 bis 5 ml PBS resuspendiert, und die enthaltene Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Im Anschluss werden die Zellen auf die jeweiligen Versuche aufgeteilt.

2.2.3.2. Immunfluoreszenzfärbung gegen MCSP

Wenn in der Lymphknotenprobe nach Herstellung der Suspension ausreichend Zellen enthalten sind, werden bis zu 3 Millionen Zellen mit dem murinen monoklonalen Antikörper 9.2.27 gegen MCSP gefärbt. Zunächst wird in einem 1,5 ml Eppendorf-Tube der Überstand abzentrifugiert und abgenommen (500 g für 5 min für alle Zentrifugations- und Waschschrte der Färbung). Danach wird das Pellet in 95 µl AB-Serum (10 % in PBS mit 2 % Pepton) für 10 min bei 8 °C auf einem Schüttler inkubiert, um die unspezifischen Bindungsstellen abzublocken. Danach folgt die Zugabe von 5 µl (25 µg/ml) des primären Antikörpers 9.2.27 (monoklonaler muriner Antikörper) und eine erneute Inkubation auf dem Schüttler für 10 min. Die Suspension wird abzentrifugiert und das Pellet in 500 µl PBS/Pepton (2 %) gewaschen. Die Färbung mit dem Sekundärantikörper findet wiederum in AB-PBS/Pepton (98 µl) für 10 min auf dem Schüttler statt. Als sekundärer Antikörper werden 1,5 µl des Cy3 konjugierten Ziege anti Maus IgG (Dianova), (75 µg/ml) verwendet. Der Überstand wird wiederum zunächst entfernt und das Pellet mit PBS/Pepton und nochmals mit PBS gewaschen. Zuletzt wird das Pellet in 200 µl PBS aufgenommen, um den Nachweis MCSP+ Zellen durchzuführen.

2.2.3.3 Isolation positiver Einzelzellen

Die gegen MCSP gefärbten Zellen werden direkt auf die Felder eines 8-Feld-Objektträgers aufgetragen und sedimentieren dort für ca. 15 min. Um ein Anhaften der Zellen auf der Oberfläche zu verhindern wurde diese zuvor mit FCS beschichtet. Die Felder werden am verwendeten Invertmikroskop (Zeiss) bei 20-facher Vergrößerung nach fluoreszierenden Zellen durchsucht (Cy3) und positive Zellen in ein freies, mit PBS beladenes Pickfeld überführt. Die Isolation positiver Zellen geschieht mit Hilfe eines Mikromanipulators mittels einer dünnen Glaskapillare. Nach erneuter Überprüfung der Fluoreszenz im Pickfeld um festzustellen, ob die richtige Zelle überführt wurde, wird die Zelle mit einer 2 µl Pipette unter Sicht von Hand aufgenommen und in ein bereitgestelltes PCR-Tube mit vorbereitetem Lysispuffer (4 µl m-Trap Lysis-Buffer; 0,4 µl (10 ng) tRNA) überführt. Die isolierten Zellen werden bis zum Abschluss des Screenens auf Eis gehalten und danach bei -80 °C gelagert.

2.2.4 Isolation und Anreicherung von cDNA und DNA aus Einzelzellen

2.2.4.1 Isolierung und Amplifikation von mRNA mit dem PNA-Protokoll

(Standardprotokoll der Arbeitsgruppe, hier wiedergegeben nach C. Hartmann, 2006)

Zu den in Abschnitt 2.2.3.3 beschriebenen isolierten Einzelzellen werden nach Auftauen PNAs und Protease zugegeben. Je Ansatz 1 µl Lysispuffer : Protease 1:20 und 1 µl PNA. Die Proben werden zum Aufschluss und zur Inaktivierung von RNasen einem Temperaturprogramm in der PCR-Maschine unterzogen (10 min 45 °C, 1 min 70 °C, 15 min 22 °C), was auch zum Annealing der PNAs dient. Pro Ansatz werden im Anschluss 4 µl Streptavidin-Beads zugefügt, und die Proben 45 min bei Raumtemperatur gerollert.

Zu jeder Probe werden 10 µl cDNA-Igepal-Waschpuffer gegeben, die Beads mittels eines Magnetständers an der Gefäßwand immobilisiert und der Überstand abgenommen. Dieser wird zur Aufarbeitung der genomischen DNA in ein silanisiertes PCR-Tube, in das 0,8 µl Polyacrylamid-Carrier vorgelegt sind, überführt. Der Waschschrift wird mit 20 µl cDNA-Tween-Waschpuffer und anschließend mit 20 µl cDNA-Igepal-Puffer wiederholt. Beide Überstände werden ebenfalls gesammelt und mit dem ersten vereinigt. (weitere Behandlung Abschnitt 2.2.4.2)

Zur cDNA Synthese werden die verbliebenen Beads mit der gebundenen RNA in 2 µl 5x Reverse Transcription-Puffer, 1 µl DTT (0,1 M), 0,5 µl Igepal (10 %), 0,5 µl Wasser und 6 µl Primer resuspendiert. Folgende Primerkombinationen (a 3 µl) werden verwendet:

- **CFL15CT24 (100 µM)**
- **CFL5C8 (200 µM)**

Die Primer werden für 10 min bei Raumtemperatur angelagert, anschließend 2 µl 5x Reverse Transcription-Puffer, 1 µl DTT (0,1 M), 1 µl dNTPs (10 mM), 5 µl Wasser und 1 µl Superscript II Reverse Transcriptase zugegeben und die Reaktionsgefäße 45 min bei 44 °C im Hybridisierungssofen rotiert.

Nach der cDNA-Synthese werden die Beads am Magneten in 20 µl Tailingwaschpuffer gewaschen, in 10 µl Tailing-Mix resuspendiert (1 µl (40 mM) MgCl₂, 1 µl (1 mM) DTT, 1 µl (2 mM) dGTP, 0,5 µl (200 mM) KH₂PO₄, 6,5 µl H₂O) und der Ansatz mit 40 µl PCR-Öl überschichtet. Eine PCR-Maschine wird auf 94 °C vorgewärmt und die Proben darin 4 min denaturiert. Im Anschluss werden sie direkt auf Eis gestellt, 0,8 µl (11,2 U) Terminal-Deoxynukleotid-Transferase (TdT) zugegeben und die Tailingreaktion bei 37 °C für 60 min durchgeführt. Nach Inaktivierung der TdT bei 70 °C für 5 min erfolgt die Zugabe von 4 µl Expand-Long-Template-Puffer 1, 7,5 µl Formamid 20 % und 24 µl H₂O. Die Proben werden in die PCR-Maschine gestellt und das LIB-Programm gestartet. Bei Erreichen der 78 °C werden 2,4 µl **CP2-Primer** (24 µM), 1,75 µl dNTPs (10 mM) und 1,5 µl Expand Long Template PolMix (5,25 U) zugefügt.

LIB-PCR-Programm für die cDNA Primäramplifikation

1	78°C	30 s	
2	94°C	15 s	
3	65°C	30 s	
4	68°C	2 min	wiederholen 2-4 19x
5	94°C	15 s	
6	65°C	30 s	
7	68°C	2,5 min + 10 s je Zyklus	wiederholen 5-7 20x
8	68°C	7 min	
9	4°C	∞	

Das PCR-Produkt ist bei -20 °C stabil und dient als Ausgangsmaterial für alle weiteren Untersuchungen der cDNA der Einzelzellen.

2.2.4.2 Einzelzell-PCR

(Standardprotokoll der Arbeitsgruppe, hier wiedergegeben nach C. Hartmann (2006) und B. Polzer (2006))

a) Aufarbeitung der genomischen DNA parallel zur mRNA

Die genomische DNA aus den gewonnenen Überständen der mRNA-Waschschriffe (Abschnitt **2.2.4.1**) wird mit 120 µl 100 % igem Ethanol über Nacht bei -20 °C gefällt. Die Fällung wird für 45 min bei 14000 rpm und 4 °C abzentrifugiert, die Flüssigkeit bis auf 10 µl abgenommen und durch 180 µl 70 % igen Ethanol ersetzt. Die Proben werden 10 min bei Raumtemperatur geschüttelt und anschließend 10 min bei 18000 g zentrifugiert. Dieser Waschschriff wird zweimal wiederholt, danach wird der Alkohol komplett abgenommen, das

Material und Methoden

Pellet kurz getrocknet und anschließend in 3,48 µl Wasser über Nacht auf dem Schüttler bei Raumtemperatur rückgelöst. Dazu werden 0,5 µl One-Phor-All-Puffer (OPA), je 0,13 µl Tween 10 % und Igepal 10 % sowie 0,26 µl Proteinase K (10 mg/ml) zugegeben und der Verdau für 15 h bei 42 °C in der PCR-Maschine durchgeführt. Das Enzym wird im Anschluss bei 80 °C für 10 min inaktiviert.

Die weitere Verarbeitung der DNA, beginnend mit dem Restriktionsverdau mit MseI läuft identisch für Einzelzellen aus Suspension sowie für Mikrodissektate, s.u.

b) Aufarbeitung der genomischen DNA aus Lasermikrodissektaten

Zu den in Abschnitt (2.2.1) beschriebenen Isolaten werden je Tube in den mit Probe und PCR-Öl befüllten Deckel des PCR-Tubes 4,5 µl Proteinase-K Verdau zupipettiert.

0,5 µl	OnePhorAll-plus Puffer (OPA)
0,13 µl	Tween 10 %
0,13 µl	Igepal 10 %
0,26 µl	Proteinase K (10 mg/ml)
3,48 µl	PCR-H ₂ O

Der Verdau findet für 15 h bei 42 °C im Brutschrank statt. Die Tubes werden dazu vorher nicht umgedreht, um Verlust von genetischem Material durch Anhaftung an den Gefäßwänden vorzubeugen. Erst vor der Inaktivierung der Proteinase für 10 min bei 80 °C wird die Flüssigkeit für 10 min bei 13500 g in die Tubes abzentrifugiert.

Die weitere Verarbeitung der DNA, beginnend mit dem Restriktionsverdau mit MseI läuft identisch für Einzelzellen aus Suspension sowie für Mikrodissektate, s.u..

Die Restriktion des Genoms der Einzelzelle erfolgt mit dem Enzym *MseI* (Schnittstelle T^ATAA). Dabei werden an den 5'- Enden TA-Überhänge generiert. Der Verdau findet bei 37 °C für 3 h in einer MJ-PCR Maschine statt. Im Anschluss wird das Enzym für 5 min bei 65 °C deaktiviert. Der Restriktionsansatz wird direkt zur mit Proteinase K verdauten Zelle pipettiert.

0,25 µl	OnePhorAll plus Puffer
0,25 µl	Mse I (50 U/µl)

Ein Adapter aus den zwei Oligonukleotiden **LIB1** und **ddMse11** (HPLC gereinigt) wird an die im Verdau generierten TA-Überhänge ligiert. Vor der Ligation wird die gezielte Zusammenlagerung des Adapters über Basenpaarung durch einen Temperaturgradienten mit schrittweiser Abkühlung von 65 °C auf 15 °C (je 1 min) in einer PCR-Maschine erzielt.

Der Preannealing Ansatz wird dazu zum Mse- verdauten Zellansatz gegeben. Im Preannealing Ansatz befinden sich:

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

Die Ligation läuft über Nacht bei 15 °C ab. Dazu werden nach dem Preannealing je 1 µl ATP (10 mM) und 1 µl T4 DNA-Ligase in den Ansatz pipettiert.

Nachdem die Adapter an die DNA Fragmente ligiert haben, wird der Ansatz mit dem eigentlichen PCR-Mix aufgefüllt.

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

Um für die Amplifikation in der PCR komplementäre LIB1-Primer Bindestellen zu generieren, wird der Ansatz zunächst für 3 min bei 68 °C inkubiert. Dadurch werden die 3'-rezessiven Enden der Adapter-Fragment-Konstrukte ergänzt.

Das generierte primäre Amplifikat ist bei -20 °C stabil. Es dient als Ausgangsmaterial für alle weiteren Untersuchungen am Genom der Einzelzellen.

PCR-Programm für die primäre Amplifikation der DNA

1	68°C	3 min	
2	94°C	40 s	
3	57°C	30 s	
4	68°C	1 min 30 s + 1 s je Zyklus	wiederholen 2-4 15x
5	94°C	40 s	
6	57°C – 68°C	30 s + 1°C je Zyklus	
7	68°C	1 min 45 s + 1 s je Zyklus	wiederholen 5-7 8x
8	94°C	40 s	
9	65°C	30 s	
10	68°C	1 min 53 s + 1 s je Zyklus	wiederholen 8-10 22x
11	68°C	3 min 40 s	

2.2.5 Kontroll-PCR

2.2.5.1 Kontroll-PCR für DNA

Die Qualität des primären PCR-Produktes aus den Einzelzellamplifikaten und den Mikrodisssektaten wird in der Arbeitsgruppe standardmäßig durch den Nachweis spezifischer genomischer MseI-Fragmente unterschiedlicher Länge bestimmt. Im Lauf dieser Arbeit

Material und Methoden

wurde das ursprüngliche Protokoll, das den Nachweis von zwei Fragmenten beinhaltet auf den Nachweis von drei Fragmenten ausgeweitet. Für die untersuchten Zellen in dieser Arbeit kamen beide Versionen zum Einsatz. Als qualitativ gut gelten nach Erfahrungswerten primäre PCR-Produkte, deren spezifische Kontroll-PCRs für mindestens zwei Fragmente positiv sind.

Der spezifische PCR-Ansatz besteht aus

1 µl	PCR-Puffer (10 mM MgCl ₂ , 100 mM Tris pH 8,5, 500 mM KCl, dNTP 1 mM)
0,5 µl	Primer 1
0,5 µl	Primer 2
0,25 µl	BSA
0,1 µl	Taq-Polymerase 5 U/µl
7,75 µl	H ₂ O

dazu jeweils 0,5µl template DNA.

Als Primerpaare werden verwendet:

Für Einzelzellamplifikate Kombinationen aus zwei bzw. drei der folgenden Primer:

- **p53 Exon 2/3** (TP53)
- **p53 Exon 8/9** (TP53)
- **CK 19** (Pseudogen KRT19P1)
- **BCRTT** (BCR1)

Für lasermikrodissektierte Proben:

- **D16S485**
- **D5S500**
- **D16S8040** (humane Mikrosatellitenmarker)

PCR-Programm für die Kontroll-PCR von DNA und cDNA

1	94°C	2 min	
2	58°C	30 s	
3	72°C	2 min	
4	94°C	15 s	
5	58°C	30 s	
6	72°C	20 s	wiederholen 4-6 15x
7	94°C	15 s	
8	58°C	30 s	
9	72°C	30 s	wiederholen 7-9 25x
10	72°C	2 min	

2.2.5.2 Kontroll-PCR für cDNA

Zur Überprüfung der Qualität der unter **2.2.4.1** beschriebenen cDNA-Anreicherung aus den isolierten Einzelzellen wird das PCR-Programm und der beschriebene PCR-Ansatz von **2.2.5.1** zusammen mit den folgenden drei Primerkombinationen angewendet:

- **EF1a** (*EEF1A1*)
- **β -Aktin** (*ACTB*)
- **GapDH** (*GAPDH*)

2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese

Die PCR-Produkte werden durch Gelelektrophorese aufgetrennt. Die universell verwendete Gelkonzentration beträgt 1,5 % Agarose in TBE. Die PCR-Proben werden mit 2 μ l Dye (0,3 % Orange G, 25 % Ficoll in TBE) gemischt und in die Geltaschen geladen. Das Elektrophorese-Netzgerät wird auf 160 V, 400 mA eingestellt und die Proben 45 min mit einem Horizontal-Gelelektrophorese-System aufgetrennt. Auf einem UV-Schirm wird das Gel zur weiteren Auswertung und Dokumentation digitalisiert.

2.2.7 Genexpressionsanalysen

Die Expression melanozytärer sowie Stammzell-assoziiierter Marker in den isolierten MCSP+ Einzelzellen wird über PCR-Analysen der transkribierten und amplifizierten (**Abschnitt 2.2.4.1**) cDNA untersucht. Die Ansätze für die PCR wurden analog zu der Kontroll-PCR für DNA und cDNA (**Abschnitt 2.2.5.1 und 2**) pipettiert.

Als Primerpaare werden verwendet:

Zum Test der Expression melanozytärer Marker:

- **HMB45 (auf gp100)** (*PMEL*)
- **MelanA** (*MLANA*)
- **S100** (*S100B*)
- **MCSP** (*CSPG4*)
- **TRP2** (*DCT*)

Zum Test der Expression Stammzell-assoziiierter Marker:

- **ABCB5** (*ABCB5*)
- **CD271** (*NGFR*)
- **Nestin** (*NES*)
- **Jarid1B** (*KDM5B*)

Material und Methoden

Als PCR-Programm wurde für **TRP2** verwendet:

1	94°C	2 min	
2	58°C	30 s	
3	72°C	2 min	
4	94°C	15 s	
5	58°C	30 s	
6	72°C	20 s	wiederholen 4-6 15x
7	94°C	15 s	
8	58°C	30 s	
9	72°C	30 s	wiederholen 7-9 25x
10	72°C	2 min	

Als PCR-Programm für **alle übrigen Marker**:

1	94°C	2 min	
2	62°C	30 s	
3	72°C	2 min	
4	94°C	15 s	
5	62°C	30 s	
6	72°C	20 s	wiederholen 4-6 15x
7	94°C	15 s	
8	62°C	30 s	
9	72°C	30 s	wiederholen 7-9 25x
10	72°C	30 s	

2.2.8 *in vivo* Studien zur Tumorigenität MCSP+ Zellen

2.2.8.1 Zellkultur von Melanomzelllinien zur Etablierung der Transplantationsmethode

Die Zelllinien für die Etablierung der subkutanen Einzelzellinjektionen *in vivo* werden in RPMI 1640 Medium (2 mM L-Gut, 10 % FCS, 1 % Pen/Strep) in 75 ml Zellkulturflaschen bis zum Erreichen der Konfluenz kultiviert. Nach Ansetzen der Kultur werden die Zellen ein- bis zweimal passagiert, um eine ausreichende Vitalität sicherzustellen. Sowohl für die Passagen als auch für das Abernten zur Einzelzellisolation werden die Zellen mit Trypsin abgelöst und für die folgende Isolation der Einzelzellen einmal mit PBS gewaschen und in PBS aufgenommen. Die Isolation einzelner Zellen für die Injektionen *in vivo* wird am Invertmikroskop (Zeiss) im Hellfeld bei zehnfacher Vergrößerung mittels Mikromanipulator durchgeführt (Abschnitt 2.2.3.3). Die Anzahl der Zellen in den *Wells* wird jeweils vor Injektion am Mikroskop überprüft.

2.2.8.2 Beschichtung von Mikrotiterplatten für die Anreicherung der Einzelzellen

Die isolierten Einzelzellen für die *in vivo* Transplantationen werden, in der für eine Injektion vorgesehenen Zahl, in Vertiefungen von Mikrotiterplatten (Terrassaki-96 Well) überführt. In den Vertiefungen für die Aufnahme der Zellen sind je 10 µl PBS vorgelegt, in den umgebenden Wells je 20 µl. Das Auffüllen umgebender Wells dient dazu, in der geschlossenen Platte bis zur Injektion eine gesättigte Wasserdampfatosphäre zu schaffen, die das mögliche Austrocknen bzw. die zu starke Reduktion der Flüssigkeit in den Wells mit

Einzelzellen verhindert. Für die subkutanen Injektionen ist das vorgegebene Volumen an PBS möglichst genau einzuhalten.

Um ein Anhaften der isolierten Zellen in den Wells zu verhindern, werden diese zuvor mit PolyHema beschichtet.

Dazu werden 2,4 g Poly-Hydroxy-Ethyl-Methyl-Acrylat (PolyHema, Sigma) in 20 ml 95 % igem Ethanol bei 65 °C auf dem Schüttler für ca. 8 h gelöst. Anschließend werden 80 ml 95 % iger Ethanol (RT) zugegeben und gut gemischt. Diese Lösung ist bei 4 °C haltbar.

In die markierten Vertiefungen auf der Mikrotiterplatte werden unter sterilen Bedingungen 20 µl PolyHema pipettiert und offen unter Reinstraumbedingungen ÜN getrocknet. Die getrockneten Platten können verschlossen bei 4 °C gelagert werden. Sie werden vor dem Verpacken unter UV-Licht nochmals für 20 min sterilisiert.

2.2.8.3 Subkutane Transplantation *in vivo*

Die Injektionen der isolierten Einzelzellen in vivo, die Überprüfung des Tumorwachstums, die Euthanasie der Tiere und der Verdau der Maustumore zur Generierung einer Zellsuspension wurden in Kooperation mit Dr. Melanie Werner-Klein vorgenommen.

Die Zellen der verwendeten Melanomzelllinien bzw. die MCSP+ Patientenzellen werden mit dem Mikromanipulator isoliert (Abschnitt **2.2.3.3**) und in beschichtete Vertiefungen von Mikrotiterplatten überführt. Von dort werden die Zellen mit dem gesamten enthaltenen PBS-Volumen (20–25 µl) in eine Insulin-Spritze (Microfine, 29G, U.50) aufgesogen, in der bereits 30 µl 50 % iges Matrigel vorgelegt sind. Direkt im Anschluss werden die Zellen aus der Spritze ohne weiteres Mischen oder Entfernen von Luftblasen (Gefahr des Verlusts der Einzelzellen) subkutan unter die Rückenhaut einer NSG-Maus gespritzt. Dazu wird vor dem Injizieren unter der Haut durch vorsichtiges Hin- und Herbewegen eine kleine Tasche ausgeformt.

Die Tiere werden vor der Injektion mit einer vollantagonisierbaren Narkose (Narkose: Midazolam 5 mg/kg KG, Fentanyl 0,05 mg/kg KG, Medetomidin 0,5 mg/kg KG, i.p. und Antagonist Flumazenil 0,5 mg/kg KG, Atipamezol 2,5 mg/kg KG, Naloxon 1,2 mg/kg KG s.c.) betäubt. Die Injektionsstelle wird enthaart und mit Jod desinfiziert. Die Tiere werden nach der Injektion im ein- bis zweiwöchentlichen Rhythmus auf das Wachstum eines s.c. Tumors hin palpiert. Die tumortragenden Tiere werden euthanasiert wenn der Tumor einen Durchmesser von max. 1,2 cm erreicht hat.

2.2.8.4 Tumorverdau und Typisierung von Einzelzellen aus Maustumoren

Der Tumorverdau findet in der Reinstwerkbank unter sterilen Bedingungen statt. Dazu wird das Gewebe in 1 ml Basalmedium (250 ml DMEM, 250 ml Ham's F12, 10 nM Hepes, 5 ml Pen/Strep, 1 % BSA, 10 µg/ml Insulin) mit 10 µl DNase (19 µg/ml) überführt, um die Austrocknung zu verhindern. Dort wird er zunächst mechanisch mit Skalpellen zerkleinert. Unter Auf- und Abpipettieren, um die kleinen Gewebeteile zu lösen, wird 9 ml Verdaumedium (10 ml Basalmedium, 0,33 mg/ml Collagenase, 100 µg/ml Hyaluronidase, 10 ng/ml EGF, 0,1 mg/ml DNaseI) zugegeben und für 20 min bei 37 °C inkubiert. Dabei wird die Lösung mit der Pipette nach der Hälfte der Zeit nochmals durchgemischt. Nach dem Verdau wird die Suspension mit einer 10 ml Pipette erneut gemischt und in ein 50 ml Falcon überführt. Die Petrischale wird mit 10 ml PBS gespült und das Volumen ebenfalls in das Falcon überführt. Danach wird für 3 min bei RT zentrifugiert (80 x g) um Organoide und unverdaute Zellen abzutrennen. Der Überstand mit den Einzelzellen wird in ein neues 50 ml Falcon überführt und für 4 min bei Raumtemperatur mit 350 x g zentrifugiert. Das Pellet wird in max. 1 ml Basalmedium oder PBS aufgenommen, über einen 40 µm Filter gegeben und das genaue Volumen zum anschließenden Zählen der Zellen in der Neubauer-Kammer bestimmt.

Aus der Zellsuspension des Tumors von Maus 91-0 wurden im Rahmen dieser Arbeit MCSP+ Einzelzellen aus der Färbung in Suspension (Abschnitt **2.2.3.2**) des verdauten Tumors isoliert, und die cDNA / DNA isoliert und amplifiziert (Abschnitt **2.2.4**).

Die Bestimmung der Qualität des entstandenen primären Amplifikates der DNA, sowie die Typisierung der Zellen auf humanen oder murinen Ursprung, wurden in Kooperation von Dr. Melanie Werner-Klein durchgeführt.

2.2.9 Komparative genomische Hybridisierung (CGH)

Die folgenden Methoden zur Durchführung der komparativen genomischen Hybridisierung werden standardmäßig in der Arbeitsgruppe angewandt. Hier wiedergegeben nach O. Schmidt-Kittler (2003) und B. Polzer (2006)

2.2.9.1 Lymphozytenkultur und Präparation von Metaphasenchromosomen

20 ml Blut eines gesunden männlichen Spenders werden in Lymphozyten-Kulturmedium (250 ml RPMI Medium ohne L-Glutamin, 15 % FCS, Penicillin 200 U/ml, Streptomycin 200 U/ml, L-Glutamin 2 mM, 3 mg Phytohemagglutinin) in 10 ml Kulturflaschen über drei Nächte bei 37 °C in einem CO₂-Brutschrank inkubiert. Die Kulturen werden dabei jeden Tag ein bis zweimal vorsichtig bewegt, um ein Anhaften der Zellen am Flaschenboden zu

vermeiden. Eine Stunde vor dem Ernten der Zellen wird den Kulturen je 100 µl Colcemidlösung (10 µg/ml) zum Arretieren der Zellteilung in der Metaphase zugesetzt. Die Kulturen werden in ein 15 ml Falcon überführt und durch Zentrifugation pelletiert. Anschließend quellen die Zellen 8 min in 10 ml hypotoner Lösung KCl (75 mM) und werden nach erneuter Zentrifugation vorsichtig mit je 10 ml eiskaltem Fixativ (Methanol : Eisessig 3:1) resuspendiert. Reste lysierter Erythrozyten werden durch Wiederholung der Waschschrte mit Fixativ entfernt. Dieser Vorgang wird nach Bedarf bis zu dreimal durchgeführt. Der Überstand über dem Pellet sollte eine klare Färbung aufweisen. Die Suspension kann bei -20 °C in 3 ml Fixativ einige Monate gelagert werden.

Für die Herstellung von Metaphasen-Objektträgern werden Glasobjektträger für mindestens eine Nacht in 100 % Alkohol entfettet und gereinigt. Vor dem Auftropfen der Metaphase-Lymphozyten wird der Alkohol abgegossen und die Objektträger in destilliertem Wasser bei -20 °C kurz gekühlt. Das Auftropfen der resuspendierten und in Methanol-Eisessig fixierten Lymphozytenkultur erfolgt mit einer Transferpipette aus einem Abstand von ca. einem halben Meter. Es werden zunächst Probeslides angefertigt und diese mikroskopisch kontrolliert, um Qualität und Anzahl an Metaphasen zu bestimmen. Danach kann, je nach Bedarf, mehr Suspension aufgetropft, die Suspension mit Fixativ stärker verdünnt, oder die Fallhöhe modifiziert werden (um das Aufplatzen der Kernmembran wenn nötig zu verbessern). Verbleibendes Fixativ wird durch Inkubation des Objektträgers auf einer Heizplatte bei ca. 40 °C verdampft. Dabei wird die Umgebungsluft künstlich, durch das Auflegen von feuchten Tüchern, mit Wasserdampf angereichert, was die Qualität der Metaphasenpräparationen verbessert. Durch die Trocknung der Slides kommt es zu einem sog. Alterungsprozess der Chromosomen, was die Qualität der Ergebnisse ebenfalls positiv beeinflussen soll. Nach Trocknung sind die Slides in 70 % Alkohol bei -20 °C für mehrere Monate lagerfähig.

2.2.9.2 Markierungs-PCR

Die primären PCR-Produkte der Einzelzellen werden unter Zugabe von Desoxynukleotid-Derivaten (Digoxigenin-11-dUTP zur Markierung der Einzelzelle und Biotin-16-dUTP zur Markierung der Referenz-DNA) reamplifiziert. Durch den Einbau der Derivate in die amplifizierte DNA können die Reamplifikate, nach der Hybridisierung auf humane Metaphasen (CGH Abschnitt 2.2.9.3), mittels geeigneter Detektionssysteme durch Fluoreszenz nachgewiesen werden. Der Reamplifikationsansatz besteht aus:

4 µl	Expand-Long-Template Puffer 1
8 µl	LIB1 10 µM
1,5 µl	7/8 dNTP-Mix (8,75 mM dTTP; je 10 mM dATP, dCTP und dGTP)
1,75 µl	1 mM Biotin-dUTP (Referenz) oder 1 mM Digoxigenin-dUTP (Tumor)
0,75 µl	Taq-Polymerase 5 U/µl
24 µl	H ₂ O

Material und Methoden

Zu den PCR-Mixen wird jeweils 1 µl primäres PCR-Produkt der Test- und Referenz-DNA als Template zugegeben. Die PCR läuft mit folgendem Programm (MJ-Research PCR-Maschine):

PCR-Programm Markierungs-PCR CGH

1	94°C	1 min	
2	60°C	30 s	
3	72°C	2 min	
4	94°C	30 s	
5	60°C	30 s	
6	72°C	2 min + 20 s je Zyklus	wiederholen 4-6 10x

Der **LIB1**- Primer wird nach der Reamplifikation durch einen Restriktionsverdau mit Trul (Isozym von MseI, Schnittstelle entsprechend T^ΔTAA) abgetrennt, um mögliche Interferenzen bei der CGH auszuschließen. Dazu werden zum Reamplifikat (40 µl) 2 µl Puffer R und 1 µl Trul (50 U/µl) zugegeben und bei 65 °C für 3 h inkubiert.

2.2.9.3 Vergleichende genomische Hybridisierung (CGH)

Test- und Referenz-DNA (Test: primäres PCR-Produkt der einzelnen disseminierten Tumorzellen; Referenz: Pool aus fünf bis zehn primären PCR-Produkten von normalen diploiden Zellen) werden wie in Abschnitt **2.2.9.2** beschrieben mit Biotin-dUTP bzw. Digoxigenin-dUTP markiert. Die Reamplifikate von Test- und Referenz-DNA werden über Nacht bei –20 °C gefällt:

Fällungsansatz:

40 µl	PCR-Produkt der Tumor-DNA
40 µl	PCR-Produkt der Referenz-DNA
80 µl	1 µg/µl C ₀ t-1 DNA
10 µl	10 µg/µl Heringssperm DNA
18 µl	3 M NaAc pH 5,2
400 µl	100% EtOH

Am folgenden Tag wird die präzipitierte DNA 45 min bei 4 °C und 18.000 g in der Tischzentrifuge abzentrifugiert, das DNA-Pellet einmal mit 700 µl EtOH 70 % gewaschen, erneut 10 min zentrifugiert und luftgetrocknet. Dabei soll das Pellet nicht komplett farblos werden. Das Pellet wird in 7 µl 100 % Formamid in einem Heizblock bei 42 °C 45 min unter Schütteln gelöst und mit 7 µl Master-Mix (4x SSC, 30 % Dextran Sulfat Mr > 500000) gemischt. Diese Mischung wird erneut für 30 min bei 42 °C unter Schütteln inkubiert. Die Denaturierung der DNA-Probe erfolgt in einem Heizblock bei 78 °C für 6 min. Die C₀t-1 DNA hybridisiert im Folgenden für 1 h bei 37 °C im Wasserbad mit der repetitiven DNA von Test und Referenz, um störende Einwirkung auf die CGH zu unterbinden.

Parallel zur Herstellung der oben beschriebenen DNA-Probe wird ein geeigneter Metaphase-Objektträger (Abschnitt **2.2.9.1**) vorbereitet und die chromosomale DNA denaturiert. Dazu wird der Metaphase-Objektträger zunächst in 2x SSC Puffer equilibriert. In einem Wasserbad werden 100 ml 10 mM HCl auf 37 °C erwärmt, 50 µl Pepsin-Lösung (100 mg/ml in H₂O) zugegeben und der Metaphase-Objektträger 2 bis 4 min (abhängig von der Beschaffenheit der Metaphasenchromosomen) in der Pepsin-HCl Lösung inkubiert. Der Pepsinverdauprozess wird durch dreimaliges Waschen in PBS gestoppt. Mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 85 % und 100 % EtOH) wird der Objektträger dehydriert. In einem Wasserbad werden 100 ml Formamid-Lösung (70 ml 100 % Formamid, 10 ml 20x SSC, 20 ml H₂O, eingestellt auf pH 7,2) auf 70 °C erhitzt und der Metaphase-Objektträger darin für 1 min 45 sec bis 2 min denaturiert. Die Denaturierungszeit ist durch Erfahrung zu ermitteln und insbesondere der Kondensation der Chromosomen und der Intensität des Pepsinverdaus anzupassen. Der Metaphase-Objektträger wird durch eine erneute aufsteigende Alkoholreihe getrocknet und die zu hybridisierende DNA-Probe aufgebracht. Das Hybridisierungsfeld wird durch ein 18 x 18 mm großes Deckgläschen abgedeckt und begrenzt sowie mit großzügig aufgebrachtem Montagekleber (Fixogum) luftdicht verschlossen. Die Hybridisierung läuft über zwei bis drei Nächte in einem Wasserbad bei 37 °C ab, wobei darauf zu achten ist, dass das Fixogum durch Kondenswasser nicht gelöst und die DNA-Probe gewaschen wird.

Nach der Hybridisierung wird vorsichtig das Deckgläschen über dem Hybridisierungsfeld abgenommen und das zähflüssige Dextransulfat durch kräftiges Schwenken auf dem Schüttler für 4x 5 min in 4x SSC mit 0,2 % Tween bei 42 °C und 3x 5 min in 1x SSC bei 60 °C entfernt. Vor dem Nachweis der Hybridisierung wird der Objektträger in 1x PBS + 0,2 % Tween bei 42 °C equilibriert und die Proteinbindungsstellen auf dem Glas für 30 min mit 1 ml 3 % Superblock-Lösung (1x PBS pH 7,5, 0,2 % Tween, 3 % BSA Fraktion V, 5 % FCS) abgesättigt. Die überschüssige Superblock-Lösung wird mit PBS + 0,2 % Tween weggespült und der Objektträger mit einem Gemisch aus 20 µl Anti-Digoxigenin-FITC (200 µg/ml), 2 µl Avidin-Cy 3.5 (1 mg/ml) und 180 µl 1 % Superblock-Lösung (1x PBS pH 7,5, 0,2 % Tween, 1 % BSA Fraktion V, 5 % FCS) für 1 h bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Dabei verhindert ein aufgelegtes 24 x 55 mm großes Deckglas die Austrocknung. Durch dreimaliges Waschen (je 5 min) bei 42 °C in 4x SSC + 0,2 % Tween werden die nicht gebundenen Fluorochrome entfernt und die Chromosomenbänderung anschließend mit einer zweiminütigen DAPI Färbung (1 ml 4x SSC + 0,2 % Tween, 10 µg DAPI (1 µg/ml)) dargestellt. Der Objektträger wird kurz mit destilliertem Wasser gespült, um bei der Trocknung die Bildung von Salzkristallen zu verhindern und unter Vectashield H-1000 eingedeckelt.

Die Auswertung der CGH erfolgt durch eine Kombination von Fluoreszenzmikroskopie (Leica DMRXA) und elektronischer Bildverarbeitung. (Alle Komponenten und die zugehörige Software von Leica). Bis zu 15 geeignete Metaphasen werden pro untersuchte Zelle mit den Fluoreszenzfiltern DAPI, FITC und Cy3 digitalisiert. Über die Software (Cyto Vision/Genus, Applied Imaging) wird zudem eine erste Vorsortierung der Chromosomen in ein Karyogramm-Schema erreicht.

Die Software vergleicht nach Normalisierung die entlang jedes Chromosoms integrierte Fluoreszenzintensität der Kanäle FITC (Test-DNA) und Cy 3.5 (Referenz-DNA). Das durchschnittliche Verhältnis aller ausgewerteten Metaphasen einer Hybridisierung kann grafisch in einem CGH-Profil dargestellt werden. Ist das Fluoreszenzintensitätsverhältnis FITC/Cy 3.5 größer als 1,25 bzw. kleiner als 0,75 liegt ein Gewinn bzw. Verlust im entsprechenden Chromosomenabschnitt vor.

Um kumulative mCGH-Profile der untersuchten Zellen darstellen zu können, werden die Aberrationen der einzelnen Analysen nach ISCN-Richtlinien (International System for Human Cytogenetic Nomenclature, 1995) in Tabellenform übertragen. Dies geschieht nach den Anforderungen des webbasierten und frei verfügbaren mCGH-Analyseprogramms Progenetix (Baudis and Cleary, 2001). Dieses Programm ermöglicht die visuelle Darstellung der gelisteten Aberrationen als CGH-Profil in Form eines Histogramms.

2.2.10 Statistische Berechnungen

Die in dieser Arbeit durchgeführten statistischen Testverfahren wurden mit Programmen durchgeführt, die im Internet kostenfrei zur Verfügung gestellt werden.

(Internetlink: <http://faculty.vassar.edu/lowry/VassarStats.html>).

- **Student´s t-Test:** Vergleicht Mittelwerte aus zwei normalverteilten Kollektiven
- **Chi-Quadrat-Test:** Vergleicht zwei (oder mehrere) Kollektive im Bezug auf eine Eigenschaft
- **Fisher´s-Exact-Test:** ersetzt den Chi-Quadrat-Test bei Kollektiven mit geringerer Fallzahl
- **Mann-Whitney (Wilcoxn) Rangsummentest:** überprüft die Signifikanz bei zwei unabhängigen Verteilungen

Die uni-(**Kaplan-Meier**) und multivariaten (**Cox-Regression**) Überlebensanalysen wurden mit dem Statistikprogramm SPSS für Windows durchgeführt

2.2.11 Hierarchische Ähnlichkeitsanalyse

Die Auswertung der CGH-Datensätze erfolgte mit der angegebenen Software analog zu der Beschreibung von Polzer (2006), und ist im Folgenden als Auszug wiedergegeben:

Die hierarchische Ähnlichkeitsanalyse der CGH-Datensätze erfolgte mit Hilfe der kostenfrei auf der Internetseite <http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm> erhältlichen Cluster und TreeView Software (Eisen, Spellman et al. 1998). Die angelegten CGH-Daten werden dafür in eine Microsoft-Excel-Tabelle eingetragen, die als Textdatei gespeichert wird (*.txt Dateiextension). Gewinne und Verluste der einzelnen Chromosomenregionen werden mit einem Zahlenwert ausgedrückt (+3 Gewinn, 0 keine Veränderung, -3 Verlust). Die auf diese Weise generierte Datei kann in das Cluster-Programm eingelesen und die Daten nach der Linkage-Clustering-Methode gruppiert werden. Das Ergebnis der hierarchischen Gliederung der Daten wird in TreeView sichtbar gemacht, wobei Gewinnen (+3) die Farbe Grün und Verlusten (-3) die Farbe Rot zugeordnet wird.

Gleichzeitig wird zu den Daten ein Dendrogramm angelegt, wobei der Abstand zu den am nächsten stehenden Knotenpunkten die Ähnlichkeit zwischen zwei Proben angibt. Im Dendrogramm benachbarte Datensätze sind sich also besonders ähnlich, wobei diese Vereinfachung nicht an den Grenzen übergeordneter Äste des Dendrogramms gilt.

In vielen veröffentlichten Arbeiten mit CGH-Daten werden die Chromosomen des untersuchten Organismus für biomathematische Analysen lediglich in die beiden Chromosomenarme aufgeteilt. Um gerade auf den größeren Chromosomen keine wichtige Information zu verlieren, wurde in dieser Arbeit (analog zur Arbeit von Polzer, 2006) ein anderer Ansatz gewählt. Die einzelnen Chromosomen wurden in möglichst kleine Abschnitte unterteilt. Auf diesem Weg können Fehler bei den Verwandtschaftsanalysen verhindert werden, da zum Beispiel eine Deletion am proximalen Ende eines Chromosomenarms nicht mit einer am distalen Ende gleichgesetzt wird.

Die Aufteilung der einzelnen Chromosomen in definierte Regionen ist in einer Tabelle im Anhang aufgeführt.

2.3 Verwendete Materialien

Enzyme und Antikörper

Anti-DIG-Flourescein.....	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Anti-Mouse-Cy3.....	Dianova, Hamburg
Avidin-Cy3.5.....	Biomol GmbH, Hamburg
Biotin-16-dUTP.....	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Collagenase.....	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DNA-Polymerase I (<i>E. coli</i>).....	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DNAseI.....	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Expand Long Template.....	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Hyaluronidase.....	Sigma Aldrich GmbH
Insulin.....	Sigma Aldrich GmbH
Mse I 50 U/µl.....	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Panscript Taq-Polymerase.....	Pan Biotech GmbH, Aidenbach
Pepsin.....	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Protease für Library.....	Activ Motif
Proteinase K.....	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
RNAse A.....	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Superscript II Reverse Transcriptase.....	Invitrogen, Karlsruhe
T4 DNA Ligase.....	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Taq Polymerase für CGH.....	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Terminal Deoxynukleotid Transferase.....	USB Europe GmbH, Staufeu
Tru I.....	Fermentas, St Leon-Rot
Trypsin.....	Pan Biotech GmbH, Aidenbach

Chemikalien

AB-Serum.....	Bio-Rad Medical Diagnostics GmbH, Dreieich
Acrylamid.....	VWR International, Ismaning
Agarose	Sigma Aldrich GmbH
Ammoniumpersulfat.....	AppliChem GmbH, Darmstadt
Bind-Silan.....	Sigma Aldrich GmbH
Biotin dUTP.....	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Bromphenolblau.....	Sigma Aldrich GmbH
BSA Fraktion V.....	Sigma Aldrich GmbH
BSA für PCR.....	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Colcemid.....	Invitrogen, Karlsruhe
DAPI.....	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
dATP, dCTP, dGTP, dTTP.....	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Dextran Sulfat.....	Sigma Aldrich GmbH
Dextranblau.....	Sigma Aldrich GmbH
Digoxigenin-11-dUTP stabil.....	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DMEM.....	PAA Laboraties GmbH, Cölbe

DNA-Größenmarker.....	New England Biolabs, Frankfurt am Main
DTT.....	Promega GmbH, Mannheim
EDTA.....	CLN GmbH, Niederhummel
EGF	CLN GmbH, Niederhummel
Eisessig 100%.....	VWR International GmbH, Ismaning
Eosin.....	VWR International GmbH, Ismaning
Ethanol unvergällt.....	CLN GmbH, Niederhummel
Ethanol vergällt.....	JT-Barker
Ethidiumbromid.....	Sigma Aldrich GmbH
Eukitt.....	Fluka
FCS für Zellkultur.....	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
FCS.....	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Formamid.....	VWR International GmbH, Ismaning
Ham's F 12.....	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Hämatoxylinlösung (Mayer's).....	Sigma Aldrich GmbH
Hank's Salzlösung.....	Biochrom AG
Harnstoff.....	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Hepes.....	Sigma Aldrich GmbH
Hering Sperm DNA.....	Invitrogen, Karlsruhe
Human Cöt-1 DNA.....	Invitrogen, Karlsruhe / Roche, Mannheim
Igepal.....	Sigma Aldrich GmbH
Isopropanol.....	Sigma Aldrich GmbH
Kaliumchlorid.....	Sigma Aldrich GmbH
Kaliumdihydrogenphosphat.....	VWR International GmbH, Ismaning
L-Glutamin.....	Pan Biotech GmbH, Aidenbach
Magnesiumchlorid.....	Sigma Aldrich GmbH
Magnesiumsulfat.....	Sigma Aldrich GmbH
Matrigel.....	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Methanol.....	CLN GmbH, Niederhummel
Montagekleber (Fixogum).....	Marabu, Tamm
Natriumacetat.....	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumchlorid.....	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumcitrat.....	Sigma Aldrich GmbH
Natriumhydroxid-Plättchen.....	VWR International GmbH, Ismaning
OPA Plus.....	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Orange G.....	Sigma Aldrich GmbH
PCR-Öl.....	Sigma Aldrich GmbH
Penicillin.....	Sigma Aldrich GmbH
Pepton.....	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Percoll.....	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Phytohämagglutinin M-From.....	Invitrogen, Karlsruhe
PNAs.....	Active Motif
PolyHema.....	Sigma Aldrich GmbH
RPMI ohne L-Glutamin.....	Pan Biotech GmbH, Aidenbach
Salzsäure (rauchend).....	Merck, Darmstadt
Streptavidin Beads.....	Activ Motif

Material und Methoden

Streptomycin.....	Sigma Aldrich GmbH
Trypanblau.....	Sigma Aldrich GmbH
Tween 20.....	Sigma Aldrich GmbH
Vectashield.....	Linaris, Bettingen am Main
Wasser (PCR).....	CLN GmbH, Niederhummel
Xylol.....	AppliChem GmbH, Darmstadt

Oligonukleotide und Primer

BRAF^{mut}
5' TCCAGACAACTGTTCAAAGT
3' CTCTTCATAATGCTTGCTCTG

NRAS^{S61seb}
5' ACACCCCCAGGATTCTTACA
3' TCCGCAAATGACTTGCTATT

CFL15CT24
CCCCCCCCCCCCCGGCCGAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT

CFL5C8
CCCCCCCCCCCCCGTCTACA(nnnnnnnnnn wobbels)

CP2-Primer
TCAGAATTCATGCCCCCCCCCCCCCCCC

LIB1
AGTGGGATTCCTGCTGTCAGT

ddMse11
TAACTGACAGddC

p53 Exon 2/3
5' CCAGATGAAGCTCCCAGAAT
3' GCAACTGACCGTGCAAGTCA

p53 Exon 8/9
5' AGGACCTGATTTCCTTACTGC
3' GAGGTCCCAAGACTTAGTAC

CK 19
5' GAAGATCCGCGACTGGTAC
3' TTCATGCTCAGCTGTGACTG

BCRTT
5' CACTAGTTGTCCCTGCTCAG
3' GTCCAGTCACTTGTGGTCTG

D16S485
5' AGTAATAATGTACCTGGTACC
3' AGGCAATTTGTTACAGAGCC

D5S500
5' CTTTTTACATTTTGGTACCTTG
3' GTATCGGTGAAATGCAACTA

D16S8040
5' CTGCAACAAGAAAGATACTCC

3' AGTGCCTCACAGGCTGCC

EF1a
 5' TGC CCC AGG ACA CAG AGA CT
 3' CTG TGT CGG GGT TGT AGC CA

β -Aktin
 5' GTGGGGCGCCCCAGGCACCA
 3' CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC

GapDH
 5' CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC
 3' GCCATCACGCCACAGTTTCC

HMB45 (auf gp100)
 5' TCCAAAGTCCCAGGTGTAGG
 3' CCTCTTGCTCATTCCAGCTC

MelanA
 5' ATAAGCAGGTGGAGCATTGG
 3' GCTCATCGGCTGTTGGTATT

S100
 5' ATTCTGGAAGGGAGGGAGAC
 3' CGTGGCAGGCAGTAGTAACC

MCSP
 5' GTCTTTTGAGGCTGCCTGTC
 3' CTGTGTGACCTGGAAGAGCA

TRP2
 5' CCAGCTGGGAAACTGTCTGT
 3' AACCCTTCCAAAGCATTCT

ABCB5
 5' TTCATCCTCCGTGGCTTATC
 3' CATAGGCGATGTTCTCAGCA

CD271
 5' GAGGCACCTCCAGAACAAGA
 3' GCTGTTCCACCTCTTGAAGG

Nestin
 5' CAGGAGAAACAGGGCCTACA
 3' TGGGAGCAAAGATCCAAGAC

Jarid1B
 5' GGTGAGCCAAAAACCTGGTA
 3' AATCACAAACTCCCCAGCAC

Geräte

Brutschrank	(Heraeus BB15), Heraeus
CCD-Kamera (CGH)	Zeiss
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 200M, Zeiss
Heizblock	Thermomixer 5436, Eppendorf

Material und Methoden

Heizplatte	Kisker Biotech
Horizontal Gelelektrophorese	Peqlab
Hybridisierungsöfen	Biometra
Invertmikroskop	Axioskop 40, Zeiss
Kapillarenzieher	DMZ-Universal-Puller, Zeitz
Lasermikroskop	P.A.L.M., Bernried (Zeiss)
Magnetständer	Miltenyi, Biotech
Medimaschine	Medimachine, Dako
Mikromanipulator	Patchman NP2, Eppendorf
Mikrotom	Leica
MJR PCR-Maschine	ThermalCycler DNA-Engine2 Tetrad, Peltier
Neubauer Zählkammer	Brand, Wertheim
Schüttelinkubator	Eppendorf
Spannungsquelle (Agarose-Gel)	Kisker Biotech
Tischzentrifuge	Eppendorf
UV-Schirm	INTAS, Göttingen
Kamera (Geldokumentation)	INTAS, Göttingen
Wasserbad	Kisker Biotech (Lauda)
Zentrifuge (groß)	Eppendorf 5810R, Eppendorf

Verbrauchsmaterialien

Chamberslides	Fisher Scientific, Ingolstadt
Deckgläschen	Schubert & Weiß OMNILAB, München
Einwegskalpelle	ROTH
Falcon	Sarstedt
Filterspitzen	Biozym Vertriebs GmbH, Hess (Oldendorf)
Glas-Küvetten	Schubert & Weiß OMNILAB, München
Haft-Objektträger	CLN GmbH, Niederhummel
Hämatokrit Kapillaren	Brand GmbH & Co KG, Wertheim/Main
Insulinspritze	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Zellkulturflaschen	Sarstedt
Medicons	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Mikrotiterplatten (Terassaki)	Sigma Aldrich GmbH
Objektträger (Matrand)	ROTH
PCR purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Petrischalen	Schubert & Weiß OMNILAB, München
Pipetten	CLN GmbH, Niederhummel
Pipettierspitzen	Biozym Vertriebs GmbH, Hess (Oldendorf)
Polyethylenmembranen	P.A.L.M.-Mikrolaser technologies AG
Reaktionsgefäße 0,2 ml	CLN GmbH, Niederhummel
Reaktionsgefäße 1,5 ml	CLN GmbH, Niederhummel
Transferpipetten	Gilson

2.4 Abkürzungen

µl.....	Mikroliter
AB.....	engl. Antikörper
ABCB5.....	ATP-binding cassette sub-family B member 5
ALM.....	akrolentigonöses Melanom
BSA.....	engl. Rinderserum-Albumin
ca.	cirka
CD271.....	Nerve growth factor receptor
cDNA.....	Engl. copy DNA
CGH.....	engl. Vergleichende Genomhybridisierung
CTC.....	engl. Circulating Tumor Cell
DCC.....	engl. Disseminated Cancer Cell
DCCD.....	engl. Disseminated Cancer Cell Density
dd.....	Di desoxy-...
dGTP.....	Desoxy Guanosintriphosphat
DNA.....	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs.....	Desoxynukleotidtriphosphate
DTT.....	Dithiothreitol
dUTP.....	Desoxy Uracil Triphosphat
FCS.....	Fetales Kälberserum
g.....	Beschleunigung
gp100.....	Premelanosome Protein (Gen)
h.....	Stunde
HE.....	Hämatoxylin-Eosin
HMB.....	H uman M elanoma B lack = Ak ggn. gp100
	High molecular weight melanoma associated antigen
	(= MCSP)
HMW-MAA.....	
IH.....	Immunhistochemie
J.....	Ja
Jarid1B.....	Histon Demethylase Jarid1B (Gen/Protein)
LK.....	Lymphknoten
Lokal.....	Lokalisation
m.....	mit
MAPK/ERK.....	RAS-RAF-Mek-ERK-Stoffwechselweg
	M elanoma associated C hondroitin S ulfate
	P roteoglycan
MCSP.....	
melanA.....	melanA (Gen / Protein)
Met.....	Metastase
Min.....	Minute
Mio.....	Million
ml.....	Milliliter
Mut.....	mutiert
N.....	Nein
Nestin.....	ein TypVI Intermediärfilament Protein (Gen)

Material und Methoden

NM.....	noduläres Melanom
NSG.....	NOD scid gamma (immundef. Labormausstamm)
OA.....	Oberarm
OP.....	Operation
OPA.....	One-Phor-All Puffer
OS.....	Oberschenkel
Pat.....	Patient
Patho.....	Pathologie
PBS.....	Phosphate buffered saline
PCR.....	Polymerasekettenreaktion
Pen.....	Penicillin
Phän.	Phänotyp
PNA(s).....	P eptid N ucleic Acid (Plural)
PT.....	Primärtumor
RNA.....	Ribonukleinsäure
RPMI.....	Zellkulturmedium (R oswel P ark M emorial Institute)
RT.....	Raumtemperatur
s.....	Sekunde
S100.....	S100 calcium binding protein B
s.c.	subkutan
SSC.....	Saline-sodium-citrate-Puffer
SSM.....	superfiziell spreitendes Melanom
Strep.....	Streptomycin
TBE.....	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TCC.....	Tumor Cell Count
TD.....	Tumordicke
TdT.....	Terminal deoxynucleotidyl transferase
TRIS.....	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan Puffer
tRNA.....	Transfer RNA
TRP2.....	Dopachrome Tautomerase (Gen / Protein)
UA.....	Unterarm
ÜN.....	über Nacht
US.....	Unterschenkel
w.....	weiblich
wt.....	wildtyp = nicht mutiert

3. Ergebnisse

Ziel der Arbeit war die Charakterisierung disseminierter Tumorzellen (DCC) aus Wächterlymphknoten von Patienten mit malignem Melanom. Dazu wurde die Isolation der Zellen mit einem Antikörper gegen das melanomspezifische Zelloberflächenantigen MCSP in Suspension etabliert. Ein Kollektiv von Patienten wurde auf das Vorhandensein positiver Zellen hin untersucht, und mit den isolierten MCSP+ Zellen eine Probenbank für die anschließenden molekularen und funktionellen Untersuchungen an diesen Zellen aufgebaut. Lymphknotenproben gesunder Spender dienten dabei als Referenz. Aus den Proben des Kollektivs parallel isolierte gp100+ DCC, sowie gp100+ DCC aus einer Kooperation standen für molekulare Vergleiche mit den MCSP+ Zellen zur Verfügung. Klinische Verlaufsdaten der Patienten sowie die histopathologischen Befunde flossen in die Auswertung der Daten mit ein (**Abb. 4**).

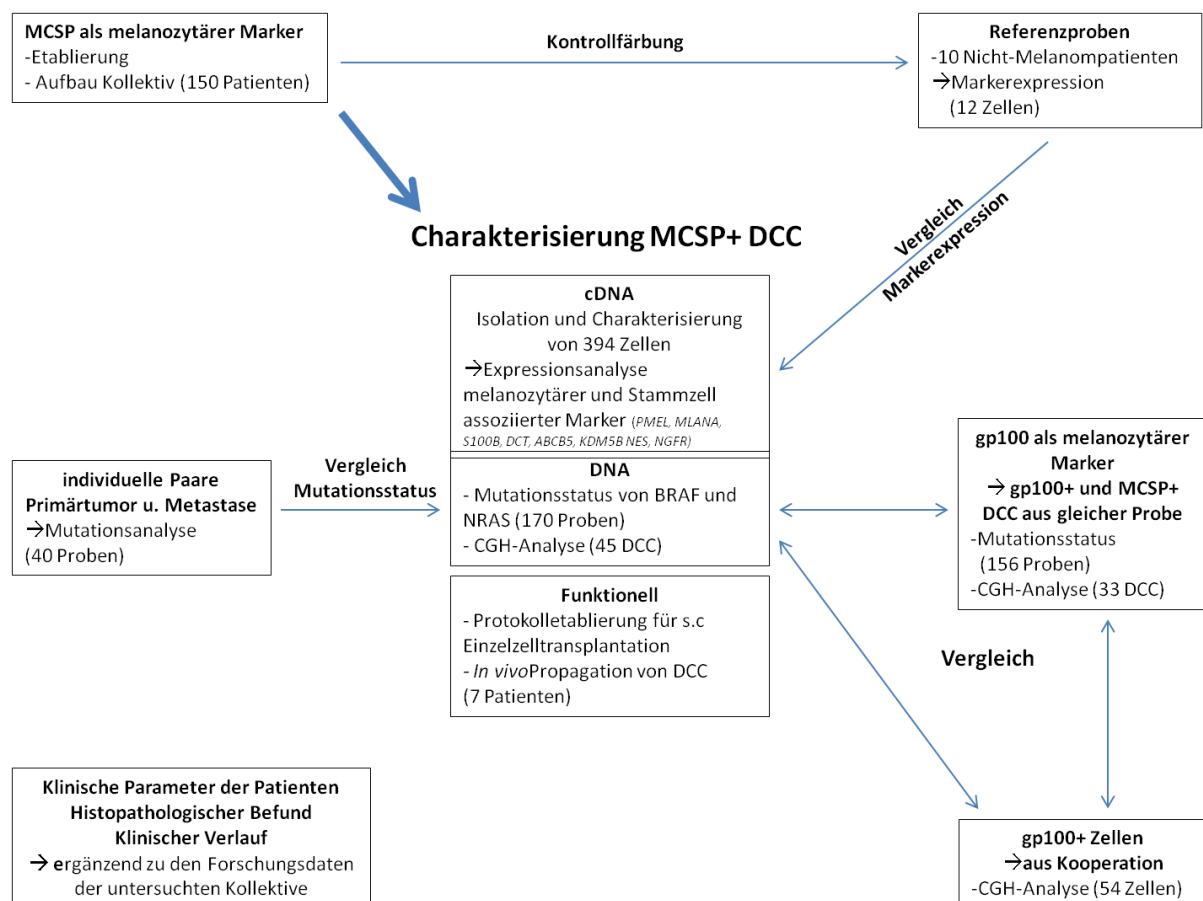


Abbildung 4: Experimentelles Vorgehen

3.1 Nachweis und Isolation disseminierter Tumorzellen in Wächterlymphknoten von Patienten mit malignem Melanom

Analysen an einzelnen isolierten DCC aus Wächterlymphknoten beim malignen Melanom in vorausgegangenen Studien und Kooperationen der Arbeitsgruppe (Ulmer et al., 2005) und (Ulmer 2013, eingereicht zur Publikation) waren bisher, aufgrund des verwendeten Antikörpers gegen das zytoplasmatische Antigen gp100, auf das Genom der Zellen beschränkt. Deshalb wurde in dieser Arbeit zunächst eine Immunfluoreszenzfärbung gegen das melanomspezifische, membranständige Antigen MCSP etabliert, und in Kooperation mit dem Lehrstuhl für Dermatologie des Uniklinikums Regensburg (Dr. Hafner, Dr. Hohenleutner) sowie dem Institut für Pathologie (Dr. Rümmele) ein Kollektiv an Patienten auf MCSP+ Zellen hin untersucht. Die detektierten positiven Zellen wurden isoliert und sowohl das Genom als auch das Transkriptom der Zellen global amplifiziert, um es für nachfolgende molekulare Analysen verwenden zu können.

Der Vorteil der angewendeten Methode lag darin, dass an dem biopsierten Wächterlymphknoten alle drei Nachweisverfahren: Histopathologie, gp100-Färbung (Immunzytochemie) und die im Rahmen dieser Arbeit etablierte Suspensionsfärbung gegen MCSP (Immunfluoreszenz) zum Einsatz kamen und somit ein Vergleich der Methoden für den Nachweis der Tumorlast im Lymphknoten möglich war.

3.1.1 Patientenkollektiv und angewendete Methoden für den Nachweis disseminierter Einzelzellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Gewebeproben aus Wächterlymphknoten von 200 Patienten mit malignem Melanom im Zeitraum zwischen September 2008 und Juni 2012 ausgewertet. Davon wurden die Proben von 150 Patienten selbst aufgearbeitet, 50 im Zuge der medizinischen Doktorarbeit von Veronika Naimer. Insgesamt wurden 253 Gewebeproben aufgearbeitet und untersucht. In 149 Fällen war jeweils ein Lymphknoten biopsiert worden, in 38 Fällen zwei und in drei Fällen drei Lymphknoten pro Patient. Von den Lymphknoten wiesen 19 keine ausreichende Zellzahl nach Aufbereitung auf und konnten dadurch nicht weiter untersucht werden. In acht Fällen stand ein zweiter Lymphknoten des Patienten zur Verfügung. Ein Patient wurde nachträglich aus der Studie ausgeschlossen, da es sich beim Primärtumor nicht um ein malignes Melanom sondern um einen Pinkus Tumor handelte. In die Studie eingeschlossen wurden damit 233 Gewebeproben von 189 Patienten.

Die klinischen Daten zu den Patienten (**Tabelle 2**) sind aufgrund externer Resektionen von Primärtumoren bisweilen nicht bei allen Patienten vollständig erfasst worden. Im Anhang

befindet sich eine detaillierte Auflistung der einzelnen Patienten und aller zugehörigen klinischen und molekularen Befunde.

Tabelle 2: Klinische Daten der untersuchten Patienten

Anzahl der Patienten	189	
Durchschnittsalter bei Diagnose	54	
(Bereich)	15 - 79	
Geschlecht	Anzahl	%
m	99	52
w	90	48
Tumordicke nach Breslow	Anzahl	%
keine Angabe	12	6
I (<1mm)	31	17
II (1mm - 2mm)	72	38
III (>2mm - 4mm)	44	23
IV (>4mm)	30	16
N-Status (Histopathologie)	Anzahl	%
N0	144	76
N1	45	24
Ulzeration	Anzahl	%
keine Angabe	40	21
Ja	49	26
Nein	100	53
Clark level	Anzahl	%
keine Angabe	36	19
1	0	0
2	8	4
3	42	22
4	95	51
5	8	4
Lokalisation Primärtumor	Anzahl	%
keine Angabe	7	4
Extremitäten	114	60
Rumpf	67	35,5
Kopf und Hals	1	0,5
Tumortyp	Anzahl	%
keine Angabe	7	3,7
keine nähere Spezifikation	58	30,5
SSM	58	30,5
NM	55	29,1
ALM	9	4,7
sonstige	2	1

Der biopsierte Wächterlymphknoten wird vom Pathologen in der Mitte geteilt. Eine Hälfte verbleibt im Institut für Pathologie zur histopathologischen Untersuchung. Am Uniklinikum Regensburg besteht diese aus einer Lamellierung des in Paraffin gebetteten Lymphknotens parallel zur Längsachse in 1 mm dicke Scheiben. Von jeder Schnittstufe wird ein HE-Schnitt sowie 3 Schnitte für immunhistochemische Färbungen gegen S100, MelanA und gp100 angefertigt. Die IH-Färbungen ergänzen im Fall einer positiven Befundung des HE-Schnittes

Ergebnisse

das Ergebnis. Bei negativem Befund werden die Blöcke in mindestens 5 weitere Stufen aufgeschnitten und untersucht. Als positiv wird ein LK gewertet, sofern in der IH-Färbung zumindest positive atypische Einzelzellen nachweisbar sind.

Aus der zweiten Hälfte des Lymphknotens wird für die DCC-Studien durch mechanische Zerkleinerung eine Einzelzellsuspension hergestellt, diese in mehreren Waschschritten gereinigt und durch eine Percolldichtegradientenzentrifugation angereichert. Dabei werden mononukleare Zellen von den Erythrozyten und Granulozyten abgeschieden.

Von der so gewonnenen Zellfraktion wurden, wenn genug Zellen enthalten waren, zwei bzw. drei Millionen Zellen gegen MCSP gefärbt. Von den verbliebenen Zellen wurden, je nach Anzahl, bis zu fünf Millionen reversibel auf Adhäsionsobjektträgern fixiert. Diese fixierten Zellen können bei -20 °C über längere Zeit gelagert werden. Sie werden im Rahmen einer weiteren Studie zum diagnostischen Nachweis gp100+ DCC verwendet. Von der MCSP gefärbten Zellsuspension wurden jeweils eine bzw. zwei Millionen Zellen mikroskopisch ausgewertet (**Abb. 5**).

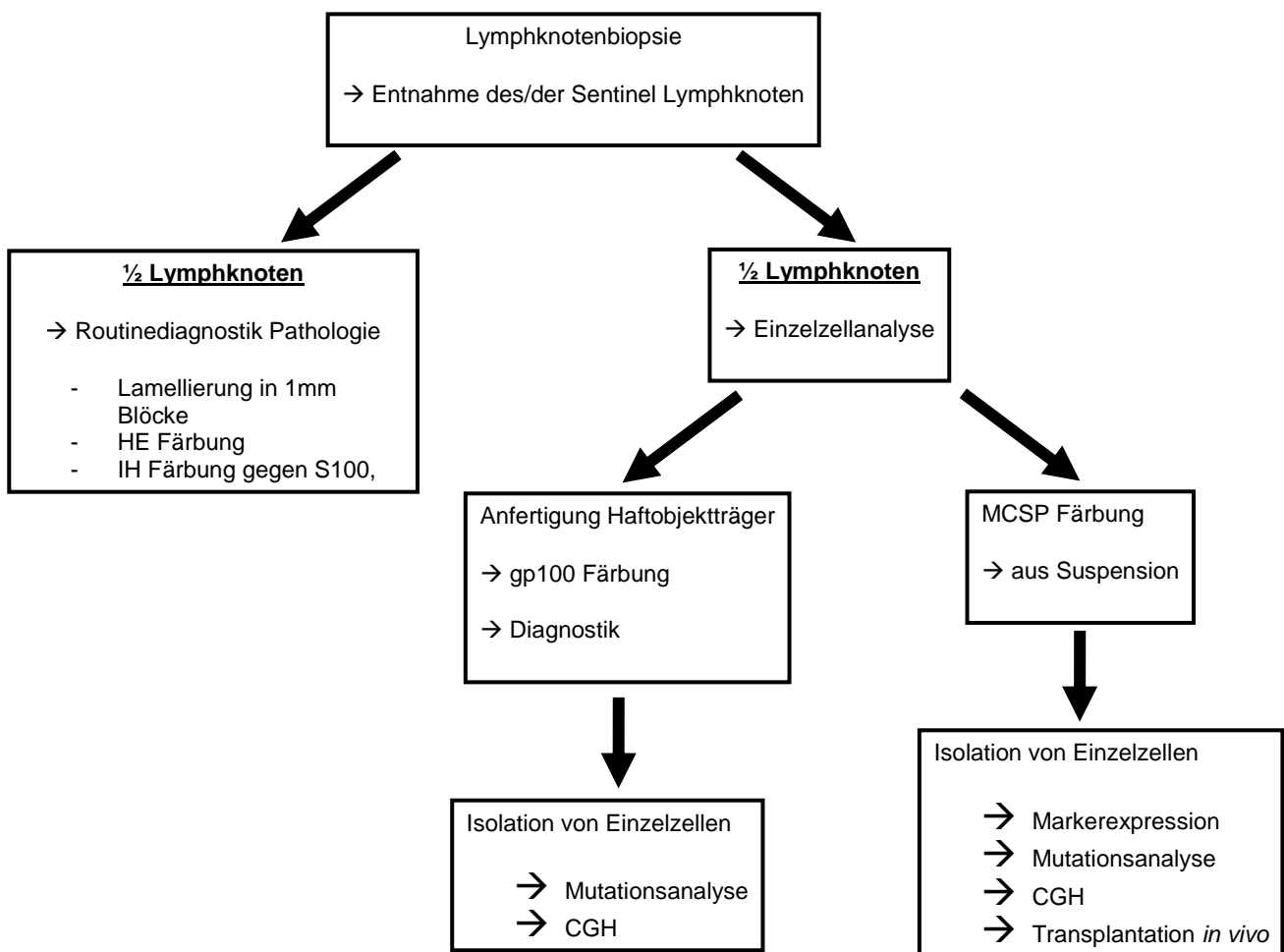


Abbildung 5: Aufteilung des Probenmaterials auf die durchgeführten Untersuchungen

Das Pfeildiagramm zeigt die Aufarbeitungsschritte an den biopsierten Lymphknoten, sowie die nach Einzelzellisolation in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen

3.1.2 Histopathologischer Nachweis der Tumorlast in Wächterlymphknoten

Von allen biopsierten Lymphknoten aus dem genannten Patientenkollektiv wurde eine Hälfte histologisch untersucht. Für 188 Patienten konnte ein Befund erstellt werden, in einem Fall enthielt das resektierte Gewebe nur Fett. Histologisch wurde in 23 % der Patienten (44 Patienten) ein Lymphknotenbefall festgestellt (**Abb. 6 A**). Ein Patient wird als N1 eingestuft, sobald in einem der biopsierten Lymphknoten eine Tumorlast nachweisbar ist. Als positiver Befund gelten bereits einzelne Tumorzellen, die auf den Schnitten durch Immunzytochemie eindeutig zu bestimmen sind.

Bei den 44 N1-Patienten wurden in 19 Patienten Mikro- (< 2 mm) und in 21 Makrometasen (> 2 mm) diagnostiziert. Zwei Patienten wiesen benigne Nävuszellen auf den untersuchten histologischen Schnittstufen auf, zwei weitere Patienten Zellnester, die als Tumorzellen eingestuft wurden (**Abb. 6 B**). Die Befunde der Nävus und Tumorzellnester wurden histologisch extern überprüft und ein zweites Gutachten erstellt.

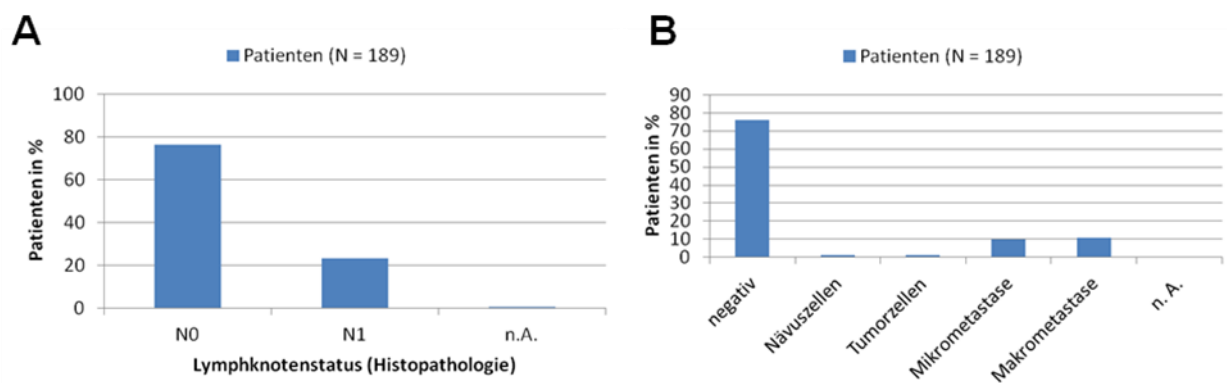


Abbildung 6: Histopathologische Befunde der untersuchten Patienten

- A) Dargestellt ist der Lymphknotenstatus der untersuchten Patienten in % unterschieden nach Stadium N0 und N1, sowie dem Anteil der nicht auswertbaren Patienten.
- B) Dargestellt ist der Anteil der unterschiedlichen histologischen Einstufungen der Lymphknoten der untersuchten Patienten in %.

3.1.3 Immunzytochemischer Nachweis von Tumorzellen durch das melanomspezifische Antigen gp100

Zellüberstände die aus der Aufarbeitung der Gewebeproben für DCC-Analysen resultieren, werden auf Haftobjektträgern fixiert, sofern sie nicht für den Nachweis MCSP+ Zellen verwendet werden (Abschnitt 1.4). Mit den fixierten Zellen wird der Nachweis gp100+ DCC durchgeführt. Das ermöglicht den in dieser Arbeit erstmals durchgeführten Vergleich von DCC, die durch beide Nachweisverfahren parallel aus den Proben isoliert wurden (**Abb. 5**). Für diese Arbeit wurden dazu ausschließlich die vitalen MCSP+ Zellen isoliert. Die Isolation gp100+ Einzelzellen aus Wächterlymphknoten läuft im Rahmen einer QM-Studie (davon 84

Ergebnisse

Patienten Promotionsarbeit Veronika Naimer). Dort isolierte Einzelzellen der immunzytochemischen Färbung gegen gp100 werden zum Vergleich mit den MCSP+ Zellen in mehreren der im Folgenden beschriebenen Experimente dieser Arbeit eingesetzt. Die jeweiligen Experimente wurden dazu parallel an Zellen beider Gruppen (MCSP+ und gp100+) durchgeführt.

Der Nachweis gp100+ Einzelzellen wird hier mit aufgeführt, um die Veranschaulichung der im Folgenden damit durchgeführten Versuche besser zu gewährleisten.

Insgesamt konnten bisher 138 der 200 Patienten auf gp100+ Einzelzellen getestet werden (**Tabelle 3**). 56 der untersuchten Patienten wiesen positive Zellen auf. Der DCCD-Wert lag zwischen 1 und 500000 Zellen pro Million, wobei die Werte über 5000 Zellen geschätzt, Werte darunter ausgezählt wurden. Der Median in den positiv getesteten Patienten lag bei 2 gp100+ Zellen pro Million (**Tabelle 3**).

Tabelle 3: Klinische Daten der Patienten aus dem Kollektiv Regensburg für die parallel zur MCSP Färbung auch der Nachweis von gp100+ Zellen durchgeführt wurde

Anzahl der Patienten	138	
Durchschnittsalter bei Diagnose	53	
(Bereich)	15 - 78	
Geschlecht	Anzahl	%
m	73	52,9
w	65	47,1
N-Status	Anzahl	%
N0	102	73,9
N1	35	25,4
nicht auswertbar	1	0,7
DCCD gp100	2	
Median	1 - 500000	
Bereich (von - bis)	Anzahl	%
positiv	56	40,6
negativ	82	59,4
DCCD MCSP in gp100+ Patienten	8	
Median	1 - 400000	
Bereich (von - bis)	Anzahl	%
Phänotyp MCSP in gp100+ Patienten		
negativ	39	28,3
große Zellen	30	21,7
kleine Zellen	69	50

3.1.4 Immunfluoreszenznachweis von Tumorzellen durch das melanomspezifische Zelloberflächenantigen MCSP

3.1.4.1 Etablierung einer Färbung gegen MCSP in Suspension

Für die Isolation von Einzelzellen aus den biopsierten Gewebeproben der Patienten wurde das membranständige Antigen MCSP (HMW-MAA) verwendet. Zur Detektion des Antigens wurde der monoklonale Antikörper 9.2.27 (Bumol and Reisfeld, 1982) eingesetzt. Dieser Antikörper erwies sich bereits als geeignet, zirkulierende Melanomzellen im Blut von Melanompatienten zu detektieren (Ulmer et al., 2004). Als Grundlage diente das Protokoll aus der Kooperation mit Dr. med. Anja Ulmer vom Uniklinikum Tübingen (Ulmer et al., 2005) zur Herstellung einer Zellsuspension aus disaggregierten Gewebeproben von Wächterlymphknoten.

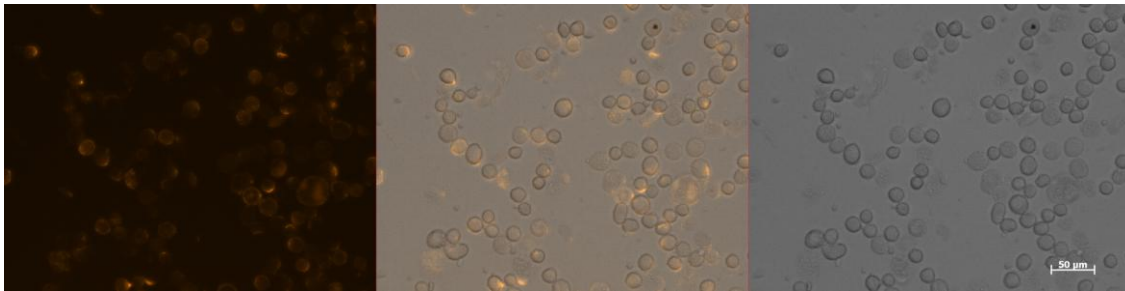
Die Färbung gegen das Zelloberflächenantigen MCSP erlaubt die Isolation vitaler Zellen, sowie die molekulare Analyse des Transkriptoms der DCC. MCSP ist ein hoch spezifisches und sensitives Antigen, das von mehr als 90 % der melanozytären Zellen exprimiert (Natali et al., 1983) wird. Es zeigte sich auch in immunhistochemischen Studien als sensitiver als die standardmäßig eingesetzten Färbungen gegen gp100, S100B und melanA (Goto et al., 2008).

Zur Konzentrationsbestimmung wurden zunächst Tests an den Melanomzelllinien Mel HO und SKMel28 durchgeführt. Mel HO zeigte eine intensivere Färbung. Die optimale Konzentration des Antikörpers betrug 25 µg/ml. In der Isotypkontrolle UPC-10 (Maus IgG2a) konnte keine positive Färbung nachgewiesen werden (**Abb. 7**).

3.1.4.2 Untersuchte Patientenproben für den Nachweis MCSP+ Einzelzellen

Wie unter **3.1.1** beschrieben konnten von den 200 Patienten 189 mit insgesamt 233 Lymphknotenproben in die Studie eingeschlossen, und die daraus generierte Zellsuspension gegen MCSP gefärbt werden. In 145 (62,3 %) der 233 untersuchten Proben konnten MCSP+ Zellen nachgewiesen werden, 88 Proben (37,7 %) waren negativ (**Abb. 8**). Somit enthielten Proben von 126 (66,6 %) der 189 Patienten MCSP+ Zellen, 63 Patienten (33,3 %) blieben negativ.

A



B

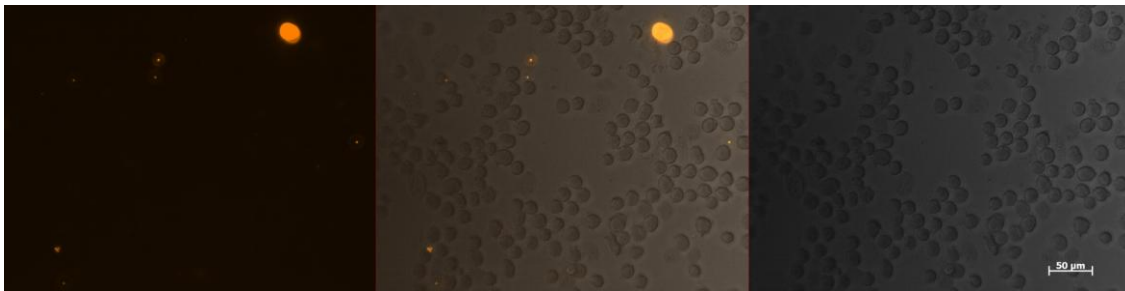


Abbildung 7: Etablierung einer MCSP-Färbung in Suspension

- A) Testfärbung der Zelllinie Mel HO
- B) Isotypkontrolle der Zelllinie Mel HO

3.1.5 Detektionsraten MCSP+ Zellen in den Patienten und Zellmorphologie

Enthielt die Lymphknotenprobe genügend Zellen, wurden drei Millionen Zellen gefärbt und jeweils eine bzw. zwei Millionen Zellen ausgewertet. Waren weniger Zellen enthalten, musste entsprechend weniger gefärbt werden. Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse entsteht für alle untersuchten Proben durch die Berechnung des sog. DCCD (= **d**isseminated **c**ancer **c**ell **d**ensity) Wertes, der die Mittelung der gefundenen MCSP+ Zellen pro 1 Mio untersuchte Lymphozyten ergibt. Mehr als 40 % der positiven Proben wiesen weniger als 10 MCSP+ Zellen pro Mio auf, weitere 15 % weniger als 100. Somit konnte nur in 5,6 % der untersuchten Proben ein DCCD > 100 festgestellt werden (**Abb. 8**). Der DCCD lag zwischen 1 bis 400000 MCSP+ Zellen pro Million untersuchter Lymphozyten. Der Median lag bei 5 positiven Zellen pro Million.

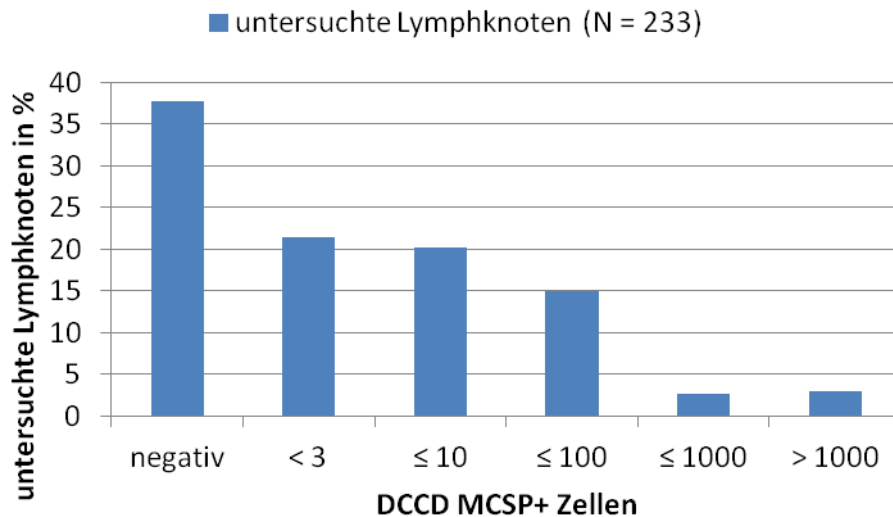


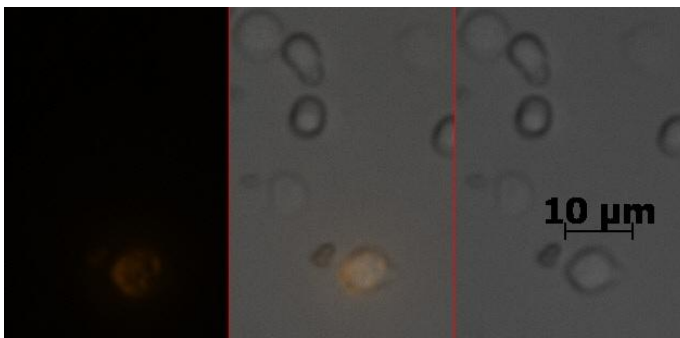
Abbildung 8: Anzahl und Verteilung MCSP+ Zellen in den untersuchten Patientenproben

Dargestellt ist die Rate MCSP+ Lymphknoten in % für Proben mit unterschiedlichen DCCD-Werten.

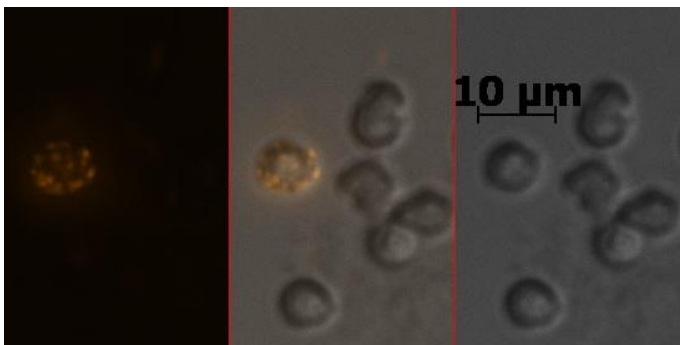
Die detektierten MCSP+ Zellen wiesen keine einheitliche Morphologie auf (**Abb. 9**). Sie zeigen Unterschiede in der Größe sowie in der Intensität des Fluoreszenzsignals.

Große intensiv fluoreszierende Zellen wurden in 26 Proben (11,2 %) detektiert, der Median lag hier bei 60 Zellen, im Bereich von einer bis 400000 Zellen. Werte über 5000 Zellen pro Million wurden geschätzt, alle anderen Werte ausgezählt. Kleine Zellen traten in 103 Proben auf (44,2 %), der Median lag hier bei 4 Zellen, im Bereich von 1 bis 47 Zellen pro Million. In 16 Proben (6,9 %) konnten beide Zelltypen nachgewiesen werden. Hier lag der Median bei 15 Zellen, im Bereich von 1 bis 2308 Zellen pro Million (**Abb. 10**).

A



B



C

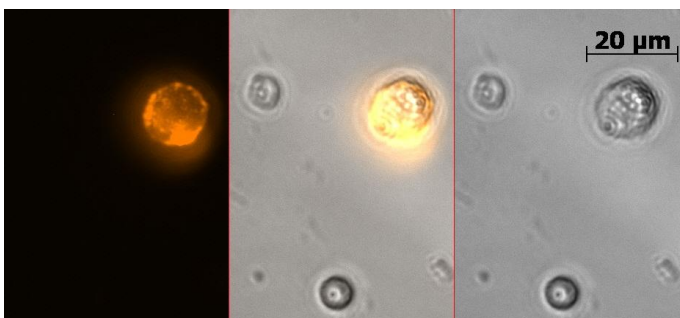


Abbildung 9: Morphologie und Phänotyp der detektierten MCSP+ Zellen in den Patientenproben

- A) und B) zeigen morphologisch kleine MCSP+ Zellen in der Größe der umgebenden Lymphozyten, mit einem Durchmesser kleiner 10 µm. Unterschied in der Intensität der Färbung zwischen den kleinen Zellen in A und B
- C) morphologisch große MCSP+ Zelle, vierfach größer als umgebende Lymphozyten (deutlich größer als 10µm) mit intensiver Färbung

Die Anzahl positiver Zellen war in Lymphknoten mit großen MCSP+ Zellen signifikant höher als in Lymphknoten mit kleinen Zellen ($p < 0,0001$ Mann-Whitney).

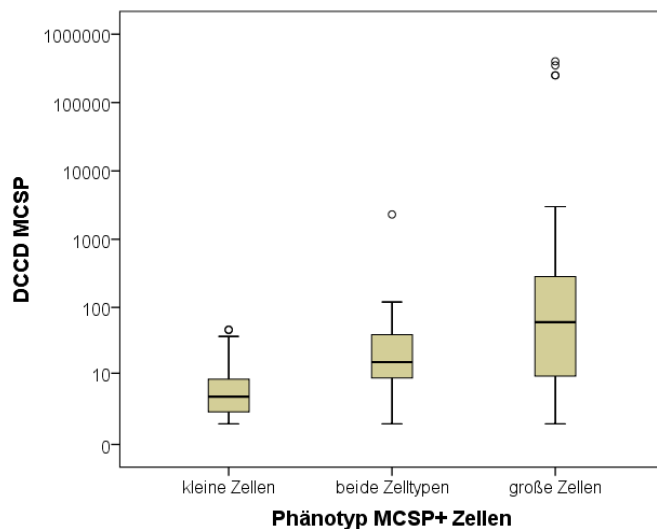


Abbildung 10: DCCD MCSP+ Zellen mit unterschiedlichem Phänotyp

Der dargestellte Boxplot gibt logarithmiert in den Balken jeweils den DCCD-Wert von 50% der betrachteten Proben an, die Linien markieren die Spannweite und der schwarze Querbalken in den Plots den medianen DCCD Wert.

3.1.6 Vergleich der Analyseverfahren: Detektionsraten und Zellmorphologie

Die Gewebeproben der Patienten unterliefen parallel drei unterschiedliche Befundungen. Eine Hälfte des LKs die histopathologische Routine aus Stufung des Gewebes mit anschließender Hämatoxylin-Eosin und immunhistologischer Färbung. Die andere Hälfte der Probe sowohl Immunfluoreszenzfärbung vitaler Zellen in Suspension gegen MCSP, als auch immunzytochemische Färbung fixierter Einzelzellen gegen gp100. Dadurch eröffnet sich die Möglichkeit, alle drei diagnostischen Verfahren miteinander zu vergleichen.

Bei diesem Vergleich sind im Folgenden die Befunde auf Patienten bezogen. Analog zum N-Staging in der Diagnostik wurden hier die Werte der MCSP- und gp100-Befunde auch jeweils auf den einzelnen Patienten umgerechnet, d.h. wies einer von zwei LKs positive Zellen auf, wurde der Patient als positiv gewertet. Dabei wurde immer die höchste gefundene Zellzahl eingesetzt, beim Auftreten sowohl großer wie kleiner MCSP+ Zellen der große Phänotyp angegeben.

Von den 189 in der Studie eingeschlossenen Patienten gehen in diesen Vergleich für die MCSP Auswertung 188 ein, da in einem Fall der Lymphknoten für die Pathologie nicht auswertbar war. 144 Patienten davon waren ohne Lymphknotenbeteiligung in der Routinediagnostik, 44 Patienten (23,3 %) im Stadium N1. Für gp100 lag der Befund bei 137 Patienten vor, 138 waren ursprünglich befundet. Aber auch hier scheidet der Patient ohne pathologischen Befund aus.

Der Nachweis MCSP+ DCC war bei 85 Patienten mit Stadium N0 positiv, während nur bei 4 Patienten mit Stadium N1 kein Nachweis von Zellen mit MCSP möglich war. Dieser

Ergebnisse

Unterschied ist signifikant. ($p < 0,0001$ chi-Quadrat) (**Abb. 11 A** und **Tabelle 4**). Beim Nachweis gp100+ DCC ist eine ähnliche Tendenz ersichtlich wie bei MCSP. N0 Patienten wiesen in 31 Fällen gp100+ Zellen auf. Im Stadium N1 waren 10 Patienten negativ für gp100 (**Abb. 11 B** und **Tabelle 4**). Der Unterschied im Nachweis von Einzelzellen zur Routinediagnostik ist auch für gp100 signifikant ($p < 0,0001$ chi-Quadrat).

In den vier Fällen, in denen die Immunfluoreszenz gegen MCSP im Gegensatz zur Histopathologie einen negativen Befund lieferte (**Tabelle 4**), handelte es sich laut Histologischem Befund um Mikrometastasen. Die zehn gp100 negativen Patienten in der Immunzytochemie mit positivem histologischem Befund wiesen in 5 Fällen Mikrometastasen, in zwei Fällen Tumorzellnester und in drei Fällen Makrometastasen auf.

Tabellen 4 und 5:

4) Befunde aus Routinediagnostik und Einzelzellanalyse (absolute Häufigkeiten)

5) Zusammenhang von Zellmorphologie MCSP+ Zellen mit Befunden aus Histopathologie und Immunzytochemie (absolute Häufigkeiten)

Tabelle 4		MCSP Färbung		Gesamt	p-Wert (chi-quadrat)
		negativ	positiv		
N-Stadium	N0	59	85	144	<0,0001
	N1	4	40	44	
	Gesamt	63	125	188	
		gp100 Färbung		Gesamt	
		negativ	positiv		
N-Stadium	N0	71	31	102	<0,0001
	N1	10	25	35	
	Gesamt	81	56	137	

Tabelle 5		Morphologie MCSP		Gesamt	p-Wert (chi-quadrat)
		groß	klein		
N-Status	N0	5	81	86	<0,0001
	N1	29	11	40	
	Gesamt	34	92	126	
		Morphologie MCSP		Gesamt	
		groß	klein		
gp100-Status	negativ	7	41	48	0,001
	positiv	23	28	51	
	Gesamt	30	69	99	

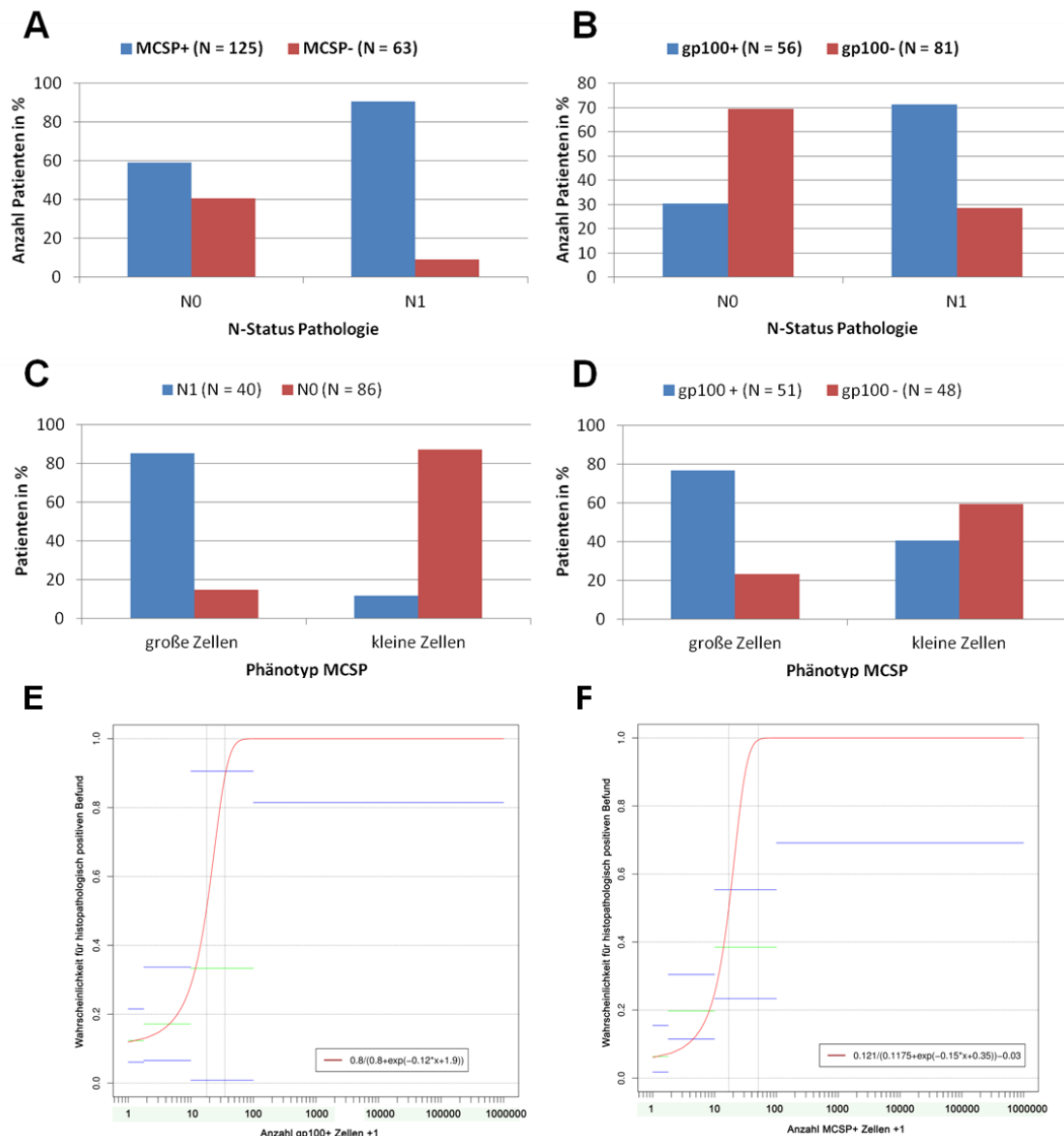


Abbildung 11: Vergleich der Analyseverfahren von Histopathologie, Immunzytochemie und Immunfluoreszenz

- A) Dargestellt ist die Verteilung MCSP+/- Patienten in % auf die klinischen Stadien N0 und N1
- B) Dargestellt ist die Verteilung gp100+/- Patienten in % auf die klinischen Stadien N0 und N1
- C) Dargestellt ist die Verteilung MCSP+ Zellen der beiden morphologischen Gruppen in % auf Patienten in den klinischen Stadien N0 und N1
- D) Dargestellt ist die Verteilung MCSP+ Zellen der beiden morphologischen Gruppen in % auf Patienten mit +/- gp100 Befund (Immunzytochemie)
- E) Dargestellt ist eine nichtlineare Regression, die den Zusammenhang zwischen der Anzahl gp100+ Zellen pro Million Lymphozyten (DCCD) in der Immunzytochemie und der Wahrscheinlichkeit eines positiven Befundes in der histopathologischen Aufarbeitung des Lymphknotens beschreibt. Rote Linie: Berechnete Wahrscheinlichkeit; Grün: Anteil histopathologisch positiver Patienten Blau: Obere und untere Grenze des 95 % Konfidenzintervalls (n= 56) Senkrechte Linien: DCCD-Wert für 50 % und 100 % Positivität.
- F) Dargestellt ist analog zu E der Zusammenhang für MCSP+ Zellen im Lymphknoten (n=125)..

Die DCCD Werte der beiden Einzelzell-Nachweise wurden mit dem Ergebnis der Pathologie verglichen. In den 125 Patienten mit MCSP+ Zellen im Lymphknoten unterschieden sich die

medianen Zellzahlen deutlich zwischen N1 und N0 Patienten. Der Wert lag für N1 Patienten bei 32,5 und für N0 Patienten bei 4 MCSP+ Zellen pro Million ($p < 0,0001$ Mann-Whitney).

In den 56 Patienten mit gp100+ Zellen lagen die medianen Zellzahlen bei N0 Patienten bei 1 und bei N1 Patienten bei 180 positiven Zellen pro Million ($p < 0,0001$ Mann-Whitney).

Da MCSP+ Zellen in unterschiedlichen morphologischen Gruppen vorliegen, wurde überprüft ob ein Zusammenhang zwischen der Morphologie der Zellen und dem histopathologischen Befund besteht. Lediglich fünf Patienten mit phänotypisch großen MCSP+ Zellen wurden als negativ in der Routinepathologie befundet (**Abb. 11 C** und **Tabelle 5**). Allerdings wiesen vier der fünf Patienten sowohl große als auch kleine MCSP+ Zellen auf, nur ein Patient ausschließlich große Zellen. Die Verteilung MCSP+ Zellen der morphologischen Gruppen unterscheidet sich signifikant zwischen Patienten im Stadium N0 und N1 ($p < 0,0001$ chi-Quadrat).

Analog wurde ein Zusammenhang zwischen gp100-Befund und Morphologie der MCSP+ Zellen für die 99 MCSP+ Patienten überprüft, von denen eine Aussage zum gp100 Status vorhanden war. Während sich in den gp100+ Patienten die Anzahl an Patienten mit großen (23) und kleinen (28) MCSP+ Zellen kaum unterscheidet, weisen die gp100- Patienten häufiger kleine MCSP+ Zellen auf (**Abb. 11 D, 14** und **Tabelle 5** ($p = 0,001$ chi-Quadrat).

Zudem wurde die Korrelation zwischen den DCCD-Werten für gp100 und MCSP und der Wahrscheinlichkeit für einen positiven histopathologischen Befund untersucht. Bei den gp100+ Patienten liegt bei einem medianen DCCD-Wert von 18 positiven Zellen ein histologischer N1-Befund vor. Ab einem DCCD von 37 sind 100 % der untersuchten Patienten im Stadium N1 (**Abb. 11 E**). Die 25 % ige Wahrscheinlichkeit für das Stadium N1 beträgt 9, die 75 % ige 27 gp100+ Zellen pro Million.

Der mediane DCCD-Wert MCSP+ Patienten für das Vorliegen eines histologisch positiven Lymphknotens liegt bei 17 DCC. Ab einem DCCD-Wert von 51 sind 100 % der untersuchten Patienten im Stadium N1 (**Abb. 11 F**). Die 25 % ige Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen des N1-Stadiums liegt bei 10, die 75 % ige bei 24 MCSP+ Zellen pro Million. Damit zeigt sich, dass sich die DCCD-Werte von MCSP und gp100 für die Wahrscheinlichkeiten eines positiven histologischen Befundes nicht wesentlich voneinander unterscheiden.

Die MCSP+ und gp100+ Zellen weisen grundsätzlich einen unterschiedlichen Phänotyp auf (**Abb. 12**), gp100+ Zellen ähneln morphologisch großen MCSP+ Zellen.

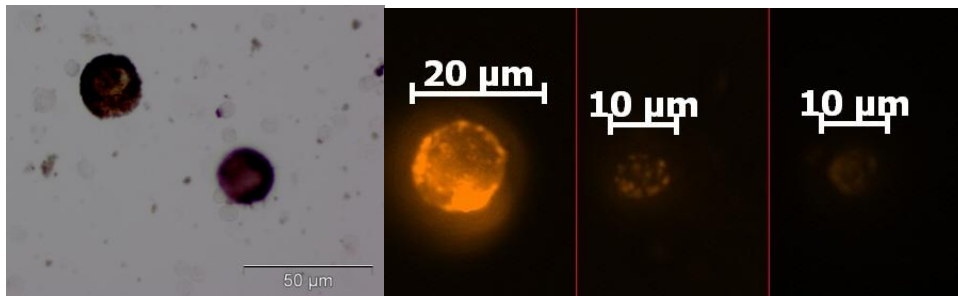


Abbildung 12: Vergleich gp100+ und MCSP+ Zellen aus Wächterlymphknoten

Durch die jeweils angegebene Größenskalierung wird ersichtlich, dass die gp100+ Zellen morphologisch den großen MCSP Zellen stärker ähneln.

Ein Zusammenhang zeigte sich zwischen der Morphologie MCSP+ Zellen in einer Probe und dem DCCD der gp100+ Zellen. Enthielt der Lymphknoten große MCSP+ Zellen, so lag der Median der gefundenen gp100+ Zellen bei 180, enthielt die Probe kleine MCSP+ Zellen bei 2 (**Abb. 13 A**). Dieser Unterschied ist signifikant ($p < 0,0001$ Mann-Whitney)

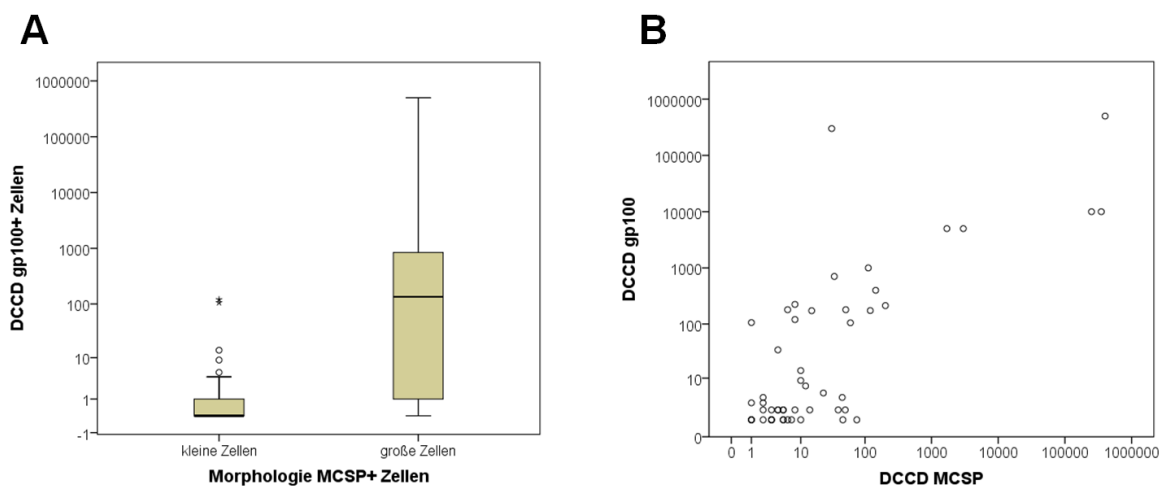


Abbildung 13: Anzahl gp100+ Zellen in Proben mit großen oder kleinen MCSP+ Zellen und Korrelation der DCCD Werte in doppelt positiven Proben

- A) Dargestellt sind logarithmiert die Bereiche sowie die mediane Anzahl (schwarzer Querbalken) gp100+ Zellen in Proben mit morphologisch unterschiedlichen MCSP+ Zellen. (Säulen repräsentieren 50 % der Proben)
- B) Dargestellt ist die Korrelation der DCCD Werte in den Patienten ($N = 51$) mit doppelt positivem Befund (MCSP und gp100)

Für 51 Patienten (37 %) waren die Befunde in beiden Nachweismethoden positiv (**Tabellen 5 und 6**). Dabei war die Morphologie der MCSP+ Zellen nicht von Bedeutung (23 Patienten (16,7 %) mit großen und 28 (20,3 %) mit kleinen MCSP+ Zellen). Bei 34 Patienten (24,6 %) wurden mit beiden Methoden keine positiven Zellen gefunden. In fünf Fällen (3,6 %) konnten nur gp100+ Zellen detektiert werden, bei 48 Patienten (34,8 %) ausschließlich MCSP+ Zellen. In dieser Gruppe zeigt sich der signifikante Unterschied in der Verteilung der morphologischen Gruppen MCSP+ Zellen. Während nur in 7 Fällen (5,1 %) mit

Ergebnisse

morphologisch großen Zellen der Nachweis mit gp100 negativ war, blieben 41 Patienten (29,7 %) mit kleinen MCSP+ Zellen negativ für gp100 (**Tabelle 5** und **Abb. 14**).

In den doppelt positiven Proben kann eine Korrelation der DCCD-Werte zwischen den beiden Nachweisverfahren von MCSP und gp100 festgestellt werden (**Abb. 13 B**). Diese Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig) nach Spearman ($p=0,618$; $p<0,0001$).

Tabelle 6: Absolute Werte positiv und negativ getesteter Patienten in den beiden Nachweismethoden

		gp100 Färbung		Gesamt
		negativ	positiv	
MCSP Färb.	negativ	34	5	39
	positiv	48	51	99
	Gesamt	82	56	138

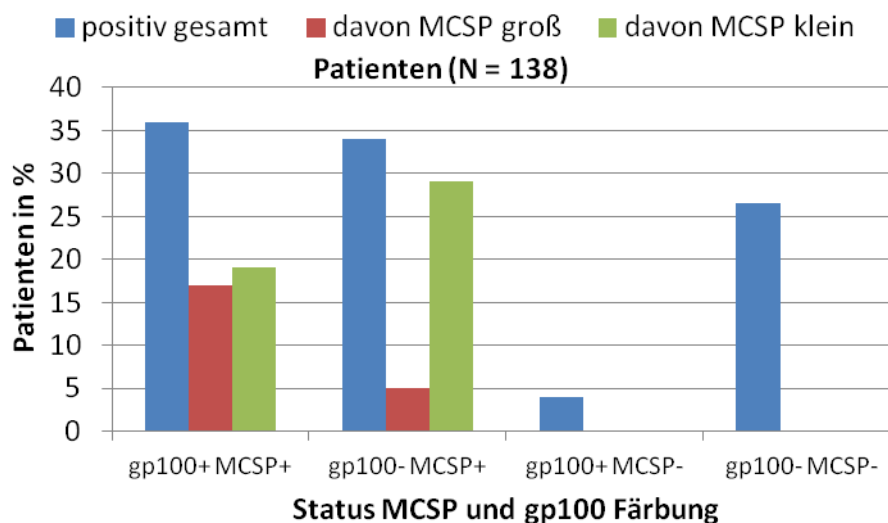


Abbildung 14: Anteil einfach und doppelt positiver Patienten in % für die Nachweise mit MCSP und gp100 (mit Unterscheidung der Zellmorphologie MCSP)

Dargestellt ist der Anteil der untersuchten Patienten in %, die für beide, eine, oder keine der Nachweismethoden positiv waren. Die Werte für die morphologischen Gruppen der MCSP+ Patienten addieren sich zum Gesamtwert.

3.1.7 MCSP Kontrollfärbung von Lymphknoten gesunder Probanden

Benigne Nävuszellen die in biopsierten Wächterlymphknoten nachgewiesen werden (Carson et al., 1996; McCarthy et al., 1974; Ridolfi et al., 1977), sowie eine Expression des MCSP-Antigens auf nicht melanozytären Zellen (Campoli et al., 2004), machen eine Überprüfung der Befunde aus den Melanomlymphknoten an Kontrollproben von Personen ohne malignes Melanom nötig. Zumal eine Unterscheidung zwischen malignen und benignen Zellen melanozytären Ursprungs mit dem eingesetzten Antikörper nicht möglich ist.

Deshalb wurden für diese Arbeit Färbungen an Kontrolllymphknoten gesunder Probanden durchgeführt, um diese auf das Auftreten MCSP+ Zellen hin zu untersuchen. Im Zeitraum von September 2012 bis August 2013 wurden insgesamt 13 Lymphknoten von 10 Probanden untersucht. Die Gewebeproben stammten aus Resektionen die im Rahmen von gefäßchirurgischen Eingriffen entnommen wurden.

Das durchschnittliche Alter der Probanden lag bei 72 Jahren, in sieben Fällen wurde ein LK biopsiert, in drei Fällen zwei. Ein LK war nicht auswertbar, so dass am Ende 12 Proben untersucht werden konnten. Davon waren zwei Lymphknoten negativ, zehn (83 %) positiv für MCSP (**Tabelle 7**). Somit ist die Positivrate in den Kontrolllymphknoten, soweit bei der geringen Fallzahl derzeit Aussagen möglich sind, höher als bei den Melanompatienten mit 66,6 %. Die durchschnittliche Zellzahl in den positiven Lymphknoten lag bei 4 MCSP+ Zellen pro Million untersuchter Lymphozyten, was dem Median der kleinen Zellen in den Melanompatienten nahe kommt. Die Morphologie der gefundenen Zellen entsprach in allen Fällen denen von kleinen schwach gefärbten MCSP+ Zellen in den Wächterlymphknoten der Melanompatienten (**Abb. 15**). Aus den isolierten Einzelzellen wurde die RNA und DNA isoliert sowie bisher die RNA transkribiert und global amplifiziert. Dies geschah analog zu den Zellen aus den Wächterlymphknoten nach Standardprotokoll. Es konnten bei fünf der 18 untersuchten Zellen alle drei Kontrollmarker für cDNA detektiert werden, bei drei Zellen zwei und bei vier weiteren Zellen noch je einer (**Tabelle 8**). Diese Zellen können zukünftig für weitere Untersuchungen als Referenzzellen eingesetzt werden. In dieser Arbeit wurde mit den Zellen die Expression für das Melanom spezifischer Marker untersucht, um mögliche Hinweise auf einen melanozytären Hintergrund der MCSP+ Zellen aus Normallymphknoten zu überprüfen.

Ergebnisse

Tabelle 7: Kontrolllymphknoten für MCSP-Färbung an gesunden Probanden

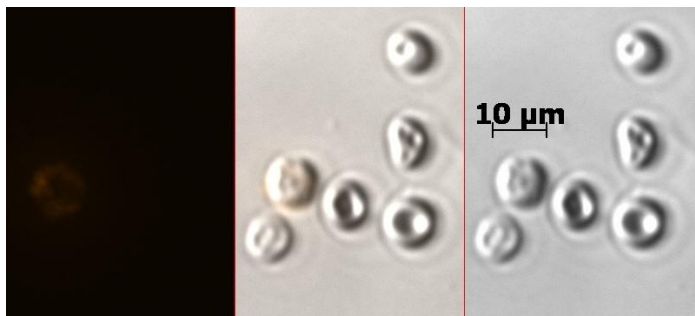
ID	Geschlecht	Alter	DCCD
K-1	w	78	6
K-2 A	m	71	negativ
K-2 B			2
K-3	m	60	1
K-4	m	74	2
K-5	m	72	2
K-6 A			negativ
K-6 B			nicht auswertbar
K-7			5
K-8 A	m	72	6
K-8 B			4
K-9	w	84	11
K-10	m	67	4

Tabelle 8: Ergebnisse Qualitätskontrolle der cDNA in den Kontrollzellen

Zelle	EF1a	β Aktin	GapDH	Positiv	Negativ
K-1 Z1					
K-1 Z2					
K-1 Z3					
K-1 Z4					
K-1 Z5					
K-2B Z2					
K-3 Z1					
K-4 Z1					
K-4 Z2					
K-5 Z1					
K-5 Z2					
K-9 Z1					
K-9 Z2					
K-9 Z3					
K-9 Z4					
K-10 Z1					
K-10 Z2					
K-10 Z3					

Positiv 
Negativ 

A



B



C

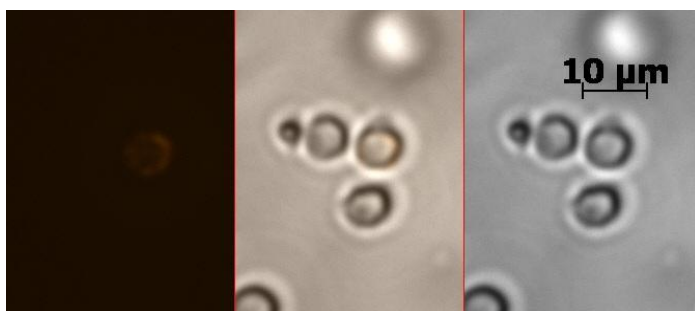


Abbildung 15: Gegenüberstellung MCSP+ Zellen aus Kontrolllymphknoten und Wächterlymphknoten

A) und B) Zellen aus Kontrolllymphknoten 2222 und 2219

C) morphologisch kleine MCSP+ Zelle aus LK 30

3.2 Überprüfung des melanozytären und malignen Ursprungs isolierter MCSP+ Zellen durch Transkriptomanalyse

Der Antikörper 9.2.27 gegen das membranständige Antigen MCSP detektiert hochsensitiv Zellen melanozytären Ursprungs (Bumol and Reisfeld, 1982), erlaubt jedoch keine Unterscheidung benigner und maligner Zellen. Melanozytäre Zellen exprimieren das Antigen in bis zu 90 % der Zellen (Campoli et al., 2004). Das Auftreten unterschiedlicher morphologischer Zelltypen, sowie der Nachweis MCSP+ Zellen in Lymphknoten gesunder Probanden lassen darauf schließen, dass nicht alle der detektierten und isolierten Zellen malignen Ursprungs sind. Um eine erste Aussage über den Ursprung der isolierten MCSP+ Zellen im Kollektiv zu erhalten, wurde die Expression von Markern untersucht, die spezifisch für melanozytäre Zellen und Stammzellen sind.

3.2.1 Einzelzellisolation und Gewinnung von cDNA und DNA für die molekulare Charakterisierung

Nach Isolation MCSP+ Einzelzellen mittels Glaskapillaren durch den Mikromanipulator, wurde nach Protokoll (Hartmann and Klein, 2006) die Gesamt-RNA der Einzelzellen über magnetische Beads extrahiert und anschließend revers transkribiert und amplifiziert. Die in den Überständen enthaltene Gesamt-DNA der Zellen wurde nach Ethanolfällung ebenfalls nach Protokoll (Klein et al., 1999) extrahiert und amplifiziert.

Der Schritt einer globalen Amplifikation ist bei gewonnener DNA und RNA aus Einzelzellen nötig, um mit dem limitierten Ausgangsmaterial molekulare Arbeiten durchführen zu können. Da diese Protokolle in der Arbeitsgruppe standardmäßig angewendet werden, wird hier auf eine detaillierte Beschreibung der Vorgänge verzichtet und auf den Methodenteil sowie auf die Literatur verwiesen.

Nach Amplifikation der DNA bzw. reverser Transkription mit anschließender Amplifikation der cDNA, wird durch PCR-Analyse konstitutiv exprimierter Haushaltsgene die Qualität des gewonnenen Materials überprüft. Dabei wird getestet ob sich die cDNA bzw. DNA der jeweiligen Zelle für weitere Untersuchungen eignet oder ob durch Verlust von Nukleinsäurefragmenten während der Zellaufarbeitung oder dem Verlust der Einzelzelle beim Isolationsvorgang, eine Verwendung des Zellisolates ausscheidet.

In diese Arbeit flossen die Ergebnisse aus 394 MCSP+ Einzelzellen ein. Von diesen Zellen konnte in allen Fällen cDNA gewonnen werden. DNA war von 359 dieser Zellen verfügbar. Als Marker für die Qualität der cDNA wurden *ACTB*, *EEF1A1* und *GAPDH* verwendet. Für die DNA-Analyse kamen *TP53* (Ex 8/9 und Ex2/3), *Pseudogen KRT19P1*, *BCR1* sowie der Mikrosatellitenmarker *D5S2117* und *KRAS* zum Einsatz. Es wurden für die DNA-Analyse

standardmäßig je 2, bei einem Teil der untersuchten Zellen jeweils 3 Marker pro Zelle zur Bestimmung der Qualität der DNA eingesetzt.

In die Auswertungen für diese Arbeit sind nur Zellen übernommen worden, die mindestens für einen Marker der cDNA oder DNA positiv waren. Alle nachfolgend beschriebenen Versuche (mit Ausnahme der Expressionsanalyse für melanozytäre und Stammzell-assoziierte Marker) wurden an Zellen durchgeführt, die mindestens für zwei Kontrollmarker positive Banden in der PCR aufwiesen. Insgesamt wiesen 358 Zellen (davon 228 mit mehr als einem Marker) eine ausreichend gute Qualität der cDNA auf, sowie 253 Zellen (davon 156 mit mehr als einem Marker) für DNA und konnten damit in die weiteren Analysen und Auswertungen eingeschlossen werden (**Abb. 16 A**). Der Anteil negativer Zellen in beiden Gruppen der Abbildung ist bedingt durch Zellen, die nach Aufbereitung entweder keine cDNA in der Kontrolle aufwiesen, jedoch positiv für DNA waren, sowie umgekehrt, keine DNA aber cDNA aufwiesen. In mehr als 60 % der Zellen (222) konnte sowohl DNA als auch cDNA erfolgreich isoliert werden (**Abb. 16 B**).

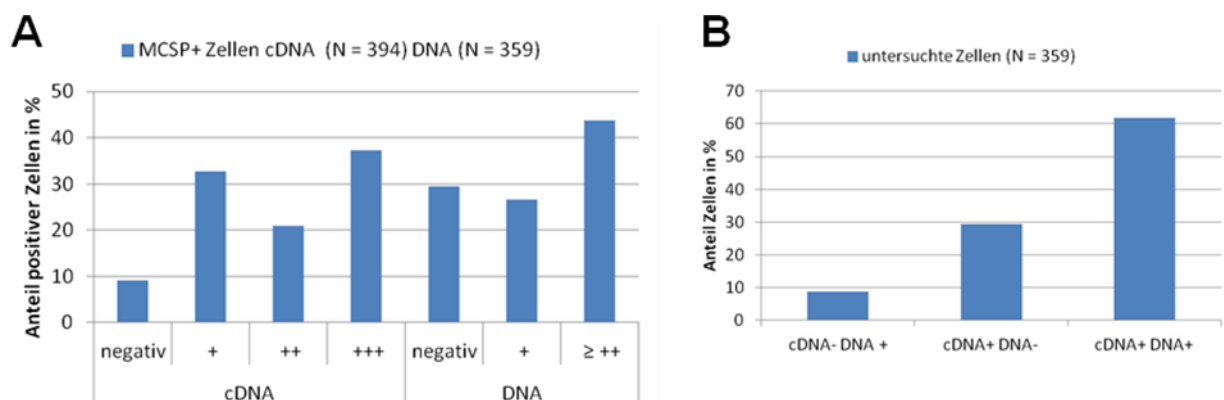


Abbildung 16: Qualitätsbestimmung von cDNA und DNA der isolierten MCSP+ Zellen

- A) **Ergebnisse der Kontroll-PCR zur Qualitätsbestimmung in den MCSP+ Zellen.** Dargestellt ist der Anteil negativer sowie ein- bis dreifach positiv getesteter Zellen in %, für die untersuchten Kontrollmarker von cDNA und DNA. Zur Qualitätsbestimmung der DNA wurden die zwei- und dreifach positiv getesteten Zellen zusammengefasst in $\geq ++$.
- B) **Anteil MCSP+ Zellen in % mit ausreichender Qualität von cDNA /DNA nach globaler Amplifikation.** Dargestellt ist der Anteil an Zellen von denen entweder nur cDNA, nur DNA, oder beide Nukleinsäuren erfolgreich isoliert und amplifiziert werden konnten

Es konnte ein Unterschied zwischen dem morphologischen Typ der Zellen und den positiv getesteten Kontrollmarkern der cDNA gezeigt werden (**Abb. 17**). In der Gruppe der großen MCSP+ Zellen waren signifikant mehr dreifach als zweifach positive Zellen vorhanden ($p < 0,0001$ chi-Quadrat). Für die Qualitätsbestimmung der DNA wurde zwischen ein – und mindestens zweifach positiven Zellen (darin eingeschlossen auch die dreifach positiven Zellen) unterschieden. Hier konnte jedoch kein Unterschied der Verteilung Marker positiver Zellen in Abhängigkeit von der Zellmorphologie festgestellt werden (**Abb. 17**).

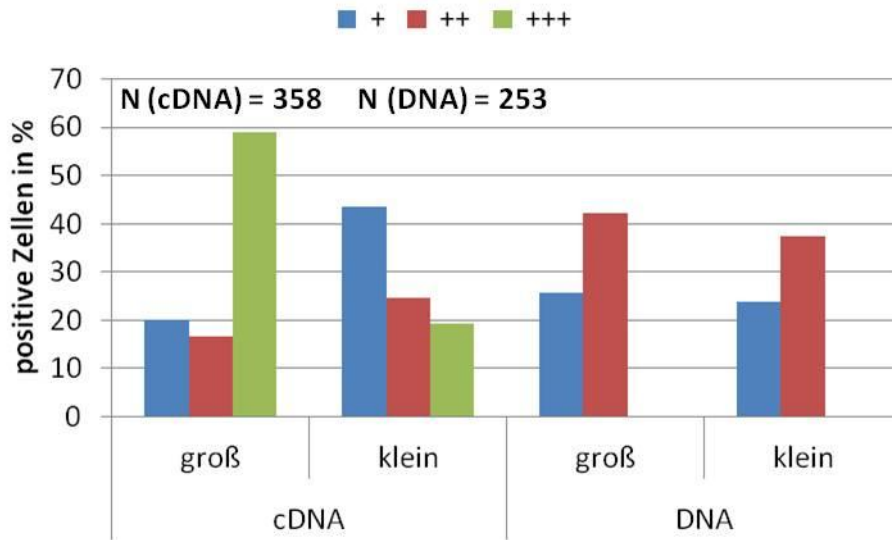


Abbildung 17: Zusammenhang zwischen Zellmorphologie und Expression von Kontrollmarkern für cDNA und DNA

Dargestellt ist der Anteil ein - bis dreifach positiv getesteter Zellen in % (für DNA entspricht ++ der Gruppe zwei und dreifach positiver Zellen) in der Qualitätsbestimmung, unterschieden nach den morphologischen Gruppen MCSP+ Zellen.

3.2.2 Expression Melanom-assoziiierter Marker

Zur Überprüfung, ob die isolierten und aufbereiteten MCSP+ Einzelzellen melanozytären Ursprungs sind, wurde zunächst die Expression spezifischer Markergene für ausdifferenzierte melanozytäre Zellen und Tumorzellen des malignen Melanoms untersucht. Die Zellen wurden mittels genspezifischer PCR auf die Expression von *PMEL* (gp100), *MLANA* (melanA), *S100B* sowie *DCT* (TRP-2) getestet. Die Gene von gp100, melanA und S100 wurden gewählt, da ihre Proteine standardmäßig in der Histopathologie zur Diagnostik der Wächterlymphknoten beim Melanom verwendet werden. TRP2 ist das früheste Differenzierungsantigen in der Zellentwicklung, das einen sicheren Nachweis melanozytärer Zellen erlaubt. Die Expressionrate der Marker im gesamten Kollektiv lag zwischen 15 % bei TRP2 und 34 % bei S100 (**Abb. 18 A** und **Tabelle 9**).

Bei allen untersuchten Markern zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Expressionshäufigkeit der Marker zwischen großen und kleinen Zellen im *chi-Quadrat* Test ($p < 0,0001$). Eine der 12 untersuchten Normalzellen aus Kontrolllymphknoten zeigte eine Expression von S100 (**Abb. 18 A** und **Tabelle 9**). Die Expression dieses Markers wurde deshalb zwischen den Gruppen der Patientenzellen und den Normalzellen verglichen. Ein signifikanter Unterschied in der Expressionsrate von S100 ist nur zwischen den Normalzellen und den großen MCSP+ Zellen gegeben ($p = 0,0017$ *chi-Quadrat*). Für die kleinen Zellen und das Gesamtkollektiv wird der Unterschied in der Expressionsrate von S100 nicht

signifikant ($p=0,69$ bzw. $0,11$). Daher kann die Expression von S100 allein nicht mehr als Kriterium für Malignität der untersuchten Zelle angesehen werden und wird im weiteren Verlauf der Arbeit für die Einteilung in maligne und nicht maligne Zellen nicht verwendet. Es wurde zudem untersucht, mit welcher Häufigkeit MCSP+ Zellen einen oder mehrere der Marker exprimieren (**Abb. 18 B und Tabelle 10**). Auch hier liegt ein signifikanter Unterschied zwischen den morphologischen Gruppen vor. Große Zellen exprimieren signifikant häufiger mehr als einen der Marker, verglichen mit kleinen Zellen ($p<0,0001$ chi-Quadrat). Bei den Kontrollzellen kam es zu keiner Koexpression melanozytärer Marker.

3.2.3 Expression Stammzell-assoziiierter Marker

Einen weiteren Hinweis auf den malignen Ursprung der isolierten MCSP+ Zellen sollte ein Test auf die Expression von Genen liefern, die als Marker potentieller Tumorstammzellen beim Melanom bekannt sind. In Quellen verschiedener Autoren wurden Gene beschrieben, deren Expression eine Subgruppe der untersuchten Melanomzellen zu sog. pluripotenten Stammzellen auszeichnet. Dazu zählen unter anderem *ABCB5* (Schatton et al., 2008), *NES* (Nestin) (Grichnik et al., 2006), *KDM5B* (Jarid1B) (Roesch et al., 2010) sowie *NGFR* (CD271) (Boiko et al., 2010). Die isolierten MCSP+ Zellen wurden ebenfalls mittels genspezifischer PCR auf die Expression dieser Gene hin untersucht. Die Expressionsraten lagen niedriger als für die melanozytären Marker und schwankten zwischen 2,5 % (CD271) und 5,8 % (Nestin) (**Abb. 18 A und Tabelle 9**). Für Jarid ($p=0,02$) und Nestin ($p=0,0001$) zeigten sich signifikante Unterschiede in der Expressionsrate zwischen den morphologischen Gruppen der Zellen.

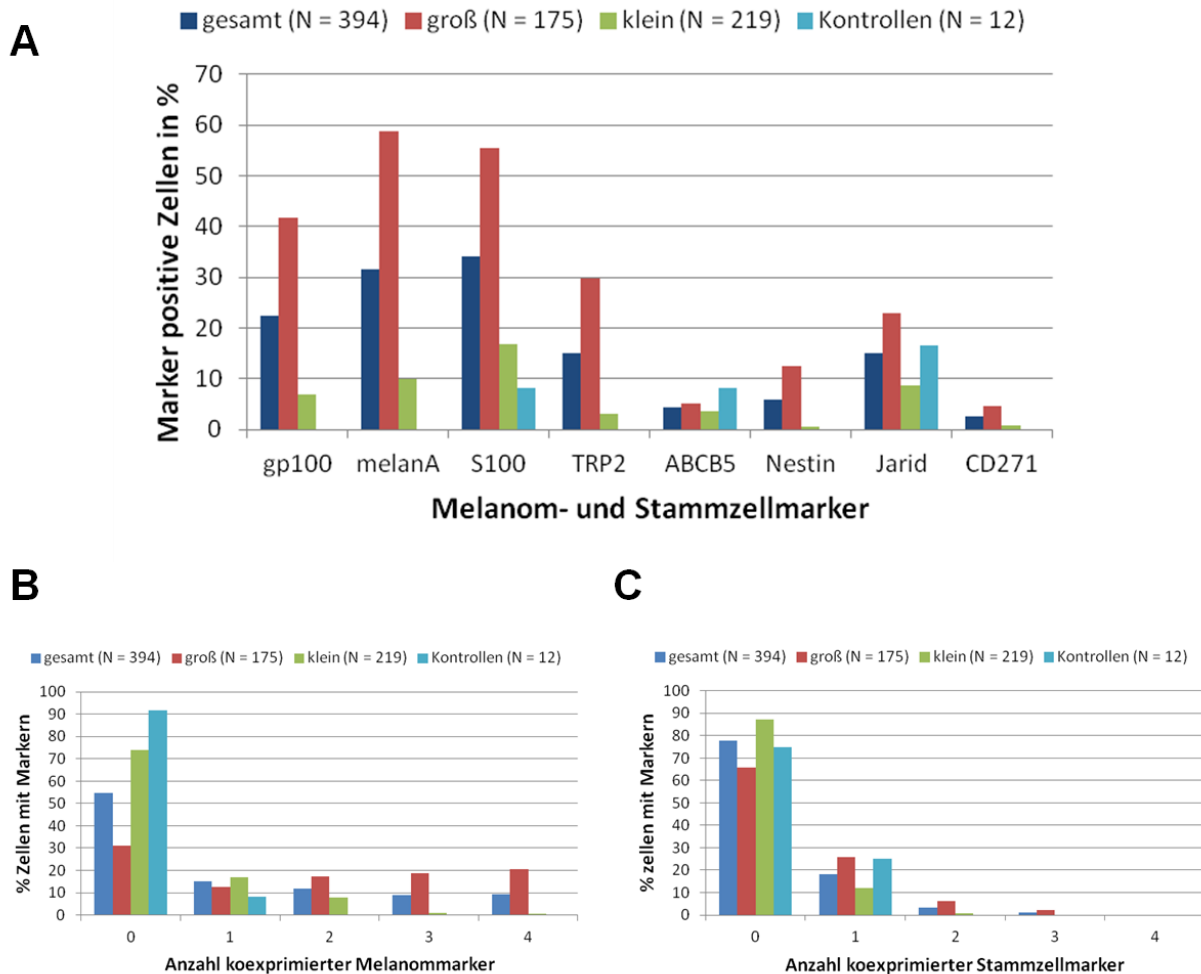


Abbildung 18: Expressionshäufigkeit und Koexpressionsraten der untersuchten Melanom- und Stammzell-assoziierten Marker in den MCSP+ Zellen

- A) **Expressionsraten der getesteten Marker in % in den untersuchten MCSP+ Zellen.**
Dargestellt ist für jeden Marker zum einen das Gesamtkollektiv der Zellen, zum anderen aufgeteilt in die morphologischen Gruppen. Im Vergleich dazu, die untersuchten Normalzellen (Kontrollen)
- B) **Koexpressionssrate Melanom-assoziiierter Marker in %.**
Dargestellt ist die Anzahl koexprimierter Marker in den untersuchten Zellen (gesamt, groß, klein und Normalzellen)
- C) **Koexpressionssrate Stammzell-assoziiierter Marker in %.**
Dargestellt ist die Anzahl koexprimierter Marker analog zu B)

Drei der untersuchten Normalzellen aus den Kontrolllymphknoten zeigten eine Expression von Stammzellmarkern. Eine Zelle exprimierte ABCB5 zwei weitere Jarid1B (**Abb. 18 A**). Lediglich die Expressionsrate von ABCB5 unterscheidet sich signifikant zwischen den großen MCSP+ und den Kontrollzellen. Die Expressionsraten der anderen Marker und die Raten zwischen den kleinen Zellen und den Kontrollen unterscheiden sich für die Stammzellmarker nicht. Die geringe Zahl an Zellen in der Kontrollgruppe muss dabei als mögliche Ursache in Betracht gezogen werden.

Analog zu den Melanommarkern wurde untersucht, mit welcher Häufigkeit MCSP+ Zellen einen oder mehrere Stammzellmarker exprimieren (**Abb. 18 C** und **Tabelle 10**). Zwischen den morphologischen Gruppen zeigt sich ein Unterschied in der Expression der Stammzellmarker. Große Zellen exprimieren signifikant häufiger mindestens einen der Marker ($p < 0,0001$ chi-Quadrat). Die Koexpression mehrerer Stammzellmarker kommt im Vergleich zu den Melanommarkern seltener vor. Während noch 17 % der großen Zellen zwei Melanommarker exprimieren, werden zwei Stammzellmarker nur noch von 6,3 % der großen Zellen exprimiert. In der Gruppe der getesteten Normalzellen konnte keine Koexpression von Stammzellmarkern festgestellt werden.

Tabelle 9: Expressionsrate (relative und absolute Werte) Melanom- und Stammzell-assoziiierter Marker im Gesamtkollektiv der MCSP+ Zellen, sowie in den morphologischen Gruppen und den getesteten MCSP+ Zellen der untersuchten Kontrolllymphknoten.

		Zellen gesamt		Zellen groß		Zellen klein		Kontrollzellen	
		N=394		N=175		N=219		N = 12	
		N	%	N	%	N	%	N	%
Melanom-Marker	gp100	88	22,3	73	41,7	15	6,8	0	0
	melanA	125	31,7	103	58,9	22	10	0	0
	S100	134	34	97	55,4	37	16,9	1	8,3
	TRP2	59	15	52	29,7	7	3,2	0	0
Stammzell-Marker	ABCB5	17	4,3	9	5,1	8	3,7	1	8,3
	Nestin	23	5,8	22	12,6	1	0,5	0	0
	Jarid	59	15	40	22,9	19	8,7	2	16,6
	CD271	10	2,5	8	4,6	2	0,9	0	0

Tabelle 10: Koexpressionsrate (relative und absolute Werte) Melanom- und Stammzell-assoziiierter Marker, sowie der Tumormarker (gp100, melanA, TRP2) im Gesamtkollektiv der MCSP+ Zellen, sowie in den morphologischen Gruppen und den getesteten MCSP+ Zellen aus Kontrolllymphknoten.

	Anzahl Marker	Zellen gesamt		Zellen groß		Zellen klein		Kontrollzellen	
		N=394		N=175		N=219		N=12	
		N	%	N	%	N	%	N	%
Koexpression Melanom-Marker	0	215	54,8	54	30,9	162	74	11	92,7
	1	59	15	22	12,6	37	16,9	1	8,3
	2	47	11,7	30	17,1	17	7,8	0	0
	3	35	8,9	33	18,9	2	0,9	0	0
	4	37	9,4	36	20,6	1	0,5	0	0
Koexpression Stammzell-Marker	0	306	77,7	115	65,7	191	87,2	9	75
	1	71	18	45	25,7	26	11,9	3	25
	2	13	3,3	11	6,3	2	0,9	0	0
	3	4	1	4	2,3	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
Koexpression Tumormarker (gp100, melanA, TRP2)	mindestens 1	150	38,1	111	63,4	39	17,8	0	0
	alle drei	40	10,1	38	21,7	2	0,9	0	0

Da in den bisher untersuchten Kontrollzellen in keinem Fall einer der Melanom-assoziierten Marker gp100, melanA und TRP2 exprimiert wurde, kann die Expression eines (oder mehrerer) dieser Marker als ein mögliches Kriterium für die Malignität der Zellen betrachtet

Ergebnisse

werden. Werden nach diesem Selektionskriterium alle Zellen zusammen betrachtet, können 38,1 % als maligne Zellen eingestuft werden. Ein deutlicher Unterschied zeigt sich wiederum in der Verteilung auf die morphologischen Gruppen. Während 63,4 % der großen Zellen somit als Tumorzellen gewertet werden können, sind es bei den kleinen Zellen nur 17,8 % (**Tabelle 10**). Im Vergleich mit den Kontrollzellen ist der Unterschied in der Expressionsrate der Tumormarker für die Zellen insgesamt ($p=0,01$) und die großen Zellen ($p<0,0001$) signifikant.

3.2.4 Korrelation Melanom- und Stammzell-assoziiierter Marker

Nachdem sich bei der Expression der Marker in den verschiedenen Phänotypen der Zellen signifikante Unterschiede gezeigt hatten, sollte untersucht werden, ob sich ein Zusammenhang zwischen Expression Stammzell-assoziiierter Marker und Ausdifferenzierung der melanozytären Zellen zeigt. Für die nachfolgenden Berechnungen wurde das Kollektiv aufgeteilt in Zellen mit und Zellen ohne Expression melanozytärer Differenzierungsmarker und anschließend auf die Expressionsrate von Stammzellmarkern getestet. Die Marker Nestin und Jarid1B werden signifikant häufiger in Zellen mit Differenzierungsmarkern exprimiert ($p<0,0001$) (**Abb. 19 A und Tabelle 11**). Zellen mit melanozytären Differenzierungsmarkern exprimieren signifikant häufiger mindestens einen Stammzellmarker ($p<0,0001$) (**Abb. 19 B und Tabelle 11**)

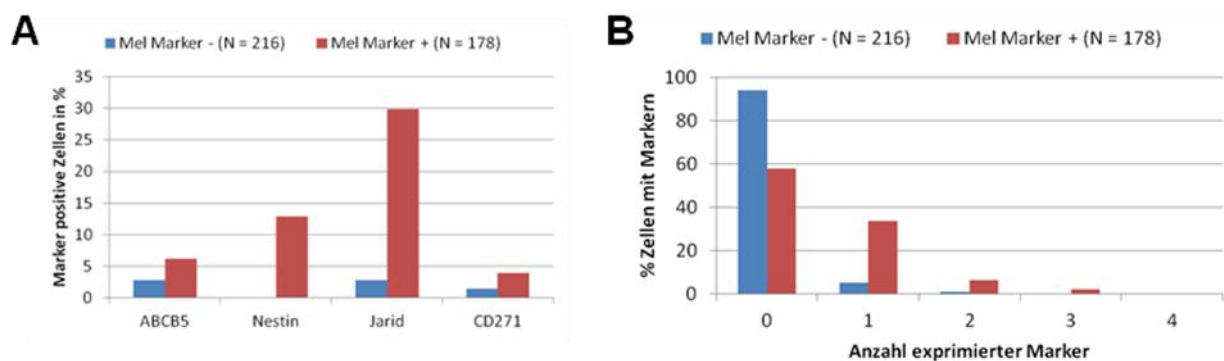


Abbildung 19: Expression und Koexpression Stammzell-assoziiierter Marker in MCSP+ Zellen in Abhängigkeit Melanom-assoziiierter Differenzierungsmarker

- A) **Expressionsrate Stammzell-assoziiierter Marker in %.**
Dargestellt ist der relative Anteil MCSP+ Zellen mit Expression von Stammzellmarkern in Zellen mit und ohne Expression melanozytärer Differenzierungsmarker
- B) **Koexpression Stammzell-assoziiierter Marker in %.**
Dargestellt ist die relative Häufigkeit MCSP+ Zellen mit Koexpression von Stammzellmarkern in Zellen mit und ohne Expression melanozytärer Differenzierungsmarker.

Insgesamt deuten diese ersten Ergebnisse der Transkriptomanalyse MCSP+ DCC darauf hin, dass es sich bei einem Teil der Zellen sicher um Zellen melanozytären Ursprungs handelt. Die Wahrscheinlichkeit dafür ist bei morphologisch großen Zellen signifikant höher. Als alleiniges Kriterium zur Unterscheidung benigner und maligner Zellen reicht die Expression der Marker nicht aus, da diese bisweilen auch in MCSP+ Kontrollzellen gesunder Probanden nachgewiesen wurden. Jedoch ist für eine sichere Aussage über die Expressionsraten in den Kontrollzellen noch eine Erhöhung der Fallzahlen nötig.

Tabelle 11: Expressions- und Koexpressionsrate (relative und absolute Werte) Stammzell-assoziiierter Marker in MCSP+ Zellen mit und ohne Ausprägung Melanom-assoziiierter Differenzierungsmarker.

		Melanom Marker +		Melanom Marker -	
		N=193		N=201	
		N	%	N	%
	ABCB5	11	5,7	6	3
	Nestin	23	11,9	10	0
	Jarid	54	28	5	2,5
	CD271	7	3,6	3	1,5
Koexpression Stammzell-Marker	0	117	60,6	189	94
	1	61	31,6	10	5
	2	11	5,7	2	1
	3	4	2,1		

3.3 Überprüfung des malignen Ursprungs von MCSP+ und gp100+ Zellen durch Genomanalysen

Nachdem die Analyse der cDNA MCSP+ DCC erste Hinweise auf einen melanozytären und möglicherweise malignen Ursprung der detektierten Einzelzellen geliefert hat, sollte im nächsten Schritt die DNA der Zellen untersucht werden. Es bot sich durch die parallele Isolation der beiden Zelltypen (MCSP+ und gp100+) im Regensburger Patientenkollektiv an, auch die DNA der isolierten gp100+ Zellen hinsichtlich ihres Mutationsstatus für *BRAF* und *NRAS* und ihrer chromosomalen Veränderungen zu untersuchen, und dadurch den direkten Vergleich der Zellpopulationen innerhalb der einzelnen Patienten zu erhalten.

3.3.1 Vergleich des Mutationsstatus der Onkogene *BRAF* und *NRAS* zwischen Einzelzellen und Zellpopulationen von MCSP und gp100

Zunächst wurden MCSP+ Zellen, sowie korrespondierende gp100+ Zellen der Regensburger Proben, auf das Vorkommen für das Melanom typischer Punktmutationen der Onkogene *BRAF* und *NRAS* getestet. Dabei wurden die zwei am häufigsten vorkommenden Mutationen *BRAF* V600E sowie *NRAS* Q61K untersucht. Insgesamt wurden 326 Zellen sequenziert. Von den untersuchten Lymphknoten (40) trugen 12 die *BRAF* Mutation in MCSP+ Zellen (30 %). Von den untersuchten Lymphknoten (27) mit gp100+ Zellen waren es 10 (37 %) (**Abb. 20** und **Tabelle Anhang**). Eine *NRAS* Mutation trat in rund 8 % (3) der untersuchten Lymphknoten (39) mit MCSP+ Zellen sowie in 14 % (4) der untersuchten Lymphknoten (28) mit gp100+ Zellen auf (**Abb. 20** und **Tabelle Anhang**).

Von besonderem Interesse war die Frage, ob sich unterschiedliche disseminierte Einzelzellen im Lymphknoten eines Patienten hinsichtlich ihres Mutationsstatus unterscheiden, und ob es Parallelen oder Unterschiede in der Mutationsrate der detektierten MCSP+ oder gp100+ Zellen gibt. Von den insgesamt 326 Sequenzierungen entfielen 170 auf MCSP+ und 156 auf gp100+ Zellen. Die MCSP+ Zellen stammten aus 34, die gp100+ Zellen aus 23 unterschiedlichen Patienten.

Insgesamt trugen 54 Zellen die *BRAF* V600E Mutation, (23 MCSP+ und 31 gp100+ Zellen) und 22 Zellen die *NRAS* Mutation (7 MCSP+ Zellen und 15 gp100+) (**Tabelle Anhang**).

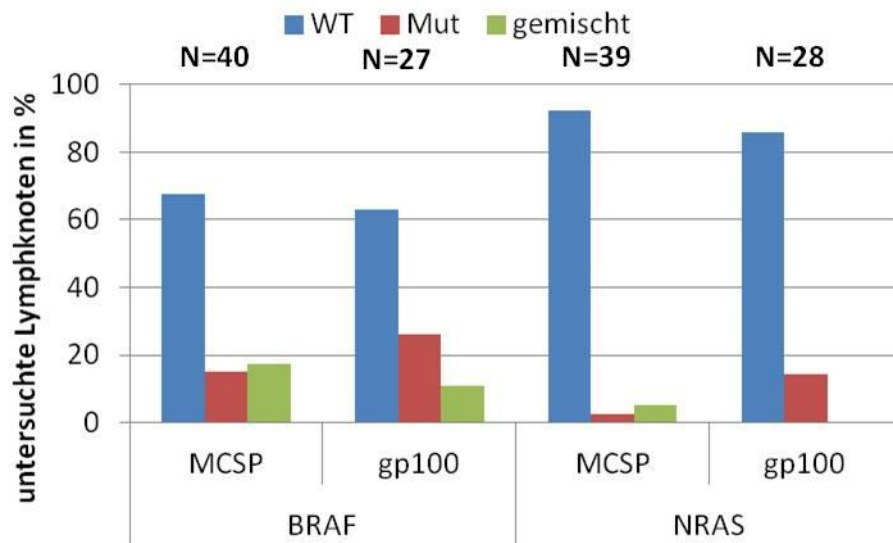


Abbildung 20: Punktmutationen von *BRAF* und *NRAS* in den untersuchten Lymphknotenproben

Aufgetragen sind die Lymphknoten in %, mit untersuchten MCSP+ bzw. gp100+ Zellen und zugehörigem Mutationsstatus der Probe. Gemischt bedeutet dabei, dass aus dem selben Lymphknoten sowohl Zellen mit und ohne Mutation vorlagen

Von insgesamt 19 Patienten (21 Lymphknoten) konnten Zellen als sog. gepaarte Proben ausgewertet werden, d.h. aus derselben Lymphknotenprobe konnten sowohl MCSP+ wie auch gp100+ Zellen sequenziert werden. Zellen von 7 Patienten (36,8 %) (8 Lymphknoten) trugen bei den MCSP+ Zellen die *BRAF*-Mutation, Zellen von 2 (10,5 %) Patienten die Mutation für *NRAS*.

Dieselben Patienten trugen die *NRAS*-Mutation auch in den untersuchten gp100+ Zellen. Sie trat dort bei drei Patienten (15,8 %) auf. Während alle untersuchten gp100+ Zellen der Patienten die *NRAS*-Mutation aufwiesen, lag bei den MCSP+ Zellen der untersuchten Patienten eine Heterogenität bezüglich der *NRAS*-Mutation vor. Einige der untersuchten Zellen waren in den Patienten jeweils nicht mutiert (**Abb. 21 A**).

gp100+ Zellen von 8 Patienten (42,1 %) (10 Lymphknoten) trugen die *BRAF*-Mutation. Bei sechs dieser Patienten waren auch MCSP+ Zellen *BRAF*-mutiert. Bei zwei Patienten trat die *BRAF*-Mutation nur in den untersuchten gp100+ Zellen auf, bei einem Patienten nur in den MCSP+ Zellen. Bei keinem der untersuchten Patienten traten die *BRAF*- und *NRAS*-Mutation zusammen auf, auch nicht innerhalb der unterschiedlichen Zellpopulationen von MCSP und gp100 (**Abb. 21 A**).

Bei den untersuchten Zellen handelte es sich um Zellen malignen Ursprungs, da alle, bis auf zwei, melanozytäre Differenzierungsmarker (melanA, gp100, TRP2) exprimieren. Die Zellen ohne Markerexpression können allerdings aufgrund ihres aberranten CGH Profils (LK 32) bzw. aufgrund ihres Phänotyps (LK 168, große Zellen, histopathologischer Befund Makrometastase) ebenfalls als Tumorzellen betrachtet werden.

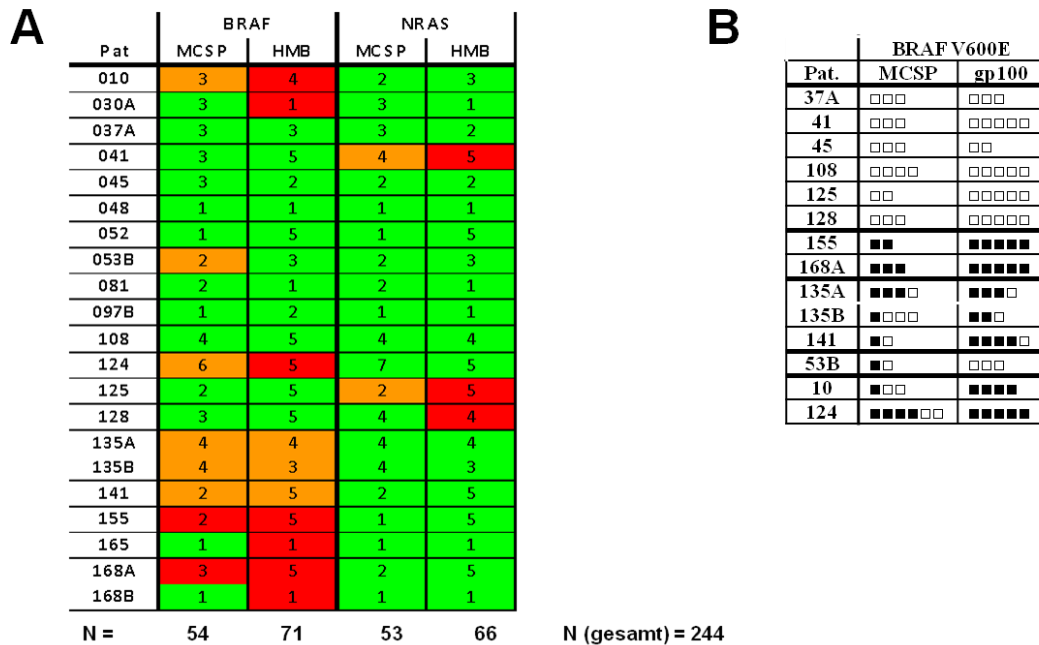


Abbildung 21: Mutationsstatus und Heterogenität in gepaarten Proben von MCSP und gp100

A) Schematische Gesamtübersicht der Mutationsanalysen in den gepaarten Proben

Die Zahlen in den Kästchen stehen für die Anzahl an untersuchten Zellen. Rot = mut, grün = wt, orangen = gemischt (mut und wt) (HMB in der Legende entspricht gp100)

B) Abbildung 22: Heterogenität des Mutationsstatus für BRAF in MCSP+ und gp100+ Zellen.

□ = untersuchte Zelle wt ■ = untersuchte Zelle mutiert

Auffällig bei den ausgewerteten Sequenzen für BRAF V600E, ist bei Patienten mit MCSP+ als auch gp100+ Zellen die Heterogenität hinsichtlich des Mutationsstatus (**Abb. 21 B**). Damit weitestgehend ausgeschlossen werden kann, dass die Heterogenität aufgrund einer zu geringen Anzahl ausgewerteter Zellen besteht, wurden in diesen Vergleich nur die Patienten (13) übernommen, von denen für die Gruppen der MCSP+ und gp100+ Zellen jeweils mindestens zwei Zellen sequenziert wurden. Bei drei der Patienten (4 Lymphknoten) kamen sowohl MCSP als auch gp100 Zellen mit und ohne BRAF-Mutation vor.

Für beide Zellpopulationen wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer der beiden Mutationen und dem DCCD Wert besteht. Für diese Auswertung wurden die Mutationen zusammengefasst. Ein Patient galt als mutiert, wenn in einem der untersuchten Lymphknoten eine der Mutationen vorlag. Die Mutationen wurden aufgrund der geringen Fallzahlen zusammengeschlossen, um eine statistische Auswertung zu ermöglichen. Beide Mutationen wirken konstitutiv aktivierend auf denselben Signalweg. Es wurden 32 Patienten mit MCSP+ Zellen und 20 Patienten mit gp100+ Zellen in die Auswertung eingeschlossen. In der Gruppe der MCSP+ Zellen lag bei 41 % der Patienten eine Mutation vor. Der Median der DCCD-Werte ist bei Patienten mit Mutation 11,4 mal höher. (57 Zellen / Mio mit Mutation; 5 Zellen / Mio ohne Mutation) (**Abb. 22**).

Noch deutlicher zeichnet sich der Unterschied bei den gp100 Zellen ab. Hier lag bei 55 % der Patienten eine Mutation vor. Der mediane DCCD-Wert war hier 58 mal höher als in den

Patienten ohne Mutation in den untersuchten DCC (174 Zellen / Mio mit Mutation; 3 Zellen / Mio ohne Mutation) (**Abb. 22**).

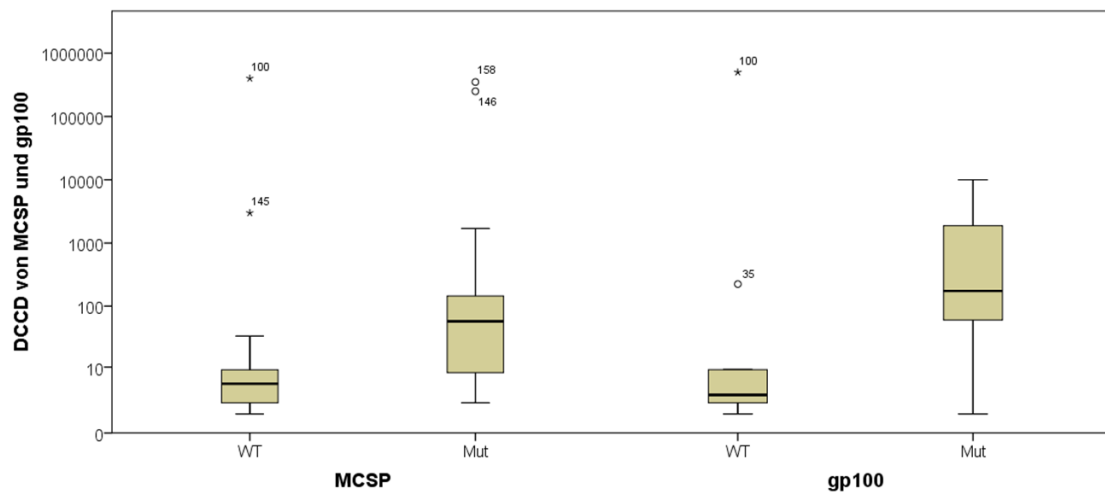


Abbildung 22: DCCD Werte von Patienten mit und ohne Mutation

Aufgetragen sind die logarithmierten DCCD-Werte von Patienten, unterschieden nach MCSP (N = 32) und gp100 (N = 20), aufgeteilt in Patienten ohne (WT) und mit (Mut) Mutation. Der dargestellte Boxplot gibt logarithmiert in den Balken jeweils den DCCD-Wert von 50% der eingeschlossenen Patienten an, die senkrechten Linien markieren die Spannweite und der schwarze Querbalken in den Plots den medianen Wert.

Für MCSP+ Zellen wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen Morphologie der gefundenen Zellen und dem Auftreten einer Punktmutation besteht. Hier wurden ebenfalls beide Mutationen in der Auswertung zusammengeschlossen. 38 Lymphknotenproben mit MCSP+ Zellen konnte auf beide Mutationen getestet werden. Es treten dabei die Mutationen signifikant häufiger in Lymphknoten mit MCSP+ Zellen vom großen Phänotyp auf ($p=0,00069$ Fisher exact) (**Tabelle 12**).

Tabelle 12: Zusammenhang Zellmorphologie und Mutationsstatus

	Proben mit:		
	großen Zellen	kleinen Zellen	
Mutiert	12	3	15
WT	5	18	23
	17	21	38

Der Zusammenhang zwischen dem Mutationsstatus der Zellen und den klinischen Eigenschaften der Patienten wird unter **5.2** beschrieben.

3.3.2 Überprüfung des Mutationsstatus von *BRAF* und *NRAS* an individuellen Paaren von Primärtumor und Metastase

Nachdem die Mutationsanalyse an isolierten DCC einen gewissen Grad an Heterogenität zeigte, sollte in diesem Zusammenhang ein weiterer Befund überprüft werden, der sich in der dieser Arbeit vorausgegangenen Dissertation von Isabelle Hodak zeigte. Durch Analyse gepaarter Proben aus Primärtumoren, DCC und Metastasen von Melanompatienten wurde dort versucht, die DNA auf charakteristische Veränderungen zwischen den Stadien der Erkrankung zu vergleichen. Erste Ergebnisse von Mutationsanalysen der Onkogene *BRAF* und *NRAS* deuteten auf eine klonale Diversität zwischen Primärtumoren und ihren korrespondierenden Metastasen hin. Da die Anzahl von Patienten mit Metastasen auf vier beschränkt war, wurde im Rahmen dieser Arbeit versucht, diesen Befund durch die Untersuchung weiterer gepaarter Patientenproben zu überprüfen.

3.3.2.1 Patientenkollektiv und experimentelles Vorgehen

Zwischen 2010 und 2012 wurden Paraffinpräparate aus Primärtumoren und korrespondierenden Metastasen von 12 Patienten mit malignem Melanom untersucht (**Tabelle 13**).

Es konnten aus Präparaten von 12 Patienten erfolgreich DNA isoliert und Sequenzanalysen durchgeführt werden. In einem Fall war es nicht möglich die gewonnene DNA aus dem Primärtumor (PT) für *BRAF* zu sequenzieren. Der Patient wird hier mit aufgeführt, da sich die beiden untersuchten Metastasen hinsichtlich ihres Mutationsstatus von *BRAF* unterscheiden. In zwei Fällen gab es jeweils zwei PTs, da die Patienten Lokalrezidive entwickelt hatten, die als eigenständige Tumore eingestuft wurden. Insgesamt wurden 13 PTs untersucht. Die Anzahl der untersuchten korrespondierenden Metastasen betrug zwischen einer und vier pro Patient. Insgesamt wurden 27 Metastasen ausgewertet.

Die Sequenzierung von *NRAS* konnte aufgrund von Schädigung oder Verlusten der DNA auf dem betreffenden Sequenzabschnitt, bedingt durch die Fixierung des Gewebes mit Paraffin, bei einigen der untersuchten Proben nicht ausgewertet werden. Der Status von *NRAS* wurde daher an gepaarten Gewebeproben von neun Patienten untersucht. Dazu wurden insgesamt 11 PTs und 22 Mets ausgewertet.

Von den Paraffinpräparaten wurden zunächst Dünnschnitte am Mikrotom auf Folienobjektträgern angefertigt, das Paraffin entzogen und die Schnitte mit Hämatoxylin angefärbt (**Abb. 23**). Ein zusätzlicher Schnitt des Gewebes wurde mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt und die relevanten Tumorareale dort exemplarisch vom Pathologen gekennzeichnet. Dadurch sollte die Isolation nicht maligner Gewebeareale verhindert, und die damit verbundene Gefahr einer unbewussten Verfälschung der Ergebnisse in der nachfolgenden

Sequenzierung ausgeschlossen werden. Anschließend erfolgte die Mikrodisektion nach Protokoll (Stoecklein et al., 2002) an den Folienobjektträgern mit einem Lasergerät von P.A.L.M Systems (Zeiss). War genug Tumormaterial auf den Schnitten verfügbar, wurden nach Möglichkeit zwei getrennte Proben aus unterschiedlichen Regionen der Läsion isoliert und parallel ausgewertet. Jede Probe bestand aus bis zu fünf einzelnen Mikrodisektaten mit einer durchschnittlichen Gesamtfläche aller Dissektate zwischen 60.000 und 100.000 μm^2 . Die erfolgreiche Überführung der gelaserten Tumoreale wurde für jede Probe mikroskopisch überprüft. Vor der Sequenzierung wurde die gesamt-DNA global amplifiziert (Klein et al., 1999), im Anschluss daran die jeweils entsprechenden Sequenzabschnitte für die Onkogene *BRAF* und *NRAS* amplifiziert. Nach Aufreinigung der DNA und Konzentrationsbestimmung wurde die Sequenzierung durch die Firma Sequiserve (Vaterstetten) durchgeführt.

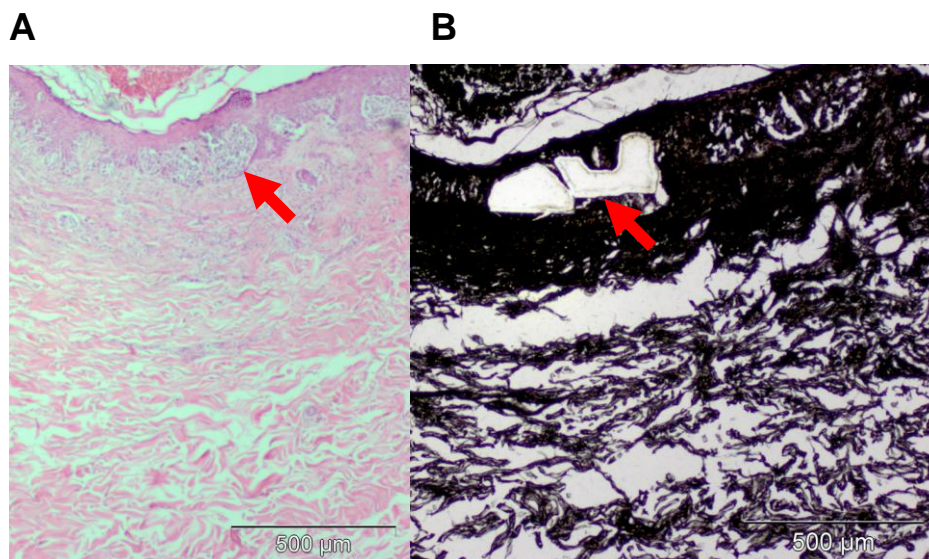


Abbildung23: Lasermikrodisektion von Ultradünnschnitten

- A) HE Färbung eines Dünnschnitts von Patient 14117. PT eines superfiziell spreitenden Melanoms (TD = 0,9mm). Der rote Pfeil markiert die malignen Bereiche.
- B) Hämatoxylin gefärbter Folienschnitt derselben Läsion nach Mikrodisektion. Der rote Pfeil markiert die entnommenen Gewebebereiche.

Ergebnisse

Tabelle 13: Klinische Daten der untersuchten Patienten mit individuellen Paaren von Primärtumor und Metastase, sowie Anzahl und Lokalisation der untersuchten Läsionen.

A) klinische Daten

B) Anzahl und Lokalisation Läsionen

A

Patienten	Anzahl (%)
gesamt	12 (100)
PT vs Met	11 (92)
Met vs Met	1 (8)
Alter bei OP PT	
Median	58
Bereich	38 - 85
Geschlecht	
Frauen	4 (33,3)
Männer	8 (66,6)
Lokalisation PT	
Extremitäten	6 (46)
Kopf und Nacken	4 (31)
Rumpf	3 (23)
Histologischer Typ	
SSM	3 (23)
NM	2 (15,5)
ALM	2 (15,5)
keine Angaben	6 (46)
Tumordicke	
Median	3,85mm
Bereich	0,2-8mm
Klinisches Stadium	
1	2 (17)
2	1 (8)
3	2 (17)
4	3 (25)
k.A.	4 (33)

B

Proben	Anzahl (%)
PT	13 (100)
Met	27 (100)
Lokalisation Met	
LK	11 (40,7)
Haut	13 (48,2)
Weichteile	3 (11,1)

3.3.2.2 Mutationsstatus von *BRAF* und *NRAS* in den gepaarten Proben

Die untersuchten Areale der PTs zeigten bei vier von elf Patienten (36 %) eine Mutation für *BRAF*, in den Metastasen trat die Mutation bei sechs von elf Patienten (54 %) auf. Die *NRAS*-Mutation trat in den Primärtumoren bei einem von neun Patienten (11 %) auf, in den Metastasen bei zwei von neun Patienten (22 %).

Bezüglich *BRAF* (Mutation V600E) sind die Befunde in 9 Patienten identisch für PT und Met. In sechs Patienten sind PT(s) und Met(s) jeweils wildtyp und in drei Patienten jeweils mutiert. In drei Patienten (25 %) sind PT und Met, bzw. die Mets untereinander hinsichtlich des Mutationsstatus heterogen. Dabei kommt es bei Patient 2 zu einem Verlust der Mutation vom PT in einer der untersuchten korrespondierenden Metastasen. Zwei der drei untersuchten Metastasen tragen bei diesem Patienten die Mutation. Bei Patient 8 tritt die Mutation in der Metastase auf, wohingegen sie im PT nicht nachgewiesen wurde. Bei Patient 17 tragen die untersuchten Metastasen einen unterschiedlichen Mutationsstatus, wie er auch bei Patient 2 auftritt (**Abb. 24 und 25**)

Pat ID	BRAF mutiert von Proben		NRAS mutiert von Proben	
	PT	Met	PT	Met
R 1	■	■■■	□	□□
R 2	■	■■■□	□	□□□
R 3	□□	□□□	□□	□□□
R 4	■■■	■■■■	□□	□□□
R 6	□	□□	■	■■■
R 7	□	□		
R 8	□	■■■■	□	□□□
R 9	■	■■■	□	□□
R 11	□	□□□□	□	■■■■
R 13	□	□		
R 17		■□	□	□
R 19	□	□		

Abbildung 24: *BRAF* und *NRAS* Mutationen in den untersuchten Gewebeproben

- = untersuchtes Areal PT wt
- = untersuchte Läsion Metastase wt
- = untersuchtes Areal / Läsion mit Mutation

Hinsichtlich der Mutation Q61K in *NRAS* sind die Befunde für 8 Patienten identisch zwischen PT und Met, wobei 7 Patienten keine Mutation tragen. Bei Patient 6 tragen sowohl die PT- als auch die Met-Proben die Mutation. Bei Patient 11 unterscheiden sich PT und Metastase hinsichtlich ihres *NRAS*-Status. Während alle untersuchten Metastasen die Mutation tragen, wurde sie beim PT nicht nachgewiesen.

Ergebnisse

Betrachtet man die Heterogenität der Mutationen von *BRAF* und *NRAS* zwischen PT und Met insgesamt, so weisen vier von zwölf Patienten (33 %) einen Unterschied zwischen den Mutationen von PT und Met auf.

In keiner der untersuchten Proben und folglich bei keinem der Patienten traten *BRAF*- und *NRAS*-Mutation gemeinsam auf. Entweder trug der Patient in PT und/oder Met jeweils die *NRAS*- oder die *BRAF*-Mutation.

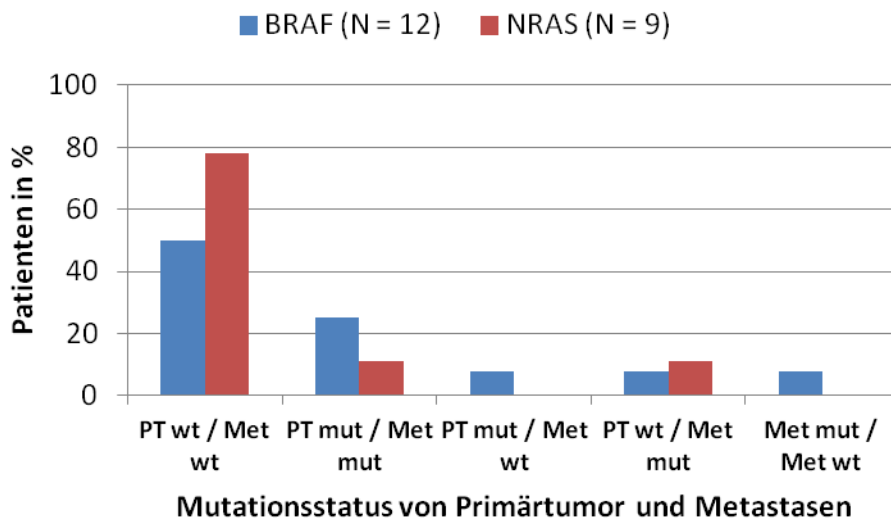


Abbildung 25: Verteilung von Punktmutationen der Onkogene *BRAF* und *NRAS* in den korrespondierenden Patientenproben

Dargestellt ist jeweils der Anteil an Patienten in % für die jeweilige Kombination aus Mutation und / oder wildtyp-Stadium in den individuellen Probenpaaren. Blaue Balken zeigen die Werte für *BRAF*, Rote für *NRAS*.

Anhand der verfügbaren klinischen Daten zu den untersuchten Patienten wurde überprüft, ob sich charakteristische Unterschiede ergeben, zwischen Patienten mit konvergentem (beide Läsionen entweder mutiert oder wildtyp), oder divergentem (unterschiedlicher Status zwischen den untersuchten Läsionen) Phänotyp. Untersucht wurden medianes Alter, Tumordicke, Clark-Level, Zeitraum zwischen Exzision des Primärtumors und erstem Rezidiv, Tumor-Stage, Subtyp des Primärtumors sowie Lokalisation des Primärtumors. Aufgrund der geringen Fallzahl sowie bisweilen fehlender Angaben, konnten bislang keine Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden.

Die gewonnenen Daten der Untersuchung individueller Paare auf ihren Mutationsstatus weisen wie die der untersuchten DCC eine Heterogenität innerhalb der einzelnen Patienten auf. Sie stärken damit die ersten Befunde aus den Untersuchungen von Isabelle Hodak, in denen sich eine Heterogenität zwischen PT und Met bei zwei der vier untersuchten Patienten (50 %) nachweisen ließ.

3.3.3 Genomische Charakterisierung MCSP+ und gp100+ Einzelzellen über Metaphasen-CGH

Punktmutationen der Onkogene *BRAF* und *NRAS* liefern einen weiteren Hinweis auf einem malignen Ursprung der isolierten DCC, reichen aber als alleiniges Kriterium nicht aus, da auch in benignen Zellen aus Nävi Mutationen nachgewiesen werden (Kumar et al., 2004; Pollock et al., 2003). Um eine sichere Aussage zu erhalten, wird aber eine Methode benötigt, mit der das gesamte Genom der Zellen untersucht werden kann.

Das Genom der isolierten Einzelzellen wurde deshalb mit der Methode der komparativen genomischen Hybridisierung (CGH) auf numerische Veränderungen hin untersucht. Dadurch konnten die MCSP+ Zellen auf das Vorhandensein für das Melanom charakteristischer genomischer Aberrationen getestet werden. Zudem war durch die Möglichkeit der Isolation von MCSP+ und gp100+ Zellen aus denselben Proben erstmals ein direkter Vergleich genomischer Veränderungen in Zellen der beiden Populationen innerhalb einzelner Patienten möglich. Genomische Veränderungen in gp100+ DCC sowie die prognostische Bedeutung dieser veränderten Zellen aus Wächterlymphknoten für den Melanompatienten wurden bereits beschrieben (Ulmer et al., 2005) und (Ulmer 2013, eingereicht zur Publikation).

Die CGH basiert auf einer Fluoreszenzmarkierung amplifizierter Einzelzell-DNA von Testzelle und DNA einzelner Normalzellen gesunder Probanden über unterschiedliche Antikörper. Ein Gemisch beider DNA-Fraktionen wird auf fixierte humane Metaphasenchromosome hybridisiert und gebunden. Deletionen und Amplifikationen auf den Chromosomen der Tumorzellen werden durch die Berechnung des Verhältnisses der Intensitäten der verwendeten Fluorochrome bestimmt. Dazu werden die Metaphasen zunächst fotografiert und das Karyogramm der Zellen erstellt.

Die Methode der CGH-Analyse auf Einzelzellebene wurde in der Arbeitsgruppe bereits etabliert (Klein et al., 1999). Auf eine genaue Beschreibung der Methode wird deshalb an dieser Stelle verzichtet und auf den Methodenteil und die Literatur verwiesen.

3.3.3.1 Patientenkollektive MCSP+ und gp100+ Zellen für die CGH-Analyse

In diese Untersuchungen flossen disseminierte Einzelzellen aus drei unterschiedlichen Zellpopulationen ein. Zunächst die MCSP+ Einzelzellen aus den Wächterlymphknoten des beschriebenen Regensburger Patientenkollektivs, sowie gp100+ Einzelzellen aus diesen Proben. Um Vergleichswerte zu den bisher in Kooperation mit Tübingen (Ulmer et al., 2013 eingereicht zur Publikation) generierten Daten zu erhalten, wurden auch die Ergebnisse gp100+ Einzelzellen aus Lymphknotenproben der Promotionsarbeit von Isabelle Hodak herangezogen. Diese Zellen stammen aus der Tübinger Studie, und werden im Folgenden

Ergebnisse

mit „Tübingen“ bezeichnet. (Eine Auflistung der Patientencharakteristika des Tübinger Kollektivs findet sich im Anhang).

Durch den Vergleich der CGH-Aberrationen sollte untersucht werden, ob sich in der DNA der Zellen Unterschiede oder Gemeinsamkeiten im Muster der Aberrationen zwischen den Kollektiven abzeichnen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Genome von 78 disseminierten Tumorzellen erfolgreich untersucht. Insgesamt 45 MCSP+ Zellen von 26 Patienten und 33 gp100+ Zellen von 20 Patienten. Von zehn Patienten aus dem Regensburger Kollektiv konnten sowohl MCSP+ als auch gp100+ Zellen in der CGH untersucht werden. Damit kamen Zellen von insgesamt 36 Patienten aus Regensburg zur Auswertung. Vergleichend werden die Ergebnisse von 54 gp100+ Zellen aus 35 Tübinger Patienten herangezogen, so dass insgesamt 132 Zellen von 71 Patienten verglichen werden konnten (**Tabelle 14**).

Tabelle 14: Mit CGH untersuchte Zellen der drei Kollektive (MCSP, gp100, gp100 Tübingen)

	MCSP+ Reg.	gp100+ Reg.	gp100+ Tüb.
mit CGH analysierte Zellen	45	33	54
Patientenzahl	26	20	35
Pat. mit gepaarten Proben	10		
Anzahl gepaarte Proben	24	22	
untersuchte Zellen / Patient			
Median (Mittel)	1 (1,7)	1 (1,65)	1 (1,54)
von - bis	1 - 4	1 - 4	1 - 5
Zellen ohne Veränderungen	15 (33 %)	6 (18 %)	8 (15 %)
N-Status des Patienten			
Zellen von N1	29	17	21
Zellen von N0	16	16	33
Zellmorphologie MCSP+			
kleine Zellen	19		
große Zellen	26		

Von den MCSP+ Zellen zeigten 30 (67 %) und von den gp100+ Zellen 27 (82 %) sichtbare Veränderungen in der CGH-Analyse (**Tabelle 14**). Es ergibt sich kein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit des Auftretens balancierter Zellen (Zellen ohne genomische Veränderungen) zwischen den Kollektiven. Von den Tübinger Zellen tragen 46 (85 %) genomische Veränderungen.

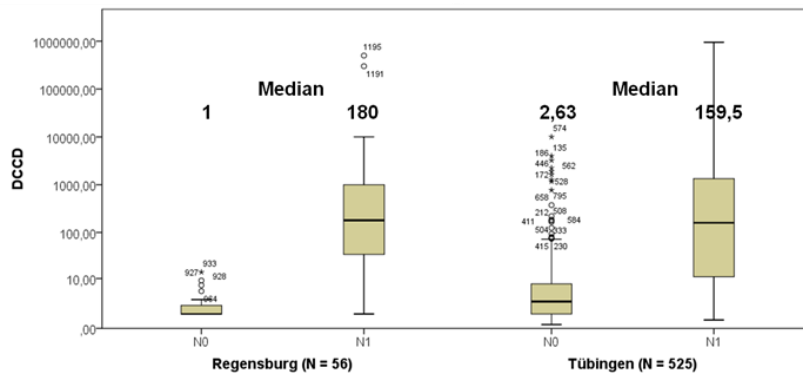
Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse der untersuchten Zellen zu gewährleisten, wurden die beiden gp100+ Populationen aus Tübingen und Regensburg auf ihren medianen DCCD-Wert in den Stadien N0 und N1 verglichen. Hintergrund dieser Untersuchung ist der Unterschied, der in der histopathologischen Aufarbeitung des Gewebes zwischen den beiden Studien besteht. Während in Regensburg der halbe Lymphknoten komplett durchgestuft und befundet wird (Abschnitt 3.1.1), geschieht die histologische Untersuchung in Tübingen lediglich an drei zentralen Schnittstufen. Es besteht somit die Möglichkeit, dass in Tübingen

die DCCD-Werte von N0-Patienten höher liegen als in Regensburg, da potentielle histologisch positive Patienten nicht als N1 eingestuft wurden. Die Einstufung als N1 trifft in Regensburg bei 24 % der Patienten, in Tübingen bei 13,53 % (Ulmer 2013, eingereicht zur Publikation) zu. Die medianen DCCD-Werte der N0- und N1-Patienten unterscheiden sich jedoch nicht signifikant ($p=0,34$ Fishers exact). Sie liegen bei N0-Patienten in Regensburg bei einer, in Tübingen bei 2,63 gp100+ Zellen pro Million (**Abb. 26 A**).

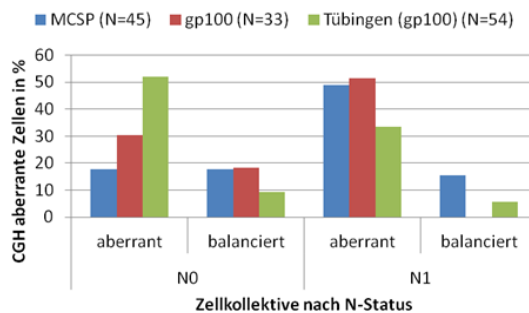
3.3.3.2 Aberrationsmuster MCSP+ und gp100+ Zellen

Von den untersuchten MCSP+ Zellen tragen 67 %, von den gp100+ Zellen 82 % genomische Aberrationen (**Tabelle 14**). In der vorausgegangenen Arbeit von Isabelle Hodak (unveröffentlicht) zeichnete sich eine Tendenz bei den untersuchten gp100+ DCC ab, dass die Anzahl der chromosomalen Veränderungen in Zellen aus Patienten im N1-Stadium niedriger ist, als in DCC von N0-Patienten. Zunächst wurde deshalb überprüft, ob das Vorhandensein chromosomaler Veränderungen in Zusammenhang mit dem N-Status der Patienten steht. Während bei gp100+ Zellen aus Regensburg balancierte Zellen signifikant häufiger in N0-Patienten auftreten ($p=0,01$ chi-Quadrat), ist das bei den gp100+ Zellen aus Tübingen nicht der Fall ($p=1,0$ Fisher exact). Der Unterschied in der Verteilung aberranter und balancierter Zellen basierend auf dem N-Status der Patienten zeichnet sich auch bei den MCSP+ Zellen deutlich ab, wird jedoch hier nicht signifikant ($p=0,15$ chi-Quadrat) (**Abb. 26 B**). Für die MCSP+ Zellen wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Phänotyp der Zellen und der Verteilung von aberranten und balancierten Zellen untersucht. Morphologisch kleine Zellen tragen in 47 % der Fälle keine Veränderung, große Zellen in 22 %. Der Unterschied in der Verteilung ist nicht signifikant ($p=0,16$ chi Quadrat), was sehr wahrscheinlich durch die geringe Fallzahl der untersuchten Zellen begründet ist (**Abb. 26 C**).

A



B



C

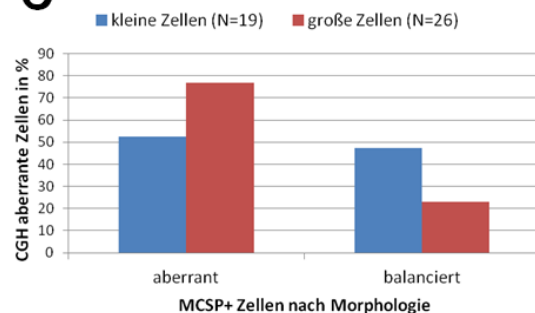


Abbildung 26: Verteilung aberranter und balancierter Zellen sowie mediane DCCD-Werte in den untersuchten Kollektiven

- A) Dargestellt sind die medianen DCCD-Werte der gp100+ Patienten aus den Kollektiven Regensburg und Tübingen aufgeteilt nach Stadium N0 und N1. Der Boxplot gibt logarithmiert in den Balken jeweils den DCCD-Wert von 50 % der eingeschlossenen Patienten an, die senkrechten Linien markieren die Spannweite und der schwarze Querbalken in den Plots den medianen DCCD-Wert
- B) Dargestellt ist die Verteilung aberranter und balancierter Zellen in den drei Kollektiven (in %) in Abhängigkeit vom N-Status des Patienten
- C) Dargestellt ist die Verteilung aberranter und balancierter MCSP+ Zellen (in %) in Abhängigkeit von der Zellmorphologie.

Die mediane Anzahl genomischer Veränderungen pro Zelle zwischen den Populationen unterscheidet sich nicht wesentlich (**Abb. 27** und **Tabelle 15**). Zusätzlich wurde das Auftreten von Aberrationen in den Zellkollektiven für die Stadien N0 und N1 überprüft.

Die Anzahl der Aberrationen insgesamt sowie der chromosomalen Gewinne unterscheiden sich in den Kollektiven nicht signifikant. Ein signifikanter Unterschied besteht zwischen der Anzahl chromosomaler Verluste der MCSP+ Zellen und den Zellen beider gp100-Kollektive (Regensburg und Tübingen). Dieser Unterschied bleibt signifikant, beim Vergleich von Patientenzellen des Stadiums N1 (**Tabellen 15** und **16**).

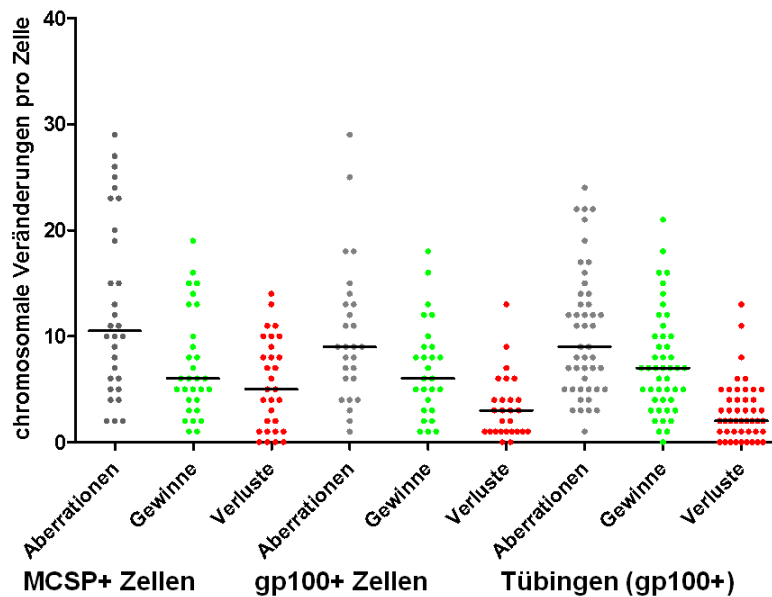


Abbildung 27: Mediane Anzahl genomischer Veränderungen in den Zellen

Dargestellt sind für die drei Zellkollektive (MCSP, gp100 und Tübingen gp100) jeweils die Gesamtzahl der Aberrationen je Zelle sowie der Anteil an Amplifikationen und Deletionen. Der Querbalken markiert jeweils den Median. (**Zahlenwerte in Tabelle 15**)

Tabelle 15: Mediane Anzahl genomischer Veränderungen in den untersuchten Zellen der jeweiligen Kollektive (analog zu Abbildung 27)

Kollektiv	Gruppe (Anzahl Zellen)	Mediane Anzahl Aberrationen		
		gesamt	Gewinne	Verluste
MCSP	gesamt (30)	10,5	6	5
	N1 (22)	12,5	6,5	7
	N0 (8)	6	4,5	1
gp100	gesamt (27)	9	6	3
	N1 (17)	9	8	3
	N0 (10)	7,5	4,5	2,5
Tübingen	gesamt (46)	9	7	2
	N1 (18)	7,5	5	2,5
	N0 (28)	11	7,5	2

Innerhalb des MCSP-Kollektivs besteht ein signifikanter Unterschied in der Zahl chromosomaler Aberrationen zwischen den N1- und den N0-Zellen. Dieser Befund beruht auf der signifikant unterschiedlichen medianen Anzahl chromosomaler Verluste zwischen N1 und N0 Zellen. Während MCSP+ Zellen im Stadium N0 im Median 1 Verlust pro Zelle aufweisen, sind es bei Zellen im Stadium N1 im Median 7. Bei den gp100 Zellen beider Kollektive unterscheidet sich die mediane Anzahl chromosomaler Verluste nicht signifikant zwischen den Stadien N0 und N1 (**Tabelle 16**).

Tabelle 16:

p-Werte nach Mann-Whitney-Wilcoxon, zeigen signifikante Unterschiede in der Zahl genomischer Veränderungen zwischen Zellkollektiven und Krankheitsstadien N1 und N0

Zellkollektive	Gruppen im Vgl.	p-Werte nach Mann-Whitney-Wilcoxon		
		Aberrationen	Gewinne	Verluste
MCSP	N1 zu N0	0,0139	0,1527	0,0099
gp100	N1 zu N0	0,303	0,2077	0,6892
Tübingen	N1 zu N0	0,5093	0,0836	0,267
MCSP zu gp100	gesamt	0,3173	0,9362	0,0588
	N1 zu N1	0,1069	0,8887	0,0051
	N0 zu N0	0,6599	1	0,246
MCSP zu Tübingen	gesamt	0,332	0,7263	0,0121
	N1 zu N1	0,0424	0,2263	0,0124
	N0 zu N0	0,1188	0,0673	0,4009
gp100 zu Tübingen	gesamt	0,865	0,7339	0,6171
	N1 zu N1	0,3898	0,1707	0,865
	N0 zu N0	0,2585	0,1802	0,6527

Da sich im MCSP-Kollektiv signifikante Unterschiede hinsichtlich chromosomaler Verluste in Zellen der Stadien N0 und N1 zeigten, wurde untersucht ob auch ein Zusammenhang mit der Morphologie der Zellen besteht. Von den morphologisch großen MCSP+ Zellen tragen 20 (77 %) Aberrationen, verglichen mit 10 (53 %) der kleinen MCSP+ Zellen (**Abb. 26 C**). Die mediane Anzahl chromosomaler Veränderungen entspricht bei diesem Vergleich den Befunden aus dem Vergleich der N-Stadien der Patienten. Die Anzahl chromosomaler Verluste ist in den morphologischen Gruppen signifikant unterschiedlich (**Tabelle 17**). Der Median liegt bei den großen Zellen bei 7, bei den kleinen Zellen bei 1,5 Verlusten. Die Gesamtzahl an Aberrationen ist bei morphologisch großen MCSP+ Zellen höher. Der Unterschied ist gerade nicht signifikant (**p=0,0615**), was aber vermutlich durch die geringe Fallzahl bedingt ist.

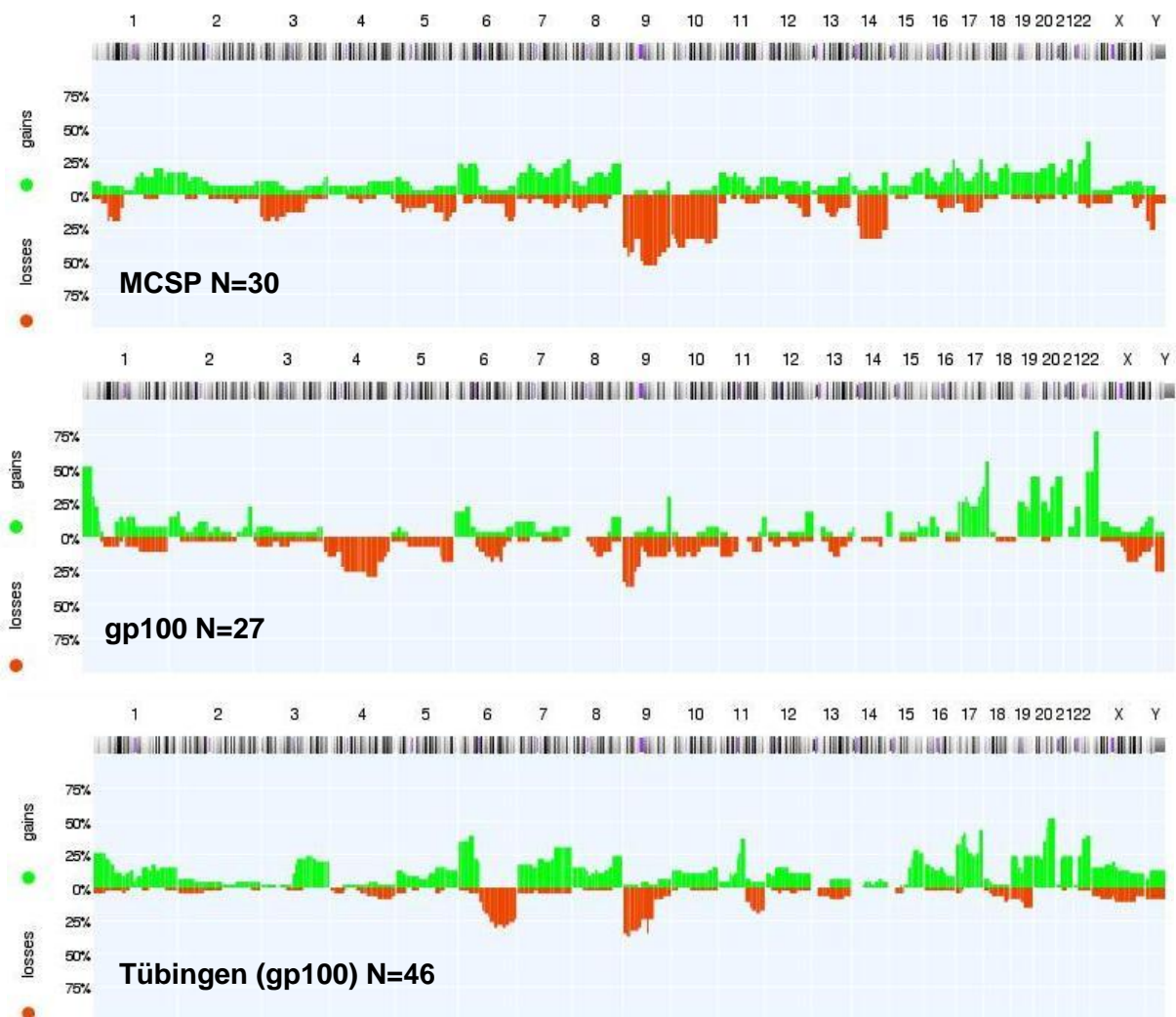
Tabelle 17:

Mediane Anzahl chromosomaler Veränderungen in den untersuchten MCSP+ Zellen beim Vergleich der beiden morphologischen Gruppen

	MCSP	gesamt	Gewinne	Verluste
Anzahl Aberrationen(median)	große Zellen	12,5	6,5	7
	kleine Zellen	6,5	5	1,5
große zu kleinen Zellen	p-Wert (Mann-Whitney)	0,0615	0,332	0,0349

Mit Hilfe des Programms *Progenetix* (www.progenetix.org) wurden Histogramme von den chromosomalen Veränderungen der untersuchten Zellen erstellt, um die Verteilung der Aberrationen im Genom der Zellen anschaulich zu machen (**Abb. 28 A und B**).

A



B

	1p	1q	2p	2q	3p	3q	4p	4q	5p	5q	6p	6q	7p	7q	8p	8q	9p	9q	10p	10q	11p	11q	12p	12q	13p	13q	14p	14q	15p	16p	16q	17p	17q	18p	18q	19p	19q	20p	20q	21p	21q	22p	22q	Xp	Xq	Yp	Yq		
MCSP gesamt																																																	
gp100 gesamt																																																	
TÜBINGEN gesamt																																																	

Abbildung 28: Chromosomale Veränderungen in Zellen der drei Kollektive. (eingeschlossen nur aberrante Zellen)

- A) Histogramme der untersuchten Populationen (nach Progenetix). Grüne Balken zeigen die relative Anzahl chromosomaler Gewinne in der untersuchten Gruppe von Zellen, rote Balken chromosomale Verluste.
- B) Tabellarische Zusammenstellung der Befunde aus A). Grüne Felder bedeuten Amplifikationen und Rote Deletionen auf den Chromosomenarmen, wenn diese in mindestens 25 % der untersuchten Zellen nachweisbar sind.

In der grafischen Darstellung der Histogramme (**Abb. 28 A**) wird deutlich, dass genomische Aberrationen in den MCSP+ Zellen häufiger auftreten, was durch die berechnete mediane Anzahl an Aberrationen (**Tabelle 15**) bestätigt wird. Die Aberrationen verteilen sich auf das gesamte Genom, mit wenigen deutlichen Spitzen (**Tabelle 18**). Bei den korrespondierenden

gp100+ Zellen ist die mediane Anzahl an Aberrationen geringer, aber die Veränderungen konzentrieren sich stärker auf bestimmte Regionen im Genom. Beispielsweise zeigen mehr als 50 % der untersuchten Zellen Gewinne auf Chromosom 1 und mehr als 75 % der Zellen Gewinne auf Chromosom 22 (**Abb. 28 A**).

Beim Vergleich der beiden gp100-Kollektive wird ein unterschiedliches Aberrationsprofil deutlich (**Abb. 28 B**). So zeigen beispielsweise nur 25 % der Tübinger Zellen eine Amplifikation auf Chromosom 1 und knapp 50 % den Gewinn auf Chromosom 22. Das in den Tübinger Zellen charakteristische Amplikon auf Chromosom 11q, das hier 37 % der untersuchten Zellen tragen, fehlt in den Regensburger gp100 Zellen. Den Zellen aus Tübingen fehlen dagegen die Deletionen auf Chromosom 4.

Gemeinsam tritt in allen drei Zellpopulationen in mehr als 25 % der Zellen eine chromosomale Deletion auf Chromosom 9p auf und ein Gewinn auf Chromosom 22q. Die beiden gp100 Kollektive zeigen zusätzlich Gemeinsamkeiten bei chromosomalen Gewinnen auf Chromosom 1p sowie Chromosom 17 (**Abb. 28 B**).

In der grafischen Darstellung der Histogramme (**Abb. 29 A und B**) wird der Unterschied in der Gesamtzahl an Aberrationen (**Tabelle 15**) zwischen den klinischen Stadien N1 und N0 deutlich. Dieser Unterschied ist im gp100 Zell-Kollektiv aus Regensburg nicht vorhanden. Hier unterscheiden sich die klinischen Stadien mehr in der Verteilung chromosomaler Gewinne und Verluste im Genom. Die Gesamtzahl an Aberrationen im gp100 Kollektiv aus Tübingen nimmt vom Stadium N0 zu N1 ab (**Tabelle 15 und Abb. 29 A**), und zeigt damit eine entgegengesetzte Entwicklung zu den MCSP+ Zellen.

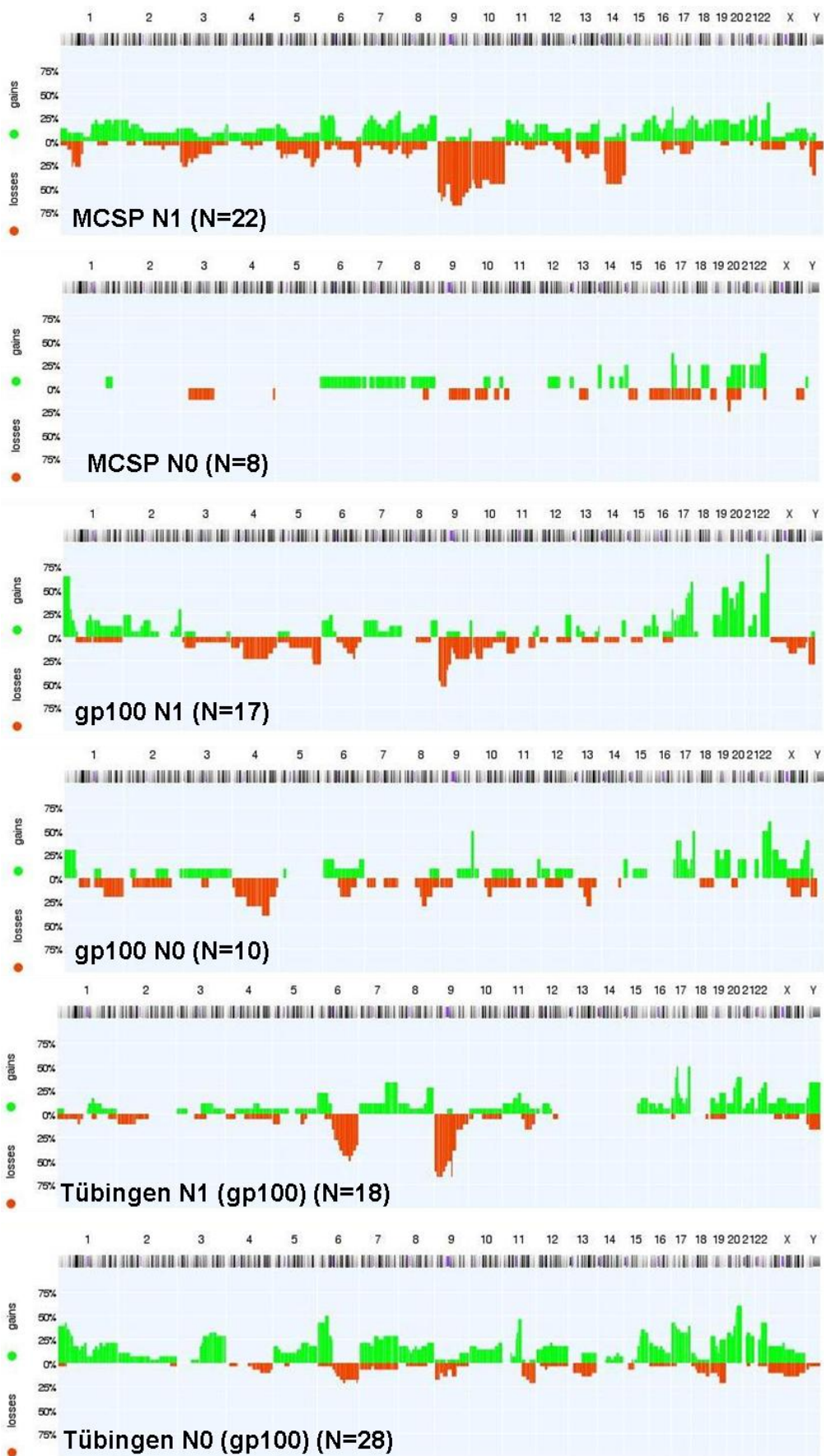
Beim direkten Vergleich der beiden gp100 Kollektive weisen diese, auch zwischen den klinischen Stadien, wiederum unterschiedliche Veränderungsmuster auf (**Abb. 29 A und B / Tabelle 18**).

Gp100+ Zellen aus Tübingen zeigen insgesamt mehr chromosomale Gewinne im Stadium N0. Das 11q Amplikon im Genom dieser Zellen tritt vermehrt bei Zellen von N0-Patienten auf. Die Amplifikation auf Chromosom 9q der Regensburger gp100 Zellen im Stadium N0 wiederholt sich in keiner der anderen Zellpopulationen. Gp100+ Zellen beider Populationen vom Stadium N1 zeigen chromosomale Verluste auf Chromosom 6 und 9. Die Tübinger Zellen weisen jedoch die chromosomalen Gewinne auf Chromosom 1p und 22q nicht in dem Maße auf, wie sie in den Regensburger Zellen mit bis zu 80 % der Fälle vorliegen. Insgesamt ähneln sich die Aberrationsmuster der Regensburger gp100-Zellen aus den beiden klinischen Krankheitsstadien mehr, wohingegen, wie oben beschrieben, bei den Tübinger Zellen ein deutlicher Unterschied in der Anzahl und der Verteilung der Veränderungen im Genom der untersuchten Zellen vorliegt (**Abb. 29 A und B**).

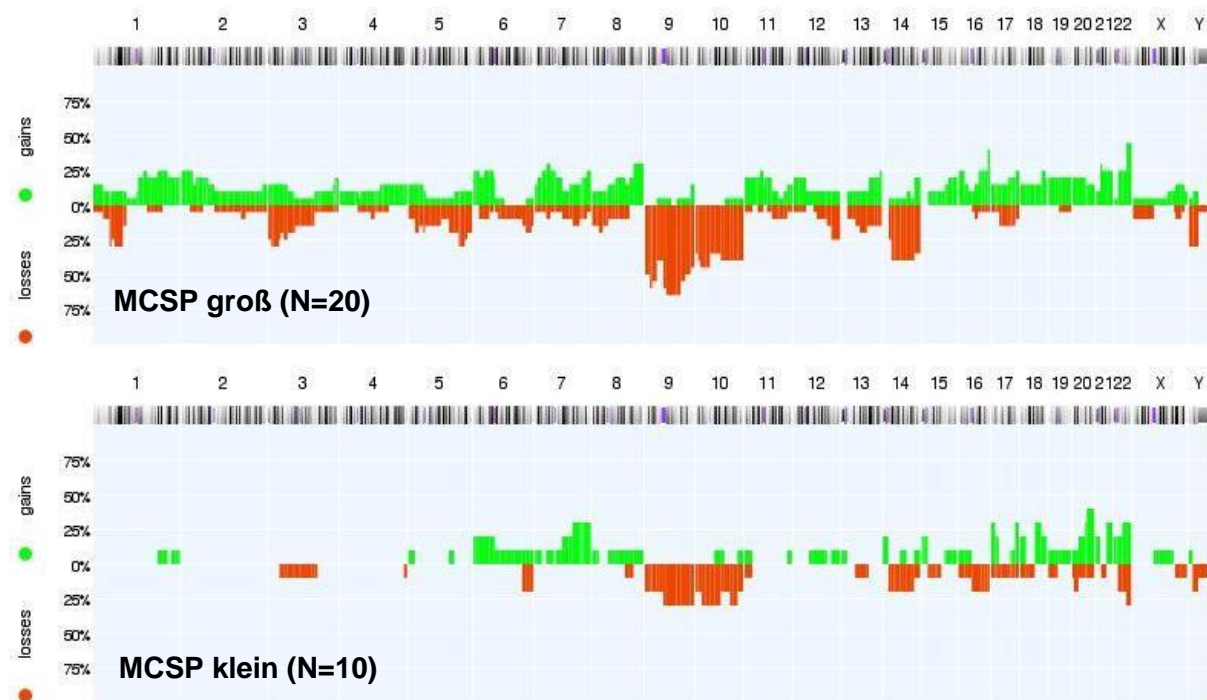
MCSP+ Zellen im Stadium N1 zeigen deutliche Deletionsspitzen auf den Chromosomen 9, 10 und 14. Die Deletion auf Chromosom 9 wiederholt sich in den gp100-Kollektiven vom Stadium N1. Gemeinsam haben MCSP+ und gp100+ Zellen aus Tübingen vom Stadium N1 die Deletion auf Chromosom 6q. Gemeinsam mit ihren korrespondierenden gp100+ N1-Zellen zeigen sie gehäuft Verluste auf Chromosom 5q und Y sowie Gewinne auf Chromosom 16q, 19q, 20q und 22q.

Allen Kollektiven vom Stadium N1 gemeinsam ist der Verlust auf Chromosom 9 und der Gewinn auf Chromosom 17. Bei den untersuchten Zellen im Stadium N0 liegt eine größere Heterogenität zwischen den Kollektiven vor. Gemeinsam ist den Zellen hier ein Gewinn auf Chromosom 17 und 22q (**Abb. 29 A und B / Tabelle 18**).

A



A



B

	1p	1q	2p	2q	3p	3q	4p	4q	5p	5q	6p	6q	7p	7q	8p	8q	9p	9q	10p	10q	11p	11q	12p	12q	13p	13q	14p	14q	15p	16p	16q	17p	17q	18p	18q	19p	19q	20p	20q	21p	22p	22q	Xp	Xq	Yp	Yq		
MCSP N1																																																
MCSP groß																																																
MCSP N0																																																
MCSP klein																																																

Abbildung 30: Chromosomale Veränderungen in MCSP+ Zellen aufgeteilt nach den beiden morphologischen Gruppen. (eingeschlossen nur aberrante Zellen)

- A) Histogramme der untersuchten Populationen (nach Progenetix). Grüne Balken zeigen die relative Anzahl chromosomaler Gewinne in der untersuchten Gruppe von Zellen, rote Balken chromosomale Verluste.
- B) Tabellarische Zusammenstellung der Befunde aus A). Grüne Felder bedeuten Amplifikationen und rote felder Deletionen auf den Chromosomenarmen, wenn diese in mindestens 25% der untersuchten Zellen nachweisbar sind. Gelbe Felder bedeuten sowohl Deletionen als auch Amplifikationen auf diesem Abschnitt des Chromosoms

Tabelle 18: Amplifikationen und Deletionen in den Kollektiven insgesamt sowie unterschieden nach N-Status und Morphologie (MCSP). Aufgelistet sind dabei chromosomale Regionen, wenn sie in jeweils mindestens 25 % der untersuchten Zellen Aberrationen tragen.

	MCSP+ Zellen mit Aberrationen (N = 30)																		
Gewinne	7q	18q	20q	21q	22q														
Verluste	9p	9q	10p	10q	14q	Yq													
	MCSP+ Zellen mit Aberrationen aus Stadium N1 (N = 22)																		
Gewinne	1q	2p	6p	7p	7q	8q	11p	15q	16p	16q	17q	18q	19p	19q	20q	21q	22q		
Verluste	1p	3p	5q	6q	9p	9q	10p	10q	14q	Yp	Yq								
	MCSP+ Zellen mit Aberrationen aus Stadium N0 (N = 8)																		
Gewinne	14p	15p	17p	17q	18q	20p	20q	21p	21q	22p	22q								
Verluste	20p																		
	Große MCSP+ Zellen mit Aberrationen (N = 20)																		
Gewinne	1q	2p	6p	7p	7q	8q	11p	13q	15q	16p	16q	17q	18q	19p	19q	20p	20q	21q	22q
Verluste	1p	3p	5p	5q	9p	9q	10p	10q	12q	14q	Yp	Yq							
	Kleine MCSP+ Zellen mit Aberrationen (N = 10)																		
Gewinne	7q	17p	17q	18q	20q	21q	22q												
Verluste	9q	10p	10q	22q															
	gp100+ Zellen mit Aberrationen (N = 27)																		
Gewinne	1p	9q	16q	17p	17q	19p	19q	20p	20q	22q									
Verluste	4q	9p	Yp	Yq															
	gp100+ Zellen mit Aberrationen aus Stadium N1 (N = 17)																		
Gewinne	1p	2q	16q	17q	19q	20p	20q	22q											
Verluste	5q	9p	Yp	Yq															
	gp100+ Zellen mit Aberrationen aus Stadium N0 (N = 10)																		
Gewinne	1p	9q	17p	17q	19p	19q	22q	Xp	Xq										
Verluste	4q	8q	13q																
	Tübingen gp100+ Zellen mit Aberrationen (N = 46)																		
Gewinne	1p	6p	7q	11q	15q	17p	17q	20q	22q										
Verluste	6q	9p	9q																
	Tübingen gp100+ Zellen mit Aberrationen aus Stadium N1 (N = 18)																		
Gewinne	17q	Yq																	
Verluste	6q	9p	9q																
	Tübingen gp100+ Zellen mit Aberrationen aus Stadium N0 (N = 28)																		
Gewinne	1p	4q	6p	7q	11q	17p	17q	19p	19q	20p	20q	21q	22q						
Verluste	11q																		

3.3.3.3 CGH-Aberrationen und DCCD-Wert im Lymphknoten

Die Auswertungen ergaben bei den MCSP+ Zellen einen deutlichen Unterschied im Aberrationsmuster, wenn diese aus Patienten mit unterschiedlichem Lymphknotenstatus der Erkrankung stammten. In Kooperation mit Tübingen konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der detektierten gp100+ Zellen einen wichtigen Prognosefaktor für den Verlauf der Krankheit darstellt. Es wurde deshalb untersucht, ob sich die genomischen Veränderungen nur im Vergleich der klinischen Krankheitsstadien derart stark unterscheiden, oder ob sich auch

Ergebnisse

bereits aufgrund der Anzahl an detektierten Zellen ein Unterschied im Genom der Zellen erkennen lässt. Als kritischer Wert wurde der DCCD von 100 Zellen pro Million gewählt, da ab diesem Wert von einer Zellkolonie im Lymphknoten ausgegangen werden kann (Ulmer 2013, eingereicht zur Publikation), der Vorstufe einer Mikrometastase (und damit zum Stadium N1).

Das Aberrationsmuster der Zellen unterscheidet sich in den beiden gp100+ Zellpopulationen nicht wesentlich zwischen einem DCCD-Wert >100 und dem Stadium N1, bzw. DCCD <100 und N0 (**Abb. 31**). Das zeigt auch der Vergleich (**Tabelle 19**) der medianen Anzahl an Aberrationen. Diese stimmen weitestgehend mit den Werten für N1 und N0 (**Tabelle 15**) überein. Bei den MCSP+ Zellen treten sowohl in der Gruppe >100 Zellen als auch in der Gruppe <100 Zellen Aberrationen in mehr Regionen auf, als beim Vergleichsstadium N1 und N0. Die mediane Anzahl an Aberrationen verändert sich dabei aber nicht wesentlich im Vergleich zu den Stadien N1 und N0. (**Tabellen 15 und 19**)

	1p	1q	2p	2q	3p	3q	4p	4q	5p	5q	6p	6q	7p	7q	8p	8q	9p	9q	10p	10q	11p	11q	12p	12q	13p	13q	14p	15p	16p	16q	17p	17q	18p	18q	19p	19q	20p	20q	21p	22q	Xp	Xq			
MCSP > 100																																													
MCSP N1																																													
MCSP < 100																																													
MCSP N0																																													
gp100 > 100																																													
gp100 N1																																													
gp100 < 100																																													
gp100 N0																																													
Tübingen > 100																																													
TÜBINGEN N1																																													
Tübingen < 100																																													
TÜBINGEN N0																																													

Abbildung 31: Tabellarische Zusammenstellung chromosomaler Veränderungen in den drei Zellpopulationen aufgeteilt nach dem DCCD-Wert > bzw. <100 Zellen/Mio. Zur besseren Vergleichbarkeit mit den Befunden der N-Stadien sind diese mit angefügt.

Grüne Felder bedeuten Amplifikationen und rote Felder Deletionen auf den Chromosomenarmen, wenn diese in mindestens 25 % der untersuchten Zellen nachweisbar sind. Gelbe Felder bedeuten sowohl Deletionen als auch Amplifikationen auf diesem Abschnitt des Chromosoms (Eingeschlossen nur aberrante Zellen)

Tabelle 19: Mediane Anzahl genomischer Veränderungen in den untersuchten Zellen der jeweiligen Kollektive in Abhängigkeit vom DCCD-Wert

Kollektiv	Gruppe (Anzahl Zellen)	Mediane Anzahl Aberrationen		
		gesamt	Gewinne	Verluste
MCSP	gesamt (30)	10,5	6	5
	DCCD > 100 (11)	13	9	8
	DCCD < 100 (19)	7	5	2
gp100	gesamt (27)	9	6	3
	DCCD > 100 (16)	9	7	2,5
	DCCD < 100 (11)	8	5	3
Tübingen	gesamt (46)	9	7	2
	DCCD > 100 (16)	7	5	2
	DCCD < 100 (30)	11	7	2

3.3.3.4 CGH-Aberrationen und Mutationsstatus des *BRAF*-Gens

Neben dem Lymphknotenstatus ist der *BRAF*-Status für Therapieentscheidungen beim Melanom ein wichtiger Faktor. Da von den meisten der isolierten Einzelzellen in den Kollektiven der Mutationsstatus bekannt ist, wurde untersucht, ob sich Unterschiede in Zellen mit und ohne Mutation abzeichnen. Die Zellen aller drei Kollektive wurden dabei zusammengefasst.

In den Zellen mit *BRAF*-Mutation sind mehr chromosomale Veränderungen erkennbar als in den Wildtyp-Zellen (**Abb. 32 A**). Die mediane Anzahl der Aberrationen sowie der chromosomalen Gewinne unterscheidet sich aber nicht signifikant zwischen den Zellen mit und ohne Mutation ($p=0,13$ bzw. $p=1$ Mann-Whitney). Zellen mit *BRAF*-Mutation tragen hingegen signifikant häufiger Deletionen ($p=0,0014$ Mann-Whitney) (**Abb. 32 B**). Besonders deutlich treten Verluste der mutierten Zellen auf Chromosom 5, 9, 10 und 14, sowie Amplifikationen auf Chromosom 7 hervor (**Abb. 32**).

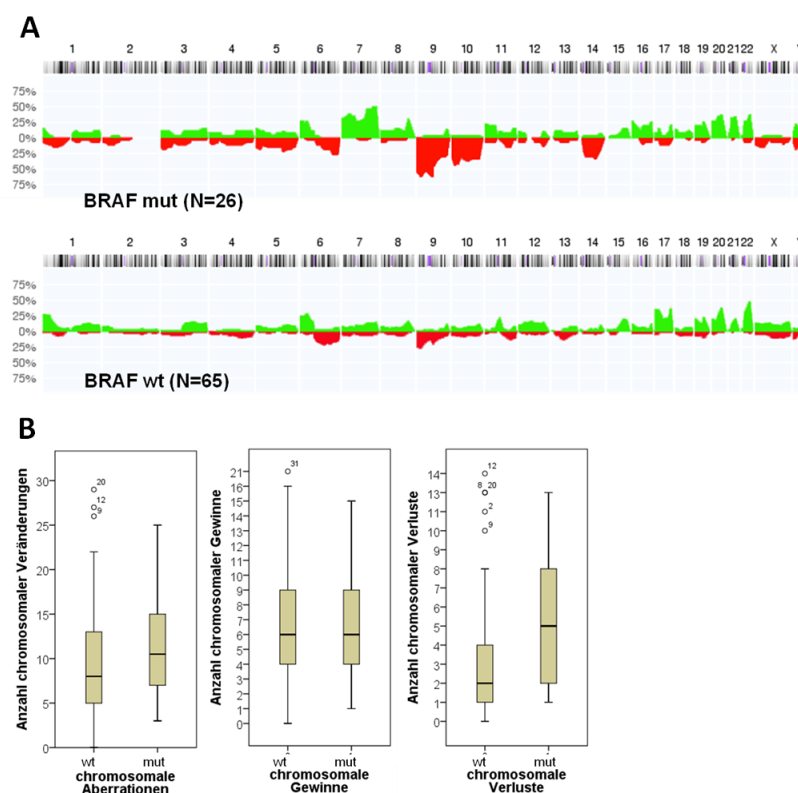


Abbildung 32: Chromosomale Veränderungen in Zellen der drei Kollektive aufgeteilt nach ihrem Mutationsstatus für BRAF V600E. (eingeschlossen nur aberrante Zellen)

A) Histogramme der untersuchten Populationen (nach Progenetix). Grüne Balken zeigen die relative Anzahl chromosomaler Gewinne in der untersuchten Gruppe von Zellen, rote Balken chromosomale Verluste.

B) Dargestellt sind die absoluten Zahlen chromosomaler Veränderungen insgesamt, sowie aufgeteilt in Gewinne und Verluste im Vergleich der Zellen mit *BRAF*-Mutation (mut) (N=26) und ohne Mutation (wt) (N=65). Die Boxplots geben in den Balken jeweils die Anzahl an Veränderungen von 50 % der eingeschlossenen Zellen an, die senkrechten Linien markieren die Spannweite und der schwarze Querbalken in den Plots den medianen Wert.

3.3.3.5 Genomische Heterogenität disseminierter Tumorzellen

Die untersuchten DCC zeigten in der CGH Unterschiede im Veränderungsprofil zwischen den Populationen, den N-Stadien und den morphologischen Gruppen. Deshalb war es von Interesse zu überprüfen, ob die Zellen neben der auffallenden Heterogenität auch gemeinsame Muster an Veränderungen aufweisen.

Hilfe des Programms *Cluster* (EisenSoftware.htm) wurde das Muster der genomischen Veränderungen in den untersuchten Einzelzellen bestimmt. In die folgenden Cluster-Analysen wurden wiederum nur Zellen mit genomischen Veränderungen eingeschlossen. Zellen mit balanciertem Genom kamen nicht zur Auswertung. Ebenso musste ein Weg gefunden werden, um die Überrepräsentation einzelner Patienten im Kollektiv zu verhindern. Von einzelnen Patienten wurden zwischen einer und sieben Einzelzellen untersucht. Deshalb wurden pro Patient maximal zwei Zellen des gleichen Kollektivs in die Analyse eingeschlossen. Wenn beispielsweise sowohl MCSP als auch gp100-Zellen untersucht wurden, kamen somit maximal je zwei MCSP+ und zwei gp100+ Zellen in die Auswertung. Bei der Auswahl dieser selektierten Zellen wurden jeweils die Zellen gewählt, die sich in ihrem Aberrationsprofil maximal voneinander unterschieden.

Insgesamt wurden in diese Analyse 91 Zellen eingeschlossen, davon 25 MCSP+ und 24 gp100+ Zellen aus Regensburg und 42 gp100+Zellen aus Tübingen.

Um in den folgenden Abbildungen und Auswertungen der Cluster-Analyse sowie der Dendrogramme die Identität der eingesetzten Zellen nachvollziehbar zu machen, wurde den einzelnen Zellen ein kurzer Code zugeordnet (**Tabelle 20**). Dieser Code ermöglicht auf vereinfachte Weise, die wesentlichen Eigenschaften und Gruppenzugehörigkeiten der Zellen darzustellen.

Bei dieser Analyse wird der Verwandtschaftsgrad der in die Auswertung eingeschlossenen Zellen durch ein sogenanntes Dendrogramm dargestellt und nachvollziehbar gemacht (**Abb. 33** und **34**). Die jeweilige Länge der Verbindungslinien vor der jeweils nächsten Verzweigung ist, zusätzlich zur Anzahl der Verzweigungen, ein weiteres Maß für die Verwandtschaft der untersuchten Zellen.

Es wurde ersichtlich, dass kein klares Verwandtschaftsschema zwischen den untersuchten Zellen vorliegt (**Abb. 33**). In dem heterogenen Muster der Aberrationen zeichnen sich, bis auf vereinzelte Regionen, keine klaren Amplifikations- oder Deletionsspitzen ab.

Über die Zellkollektive hinweg einheitlich veränderte Regionen liegen auf Chromosom 22q, 1p, und 17q als Amplifikationen, auf Chromosom 9 als Deletion (**Abb. 34 A**).

Im Dendrogramm zeigt sich auch für keines der weiteren untersuchten Parameter (N-Status, Mutationsstatus, Follow-up und Zellmorphologie der MCSP+ Zellen) eine einheitliche Gruppierung in, bzw. statistisch signifikant unterschiedliche Verteilung der Zellen auf, die beiden Hauptarme des Dendrogramms (**Abb. 34 B**).

Die Verteilung auf die beiden Hauptarme unterscheidet sich nicht signifikant für Zellen aus Patienten vom Stadium N1 und N0 ($p=0,1$ chi-Quadrat), oder dem *BRAF*-Mutationsstatus der Zellen ($p=0,26$ chi-Quadrat). Wobei eine Tendenz der Gruppierung von Zellen aus Patienten mit Lymphknotenbeteiligung (N1) im unteren Ast zu erkennen ist. Möglicherweise ist die Fallzahl hier für eine genaue statistische Aussage zu klein.

Über das ganze Dendrogramm zeichnen sich Kumulationen von Einzelzellen aus denselben Patienten ab. Diese Kumulation tritt sowohl bei Zellen aus dem gleichen Kollektiv auf, als auch über die Kollektive aus MCSP+ und gp100+ Zellen hinweg, wenn diese aus der gleichen Probe isoliert wurden. Beispielsweise ähneln sich die MCSP+ Zellen aus beiden untersuchten Lymphknoten (A und B) von Patient 30 im oberen Ast des Dendrogramms, sowie die beiden gp100+ Zellen dieses Patienten. Zwischen den MCSP+ und gp100+ Zellen dieses Patienten liegen jedoch 4 Aufspaltungen (Stufen). Bei diesem Patienten handelte es sich um das Stadium N0. Im unteren Ast sind Zellen vom Stadium N1 von Patient 124 gruppiert. Dabei liegen zwischen den MCSP+ und gp100+ Zellen nur zwei Aufspaltungen. Dasselbe ist für N1-Zellen im unteren Ast bei Patient 41 ersichtlich (**Abb. 34 B**).

Tabelle 20: Nummern-Code zur Beschriftung der Zellen in der Cluster-Analyse

Position	Bedeutung	Beispiel
1	Nummer des Patienten im Kollektiv	124 = Patient 124 25B = Patient 25 Lymphknoten B
2	Zellkollektiv	M = MCSP H = HMB (gp100) aus Regensburg T = HMB (gp100) aus Tübinger Kollektiv
3	Phänotyp (nur bei MCSP+)	1 = groß 2 = klein intensiv 3 = klein schwach 4 = gemischt
4	N-Status	1 = N1 0 = N0
5	BRAF Status	1 = mutiert 0 = wildtyp x = kein Befund
6	Follow up	0 = kein Event 1 = systemische Erkrankung (lokal Rez. , Met., Verstorben)
7	Zell-Nummer	Z1, Z2 etc.

Darstellung im average-linkage mode. Spalten zeigen die untersuchten Zellen, Zeilen die Chromosomregionen. Über der Clusteranalyse das Dendrogramm zur Bestimmung des Verwandtschaftsgrades (siehe **Abb. 34**). Rote Kästchen bedeuten Deletionen,, grüne Kästchen Amplifikationen in der entsprechenden Region.

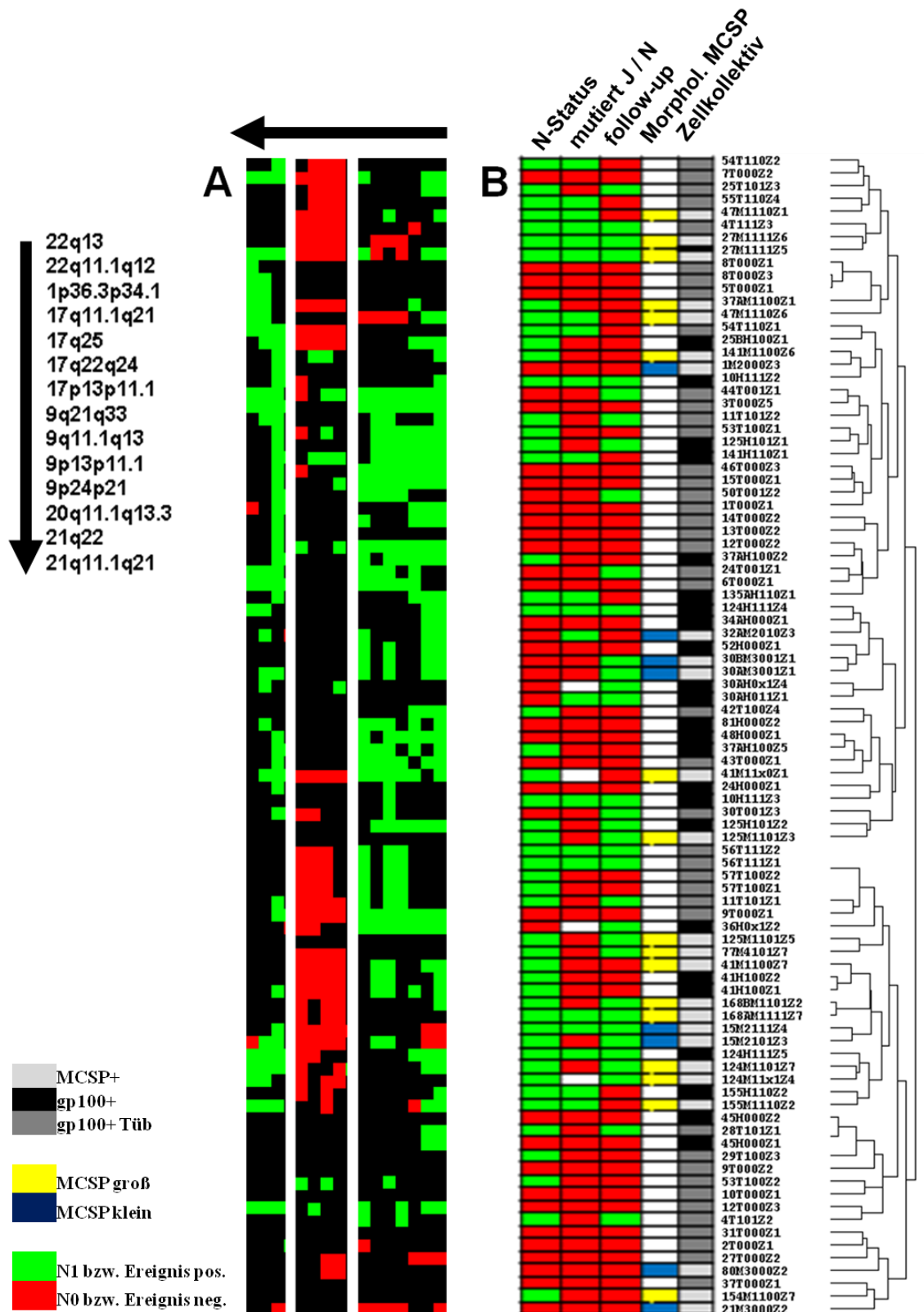


Abbildung 34: Gemeinsam veränderte chromosomale Regionen und Dendrogramm der Ähnlichkeitsanalyse der aberranten Einzelzellen (aus Abb. 33)

- A) Ausschnitt aus der Clusteranalyse mit Dendrogramm (von Abb. 33). Es sind Regionen eingeschlossen, die in den untersuchten Zellen am meisten Übereinstimmung in den chromosomalen Veränderungen aufweisen. Die Pfeile geben die Leserichtung der Chromosomenabschnitte in der Abbildung an.
- B) Die Farbbalken links vom Zellcode (Tabelle 20) geben die Zugehörigkeit zu den drei Kollektiven und die untersuchten Charakteristika nochmals grafisch wieder.

3.3.3.6 Heterogenität disseminierter Tumorzellen innerhalb einzelner Patienten

In der durchgeführten Verwandtschaftsanalyse der Zellen zeigte sich hinsichtlich der untersuchten Gesamtpopulation ein großer Grad an Heterogenität zwischen den Zellen. Es ergaben sich keine spezifischen Aberrationsmuster in Zellen der unterschiedlichen Populationen von MCSP und gp100. In der Clusteranalyse deutete sich eine Tendenz der Gruppierung von Zellen aus denselben Patienten an, obwohl in den meisten Fällen bereits eine Vorselektion auf zwei Zellen je Patient und Zellkollektiv mit dem stärksten Abweichungsprofil getroffen wurde. Im Folgenden wird die Verwandtschaft aller untersuchter Zellen in den einzelnen Patienten dargestellt. Dazu wurden die in der CGH untersuchten Einzelzellen der Regensburger Patienten mit Befunden von sowohl MCSP+ als auch gp100+ Zellen zusammengefasst. Hierbei sind alle Zellen der zehn Patienten mit gepaarten Proben eingeschlossen, auch die Zellen mit balanciertem Genom.

Für die Darstellung (**Abb. 35**) wurde eine tabellarische Auflistung gewählt, da die Fallzahlen sowohl hinsichtlich der zehn Patienten insgesamt, als auch der untersuchten Zellen innerhalb der einzelnen Patienten (von 2 bis 7) nicht ausreichend sind, um statistische Aussagen zu treffen.

Auch hier zeigt sich ein sehr heterogenes Bild, das zwischen den einzelnen Patienten deutlich variiert. Bei den Patienten 37, 41, 124, 141 und 155 sind die Aberrationen in den MCSP+ und gp100+ Zellen sehr ähnlich bzw. stimmen in den wesentlichen Bereichen überein. Bei Patient 53 tragen die Zellen beider Kollektive keine Aberrationen. Patient 15 und 135 tragen nur Aberrationen in den gp100+ Zellen, während die untersuchten MCSP+ Zellen ein balanciertes Profil aufweisen. Die Zellen von Patient 35 und 125 tragen in den beiden Kollektiven unterschiedliche Aberrationsmuster. Bei Patient 125 weisen zudem die gp100+ Zellen deutlich mehr Aberrationen auf als die MCSP+ Zellen.

Wie aus der Beschriftung der Abbildung hervorgeht, zeigen die untersuchten Faktoren N-Status, Mutationsstatus, Follow-up sowie Zellmorphologie der eingeschlossenen MCSP+ Zellen keinen erkennbaren Einfluss auf die Verteilung und die Anzahl der Aberrationen in den Zellen.

3.4 Tumor induzierendes Potential MCSP+ Einzelzellen *in vivo*

Einen Hinweis auf die Tumorigenität der detektierten MCSP+ Einzelzellen im Lymphknoten kann mit den vitalen Zellen *in vivo* untersucht werden. Ein Anwachsen bzw. Nichtanwachsen der DCC in der Maus erlaubt eine Aussage über das metasiogene Potential dieser Zellen. Quintana et al., (2008) haben ein *in vivo* Modell entwickelt und beschrieben, mit dem die Tumorigenität von Zellpopulationen im Melanom über subkutane Injektion von Einzelzellen in immundefizienten Mäusen getestet wurde. In einer neueren Arbeit (Quintana et al., 2012), wurde zudem ein Ansatz zur Identifizierung klinisch relevanter Tumorzellen aufgezeigt. Dieser ist markerunabhängig und beruht auf den funktionellen Eigenschaften der Zellen. Dort konnte gezeigt werden, dass die Metastasierung von Primärtumorzellen in NSG-Mäusen mit der klinischen Progression der Patienten korrelierte.

In Kooperation mit Dr. Melanie Werner-Klein wurde versucht, dieses Modell in der Arbeitsgruppe zu etablieren. Dabei wurden im Rahmen dieser Arbeit die Vorkulturen der Zelllinien sowie die Isolation und Präparation der Einzelzellen, sowohl der Zelllinien als auch aller Patientenzellen, für die Injektion durchgeführt. Die Injektionen *in vivo* sowie die operative Entfernung der Tumore wurden von Dr. Werner-Klein ausgeführt.

3.4.1 Protokolletablierung für die subkutane Injektion von Einzelzellen

Für die methodische Etablierung des Modells wurden zunächst Einzelzellen von kommerziell erhältlichen Melanomzelllinien isoliert und subkutan in NSG-Mäuse injiziert (**Tabelle 21**).

Tabelle 21: Subkutane Injektionen von Einzelzellen aus Zelllinien

Anzahl	SK Mel 28	MaMel86	MelHO	MelWei	A375
Injektionen	8	15	4	4	15
Zellen je Injektion Maus 1	4 x 5	4 x 5	4 x 10	4 x 10	3 x 5 / 1 x 6
Zellen je Injektion Maus 2	4 x 10	4 x 10			4 x 10
Zellen je Injektion Maus 3		4 x 10 / 1 x 5			4 x 10
Zellen je Injektion Maus 4		3 x 5			3 x 5

Die Zellen wurden aus konfluenter 2D Kultur geerntet und mit PBS gewaschen, um restliches Medium zu entfernen. Im Anschluss wurden einzelne Zellen mit dem Mikromanipulator analog zur Isolation von Patientenzellen isoliert und in Mikrotiterplatten (Terrassaki) überführt. In den Wells war ein definiertes Volumen an PBS vorgelegt und die Platten waren zur Verhinderung der Anhaftung der Zellen mit PolyHEMA beschichtet. Die überführten und mikroskopisch nochmals überprüften Zellen wurden in einer Injektionsnadel mit einem ebenfalls definierten Volumen Matrigel vermengt und anschließend subkutan in die Maus injiziert. Pro Tier wurden zwischen einer und vier Injektionen durchgeführt.

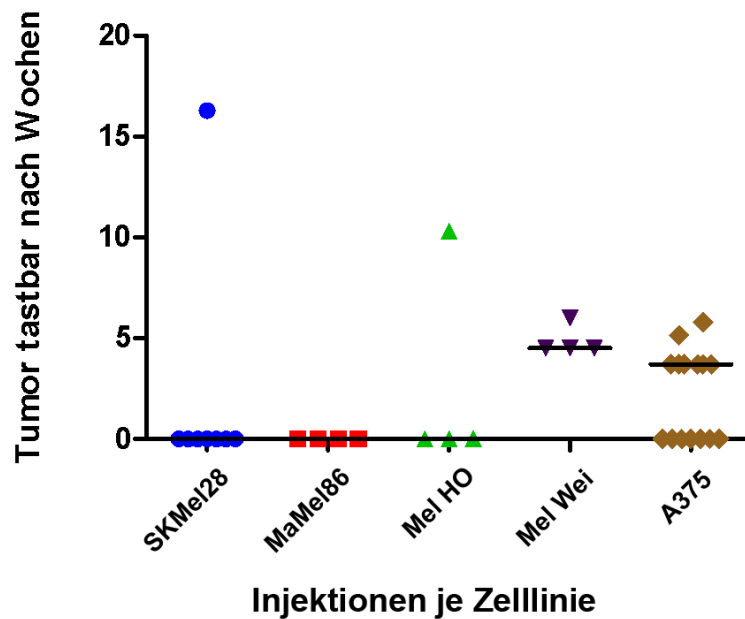


Abbildung 36: Tumorbildung nach subkutaner Injektion von Einzelzellen aus Melanom Zelllinien in NSG-Mäuse

Aufgetragen ist die Zeit in Wochen nach Injektion bis zum ersten tastbaren Auswachsen der Tumore. Die farbigen Symbole entsprechen der Gesamtzahl an Injektionen (mehrere Injektionen pro Tier). Die Querbalken symbolisieren die mediane Zeit bis zum Auswachsen.

Es zeigt sich ein deutlicher Unterschied im tumorigenen Potential der einzelnen Zelllinien. Während bei MelWei und A375 bereits nach fünf Wochen in allen Tieren deutlich tastbare Tumore gewachsen waren, konnte bei SK Mel28 und Mel HO nur in jeweils einem Tier ein Tumor getastet werden (**Abb. 36**). Die Zeit bis zum Auswachsen war bei letzteren auch bedeutend länger, Mel HO brauchte dazu 19 Wochen, SKMel28 17 Wochen. Die Zellen der Zelllinie MaMel86 zeigten in keinem der vier Tiere eine Tumorbildung. Auch bei der Zelllinie A375 zeigten zwar alle Tiere, nicht jedoch alle einzelnen Injektionsstellen ein Tumorwachstum.

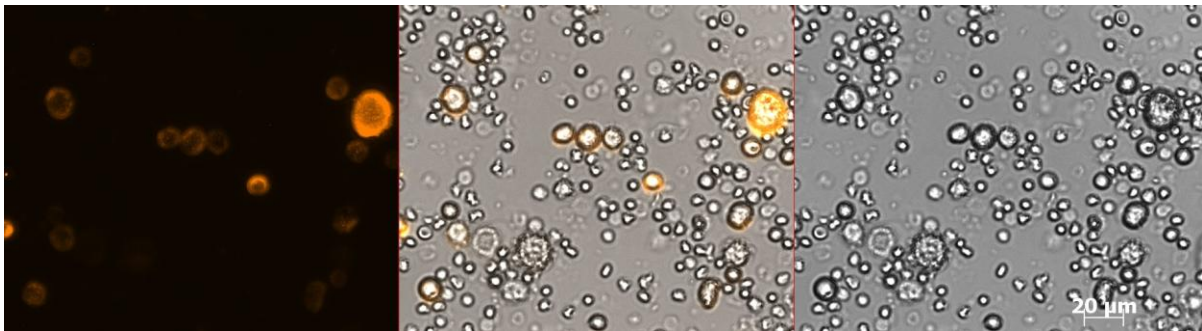
3.4.2 Tumorbildung nach Injektion MCSP+ Patientenzellen

Nachdem die subkutane Injektion einzelner Tumorzellen aus Zelllinien erfolgreich zur Propagation von Tumoren *in vivo* geführt hat, wurde versucht, von geeigneten Patienten einzelne vitale MCSP+ Tumorzellen zu isolieren und zu injizieren (**Abb. 37**). Dabei war von vornherein eine Beschränkung bei der Auswahl der Patienten gegeben. Patienten mit sehr wenigen positiven Zellen wurden von diesen Versuchen aus zwei Gründen ausgeschlossen. Zum einen hätten diese Patienten nicht in die laufende Studie eingeschlossen werden können wenn ihr Zellmaterial *in vivo* eingesetzt worden wäre (und damit nicht mehr für die molekularen Analysen zur Verfügung gestanden hätte). Zum anderen war der Zeitfaktor

Ergebnisse

entscheidend: Die Isolation einer geeigneten Zellzahl aus Patienten mit kleinem DCCD-Wert hätte durch das zusätzliche Screenen mehrerer Millionen Lymphozyten etliche Stunden in Anspruch genommen. Diese Zeit hätten die gefärbten Zellen unter dem Mikroskop bei Raumtemperatur ohne Nährmedium zugebracht, was sich möglicherweise nachteilig auf ihre Vitalität im anschließenden Versuch ausgewirkt hätte. Deswegen wurden für diese erste Studie vorerst nur Zellen von Patienten injiziert, die einen ausreichend großen DCCD-Wert aufwiesen (**Tabelle 22**).

A



B

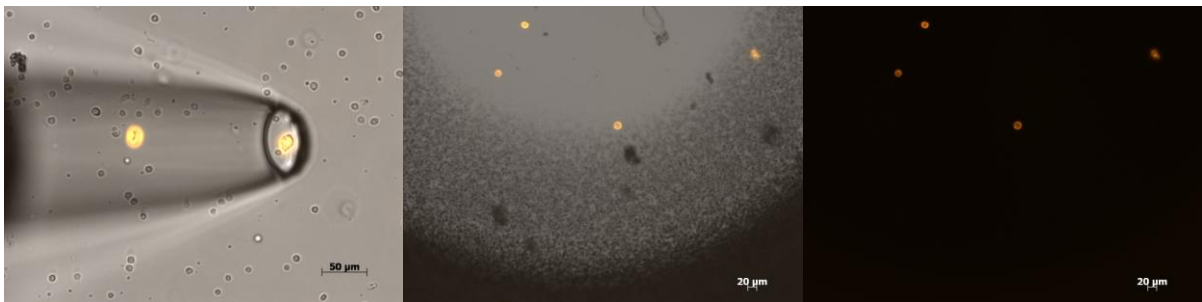


Abbildung 37: MCSP+ Patientenzellen für *in vivo* Transplantation sowie Anreicherung der Zellen für die Injektion

- A) MCSP+ Zellen in Lymphknotenprobe von Patient 124 (DCCD = 1700)
- B) Isolation MCSP+ Patientenzellen mit Mikromanipulator und Anreicherung der Zellen für die Injektion in beschichteter Mikrotiterplatte. Mikroskopisch wurde vor jeder Injektion die Anzahl der überführten Zellen verifiziert. (Abgebildete Zellen: Pat 141).

Tabelle 22: Patienten und zugehörige *in vivo* Transplantationen

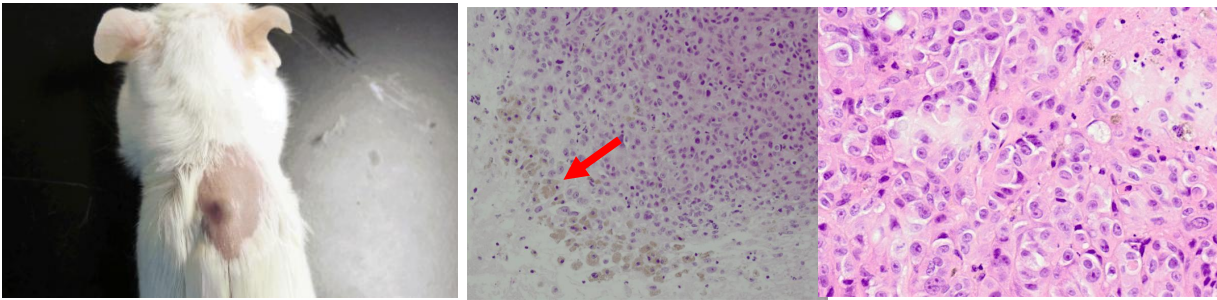
	Patient	124	125	135	141	154	155	168
Daten Patient	Geschlecht	m	m	w	w	w	w	m
	Alter bei OP	43	75	24	57	57	69	52
	Tumordicke in mm	4,3	2,3	7	2,8	5	2,6	3,5
	Tumortyp	keine Ang.	SSM	SSM	NM	NM	keine Ang.	SSM
	Ulzeration	ja	nein	nein	nein	ja	ja	ja
	N-Status	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1
	DCCD MCSP	1700	34	120	60	3000	250000	350000
	Zellmorphologie	groß	groß	gemischt	groß	groß	groß	groß
	DCCD gp100	5000	706	174	105	5000	10000	10000
	Follow up	Verstorben	Verstorben					Verstorben
	BRAF Status	mut	wt	mut	mut	wt	mut	mut
	NRAS Status	wt	mut	wt	wt	wt	wt	wt
Daten Mäuse	Anzahl Mäuse	4	1	1	1	5	2	2
	Zellen /Injektion pro Maus	4 8 9 10	2 / 7	6 / 8 / 8	14	8 / 11 10 / 8 1 / 1 1 / 1 5 / 4	6 / 10 9 / 11	1 / 3 / 4 / 5 8 / 9
	Tumorbildung	nein	ja	ja	nein	nein	ja	nein
	nach (Wochen)		16	46			46	
	BRAF Status		wt	mut			mut	
	NRAS Status		mut	wt			wt	
	serielle Transpl.		ja	nein			ja	
	Metastasenbildung		ja	nein			ja	

Bislang wurden MCSP+ Zellen von sieben Patienten injiziert. Dabei handelte es sich in allen Fällen um morphologisch große Zellen von Patienten im Stadium N1. Zellen von drei der Patienten wuchsen *in vivo* zu Tumoren aus (**Tabelle 22**). Histologische Untersuchungen der Organe dieser Tiere deuten darauf hin, dass es vereinzelt auch zu einer Metastasierung in der Lunge kam. Die Lungen der Tiere wurden in 8 Stufen im Abstand von 100 µm aufgeteilt und je 2 µm dicke Schnitte in einer HLA-ABC Färbung in Kooperation untersucht. Es konnte bei zwei von drei der aus Patientenzellen generierten Läsionen (Pat 125 und 155) eine Streuung von Tumorzellen in die Lunge der Tiere nachgewiesen werden.

Die vorliegenden Fallzahlen der *in vivo* Versuche sind noch zu gering um damit statistische Aussagen zu treffen. Sie stellen den Beginn zukünftiger Forschungsarbeiten auf diesem Projekt dar. Jedoch geben sie einen ersten Hinweis auf das tumorigene Potential der MCSP+ Zellen in Wächterlymphknoten. Keiner der Faktoren von Alter, Tumordicke, Ulzeration oder DCCD-Wert von MCSP oder gp100 (**Tabelle 22**) stehen in Zusammenhang mit einer Tumorbildung. Zwei der drei bisher gebildeten Tumore entstammten Zellen aus Patienten mit superfiziell spreitendem Melanom. Zellen aus Patienten mit nodulärem Melanom bildeten bisher keine Tumore aus. Alle Patienten deren Zellen *in vivo* Tumore ausbildeten trugen in ihren molekular untersuchten DCC eine Mutation für *BRAF* oder *NRAS*. Aber nicht alle Zellen aus Patienten mit Punktmutation in den DCC bildeten erfolgreich Tumore aus (**Tabelle 22**).

Zellen von zwei der Patienten mit Tumorbildung *in vivo*, konnten bereits in serielle Transplantationsversuche eingesetzt werden und bilden auch in diesen Transplantationen erfolgreich Tumore aus (**Abb. 38 A**). Die Zellen aus dem Maustumor besitzen den gleichen Mutationsstatus wie die originalen DCC des Patienten.

A



B

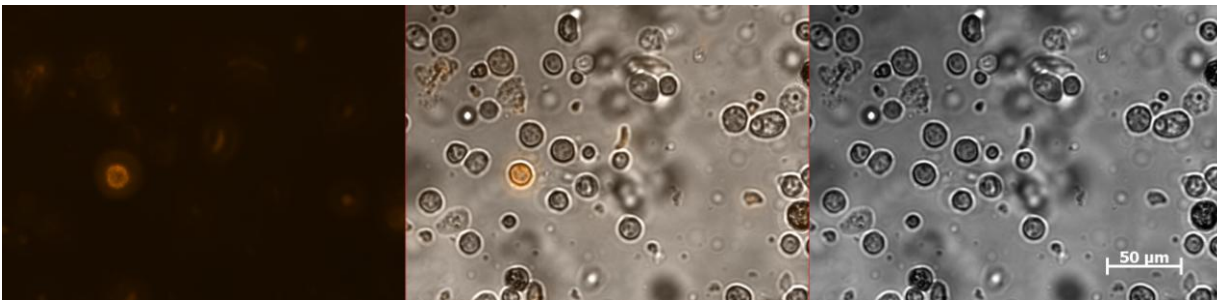


Abbildung 38: Tumorbildung nach subkutaner Injektion MCSP+ Zellen eines Melanompatienten und MCSP+ Zellen in dissagregiertem Maustumor

- A) Tumor in NSG Maus nach erster serieller Transplantation von MCSP+ Einzelzellen (aus Pat. 125), sowie histologische Schnitte des Tumors nach HE-Färbung. Im mittleren Bild sind die Melanineinschlüsse der Zellen (Pfeil) deutlich erkennbar
- B) MCSP-Färbung an Zellsuspension nach Trypsinverdau des abgebildeten Maustumors

Aus dem abgebildeten Maustumor konnten nach enzymatischem Verdau und anschließender Färbung der Tumorzellsuspension erneut MCSP+ Einzelzellen isoliert werden (**Abb. 38 B**). Diese Einzelzellen wurden in Kooperation mittels PCR-Analyse als humane Zellen bestätigt. In einer Fingerprint-Analyse entsprach ihr Profil den Einzelzellen von Patient 125 (Steffi Treitschke und Melanie Werner-Klein, unveröffentlichte Daten). Die DNA-Qualität dieser Zellen erwies sich als brauchbar, um mit ihnen eine komparative Genomhybridisierung durchzuführen. Zwei der Zellen wurden damit im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Es sollte überprüft werden, wie sich das Genom der Zellen durch die Passagen *in vivo* hinsichtlich chromosomaler Veränderungen im Vergleich zu den ebenfalls analysierten MCSP+ und gp100+ Einzelzellen des Patienten darstellt.

Es zeigte sich, dass die untersuchten MCSP+ Zellen dieses N1-Patienten trotz des fortgeschrittenen Krankheitsstadiums abgesehen von Chromosom 1q, 9q und Y kaum chromosomale Veränderungen aufweisen. Die gp100+ Zellen des Lymphknotens weisen hingegen deutlich mehr chromosomale Veränderungen auf (**Abb. 39**). Die untersuchten humanen Zellen aus dem Tumor der Maus tragen nochmals mehr chromosomale Veränderungen (**Abb. 39**), stimmen aber in den wesentlichen Mustern mit den gp100+ Zellen

Abbildung 39: Tabellarische Zusammenstellung chromosomaler Veränderungen in den MCSP+ und gp100+ Einzelzellen aus dem Wächterlymphknoten von Patient 125 sowie den Tumorzellen aus der zweiten Mauspassage nach Injektion MCSP+ Lymphknotenzellen von Patient 125
Grüne Felder bedeuten Amplifikationen, rote Felder Deletionen auf den Chromosomenarmen. Die dickeren Trennlinien grenzen die drei Zellgruppen voneinander ab.

3.5 Zusammenhang von Nachweisverfahren gestreuter Melanomzellen im Wächterlymphknoten und klinischen Faktoren

Unter Punkt **3.1.6** wurden die Unterschiede der Detektionsraten und Zelltypen in den drei angewandten Nachweisverfahren zur Bestimmung der Tumorlast im Wächterlymphknoten dargestellt. Im Folgenden wurde untersucht, ob sich anhand klinischer Faktoren der Patienten Auswirkungen auf den Krankheitsverlauf ergeben. Insbesondere, ob ein signifikanter Zusammenhang von klinischen Faktoren mit einem der drei Nachweisverfahren besteht und ob sich klinische Faktoren und der Nachweis positiver Einzelzellen auf das Überleben der Patienten im Regensburger Kollektiv auswirken

3.5.1 Korrelation von Punktmutationen in *BRAF* und *NRAS* in DCC mit klinischen Faktoren

Es wurde untersucht, ob klinische Faktoren der Patienten, deren Einzelzellen auf Punktmutationen in *BRAF* und *NRAS* untersucht wurden (Abschnitt **3.3.1**), in Zusammenhang mit einer vorhandenen Mutation stehen. Die Mutationen wurden aufgrund der relativ geringen Zahl untersuchten Patienten nicht getrennt behandelt. Ein Patient galt als mutiert, wenn mindestens eine seiner untersuchten MCSP+ oder gp100+ Zellen eine Mutation für *NRAS* oder *BRAF* trug.

Aufgrund der geringen Fallzahlen sind statistische Aussagen mit Vorsicht zu tätigen. Es zeigt sich dennoch eine Tendenz, dass signifikant mehr männliche Patienten eine Mutation in den DCCs tragen als Weibliche (**p=0,0357** chi-Quadrat) (**Tabelle 23**). Auch zeigen signifikant mehr Patienten mit Stadium N1 eine Mutation in den Zellen als im Stadium N0 (**p=0,0026** chi-Quadrat). Die Dicke des Primärtumors ist bei Patienten mit Mutation im Median um 1,1 mm größer. Ereignisse einer fortschreitenden systemischen Progression der Krankheit zeigten sich häufiger bei Patienten mit Mutation. Wegen der sehr geringen Fallzahl von Patienten mit „Follow-up“ Ereignissen sowie des relativ kurzen Beobachtungszeitraums bei einigen der Patienten wird auf eine genauere Interpretation dieser Werte verzichtet. Keine wesentlichen Unterschiede in den Gruppen mit und ohne Mutation zeigten sich bei der Lokalisation des Primärtumors, der Ulzeration, dem histologischen Typ, sowie dem Clark-level (**Tabelle 23**).

Tabelle 23: Zusammenhang klinische Faktoren Patienten mit Mutationsstatus Einzelzellen

	Mut		WT	
Geschlecht	N	%	N	%
m	13	72,2	7	33,3
w	5	27,8	14	66,7
Alter				
Median	58,5		51	
von bis	24-77		20-74	
Patho Befund	N	%	N	%
N0	5	27,8	17	81
N1	13	72,2	4	19
Lokalisation PT	N	%	N	%
Extremitäten	7	38,9	12	57,2
Rumpf	11	61,1	8	38
keine Angabe			1	4,8
Tumordicke				
Median	2,8		1,7	
von bis	0,3-11		0,8-7	
Ulzeration	N	%	N	%
ja	5	11,1	7	33,3
nein	11	61,1	12	57,1
keine Angabe	2	11,1	2	9,6
Histologie	N	%	N	%
SSM	6	33,3	7	33,3
NM	7	38,9	7	33,3
amelanot. Mel			1	4,8
nicht spez	5	27,8	6	28,6
Clark-Level	N	%	N	%
2	1	5,8		
3	3	16,7	5	23,8
4	11	61,1	13	61,9
keine Angabe	3	16,7	3	14,3
Follow up	N	%	N	%
Lokalrezidiv	6	33,3	2	9,6
Metastase	2	11,1	1	4,8
verstorben	5	27,7	1	4,8
Ereignisse ges.	13		4	

3.5.2 Korrelation klinischer Faktoren der Patienten mit Befunden von Einzelzellanalyse und Histopathologie

Die klinischen Faktoren der Patienten wurden - soweit bekannt - in Relation mit den drei Diagnoseverfahren gebracht, um zu untersuchen, ob sich signifikante Zusammenhänge zwischen den Befunden und einzelnen klinischen Faktoren abzeichnen. Alle im Folgenden beschriebenen Faktoren und Ergebnisse sind mit den absoluten Zahlen und Berechnungen zur Signifikanz in **Tabelle 24** aufgelistet.

Keinen Zusammenhang gab es zwischen dem Geschlecht und einem positiven Ergebnis in einer der drei Diagnoseverfahren. Beim Alter ist der Unterschied zwischen positivem und

negativem Befund der MCSP-Färbung beinahe signifikant ($p=0,0703$ chi-Quadrat), während bei den anderen Verfahren kein Zusammenhang erkennbar ist. Während das mediane Alter bei in Pathologie und gp100-Färbung negativen Patienten niedriger ist, als bei Positiven, ist die Situation in der MCSP-Färbung genau entgegengesetzt. Hier liegt das mediane Alter negativer Patienten um 6,5 Jahre über dem der Positiven. Die Bedeutung der Lokalisation des Primärtumors wurde aufgrund der niedrigen Fallzahlen von Tumoren an anderen Körperpartien nur zwischen den Tumoren an Extremitäten und am Rumpf statistisch verglichen. Hier zeigt sich ebenfalls kein signifikanter Zusammenhang. Es ist lediglich eine Tendenz erkennbar, dass Primärtumore der gp100+ Patienten häufiger an den Extremitäten lokalisiert waren. Dieser Befund ist allerdings aufgrund der Tatsache, dass nicht von allen Patienten Material zur gp100-Färbung verfügbar war und somit möglicherweise eine ungewollte Selektion stattfand, mit Vorsicht zu interpretieren.

Die mediane Tumordicke lag in allen drei Nachweismethoden bei negativ befundenen Patienten niedriger als bei Positiven, beim histopathologischen Befund um eine Differenz von 1,5 mm. Wenn alle vier Stadien nach Breslow verglichen werden, ist hier auch ein signifikanter Unterschied in der Häufung festzustellen. N0-Patienten haben signifikant häufiger dünnere Primärtumore ($p<0,0001$ chi-Quadrat). Für die beiden Einzelzellnachweise ist dieser Zusammenhang nicht signifikant.

Kein Zusammenhang besteht zwischen dem histologischen Typ des Primärtumors und der Nachweismethode. In diese Berechnung wurden nur die spezifizierten Tumortypen zum Vergleich einbezogen. Es ist anzunehmen, dass sich die Verteilung der Tumore ohne nähere Angabe des Subtyps nicht wesentlich davon unterscheidet. In keiner der drei Diagnoseverfahren zeigte sich ein Zusammenhang zwischen dem Tumortyp und dem Befundergebnis.

In die Berechnungen zur Ulzeration des Primärtumors wurden ebenfalls nur die Patienten mit klarem histologischem Befund zur Ulzeration eingeschlossen. Hierbei zeigt sich für den MCSP-Nachweis ein signifikanter Zusammenhang zwischen einem positiven Ergebnis in der Färbung und dem Auftreten von Ulzeration im Primärtumor. ($p=0,0096$ chi-Quadrat).

Tabelle 24: Zusammenhang Patientencharakteristika mit Befunden der drei Diagnostikmethoden

		Pathologie		MCSP		gp100	
		N0	N1	negativ	positiv	negativ	positiv
Geschlecht	m	78	21	35	64	42	30
	w	66	23	28	62	40	25
p =		0,5657		0,6468		0,8415	
Alter	Median	53,5	56,5	58	51,5	50,5	55,5
	von - bis	15 - 79	15 - 78	23 - 79	15 - 79	15 - 78	30 - 77
p =		0,6384		0,0703		0,3789	
Lokalisation PT	Extremitäten	88	25	39	75	54	28
	Rumpf	50	17	19	48	26	26
	Kopf und Nacken	1		1			
	keine Angabe	5	2	4	3	2	2
p =		0,7518		0,5169		0,1003	
Tumordicke	Median	1,5	3	1,5	2	1,5	2,3
	von - bis	0,2 - 13	0,6 - 12	0,2 - 13	0,3 - 12	0,2 - 10	0,3 - 11
	1	20	1	9	13	11	6
	2	67	7	28	45	37	17
	3	29	19	13	35	17	15
	4	17	16	6	27	10	14
keine Angabe		11	1	6	6	7	3
p =		< 0,0001		0,1328		0,1277	
Histologie	SSM	47	10	20	38	31	18
	NM	40	15	19	36	22	17
	ALM	6	3	4	5	6	
	sonst. / nicht spez.	51	16	20	47	23	21
p =		0,357		0,8353		0,6629	
Ulzeration	Ja	34	15	10	39	19	14
	Nein	79	21	44	57	39	30
	keine Angabe	31	8	9	30	24	12
p =		0,2774		0,0096		0,9203	

3.5.3 Einfluss von Einzelzellnachweis und klinischen Faktoren auf den Krankheitsverlauf

Durch die Laufzeit der Studie, im Rahmen dieser Arbeit von 2008 bis 2012, konnte von einem Großteil der Patienten der weitere Krankheitsverlauf dokumentiert werden. Für finale Aussagen sind die Beobachtungszeiträume bei zahlreichen Patienten noch nicht ausreichend. Mit den bisher vorhandenen Daten aus dem Register des Regensburger Tumorzentrums wurde eine vorläufige Überlebensanalyse erstellt und der Einfluss klinischer Faktoren der Patienten sowie Befunde aus den Einzelzellnachweisen beider Färbemethoden untersucht (**Abb. 40**).

Den stärksten Einfluss auf den Krankheitsverlauf zeigt der Lymphknotenstatus der histopathologischen Untersuchung (**p=0,000**), gefolgt von der Tumordicke nach Breslow (**p=0,027**), sowie dem Auftreten einer *BRAF/NRAS*-Mutation (**p = 0,036**).

Keinen signifikanten Zusammenhang mit dem Krankheitsverlauf zeigen hingegen die beiden Nachweismethoden für disseminierte Einzelzellen mit MCSP (**p=0,154**) und gp100 (**p=0,22**). Werden die MCSP+ Zellen nach ihren Phänotypen aufgetrennt, wird deutlich, dass das

Ergebnisse

Vorhandensein morphologisch großer Zellen im Lymphknoten in signifikantem Zusammenhang mit dem Krankheitsverlauf steht ($p=0,038$) (**Tabelle 25** und **Abb. 40**).

Für eine weitere Analyse wurden die MCSP+ Zellen eingeteilt in Tumorzellen (großer Phänotyp oder kleiner Phänotyp mit Expression melanozytärer Marker) und Normalzellen (kleine Zelle ohne Expression von Markern). Eine alleinige Expression von S100 galt nicht als ausreichend um eine Zelle als Tumorzelle zu definieren, da auch in der Gruppe der getesteten Normalzellen eine Zelle S100 exprimierte (Abschnitt **3.2.2**).

Das Ziel war zu testen, ob allein aufgrund der Charakteristika detektierter MCSP+ Zellen schon eine Unterscheidung in für Patienten und Krankheitsverlauf relevante und nicht relevante DCC möglich ist.

Für die Überlebensanalyse wurden in diese Gruppe der Patienten mit MCSP+ Normalzellen auch die MCSP- Patienten eingeschlossen. Diese vorläufige Unterscheidung in Tumorzelle Ja/Nein zeigte sich nicht signifikant ($p=0,069$) (**Tabelle 25** und **Abb. 41**).

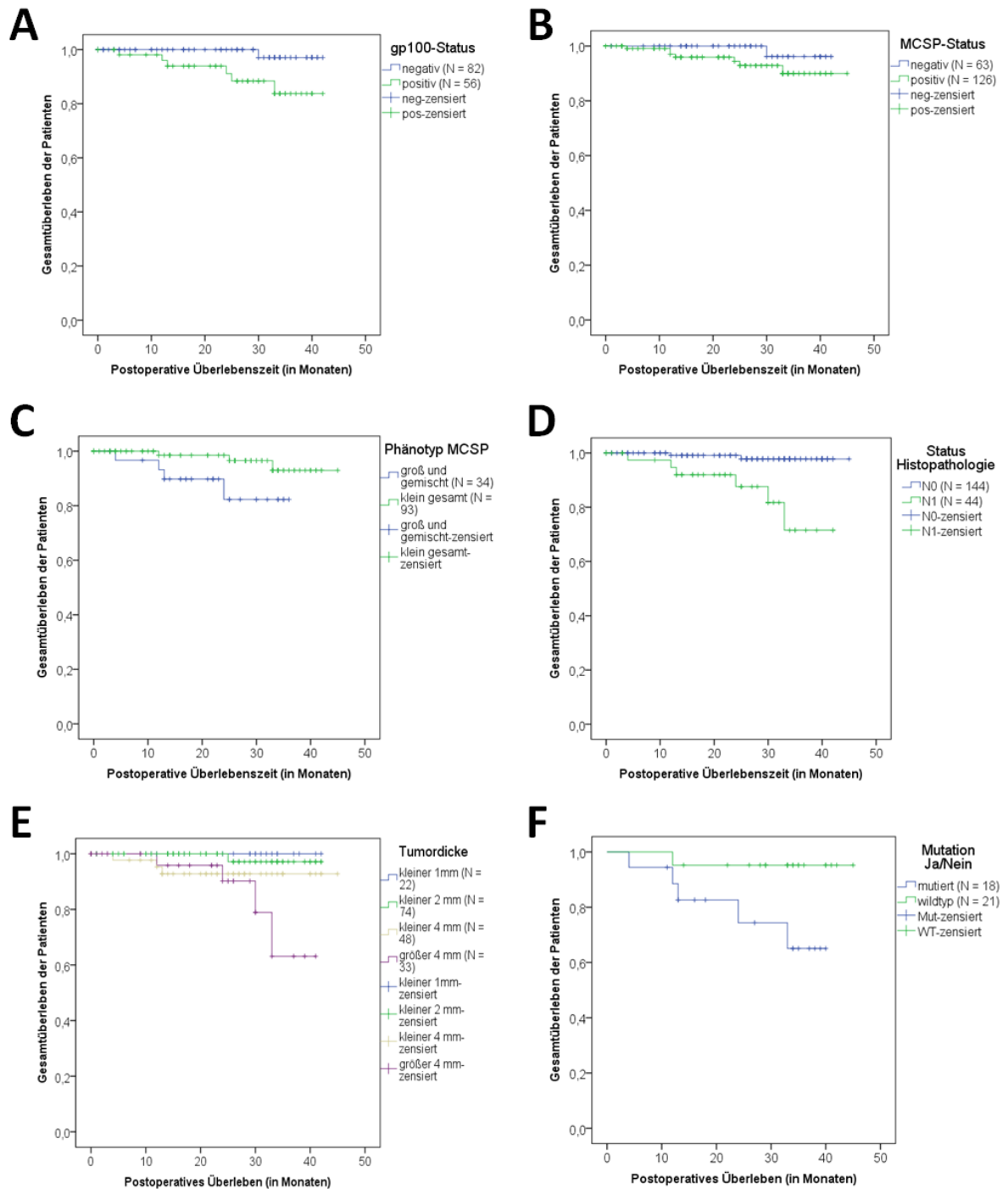


Abbildung 40: Univariates Überleben (Kaplan-Meier) der Patienten im Regensburger Kollektiv in Abhängigkeit der untersuchten klinischen und molekularen Faktoren.

Zusätzlich zur univariaten Analyse der klinischen Faktoren wurden die Faktoren MCSP-Status, Phänotyp der MCSP+ Zellen, gp100-Status, Tumordicke, N-Status und die Einstufung als MCSP+ Tumorzelle (nach obiger Definition), in einer multivariaten Überlebensanalyse (Cox-Regression) überprüft. Von den eingeschlossenen Faktoren zeigte lediglich der N-Status aus der Histopathologie einen signifikanten Einfluss auf den Krankheitsverlauf bzw. das Überleben der Patienten (**Tabelle 25**).

Ergebnisse

Tabelle 25: Uni- und multivariate Überlebensanalyse der Patienten aus dem Regensburger Kollektiv

Parameter	Univariate Analyse		Multivariate Analyse (N=)	
	untersuchte Patienten	p-Wert	Relatives Risiko (95% CI)	p-Wert
gp100-Befund + / -	138	0,22	Nicht eingeschlossen in Modell	
MCSP-Befund + / -	189	0,154	Nicht eingeschlossen in Modell	
Phänotyp der MCSP+ DCC	127	0,038	Nicht eingeschlossen in Modell	
Histopathologischer Befund + / -	188	0	1,5 - 112,9	0,005
Tumordicke in Gruppen	177	0,027	Nicht eingeschlossen in Modell	
Mutation J / N	39	0,036	Nicht untersucht	
Tumorzellen J / N (Marker)	189	0,069	Nicht eingeschlossen in Modell	

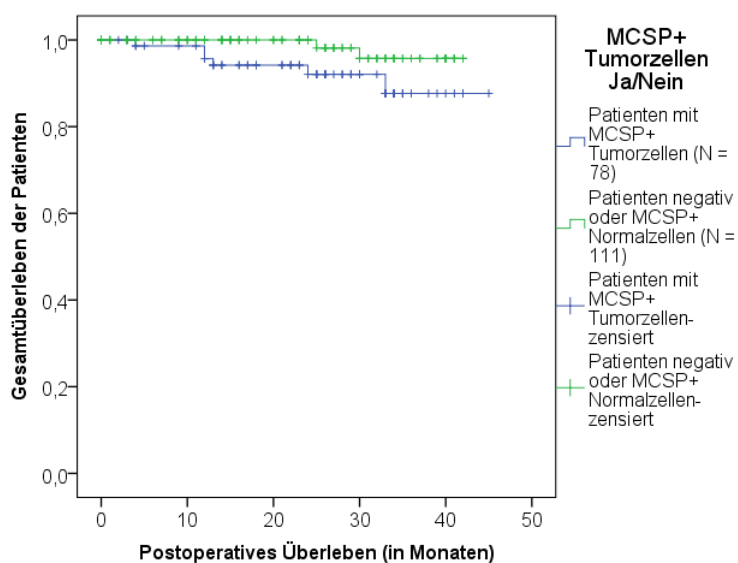


Abbildung 41: Univariates Überleben der Patienten in Abhängigkeit MCSP+ Tumorzellen im Wächterlymphknoten

Dargestellt ist eine Kaplan-Meier Analyse für die Patientengruppen mit und ohne MCSP+ Tumorzellen im Lymphknoten ($p=0,069$). Als Tumorzellen wurden MCSP+ DCC eingestuft, wenn sie morphologisch groß, bzw. klein mit Expression Melanom-assoziiierter Marker waren. Kleine MCSP+ Zellen ohne Markerexpression und MCSP negative Patienten bilden die Vergleichsgruppe.

4. Diskussion

Die Entscheidung der AJCC zur Einstufung des Tumorstatus von Wächterlymphknoten als N1 beim Nachweis bereits einzelner disseminierter Tumorzellen (Balch et al., 2009a), belegt die zunehmende Akzeptanz der prognostischen Bedeutung, die diesen Zellen als Vorstufe einer systemischen Progression beim Melanom zukommt.

Die vorliegende Arbeit basiert auf Studien der Arbeitsgruppen Klein und Ulmer zu Nachweis und Charakterisierung einzelner disseminierter Tumorzellen in Wächterlymphknoten von Melanompatienten (Ulmer et al., 2005) und Ulmer 2013 (eingereicht zur Publikation), sowie der Promotionsarbeit von Isabelle Hodak (unveröffentlicht). Darin wurde ein erster Vergleich aller Stadien der systemischen Erkrankung beim Melanom von Primärtumor, DCC und Metastase(n) innerhalb derselben Patienten auf molekularer Ebene begonnen. Dazu wurde das Genom isolierter DCC und mikrodissektierter Areale von PT und Met der Patienten auf chromosomale Veränderungen mittels CGH, sowie auf das Auftreten von Punktmutationen in den Onkogenen *BRAF* und *NRAS* hin untersucht.

Ziel dieser Arbeit war es, zunächst die Hinweise auf eine vorliegende Heterogenität zwischen Primärtumoren und korrespondierenden Metastasen im Verlauf der systemischen Erkrankung zu verifizieren. Um die molekulare Charakterisierung der DCC beim Melanom auf globaler Ebene zu ermöglichen, war das Hauptziel der Arbeit die Isolation und Charakterisierung vitaler DCC. Dazu sollte ein Einzelzellnachweis im Lymphknoten durch Immunfluoreszenz über das membranständige melanomspezifische Antigen MCSP mit dem Antikörper 9.2.27 (Bumol and Reisfeld, 1982) etabliert werden. Mit dem neuen Marker sollte ein Patientenkollektiv untersucht und mit den isolierten MCSP+ Zellen erste molekulare Analysen von Genom und Transkriptom durchgeführt werden. Die Untersuchungen der DNA der Zellen sollten zum Vergleich auch an den aus den Proben parallel isolierten gp100+ DCC der Patienten durchgeführt werden. Vergleichend flossen in diese Arbeit die aus den vorangegangenen Studien gewonnenen CGH-Daten der dort ausgewerteten gp100+ Zellen aus Wächterlymphknoten mit ein.

4.1 Klonale Diversität von Primärtumor und korrespondierender Metastase beim malignen Melanom

Isabelle Hodak konnte beim Vergleich korrespondierender Primärtumore (PTs) und Metastasen (Mets) auf Punktmutationen in den Onkogenen *BRAF* (V600E) und *NRAS* (Q61K) in zwei von vier untersuchten Patienten eine Heterogenität zwischen den Läsionen nachweisen (unveröffentlicht). Aufgrund der geringen Fallzahl wurden zur Festigung der Befunde in dieser Arbeit zunächst 12 weitere Patienten mit gepaarten Proben untersucht. Dabei konnte bezogen auf beide Mutationen zusammen bei 4 der Patienten (33 %) ein Unterschied im Mutationsstatus zwischen den korrespondierenden Läsionen festgestellt werden, was die bisherigen Ergebnisse bestätigt. In einer vergleichbaren Studie (Yankovitz et al., 2012) wurden korrespondierende PTs und Mets aus 18 Patienten auf die Mutation *BRAF* V600E getestet. Es zeigte sich dort eine Heterogenität in 44 % der untersuchten Patienten. In beiden Studien konnten zwei unterschiedliche Befunde festgestellt werden: Mutationen des PT werden bisweilen nicht zur Metastase weitergegeben (bei Yankovitz keine Weitergabe in 33 % der Patienten, in dieser Arbeit in 8 % der Patienten). Metastasen können ebenso vereinzelt die Mutation tragen, auch wenn sie im Primärtumor nicht nachgewiesen wurde (Yankovitz 11 %, hier 17 %).

In der kurativen Behandlung solider Tumore, so auch beim Melanom, richten sich sog. „zielgerichteten Therapien“ gegen molekulare Eigenschaften des Primärtumors. Zugrunde liegt die Vorstellung einer linearen Tumorprogression (Fearon and Vogelstein, 1990), die zu der Annahme führt, dass Metastasen ihr molekulares Profil und Mutationsmuster vom Primärtumor übernommen haben.

Konstitutiv aktivierende Mutationen des MAPK/ERK-Stoffwechselweges durch Mutationen von *BRAF* werden in 53 bis 59 % der untersuchten Tumore beschrieben, Mutationen in *NRAS* treten mit weniger als 30 % nicht so häufig auf (Edlundh-Rose et al., 2006; Omholt et al., 2003). Der Einsatz von *BRAF*-Inhibitoren zur Therapie metastasierter Melanome zeigt meist geringen therapeutischen Nutzen für den Patienten (Shepherd et al., 2010). Auch der Einsatz so genannter selektiver Inhibitoren wie PLX4032 (Vemurafinib) (Flaherty et al., 2010), führt nach einer Phase des Tumorrückganges mit einhergehender Verlängerung des Überlebens (Chapman et al., 2011) zu Rezidiven. Die Wirkung selektiver Inhibitoren zielt auf Zellen mit der erstmals 2002 von Davies beschriebenen V600E Mutation des *BRAF*-Gens, die mehr als 90 % der *BRAF*-Mutationen beim Melanom ausmacht. Es wird vermutet, dass die Tumorzellen von der mutationsbedingten konstitutiven Aktivierung des MAPK-Signalwegs durch *BRAF* in einer Art „oncogene Addiction“ (Weinstein and Joe, 2006) profitieren (Hingurani 2005). Somit erscheint dieses Target als therapeutische Zielstruktur geeignet.

Die Mechanismen der Resistenzbildung gegen *BRAF*-Inhibitoren werden kontrovers diskutiert (Hatzivassiliou et al., 2010; Montagut et al., 2008; Poulikakos et al., 2010). Die in dieser Arbeit festgestellte Heterogenität des Mutationsstatus zwischen den Läsionen mag eine der Erklärungen für das Auftreten intrinsischer Resistenzen von Tumorzellen geben.

4.2 *BRAF*- und *NRAS*-Status disseminierter Tumorzellen in Wächterlymphknoten

Im Zusammenhang mit den oben gezeigten Befunden von Primärtumor und Metastasen, wird hier der Teil über die Mutationsanalysen an den isolierten disseminierten Einzelzellen (DCC) vorweggenommen und die Isolation sowie weitere Charakterisierung der Zellen im Folgenden behandelt.

Der Mutationsstatus der DCC ist von Interesse, da die Zellen eine Zwischenstufe von Primärtumor und Metastase im systemischen Krankheitsverlauf darstellen. *BRAF*- und *NRAS*-Mutationen werden auch in bis zu 80 % benigner Nävi beschrieben (Kumar et al., 2004; Pollock et al., 2003) und gelten als frühe Ereignisse in der Erkrankung beim Melanom, die im Verlauf der Tumorprogression und später bis zur Metastasierung konstant beibehalten und weitergegeben werden (Omholt et al., 2003). Dem entgegen, stehen aber die Befunde dieser Arbeit aus dem Vergleich gepaarter Läsionen und der Studie von Yankovitz. In isolierten MCSP+ Tumorzellen aus peripherem Blut von Patienten konnte ebenfalls bereits eine klonale Heterogenität der Zellen hinsichtlich ihres Mutationsstatus bei einem von neun untersuchten Patienten festgestellt werden (Sakaizawa et al., 2012).

Von 13 Patienten aus dem Kollektiv dieser Arbeit standen jeweils mehrere MCSP+ sowie gp100+ Zellen für die Sequenzanalysen auf die *BRAF* V600E Mutation zur Verfügung. Somit konnte an diesen Patienten die Verteilung der Mutationen nicht nur zwischen den Zellpopulationen von MCSP und gp100, sondern auch innerhalb der Populationen getestet werden. Bei 5 der Patienten war eine Heterogenität für die *BRAF*-Mutation festzustellen. Die Heterogenität zeigte sich sowohl zwischen den beiden Zellgruppen von MCSP und gp100 (3 Patienten), als auch innerhalb der MCSP+ Zellen (2 Patienten). Da es nach derzeitigem Wissensstand keine vergleichbare Mutationsstudie an DCC beim Melanom gibt, können diese Befunde nur in Relation zur genannten CTC Studie von Sakaizawa interpretiert werden. Die Mutationsrate lag dort bei 38 % der Patienten (davon waren 11 % hinsichtlich der Mutation heterogen). Im DCC-Vergleich für *BRAF* in den gepaarten Proben der vorliegenden Arbeit trugen 53 % der Patienten die Mutation (davon waren 38,5 % heterogen).

Literaturangaben für *BRAF*-Mutationen liegen für primäre Melanome im Bereich um 45 % (Liu et al., 2007; Thomas et al., 2007), für metastasierte Melanome zwischen 48 und 66 % (Houben et al., 2004; Long et al., 2011; Ugurel et al., 2007). Die Mutationsraten in der DCC-Analyse bezogen auf Patienten liegen darunter (MCSP+: 31 %, gp100+ 35 %). Zellen der 19 Patienten mit auswertbaren gepaarten Proben sowohl für MCSP als auch gp100 weisen in 32 % der Patienten (9) eine *BRAF*-Mutation auf, *NRAS*-Mutationen traten in knapp 9 % der MCSP+ DCC und 17 % der gp100+DCC auf. Bei den gepaart auswertbaren Patienten war in 16 % der Patienten eine *NRAS*-Mutation in den DCC vorhanden, was im Rahmen einer Studie für primäre Melanome liegt (Goel et al., 2006).

Für das Patientenkollektiv aus dieser Arbeit sind keine Angaben zum Mutationsstatus des Primärtumors vorhanden. In der Arbeit von Isabelle Hodak (unveröffentlicht) konnte jedoch auch eine Heterogenität zwischen PT und DCC festgestellt werden. Eine lineare Weitergabe der Mutationen vom PT in die korrespondierenden DCC fand dort bei 7 % der Patienten statt. Aufgrund dieser ersten Ergebnisse, muss auch die Heterogenität des Mutationsstatus in den DCC der Patienten als ein Faktor in Betracht gezogen werden, der Therapieerfolge oder Resistenzbildung bei den betroffenen Patienten beeinflussen kann.

Während das Auftreten einer *BRAF*-Mutation in frühen Melanomen nicht mit einer Auswirkung auf das Überleben verbunden ist (Edlundh-Rose et al., 2006; Houben et al., 2004; Shinozaki et al., 2004), wurde bei metastasierten Melanomen ein schlechteres Überleben der Patienten beschrieben (Houben et al., 2004; Long et al., 2011). Im untersuchten Kollektiv konnte in dieser Arbeit ein signifikant häufigeres Auftreten von Mutationen bei N1-Patienten und bei Patienten mit einem hohen DCCD beobachtet werden. Das Auftreten einer Mutation korrelierte signifikant mit einem schlechteren Überleben der Patienten.

4.3 Nachweis und Isolation disseminierter Tumorzellen aus Wächterlymphknoten von Patienten mit malignem Melanom

Nachdem die prognostische Bedeutung einzelner DCC in Wächterlymphknoten von Melanompatienten nicht aus allen Studien klar hervorgeht, zeigen erste Langzeitstudien einen deutlichen Zusammenhang zwischen dem Auftreten einzelner Zellen und dem Überleben der Patienten (Scheri et al., 2007).

In den Studien von Ulmer (2005 und 2013) wurde der Marker HMB45 gegen das zytoplasmatische Antigen gp100 zum Nachweis der DCC verwendet. In diesen Studien konnte in 44 bzw. 51 % der Patienten ein positiver Nachweis gp100+ Zellen gezeigt werden.

Der Nachweis war dort um 32 bzw. 37 % sensitiver als die Routinediagnostik mit 12 bzw. 14 %. In der Langzeitstudie von Ulmer (2013) mit 1027 Patienten konnte zudem die prognostische Bedeutung der nachgewiesenen Zellen gezeigt werden. Für die vorliegende Arbeit wurden, an den aus dem Patientenkollektiv der MCSP-Studie parallel isolierten, gp100+ DCC, zum Vergleich dieser beiden Zellpopulationen die genomischen Analysen ebenfalls durchgeführt.

Von den 138 Patienten für die ein Nachweis mit gp100 durchgeführt werden konnte, zeigten 40,5 % gp100+ Zellen. Im Vergleich zur Histopathologie (25,4 %) war der DCC-Nachweis hier um 15,1 % sensitiver. Zehn N1-Patienten (7,2 %) waren negativ im Einzelzellnachweis für gp100. Diese Unterschiede in den Nachweisraten zu der Vorgängerstudie in Tübingen können durch die Art der histopathologischen Untersuchung begründet sein. Während bei den Patienten im Kollektiv für diese Arbeit in Regensburg eine Hälfte des Lymphknotens durch die Pathologie komplett in Blöcken zu 1 mm durchgestuft und immunhistochemisch gefärbt wird, trifft das in Tübingen nur auf drei Sektionen der zentralen Ebene zu. Somit kann auch hier bestätigt werden, was in mehreren Studien gezeigt wurde (Abrahamsen et al., 2004; Baisden et al., 2000; van Diest, 1999), dass mit einer zunehmender Anzahl an untersuchten Schnittebenen die Wahrscheinlichkeit steigt, auch kleine Tumordinfiltrate und Einzelzellen zu detektieren. Das kann auch eine Erklärung für die insgesamt höhere Rate histopathologisch positiver Befunde am Klinikum Regensburg sein. Wenn Zellnester in der histologisch gestuften Hälfte des Lymphknotens lokalisiert liegen (siehe **Abb. 1** Einleitung), kann der sensitivere immunzytochemische Nachweis auf Einzelzellen in der disaggregierten Hälfte des Lymphknotens trotzdem zu einem negativen Befund kommen.

MCSP als neuer Marker für DCC in Wächterlymphknoten

Zum Nachweis vitaler Zellen wurde in dieser Arbeit erstmals die Immunfluoreszenzfärbung gegen MCSP an disaggregierten Wächterlymphknoten etabliert, und ein Kollektiv von 150 Patienten (50 weitere in Kooperation) untersucht. Die Detektion MCSP+ zirkulierender Tumorzellen im Blut von Patienten wurde bereits mehrfach beschrieben (Benez et al., 1999; Ulmer et al., 2004), ebenso die höhere Sensitivität des Markers in histologischen Nachweisen MCSP+ Mikrometastasen (Goto et al., 2008).

Da der Nachweis MCSP+ DCC in Suspension disaggregierter Lymphknoten in der hier angewendeten Form und mit dem eingesetzten Antikörperklon 9.2.27 (Bumol and Reisfeld, 1982) bisher noch nicht durchgeführt wurde, war es zunächst wichtig zu klären, ob es sich bei den detektierten und isolierten Zellen um Zellen melanozytären bzw. tumorigenen Ursprungs handelte. Eine Expression von MCSP auf Zellen in anderen Geweben wurde mehrfach beschrieben, beispielsweise in Zellen der glatten Muskulatur (Tordsson et al., 2000), der Mundschleimhaut, in Haarfolikeln (Ghali et al., 2004; Legg et al., 2003) sowie

differenzierungsfähigen mesenchymalen Stromazellen im Knochenmark (Kozanoglu et al., 2009). In Tumorerkrankungen nicht melanozytären Ursprungs weisen bis zu 50 % der Läsionen eine Expression von MCSP auf, wie z.B. basale Brustkrebserkrankungen oder Chordome (Schwab et al., 2009; Wang et al., 2010a; Wang et al., 2010b).

Erschwert wird die Interpretation der Detektionsraten MCSP+ Zellen in Wächterlymphknoten durch die Tatsache, dass MCSP nicht nur in mehr als 85 % der Melanome (Campoli et al., 2004) sondern ebenso auch in benignen Nevi exprimiert wird (Natali et al., 1983). Der Nachweis benigner Nävuszellen in histopathologischen Analysen von Wächterlymphknoten wird bei 3 – 6 % der Patienten beschrieben (Carson et al., 1996; McCarthy et al., 1974; Ridolfi et al., 1977), eine andere Studie zeigte Detektionsraten von bis zu 28 % (Abrahamsen et al., 2004). Auch bei den untersuchten Patienten des Regensburger-Kollektivs wurden histopathologisch in 1 % der Patienten Nävuszellen detektiert. Bei einem weiteren 1 % der Patienten kleine Zellnester, die aber pathologisch als Tumorzellnester eingestuft wurden. Der Nachweis MCSP+ Zellen in den untersuchten Wächterlymphknoten der eingeschlossenen 189 Patienten war bei 66,6 % der Patienten positiv, und damit um 45,2 % sensitiver als die Histopathologie mit 21,4 %. In 2 % der Fälle konnte nur durch die Pathologie ein positiver Befund erstellt werden. Die Gründe dafür dürften, wie bei den gp100+ Zellen beschrieben, in der Aufteilung des Lymphknotens liegen. Von den beschriebenen morphologischen Phänotypen wiesen 18,2 % der Patienten große bzw. große und kleine Zellen auf, 44,4 % ausschließlich kleine Zellen.

Von den 138 mit beiden Nachweismethoden für DCC untersuchten Patienten waren 71,73 % positiv für MCSP und 40,5 % für gp100. Somit lag die Detektionsrate mit MCSP im direkten Vergleich um 31 % höher. Umgekehrt waren lediglich 3,6 % der Patienten positiv für gp100 und negativ für MCSP. Mögliche Gründe für die unterschiedlichen Nachweisraten mit den beiden Einzelzellmarkern werden im Abschnitt über die Heterogenität der isolierten DCC diskutiert.

Um eine Kontrolle für die Sensitivität und Spezifität der MCSP-Färbung in Lymphknoten zu bekommen wurden 13 Lymphknoten von 10 Patienten ohne malignes Melanom untersucht. Es konnte in 83 % der Kontrollpatienten ein Nachweis von MCSP+ Zellen erbracht werden. Dieser Wert liegt höher als in den Lymphknoten der Melanompatienten. Hierbei muss allerdings als Beschränkung die geringe Fallzahl zum einen und die detektierte mediane Zellzahl (3/Mio) zum anderen erwähnt werden. Es handelte sich bei den detektierten Zellen ausschließlich um kleine schwach gefärbte Zellen, wie sie meist auch bei N0 Patienten des Melanoms nachgewiesen wurden. Es ist davon auszugehen, dass eine Erhöhung der Fallzahlen hier eine Veränderung der Detektionsraten mit sich bringt.

Über eine nichtlineare Regression wurde analog zur Tübinger Studie von 2005 die Korrelation zwischen den gefundenen DCCD-Werten und der Wahrscheinlichkeit für einen

positiven histopathologischen Befund des Wächterlymphknotens überprüft. Hierbei ähneln sich die Werte für MCSP und gp100. Während im Kollektiv zu dieser Arbeit ab einem medianen DCCD-Wert von 17 Zellen für MCSP und 18 für gp100 ein N1-Befund vorliegt, zeigen in Tübingen ab einem Wert von mehr als 1000 DCC 75 % der Patienten einen histopathologisch positiven Lymphknoten. Diese Werte bestätigen die Annahme, dass durch die histopathologische Aufarbeitung der Lymphknoten über eine vollständige Stufung des Gewebes in Blöcke a 1 mm in Regensburg, eine höhere Detektionsrate erreicht wird.

Als erster Hinweis auf einen melanozytären Ursprung der isolierten MCSP+ Zellen wurde die Expression Melanom-assoziiierter Marker und beschriebener Stammzellmarker beim Melanom über genspezifische PCR-Analyse getestet. Die Expression erlaubt jedoch allein noch keine Unterscheidung maligner und benigner Zellen.

Die verwendeten Marker gp100, MelanA und S100 werden als melanozytäre Differenzierungsmarker in den histologischen Nachweisen der Pathologie routinemäßig zur Diagnostik beim malignen Melanom eingesetzt (Baisden et al., 2000; Gietema et al., 2004; Prieto and Clark, 2002). TRP2 ist als frühester Differenzierungsmarker melanozytärer Zellen beschrieben (Wang et al., 1996). Die Expressionsraten in den untersuchten Zellen lagen je nach Marker zwischen 15 und 34 % (**Abb. 18** und **Tabelle 9**, Ergebnisteil). Die Abbildung zeigt auch die für alle Marker signifikant unterschiedliche Expressionsrate zwischen morphologisch großen und kleinen Zellen. Die Koexpressionsrate der Marker war in den morphologisch großen Zellen höher.

Die verwendeten Stammzell-assoziierten Marker ABCB5 (Schatton et al., 2008), CD271 (Boiko et al., 2010), Jarid1B (Roesch et al., 2010) und Nestin (Grichnik et al., 2006) hatten geringere Expressionsraten von 2,5 bis 15 % der untersuchten Zellen (**Abb. 18** und **Tabelle 9**, Ergebnisteil). Die Expression ist wie bei den melanozytären Markern, auch hier abgesehen von ABCB5, in den großen Zellen höher. Dieser Befund steht bei Nestin gegen die Beobachtung von Grichnik, der Nestin+ Zellen als vorwiegend klein und gering proliferierend beschrieb. Zellen mit den genannten Stammzellmarkern werden gemeinhin als kleine Subpopulationen innerhalb von Zelllinien oder Läsionen beschrieben, die Raten liegen beispielsweise für ABCB5 bei 1,6 % der untersuchten Zellpopulation (Schatton et al., 2008). Verglichen damit sind die Expressionsraten der Marker von bis zu 15 % für Jarid1B in den untersuchten DCC verhältnismäßig hoch. Das lässt vermuten, dass sich innerhalb der heterogenen Gruppe von DCC in Wächterlymphknoten der Patienten in gewissem Umfang Zellen mit Stammzeleigenschaften akkumulieren.

Drei der untersuchten MCSP+ Zellen aus den Kontrolllymphknoten zeigten ebenfalls eine Expression von Stammzell-assoziierten Markern, sowie eine der Zellen für den melanozytären Differenzierungsmarker S100. Eine der MCSP+ Normalzellen war positiv für ABCB5. Dieser ABC-Transporter kommt in vielen Zelltypen vor und wird auch in geringem

Maß von Nävuszellen exprimiert (Schatton et al., 2008). Schatton zeigte auch, dass nicht jede der ABCB5+ Zellen automatisch das Potential besitzt zu proliferieren. Zwei weitere Normalzellen zeigten eine Expression von Jarid1B. Die Expression dieses Markers wird in den Zellen als dynamisch regulierter Prozess beschrieben (Roesch et al., 2010). Jarid1B wird ebenso in benignen Geweben exprimiert, insbesondere im Knochenmark und in hoch regenerativen Zelltypen sowie in Nävuszellen (Roesch et al., 2005; Vogt et al., 1999). S100 gilt als der Differenzierungsmarker mit der geringsten Spezifität (Baisden et al., 2000; Cochran et al., 1988).

In den Auswertungen dieser Arbeit wurde aufgrund der Expressionsbefunde MCSP+ DCC eine vorläufige Einteilung in tumorigene und vermutlich benigne MCSP+ Zellen versucht. Da in keiner der Kontrollzellen eine Expression der Differenzierungsmarker gp100, MelanA und TRP2 stattfand, wurde die Expression mindestens eines dieser Marker als Merkmal für Tumorigenität definiert. Von den isolierten Zellen können demnach 38 % als Melanomzellen eingestuft werden. Auch hier liegt wieder ein deutlicher Unterschied zwischen den morphologisch großen (63 %) und kleinen Zellen (18 %) vor (**Tabelle 10**, Ergebnisteil).

Insgesamt geben die Expression melanozytärer Differenzierungsmarker und Stammzell-assoziiierter Marker eine erste Sicherheit, dass es sich zumindest bei einem Teil der detektierten und isolierten MCSP+ Zellen in Wächterlymphknoten um Zellen melanozytären Ursprungs handelt. Die weitere Charakterisierung der Zellen fand in dieser Arbeit an der DNA der Zellen statt.

4.4 Disseminierte Tumorzellen bilden Subpopulationen in Wächterlymphknoten

Die DNA-Analyse der isolierten DCC bot im Rahmen dieser Arbeit erstmals die Möglichkeit, den direkten Vergleich von gp100+ und MCSP+ Zellen aus demselben Patienten durchzuführen, und mit den Befunden zu den gp100+ Zellen der Vorgängerstudien zu vergleichen.

So lag der DCCD Wert beim Nachweis gp100+Zellen in dieser Arbeit in positiv getesteten Patienten im Median bei 2 Zellen, im Vergleich zu 1,6 bzw. 4 Zellen in den Studien von Ulmer (2005 und 2013). Der Wert für MCSP+ Zellen lag bei 5 DCC pro Million Lymphozyten. Während sich somit die medianen DCCD-Werte für MCSP und gp100 insgesamt nicht wesentlich unterscheiden, liegen innerhalb der einzelnen Patienten deutliche Unterschiede der DCCD-Werte vor. (Tabelle Anhang **9.1**). Patient Nr. 125 wies beispielsweise 706 gp100+ Zellen aber nur 34 MCSP+ Zellen pro Million Lymphozyten auf. Das legt den Schluss nahe, von zwei unterschiedlichen Zellpopulationen im Lymphknoten auszugehen.

Eine Expression von MCSP ist für mehr als 90 % der untersuchten melanozytären Gewebe beschrieben (Natali et al., 1983). Die Expressionsrate variiert nicht zwischen primären und metastasierten Melanomen. Eine Ausnahme bilden akrolentigonöse Melanome, hier wird MCSP im Primärtumor in geringerem Maß exprimiert als in den Metastasen (Kageshita et al., 1991).

Eine Problematik, die sich beim Nachweis mit gp100 ergibt, ist die geringe Sensitivität des Markers, die in bis zu 20 % der immunhistochemischen Färbungen zu falsch negativen Befunden führen kann (Abrahamsen et al., 2004).

Dadurch kann das unterschiedliche Befundergebnis für gp100 und MCSP in den Patienten erklärt werden, die mit beiden Markern untersucht wurden. Die beschriebene (Goto et al., 2008) höhere Sensitivität und geringere Spezifität von MCSP im Vergleich zu gp100 zeigt sich auch in einer höheren Positivrate innerhalb dieser Studie. Ebenso kann sie eine Erklärung für die hohe Rate an positiv getesteten Kontrolllymphknoten sein.

Das Auftreten der beiden hier unterschiedenen morphologischen Typen von MCSP+ Zellen lässt auf eine unterschiedliche Gruppierung auch innerhalb der MCSP+ DCC schließen. Große MCSP+ Zellen korrelieren signifikant mit einer N1-Klassifizierung der Pathologie, sowie dem Nachweis gp100+ Zellen. Da aber auch in diesen Patienten die DCCD-Werte zwischen den großen MCSP+ und den morphologisch ähnlichen gp100+ Zellen differieren, handelt es sich vermutlich auch bei diesen Zellen um unterschiedliche Zellpopulationen bzw. Gruppen an DCC. Ulmer beschreibt in ihren Studien an gp100+ Zellen keine morphologischen Unterschiede, und auch bei den Patienten im Kollektiv dieser Arbeit, waren die detektierten gp100+ Zellen von einheitlicher Größe zwischen 20 und 25 µm.

Die eingangs behandelte Mutationsanalyse an DCC beider Gruppen, bei der 23 % der untersuchten Patienten einen heterogenen Mutationsstatus für *BRAF* zwischen MCSP+ und gp100+ Zellen aufwiesen, bekräftigt ebenfalls die Annahme, dass es sich bei den DCC um verschiedene Subpopulationen im Lymphknoten handelt.

Mit der Methode der CGH wurden MCSP+ und gp100+ Zellen des Kollektivs untersucht und ihre genomischen Veränderungen verglichen. Von 10 Patienten konnten jeweils Zellen beider Nachweismethoden ausgewertet werden und erlauben so den direkten Vergleich innerhalb des einzelnen Patienten. Die gp100+ DCC aus der Studie von Ulmer 2013 wurden zum Vergleich der Aberrationsmuster in der Auswertung herangezogen.

Die untersuchten gp100+ Zellen aus Regensburg zeigten mit 82 % an Zellen mit genomische Veränderungen ein ähnliches Bild wie die Tübinger Studie mit 84 %. MCSP+ Zellen wiesen in 67 % der Fälle Aberrationen auf. Dabei war ein deutlicher Unterschied zwischen den morphologischen Gruppen zu erkennen. Kleine MCSP+ Zellen wiesen in 53 % der untersuchten Zellen Veränderungen auf, Große in 78 %. Die in den CGH-Versuchen

eingesetzten Normalzellen (Lymphozyten) der Patienten die als Versuchskontrolle dienten, waren in allen Fällen ohne genomische Veränderungen (siehe Anhang). Wiesen diese Kontrollen Veränderungen auf, wurden auch die Profile der MCSP/gp100+ Zellen nicht gewertet, da dann von einem Fehler in der Hybridisierung ausgegangen werden musste. Zellen ohne Veränderungen traten im Regensburger Kollektiv häufiger bei N0-Patienten auf, im Tübinger Kollektiv ist das nicht der Fall. Zellen primärer Melanome weisen in über 95 % der Fälle chromosomale Veränderungen auf, während in benignen Nävuszellen nur in sehr geringem Maße (13 %) Aberrationen nachgewiesen wurden (Bastian et al., 2003). Werden die Unterschiede in der Markerexpression zwischen großen und kleinen MCSP+ Zellen berücksichtigt, sowie die Tatsache, dass die kleinen Zellen häufiger in N0-Patienten detektiert werden und zudem weniger Punktmutationen tragen, muss bei einem Teil der kleinen Zellen davon ausgegangen werden, dass es sich dabei nicht um maligne melanozytäre Zellen handelt. Eine mögliche Erklärung wären benigne Nävuszellen im Lymphknoten, die mit MCSP detektiert werden. Eine weitere Charakterisierung dieser kleinen Zellen über hochauflösende Microarrays bzw. Array-CGH könnte zukünftig klären, ob und wie weit sich diese kleinen MCSP+ Zellen in Patientenproben und die positiven Zellen in den Kontrollproben ähneln.

Ein balanciertes Metaphasen-CGH Profil lässt nicht zwangsläufig auf ein unverändertes Genom der untersuchten Zellen schließen. So zeigten 7 von 9 balancierten gp100+ Zellen aus dem Tübinger Kollektiv in einer nachfolgend durchgeführten Array-CGH genomische Veränderungen, die unterhalb der Auflösungsgrenze der Metaphasen-CGH lagen (Ulmer 2013, eingereicht zur Publikation). Das Auftreten von Aberrationen unterhalb der Auflösungsgrenze der Metaphasen-CGH wurde auch bei DCC von Brustkrebspatienten beschrieben (Schmidt-Kittler et al., 2003). Da bei 53 % der untersuchten kleinen MCSP+ Zellen genomische Veränderungen auftraten, muss nach derzeitigem Wissensstand auch innerhalb der kleinen Zellen von einem Anteil maligner Zellen ausgegangen werden.

Die mediane Anzahl chromosomaler Veränderungen in den drei untersuchten Gruppen ähnelt sich (**Tabelle 15**), der höchste Wert kommt den großen MCSP+ Zellen zu (12,5). Bei ihnen liegt im Verhältnis zu den kleinen Zellen die Anzahl der chromosomalen Verluste deutlich höher (7 vs. 1,5) (**Tabelle 17**). Chromosomale Verluste werden als frühes, chromosomale Gewinne als spätes Ereignis in der Entwicklung der Melanomzellen beschrieben (Bastian et al., 1998). In den DCC Gruppen lag die mediane Anzahl der Gewinne höher. In allen drei DCC Gruppen lag die mediane Anzahl chromosomaler Veränderungen insgesamt über den für primäre (6,3) und metastasierte (7,8) Melanome beschriebenen Werten (Balazs et al., 2001).

Die gemeinhin auftretenden Verluste und Gewinne der drei untersuchten Zellpopulationen sind in **Tabelle 18** auch für unterschiedliche Stadien und Morphologien aufgelistet. Die

häufigsten Veränderungen entsprechen den Angaben in der Literatur für DCC (Ulmer 2005 und 2013) sowie primären und metastatischen Melanomen (Balazs et al., 2001; Bastian et al., 1998), können somit als melanomtypisch bezeichnet werden. In mehr als 25 % der untersuchten Zellen aller drei Gruppen kamen zudem Amplifikationen auf Chromosom 19 und 21, sowie bei MCSP+ Zellen auf Chromosom 16 vor. Da die Fallzahlen für diese auftretenden Veränderungen in den Gruppen sehr niedrig sind, kann hier noch keine aussagekräftige Interpretation gegeben werden.

Die in der durchgeführten Verwandtschaftsanalyse für alle drei Zellpopulationen gemeinsam am häufigsten veränderten Regionen auf den Chromosomen 1p, 9, 17, 20, und 22 entsprechen den bekannten Regionen (Bastian et al., 1998; Ulmer et al., 2005), dazu tritt in den untersuchten DCC zu dieser Arbeit eine Amplifikation auf Chromosom 21q.

Bei der Unterscheidung der Veränderungen in Zellen mit und ohne *BRAF*-Mutation zeigten mutierte Zellen signifikant mehr Deletionen. Die in einer Studie (Greshock et al., 2009) beschriebene Häufung von Gewinnen auf Chromosom 7 konnte auch in den hier untersuchten Proben bestätigt werden, nicht hingegen die dort beschriebene Häufung an Deletionen auf Chromosom 11q im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen.

Bastian (1998) beschreibt für das Melanom typische Regionen für die Lokalisation von Onkogenen. Von den dort beschriebenen Regionen ist Chromosom 8q12 in mehr als 25 % der MCSP+ Zellen amplifiziert, 11q13 in den Tübinger Zellen, 7q33 in Tübinger und MCSP+ Zellen sowie 17q25 in allen Zellpopulationen.

Ein Amplikon auf Chromosom 11q13 wurde bei Bastian 36,4 % der untersuchten akrolentigonösen Melanome beschrieben und trat gehäuft in Melanomen an stark sonnenexponierten Körperstellen auf (Balazs et al., 2001; Bastian et al., 1998; Curtin et al., 2005). Bei den Untersuchungen zu dieser Arbeit konnte das Amplikon in gp100+ DCC aus Tübingen in 37 % der Zellen nachgewiesen werden, und trat in gp100+ Zellen des Regensburger Kollektivs nicht, und in MCSP+ Zellen nur in 6 % der Fälle auf.

4.5 Die prognostische Bedeutung disseminierter Tumorzellen für den Patienten

Schon frühe Studien belegen, dass der Nachweis einer mikrometastatischen Tumorlast sowie okkulten Tumorzellen zu einer schlechteren Überlebensprognose für den Patienten führen (Cochran et al., 1988; Murali et al., 2012). In der bereits genannten Studie von Scheri (2007) wurde erstmals der klare Zusammenhang zwischen dem Nachweis einzelner positiver Tumorzellen in Lymphknoten mit dem Überleben der Patienten gezeigt. Hierbei handelte es sich jedoch auch um einen histologischen Nachweis der Zellen. Für zirkulierende MCSP+

Tumorzellen im Blut der Patienten konnte Ulmer einen klaren Grenzwert von 2 Zellen definieren, ab dem sich der Nachweis von Zellen auf die Prognose für den Patienten auswirkt (Ulmer et al., 2004). Der Nachweis MCSP+ Zellen im Knochenmark von Melanompatienten korreliert ebenfalls mit einer verkürzten Gesamtüberleben (Faye et al., 2004). Ein Zusammenhang zwischen dem Nachweis von DCC in Lymphknoten und Knochenmark mit dem Überleben zeigte sich auch bei Patienten mit Ösophagus Krebs (Stoecklein et al., 2008), sowie Prostatakrebs (Weckermann et al., 2009).

Die derzeit einzige Studie über den Einfluss einzelner DCC in Wächterlymphknoten beim Melanom ist die Vorgängerstudie von Ulmer 2013. Dort konnten die Überlebensdaten der 1027 eingeschlossenen Patienten im Median über 49 Monate (3 – 123 Monate) verglichen werden. Es zeigte sich ein signifikant verringertes 5-Jahres Überleben der Patienten ab einem Nachweis von 3 gp100+ DCC pro Million Lymphozyten. Der gemessene DCCD-Wert der Zellen erwies sich dabei im multivariaten Vergleich als Prognosefaktor auch dem histopathologischen Staging überlegen.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Nachweis von gp100+ und erstmals auch von MCSP+ DCC im Lymphknoten mit dem Überleben und den klinischen Faktoren der Patienten verglichen.

Für den Nachweis der gp100+ Zellen konnte in dieser Arbeit der Befund von Tübingen nicht bestätigt werden. Es zeigte sich (noch) kein Zusammenhang mit dem Überleben der Patienten. Dabei muss die mediane Beobachtungszeit der Patienten bei der Bewertung der Ergebnisse berücksichtigt werden. Diese lag im Rahmen dieser Arbeit bei etwa 20 Monaten (Tübingen 49 Monate). Von den Regensburger Patienten wurden auch nur 138 (73 %) in diese Auswertung eingeschlossen, sie spiegeln also nicht das gesamte Kollektiv repräsentativ wieder. Es konnte auch kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Nachweis gp100+ Zellen und klinischen Parametern der Patienten festgestellt werden. Untersucht wurden analog zur Tübinger Studie Geschlecht, Alter, Lokalisation des Primärtumors, Tumordicke, histologischer Subtyp des Primärtumors sowie die Ulzeration.

Der Nachweis MCSP+ Zellen zeigt insgesamt ebenfalls keinen signifikanten Einfluss auf das Überleben der Patienten. Von den klinischen Faktoren korreliert lediglich die Ulzeration des Primärtumors signifikant mit dem Auftreten MCSP+ Zellen. Einen signifikanten Unterschied (**p=0,038**) macht allerdings der morphologische Typ der MCSP+ Zellen aus. Große Zellen korrelieren mit einer schlechten Prognose für den Patienten. Ebenso hatte der pathologische Befund, die Tumordicke, und wie bereits zu Beginn des Kapitels beschrieben das Auftreten einer *BRAF/NRAS*-Mutation, Einfluss auf das Überleben der Patienten. Für die untersuchten Parameter konnte ein Zusammenhang mit dem Überleben in multivariater Analyse nur für den histopathologischen Befund bestätigt werden.

Da sich derzeit bereits für die großen MCSP+ Zellen eine prognostische Tendenz abzeichnet, muss auch hier davon ausgegangen werden, dass ein verlängerter Beobachtungszeitrahmen diese Werte noch verdeutlichen kann. Dadurch kann sich auch der Nachweis gp100+ Zellen ähnlich wie in Tübingen als prognostisch relevant für den Patienten erweisen.

4.6 Tumorigenes Potential vitaler MCSP+ DCC *in vivo*

Die Frage nach der klinischen Relevanz der DCC kann durch die in dieser Arbeit etablierte Isolation vitaler MCSP+ Zellen zukünftig auch funktionell *in vitro* und *in vivo* untersucht werden. Von Interesse ist besonders die Frage nach dem Potential dieser Zellen zur Tumorbildung. Dies wäre ein Hinweis darauf, dass unter diesen MCSP+ DCC zumindest vereinzelt Zellen zu finden sind, die im weiteren Verlauf der Erkrankung zur Ausbildung der Lymphknotenmetastasen führen.

Die entscheidende Frage in der Stammzelldebatte beim Melanom und anderen soliden Krebserkrankungen ist, wie verbreitet Zellen mit tumorigenem Potential innerhalb der Zellmasse des Primärtumors sind. Ausgehend von diesem sog. Krebsstammzell-Konzept, müsste das Konsequenzen für die therapeutische Anwendung haben. Es müsste dann verstärkt darauf gezielt werden, diese Zellpopulation innerhalb des Tumors zu eliminieren, anstatt wie bisher die Tumorlast grundsätzlich zu verringern (Pardal et al., 2003; Wang and Dick, 2005). Eine besondere Bedeutung käme tumorigenen DCC im Lymphknoten beim Melanom zu, da sie als frühe Stufe der systemischen Erkrankung geeignete therapeutische Zielstrukturen wären, um den weiteren Krankheitsverlauf zu unterbrechen.

Einen entscheidenden Einfluss auf das Ergebnis der *in vivo* Studien hat nicht zuletzt das Immunsystem des verwendeten Wirtsorganismus. Verschiedene Autoren haben gezeigt, dass nur jeweils kleine Subpopulationen von Melanomzellen in der Lage sind, Tumore in immundefizienten Mäusen zu generieren (Boiko et al., 2010; Schatton et al., 2008). dagegen konnte Quintana mit einem Transplantationsmodell in hoch immundefizienten NSG-Mäusen zeigen, dass die Zahl tumorinduzierender Zellen bei Verwendung komplett immundefizienter Mäuse drastisch ansteigt (Quintana et al., 2008) und dass jede vierte Zelle ohne den Einsatz von Selektionsmarkern dazu in der Lage ist.

Das Modell der subkutanen Transplantation von Einzelzellen (in immundefiziente NSG-Mäuse) wurde im Rahmen dieser Arbeit in Kooperation mit Dr. Werner-Klein etabliert, und das tumorigene Potential einzelner injizierter MCSP+ Zellen getestet. Zellen aus drei der sieben für diesen Versuch ausgewählten Patienten, waren im Mausmodell in der Lage

Tumore *in vivo* zu generieren. Eine Metastasierung in die Lunge der Tiere wurde bei Tumoren aus DCC von zwei der Patienten nachgewiesen.

Quintana betont, dass in keiner der bisherigen Stammzell-Studien die Frage untersucht wurde, welche Zellen tatsächlich Tumorwachstum und Krankheitsfortschritt begünstigen. In ihrer Studie wurden zufällig ausgewählte Einzelzellen aus Primärtumoren von Patienten injiziert. Keiner der gängigen Stammzellmarker wie CD271 oder ABCB5 war in den tumorigenen Zellen angereichert, Marker schienen dabei reversibel in den tumorigenen Zellen exprimiert zu werden (Quintana et al., 2010). In einer weiteren Studie zu s.c. injizierten Einzelzellen (Held et al., 2010) wurden dagegen Stammzellmarker zur Selektion der Tumorphpopulationen verwendet. Es zeigte sich dort, dass mehrere unterschiedliche tumorpropagierende Zellen innerhalb eines Tumors vorzukommen scheinen.

Die gezielte Injektion einzelner MCSP+ Zellen zeigt in der vorliegenden Arbeit, dass nicht alle MCSP+ Zellen in der Lage sind Tumore zu generieren. Weder klinische Faktoren der Patienten, noch andere Faktoren wie der DCCD-Wert scheinen einen Einfluss auf die Tumorentstehung zu haben. Tumorbildung wurde aus Zellen von Patienten mit vorliegender *BRAF/NRAS*-Mutation beobachtet, aber eine vorliegende Mutation in den DCC allein war kein Garant für das Auswachsen der Zellen.

Insgesamt müssen diese ersten Ergebnisse noch mit Vorsicht interpretiert werden. Da die Fallzahl zu gering ist, um entsprechende Aussagen zu quantifizieren, und die verwendeten DCC alle aus Patienten mit hohen DCCD-Werten stammten. Möglicherweise handelt es sich bei diesen Zellen bereits um disaggregierte Metastasenzellen, die schon eine verstärkte Proliferation aufweisen. Wie unter **4.3** bereits beschrieben, unterscheiden sich die histologischen Nachweisverfahren in Tübingen und Regensburg, was sich in der höheren Nachweisrate von histologisch befundeten Lymphknotenmetastasen in Regensburg zeigt. Die herkömmliche Einteilung in N1/N0 gibt somit keine wirklich quantitative Aussage über die reale Tumorlast im Lymphknoten.

Von Interesse ist deshalb insbesondere die Frage, ob auch kleine MCSP+ Zellen oder Zellen aus Lymphknoten mit einem niedrigen DCCD-Wert Tumore *in vivo* bilden. Der nächste Schritt wird die molekulare Charakterisierung der gebildeten Tumore sein. Das Ziel ist, mögliche Muster auf Expressionsebene oder chromosomale Veränderungen zu detektieren, die Rückschlüsse auf einen bestimmten Phänotyp von tumorinduzierenden MCSP+ DCC ermöglichen. Die ersten Experimente dazu laufen bereits in einem weiteren Projekt.

4.7 Hypothetisches Progressionsmodell für DCC in Wächterlymphknoten

Die vorliegenden Daten dieser Arbeit zeichnen im Wesentlichen ein sehr heterogenes Bild der DCC in Wächterlymphknoten von Melanompatienten. Viele der Befunde müssen zunächst noch über eine Erhöhung der Fallzahlen durch zusätzliche Proben bestätigt, die Aberrationsmuster im Genom der Zellen, sowie die Genexpression der Zellen durch höher auflösende Verfahren detaillierter untersucht werden. Auch wird erst der weitere Krankheitsverlauf der Patienten im Kollektiv eine sichere Aussage über die prognostische Bedeutung, insbesondere der detektierten MCSP+ DCC geben können.

Basierend auf den vorliegenden Daten und den vorausgegangenen Studien kann dennoch ein erstes hypothetisches Modell zur Progression maligner Melanome einschließlich der DCC entworfen werden (**Abb. 42**):

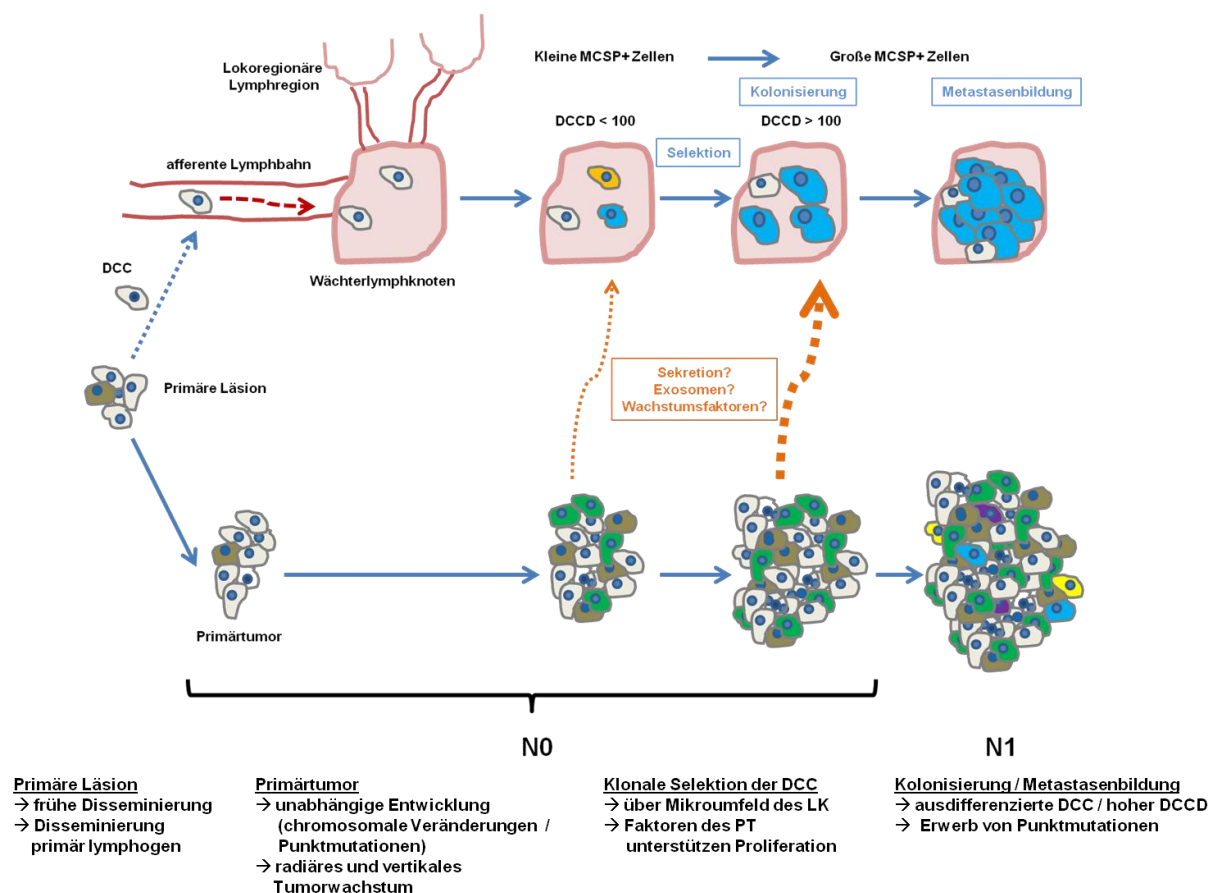


Abbildung 42: Hypothetisches Modell zur systemischen Progression maligner Melanome

Dargestellt ist in schematischer Weise die frühe Disseminierung der DCC ausgehend von der Primärläsion, mit anschließender paralleler und unabhängiger Entwicklung von Primärtumor und DCC-Population im Lymphknoten, über den fortschreitenden Krankheitsverlauf bis zur Lymphknotenmetastasierung. Das Mikroumfeld des Lymphknotens übt einen klonalen Selektionsdruck auf die Zellen aus. Es gibt Hinweise, dass der Primärtumor über diverse Stimuli die Proliferation der DCC beeinflusst.

Die Disseminierung von DCC in Wächterlymphknoten stellt ein frühes Ereignis beim Melanom dar. Im Kollektiv von Ulmer konnte gezeigt werden, dass die mediane Tumordicke

zum Zeitpunkt der Disseminierung bei weniger als 0,4 mm liegt (Scheitler, Hodak, eingereicht zur Publikation). Bedingt durch die frühe Absiedlung besitzen die Zellen, verglichen mit ihrem korrespondierenden Primärtumoren, unterschiedliche Aberrationsmuster sowie einen heterogenen Mutationsstatus (Scheitler, Hodak, eingereicht zur Publikation). Während in der Studie von Ulmer nur 7 % der DCC zum Zeitpunkt der Absiedlung ein mit dem korrespondierenden Primärtumor identisches Mutationsmuster aufweisen, erwerben andere DCC Mutationen erst im Mikroumfeld des Lymphknotens und unabhängig vom Primärtumor (Scheitler, Hodak, eingereicht zur Publikation). Somit erklärt sich das Auftreten von Punktmutationen in Lymphknotenmetastasen von Patienten ohne Mutation im Primärtumor.

Einflüsse des Mikroumfelds im Lymphknoten auf Entwicklung und Proliferation der DCC führen zu einer klonalen Selektion innerhalb der DCC im Lymphknoten. Ein Argument dafür ist die in den bisher vorliegenden Daten festgestellte Abnahme der Anzahl chromosomaler Aberrationen gp100+ DCC vom Stadium N0 zu Stadium N1 (Isabelle Hodak, unveröffentlicht). gp100+ DCC verschiedener Patienten ähneln sich in ihrem Aberrationsmuster untereinander stärker, als ihrem jeweils korrespondierenden Primärtumor (Scheitler, Hodak, eingereicht zur Publikation).

Bei Clusteranalysen MCSP+ und gp100+ DCC in dieser Arbeit ähnelten sich Zellen der individuellen Patienten stärker, selbst wenn diese den unterschiedlichen Populationen von MCSP und gp100 angehörten, als Zellen die aus verschiedenen Patienten stammten (**Abb. 33** und **34**, Ergebnisteil). Innerhalb der DCC kommt es zu einer Akkumulation von Zellen mit Stammzeleigenschaften (**Abb. 18** und **Tabelle 9**, Ergebnisteil). Diese Befunde stützen die These eines klonalen Selektionsdrucks im Lymphknoten.

Die unterschiedlichen Phänotypen der DCC würden sich dadurch erklären, dass früh disseminierte Zellen zunächst einen morphologisch kleinen Phänotyp besitzen und MCSP+ sind. Sie besitzen zu diesem Zeitpunkt noch wenige Aberrationen (**Abb. 30 A**, Ergebnisteil) und Mutationen (**Tabelle 12**, Ergebnisteil). Durch die weitere Proliferation der Zellen sowie dem Selektionsdruck im Lymphknoten kommt es zu einer Ausbildung der unterschiedlichen Gruppen an DCC, die je nach Entwicklungsstand MCSP, gp100, oder beide Marker exprimieren. Ziel ist hier zukünftig über eine MCSP/gp100-Doppelfärbung festzustellen, in wie weit sich diese Zellpopulationen überschneiden. Abhängig vom jeweiligen Entwicklungsgrad der Zellen weisen diese unterschiedliche Aberrationsmuster und Mutationsraten auf. Morphologisch große MCSP+ Zellen sind nach dieser Hypothese die am weitesten entwickelte Gruppe der DCC, da sie am meisten genomische Veränderungen tragen (**Tabelle 18**, Ergebnisteil) und für sie bereits ein prognostischer Effekt (**Abb. 40 C**, Ergebnisteil) sowie ein tumorigenes Potential *in vivo* (**Tabelle 22**, Ergebnisteil) im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte. Große MCSP+ Zellen weisen eine signifikant höhere

Zelldichte im Lymphknoten auf als Kleine (**Abb. 10**, Ergebnisteil), was für eine beginnende Kolonisierung durch diese Zellen als Vorstufe der Metastasierung spricht.

Es ist anzunehmen, dass der Primärtumor die Entwicklung der DCC und das Auswachsen manifestierter Lymphknotenmetastasen auf unterschiedliche Weise fördert, z.B. über Sekretion stimulierender Faktoren für Proliferation und Kolonisierung der Zellen.

Antworten darauf können funktionelle Studien an vitalen DCC *in vitro* und *in vivo* liefern. Sie sind das Ziel weiterführender Forschungsarbeiten an diesem Projekt.

5. Zusammenfassung

Der Nutzen systemischer Therapien beim malignen Melanom ist bis heute zumeist gering. Eine mögliche Ursache hierfür ist, dass die disseminierten Zielzellen dieser Therapien molekular schlecht charakterisiert sind. Der Nachweis von gestreuten Tumorzellen im Wächterlymphknoten stellt in der Diagnostik derzeit den wichtigsten prognostischen Faktor dar. Bereits der immunhistochemische Nachweis einzelner Tumorzellen im Lymphknoten gilt als Kriterium für eine systemische Streuung des Primärtumors. Es war das Ziel der vorliegenden Arbeit, einzelne disseminierte Tumorzellen des Melanoms aus Wächterlymphknoten zu isolieren und molekular sowie funktionell zu untersuchen.

Dazu wurde zunächst eine Immunfluoreszenzfärbung zum Nachweis vitaler Zellen in Wächterlymphknoten über das membranständige Markermolekül Melanom-assoziiertes-Chondroitin-Sulfat Proteoglykan (MCSP) etabliert und ein Patientenkollektiv auf MCSP+ DCC in Lymphknoten untersucht. Es konnten morphologisch große und kleine MCSP+ Zellen isoliert werden. Bei Verwendung eines anderen Markers, dem Antigen gp100, für den aus der Arbeitsgruppe bereits erste molekulare Daten vorlagen, fand sich hingegen stets ein einheitlicher Phänotyp. Es wurden in dieser Arbeit MCSP+ und gp100+ DCC aus denselben Proben, sowie gp100+ DCC aus vorausgegangenen Studien miteinander verglichen. Die Sensitivität des MCSP-Nachweises wurde an Kontrolllymphknoten gesunder Spender überprüft. In den Kontrollen wurden ausschließlich kleine MCSP+ Zellen detektiert, die mediane Zellzahl und die Detektionsraten in den Kontrollen entsprachen denen der Patientenproben.

Ein Ursprung MCSP+ Zellen aus dem Melanom wurde zunächst über eine PCR-basierte Expressionsanalyse melanozytärer Differenzierungsmarker und für das Melanom beschriebener Stammzell-assoziiierter Marker überprüft. Die Marker gp100, MelanA und TRP2 wurden ausschließlich in den MCSP+ Zellen von Melanompatienten exprimiert und kennzeichnen 63 % der großen MCSP+ Zellen und 18 % der kleinen MCSP+ Zellen als maligne Zellen.

Um weitere Aussagen zur Malignität der MCSP+ Zellen zu erhalten, wurde die DNA der isolierten Zellen auf Punktmutationen der Onkogene *BRAF* und *NRAS*, sowie durch komparative genomische Hybridisierung (CGH) auf charakteristische Veränderungen hin, untersucht und mit den Befunden der gp100+ DCC verglichen.

Von den untersuchten Patienten teilten 38 % in ihren DCC Punktmutationen nicht zwischen MCSP+ und gp100+ Zellen. Ein Vergleich gepaarter Läsionen aus Primärtumor und Metastasen zeigte ebenfalls eine Heterogenität in 33 % der Patienten. Die CGH-Profile der DCC unterschieden sich zwischen den Zellpopulationen von MCSP und gp100, und

zwischen großen und kleinen MCSP+ Zellen. Zellen von N1-Patienten beider Gruppen wiesen eine höhere Anzahl an Aberrationen auf, ebenso morphologisch große MCSP+ Zellen. MCSP+ Zellen trugen in 67 %, gp100+ Zellen in 82 % genomischen Veränderungen. Zudem konnten auch in 53 % der untersuchten kleinen MCSP+ Zellen Veränderungen nachgewiesen werden, was diese als maligne melanozytäre Zellen kennzeichnet.

Die erfolgreiche *in vivo* Propagation von Tumoren nach subkutaner Injektion einzeln isolierter MCSP+ DCC in immundefizienten NSG-Mäusen, bestätigt deren tumorigenes Potential und ihre Bedeutung als Vorstufen manifestierter Lymphknotenmetastasen.

Der Nachweis gp100+ Melanomzellen war sensitiver als die Routinepathologie und bestätigte frühere Studien der Arbeitsgruppe. Für MCSP+ DCC liegen finale Aussagen zur Malignität bislang nur bei einem Teil der Zellen vor. Deshalb ist hier derzeit noch keine endgültige Aussage zur Sensitivität des Nachweises von DCC mit MCSP möglich. Hinsichtlich klinischer Faktoren bestand ein signifikanter Zusammenhang lediglich zwischen einer Ulzeration des Primärtumors und dem Auftreten MCSP+ Zellen im Lymphknoten. Der Nachweis großer MCSP+ Zellen korrelierte negativ mit dem Überleben der Patienten, ebenso die klinischen Parameter histopathologischer Befund des Lymphknotens, Tumordicke und Mutationsstatus. Für die kleinen MCSP+ Zellen konnten keine Zusammenhänge zwischen dem Nachweis und dem Überleben der Patienten oder anderen klinischen Variablen gefunden werden. Hier muss allerdings die relativ kurze Beobachtungszeit der Patienten bis zum Abschluss dieser Arbeit berücksichtigt werden, die im Mittel unter 24 Monaten lag.

Die gewonnenen Ergebnisse machen deutlich, dass die systemische Progression des malignen Melanoms über die Stufen der Erkrankung vom Primärtumor, der frühen Disseminierung in die Wächterlymphknoten, bis zu manifestierten Metastasen einen dynamischen und heterogenen Verlauf zeigt. Diese Heterogenität muss verstärkt bei der Entwicklung neuer individualisierter Therapieansätze berücksichtigt werden. Großen MCSP+ DCC in Wächterlymphknoten kommt aufgrund ihrer Malignität, ihres tumorigenen Potentials und ihrem Einfluss auf das Überleben als Vorstufe der Metastasierung eine entscheidende Bedeutung zu. Kleine MCSP+ Zellen stellen nach den Ergebnissen dieser Arbeit möglicherweise eine im Prozess der Proliferation befindliche Vorstufe der großen Zelle dar.

Die weitere molekulare und funktionelle Charakterisierung der DCC kann Hinweise auf potentielle therapeutische Zielstrukturen liefern. Diese Arbeit kann dazu als ein erster Schritt gesehen werden.

6. Literaturverzeichnis

Abrahamsen, H.N., Hamilton-Dutoit, S.J., Larsen, J., and Steiniche, T. (2004). Sentinel lymph nodes in malignant melanoma: extended histopathologic evaluation improves diagnostic precision. *Cancer* 100, 1683-1691.

Bagaria, S.P., Faries, M.B., and Morton, D.L. (2010). Sentinel node biopsy in melanoma: technical considerations of the procedure as performed at the John Wayne Cancer Institute. *Journal of surgical oncology* 101, 669-676.

Baisden, B.L., Askin, F.B., Lange, J.R., and Westra, W.H. (2000). HMB-45 immunohistochemical staining of sentinel lymph nodes: a specific method for enhancing detection of micrometastases in patients with melanoma. *The American journal of surgical pathology* 24, 1140-1146.

Balazs, M., Adam, Z., Treszl, A., Begany, A., Hunyadi, J., and Adany, R. (2001). Chromosomal imbalances in primary and metastatic melanomas revealed by comparative genomic hybridization. *Cytometry* 46, 222-232.

Balch, C.M., Buzaid, A.C., Soong, S.J., Atkins, M.B., Cascinelli, N., Coit, D.G., Fleming, I.D., Gershenwald, J.E., Houghton, A., Jr., Kirkwood, J.M., *et al.* (2001). Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 19, 3635-3648.

Balch, C.M., Gershenwald, J.E., Soong, S.J., Thompson, J.F., Atkins, M.B., Byrd, D.R., Buzaid, A.C., Cochran, A.J., Coit, D.G., Ding, S., *et al.* (2009a). Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol* 27, 6199-6206.

Balch, C.M., Morton, D.L., Gershenwald, J.E., McMasters, K.M., Nieweg, O.E., Powell, B., Ross, M.I., Sondak, V.K., and Thompson, J.F. (2009b). Sentinel node biopsy and standard of care for melanoma. *Journal of the American Academy of Dermatology* 60, 872-875.

Balch, C.M., Soong, S.J., Bartolucci, A.A., Urist, M.M., Karakousis, C.P., Smith, T.J., Temple, W.J., Ross, M.I., Jewell, W.R., Mihm, M.C., *et al.* (1996). Efficacy of an elective regional lymph node dissection of 1 to 4 mm thick melanomas for patients 60 years of age and younger. *Annals of surgery* 224, 255-263; discussion 263-256.

Bastian, B.C., LeBoit, P.E., Hamm, H., Brocker, E.B., and Pinkel, D. (1998). Chromosomal gains and losses in primary cutaneous melanomas detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Res* 58, 2170-2175.

Bastian, B.C., Olshen, A.B., LeBoit, P.E., and Pinkel, D. (2003). Classifying melanocytic tumors based on DNA copy number changes. *Am J Pathol* 163, 1765-1770.

Baudis, M., and Cleary, M.L. (2001). Progenetix.net: an online repository for molecular cytogenetic aberration data. *Bioinformatics* 17, 1228-1229.

Benez, A., Geiselhart, A., Handgretinger, R., Schiebel, U., and Fierlbeck, G. (1999). Detection of circulating melanoma cells by immunomagnetic cell sorting. *Journal of clinical laboratory analysis* 13, 229-233.

Berson, J.F., Harper, D.C., Tenza, D., Raposo, G., and Marks, M.S. (2001). Pmel17 initiates premelanosome morphogenesis within multivesicular bodies. *Molecular biology of the cell* 12, 3451-3464.

- Bieligk, S.C., Ghossein, R., Bhattacharya, S., and Coit, D.G. (1999). Detection of tyrosinase mRNA by reverse transcription-polymerase chain reaction in melanoma sentinel nodes. *Ann Surg Oncol* 6, 232-240.
- Blaheta, H.J., Sotlar, K., Breuninger, H., Bueltmann, B., Rassner, G., Garbe, C., and Horny, H.P. (2001). Does intensive histopathological workup by serial sectioning increase the detection of lymph node micrometastasis in patients with primary cutaneous melanoma? *Melanoma Res* 11, 57-63.
- Boiko, A.D., Razorenova, O.V., van de Rijn, M., Swetter, S.M., Johnson, D.L., Ly, D.P., Butler, P.D., Yang, G.P., Joshua, B., Kaplan, M.J., *et al.* (2010). Human melanoma-initiating cells express neural crest nerve growth factor receptor CD271. *Nature* 466, 133-137.
- Breslow, A. (1970). Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Annals of surgery* 172, 902-908.
- Bumol, T.F., and Reisfeld, R.A. (1982). Unique glycoprotein-proteoglycan complex defined by monoclonal antibody on human melanoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 1245-1249.
- Campoli, M.R., Chang, C.C., Kageshita, T., Wang, X., McCarthy, J.B., and Ferrone, S. (2004). Human high molecular weight-melanoma-associated antigen (HMW-MAA): a melanoma cell surface chondroitin sulfate proteoglycan (MSCP) with biological and clinical significance. *Critical reviews in immunology* 24, 267-296.
- Carson, K.F., Wen, D.R., Li, P.X., Lana, A.M., Bailly, C., Morton, D.L., and Cochran, A.J. (1996). Nodal nevi and cutaneous melanomas. *The American journal of surgical pathology* 20, 834-840.
- Chapman, P.B., Hauschild, A., Robert, C., Haanen, J.B., Ascierto, P., Larkin, J., Dummer, R., Garbe, C., Testori, A., Maio, M., *et al.* (2011). Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med* 364, 2507-2516.
- Chelly, J., Concordet, J.P., Kaplan, J.C., and Kahn, A. (1989). Illegitimate transcription: transcription of any gene in any cell type. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 2617-2621.
- Clark, W.H., Jr., From, L., Bernardino, E.A., and Mihm, M.C. (1969). The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res* 29, 705-727.
- Cochran, A.J., Wen, D.R., and Morton, D.L. (1988). Occult tumor cells in the lymph nodes of patients with pathological stage I malignant melanoma. An immunohistological study. *The American journal of surgical pathology* 12, 612-618.
- Cook, M.G., Green, M.A., Anderson, B., Eggermont, A.M., Ruiter, D.J., Spatz, A., Kissin, M.W., Powell, B.W., and Group, E.M. (2003). The development of optimal pathological assessment of sentinel lymph nodes for melanoma. *The Journal of pathology* 200, 314-319.
- Curtin, J.A., Fridlyand, J., Kageshita, T., Patel, H.N., Busam, K.J., Kutzner, H., Cho, K.H., Aiba, S., Brocker, E.B., LeBoit, P.E., *et al.* (2005). Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med* 353, 2135-2147.
- Davar, D., Tarhini, A.A., and Kirkwood, J.M. (2013). Adjuvant immunotherapy of melanoma and development of new approaches using the neoadjuvant approach. *Clinics in dermatology* 31, 237-250.
- Edlundh-Rose, E., Egyhazi, S., Omholt, K., Mansson-Brahme, E., Platz, A., Hansson, J., and Lundeberg, J. (2006). NRAS and BRAF mutations in melanoma tumours in relation to clinical characteristics: a study based on mutation screening by pyrosequencing. *Melanoma Res* 16, 471-478.

- Faye, R.S., Aamdal, S., Hoifodt, H.K., Jacobsen, E., Holstad, L., Skovlund, E., and Fodstad, O. (2004). Immunomagnetic detection and clinical significance of micrometastatic tumor cells in malignant melanoma patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 10, 4134-4139.
- Fearon, E.R., and Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61, 759-767.
- Flaherty, K.T., Puzanov, I., Kim, K.B., Ribas, A., McArthur, G.A., Sosman, J.A., O'Dwyer, P.J., Lee, R.J., Grippo, J.F., Nolop, K., *et al.* (2010). Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med* 363, 809-819.
- Friedman, R.J., Rigel, D.S., and Kopf, A.W. (1985). Early detection of malignant melanoma: the role of physician examination and self-examination of the skin. *CA: a cancer journal for clinicians* 35, 130-151.
- Gandini, S., Autier, P., and Boniol, M. (2011). Reviews on sun exposure and artificial light and melanoma. *Progress in biophysics and molecular biology* 107, 362-366.
- Garbe, C., and Blum, A. (2001). Epidemiology of cutaneous melanoma in Germany and worldwide. *Skin pharmacology and applied skin physiology* 14, 280-290.
- Garbe, C., Buttner, P., Bertz, J., Burg, G., d'Hoedt, B., Drepper, H., Guggenmoos-Holzmann, I., Lechner, W., Lippold, A., Orfanos, C.E., *et al.* (1995a). Primary cutaneous melanoma. Prognostic classification of anatomic location. *Cancer* 75, 2492-2498.
- Garbe, C., Buttner, P., Ellwanger, U., Brocker, E.B., Jung, E.G., Orfanos, C.E., Rassner, G., and Wolff, H.H. (1995b). [The Malignant Melanoma Central Register of the German Society of Dermatology 1983-1993. Epidemiologic developments and current therapeutic management of malignant melanoma of the skin]. *Der Hautarzt; Zeitschrift fur Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete* 46, 683-692.
- Garbe, C., McLeod, G.R., and Buettner, P.G. (2000). Time trends of cutaneous melanoma in Queensland, Australia and Central Europe. *Cancer* 89, 1269-1278.
- Ghali, L., Wong, S.T., Tidman, N., Quinn, A., Philpott, M.P., and Leigh, I.M. (2004). Epidermal and hair follicle progenitor cells express melanoma-associated chondroitin sulfate proteoglycan core protein. *The Journal of investigative dermatology* 122, 433-442.
- Gietema, H.A., Vuylsteke, R.J., de Jonge, I.A., van Leeuwen, P.A., Molenkamp, B.G., van der Sijp, J.R., Meijer, S., and van Diest, P.J. (2004). Sentinel lymph node investigation in melanoma: detailed analysis of the yield from step sectioning and immunohistochemistry. *Journal of clinical pathology* 57, 618-620.
- Goel, V.K., Lazar, A.J., Warneke, C.L., Redston, M.S., and Haluska, F.G. (2006). Examination of mutations in BRAF, NRAS, and PTEN in primary cutaneous melanoma. *The Journal of investigative dermatology* 126, 154-160.
- Gogel, B.M., Kuhn, J.A., Ferry, K.M., Fisher, T.L., Preskitt, J.T., O'Brien, J.C., Lieberman, Z.H., Stephens, J.S., and Krag, D.N. (1998). Sentinel lymph node biopsy for melanoma. *American journal of surgery* 176, 544-547.
- Goldstein, A.M., and Tucker, M.A. (2001). Genetic epidemiology of cutaneous melanoma: a global perspective. *Archives of dermatology* 137, 1493-1496.

- Goto, Y., Ferrone, S., Arigami, T., Kitago, M., Tanemura, A., Sunami, E., Nguyen, S.L., Turner, R.R., Morton, D.L., and Hoon, D.S. (2008). Human high molecular weight-melanoma-associated antigen: utility for detection of metastatic melanoma in sentinel lymph nodes. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 14, 3401-3407.
- Gown, A.M., Vogel, A.M., Hoak, D., Gough, F., and McNutt, M.A. (1986). Monoclonal antibodies specific for melanocytic tumors distinguish subpopulations of melanocytes. *Am J Pathol* 123, 195-203.
- Greene, M.H., Goldin, L.R., Clark, W.H., Jr., Lovrien, E., Kraemer, K.H., Tucker, M.A., Elder, D.E., Fraser, M.C., and Rowe, S. (1983). Familial cutaneous malignant melanoma: autosomal dominant trait possibly linked to the Rh locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 6071-6075.
- Greshock, J., Nathanson, K., Medina, A., Ward, M.R., Herlyn, M., Weber, B.L., and Zaks, T.Z. (2009). Distinct patterns of DNA copy number alterations associate with BRAF mutations in melanomas and melanoma-derived cell lines. *Genes Chromosomes Cancer* 48, 419-428.
- Grichnik, J.M., Burch, J.A., Schulteis, R.D., Shan, S., Liu, J., Darrow, T.L., Vervaert, C.E., and Seigler, H.F. (2006). Melanoma, a tumor based on a mutant stem cell? *The Journal of investigative dermatology* 126, 142-153.
- Hartmann, C.H., and Klein, C.A. (2006). Gene expression profiling of single cells on large-scale oligonucleotide arrays. *Nucleic Acids Res* 34, e143.
- Hatta, N., Takata, M., Takehara, K., and Ohara, K. (1998). Polymerase chain reaction and immunohistochemistry frequently detect occult melanoma cells in regional lymph nodes of melanoma patients. *Journal of clinical pathology* 51, 597-601.
- Hatzivassiliou, G., Song, K., Yen, I., Brandhuber, B.J., Anderson, D.J., Alvarado, R., Ludlam, M.J., Stokoe, D., Gloor, S.L., Vigers, G., *et al.* (2010). RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth. *Nature* 464, 431-435.
- Held, M.A., Curley, D.P., Dankort, D., McMahon, M., Muthusamy, V., and Bosenberg, M.W. (2010). Characterization of melanoma cells capable of propagating tumors from a single cell. *Cancer Res* 70, 388-397.
- Houben, R., Becker, J.C., Kappel, A., Terheyden, P., Brocker, E.B., Goetz, R., and Rapp, U.R. (2004). Constitutive activation of the Ras-Raf signaling pathway in metastatic melanoma is associated with poor prognosis. *J Carcinog* 3, 6.
- Kageshita, T., Nakamura, T., Yamada, M., Kuriya, N., Arao, T., and Ferrone, S. (1991). Differential expression of melanoma associated antigens in acral lentiginous melanoma and in nodular melanoma lesions. *Cancer Res* 51, 1726-1732.
- Kamb, A., Gruis, N.A., Weaver-Feldhaus, J., Liu, Q., Harshman, K., Tavitigian, S.V., Stockert, E., Day, R.S., 3rd, Johnson, B.E., and Skolnick, M.H. (1994). A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 264, 436-440.
- Kaufmann, R. (2000). Surgical management of primary melanoma. *Clinical and experimental dermatology* 25, 476-481.
- Kittler, H., Pehamberger, H., Wolff, K., and Binder, M. (2002). Diagnostic accuracy of dermoscopy. *Lancet Oncol* 3, 159-165.

- Klein, C.A., Schmidt-Kittler, O., Schardt, J.A., Pantel, K., Speicher, M.R., and Riethmuller, G. (1999). Comparative genomic hybridization, loss of heterozygosity, and DNA sequence analysis of single cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 4494-4499.
- Kozanoglu, I., Boga, C., Ozdogu, H., Sozer, O., Maytalman, E., Yazici, A.C., and Sahin, F.I. (2009). Human bone marrow mesenchymal cells express NG2: possible increase in discriminative ability of flow cytometry during mesenchymal stromal cell identification. *Cytotherapy* 11, 527-533.
- Kumar, R., Angelini, S., Snellman, E., and Hemminki, K. (2004). BRAF mutations are common somatic events in melanocytic nevi. *The Journal of investigative dermatology* 122, 342-348.
- Lawrence, W.D., Association of Directors of, A., and Surgical, P. (2001). ADASP recommendations for processing and reporting of lymph node specimens submitted for evaluation of metastatic disease. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 439, 601-603.
- Legg, J., Jensen, U.B., Broad, S., Leigh, I., and Watt, F.M. (2003). Role of melanoma chondroitin sulphate proteoglycan in patterning stem cells in human interfollicular epidermis. *Development* 130, 6049-6063.
- Leiter, U., Meier, F., Schitteck, B., and Garbe, C. (2004). The natural course of cutaneous melanoma. *Journal of surgical oncology* 86, 172-178.
- Liu, W., Kelly, J.W., Trivett, M., Murray, W.K., Dowling, J.P., Wolfe, R., Mason, G., Magee, J., Angel, C., Dobrovic, A., *et al.* (2007). Distinct clinical and pathological features are associated with the BRAF(T1799A(V600E)) mutation in primary melanoma. *The Journal of investigative dermatology* 127, 900-905.
- Lohmann, C.M., Iversen, K., Jungbluth, A.A., Berwick, M., and Busam, K.J. (2002). Expression of melanocyte differentiation antigens and ki-67 in nodal nevi and comparison of ki-67 expression with metastatic melanoma. *The American journal of surgical pathology* 26, 1351-1357.
- Long, G.V., Menzies, A.M., Nagrial, A.M., Haydu, L.E., Hamilton, A.L., Mann, G.J., Hughes, T.M., Thompson, J.F., Scolyer, R.A., and Kefford, R.F. (2011). Prognostic and clinicopathologic associations of oncogenic BRAF in metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 29, 1239-1246.
- Marrett, L.D., Nguyen, H.L., and Armstrong, B.K. (2001). Trends in the incidence of cutaneous malignant melanoma in New South Wales, 1983-1996. *Int J Cancer* 92, 457-462.
- McCarthy, S.W., Palmer, A.A., Bale, P.M., and Hirst, E. (1974). Naevus cells in lymph nodes. *Pathology* 6, 351-358.
- Meyer, T., Merkel, S., Goehl, J., and Hohenberger, W. (2000). Surgical therapy for distant metastases of malignant melanoma. *Cancer* 89, 1983-1991.
- Montagut, C., Sharma, S.V., Shioda, T., McDermott, U., Ullman, M., Ulkus, L.E., Dias-Santagata, D., Stubbs, H., Lee, D.Y., Singh, A., *et al.* (2008). Elevated CRAF as a potential mechanism of acquired resistance to BRAF inhibition in melanoma. *Cancer Res* 68, 4853-4861.
- Morgan, A.C., Jr., Galloway, D.R., and Reisfeld, R.A. (1981). Production and characterization of monoclonal antibody to a melanoma specific glycoprotein. *Hybridoma* 1, 27-36.
- Morton, D.L., Wanek, L., Nizze, J.A., Elashoff, R.M., and Wong, J.H. (1991). Improved long-term survival after lymphadenectomy of melanoma metastatic to regional nodes. Analysis of prognostic factors in 1134 patients from the John Wayne Cancer Clinic. *Annals of surgery* 214, 491-499; discussion 499-501.

- Morton, D.L., Wen, D.R., Wong, J.H., Economou, J.S., Cagle, L.A., Storm, F.K., Foshag, L.J., and Cochran, A.J. (1992). Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. *Archives of surgery* 127, 392-399.
- Murali, R., DeSilva, C., McCarthy, S.W., Thompson, J.F., and Scolyer, R.A. (2012). Sentinel lymph nodes containing very small (<0.1 mm) deposits of metastatic melanoma cannot be safely regarded as tumor-negative. *Ann Surg Oncol* 19, 1089-1099.
- Natali, P.G., Giacomini, P., Russo, C., Steinbach, G., Fenoglio, C., and Ferrone, S. (1983). Antigenic profile of human melanoma cells. Analysis with monoclonal antibodies to histocompatibility antigens and to melanoma-associated antigens. *Journal of cutaneous pathology* 10, 225-237.
- Neuhaus, S.J., Clark, M.A., and Thomas, J.M. (2004). Dr. Herbert Lumley Snow, MD, MRCS (1847-1930): the original champion of elective lymph node dissection in melanoma. *Ann Surg Oncol* 11, 875-878.
- Omholt, K., Platz, A., Kanter, L., Ringborg, U., and Hansson, J. (2003). NRAS and BRAF mutations arise early during melanoma pathogenesis and are preserved throughout tumor progression. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 9, 6483-6488.
- Pardal, R., Clarke, M.F., and Morrison, S.J. (2003). Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat Rev Cancer* 3, 895-902.
- Pollock, P.M., Harper, U.L., Hansen, K.S., Yudt, L.M., Stark, M., Robbins, C.M., Moses, T.Y., Hostetter, G., Wagner, U., Kakareka, J., *et al.* (2003). High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet* 33, 19-20.
- Poulidakos, P.I., Zhang, C., Bollag, G., Shokat, K.M., and Rosen, N. (2010). RAF inhibitors transactivate RAF dimers and ERK signalling in cells with wild-type BRAF. *Nature* 464, 427-430.
- Prieto, V.G., and Clark, S.H. (2002). Processing of sentinel lymph nodes for detection of metastatic melanoma. *Annals of diagnostic pathology* 6, 257-264.
- Quintana, E., Piskounova, E., Shackleton, M., Weinberg, D., Eskiocak, U., Fullen, D.R., Johnson, T.M., and Morrison, S.J. (2012). Human melanoma metastasis in NSG mice correlates with clinical outcome in patients. *Science translational medicine* 4, 159ra149.
- Quintana, E., Shackleton, M., Foster, H.R., Fullen, D.R., Sabel, M.S., Johnson, T.M., and Morrison, S.J. (2010). Phenotypic heterogeneity among tumorigenic melanoma cells from patients that is reversible and not hierarchically organized. *Cancer Cell* 18, 510-523.
- Quintana, E., Shackleton, M., Sabel, M.S., Fullen, D.R., Johnson, T.M., and Morrison, S.J. (2008). Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature* 456, 593-598.
- Ridolfi, R.L., Rosen, P.P., and Thaler, H. (1977). Nevus cell aggregates associated with lymph nodes: estimated frequency and clinical significance. *Cancer* 39, 164-171.
- Roesch, A., Becker, B., Meyer, S., Wild, P., Hafner, C., Landthaler, M., and Vogt, T. (2005). Retinoblastoma-binding protein 2-homolog 1: a retinoblastoma-binding protein downregulated in malignant melanomas. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 18, 1249-1257.
- Roesch, A., Fukunaga-Kalabis, M., Schmidt, E.C., Zabierowski, S.E., Brafford, P.A., Vultur, A., Basu, D., Gimotty, P., Vogt, T., and Herlyn, M. (2010). A temporarily distinct subpopulation of slow-cycling melanoma cells is required for continuous tumor growth. *Cell* 141, 583-594.

- Sakaizawa, K., Goto, Y., Kiniwa, Y., Uchiyama, A., Harada, K., Shimada, S., Saida, T., Ferrone, S., Takata, M., Uhara, H., *et al.* (2012). Mutation analysis of BRAF and KIT in circulating melanoma cells at the single cell level. *Br J Cancer* 106, 939-946.
- Schatton, T., Murphy, G.F., Frank, N.Y., Yamaura, K., Waaga-Gasser, A.M., Gasser, M., Zhan, Q., Jordan, S., Duncan, L.M., Weishaupt, C., *et al.* (2008). Identification of cells initiating human melanomas. *Nature* 451, 345-349.
- Scheri, R.P., Essner, R., Turner, R.R., Ye, X., and Morton, D.L. (2007). Isolated tumor cells in the sentinel node affect long-term prognosis of patients with melanoma. *Ann Surg Oncol* 14, 2861-2866.
- Schmidt-Kittler, O., Ragg, T., Daskalakis, A., Granzow, M., Ahr, A., Blankenstein, T.J., Kaufmann, M., Diebold, J., Arnholdt, H., Muller, P., *et al.* (2003). From latent disseminated cells to overt metastasis: genetic analysis of systemic breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 7737-7742.
- Schwab, J.H., Boland, P.J., Agaram, N.P., Socci, N.D., Guo, T., O'Toole, G.C., Wang, X., Ostroumov, E., Hunter, C.J., Block, J.A., *et al.* (2009). Chordoma and chondrosarcoma gene profile: implications for immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 58, 339-349.
- Shepherd, C., Puzanov, I., and Sosman, J.A. (2010). B-RAF inhibitors: an evolving role in the therapy of malignant melanoma. *Curr Oncol Rep* 12, 146-152.
- Shidham, V.B., Qi, D.Y., Acker, S., Kampalath, B., Chang, C.C., George, V., and Komorowski, R. (2001). Evaluation of micrometastases in sentinel lymph nodes of cutaneous melanoma: higher diagnostic accuracy with Melan-A and MART-1 compared with S-100 protein and HMB-45. *The American journal of surgical pathology* 25, 1039-1046.
- Shinozaki, M., Fujimoto, A., Morton, D.L., and Hoon, D.S. (2004). Incidence of BRAF oncogene mutation and clinical relevance for primary cutaneous melanomas. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 10, 1753-1757.
- Skelton, H.G., 3rd, Smith, K.J., Barrett, T.L., Lupton, G.P., and Graham, J.H. (1991). HMB-45 staining in benign and malignant melanocytic lesions. A reflection of cellular activation. *The American Journal of dermatopathology* 13, 543-550.
- Stang, A., Stang, K., Stegmaier, C., Hakulinen, T., and Jockel, K.H. (2001). Skin melanoma in Saarland: incidence, survival and mortality 1970-1996. *European journal of cancer prevention : the official journal of the European Cancer Prevention Organisation* 10, 407-415.
- Stoecklein, N.H., Erbersdobler, A., Schmidt-Kittler, O., Diebold, J., Schardt, J.A., Izbicki, J.R., and Klein, C.A. (2002). SCOMP is superior to degenerated oligonucleotide primed-polymerase chain reaction for global amplification of minute amounts of DNA from microdissected archival tissue samples. *Am J Pathol* 161, 43-51.
- Stoecklein, N.H., Hosch, S.B., Bezler, M., Stern, F., Hartmann, C.H., Vay, C., Siegmund, A., Scheunemann, P., Schurr, P., Knoefel, W.T., *et al.* (2008). Direct genetic analysis of single disseminated cancer cells for prediction of outcome and therapy selection in esophageal cancer. *Cancer Cell* 13, 441-453.
- Tarhini, A.A., Gogas, H., and Kirkwood, J.M. (2012). IFN-alpha in the treatment of melanoma. *Journal of immunology* 189, 3789-3793.
- Thomas, N.E., Edmiston, S.N., Alexander, A., Millikan, R.C., Groben, P.A., Hao, H., Tolbert, D., Berwick, M., Busam, K., Begg, C.B., *et al.* (2007). Number of nevi and early-life ambient UV exposure are associated with BRAF-mutant melanoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16, 991-997.

- Tordsson, J.M., Ohlsson, L.G., Abrahmsen, L.B., Karlstrom, P.J., Lando, P.A., and Brodin, T.N. (2000). Phage-selected primate antibodies fused to superantigens for immunotherapy of malignant melanoma. *Cancer Immunol Immunother* **48**, 691-702.
- Tucker, M.A., and Goldstein, A.M. (2003). Melanoma etiology: where are we? *Oncogene* **22**, 3042-3052.
- Ugurel, S., Thirumaran, R.K., Bloethner, S., Gast, A., Sucker, A., Mueller-Berghaus, J., Rittgen, W., Hemminki, K., Becker, J.C., Kumar, R., *et al.* (2007). B-RAF and N-RAS mutations are preserved during short time in vitro propagation and differentially impact prognosis. *PLoS One* **2**, e236.
- Ulmer, A., Fischer, J.R., Schanz, S., Sotlar, K., Breuninger, H., Dietz, K., Fierlbeck, G., and Klein, C.A. (2005). Detection of melanoma cells displaying multiple genomic changes in histopathologically negative sentinel lymph nodes. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **11**, 5425-5432.
- Ulmer, A., Schmidt-Kittler, O., Fischer, J., Ellwanger, U., Rassner, G., Riethmuller, G., Fierlbeck, G., and Klein, C.A. (2004). Immunomagnetic enrichment, genomic characterization, and prognostic impact of circulating melanoma cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **10**, 531-537.
- van Akkooi, A.C., de Wilt, J.H., Verhoef, C., Schmitz, P.I., van Geel, A.N., Eggermont, A.M., and Kliffen, M. (2006). Clinical relevance of melanoma micrometastases (<0.1 mm) in sentinel nodes: are these nodes to be considered negative? *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* **17**, 1578-1585.
- van Diest, P.J. (1999). Histopathological workup of sentinel lymph nodes: how much is enough? *Journal of clinical pathology* **52**, 871-873.
- Vogt, T., Kroiss, M., McClelland, M., Gruss, C., Becker, B., Bosserhoff, A.K., Rumpler, G., Bogenrieder, T., Landthaler, M., and Stolz, W. (1999). Deficiency of a novel retinoblastoma binding protein 2-homolog is a consistent feature of sporadic human melanoma skin cancer. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **79**, 1615-1627.
- Wagner, J.D., Gordon, M.S., Chuang, T.Y., Coleman, J.J., 3rd, Hayes, J.T., Jung, S.H., and Love, C. (2000). Predicting sentinel and residual lymph node basin disease after sentinel lymph node biopsy for melanoma. *Cancer* **89**, 453-462.
- Walts, A.E., Said, J.W., and Shintaku, I.P. (1988). Cytodiagnosis of malignant melanoma. Immunoperoxidase staining with HMB-45 antibody as an aid to diagnosis. *American journal of clinical pathology* **90**, 77-80.
- Wang, J.C., and Dick, J.E. (2005). Cancer stem cells: lessons from leukemia. *Trends Cell Biol* **15**, 494-501.
- Wang, R.F., Appella, E., Kawakami, Y., Kang, X., and Rosenberg, S.A. (1996). Identification of TRP-2 as a human tumor antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* **184**, 2207-2216.
- Wang, X., Osada, T., Wang, Y., Yu, L., Sakakura, K., Katayama, A., McCarthy, J.B., Brufsky, A., Chivukula, M., Khoury, T., *et al.* (2010a). CSPG4 protein as a new target for the antibody-based immunotherapy of triple-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst* **102**, 1496-1512.
- Wang, X., Wang, Y., Yu, L., Sakakura, K., Visus, C., Schwab, J.H., Ferrone, C.R., Favoino, E., Koya, Y., Campoli, M.R., *et al.* (2010b). CSPG4 in cancer: multiple roles. *Current molecular medicine* **10**, 419-429.

Weckermann, D., Polzer, B., Ragg, T., Blana, A., Schlimok, G., Arnholdt, H., Bertz, S., Harzmann, R., and Klein, C.A. (2009). Perioperative activation of disseminated tumor cells in bone marrow of patients with prostate cancer. *J Clin Oncol* 27, 1549-1556.

Weinstein, I.B., and Joe, A.K. (2006). Mechanisms of disease: Oncogene addiction--a rationale for molecular targeting in cancer therapy. *Nat Clin Pract Oncol* 3, 448-457.

Wolfel, T., Hauer, M., Schneider, J., Serrano, M., Wolfel, C., Klehmann-Hieb, E., De Plaen, E., Hankeln, T., Meyer zum Buschenfelde, K.H., and Beach, D. (1995). A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science* 269, 1281-1284.

Wood, T.F., DiFronzo, L.A., Rose, D.M., Haigh, P.I., Stern, S.L., Wanek, L., Essner, R., and Morton, D.L. (2001). Does complete resection of melanoma metastatic to solid intra-abdominal organs improve survival? *Ann Surg Oncol* 8, 658-662.

Yancovitz, M., Litterman, A., Yoon, J., Ng, E., Shapiro, R.L., Berman, R.S., Pavlick, A.C., Darvishian, F., Christos, P., Mazumdar, M., *et al.* (2012). Intra- and inter-tumor heterogeneity of BRAF(V600E) mutations in primary and metastatic melanoma. *PLoS One* 7, e29336.

Yu, L.L., Flotte, T.J., Tanabe, K.K., Gadd, M.A., Cosimi, A.B., Sober, A.J., Mihm, M.C., Jr., and Duncan, L.M. (1999). Detection of microscopic melanoma metastases in sentinel lymph nodes. *Cancer* 86, 617-627.

Garbe (2006). *Management des Melanoms, Diagnosestellung, Therapie, Nachsorge*. Springer Verlag.

7. Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet. Weitere Personen waren an der inhaltlich materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt.

Insbesondere habe ich dafür nicht die entgeltliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorliegenden Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

.....
(Ort, Datum)

.....
(Unterschrift)

8. Danksagung:

Ich danke allen, die mich bei dieser Arbeit unterstützt und zu ihrem Gelingen beigetragen haben:

- Prof. Dr. med Christoph Klein, der mir diese Arbeit an seinem Lehrstuhl ermöglicht und sie stets mit großem Interesse und Engagement begleitet und betreut hat
- Meinem Doktorvater Prof. Dr. Stefan Schneuwly für sein Entgegenkommen, meine Arbeit als Erstgutachter zu betreuen
- Der deutschen Krebshilfe für die Finanzierung und dem Melanomverbund unter der Leitung von Prof. Dr. Anja Bosserhoff, die stets ein offenes Ohr für meine Belange hatte
- Den klinischen Kooperationspartnern aus Dermatologie, Pathologie, dem Tumorzentrum Regensburg und Anja Ulmer für die gute Zusammenarbeit, sowie Dr. Melanie Werner-Klein und Veronika Naimer für die Kooperation bei den *in vivo* Studien und den Patientenproben
- Allen Patienten, die sich bereit erklärten an der DCC-Studie teilzunehmen
- Meinem Mentor Dr. med. Bernhard Polzer, der mir durch seine Unterstützung den Einstieg in meine Arbeit ermöglicht hat und durch seine ständige kollegiale Hilfe in allen Belangen eine wichtige Stütze war
- Manfred Meyer und Isabelle Blochberger für die ausgezeichnete methodische Einarbeitung, sowie die Hilfe bei Probenaufarbeitung und Computerproblemen
- Den TAs der Arbeitsgruppe, insbesondere Sandra, Irene und Katharina, für die gute Zusammenarbeit und Hilfe bei den Patientenproben und Sequenzierungen
- Meinen Kollegen Sophie, Lahiri, Gundula, Zbigniew, Inka, Martin und Moritz für die Computertipps, die SPSS Ratschläge, ihren fachlichen Rat und das Korrekturlesen
- Dem gesamten Lehrstuhl für ein stets angenehmes Arbeitsumfeld.

Danken möchte ich auch meinen Eltern für ihre Unterstützung während dieser Arbeit.

9. Anhang

9.1 Patientenkollektiv Regensburg

Pat. Nr.	Geschlecht	Alter	Melanomtyp	Lokal. PT	Ulzeration	Stadium	Clark level	Tumordicke	OP Datum	verstorben	Tumorbedingt	Lokalrezidiv	Metastasen	Lokal. LK	Patho LK	TCC MCSP	Phän MCSP	gp100 J/N	TCC gp100	Zellen Mio/LK	gescreent (Mio)
1	0	20	0	Arm	1	2B	3	2,5	10.09.2008					Axillär rechts	0	2	3			5	1,5
2	0	41	0		0	1B	3	1,2	08.10.2008					Leiste links	0	0		0	0	4,8	2
3	0	29	0		0	3	4	2,2	08.10.2008			J		Kniekehle links	3	8	3			2,1	2,1
4	0	42	1	US	0	1A	2	0,8	15.10.2008					Leiste links	0	0		1	1	6,2	2
5	0	19	0	Rücken	0	3A	4	3,6	17.10.2008					Leiste rechts	3	2	3			55	2
6	0	47	2	OS	0	1B	3	1,2	22.10.2008					Leiste rechts distal	0	1	3			38	2
8	1	59	2	OA	0	2A	4	2,6	29.10.2008					Axillär rechts	0	0				1,1	1,1
9	1	54	1	Rücken	0	1A	2	0,4	05.11.2008					Axillär links	0	0				0,1	0,1
10	0	58	2	Schulter	0	3	4	5	05.11.2008			J		Axillär links	3	8	3	1	120	90	1,2
11	0	53	0	OS	1	2C	4	6	12.11.2008					Oberschenkel	0	2	3	0	0	13,5	2
12	1	41	0	Kniekehle	1	2A	4	1,4	19.11.2008			J		Leiste rechts	0	0		0	0	5	2
13	1	48	1	Mons pubis	1	3B	4	4,1	26.11.2008	J	J		J	inguinal links	3	0		0	0	52	2
14	0	24	2	skapulär	0	1B	4	1,1	26.11.2008					axillär links	0	2	3	0	0	19	2
15	1	26	2	Rücken	1	3B	4	4,6	28.11.2008	J		J		axillär rechts	4	2	3	1	4	38	2
16	0	48	2	OS	0	2A	4	2,8	03.12.2008					Leiste rechts	0	0		0	0	4,4	2
17	0	35	1	OS	0	1B	4	1,3	03.12.2008					Leiste rechts oben		3	3	0	0	1,4	0
19	1	40	1	ferse	0	1B	3	1,4	10.12.2008					axillär rechts	0	0		0	0	8,5	2
20	0	64	1	US	0	1B	3	1,5	10.12.2008					Leiste	0	2	1	0	0	62	2
21	0	35	2	OS	1	2B	4	2,1	10.12.2008					Leiste links	0	2	3	0	0	11,5	2
22	1	60	1	Rücken	0	3	3	1,4	12.12.2008					Axilla links	0	0		1	2	13,5	2
23	1	56	2	Rücken	0	1B	4	2	12.12.2008					Axilla rechts	0	0		0	0	39	2
24	0	32	0	Rücken	0	1B		1,8	17.12.2008					Axilla rechts distal	0	1	3	1	3	14	2
25	1	73	2	Rücken	0	3A	4	1,3	17.12.2008					supraclaviculär re.	0	0		1	2	3	2
26	1	74		wade					09.01.2009					Leiste links	0	0		0	0	39	2
27	0	59	0	US	0	3B	4	4,5	09.01.2009	J	J		J	Leiste rechts	3	6	1	1	180	7,3	1
28	1	46	2	Flanke	0	1B	4	1,3	14.01.2009					Axilla links	0	0		0	0	27	2
29	1	49		Brust					11.02.2009					Axilla links distal	0	0		0	0	6,5	3
30	1	37	1	Rücken	0	1A	3	0,7	18.02.2009			J		Axilla links distal	0	7	3	1	1	46	1
31	1	35	2	OS	0	1B	4	1,3	25.02.2009	J	J	J	J	Leiste links	0	2	3	1	2	9	2
32	1	26	2	US	1	2C	4	11	11.03.2009					Leiste re. kaudal	0	3	3	1	1	425	2
33	0	40	0	US	0	3	4	1,6	13.03.2009					Leiste rechts	3	0		0	0	4,8	2
34	0	50	1	UA					08.04.2009					Axilla rechts	0	3	3	1	1	7,8	1,5
35	0	42	1	US	0	1A	3	0,8	06.05.2009					Leiste rechts	0	5	3	0	0	18	1
36	0	57	2	US	0	3B	4	5	06.05.2009			J		Leiste links	0	4	3	1	2	19	1,5
37	0	32	2	gluteal	1	3B	4	3,5	08.05.2009					sentinel kranial	3	8	1	1	224	26	1
38	0	34	1	UA	1	2B	4	2,2	13.05.2009					Axilla links	0	1	3	1	1	14	3
39	0	43	1	OS	0	1B	4	1,1	20.05.2009					Leiste links	0	0		0	0	8	3
40	0	72	2	Schulter	0	1B	4	1,9	27.05.2009					Axilla rechts	0	0		0	0	82	3
41	1	70	1	pectoral	0	3A	3	1	27.05.2009					Axilla rechts	4	145	1	1	400	51	1
42	1	21	0	US			4	3,2	29.05.2009					Leiste links	0	1	3	0	0	21	3
44	0	29	1	OS	0	1A	2	0,7	03.06.2009					Leiste links	0	2	3	0	0	35	2
45	1	71	1	gluteal	0	1B	4	1,6	05.06.2009					Leiste rechts	0	5	3	1	2	30	1,2
47	1	77	2	Rücken	0	3A	3	1,8	10.06.2009					Axilla rechts	3	39	1	1	2	24	2
48	0	56	1		0	1A	3	0,9	10.06.2009					Leiste rechts	0	2	3	1	1	13	2
49	1	44	1	Schulter	0	1A	3	1	19.06.2009					Axilla links	0	4	3	0	0	7,5	2

Anhang

Pat. Nr.	Geschlecht	Alter	Melanomtyp	Lokal. PT	Ulzeration	Stadium	Clark level	Tumordicke	OP Datum	verstorben	Tumorbedingt	Lokalrezidiv	Metastasen	Lokal. LK	Patho LK	TCC MCSP	Phän MCSP	gp100 J/N	TCC gp100	Zellen Mio/LK	gescreent (Mio)
50	0	32	2		0	1B	4	1,2	24.06.2009					Leiste links	0	0		0	0	23	2
51	1	62	1	Rücken	0	2A	3	2,1	24.06.2009					Leiste rechts	0	0		0	0	2,5	0,5
52	1	56	2	OS	0	1B	4	1,3	01.07.2009					Leiste rechts	0	10	3	1	9	12,5	1
53	1	69		Bauch					01.07.2009					Axilla rechts	0	12	1	1	7	25	1
54	0	53	1	Fuß	0		4	1,3	03.07.2009					Leiste links	0	0		0	0	10	2
55	1	67	1	scapulär	0	1B	4	1,1	08.07.2009					Axilla links	0	0				3	2
56	1	40	1	US	0	1B	3	1,4	08.07.2009					Leiste rechts	0	33	3	0	0	42	2
57	0	74	1	OA	0	1B	4	1,5	10.07.2009					Axilla links	0	3	3	0	0	22	2
58	1	62	1	Rücken	0	2A	4	2,8	22.07.2009					axillär links	0	10	3	1	14	31	1,7
59	0	54	1	OS	1	1B	4	0,8	22.07.2009					Leiste rechts	0	9	3	0	0	21	2
61	1	56	1	US	0	1B		1,4	29.07.2009					Leiste links	0	5	3	0	0	8,5	2
62	1	72	2	submamär	0	1A	3	0,5	05.08.2009					Axilla rechts	0	0				2	0,5
63	1	55	2	Rücken	1	2A	4	1,6	14.08.2009					Axilla links	0	47	3	0	0	17,5	1
64	0	52	2	OS	0	3A	3	2,3	19.08.2009					Leiste rechts	4	61	1	0	0	54,25	2
65	0	69	2	US	0	3	5	3	16.09.2009					Leiste links	3	1	3	1	106	6,9	2
66	1	54	0	OS	0	1B	4	1,3	18.09.2009					Leiste links	0	2	3	1	3	29,95	2
67	0	37	1	scapulär	0	1A	3	0,6	23.09.2009					Axilla links	n.A.	7	3	0	0	5,3	2
68	1	51	1	UA	0	1A	3	0,8	30.09.2009					Axilla rechts	0	0		0	0	26,25	2
69	0	23		Ellenbogen					02.10.2009					Axilla links	0	0		0	0	17,7	3
71	0	20	2	OS	0	3A	3	1,8	07.10.2009					Leiste rechts	3	203	1	1	213	10,9	2
72	1	39	0	OS			5	4	14.10.2009					Leiste rechts	3	45	1	1	4	2,9	1
73	0	63	0	ferse					14.10.2009					Leiste links	3	0		0	0	4,1	2
74	1	68	2	Rücken	1	3	4	5,4	21.10.2009					Axilla rechts	3	3	3			2,55	2
75	0	75							21.10.2009					Axilla rechts	0	0				3,02	2
76	1	64	1	Schulter	1	1B	4	1	23.10.2009					Axilla links	0	5	3	1	1	7,45	2
77	1	48	2	Außenknöchel	0	3A	4	2,6	28.10.2009				J	Leiste rechts	3	57	1	0	0	4,1	1
78	1	46	1	Abdomen	0	1A	2	0,5	28.10.2009					Axilla links	0	0		0	0	33	2
80	0	51	0	gluteal	1	2A	4	2	04.11.2009					Leiste rechts	0	2	3	0	0	4,1	2
81	0	53	2	Rücken	0	1A	3	0,8	11.11.2009					Axilla links	0	8	3	1	2	17,25	2
82	0	30	1	US	0	1A	3	0,5	18.11.2009					Leiste links	0	5	3	0	0	14	2
84	0	69		US					20.11.2009					Leiste links	0	5	3	1	2	14,75	2
85	0	68	2	Knöchel	1	2B	4	4	25.11.2009					Leiste rechts	0	0		0	0	38,25	2
86	1	70	1	Brust	0	1A	2	0,2	02.12.2009					Hals links	0	0		0	0	4,25	2
87	1	45	2	UA	1	2B	4	2,2	11.12.2009					Axilla rechts	0	4	3	1	2	10,8	2
88	1	69	2	Schulter	1	2B	4	2	16.12.2009					Axilla links	0	0				0,75	0,75
89	0	60	0	OS	1	3B	4	2,3	30.12.2009					Leiste links	3	3	3	1	2	19,25	2
90	0	40	1	OS	0	1B	3	1,3	08.01.2010					Leiste rechts	0	0		0	0	17,5	2
91	1	59	0	Schulter	0	1B	4	1,8	20.01.2010					Axilla rechts		0		1	1	0	0
92	0	62	2	US	0	2A	4	2,7	20.01.2010					Oberschenkel re.	0	0		0	0	4,4	2
93	0	75	0	Ellenbeuge	1	2B	4	2,4	27.01.2010					Axilla links	0	0				1,2	1,2
94	1	27	0	US	0	1B	3	1,1	03.02.2010					Unterschenkel links	0	14	3	1	2	16,1	2
95	0	50	0	OS	1	2B	4	2,2	05.02.2010					Leiste rechts	0	8	3	0	0	18	2
96	0	74	0	Fuß	0	2A	4	3,8	10.02.2010					Leiste links	0	3	3			2,5	2
97	0	33	6	OA	0	1B	4	1,1	17.02.2010					Axilla links	0	3	3	1	1	3,45	2
98	1	79	2	OA	0	2B		5	17.02.2010					Axilla links	0	4	3			2,6	2
99	1	69	0	Rücken	1	3B		3	19.02.2010					Axilla rechts	4	31	1	1	300000	23,5	1
100	0	67	1	US	0	1A	3	0,6	24.02.2010	J				Leiste links	4	51	1	1	180	87,5	2
101	1	62	0	OS	1	2C	5	10	24.02.2010				J	Leiste rechts	0	0		0	0	43	1
102	1	42	2	US	0	2A	4	2,2	26.02.2010					Leiste rechts	0	0		0	0	18,25	2
103	1	44	2	US	0	1B	4	1,8	26.02.2010					Leiste rechts	0	16	3			37,75	2
104	0	44	1	Rücken	0	2A	4	4,3	03.03.2010					Axilla links	0	23	3	1	5	15,5	1
105	0	66	3	Fußsohle	0	3A	4	5	03.03.2010					Leiste rechts	4	9	1			2,2	1

Pat. Nr.	Geschlecht	Alter	Melanomtyp	Lokal. PT	Ulzeration	Stadium	Clark level	Tumordicke	OP Datum	verstorben	Tumorbedingt	Lokalrezidiv	Metastasen	Lokal. LK	Patho LK	TCC MCSP	Phän MCSP	gp100 J/N	TCC gp100	Zellen Mio/LK	gescreent (Mio)
106	0	49	0	scapular	1	3C	3	5	05.03.2010					Axilla links	4	284	1			3,3	2
107	1	68	0	US	0	2B	4	4,9	10.03.2010					Leiste links	0	1	1	1	1	14,8	2
108	1	53	1	lumbal	1	3B	4	7	17.03.2010				J	Leiste links	4	400000	1	1	500000	8,25	2
109	1	69	0	US	1	2B	3	3	31.03.2010					Leiste rechts	0	1	3			6,5	3
110	0	15	2	US	0	3A	3	2,6	07.04.2010					Leiste rechts	3	4	1			18	2
111	0	44	0	UA	1	3B	5	12	07.04.2010					Axilla rechts	3	21	3			23	1
112	0	44	0	US	0	1B	4	1,3	16.04.2010					Leiste rechts	0	2	3			15	2
113	0	46	1	OS	0	1A	4	0,7	21.04.2010					inguinal links	0	0				1,25	1,25
114	1	56	1	OS	0	1A	3	0,7	23.04.2010					Leiste rechts	0	0		0	0	22	1,5
115	0	76	0	dorsal	1	2C	4	5	28.04.2010					links (axillär?)	0	1	3	0	0	9	2
116	0	42	0	OS	1	2C	4	10	05.05.2010					inguinal rechts	0	0				1,8	1,8
117	1	30	1	Rücken	0	1B	4	1,1	12.05.2010					Axilla links	0	0		0	0	122	1
118	0	45	0	OS	1	2A	4	1,5	12.05.2010					Leiste links	0	0		0	0	2,5	1
119	1	70	0	Rücken	0	1B	4	1,3	26.05.2010					axillär links		0				0,23	0
120	1	76	3	Finger	1	2A	3	1,9	28.05.2010					Axilla links oberfl.	0	2	3			2,5	2
121	1	75	2	Flanke	1	2C	5	6	09.06.2010					axillär rechts	0	1	3			2,84	2
122	1	74	3	Fußsohle	1	3B	4	2,5	23.06.2010					Leiste rechts	4	1	1	0	0	8	2
123	1	58	0	US	1	2A	4	1,7	30.06.2010					Leiste links	0	3	3			6,6	2
124	1	43	0	OS	1	3B	4	4,3	30.06.2010	J		J		rechts ? Leiste?	4	1700	1	1	5000	11,5	1
125	1	75	1	Flanke	0	3A	4	2,3	02.07.2010	J	J	J			4	34	1	1	706		2
126	1	51	0	Abdomen	1	2B	4	3	07.07.2010					Axilla rechts	0	46	3	1	1	35	1
127	0	53	2	dorsal	0	1b	3	1,4	14.07.2010					Leiste rechts	0	0				2	0,5
128	1	72	0	OA	0	3C		2,9	30.07.2010			J		Axilla rechts	4	4	1	1	34	10,2	1,5
129	0	79	0	OA	1	1B	3	1	18.08.2010					Axilla links	0	0				10	2
130	1	56	3	Fußsohle	0	3A	4	2	20.08.2010					Leiste medial	3	0		0	0	8,25	1
131	1	37	0	Rücken	0	1B	4	1,2	06.10.2010					Axilla links	0	12	3			3	1
132	1	68	2	Fußrücken	1	3B	3	1,5	13.10.2010					re Leiste; re unten	2	17	1	0	0	3	1
133	0	20	2	OS	0	1B	4	1,8	15.10.2010					Leiste li	0	1	1	0	0	14	1
134	0	55	0	Flanke	0	1A		1	10.11.2010					Leiste links	0	0		1	1	10	2
135	0	24	1	sacral	0	3B	4	7	19.11.2010					Leiste rechts	4	120	1	1	174	44	1
136	0	67	2	OA	1	2A		2	24.11.2010					Axilla links	0	12	1	0	0	22,5	1
138	1	68	0	Rücken	1	2B		2,8	01.12.2010	J		J			0	10	3			6	1
139	1	72	1	Rücken	1	2B			08.12.2010					Axilla rechts	0	3	3	0	0	23	1
140	0	54	1	Rücken	0	1A	3	1	15.12.2010					Axilla links	0	4	3	0	0	62	1,5
141	0	57	2	UA	0	III		2,8	17.12.2010					Axilla links	4	60	1	1	105	12,3	1
142	1	67	1	Rücken	0	1B	4	1,7	22.12.2010					Axilla links	0	0				19	1
143	0	71	1	US	0	1B	4	1,6	12.01.2011					Leiste rechts	0	0				2,75	1
144	1	47	1	Rücken	0	1B	3	1,2	12.01.2011					Axilla links	0	0				7,7	1
145	1	69	2	Rücken	0	1B		1,8	14.01.2011					Schulter rechts	0	0				5	1
146	1	63	0	OA	0	1B	2	1,5	02.02.2011					Axilla rechts	0	0				0,9	0,3
147	1	59	2	Nacken	0	2A		2,5	02.02.2011					Nacken rechts	0	0				1	0,5
148	1	75	4	Flanke	0	2A	4	3,7	04.02.2011					axillär links oberfl.	1	1	3			1,2	0,2
149	0	66	2	Rücken	0	2A	5	3,5	11.02.2011					axillär links	0	0				84	1
150	1	72	3	Zehe	0	1B	4	1,6	11.02.2011					Leiste links	0	0				8	1
151	0	31	0	Flanke	0	1B	4	1,7	16.02.2011					axillär links	0	14	3	0	0	13,8	1
152	0	48	1	OS	1	1B	3	0,4	16.02.2011					Leiste rechts	0	37	3			12,5	1
153	0	51	0	OA	0	1B	4	1,4	23.02.2011					Axilla links	0	10	3			4,5	1
154	0	57	2	Rücken	1	3C	4	5	23.02.2011					Axilla rechts	4	3000	1	1	5000	58	1
155	0	69	0	Fußsohle	1	3C	4	2,6	04.03.2011					Leiste links	4	250000	1	1	10000	65	1
156	1	58	0	schulter	1	2C		4,1	23.03.2011					Schulter rechts	0	2	3			133	1
157	0	44	0	Flanke	1	2B	4	2,5	23.03.2011					Axilla links	0	30	3	0	0	9,9	1
158	1	67	0	US	0	2A	4	2,5	06.04.2011					Leiste rechts	0	0				6,1	1

Anhang

Pat. Nr.	Geschlecht	Alter	Melanomtyp	Lokal. PT	Ulzeration	Stadium	Clark level	Tumordicke	OP Datum	verstorben	Tumorbedingt	Lokalrezidiv	Metastasen	Lokal. LK	Patho LK	TCC MCSP	Phän MCSP	gp100 J/N	TCC gp100	Zellen Mio/LK	gescreent (Mio)
159	0	54	1	lumbal	0	1A	3	0,5	08.04.2011					Leiste links		0	3			1,9	0
160	0	47	2	OA	1	2B	4	2	15.04.2011					axillär links	0	10	3			10,5	1
161	1	77	3	ferse	0	1A	2	1	20.04.2011					Leiste rechts	0	15	3	0	0	27,5	1
162	1	37	1	Rücken	0	3A	4	2	20.04.2011					Schulter links	1	50	1			13,5	1
163	1	53	2	OS	0	2B	5	13	04.05.2011					Leiste rechts	0	0				0,87	0,25
164	1	27	0	Rücken	0	1B		1,8	04.05.2011					axillär rechts	0	2	3	0	0	6,2	1
165	1	75	1	Rücken		1A	2	0,3	06.05.2011					Axilla rechts	0	5	3	1	1	16,75	1
166	0	23	0	Ellenbeuge					25.05.2011					Axilla links	0	11	3			2,9	1
168	1	52	1	Abdomen	1	4	4	3,5	15.06.2011	J	J			Axilla rechts	4	350000	1	1	10000	17,1	1
169	0	71	0	UA	0	1B	3	1,1	22.06.2011					Axilla rechts	0	0				5	2
170	0	37	0	Flanke	0	1A	3	0,4	29.06.2011					Axilla rechts	0	5	3	0	0	9,7	1
171	1	76	3	Hand		1B	3	1	29.06.2011					Axilla rechts	0	0		0	0	13,7	1
172	0	48	0	OA		III	4	1,4	01.07.2011					Axilla links	4	112	1	1	1000	23,7	1
173	1	42	2	Sternum		1B	4	1,2	21.09.2011					axillär rechts	0	10	3	1	1	11,2	1
174	0	50	2	Ellenbogen		2B		3,4	23.09.2011					Axilla links	0	0		0	0	44	1
175	1	15	1	schulter		1B	4	1,5	14.10.2011					Axilla rechts	0	4	3	0	0	26,5	1
176	0	47		Brust					19.10.2011					axillär links	0	1	3	0	0	8,2	1
177	0	48	1	Schulter		1B	4	1,1	26.10.2011					Axilla links	0	4	3	0	0	7,4	0,5
179	1	48	0	Abdomen		1B		1,1	30.11.2011					Axilla links	0	8	3	0	0	41,6	1
180	1	59	3	ferse	1	2C	5	4,8	07.12.2011					Leiste rechts	0	0		0	0	29	0,5
181	1	77	0	Rücken		1B		1,5	14.12.2011					Axilla links	0	6	3	1	1	63	1
182	1	45	2	Rücken		1B	3	1,1	14.12.2011					Axilla rechts	0	2	3	0	0	24	1
183	1	63	1	Flanke		1B	4	1,3	16.12.2011					axillär links proximal	0	7	3	0	0	9,3	1
184	0	55	2	plantar		3A		5	01.02.2012					Leiste links	3	50	1	1	2	8,2	0,1
185	1	76	1	Rücken		1A	3	0,9	01.02.2012					Leiste rechts cranial	0	20	3	0	0	7,3	0,1
186	0	68	0	UA	1			1,3	03.02.2012					Axilla links	0	4	3	0	0	18,9	1
187	0	45	2	OS		1B		1	10.02.2012					Leiste links	0	16	3			9,24	1
188	1	66	0	UA		1B		2	15.02.2012					Axilla rechts	0	4	3	0	0	14,2	1
189	1	42	1	schulter		1B	4	1,6	15.02.2012					Axilla rechts	0	7	3	0	0	5,2	1
190	0	45	1	Rücken		3B	4	2,8	22.02.2012					Axilla rechts	4	15	1	1	173	9,9	1
191	1	68	0	Rücken		3C		7,5	22.02.2012					Axilla links	4	75	1	1	1	16,2	1
192	1	57	2	Flanke		3B		4,5	24.02.2012					Axilla rechts	0	15	3	0	0	10,4	1
193	1	78	1	OA		2A	4	1,8	07.03.2012					Axilla rechts	2	2	3	0	0	11,5	1
194	1	51	2	Abdomen		2B	4	4	21.03.2012					Axilla rechts	0	4	3	0	0	54,7	1
195	1	71	1	Bauch		1B		1,1	30.03.2012					Axilla rechts	0	3	3	0	0	9,8	1
196	1	75	2	Brust		3A	4	6,2	04.04.2012					axillär links 1	4	2	3	0	0	70	1
197	1	42	3	Daumen		2		4	27.04.2012					Axilla rechts	0	2	3	0	0	9,2	1
198	0	58	0	OS		1B	4	1,5	09.05.2012					inguinal rechts	0	0		0	0	10	1
199	0	65	2	OA			3		23.05.2012					Axilla rechts	0	0		0	0	4,9	0,25
200	1	47	0	Rücken				3,8	06.06.2012					axillär links	0	1	3	1	1	27,4	1

Legende

	Symbol	Bedeutung
Geschlecht	0	weiblich
	1	männlich
Melanomtyp	0	k. Angabe
	1	SSM
	2	NM
	3	ALM
	>4	sonstige
Ulzeration	0	Nein
	1	ja
Patho(LK)	0	negativ
	1	Nävuszellen
	2	Tumorzellen
	3	Mikrometastase
	4	Makrometastase
gp100 J/N	0	negativ
	1	positiv

9.2 MCSP+ Zellen aus dem Regensburger Kollektiv

Zell - ID	EF1a	β -Aktin	GapDH	Ex 8/9	CK 19	Ex 2/3	D5S217	KRAS	BCRTT	HMB45	MelanA	S100	MCSP	TRP2	ABCB5	Nestin	Jarid1B	TRP2	CGH ab/bal	BRAF	NRAS
LK 001 - Z3																					
LK 003AB Z2																					
LK 003AB Z3																					
LK 005 - Z1																					
Lk 005 - Z2																					
LK 005 - Z3																					
LK 005 - Z4																					
LK 006AB Z1																					
LK 006AB Z2																					
LK 010 - Z1																					
LK 010 - Z2																					
LK 010 - Z4																					
LK 011 - Z2																					
LK 014 - Z1																					
LK 014 - Z2																					
LK 015 - Z1																					
LK 015 - Z2																					
LK 015 - Z3																					
LK 015 - Z4																					
LK 017B Z3																					
LK 017B Z4																					
LK 020 - Z1																					
LK 020 - Z2																					
LK 021 - Z1																					
LK 021 - Z2																					
LK 024A Z1																					
LK 027 - Z1																					
LK 027 - Z3																					
LK 027 - Z5																					
LK 027 - Z6																					
LK 030A Z1																					
LK 030A Z2																					
LK 030A Z3																					
LK 030B Z1																					
LK 030B Z2																					
LK 030B Z4																					
LK 031 - Z1																					
LK 031 - Z3																					
LK 032A Z1																					
LK 032A Z3																					
LK 032B Z2																					
LK 032B Z3																					
LK 034 - Z1																					
LK 035 - Z3																					
LK 035 - Z4																					
LK 036A Z2																					
LK 036A Z4																					
LK 036B Z1																					

Zell - ID	EF1a	β -Aktin	GapDH	Ex 8/9	CK 19	Ex 2/3	D5S2117	KRAS	BCRTT	HMB45	MelanA	S100	MCSP	TRP2	ABC5	Nestin	Jarid1B	TRP2	CGH ab/bal	BRAF	NRAS
LK 036B Z2																					
LK 037A Z1																					
LK 037A Z2																					
LK 037A Z4																					
LK 037A Z5																					
LK 037A Z6																					
LK 038 - Z1																					
LK 038 - Z2																					
LK 038 - Z3																					
LK 041 - Z1																					
LK 041 - Z2																					
LK 041 - Z4																					
LK 041 - Z5																					
LK 041 - Z7																					
LK 042 - Z2																					
LK 042 - Z3																					
LK 044A Z1																					
LK 044A Z2																					
LK 044A Z3																					
LK 045 - Z1																					
LK 045 - Z2																					
LK 045 - Z5																					
LK 045 - Z6																					
LK 047 - Z1																					
LK 047 - Z2																					
LK 047 - Z3																					
LK 047 - Z4																					
LK 047 - Z5																					
LK 047 - Z6																					
LK 047 - Z8																					
LK 047 - Z9																					
LK 048 - Z1																					
LK 048 - Z3																					
LK 049 - Z1																					
LK 049 - Z3																					
LK 049 - Z5																					
LK 049 - Z6																					
LK 052 - Z2																					
LK 052 - Z3																					
LK 052 - Z5																					
LK 052 - Z6																					
LK 053A Z2																					
LK 053A Z3																					
LK 053A Z4																					
LK 053A Z6																					
LK 053B Z1																					
LK 053B Z2																					
LK 053B Z3																					
LK 056 - Z1																					
LK 056 - Z5																					
LK 056 - Z6																					
LK 056 - Z7																					
LK 057 - Z1																					
LK 057 - Z2																					

Zell - ID	EF1a	β -Aktin	GapDH	Ex 8/9	CK 19	Ex 2/3	D5S2117	KRAS	BCRTT	HMB45	MelanA	S100	MCSP	TRP2	ABCB5	Nestin	Jarid1B	TRP2	CGH ab/bal	BRAF	NRAS
LK 058 - Z2																					
LK 058 - Z4																					
LK 059 - Z2																					
LK 059 - Z3																					
LK 059 - Z4																					
LK 059 - Z5																					
LK 059 - Z6																					
LK 061 - Z4																					
LK 063A - Z1																					
LK 063A - Z3																					
LK 063A - Z4																					
LK 063B - Z1																					
LK 063B - Z2																					
LK 063B - Z4																					
LK 064 - Z1																					
LK 064 - Z2																					
LK 064 - Z4																					
LK 064 - Z7																					
LK 064 - Z8																					
LK 066 - Z3																					
LK 067 - Z3																					
LK 067 - Z4																					
LK 071 - Z1																					
LK 071 - Z3																					
LK 071 - Z7																					
LK 071 - Z8																					
LK 072 - Z1																					
LK 072 - Z2																					
LK 072 - Z3																					
LK 072 - Z4																					
LK 072 - Z5																					
LK 076 - Z1																					
LK 076 - Z5																					
LK 077 - Z3																					
LK 077 - Z4																					
LK 077 - Z5																					
LK 077 - Z6																					
LK 077 - Z7																					
LK 077 - Z8																					
LK 080 - Z1																					
LK 080 - Z2																					
LK 080 - Z3																					
LK 080 - Z4																					
LK 081 - Z1																					
LK 081 - Z2																					
LK 081 - Z3																					
LK 081 - Z4																					
LK 081 - Z5																					
LK 082 - Z1																					
LK 082 - Z4																					
LK 084 - Z1																					
LK 084 - Z2																					
LK 084 - Z4																					
LK 084 - Z5																					

Zell - ID	EF1a	β -Aktin	GapDH	Ex 8/9	CK 19	Ex 2/3	D5S217	KRAS	BCRTT	HMB45	MelanA	S100	MCSP	TRP2	ABC5	Nestin	Jarid1B	TRP2	CGH ab/bal	BRAF	NRAS
LK 087 - Z4																					
LK 087 - Z5																					
LK 089 - Z1																					
LK 089 - Z3																					
LK 089 - Z4																					
LK 094 - Z4																					
LK 094 - Z5																					
LK 094 - Z7																					
LK 094 - Z8																					
LK 095 - Z4																					
LK 096 - Z2																					
LK 096 - Z3																					
LK 096 - Z5																					
LK 097B - Z3																					
LK 097B - Z4																					
LK 098A - Z1																					
LK 098A - Z2																					
LK 098A - Z3																					
LK 098A - Z4																					
LK 098A - Z5																					
LK 099A - Z1																					
LK 099A - Z2																					
LK 099A - Z4																					
LK 099A - Z5																					
LK 099A - Z6																					
LK 099B - Z1																					
LK 099B - Z2																					
LK 099B - Z3																					
LK 099B - Z4																					
LK 099B - Z5																					
LK 099B - Z6																					
LK 099B - Z7																					
LK 099B - Z9																					
LK 099C - Z1																					
LK 099C - Z2																					
LK 099C - Z3																					
LK 099C - Z4																					
LK 099C - Z5																					
LK 100 - Z1																					
LK 100 - Z2																					
LK 100 - Z3																					
LK 100 - Z4																					
LK 100 - Z5																					
LK 100 - Z6																					
LK 103 - Z2																					
LK 103 - Z3																					
LK 103 - Z4																					
LK 103 - Z5																					
LK 104 - Z2																					
LK 104 - Z4																					
LK 104 - Z5																					
LK 105 - Z1																					
LK 105 - Z2																					
LK 105 - Z4																					

Zell - ID	EF1a	β -Aktin	GapDH	Ex 8/9	CK 19	Ex 2/3	D5S217	KRAS	BCRTT	HMB45	MelanA	S100	MCSP	TRP2	ABCB5	Nestin	Jarid1B	TRP2	CGH ab/bal	BRAF	NRAS
LK 105 - Z5																					
LK 106 A Z1																					
LK 106 A Z2																					
LK 106 A Z3																					
LK 106 A Z4																					
LK 106 A Z5																					
LK 106 B Z1																					
LK 106 B Z2																					
LK 106 B Z3																					
LK 106 B Z5																					
LK 107 Z2																					
LK 108 Z1																					
LK 108 Z3																					
LK 108 Z4																					
LK 108 Z6																					
LK 108 Z7																					
LK 109 Z1																					
LK 109 Z2																					
LK 109 Z3																					
LK 110 Z1																					
LK 110 Z3																					
LK 110 Z4																					
LK 111 Z2																					
LK 111 Z5																					
LK 112 Z3																					
LK 115 Z1																					
LK 120A Z2																					
LK 120A Z3																					
LK 120A Z4																					
LK 120B Z1																					
LK 122 Z1																					
LK 123 Z3																					
LK 124 Z3																					
LK 124 Z4																					
LK 124 Z5																					
LK 124 Z6																					
LK 124 Z7																					
LK 124 Z8																					
LK 124 Z9																					
LK 125 Z1																					
LK 125 Z3																					
LK 125 Z5																					
LK 125 Z6																					
LK 125 Z7																					
LK 128 Z1																					
LK 128 Z2																					
LK 128 Z3																					
LK 128 Z4																					
LK 128 Z5																					
LK 131 Z1																					
LK 131 Z2																					
LK 131 Z3																					
LK 131 Z5																					
LK 131 Z6																					

Zell - ID	EF1a	β -Aktin	GapDH	Ex 8/9	CK 19	Ex 2/3	D5S217	KRAS	BCRTT	HMB45	MelanA	S100	MCSP	TRP2	ABC5	Nestin	Jarid1B	TRP2	CGH ab/bal	BRAF	NRAS
LK 132A Z1																					
LK 132A Z2																					
LK 132A Z4																					
LK 132B Z1																					
LK 132B Z2																					
LK 132B Z3																					
LK 132B Z4																					
LK 135A-Z2																					
LK 135A-Z3																					
LK 135A-Z4																					
LK 135A-Z5																					
LK 135B-Z1																					
LK 135B-Z2																					
LK 135B-Z3																					
LK 135B-Z4																					
LK 136A-Z2																					
LK 136A-Z3																					
LK 138-Z4																					
LK 138-Z5																					
LK 138A-Z1																					
LK 138A-Z2																					
LK 138A-Z3																					
LK 139-Z1																					
LK 139-Z2																					
LK 140-Z1																					
LK 141-Z1																					
LK 141-Z2																					
LK 141-Z3																					
LK 141-Z5																					
LK 141-Z6																					
LK 141-Z7																					
LK 151-Z3																					
LK 151-Z4																					
LK 151-Z5																					
LK 152-Z1																					
LK 152-Z2																					
LK 152-Z3																					
LK 152-Z4																					
LK 152-Z5																					
LK 153-Z1																					
LK 153-Z2																					
LK 153-Z4																					
LK 154-Z1																					
LK 154-Z3																					
LK 154-Z4																					
LK 154-Z5																					
LK 154-Z6																					
LK 154-Z7																					
LK 154-Z8																					
LK 154-Z9																					
LK 155-Z1																					
LK 155-Z2																					
LK 155-Z3																					
LK 155-Z6																					

Zell - ID	EF1a	β -Aktin	GapDH	Ex 8/9	CK 19	Ex 2/3	D5S2117	KRAS	BCRTT	HMB45	MelanA	S100	MCSP	TRP2	ABC B5	Nestin	Jarid1B	TRP2	CGH ab/bal	BRAF	NRAS
LK 156-Z1																					
LK 156-Z2																					
LK 157-Z1																					
LK 157-Z2																					
LK 157-Z3																					
LK 157-Z4																					
LK 159B-Z1																					
LK 160-Z1																					
LK 160-Z2																					
LK 160-Z3																					
LK 160-Z4 (2)																					
LK 161-Z1																					
LK 161-Z2																					
LK 161-Z3																					
LK 161-Z4																					
LK 161-Z5																					
LK 162A-Z1																					
LK 162A-Z2																					
LK 162A-Z3																					
LK 162C-Z1																					
LK 162C-Z2																					
LK 162C-Z3																					
LK 162C-Z4																					
LK 164-Z2																					
LK 164A-Z1																					
LK 165-Z1																					
LK 165-Z2																					
LK 165-Z3																					
LK 166A-Z1																					
LK 166A-Z2																					
LK 166A-Z3																					
LK 168A-Z1																					
LK 168A-Z3																					
LK 168A-Z4																					
LK 168A-Z5																					
LK 168A-Z6																					
LK 168A-Z7																					
LK 168B-Z1																					
LK 168B-Z2																					
LK 170A-Z1																					
LK 170A-Z2																					
LK 170A-Z3																					
LK 170A-Z4																					
LK 172-Z3																					
LK 172-Z4																					
LK 172-Z5																					
LK 173- Z1																					
LK 173- Z2																					
LK 173- Z3																					
LK 175-Z1																					
LK 177-Z1																					
LK 177-Z2																					
LK 179-Z1																					
LK 179-Z2																					

Zell - ID	EF1a	β -Aktin	GapDH	Ex 8/9	CK 19	Ex 2/3	D5S217	KRAS	BCRTT	HMB45	MelanA	S100	MCSP	TRP2	ABCB5	Nestin	Jarid1B	TRP2	CGH ab/bal	BRAF	NRAS
LK 181-Z1																					
LK 181-Z2																					
LK 181-Z4																					
LK 182-Z1																					
LK 183-Z2																					
LK 183-Z3																					
LK 185-Z1																					
LK 186-Z1																					
LK 186-Z2																					
LK 187-Z2																					
LK 189-Z1																					
LK 190A-Z1																					
LK 190A-Z3																					
LK 190A-Z4																					
LK 190A-Z5																					
LK 191-Z1																					
LK 191-Z2																					
LK 191-Z3																					
LK 192A-Z2																					
LK 194A-Z1																					
LK 194B-Z1																					
LK 195-Z2																					

9.3 Gesamtübersicht Mutationsanalysen

Gesamtübersicht der Mutationsanalysen für *BRAF* und *NRAS* an den MCSP+ und gp100+ Zellen des Regensburger Kollektivs

Pat	BRAF		NRAS	
	MCSP	HMB	MCSP	HMB
1	1		1	
6	2		2	
10	3	4	2	3
15	3		3	
17	1		1	
21	1		1	
24		1		1
025B		1		1
27	2		2	
030A	3	1	3	1
030B	3		3	
032A	1		1	
032B	1		1	
034A		1		1
036A	2		2	1
036B	1		1	
037A	3	3	3	2
037B		2		2
41	3	5	4	5
42	1		1	
45	3	2	2	2
47	2		2	
48	1	1	1	1
52	1	5	1	5
053A		3		3
053B	2	3	2	3
56	2		1	
57	1			
66		1		1
77	3		3	
80	2		1	
81	2	1	2	1
108	4	5	4	4
097B	1	2	1	1
124	6	5	7	5
125	2	5	2	5
128	3	5	4	4
135A	4	4	4	4
135B	4	3	4	3
138	3		3	
141	2	5	2	5
154	1		1	
155	2	5	1	5
165	1	1	1	1
168A	3	5	2	5
168B	1	1	1	1

N= 87 80 83 76 N(gesamt) = 326

Die Zahlen in den Kästchen stehen für die Anzahl an untersuchten Zellen. Rot = mut, grün = wt, orange = gemischt (je Zellen mut und wt)

9.4 Klinische Daten der Patienten aus Tübingen

Klinische Daten zu den Tübinger Patienten (N035) deren gp100+ DCC zum Vergleich in die CGH Auswertungen mit eingeschlossen wurden.

	Anzahl Patienten	Prozent (%)	Median	Bereich
Geschlecht				
weiblich	12	34,3		
männlich	23	65,7		
Alter (Jahren)			67	25 - 86
Tumordicke nach Breslow (mm)			2,15	1 - 10
Ulzeration				
nein	19	54,2		
ja	15	42,9		
keine Angabe	1	2,8		
Lokalisation				
Extremitäten	19	54,3		
Kopf und Rumpf	16	45,7		
Lymphknotenstatus (Histopathologie)				
Negativ	24	68,6		
Positiv	11	31,4		
DCCD			24	1 - 800000
Klinisches Stadium				
IA	0	0		
IB	13	37,1		
IIA	4	11,4		
IIB	4	11,4		
IIC	2	5,7		
IIIA	3	8,6		
IIIB	6	17,2		
IIIC	3	8,6		

9.5 Einteilung der definierten Chromosomenregionen für die CGH-Analyse

Einteilung der Regionen für die drei Kollektive (MCSP/gp100/gp100 Tübingen)

Chromosom	p-Arm	q-Arm
1	1p 36.3 p34.1 1p 33 p 21 1p 13 p 11	1q 11 q23 1 q24 q44
2	2 p25 p23 2 p22 p11.1	2 q11.1 q13 2q 14.1 q32.3 2 q33 q37
3	3 p26 p14 3 p13 p11.1	3 q11.1 q21 3 q22 q29
4	4 p16 p11	4 q11 q28 4 q31.1 q35
5	5 p15.3 p15.1 5 p14 p11	5 q11.1 q31 5 q32 q35
6	6 p25 p21.1 6 p12 p 11.1	6 q11.1 q21 6 q22 q27
7	7 p22 p15 7 p14 p11.1	7 q11.1 q11.2 7 q21 q36
8	8 p23 p22 8 p21 p11.1	8 q11.1 q22 8 q23 q 24.3
9	9 p24 p21 9 p13 p11.1	9 q11.1 q13 9 q21 q33 9 q34
10	10 p15 p11.1	10 q11.1 q22 10 q23 q26
11	11 p15 p11.2 11p11.1	11 q11 q13 11 q14q23 11 q24 q25
12	12 p13 p11.1	12 q11 q13 12 q14 q24.2 12 q24.3
13	13 p13 p11.1	13 q11 q22 13 q31 q34
14	14 p13 p11.1	14 q11.1 q31 14 q32
15	15 p13 p11.1	15 q11.1 q22 15 q23 q26
16	16 p13.3 p12 16 p11.2 p11.1	16 q11.1 q11.2 16 q12.1 q23 16 q24
17	17 p13 p11.1	17 q11.1 q21 17 q22 q24

		17 q25
18	18 p11.3 p11.1	18 q11.1 q12 18 q21 q23
19	19 p13.3 p11	19 q11 q13.1 19 q13.2 q13.4
20	20 p13 p12 20 p11.2 p11.1	20 q11.1 q13.3
21	21 p13 p11.1	21 q11.1 q21 21 q22
22	22 p13 p11.1	22 q11.1 q12 22 q13
X	X p22.3 p11.1	X q11 q24 X q25 q28
Y	Y p11.3 p11.1	Y q11.1 q 11.2 Y q12

9.6 CGH-Profile der untersuchten DCC

Dargestellt sind im Folgenden die CGH Profile von allen Zellen, die im Rahmen dieser Arbeit selbst aufgearbeitet und untersucht wurden. Es handelt sich um:

45 Profile MCSP+ Zellen (26 Patienten)

33 Profile gp100+ Zellen (20 Patienten)

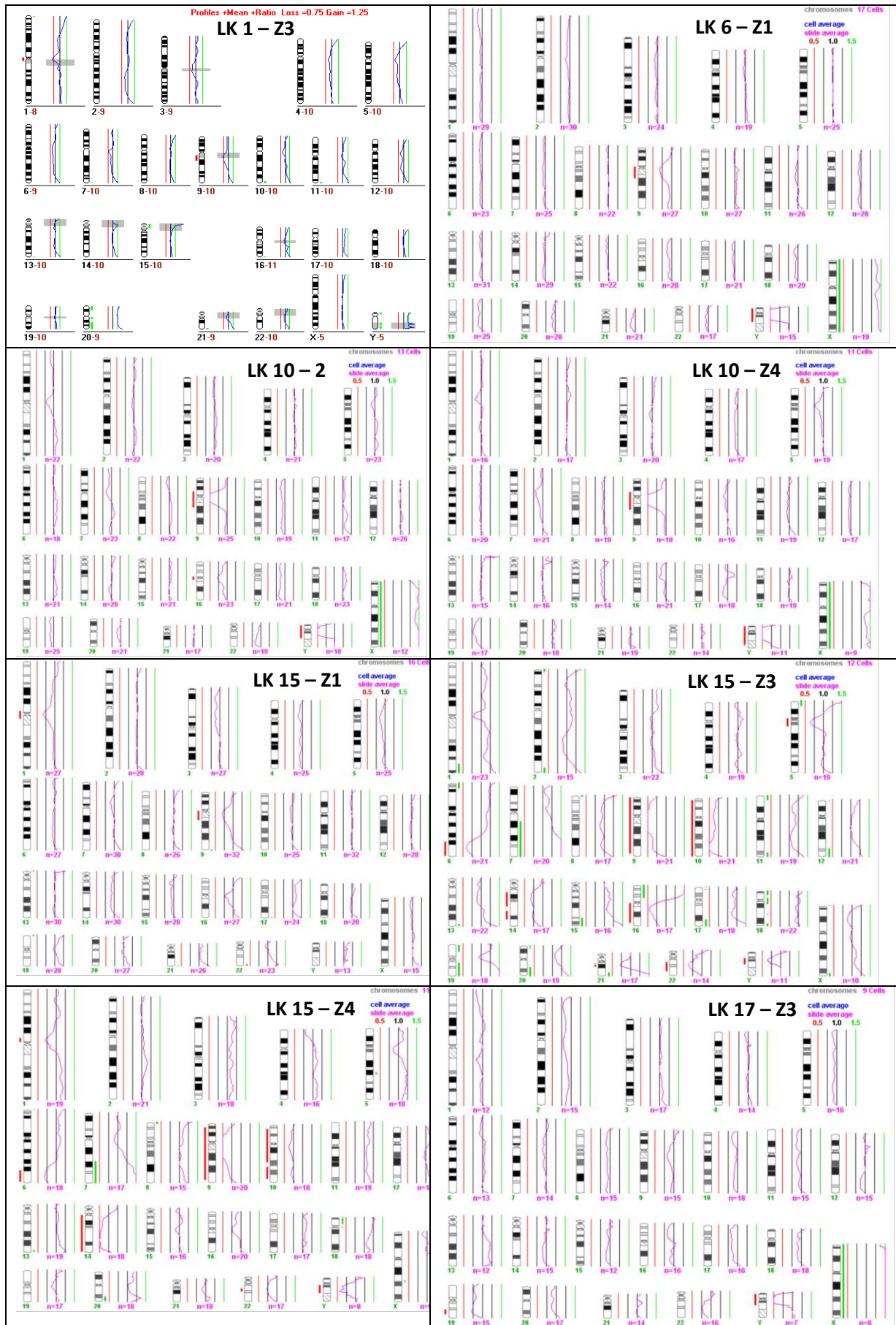
2 Profile MCSP+ Zellen humanen Ursprungs aus propagierten Maustumor

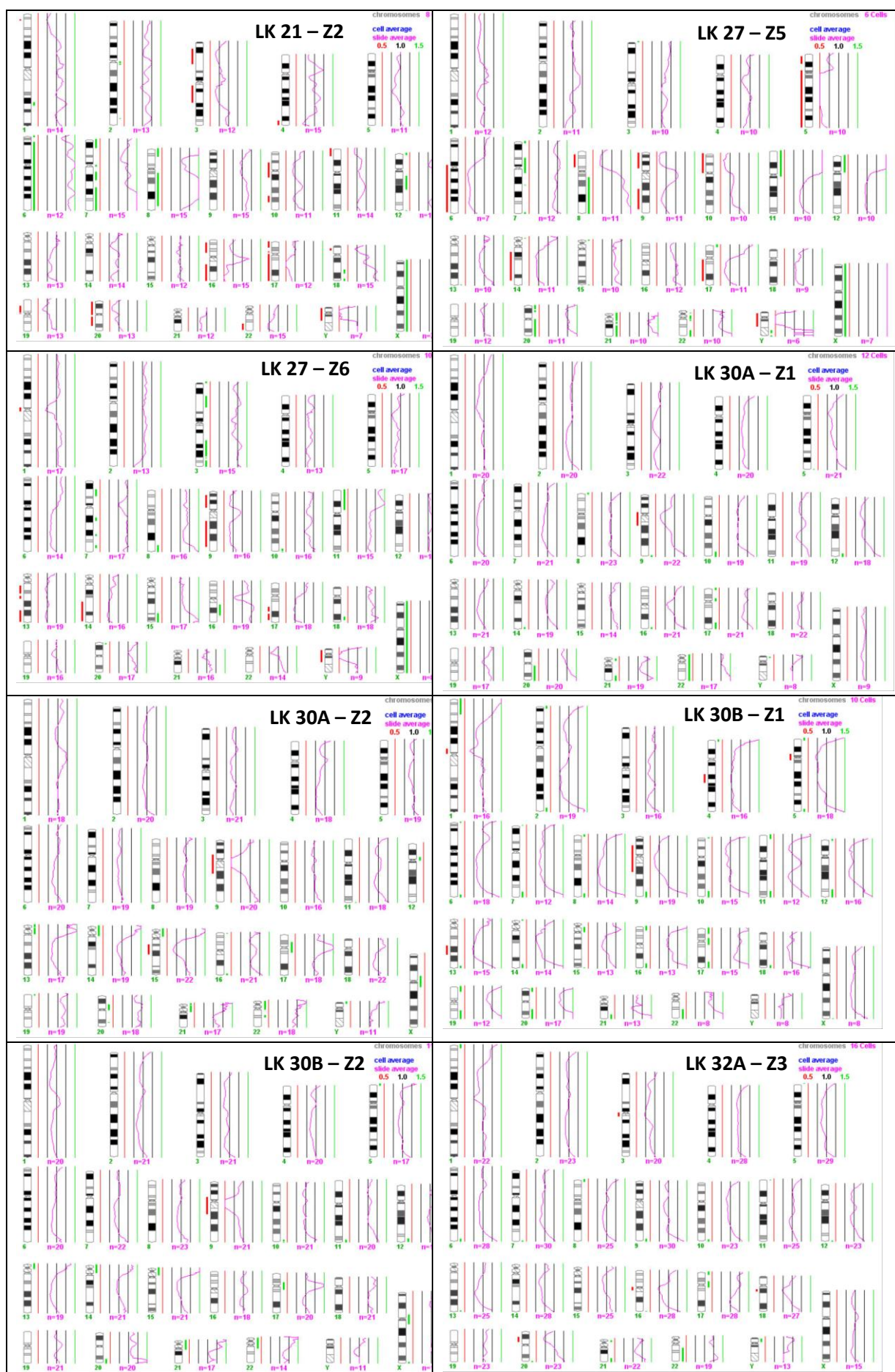
4 Profile von Kontrollzellen (MCSP- Zellen aus Lymphknoten)

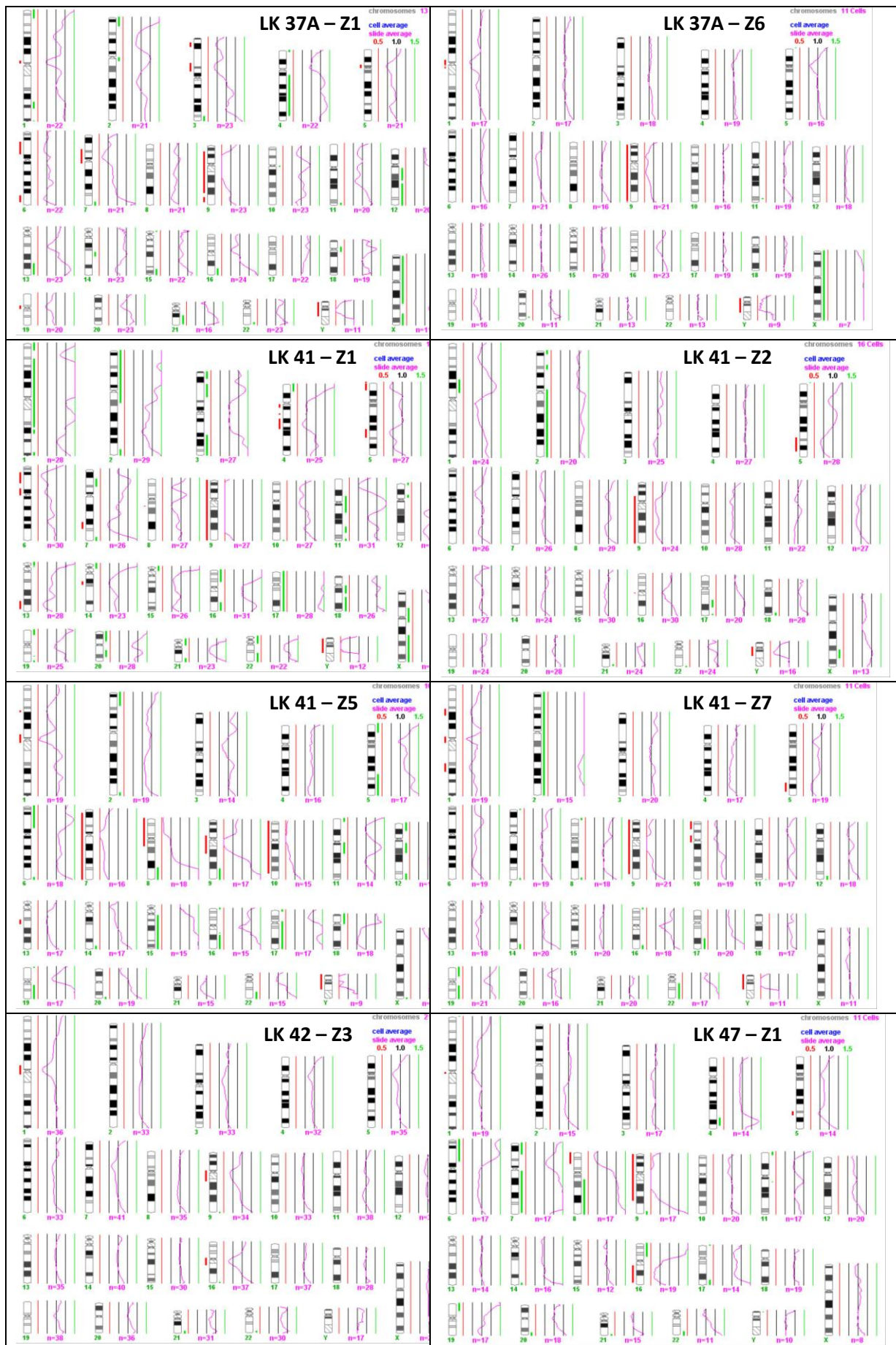
Nicht dargestellt sind die Profile der gp100+ DCC aus der Tübinger Studie, die zum Vergleich mit herangezogen wurden. Sie sind Gegenstand der Promotion von Isabelle Hodak, weshalb hier auf deren Arbeit verwiesen wird (bisher unveröffentlicht).

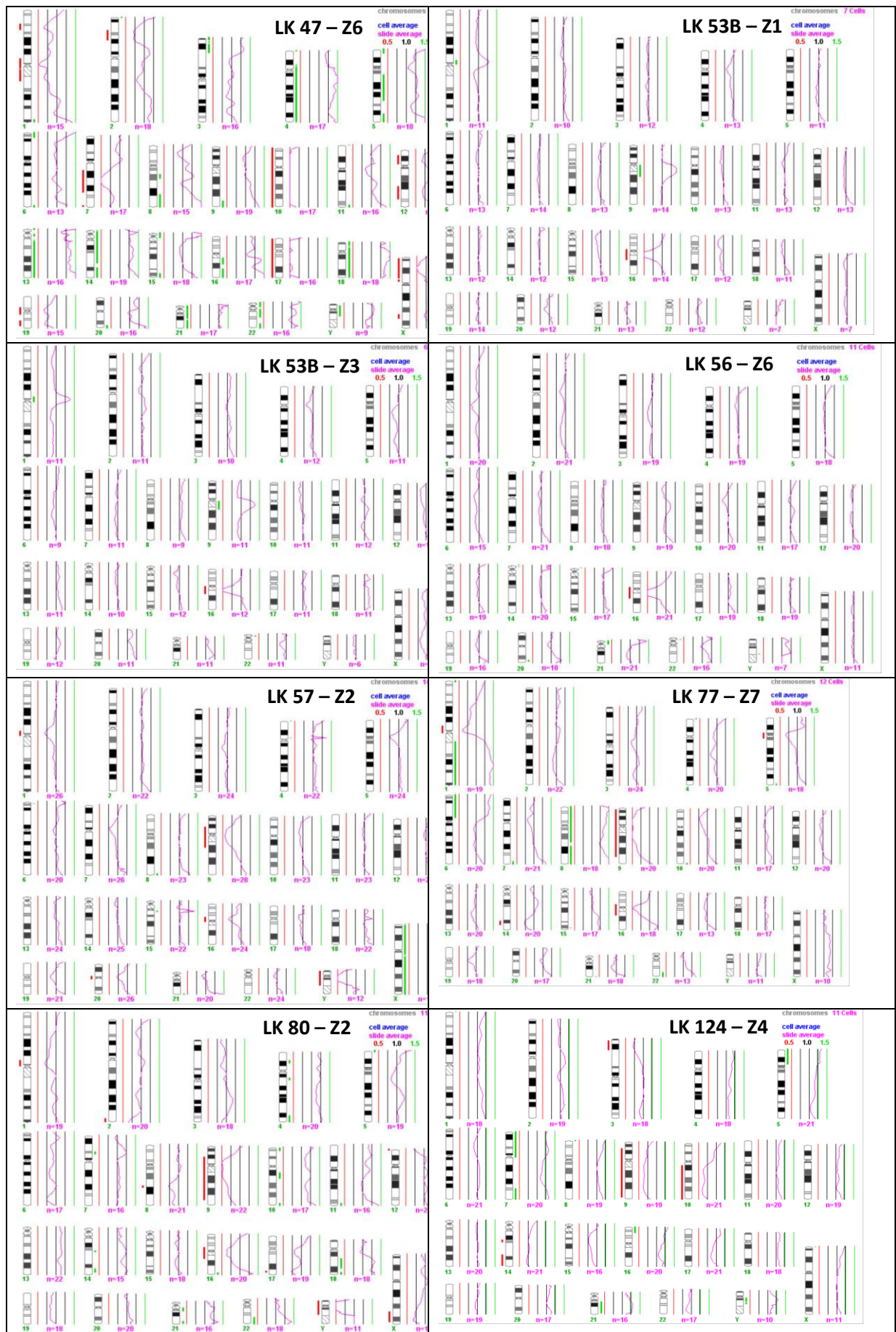
CGH-Profile MCSP+ Zellen

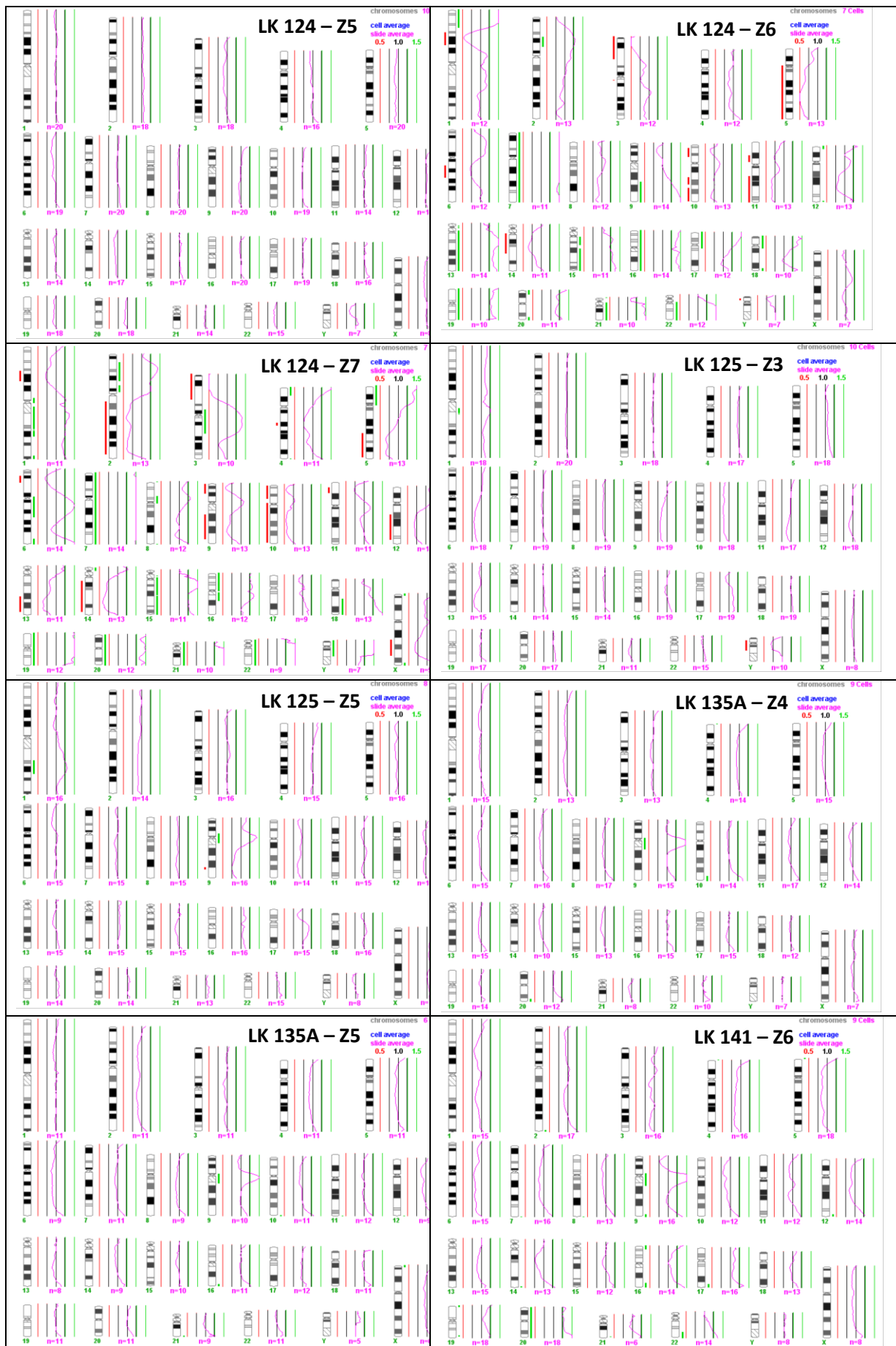
CGH-Profile MCSP+ Zellen

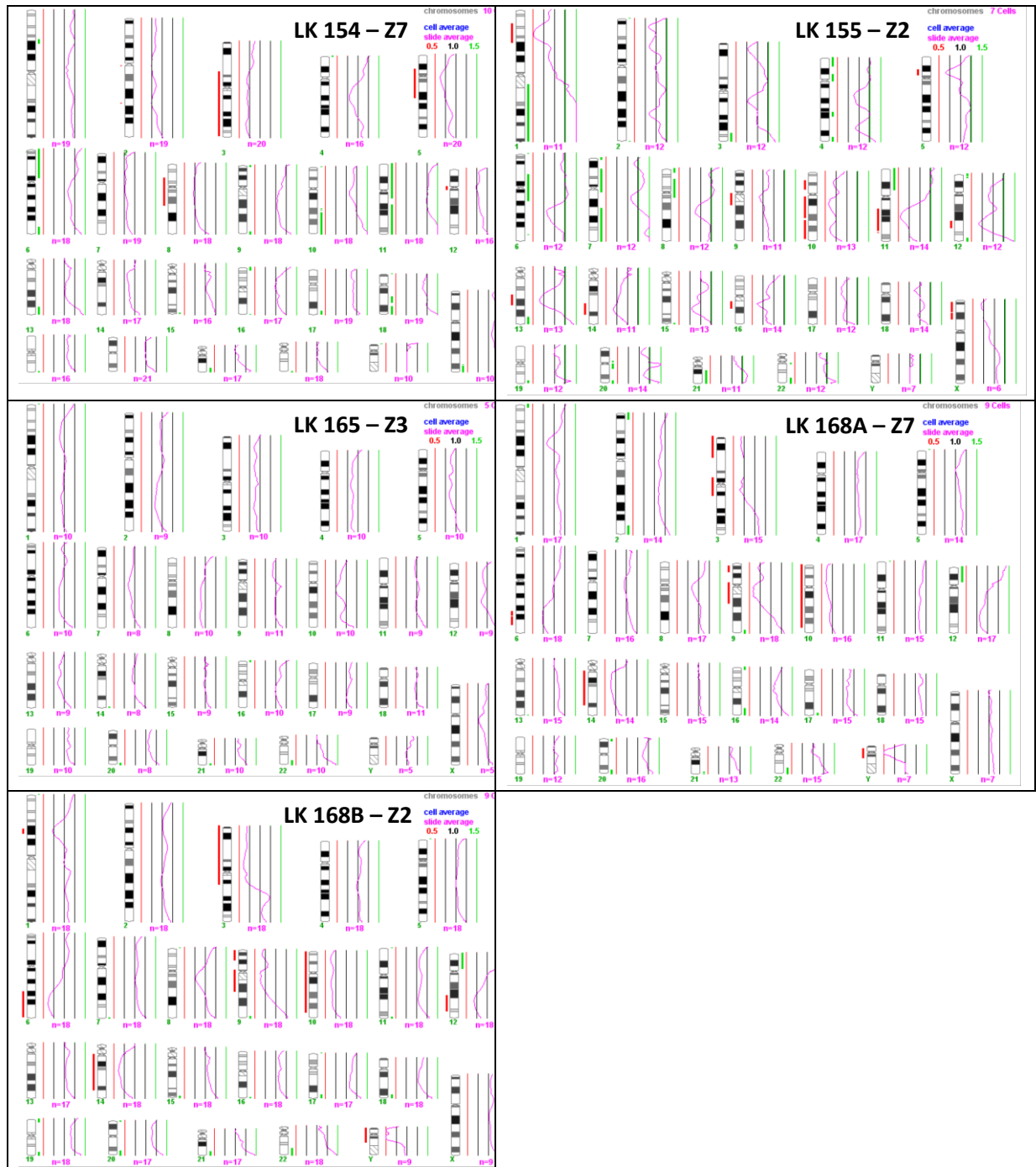




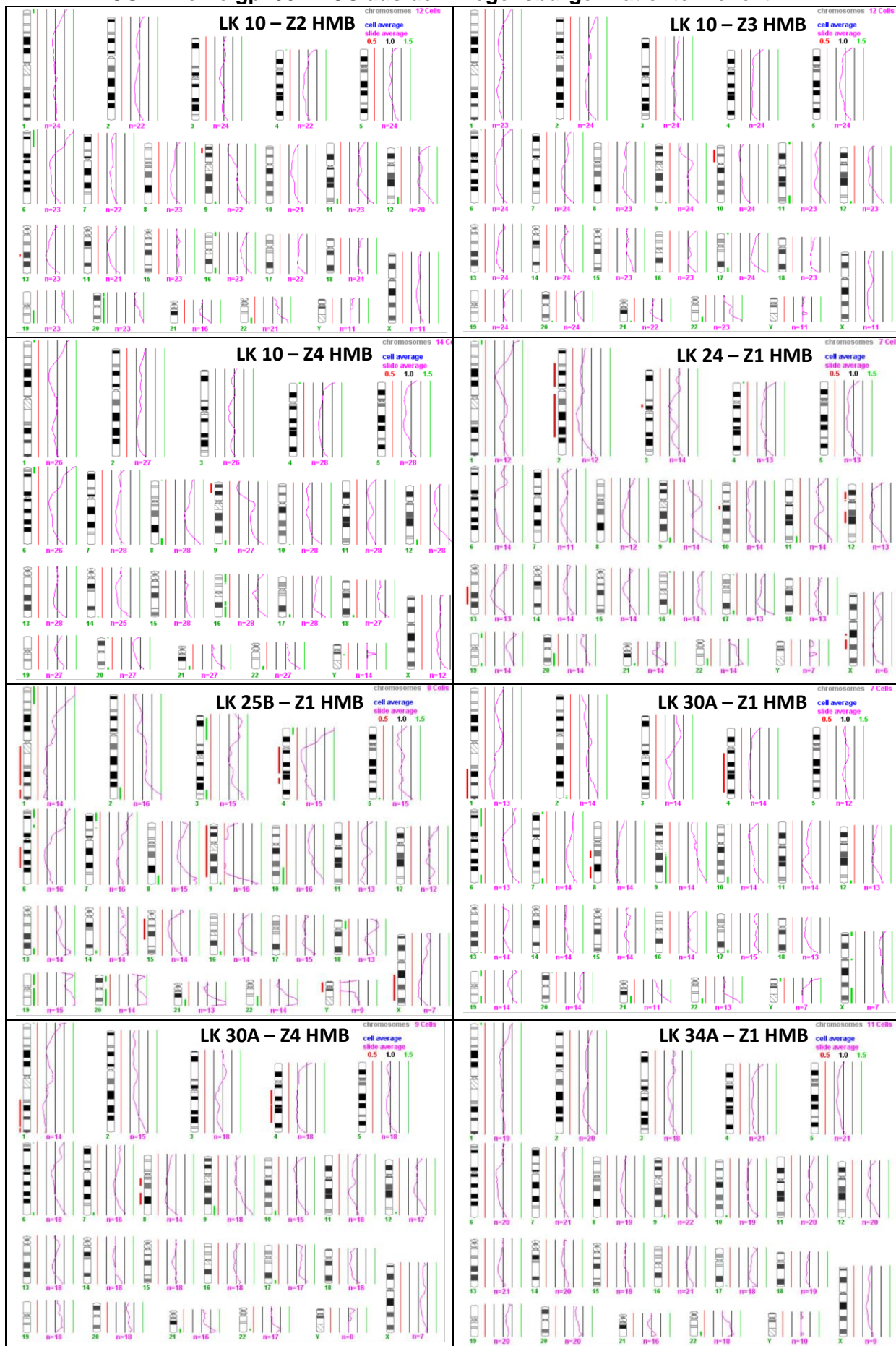


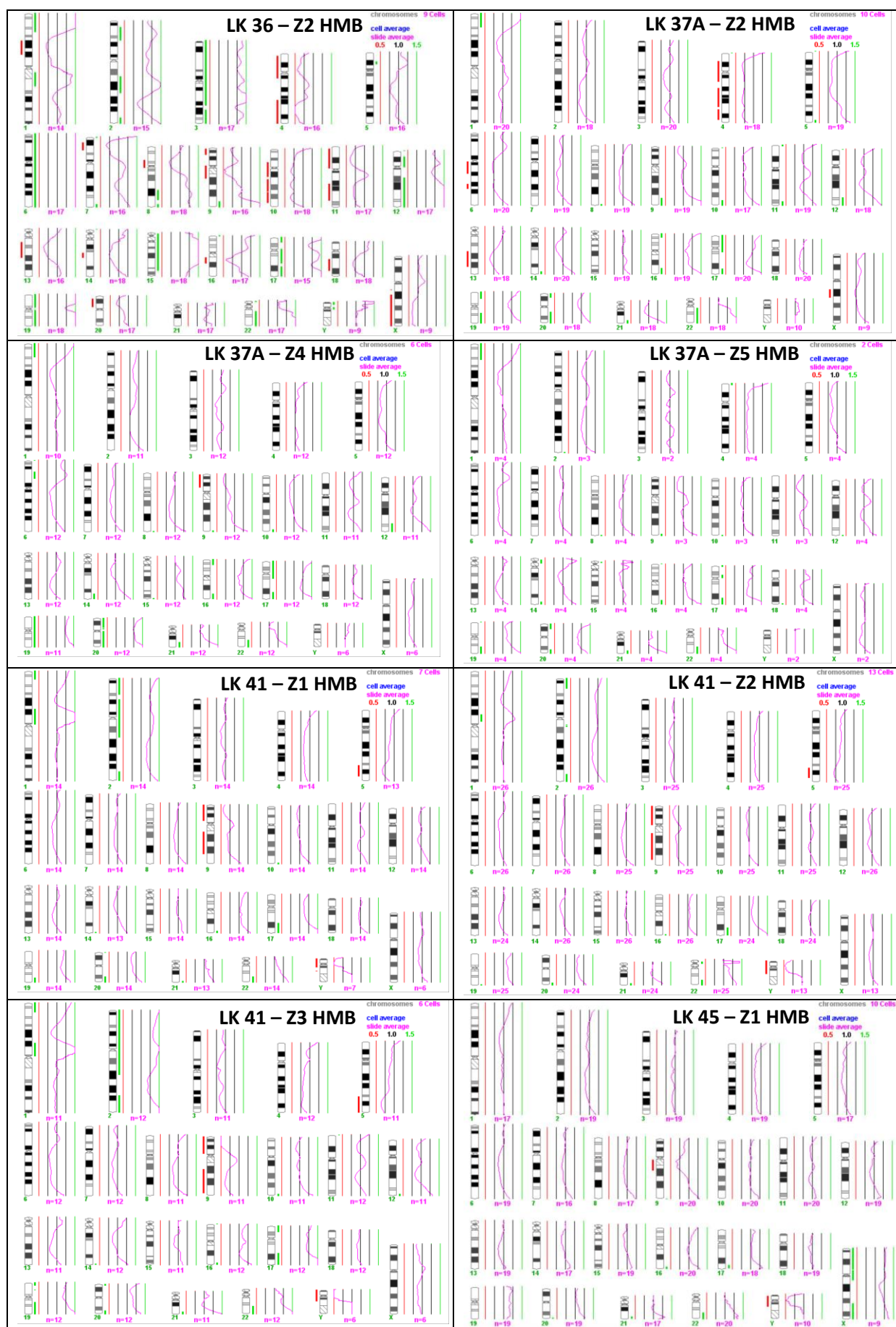


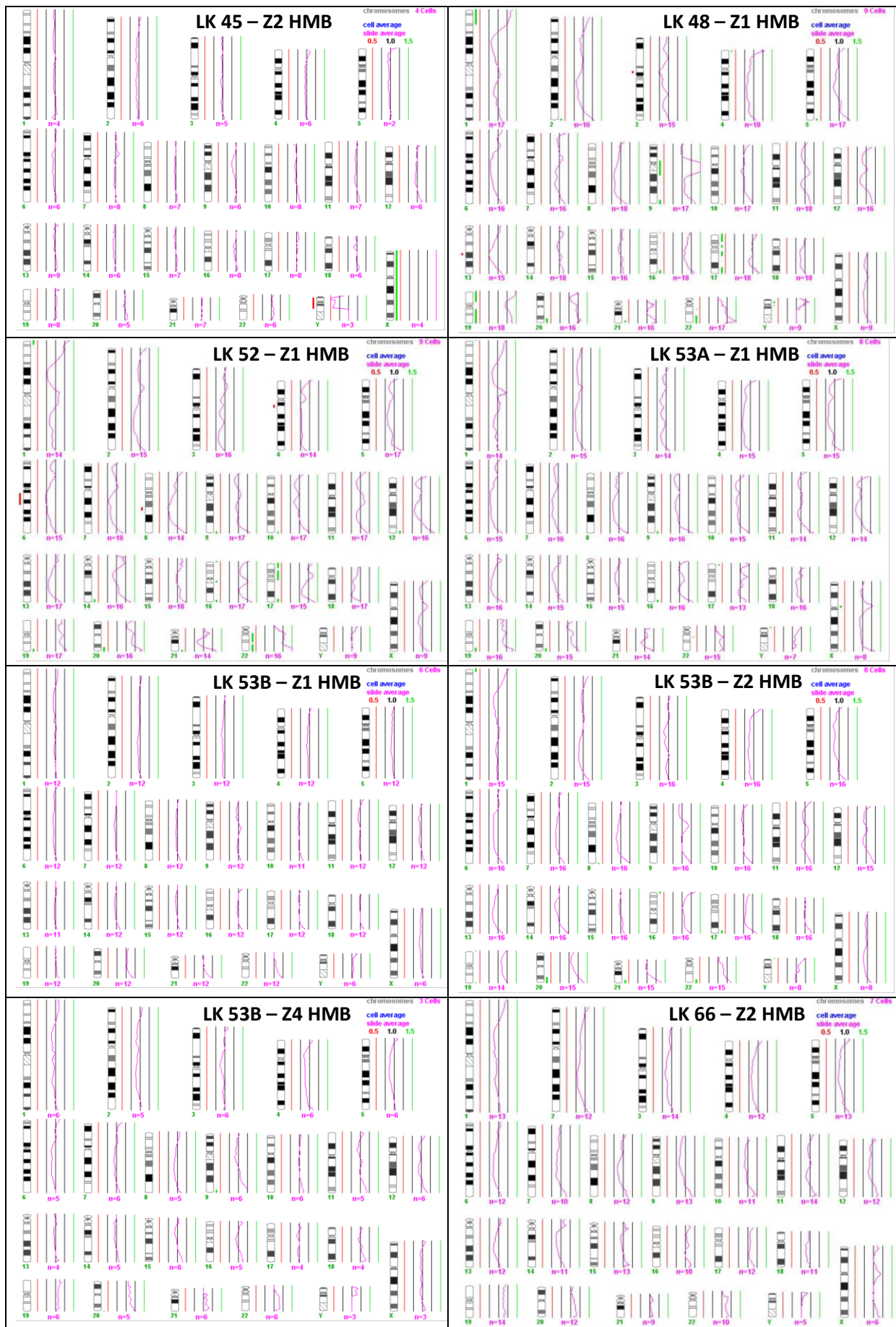


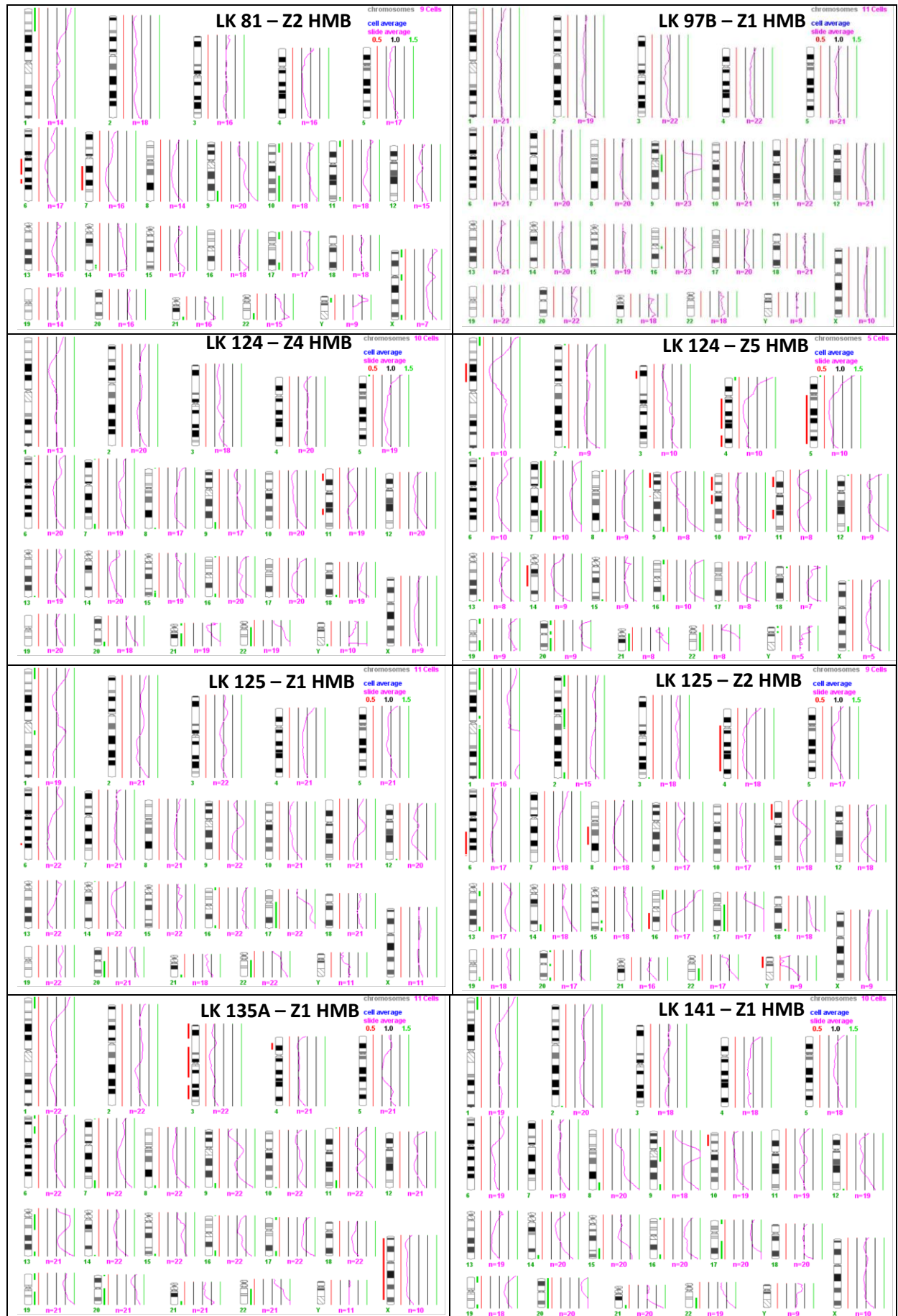


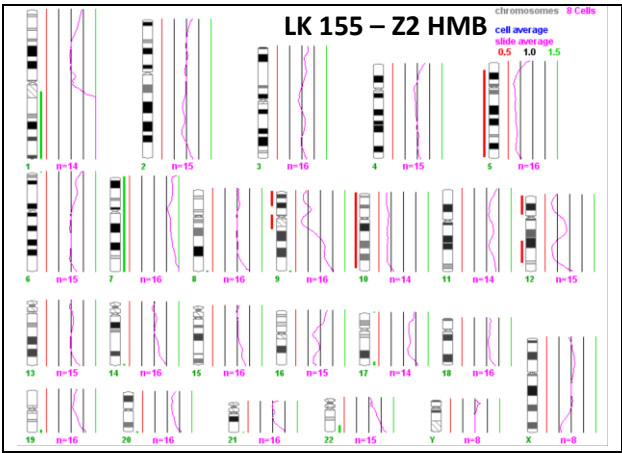
CGH-Profil gp100+ DCC aus dem Regensburger Patientenkollektiv



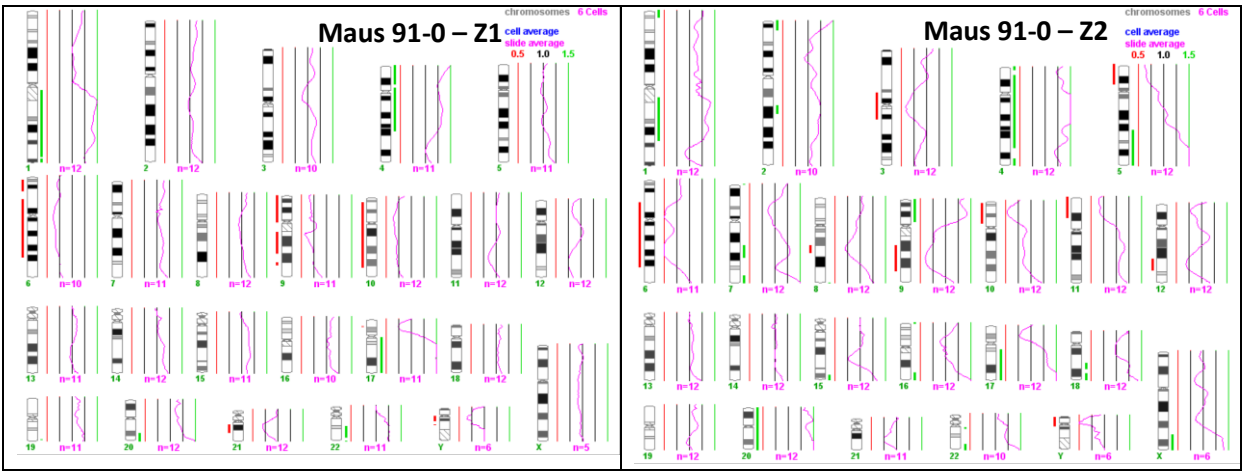








CGH-Profil MCSP+ Zellen von aus Patientenzellen generierten Tumoren *in vivo*



CGH-Profile von Kontrollzellen (Lymphozyten) aus MCSP-Färbung

