

Aus dem Lehrstuhl  
für Experimentelle Medizin und Therapieverfahren  
Prof. Dr. med. Christoph Klein  
der Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

**Identifizierung MCSP-positiver Melanomzellen in  
Wächterlymphknoten durch Genexpressionsanalysen**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Leonhard Magnus Guttenberger

2024



Aus dem Lehrstuhl  
für Experimentelle Medizin und Therapieverfahren  
Prof. Dr. med. Christoph Klein  
der Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

**Identifizierung MCSP-positiver Melanomzellen in  
Wächterlymphknoten durch Genexpressionsanalysen**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Leonhard Magnus Guttenberger

2024

Dekan: Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Christoph Klein

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Sebastian Haferkamp

Tag der mündlichen Prüfung: 22.07.2024

# Inhalt

1	Einleitung	6
1.1	Epidemiologie	6
1.2	Ätiologie	6
1.3	Klassifikation	7
1.4	Diagnose	8
1.4.1	Klinische Untersuchung	8
1.4.2	Exzision des Primärtumors	8
1.4.3	Ausbreitungsdiagnostik	8
1.4.4	Wächterlymphknotenbiopsie	8
1.4.5	Lymphadenektomie	9
1.4.6	Satelliten- und Intransitmetastasen	9
1.5	Therapie und Prognose	9
1.6	Neue Untersuchungsmethoden an Einzelzellen	10
1.6.1	Gp100-Färbung	11
1.6.2	MCSP-Färbung	11
1.7	Modelle der Tumorprogression	11
2	Material und Methoden	13
2.1	Kooperationspartner	13
2.2	Methoden	13
2.2.1	Aufarbeitung der Gewebeproben	13
2.2.2	Immunzytochemische Färbung	13
2.2.3	Isolierung einzelner Zellen aus Zellsuspension	14
2.2.4	Isolierung und globale Amplifikation von mRNA	14
2.2.5	Qualitätskontrolle	15
2.2.6	Agarose-Gelelektrophorese	16
2.2.7	Etablierung einer PCR zum Nachweis spezifischer Markergene	17
2.2.8	PCR zum Nachweis der Expression spezifischer Markergene	18
2.2.9	Reamplifikation von cDNA	19
2.2.10	Aufreinigung der Reamplifikation	20
2.2.11	Messung der cDNA-Konzentrationen und Verdünnung	20
2.2.12	qPCR	20
2.2.13	Nachweis von BRAF- und NRAS-Mutationen	22
2.2.14	Statistische Berechnungen	22
2.3	Material	23
2.3.1	Reagenzien	23

2.3.2	Primer.....	24
2.3.3	Geräte.....	25
2.4	Abkürzungsverzeichnis.....	25
3	Ergebnisse.....	27
3.1	DCCD <sub>MCSP</sub> in CLN, SLN und LADN.....	29
3.1.1	Unterschiede zwischen SLN, CLN und LADN.....	29
3.1.2	Unterschiede der DCCD <sub>MCSP</sub> zwischen histopathologisch positiven und negativen SLN.....	30
3.2	Korrelation zwischen DCCD <sub>MCSP</sub> und DCCD <sub>gp100</sub> .....	32
3.3	MCSP-positive Zellen.....	33
3.3.1	Assoziation der Zellmorphologie mit der DCCD <sub>MCSP</sub> .....	34
3.3.2	Assoziation der Zellmorphologie mit dem histopathologischen Lymphknotenstatus ..	35
3.4	Genexpressionsanalysen.....	37
3.4.1	Darstellung der Probenbank.....	37
3.4.2	Untersuchung der WTA-Qualität.....	38
3.4.3	Expression Melanom-assoziiierter Gene.....	38
3.5	Bestimmung neuer Genexpressionsmuster.....	42
3.5.1	Unterscheidung kleiner MCSP-positiver SLN-Zellen von CLN-Zellen.....	42
3.5.2	Unterscheidung großer MCSP-positiver Zellen aus SLN von CLN-Zellen.....	48
3.5.3	MelanA-Expression in qPCR in unterschiedlichen Zellgruppen.....	50
3.5.4	T-Zell- und Proliferationsmarkeranalysen.....	51
3.6	Korrelation der MelanA-Expression mit DCCD <sub>MCSP</sub> .....	54
3.7	Statistische Analysen der Daten des Tumorzentrums.....	56
3.7.1	Überblick über das Patientenkollektiv.....	56
3.7.2	Univariate Überlebensanalysen.....	58
3.7.3	Multivariate Analysen.....	62
4	Diskussion.....	66
4.1	Lymphknotenscreening - Vergleich der Färbemethoden.....	66
4.1.1	gp100.....	66
4.1.2	MCSP.....	66
4.2	Zellmorphologien.....	68
4.2.1	Bestimmung der großen Zellen als sichere Melanomzellen.....	68
4.2.2	Bestimmung der kleinen Zellen als heterogene Gruppe.....	68
4.2.3	Kleine Zellen als Vorstufe der großen Zellen.....	69
4.3	Interpretation der Genexpressionsanalysen.....	70
4.3.1	Nachweis von Melanomzellen durch Markerscreening.....	70
4.3.2	Keine Unterscheidung der kleinen Zellen von CLN-Zellen durch Mikroarray-Untersuchungen.....	71

4.4	Höhere Sensitivität der Endpunkt-PCR im Vergleich zur MelanA-qPCR .....	72
4.5	Nachweis von Melanomzellen durch MelanA-qPCR .....	73
4.6	Unterdiagnostik durch stochastische Genexpression .....	74
4.7	Einordnung der nicht-Melanomzellen .....	74
4.8	Verschlechtertes Überleben durch MelanA-Nachweis .....	75
4.8.1	Verbesserung klinischer Einteilungen.....	75
4.8.2	Prädiktionsmodell zur Identifizierung von Risikopatienten.....	76
5	Zusammenfassung .....	78
6	Literaturverzeichnis .....	80
7	Tabellenverzeichnis .....	83
8	Abbildungsverzeichnis .....	84

# 1 Einleitung

Obwohl das Maligne Melanom im Frühstadium einfach operativ entfernt werden kann, handelt es sich um eine der aggressivsten Krebsformen. Das liegt vor allem an den sehr schwer zu therapierenden metastatischen Erkrankungen und der früh einsetzenden Metastasierung. Eine Früherkennung der Metastasen beziehungsweise gefährdeter Patienten wäre also ein großer Schritt für die Therapie von Melanompatienten.

## 1.1 Epidemiologie

Im „Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016“ (Robert Koch-Institut [RKI], 2016) wird das Maligne Melanom mit einer Inzidenz von etwa 21000 im Jahr 2013 als die sechsthäufigste solide maligne Erkrankung aufgelistet. Mit einer jährlichen Steigerung der Neuerkrankungsrate um mehr als 4 % innerhalb des Zeitraums von 2003-2013 zählt das Maligne Melanom zu den immer wichtiger werdenden Tumorerkrankungen.

Die Sterbefälle beliefen sich im Jahr 2013 auf 3042 Patienten, das entspricht etwa 14 % der gleichjährigen Inzidenz. Die jährliche Steigerung der Sterbefälle beträgt für Frauen 0,9 % und für Männer 1,8 %. Die Todesfälle steigen also nicht im gleichen Maße, wie die Neuerkrankungen. Im Vergleich zu vor 40 Jahren tritt das Melanom zwar zehnmal so oft auf, die Sterbefälle steigen aber nur leicht an. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate wird im „Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016“ mit Datenstand 2013 für Frauen mit 94 % und bei Männern mit 91 % angegeben.

Als Ursachen für die erhöhte Inzidenz werden das veränderte Freizeitverhalten, die Nutzung künstlicher UV-Quellen sowie Reisen in äquatornahe Gegenden genannt. Dass die Mortalität im Vergleich zur Inzidenzrate weniger stark anstieg, könne an verbesserter Früherkennung und Therapie liegen. Die verbesserte Früherkennung wurde in Österreich statistisch erfasst, bei insgesamt steigender Inzidenz von dünnen (<1,0 mm) und dicken (>1,0 mm) Melanomen zwischen 1998 und 2012, sank der Anteil der dicken Melanome von etwa 33 % auf 29 %. Die mediane Breslow-Dicke lag dabei bei 0,62 mm (0,09 mm – 30,0 mm; n=1520) (Ambrosini-Spaltro et al., 2015).

## 1.2 Ätiologie

Die Ätiologie des Malignen Melanoms wird nach bisherigem Kenntnisstand multifaktoriell beeinflusst.

Als intrinsische Faktoren werden hohes Alter (Psaty et al., 2010), helle Hauttypen, die Anzahl der Nävuszellnävi und Immundefizienzsyndrome genannt (Bataille & Vries, 2008; Rigel et al., 2010). Diese Faktoren können zwar überwiegend nicht beeinflusst werden, sind aber für die Definierung von Risikopatienten höchst relevant und können für ein effektives Melanomscreening verwendet werden.

Die extrinsischen Faktoren sind in der Literatur übereinstimmend soziale Faktoren, wie sozioökonomischer Status, Beruf und Familienstand (Bilimoria et al., 2009; Linos et al., 2009). Interessanterweise ist eine hohe berufliche Sonnenexposition nicht eindeutig mit einem höheren Melanomrisiko verbunden. Es gibt Analysen, die ein niedrigeres Risiko für Menschen mit hoher beruflicher Sonnenexposition beschreiben (Gandini et al., 2005), andere sprechen von einem höheren Risiko für Melanome an Kopf und Hals (Chang et al., 2009).

Als maßgeblicher extrinsischer Risikofaktor ist die Exposition gegen UV-Strahlung bekannt, welche DNA-Schäden, wie Dimerisierungen zwischen Pyrimidinbasen, verursachen kann. Die intermittierende Exposition, vor allem ansonsten abgedeckter Körperteile, erhöht die Anzahl der Nävuszellnävi (Newton-Bishop et al., 2010) und auch das Melanomrisiko an Körperstamm und Extremitäten (Chang et al., 2009). Sporadische Exposition mit blasigen Sonnenbränden erhöhen das Melanomrisiko (Olsen et al., 2011; Rigel et al., 2010). Hiervon sind in erster Linie Kinder gefährdet, da ihnen das Risiko nicht bewusst ist und sie sich nicht in ausreichendem Maße vor der Sonne schützen können (Berneburg & Surber, 2009).

Insgesamt scheint die intermittierende, hohe UV-Exposition eine höhere Assoziation mit dem Auftreten Maligner Melanome zu haben als die andauernde berufliche Exposition (Elwood & Jopson, 1997).

Prospektiv wurde festgestellt, dass eine regelmäßige Nutzung von Sonnencreme als UV-Schutz mit einer signifikanten Reduktion der Melanominzidenz einhergeht (Green et al., 2011). Durch Sensibilisierung der Bevölkerung für die Verwendung von Sonnenschutz könnte die Inzidenz des Malignen Melanoms also ohne großen Aufwand gesenkt werden.

### **1.3 Klassifikation**

Tumorerkrankungen werden in der Regel nach der TNM-Klassifikation eingeteilt, in die Tumorgöße, nodulärer Befall und Fernmetastasen eingehen. Da jeder Tumor seine Eigenheiten besitzt werden häufig anhand dieser Informationen noch Stadien definiert, in die die Patienten je nach Befund eingeteilt werden. Der Vorteil darin liegt in der systematischen

Diagnostik und Therapie der Patienten. Auch die Prognose der Patienten kann so eingeschätzt werden.

Die TNM-Klassifikation und Stadieneinteilung für das Maligne Melanom werden vom American Joint Committee of Cancer (AJCC) erstellt (Gershenwald et al., 2017).

## 1.4 Diagnose

### 1.4.1 Klinische Untersuchung

In der Erkennung des Malignen Melanoms stellt die klinische Untersuchung den wichtigsten Aspekt dar. Durch genaue Begutachtung der gesamten Haut eines Patienten können verdächtige Hautläsionen erkannt werden. Hautläsionen werden nach der ABCD-Regel (Asymmetrie, Begrenzung, Color, Durchmesser) (Friedman et al., 1985) beurteilt. Mit der Dermatoskopie kann schnell und nichtinvasiv eine genauere Beurteilung verdächtiger Läsionen erfolgen. Durch regelmäßige Untersuchungen kann auch eine Veränderung der Läsionen über die Zeit erkannt werden. Dafür wird auch die Fotodokumentation genutzt (sequenzielle digitale Dermatoskopie).

### 1.4.2 Exzision des Primärtumors

Anders als bei vielen Tumoren erfolgt beim Malignen Melanom, aufgrund der geringen Größe von nur ein paar Millimetern, grundsätzlich keine Probebiopsie, sondern primär die Exzision des Tumors mit kleinem Sicherheitsabstand. Wenn in der histologischen Untersuchung die Diagnose eines Malignen Melanoms bestätigt wird, erfolgt je nach Tumorstadium eine Nachresektion, mit einem Sicherheitsabstand um den Primärtumor, um das Auftreten von Lokalrezidiven zu verhindern. Wenn operativ keine Resektion des Melanoms im Gesunden erfolgen kann, werden andere Therapieformen (z.B. Strahlentherapie) eingesetzt.

### 1.4.3 Ausbreitungsdiagnostik

Zur Ausbreitungsdiagnostik gehören ab Stadium IB bis Stadium IIB die Lymphknoten-Sonographie und die Bestimmung des Tumormarkers S100B im Blut. In höheren Stadien stehen auch der molekularpathologische Nachweis von BRAF-, NRAS- oder c-kit-Mutationen, sowie Ganzkörper-Schnittbildgebung und Skelettszintigraphie zur Suche nach Fernmetastasen zur Verfügung.

### 1.4.4 Wächterlymphknotenbiopsie

Zur genauen Bestimmung des Tumorstadiums nach AJCC 2017 ist die histopathologische Beurteilung des Wächterlymphknotens (sentinel lymph node, SLN) notwendig. Die SLN-Biopsie wird bereits ab einer Tumordicke von >0,75 mm durchgeführt, wenn Risikofaktoren

wie die Ulzeration oder eine erhöhte Mitoserate des Primärtumors vorliegen. Die Entfernung des SLN wird durch die Nutzung eines radioaktiven Tracers in einer Lymphoszintigraphie ermöglicht. Intraoperativ werden dabei mit einer Gammasonde die radioaktiven Zerfälle nachgewiesen und die Lymphknoten mit der höchsten Aktivität ermittelt und exzidiert.

Die Histopathologie beurteilt den SLN mithilfe von Schnitten mit Standardfärbungen (z.B. H.E.) und auch speziellen immunhistochemischen Färbungen (z.B. HMB45 und S100B). Beschrieben werden die Menge der Melanomzellen und das Ausmaß der Lymphknotenbesiedelung.

#### 1.4.5 Lymphadenektomie

Im Falle eines histopathologisch gesicherten SLN-Befalls kann in therapeutischer Absicht eine Lymphknotendissektion einer Lymphknotenregion erfolgen. Der potenzielle Nutzen muss gegen die Nebenwirkungen (Entstehung eines Lymphödems, damit einhergehend Schmerzen und Bewegungseinschränkung), die je nach Region unterschiedlich beeinträchtigen können, abgewogen werden. Die Indikationsstellung muss also bewusst erfolgen und Gegenstand aktueller klinischer Forschung sein.

#### 1.4.6 Satelliten- und Intransitmetastasen

Eine Besonderheit des Malignen Melanoms stellen die sogenannten Intransitmetastasen dar. Dabei handelt es sich um Hautmetastasen, die sich „zwischen dem Primärtumor und den regionären Lymphknoten“ manifestieren. „Wenn sich Hautmetastasen in der unmittelbaren Umgebung des Primärtumors befinden, werden sie [...] ‚Satellitenmetastasen‘ genannt“ (Szeimies et al., 2010). In der N-Klassifikation wird das Auftreten von Satelliten- oder Intransitmetastasen mit der Einstufung „c“ gekennzeichnet. In der Stadieneinteilung führt das Vorliegen der Satelliten- oder Intransitmetastasen mindestens zur Einstufung IIIB. Fernmetastasen führen zur Einstufung des Patienten in Stadium IV.

### 1.5 Therapie und Prognose

Zwar ist die insgesamt Lebenserwartung beim Malignen Melanom mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von >90 % verglichen mit anderen Krebserkrankungen sehr gut, bei Vorliegen von Fernmetastasen (Stadium IV) galt die Erkrankung aber lange als kaum behandelbar und die Patienten verstarben meist rasch. In den letzten Jahren wurden enorme Fortschritte durch den Einsatz von Immuntherapien erzielt. Durch Ipilimumab (Monoklonaler Antikörper gegen

den Rezeptor CTLA4) konnte die 5-Jahres-Überlebensrate auf 20 % gesteigert werden (Eggermont et al., 2016).

Die 5-Jahres-Analyse der „CheckMate 067“-Studie, in der die Kombination der Immun-Checkpoint-Inhibitoren Nivolumab (Monoklonaler Antikörper gegen den Rezeptor PD-1) und Ipilimumab an Melanompatienten der Stadien III und IV nach AJCC 2017 untersucht wurde, ergab einen Anstieg der 5-Jahres-Überlebensrate der Patienten auf 52 % (Larkin et al., 2019). Durch den Einsatz und die Verbesserung der Immuntherapie sind also in den letzten Jahren deutliche Therapiefortschritte erzielt worden, dennoch ist das metastasierte Maligne Melanom weiterhin eine sehr gefährliche Erkrankung, an der trotz dieser intensiven Therapie nach neuester Studienlage immer noch etwa die Hälfte der Patienten innerhalb der ersten fünf Jahre versterben (Larkin et al., 2019).

Die Verhinderung der systemischen Metastasierung würde die Mortalität also weiter reduzieren und gleichzeitig die Lebensqualität der Patienten steigern, da sich die Therapieintensität verringern würde.

## 1.6 Neue Untersuchungsmethoden an Einzelzellen

Mit dem Ziel, die systemische Streuung des Malignen Melanoms besser zu verstehen und letztendlich zu verhindern, wird in der Arbeitsgruppe von Professor Klein am Lehrstuhl für experimentelle Medizin und Therapieverfahren daran gearbeitet, aus Zellsuspensionen der Wächterlymphknoten von Melanompatienten Vorläuferzellen der Metastasen in klinisch und pathologisch unauffälligen Lymphknoten nachzuweisen. Hierzu wird die eine Hälfte des Wächterlymphknotens in eine Zellsuspension zerlegt, um Tumorzellen und potenzielle Tumorzellen mithilfe immunzytochemischer Färbungen nachzuweisen. Diese werden im Anschluss mittels Mikromanipulator isoliert und weiter untersucht. Die andere Hälfte des Wächterlymphknotens wird in der Pathologie mittels H.E. und Immunfärbungen untersucht. Interessanterweise ist die Positivitätsrate mittels immunzytochemischer Färbung der Zellsuspension deutlich höher, als mit histopathologischen Färbemethoden (Ulmer et al., 2005). Dies spiegelt sich auch in der AJCC 2017 Klassifikation wider. So heißt es, dass ein Lymphknoten, unabhängig davon, ob der Nachweis mithilfe klassischer histopathologischer Färbemethoden oder mithilfe von Immunfärbungen gelungen ist, als von Tumorzellen befallen gewertet werden solle. Die Größe des gefundenen Tumors wird dabei nicht berücksichtigt (Gershenwald et al., 2017).

### 1.6.1 Gp100-Färbung

Die Relevanz einzelner Tumorzellen in SLN wurde in einer Kooperation mit einer Tübinger Arbeitsgruppe gezeigt. Das Überleben von Patienten mit nur wenigen gp100-positiven Zellen pro Million untersuchter mononukleärer Lymphknotenzellen war signifikant kürzer als von gp100-negativen Patienten (Ulmer et al., 2014).

Die gp100-Färbung wird mit dem Antikörper HMB45 gegen das intrazellulär lokalisierte Antigen gp100 durchgeführt. Einzelne damit angefärbte Zellen werden als „disseminated cancer cells“ (DCC) bezeichnet. Die Anzahl der gefärbten Zellen pro Million untersuchter Zellen der Lymphknotensuspension wird als Tumorzell-dichte, „disseminated cancer cell density“ (DCCD) bezeichnet. Der HMB45 Antikörper kommt zudem bei der histopathologischen Aufarbeitung des SLN zum Einsatz.

### 1.6.2 MCSP-Färbung

Als weiterer Melanommarker ist eine Färbung gegen das Oberflächenantigen MCSP (Melanoma-associated Chondroitin Sulfate Proteoglycan) weit verbreitet. Bei MCSP handelt es sich um ein in Melanomzellen vorkommendes integrales Membran-Proteoglykan. Es kommt in bis zu 90 % der humanen Melanomzellen vor (Bumol & Reifeld, 1982). Funktionell spielt es während der Zellmigration eine wichtige Rolle (Campoli et al., 2004).

Mithilfe des gegen MCSP gerichteten Antikörpers 9.2.27 können im Gegensatz zur gp100-Färbung lebende Zellen aus den Zellsuspensionen der Lymphknoten isoliert werden. Dadurch kann die mRNA dieser Zellen gewonnen werden, die mittels WTA (whole transcriptome amplification; (Klein et al., 2002)) in stabile komplementäre DNA (cDNA) überschrieben wird und somit die Genexpressionsanalyse der Zelle ermöglicht. Auch hier kann wieder die Dichte der gefärbten Zellen (DCCD) bestimmt werden, die  $DCCD_{MCSP}$  genannt wird.

## 1.7 Modelle der Tumorprogression

Das klassische lineare Progressionsmodell besagt, dass der Primärtumor erst eine gewisse Größe erreichen muss, bevor er streut. Tumorzellen müssen erst eine Anzahl an Mutationsrunden durchlaufen, bis sie metastasieren und in entfernten Organen Kolonien bilden können (Farber, 1984). Im Melanom konnte jedoch gezeigt werden, dass DCCs bereits ab einer Primärtumordicke von nur 0,5 mm lymphogen disseminieren können (Werner-Klein et al., 2018). Zudem wurde nachgewiesen, dass sich die DCCs genetisch vom Primärtumor unterscheiden, was zu dem Schluss führte, dass die DCCs den Primärtumor früher verlassen haben mussten, als das lineare Tumorprogressionsmodell es erklären kann. In CGH-Analysen

der DCCs und der Primärtumore wurden nämlich Deletionen im Genom der Primärtumore nachgewiesen, die in den DCCs nicht auftraten und vice versa (Werner-Klein et al., 2018). DCCs und Primärtumor haben sich also parallel entwickelt und nicht linear.

Des Weiteren fand man in DCCs dicker Melanome ( $\geq 1,8$  mm) keine wesentliche Steigerung der Kopiezahlveränderungen (copy number alterations (CNAs)) als in DCCs dünner Melanome ( $< 1,8$  mm). Außerdem fand sich keine CNA signifikant häufiger in DCCs dicker Melanome als in DCCs dünner Melanome. Das Modell der linearen Progression, nach dem die Mutationen im Primärtumor entstehen und sich ansammeln, bis ab einem gewissen Punkt Disseminierung stattfindet, konnte damit also ausgeschlossen werden (Werner-Klein et al., 2018).

Zudem konnten wichtige genetische Veränderungen mit einer  $DCCD_{gp100} > 100$  in Verbindung gebracht werden, ebenso wie die Kolonisierung der Lymphknoten, die in der Histopathologie erst ab einer  $DCCD_{gp100} > 100$  gesehen wurde. Bei  $DCCD_{gp100} < 100$  waren histopathologisch nur einzelne, verstreute Melanomzellen unterhalb der Lymphknotenkapsel zu sehen (Werner-Klein et al., 2018).

Eine frühe Disseminierung und daraufhin eigenständige Entwicklung der DCCs, während der die DCCs die zur Metastasenbildung nötigen Eigenschaften akquirieren, lässt also auf eine parallele Entwicklung von Primärtumor und DCCs schließen.

Ein weiteres Indiz dafür, dass die Fähigkeit, Metastasen zu bilden, auch nach der Disseminierung erlangt werden kann, ergaben Mausexperimente, in denen nur Zellen aus kolonisierten Lymphknoten ( $DCCD_{gp100} > 100$ ) in immundefizienten Mäusen Melanome bilden konnten. DCCs aus nicht-kolonisierten Lymphknoten ( $DCCD_{gp100} < 100$ ) schafften dies nicht (Werner-Klein et al., 2018). Auch die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen deuten darauf hin, dass die Disseminierung früher beginnt als bisher angenommen wurde. So fanden sich z.B. in 53 % der Hirnmetastasen verschiedener Tumorentitäten Veränderungen, die nicht im Primärtumor nachzuweisen waren (Brastianos et al., 2015).

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Kooperationspartner

Die in dieser Arbeit untersuchten Zellen aus Wächterlymphknoten und Lymphknoten von Patienten ohne Tumorerkrankungen stammen aus den Kooperationen des Lehrstuhls für experimentelle Medizin und Therapieverfahren mit der Dermatologie sowie der Gefäßchirurgie der Universitätsklinik Regensburg. Hierfür gaben die Patienten ihre schriftliche Einwilligung, die Ethikkommission der Universität Regensburg genehmigte die Untersuchungen an den Lymphknoten und den isolierten Zellen. Die Daten zur Histopathologie stammen aus dem Institut für Pathologie, die Überlebensdaten der Patienten aus dem Tumorzentrum Regensburg.

### 2.2 Methoden

#### 2.2.1 Aufarbeitung der Gewebeproben

Von den entnommenen Lymphknoten geht jeweils eine Hälfte in die Pathologie zur Routineuntersuchung und eine Hälfte in unser Labor zur Durchführung der Einzelzelluntersuchungen. Die Verarbeitung erfolgt unmittelbar nach Eingang der Probe, falls mehrere Proben gleichzeitig eingehen, werden sie in RPMI 1640 Medium bei 8 °C gelagert. Nach Zerkleinerung in wenige Millimeter große Stücke werden die Lymphknoten im gleichen Medium mit Medicons (BD-Bioscience), Einsätzen der Medimaschine (Dako), disaggregiert, in mehreren Zentrifugationsschritten mit Hank's Salzlösung, Percoll 60 % und PBS von Verunreinigungen befreit und das entstandene Zellpellet in PBS resuspendiert. Anschließend wird die Zellzahl unter dem Mikroskop bestimmt. Die Zellen werden auf die einzelnen Versuche aufgeteilt.

#### 2.2.2 Immunzytochemische Färbung

Für die Färbung mit dem murinen monoklonalen Antikörper 9.2.27 gegen MCSP werden bis zu 3 Millionen Zellen der hergestellten Zellsuspension hergenommen. Die einzelnen Schritte umfassen dabei das Abzentrifugieren des Überstands, das Inkubieren in 95 µl AB-Serum (10 % in PBS mit 2 % Pepton), die Inkubation von 5 µl des primären Antikörpers 9.2.27 der Konzentration 25 µg/ml, einen Waschschrift mit 500 µl PBS/Pepton (2 %) sowie die Inkubation mit 2 µl des Cy3-konjugierten sekundären Antikörper Ziege anti Maus IgG der Konzentration 75 µg/ml. Nach zwei weiteren Waschschriften mit PBS/Pepton und PBS kann das verbliebene Pellet in 200 µl PBS aufgenommen werden.

### 2.2.3 Isolierung einzelner Zellen aus Zellsuspension

Zur mikroskopischen Untersuchung werden die gegen MCSP gefärbten Zellen auf einen mit BSA beschichteten 8-Feld-Objektträger gegeben. Nach einer Sedimentationszeit von etwa 15 Minuten wird bei 20-facher Vergrößerung an einem Invertmikroskop mittels Cy3-Filter nach fluoreszierenden Zellen gesucht. Fluoreszierende Zellen (MCSP-positiv) werden mittels eines Mikromanipulators mit einer dünnen Glaskapillare einzeln isoliert und auf ein zellfreies mit PBS beladenes Feld des Objektträgers überführt. Dort wird die Zelle mit einer 2 µl Pipette unter Sicht angesaugt und in ein gekühltes PCR-Tube mit Lysispuffer (4 µl m-Trap Lysis-Buffer; 0,4 µl (10 ng) tRNA) gegeben. Nach Ende des Screenings werden die entnommenen Zellen bei -80 °C gelagert. Neben MCSP-positiven Zellen werden auch zur Kontrolle MCSP-negative Zellen sowie eine Negativkontrolle (PBS ohne Zellen) zum Ausschluss einer Verunreinigung genommen.

### 2.2.4 Isolierung und globale Amplifikation von mRNA

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

Zu den in Abschnitt 2.2.3 beschriebenen isolierten Einzelzellen werden nach dem Auftauen Peptid-Nukleinsäuren (PNAs) und Protease zugegeben. Je Ansatz 1 µl Lysispuffer: Protease 1:20 und 1 µl PNA. Die Proben werden zum Aufschluss der RNA, zur Bindung der PNAs und zur Inaktivierung von RNasen einem Temperaturprogramm in der PCR-Maschine unterzogen (10 min 45 °C, 1 min 70 °C, 15 min 22 °C). 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 silanisierendes PCR-Tube überführt, in das 0,8 µl Polyacrylamid-Carrier vorgelegt sind. 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.

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:

- CFL15CT24puE1 (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) MgCl<sub>2</sub>, 1 µl (1 mM) DTT, 1 µl (2 mM) dGTP, 0,5 µl (200 mM) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 6,5 µl H<sub>2</sub>O) und der Ansatz mit 40 µl PCR-Öl überschichtet. Eine PCR-Maschine wird auf 94 °C vorgewärmt und die mRNA-cDNA-Hybride darin 4 min denaturiert, die cDNA ist danach nicht mehr an die Beads gekoppelt. 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 H<sub>2</sub>O. Die Proben werden in die PCR-Maschine gestellt und das LIB-Programm gestartet. Bei Erreichen der 78 °C werden 2,5 µl CP2-Primer (24 µM), 1,75 µl dNTPs (10 mM) und 1,5 µl Expand Long Template PolMix (5,25 U) zugefügt.

PCR-Programm für die cDNA Primäramplifikation:

Schritt	Temperatur	Zeit (h:min:sec)	Zyklen
1	78.0°C	00:00:30	20 Zyklen
2	94.0°C	00:00:15	
3	65.0°C	00:00:30	
4	68.0°C	00:02:00	
5	94.0°C	00:00:15	20 Zyklen
6	65.0°C	00:00:30	
7	68.0°C	00:02:30 +10 sec/Zyklus	
8	68.0°C	00:07:00	
9	4.0°C	forever	

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

### 2.2.5 Qualitätskontrolle

Zur Kontrolle der erfolgreichen Isolierung und globalen Amplifikation der mRNA und der daraus erlangten cDNA wird eine Multiplex-PCR durchgeführt (Quality Control, QC).

Zur Überprüfung der Qualität der primär gewonnenen cDNA aus den isolierten Einzelzellen, sowie der Reamplifikation von cDNA zur Durchführung weiterer Untersuchungen werden folgende Gene untersucht.

- EF1a (EEF1A1)
- $\beta$ -Aktin (ACTB)
- GAPDH

Reagenz	Volumen in $\mu$ l
10x FastStart PCR Buffer (20 mM MgCl <sub>2</sub> included)	1.0
Primer-Mix (enthält 3 Primerpaare)	1.0
dNTPs (10 mM)	0.2
BSA (20 mg/ml)	0.2
FastStart Taq Polymerase (5 U/ $\mu$ l)	0.1
PCR-Wasser	6.5
cDNA Template (1:5 verdünnt)	1.0

Schritt	Temperatur in °C	Zeit (min:sec)	Zyklen
1	95.0	04:00	
2	95.0	00:30	32 Zyklen
3	58.0	00:30	
4	72.0	00:90	
5	72.0	07:00	
6	4.0	forever	

Eine gute Qualität der hergestellten cDNA wird bei Expression von mindestens zwei der untersuchten Fragmente angenommen. Die Auswertung erfolgt mittels Agarose-Gelelektrophorese.

### 2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese

Die PCR-Produkte werden durch Gelelektrophorese aufgetrennt. Für die Arbeit mit cDNA wurden 3-prozentige Agarosegele verwendet. Zum DNA-Nachweis werden 3  $\mu$ l Ethidiumbromid hinzugegeben. Nachdem das Gel auspolymerisiert ist, wird es in die Elektrophoresekammer gelegt und mit 1x TBE-Puffer bedeckt. Die PCR-Proben werden mit 3  $\mu$ l Dye (0,3 % Orange G, 25 % Ficoll in TBE) gemischt und in die Geltaschen geladen. Außerdem werden Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt. Zur späteren Bestimmung der Fragmentlänge wird ein geeigneter Längenstandard (z.B. 1 kb Plus DNA Ladder, low molecular weight ladder) ebenfalls in eine oder mehrere Geltaschen geladen. Das Elektrophorese-Netzgerät wird auf 160 V, 400 mA eingestellt und die Proben 45 min mit einem Horizontal-Gelelektrophorese-System aufgetrennt. Anschließend wird das Gel auf einem UV-Schirm zur weiteren Auswertung und Dokumentation digitalisiert.

Nur bei erfolgreicher Positivkontrolle und verunreinigungsfreier Negativkontrolle wird ein Experiment gewertet. Die Fragmentlänge wird anhand des Längenstandards abgelesen.

## 2.2.7 Etablierung einer PCR zum Nachweis spezifischer Markergene

### 2.2.7.1 *Auswahl der Gene*

Zur Auswahl der untersuchten Gene werden die Ergebnisse bereits vorab durchgeführte Mikroarray-Untersuchungen verwendet. Als Auswahlkriterien werden der „log2fold“, die Differenz zwischen den Mittelwerten zweier Gruppen und die Standardabweichung genutzt. Das Signifikanzniveau liegt unter 0,05. Eine Auflistung der Gene findet sich unter 2.3.2 ab Seite 24.

### 2.2.7.2 *Aussuchen der Primer*

Zur Suche passender Primer wird die Homepage des „National Center for Biotechnology Information“ (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) verwendet. Das Programm errechnet mögliche Primerpaare und gibt auch Vorhersagen zu ihren Eigenschaften ab. Es ist essenziell, dass eine zu starke Selbstkomplementarität ausgeschlossen ist, da die Primer sich dann vor allem gegenseitig binden würden und dadurch nicht das gewünschte PCR-Produkt entsteht. Erstrebenswert ist außerdem, Primerpaare zu finden, die zumindest einen Teil der im Mikroarray untersuchten Gensequenz amplifizieren und die über eine Exongrenze hinweg lokalisiert sind, da so eventuell vorhandene genomische DNA, die Introns besitzt, nicht als Matrize infrage kommt. Die Länge der Primer soll etwa 20 bp betragen.

### 2.2.7.3 *Gradienten-PCR*

Alle Primer wurden mit einer Gradienten-PCR auf ihre optimale Annealingtemperatur untersucht.

Im ersten Schritt wird in einer PCR (Ansatz und PCR-Programm siehe 2.2.5) mit cDNA verschiedener Melanom-Zelllinien ein Template für eine Gradienten-PCR bestimmt. Die Annealingtemperatur wird anhand eines Temperaturgradienten in einem Block der PCR-Maschine so abgestuft, dass jedes Reaktionsgefäß zum Primerannealing auf eine andere Temperatur eingestellt wird. Der Temperaturgradient wird mit einer passenden Temperaturspanne (um die berechnete Annealingtemperatur, meist 55 -65 °C) durchgeführt. Die optimale Temperatur zum Annealing der Primer wird durch die stärkste Bande in der Agarose-Gelelektrophorese bestimmt.

Reagenz	Volumen in $\mu\text{l}$
10x Fast Start PCR Buffer	1,0
dNTPs (10 mM)	0,2
Forward Primer (8 $\mu\text{M}$ )	0,5
Reverse Primer (8 $\mu\text{M}$ )	0,5
BSA (20 mg/ml)	0,2
H <sub>2</sub> O	7,0
Fast Start Taq Polymerase (5 U/ $\mu\text{l}$ )	0,1
cDNA eines Zellpools (1:5)	0,5

Schritt	Temperatur in $^{\circ}\text{C}$	Zeit (mm:ss)	Bemerkung
1	95	06:00	
2	95	00:30	35 Zyklen
3	Gradient (von 55-65)	00:30	
4	72	00:30	
5	72	02:00	
6	4	forever	

#### 2.2.7.4 Restriktionsverdau

Zum Nachweis, dass auch tatsächlich das gewünschte Amplikon entstanden ist, wird das gewonnene Amplikon mit einem Restriktionsenzym verdaut. Mit einer Software (<https://nc2.neb.com/NEBcutter2/>) können die zu erwartenden DNA-Fragmente errechnet werden. Im Anschluss an den Verdau erfolgte eine Darstellung der DNA-Fragmente auf einem Agarose-Gel.

Die Reaktionstemperatur wird gemäß der Empfehlung des Herstellers gewählt. Bei den meisten Enzymen beträgt sie 37,0  $^{\circ}\text{C}$ .

Reagenz	Volumen in $\mu\text{l}$
PCR-Produkt	20
NEB Cutsmart Buffer	3,0
BSA (20 mg/ml)	0,3
H <sub>2</sub> O	6,7

Schritt	Temperatur in $^{\circ}\text{C}$	Zeit in Minuten
1	95	2
2	Reaktionstemperatur des Enzyms	180
3	65	20
4	4	forever

#### 2.2.7.5 Standardkurven

Idealerweise verdoppelt sich die DNA innerhalb eines PCR-Zyklus (Effizienz=100 %). Um die tatsächliche Effizienz herauszufinden, wird eine Verdünnungsreihe einer DNA-Probe erstellt (z.B. in 1:2, 1:5 oder 1:10 Verdünnungsschritten). Eine Effizienz von 100 % (entspricht einer Verdopplung pro Zyklus) vorausgesetzt, kennt man den genauen Abstand, den die einzelnen Verdünnungsstufen voneinander haben sollen. Abweichungen davon werden in die tatsächliche Effizienz der Primer umgerechnet. Primer mit Effizienzen von >90 % wurden als ausreichend gewertet und in den weiteren Untersuchungen eingesetzt. Primerpaare mit geringerer Effizienz wurden nicht weiterverwendet.

#### 2.2.8 PCR zum Nachweis der Expression spezifischer Markergene

Bereits etabliert war im Labor eine PCR zum Screening aller isolierter Einzelzellen aus SLN, LADN und CLN. Dieses Screening wird im Folgenden Markerscreening genannt.

Im Markerscreening wird die Expression melanozytärer Marker, im Folgenden Melanommarker genannt, an der zuvor hergestellten cDNA der Einzelzellen untersucht. Die PCR wird wie die Kontroll-PCR für cDNA (s. 2.2.5) durchgeführt.

Folgende melanozytäre Marker wurden im gesamten Kollektiv bestimmt.

- gp100 (PMEL)
- MelanA (MLANA)
- TRP2 (DCT)

Reagenz	Volumen in $\mu\text{l}$	Schritt	Temperatur ( $^{\circ}\text{C}$ )	Zeit (mm:ss)	Bemerkung
Puffer + dNTPs	1,0	1	94	02:00	
Forward Primer (8 $\mu\text{M}$ )	0,5	2	58/62	00:30	
Reverse Primer (8 $\mu\text{M}$ )	0,5	3	72	02:00	
BSA (20 mg/ml)	0,25	4	94	00:15	15 Zyklen
H <sub>2</sub> O	6,65	5	58/62	00:30	
PanTaq	0,1	6	72	00:20	
cDNA der WTA (1:5)	1,0	7	94	00:15	25 Zyklen
		8	58/62	00:30	
		9	72	00:30	
		10	72	02:00	

Die Annealingtemperatur für TRP2 beträgt 58  $^{\circ}\text{C}$ , für MelanA und gp100 62  $^{\circ}\text{C}$ .

### 2.2.9 Reamplifikation von cDNA

Um die begrenzten Vorräte der originalen cDNA der Einzelzellen zu vergrößern, wird vor umfassenden Analysen eine Reamplifikation der cDNA durchgeführt.

Reagenz	Volumen ( $\mu\text{l}$ )
Expand Long Template Buffer (10x) (Roche)	5.0
CP-7C Primer	6.0
dNTPs (10mM)	1.75
Formamid (20 %)	7.5
Polymerase Mix (5U/ $\mu\text{l}$ ) (Roche)	1.5
H <sub>2</sub> O	27.25
cDNA	1.0

Schritt	Temperatur ( $^{\circ}\text{C}$ )	Zeit (min)	Bemerkung
1	95.0	01:00	
2	94.0	00:15	5 Zyklen
3	60.0	01:00	
4	65.0	03:30	
5	94.0	00:15	3 Zyklen
6	60.0	01:00	
7	65.0	03:30 + 10 sec/Zyklus	
8	65.0	07:00	
9	4.0	forever	

Die Qualitätskontrolle der Reamplifikation erfolgt wie bei der primären Amplifikation (s. 2.2.5).

### 2.2.10 Aufreinigung der Reamplifikation

Die Aufreinigung der cDNA-Produkte nach Reamplifikation erfolgte mit dem Purification Kit von Qiagen anhand des Herstellerprotokolls. 40 µl der amplifizierten cDNA werden mit 200 µl PB-Puffer versetzt, auf eine QIAquick Säule aufgetragen und bei 17900 g abzentrifugiert. Zum Waschen wird danach 750 µl PE-Puffer hinzugefügt und zweimal abzentrifugiert. Dabei werden überschüssige Reaktionsprodukte sowie DNA-Fragmente mit weniger als 40 Basenpaaren entfernt. Die cDNA wird im Anschluss mit 20 µl RNA-freiem Wasser eluiert.

### 2.2.11 Messung der cDNA-Konzentrationen und Verdünnung

Mithilfe des NanoDrop 2000c Spektrophotometers werden die Konzentrationen der aufgereinigten Reamplifikationsprodukte gemessen. Das Programm muss dafür auf DNA eingestellt werden. Jeder Messreihe geht eine Eichung mit RNA-freiem Wasser voraus. Im Anschluss wird je 1 µl der cDNA-Lösungen gemessen. Der Mittelwert aus drei Messungen wird dann zur Berechnung der Verdünnungen auf 1 ng/µl hergenommen.

### 2.2.12 qPCR

Zur genaueren Bestimmung der Expression einzelner Gene in MCSP-positiven Zellen wurde die quantitative PCR (qPCR) verwendet. Mithilfe der Messung von Fluoreszenz in den einzelnen Reaktionsgefäßen kann die Zunahme der DNA bestimmt werden, je mehr DNA vorhanden ist, desto höher ist die Fluoreszenz. Anders als in einer konventionellen PCR, bei der man nur den Endpunkt der Reaktion auf einem Gel festhält, wird hier die gesamte Reaktion aufgezeichnet. Der Zyklus, in dem sich die Fluoreszenz vom Ausgangswert signifikant unterscheidet, wird als Ct-Wert (crossing threshold) bezeichnet. Anhand des Ct-Wertes kann die Expression in verschiedenen Zellen miteinander verglichen werden. Zellen mit einer höheren Expression des untersuchten Gens überschreiten schneller den crossing threshold und haben dadurch einen niedrigeren Ct-Wert. Als positiver Nachweis eines untersuchten Gens wurde ein Ct-Wert < 30 angesehen. Ct-Werte > 30 wurden als negativ gewertet.

#### 2.2.12.1 Durchführung der qPCRs

Wichtig für die Vergleichbarkeit der Ergebnisse ist, dass die eingesetzte Menge der cDNA von jeder Zelle identisch ist. Um das zu erreichen, mussten von der primär hergestellten cDNA Reamplifikationen hergestellt (2.2.9), diese mithilfe einer Kontroll-PCR (s. 2.2.5) auf ihre Qualität untersucht, danach dann mithilfe des Qiagen DNA Purification Kit aufgereinigt und im Anschluss mithilfe eines Photospektrometers die Konzentration der cDNA gemessen

werden. Daraufhin erfolgte die Verdünnung des Samples auf 1 ng/µl. In jedes Reaktionsgefäß werden 5 ng cDNA eingesetzt.

Die qPCR wird in 96-well-Platten durchgeführt. Um fehlerhafte Ergebnisse zu erkennen und auszuschließen, wird in der qPCR mit Triplikaten gearbeitet, d.h. jede Reaktion wird dreifach durchgeführt. Dadurch können eventuelle Pipettierungenauigkeiten erkannt und eliminiert werden.

Um eine Verunreinigung der Reaktion zu erkennen, lief immer auch eine Negativkontrolle bestehend aus 15 µl Mastermix und 5 µl Wasser mit.

Da der Mastermix nicht immer exakt gleich hergestellt werden kann, wird auf jeder Platte ein Triplikat eines Kalibrators aufgebracht. Der Kalibrator wird vor dem Beginn einer Reaktionsreihe in ausreichender Menge hergestellt und ebenfalls auf 1 ng/µl verdünnt. Mit der Differenz der Ct-Werte des Kalibrators auf den verschiedenen Platten können die Ergebnisse der untersuchten Zellen einander angeglichen werden. So erhält man vergleichbare Ergebnisse.

In allen qPCR-Experimenten wurde so verfahren. Das Ergebnis der qPCR ist der sogenannte Ct-Wert, der angibt, in welchem PCR-Zyklus eine festgelegte Menge an DNA in einem Reaktionsgefäß vorliegt. Kleinere Ct-Werte stehen also für mehr Amplifikation als größere.

Reagenz	Menge in µl
iQ SYBR Green Supermix	10
Forward Primer (8 µM)	1
Reverse Primer (8 µM)	1
PCR-H <sub>2</sub> O	3
cDNA (1 ng/µl)	5

	Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (mm:ss)	Bemerkung	Heizgeschwindigkeit in °C/s	Fluoreszenzmessung
Prä-Inkubation	1	95	05:00		4,4	
Amplifikation	2	95	00:20	40 Zyklen	4,4	
	3	Annealingtemp. des Primers	00:15		2,2	
	4	72	00:15		4,4	Messung am Ende der Elongation
Schmelzkurve	5	95	00:05		4,4	
	6	50	01:00		2,2	
	7	95			Dauerhaft 0,11	5x pro sec.
Abkühlung	8	40			2,2	

### 2.2.12.2 Schmelzkurve

Mithilfe einer Schmelzkurve, bei der die Temperatur langsam erhöht wird, kann man die Spezifität einer Reaktion erkennen. Doppelsträngige DNA „schmilzt“, d.h. trennt sich in Einzelstränge, bei einer bestimmten Temperatur, je nach Größe und Beschaffenheit der DNA.

Diese Temperatur wird durch regelmäßige Fluoreszenzmessung während der Temperaturerhöhung festgestellt. Bei einer ideal verlaufenen Reaktion ist nur ein Produkt entstanden, es wird also nur bei einer Temperatur eine Auftrennung der DNA-Doppelstränge gefunden, dort wird ein Peak gezeichnet. Wenn es mehrere Peaks gibt, war die Reaktion nicht spezifisch.

Nach dem 40. Amplifikationszyklus werden die Primer durch Erhitzen auf 95°C von den DNA-Strängen getrennt. Im Anschluss wird das Reaktionsgefäß auf 50°C abgekühlt, um die DNA-Stränge wieder binden zu lassen. Dann wird kontinuierlich die Temperatur erhöht, sowie 5x pro Sekunde eine Fluoreszenzmessung durchgeführt, bis 95°C erreicht sind. Hierbei kann die Schmelztemperatur dargestellt werden. Danach erfolgen eine Abkühlung auf 40°C und die Beendigung des Programms.

### 2.2.13 Nachweis von BRAF- und NRAS-Mutationen

Zum Nachweis von in Melanomen bekannten Mutationen im Protoonkogen BRAF und im Onkogen NRAS führten wir an der genomischen DNA unserer Einzelzellen eine Sequenzierung (Sanger Sequenzierung) durch ein externes Labor (Eurofins) an DNA-Proben durch. Hierfür erfolgte durch uns zuerst die PCR zur Replikation von BRAF und NRAS, anschließend die Auswertung mittels Gelelektrophorese und der Versand an das Labor zur Durchführung der Sequenzierung.

Reagenz	Volumen in µl
Puffer + dNTPs	3,0
Forward Primer (8 µM)	1,5
Reverse Primer (8 µM)	1,5
BSA (20 mg/ml)	0,75
H <sub>2</sub> O	19,95
PanTaq	0,3
DNA (1:5 verdünnt)	3,0

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (min)	Bemerkung
1	94	02:00	
2	60 (BRAF)/ 54 (NRAS)	00:30	
3	72	02:00	
4	94	00:15	14 Zyklen
5	60/54	00:30	
6	72	00:20	
7	94	00:15	24 Zyklen
8	60/54	00:30	
9	72	00:30	
10	72	02:00	

### 2.2.14 Statistische Berechnungen

In dieser Arbeit wurden der Chi-Quadrat-Test und der Fisher´s-Exact-Test genutzt. Hierfür wurde eine kostenfreie Software eingesetzt (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/contingency1/>).

Weiterhin wurden mithilfe von SPSS 25 von IBM der Mann-Whitney- U Test und uni- (Kaplan-Meier) bzw. multivariate (Cox-Regression) Überlebensanalysen durchgeführt.

## 2.3 Material

### 2.3.1 Reagenzien

Name	Firma	Artikelnr
dNTP Set ;100 mM each A,C,G,T; 4x 24 µM	VWR International GmbH	28-4065-51
Expand Long Template PCR System, 3600U	Roche Diagnostics GmbH	11759060001
Formamid BioUltra, for molecular biology, ≥99,5 % (T)	Sigma Aldrich GmbH	47671-250ML-F
Igepal CA-360 viscous liquid, 50 ml	Sigma Aldrich GmbH	I3021-50ml
mTRAP™ Lysis Buffer, 100 ml	Active Motif	29011
PAA-Carrier	siehe Rezepturhandbuch	
Poly T gripNA™ Probe (from mTRAP™ Midi)	Active Motif	29008
Protease, 20 mg	Active Motif	29012
Streptavidin Beads (from mTRAP™ Midi), 1,6 ml	Active Motif	29010
SuperScript® II Reverse Transcriptase, 4x 10.000 U	Thermo Fisher Scientific	11553117
Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (rTdT), Recombinant, 2500 U	Affymetrix	72033
Tris-Puffer pH 8,0 (1M) für Molekularbiologie, 1000 ml	AppliChem	A4577,0500
tRNA from <i>E. coli</i> MRE 600, 100 mg	Roche Diagnostics GmbH	10109541001
TWEEN® 20, for molecular biology, viscous liquid	Sigma Aldrich GmbH	P9416-50ml
UltraPure DEPC-Treated Water, 1 l	Invitrogen GmbH	750023
Agarose	Anprotec	
Ethidium Bromide Solution (10 mg/ml)	Sigma Aldrich	E1510-10ML
1 kb Plus DNA Ladder+ Dye	New England Biolabs	N3200S
LMW ladder	New England Biolabs	
2-log DNA Ladder	New England Biolabs	N3200S
1X TBE-Puffer	siehe Rezepturhandbuch	
FastStart PCR Puffer (+MgCl <sub>2</sub> )	Roche	
FastStart dNTP Mix	Roche	
BSA (FastStart Kit)	Roche	
PCR-H <sub>2</sub> O	VWR International GmbH	1.15333.1000
iQ SyBr Green Supermix	BIO Rad	1708885
LightCycler® 480 SYBR Green I Master für QM	Roche Diagnostics	04887352001
dNTP-Set; 100 mM each A,C,G,T; 4x 25 µM	GE Healthcare Europe	28-4065-51
FastStart Taq DNA Polymerase, dNTPack, 1000 U	Roche Diagnostics	04738381001
BSA (20 mg/ml)	Roche Diagnostics	10711454001
Ethanol absolut	VWR Chemicals	20821.330
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen	28106
PB Puffer	Qiagen	28106
PE Puffer	Qiagen	28106
AB-Serum	BIO Rad	805-135-MSDS
Mouse Anti Chondroitin Sulfate, Monoclon AB unconjung. (Clone 9.2.27)	Becton-Dickinson	554275
Ziege Anti-Maus IgG, Cy3 markiert	Dianova	115-166-071
Pepton	siehe Rezepturhandbuch	
PBS pH 7.4	siehe Rezepturhandbuch	
FCS	Pan Biotech GmbH	P30-3702

## 2.3.2 Primer

Name	Sequenz 5'→ 3' (N=A/T/C/G ; V=A/C/G)	Schnittstellen für Restriktionsenzyme
<b>CFL5CN8</b>	CC C CCC CCC CCC GTC TAG ANN NNN NNN	XbaI
<b>CFL15CT24BpuEI</b>	CCC CCC CCC CCC CCC GTC TAG ACT TGA GTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TVN	XbaI, BpuEI
<b>CP2</b>	TCA GAA TTC ATG CCC CCC CCC CCC	EcoRI

Name	Sequenz (5'→ 3')	Annealing- temperatur	Fragment- länge
GAPDH_for	CCA TCT TCC AGG AGC GAG AT	62,7 °C	489bp
GAPDH_rev	CAG TGG GGA CAC GGA AGG	62,6 °C	489bp
ACTB_for	GCG TGA CAT TAA GGA GAA GCT G	61,3 °C	378bp
ACTB_rev	CGC TCA GGA GGA GCA ATG AT	62,8 °C	378bp
EF1alpha 5'	CTG TGT CGG GGT TGT AGC CA	63,1 °C	290bp
EF1alpha 3'	TGC CCC AGG ACA CAG AGA CT	63,5 °C	290bp
TP53 Exon2/3 3'	CAG CCC AAC CCT TGT CCT TA	58°C	301bp
TP53 Exon2/3 5'	GAA GCG TCT CAT GCT GGA TC	58°C	301bp
BRAF 3'	CTC TTC ATA ATG CTT GCT CTG	60°C	171 bp
BRAF 5'	TCC AGA CAA CTG TTC AAA CTG	60°C	171 bp
NRAS 61 SebFW	ACA CCC CCA GGA TTC TTA CA	54°C	174 bp
NRAS 61 SebRev	TCC GCA AAT GAC TTG CTA TT	54°C	174 bp
MelanA 3'	GCTCATCGGCTGTTGGTATT	62°C	190 bp
MelanA 5'	ATAAGCAGGTGGAGCATTGG	62°C	190 bp
gp100 3'	CCTCTTGCTCATTCCAGCTC	62°C	195 bp
gp100 5'	TCCAAAGTCCCAGGTGTAGG	62°C	195 bp
TRP2 3'	AACCTTCCAAAGCATTCT	58°C	223 bp
TRP2 5'	CCAGCTGGGAAACTGTCTGT	58°C	223 bp
RNF 150 qPCR1 3'	TCCATTCCCAGAGAGAGAATGC	59,56 °C	101 bp
RNF 150 qPCR1 5'	TGCAATCAATTCTGATTACCT	58,65 °C	101 bp
RNF 150 qPCR2 3'	GACGATGAGGGGTCTGAAAGG	60,13 °C	100 bp
RNF 150 qPCR2 5'	TGGTAAGTAGTGAATGGCAAAGG	56,67 °C	100 bp
DUSP7 qPCR1 3'	CAGGCTACATGCAACAGTGG	59,19 °C	170 bp
DUSP7 qPCR1 5'	TCAAGGTCAACATGGCGTCT	59,60 °C	170 bp
DUSP7 qPCR2 3'	TGAAGGGGTGCTTACTGCT	61,11 °C	106 bp
DUSP7 qPCR2 5'	CAGAGTCATCACAGGCGAA	60,67 °C	106 bp
CCDC66 qPCR1 3'	AGGAAAGGTCTCCATCATCACC	59,49 °C	217 bp
CCDC66 qPCR1 5'	GGTGCATCGGGATCAAGGT	59,78 °C	217 bp
CCDC66 qPCR2 3'	ATTGTCTGGGCCTTCAACCC	60,2 °C	145 bp
CCDC66 qPCR2 5'	GATTGCTTGCTGTGCATCCC	59,3 °C	145 bp
RMB25 qPCR1 3'	TTGCTTTGGTGGGGTCCTTA	59,15 °C	137 bp
RMB25 qPCR1 5'	CTCACGACACGAGAACACCA	59,97 °C	137 bp
FBXO25 qPCR1 3'	GAGTGTCTGTGAGGTGGGTG	60,54 °C	102 bp
FBXO25 qPCR1 5'	AAATGCAACCATGCAGTCCCC	61,78 °C	102 bp
NFE2L1 qPCR1 3'	TGTGAACCTGGGAGTGCTTTT	60,06 °C	124 bp
NFE2L1 qPCR1 5'	TTTTATTTTGTGCATGTGCTCAACAG	57,30 °C	124 bp
VRTN qPCR1 3'	TCTCCCGTAGGAACTGTGG	58,74 °C	109 bp
VRTN qPCR1 5'	GCCAACCAACCACTCAAATC	60,00 °C	109 bp
NDNF qPCR1 3'	CCCACAGTTGAGAGAAGTTGTG	59,13 °C	158 bp
NDNF qPCR1 5'	ATCTTTGACACCAACCGGCA	60,18 °C	158 bp
RAPH1 qPCR1 3'	TGAGGATGTTTTTGTCTGCTGG	59,68 °C	219 bp
RAPH1 qPCR1 5'	GGTGCCGATCCACAAACACT	60,89 °C	219 bp
SMOC qPCR1 3'	GGGTCTTGGGCTAAAGGAGG	59,74 °C	101 bp
SMOC qPCR1 5'	CCTTCCCACCTTCCACGTT	60,18 °C	101 bp
RELA qPCR1 3'	CACACAACACTGAGCCCATGCT	60,89 °C	171 bp
RELA qPCR1 5'	TGAGAAGTCCATGTCCGCAA	59,32 °C	171 bp
SSH2 qPCR1 3'	TGGATGGTGTGGTGGGTTTC	59,67 °C	143 bp

SSH2 qPCR1 5'	TGCTCCAGTTCATTCTTCCACC	60,55 °C	143 bp
SSH2 qPCR2 3'	TTCATTTGGATGGTGATGGTGG	58,90 °C	101 bp
SSH2 qPCR2 5'	TGAATCCCTGTCAACCCACA	58,86 °C	101 bp
SSH2 qPCR3 3'	CATTTGGATGGTGATGGTGGG	59,24 °C	103 bp
SSH2 qPCR3 5'	TCCTTGAATCCCTGTCAACCC	59,65 °C	103 bp
SSH2 qPCR4 3'	AATGGATTTCTCTCTAATGACAGT	57,79 °C	100 bp
SSH2 qPCR 4 5'	GAACCCACCATCACCATCCA	59,67 °C	100 bp
PRKCH qPCR1 3'	CCTGAATGGTGTTCATTCTGT	59,99 °C	98 bp
PRKCH qPCR1 5'	GGCAGTGACCCCTTCTTGTGA	59,89 °C	98 bp
PRKCH qPCR2 3'	TGTGAAATGCCTCTCCACGTT	60,20 °C	111 bp
PRKCH qPCR 2 5'	CACCTGTAATTCACCCGCTG	58,91 °C	111 bp
GRAP2 3'	AGCACAAAGCAGTGTCCCTTG	60,82 °C	104 bp
GRAP2 5'	CTCCCAATACCCACCACAGAG	59,79 °C	104 bp
Tyr qPCR1 3'	ATATTGGGACTGGCGGGATG	59,6 °C	181 bp
Tyr qPCR1 5'	CTCGGGCGTTCCATTGCATA	60,8 °C	181 bp
Tyr qPCR2 3'	AGGTCAGCACCCACAAATC	60,25 °C	122 bp
Tyr qPCR2 5'	TTTATGCAATGGAACGCCCG	59,55 °C	122 bp

### 2.3.3 Geräte

Pipetten (10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl)
Pipettenspitzen (10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl)
Tubeständer (1,5 µl & 0,2 µl)
Elektrophoresekammer (Schlitten & Käbme) aus Plexiglas
Geldokumentationssystem
Mikrowelle
Magnetständer für 0,2 ml Tubes
Hybridisierungsöfen mit Rotor
Roller
Thermocycler
Axygen 0,2ml-Tubes
PCR-Cycler mit Gradientenfunktion
8-Kanal Pipette (Brand oder Eppendorf)
Multistep Pipette (Eppendorf Multipette)
Vortexer
Tischzentrifuge und Tischzentrifuge für Platten
Transparente 96-Well Platte und intransparente, weiße 96-Well Platte
PCR-Siegelfolie
Nanodrop2000
Durchlichtmikroskop
Mikromanipulator
Medimaschine
LightCycler® 480

## 2.4 Abkürzungsverzeichnis

WTA	Whole Transcriptome Amplification
WGA	Whole Genome Amplification
PNA	Peptide Nucleic Acid (Peptid-Nukleinsäure)
dNTPs	Deoxynucleotidtriphosphates
TdT	Terminale Desoxyribonukleotidyltransferase
PCR	Polymerasekettenreaktion
qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion
gDNA	genomische DNA
cDNA	komplementäre DNA
LMW	low molecular weight
BSA	bovines Serumalbumin

FCS	Fetal calf serum
Ct-Wert	Crossing threshold
NCBI	National Center for Biotechnology Information
Pol Mix	Polymerase Mix
PBS	Phosphate buffered saline
MCSP	melanoma-associated chondroitin sulfate proteoglycan
Cy3	Cyanine 3
bp	Basenpaare
SLN	Wächterlymphknoten (Sentinel lymph node)
LADN	Lymphadenektomie-Lymphknoten
CLN	Kontrolllymphknoten
DCCD	Dichte der MCSP-positiven Zellen in der Zellsuspension (Einheit: 1/Million)
DCC	Disseminierte Krebszelle (disseminated cancer cell)
MCSP-positive Zelle	Nachweis des Oberflächenproteins mit Immunfluoreszenzfärbung
MCSP-negative Zelle	Ungefärbte Zelle aus einer mit MCSP gefärbten Lymphknotensuspension
CLN-Zellen	MCSP-positive Zellen aus Kontrolllymphknoten

### 3 Ergebnisse

Das Ziel der Arbeit war die Identifizierung MCSP-positiver Melanomzellen in Wächterlymphknoten durch Genexpressionsanalysen.

In Vorarbeiten des Lehrstuhls wurden zwei Färbemethoden (MCSP- und gp100-Färbung) etabliert, mittels derer Lymphknotensuspensionen der Wächterlymphknoten (SLN) auf disseminierte Melanomzellen getestet wurden.

Die gp100-Färbung färbte spezifisch Melanomzellen (Ulmer et al., 2005), methodenbedingt war es aber nicht möglich, die mRNA der gp100-positiven Zellen zu untersuchen. Die MCSP-Färbung färbte nicht spezifisch, es konnte aber die mRNA für Untersuchungen der Genexpression gewonnen werden. Einige MCSP-positive Zellen wurden mittels komparativer genomischer Hybridisierung als Melanomzellen identifiziert (Scheitler, 2013).

Die Probenbank mit einzeln isolierten MCSP-positiven Zellen aus SLN von Melanompatienten und Lymphknoten von tumorfreien Patienten (CLN) wurde 2008 begründet. Die CLN dienten als Negativkontrollen. Bei einigen Melanompatienten wurde nach histopathologisch nachgewiesener Wächterlymphknotenmetastasierung noch eine weiterführende Lymphknotenentnahme, eine regionale Lymphadenektomie (LADN), durchgeführt. Es konnte mehr als ein Lymphknoten je Patient zur Verfügung stehen. Aus Lymphknoten konnten mehrere einzelne Zellen isoliert werden, deren mRNA, in cDNA überführt, für die Untersuchung der Genexpression zur Verfügung stand.

Die vorliegende Arbeit betrachtet unter Berücksichtigung und Fortführung der Vorarbeiten die MCSP-Färbung und die MCSP-positiven Zellen in vier Abschnitten, beginnend mit der Betrachtung ganzer Lymphknoten über die verschiedenen MCSP-positiven Zellgruppen bis zu Genexpressionsuntersuchungen mit anschließender statistischer Analyse des Patientenkollektivs anhand experimenteller und klinischer Daten (*Abbildung 1*).

### **1. DCC-Nachweis in Lymphknoten**

- Unterschiede der  $DCCD_{MCSP}$  zwischen SLN, CLN und LADN
- Vergleich  $DCCD_{MCSP}$  und  $DCCD_{gp100}$

### **2. Morphologie MCSP-positiver Zellen**

- Zusammenhang der Zellmorphologie mit  $DCCD_{MCSP}$  und histopathologischem Lymphknotenstatus
- Vorkommen der unterschiedlichen Zellmorphologien in SLN, CLN und LADN

### **3. Genexpression MCSP-positiver Zellen**

- cDNA-Qualitätskontrolle
- Expression Melanom-assoziiierter Gene („Markerscreening“)
- Suche neuer Genexpressionsmuster („Mikroarrays“)
- MelanA-qPCR als spezifischer Test
- Weitere qPCR-Analysen
- Korrelation MelanA-qPCR mit  $DCCD_{MCSP}$

### **4. Statistische Analysen – Klinische Relevanz der Ergebnisse**

- Einfluss des MelanA-qPCR-Nachweises auf das Gesamtüberleben
- Multivariates Prädiktionsmodell mit neuen Faktoren

*Abbildung 1 Struktureller Aufbau des Ergebnisteils*

### 3.1 DCCD<sub>MCSP</sub> in CLN, SLN und LADN

#### 3.1.1 Unterschiede zwischen SLN, CLN und LADN

Der potenzielle Melanombefall der einzelnen Lymphknoten, nämlich der Anteil der gefärbten Zellen, wurde durch Bestimmung der ‚disseminated cancer cell density‘ (DCCD) quantifiziert. In Vorarbeiten wurde bereits gezeigt, dass MCSP-positive Zellen auch in CLN vorkommen.

Um den Anteil der MCSP-positiven Zellen an der Gesamtheit der Lymphknotenzellen zu bestimmen, wurden die DCCD<sub>MCSP</sub>-Werte aller CLN-, SLN- und LADN-Patienten erhoben. Anhand dieser Daten wurde untersucht, ob sich die DCCD<sub>MCSP</sub>-Werte zwischen CLN-, SLN- und LADN-Patienten unterscheiden. Hierfür wurde von jedem Patienten der Lymphknoten mit der höchsten DCCD<sub>MCSP</sub> gewertet.

Bereits in der Übersicht zeigte sich eine Aufteilung der Gruppen. CLN-Patienten hatten überwiegend DCCD<sub>MCSP</sub>-Werte von  $\leq 5$  (80,6 %), wohingegen bei LADN-Patienten DCCD<sub>MCSP</sub>-Werte mit  $>100$  die Regel waren (88,2 %). Die SLN-Patienten lagen dazwischen (Abbildung 2).

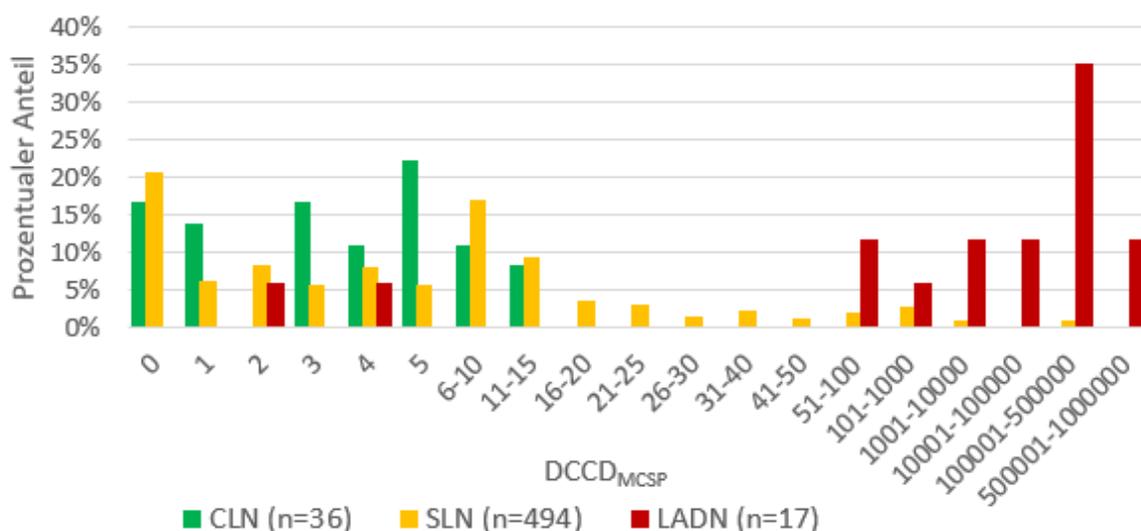


Abbildung 2 Verteilung der DCCD<sub>MCSP</sub> in CLN- (Median 4, Range 0-15), SLN- (Median 5, Range 0-400000) und LADN- (Median 50000, Range 0-800000) Patienten. Der Lymphknoten mit der höchsten DCCD<sub>MCSP</sub> wurde bei Patienten mit mehreren Lymphknoten gewertet.

Statistisch ließen sich signifikante Unterschiede beim Anteil der Patienten mit DCCD<sub>MCSP</sub>  $\leq 5$  zwischen den drei Gruppen feststellen (Tabelle 1).

**Tabelle 1: Statistischer Vergleich des Anteils der Patienten mit  $DCCD_{MCSP} \leq 5$**

	$DCCD_{MCSP} \leq 5$	$DCCD_{MCSP} > 5$	Fisher's exact test		
CLN (n=36)	29 (80,6 %)	7 (19,4 %)	p=0,0027		p<0,0001
SLN (n=494)	271 (54,8 %)	223 (45,2 %)		p=0,0007	
LADN (n=17)	2 (11,8 %)	15 (88,2 %)			

Aufgrund der CLN-Zellen war offensichtlich, dass nicht alle MCSP-positiven Zellen Melanomzellen sind.

Die MCSP-positiven Zellen werden in 3.3 näher beschrieben. Zunächst wurde überprüft, ob ein Zusammenhang zwischen der Höhe der  $DCCD_{MCSP}$  und der Histopathologie des SLN bestand.

### 3.1.2 Unterschiede der $DCCD_{MCSP}$ zwischen histopathologisch positiven und negativen SLN

Um zu überprüfen, ob eine histopathologisch in der zweiten SLN-Hälfte nachgewiesene Metastase mit höherer  $DCCD_{MCSP}$  korrelierte, wurden die  $DCCD_{MCSP}$  der SLN unterteilt nach dem Histopathologie-Status untersucht.

Hierfür wurden alle SLN, zu denen das histopathologische Ergebnis vorlag, eingeschlossen. Die  $DCCD_{MCSP}$  -Werte wurden wieder im Vergleich zu den CLN und LADN aufgetragen. In der Übersicht war zu sehen, dass die histopathologisch positiven SLN die höheren  $DCCD_{MCSP}$  zeigten im Vergleich zu den histopathologisch negativen SLN (*Abbildung 3*).

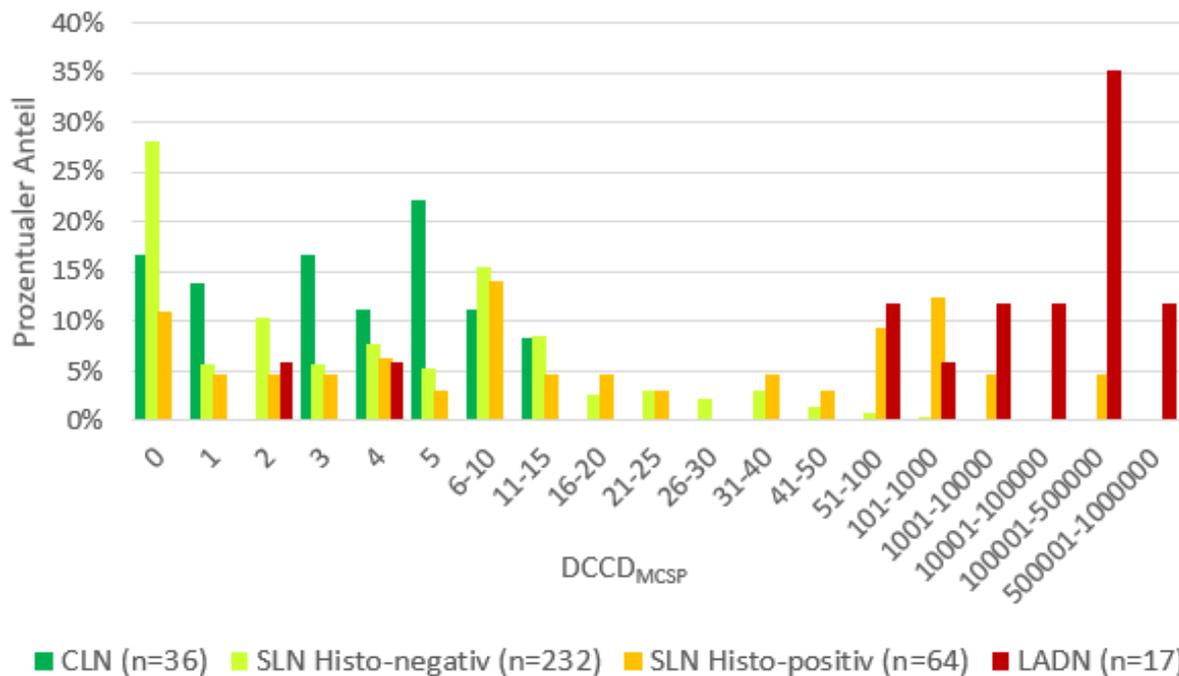


Abbildung 3 Verteilung der  $DCCD_{MCSF}$  in CLN- (Median 4, Range 0-15), histopathologisch negativen SLN- (Median 4, Range 0-106), histopathologisch positiven SLN- (Median 15, Range 0-400000) und LADN- (Median 50000, Range 0-800000) Patienten. Der Lymphknoten mit der höchsten  $DCCD_{MCSF}$  wurde bei Patienten mit mehreren Lymphknoten gewertet.

In der medianen  $DCCD_{MCSF}$  waren die zwei SLN-Gruppen zudem signifikant unterschiedlich zueinander (Abbildung 4).

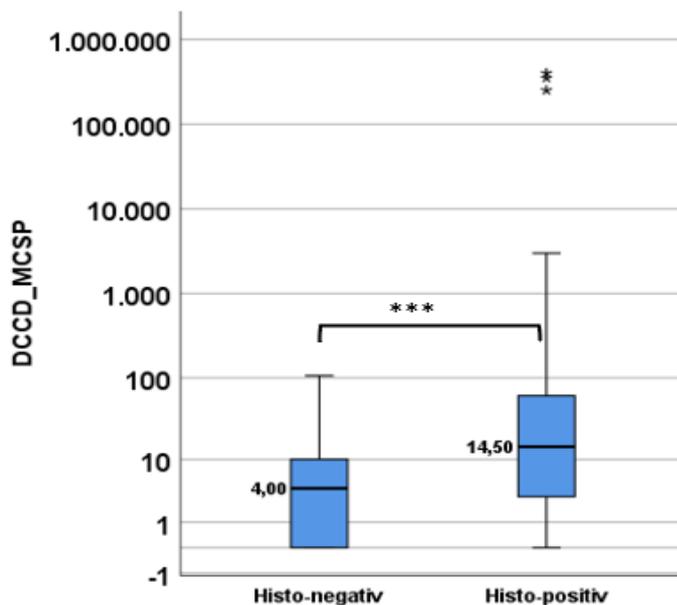


Abbildung 4  $DCCD_{MCSF}$ -Verteilung in SLN, aufgeteilt nach Histopathologie-Status negativ und positiv. Histo-negativ: Range 0-106, Histo-positiv Range 0-400000. Signifikanzen mittels Mann-Whitney-U-Test berechnet. \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ . Skala der y-Achse logarithmisch. Die Boxen beinhalten 50 % der Daten, die Antennen geben die minimalen und maximalen  $DCCD_{MCSF}$  an. Sterne sind extreme Ausreißer größer dem dreifachen Interquartilsabstand.

Patienten mit histopathologisch nachgewiesenen Lymphknotenmetastasen zeigten signifikant höhere  $DCCD_{MCSP}$ , was den vermuteten Zusammenhang zwischen Lymphknotenmetastasierung und der höheren  $DCCD_{MCSP}$  bestätigte.

Zwar hatten die histopathologisch negativen SLN in der medianen  $DCCD_{MCSP}$  von 4 keinen Unterschied zu CLN gezeigt, jedoch waren auch unter diesen maximale  $DCCD_{MCSP}$ -Werte von  $>50$  zu finden, wohingegen die maximale  $DCCD_{MCSP}$  der CLN-Zellen 15 war (*Abbildung 3*). MCSP-positive Zellen aus histopathologisch negativen SLN konnten also ebenfalls Melanomzellen enthalten.

So wie die  $DCCD_{MCSP}$  den Anteil der MCSP-positiven Zellen in den untersuchten Lymphknoten beschreibt, bestimmten wir mittels gp100-Färbung in den SLN auch die  $DCCD_{gp100}$ . Da mit beiden Färbungen Melanomzellen nachgewiesen werden, wurden die Methoden miteinander verglichen.

### 3.2 Korrelation zwischen $DCCD_{MCSP}$ und $DCCD_{gp100}$

Ein Teil der Lymphknotensuspension der Lymphknotenhälften, die im Labor aufgearbeitet und mit dem anti-MCSP-Antikörper gefärbt wurden, wurde auch mit einem anti-gp100-Antikörper gefärbt. Diese gp100-Färbung war bereits vor der MCSP-Färbung als spezifische Färbung von Melanomzellen etabliert. Sie wies keine unspezifische Detektion von CLN-Zellen auf. Bereits eine  $DCCD_{gp100} \leq 3$  führte zu einem signifikant schlechteren Patientenüberleben (Ulmer et al., 2014). Nachteilig war der Verlust der mRNA aufgrund der zytoplasmatischen Bindung des Antikörpers, welche eine Permeabilisierung der Zellmembran notwendig machte. Somit eignete sich die gp100-Färbung nicht für Untersuchungen der Genexpression.

Es sollte überprüft werden, ob die MCSP-Färbung in gleichem Maße Zellen der Lymphknotensuspensionen markierte, wie die spezifische gp100-Färbung.

In diese Analyse wurden nur Lymphknoten eingeschlossen, die sowohl mittels MCSP- als auch mittels gp100-Färbung untersucht wurden. Es lagen von 537 SLN sowohl die  $DCCD_{MCSP}$ - als auch die  $DCCD_{gp100}$ -Werte vor. Im Median betrug die  $DCCD_{MCSP} = 4$  und  $DCCD_{gp100} = 0$ .

Auffallend war, dass für  $DCCD_{gp100}=0$  sehr viele ( $n=268$ ) Lymphknoten MCSP-positiv waren. Hingegen waren nur 17 MCSP-negative Lymphknoten gleichzeitig gp100-positiv.

Insgesamt zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen den Ergebnissen der unterschiedlichen Färbemethoden (*Abbildung 5*).

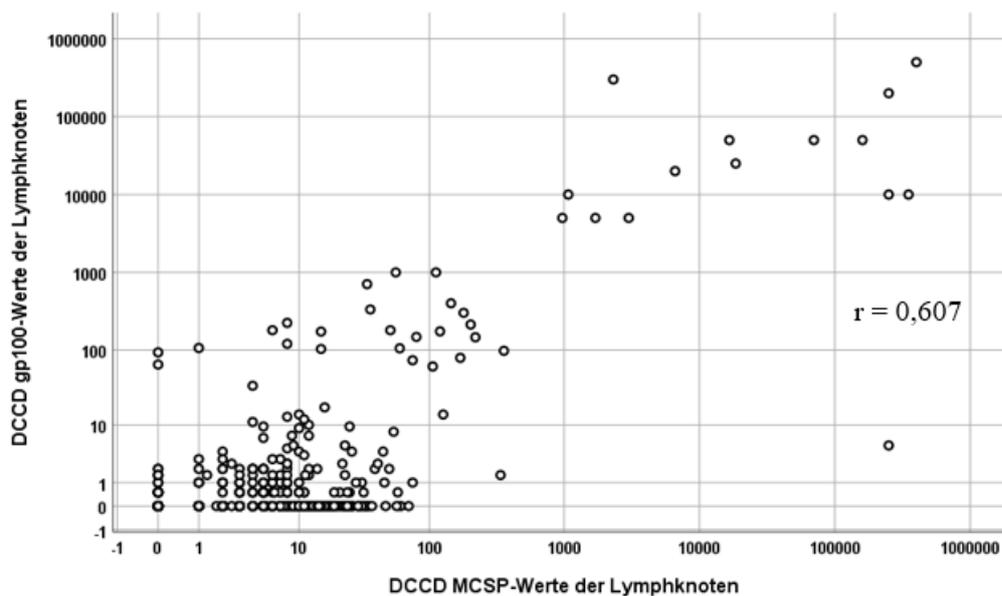


Abbildung 5 Vergleich der  $DCCD_{MCSP}$  und  $DCCD_{gp100}$  von SLN; Achsen mit logarithmischer Skalierung. Korrelationskoeffizient  $r$  nach Pearson. Signifikanz (2-seitig): 0,01

Durch die signifikante Korrelation wurde bestätigt, dass auch MCSP ein Marker zur Identifikation von DCCs ist. Interessant war jedoch, dass die Anzahl an gp100-negativen SLN, in denen MCSP-positive Zellen gefunden wurden, um ein Vielfaches höher war als umgekehrt. Hierbei galt es aber zu beachten, dass auch in CLN MCSP-positive Zellen gefunden wurden, somit konnten nicht alle MCSP-positiven Zellen auch Melanomzellen sein.

Die gp100-Färbung wird erst wieder bei den Überlebensanalysen mit einfließen. Zunächst werden die MCSP-positiven Zellen näher beschrieben.

### 3.3 MCSP-positive Zellen

Mithilfe des Melanommarkers MCSP konnten lebende Zellen isoliert und deren RNA gewonnen werden. Hierfür wurde eine Zellsuspension mittels Immunfluoreszenzfärbung untersucht, mithilfe des Antikörpers 9.2.27 konnte in MCSP ein Transmembranprotein detektiert werden. Somit war eine Permeabilisierung der Zellmembran vor der Färbung nicht nötig (s. 2.2.2).

Mittels MCSP-Färbung wurden in SLN von Melanompatienten bereits zwei morphologisch unterschiedliche Zelltypen identifiziert: große Zellen mit einem Durchmesser von etwa 15  $\mu\text{m}$  und kleine mit einem Durchmesser  $<8 \mu\text{m}$ . Im Mittel betragen die Durchmesser 14,63  $\mu\text{m}$  und 7,54  $\mu\text{m}$  (Naimer, 2016).

### 3.3.1 Assoziation der Zellmorphologie mit der $DCCD_{MCSP}$

Bei der Mikroskopie waren die unterschiedlichen Zellmorphologien aufgefallen. Eindrücklich war außerdem, dass die großen MCSP-positiven Zellen vor allem dann gefunden wurden, wenn die  $DCCD_{MCSP}$  der Lymphknotensuspension überdurchschnittlich hoch war. Sehr häufig war dies bei LADN der Fall.

Um diesen subjektiven Eindruck zu untersuchen, wurden die SLN und die LADN nach dem Vorkommen von nur kleinen MCSP-positiven Zellen, sowohl kleinen als auch großen MCSP-positiven Zellen und nur großen MCSP-positiven Zellen aufgeteilt. Diese Gruppen wurden dann anhand der  $DCCD_{MCSP}$  ausgewertet.

Es zeigte sich, dass in Lymphknoten, die nur kleine MCSP-positive Zellen aufwiesen, die  $DCCD_{MCSP}$  sowohl im Median als auch im Maximum deutlich niedriger lag als Lymphknoten mit großen Zellen. Die gemischt besiedelten Lymphknoten zeigten sich jeweils zwischen den anderen Gruppen (Abbildung 6).

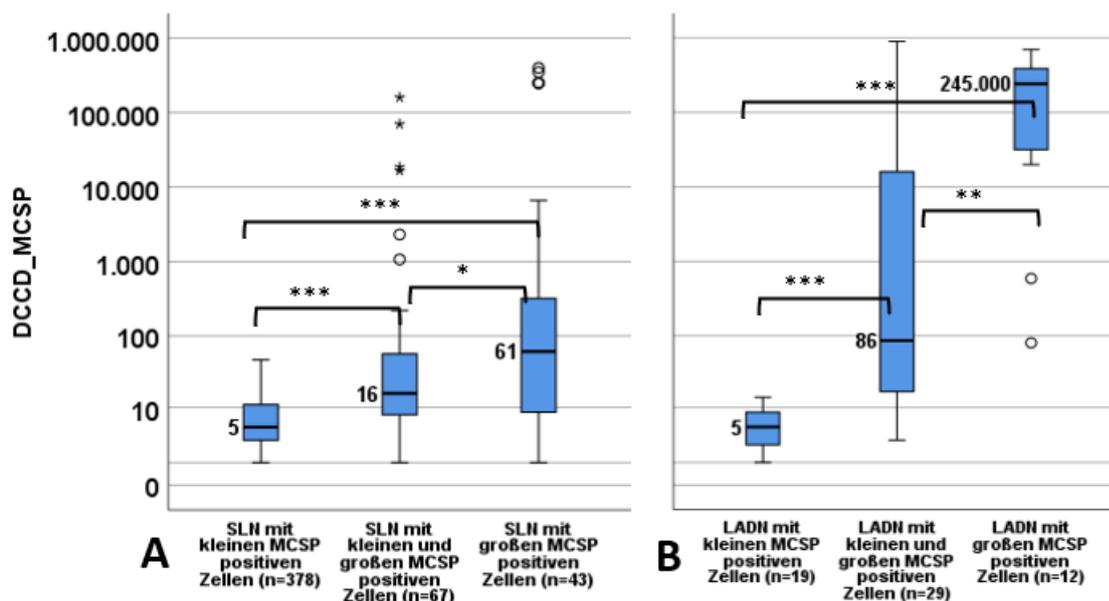


Abbildung 6  $DCCD_{MCSP}$  in SLN (A) und LADN (B) in Abhängigkeit von den gefundenen Zelltypen. Median im Diagramm links der Box angegeben. Range von links nach rechts: A 1: 1-47, 2: 1-160000, 3: 1-400000, B 1: 1-14, 2: 3-900000, 3: 80-700000. Signifikanzen mittels Mann-Whitney-U-Test berechnet. \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ . Skala der y-Achse logarithmisch. Die Boxen beinhalten 50 % der Daten, die Antennen geben die minimalen und maximalen  $DCCD_{MCSP}$  an. Kreise sind milde Ausreißer zwischen dem 1,5- bis 3-fachen Interquartilsabstand. Sterne sind extreme Ausreißer größer dem dreifachen Interquartilsabstand.

Durch die Boxplots wird klar ersichtlich, dass das Auftreten großer MCSP-positiver Zellen und eine hohe  $DCCD_{MCSP}$  zusammenhängen. Interessanterweise konnten die Lymphknoten mit beiden MCSP-positiven Zellmorphologien als eine Art Zwischenstufe zwischen den Lymphknoten mit einheitlicher Zellmorphologie dargestellt werden.

Weiterhin sollte untersucht werden, wie häufig die unterschiedlichen Zellmorphologien in den Lymphknoten vorkamen.

### 3.3.2 Assoziation der Zellmorphologie mit dem histopathologischen Lymphknotenstatus

Das Vorkommen der zwei beschriebenen MCSP-positiven Zellmorphologien wurde weiter untersucht, um zu überprüfen, ob diese unterschiedlich häufig in CLN, SLN und LADN vorkommen. Gleichzeitig sollte hierbei überprüft werden, ob der histopathologische Status des SLN einen Unterschied ausmachte.

Die untersuchten Lymphknoten (CLN, SLN und LADN) wurden dafür in Gruppen unterteilt, je nachdem, ob nur kleine MCSP-positive, nur große MCSP-positive oder beide Morphologien gemischt vorkamen. Es wurden nur SLN eingeschlossen, zu denen ein histopathologisches Ergebnis vorlag.

Es zeigte sich, dass kleine MCSP-positive Zellen in CLN prozentual am häufigsten vorkamen, außerdem traten dort keine großen MCSP-positiven Zellen auf.

Bei den SLN konnten durch die Auftrennung in Histo-positiv und Histo-negativ zwei signifikant unterschiedliche Untergruppen gefunden werden. Dieser Unterschied bestand für alle Zellmorphologien.

Die LADN waren am seltensten MCSP-negativ, der kumulative Anteil von Lymphknoten mit Vorkommen großer Zellen lag dagegen am höchsten (*Abbildung 7*).

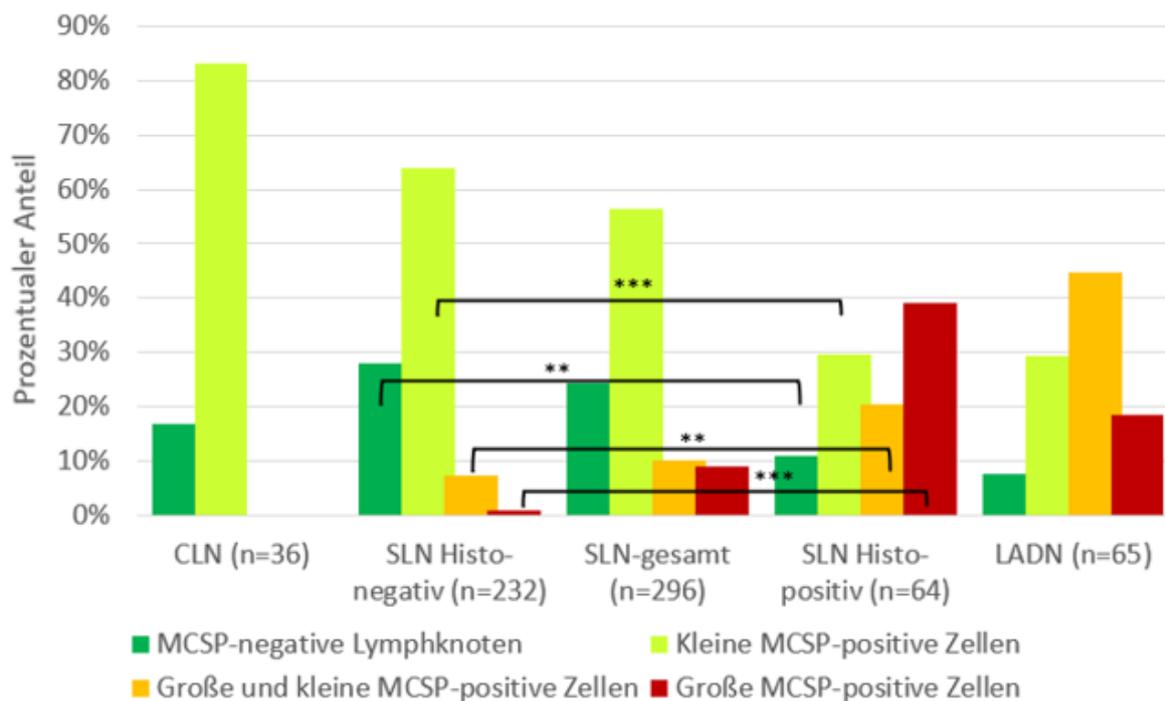


Abbildung 7 Zellmorphologien MCSP-positiver Zellen in CLN-, SLN- und LADN-Lymphknoten. Signifikanzen mittels Fisher's exact test. \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$

Das signifikant häufigere Vorkommen großer MCSP-positiver Zellen in Histo-positiven SLN im Vergleich zu den Histo-negativen zeigte, dass die großen MCSP-positiven Zellen mit fortgeschrittenerer Disseminierung assoziiert sind. Dies fügte sich ein in die Beobachtung, dass große MCSP-positive Zellen mit hohen  $DCCD_{MCSP}$  assoziiert sind (Abbildung 6).

Anhand der  $DCCD_{MCSP}$ , des histopathologischen Status und der mikroskopisch bestimmten Zellmorphologie konnte im Vergleich der CLN, SLN und LADN die Gruppe der großen MCSP-positiven Zellen als wahrscheinliche Melanomzellen eingestuft werden. Diese Einstufung wird durch weiterführende Experimente der Arbeitsgruppe bestätigt, insbesondere durch die Auslösung maligner Melanome durch große MCSP-positive Zellen aus SLN in immundefizienten Mäusen (Werner-Klein et al., 2018).

Der Nachweis kleiner MCSP-positiver Zellen in CLN bedeutete, dass mindestens einige kleine MCSP-positive SLN-Zellen nicht-Melanomzellen sein mussten.

Da allerdings in genomischen Analysen der Arbeitsgruppe kleine MCSP-positive Zellen mit denselben genomischen Aberrationen, sowie mit V600E-Mutation im BRAF-Gen gefunden wurden, mussten unter den kleinen MCSP-positiven Zellen auch Melanomzellen vorkommen. Es handelte sich also um eine heterogene Zellgruppe.

Vor Untersuchung der Genexpression konnten Hypothesen aufgestellt werden:

- Bei den großen MCSP-positiven SLN-Zellen handelt es sich um Melanomzellen
- Auch unter den kleinen MCSP-positiven Zellen befinden sich einige Melanomzellen
- Die Melanomzellen lassen sich anhand ihrer Genexpression definieren und von den nicht-Melanomzellen unterscheiden

In den Untersuchungen der Genexpression der MCSP-positiven Zellen wurden daher unterschiedliche Genexpressionsmuster erwartet. Für die Durchführung der Genexpressionsanalysen werden zuerst die verfügbaren, einzeln isolierten, Zellen dargestellt.

## 3.4 Genexpressionsanalysen

### 3.4.1 Darstellung der Probenbank

Am Lehrstuhl wurde eine Probenbank mit einzeln aus Lymphknotensuspensionen isolierten Zellen angelegt. Dabei wurden vornehmlich MCSP-positive Zellen isoliert, als Negativkontrolle auch MCSP-negative Zellen. Mit den beschriebenen Methoden (2.2.4) wurde die mRNA in cDNA umgeschrieben, welche als Ausgangsmaterial für die weiteren Untersuchungen der Genexpression diente.

Die Probenbank beinhaltet über 2000 Zellen. Passend zu dem Ergebnis, dass in LADN vorwiegend große MCSP-positive Zellen vorkamen, waren die meisten der LADN-Zellen von großem Phänotyp. Der überwiegende Anteil der SLN-Zellen wies den kleinen Phänotyp auf (*Tabelle 2*).

**Tabelle 2: Auflistung der für die Genexpressionsanalysen verfügbaren Zellen**

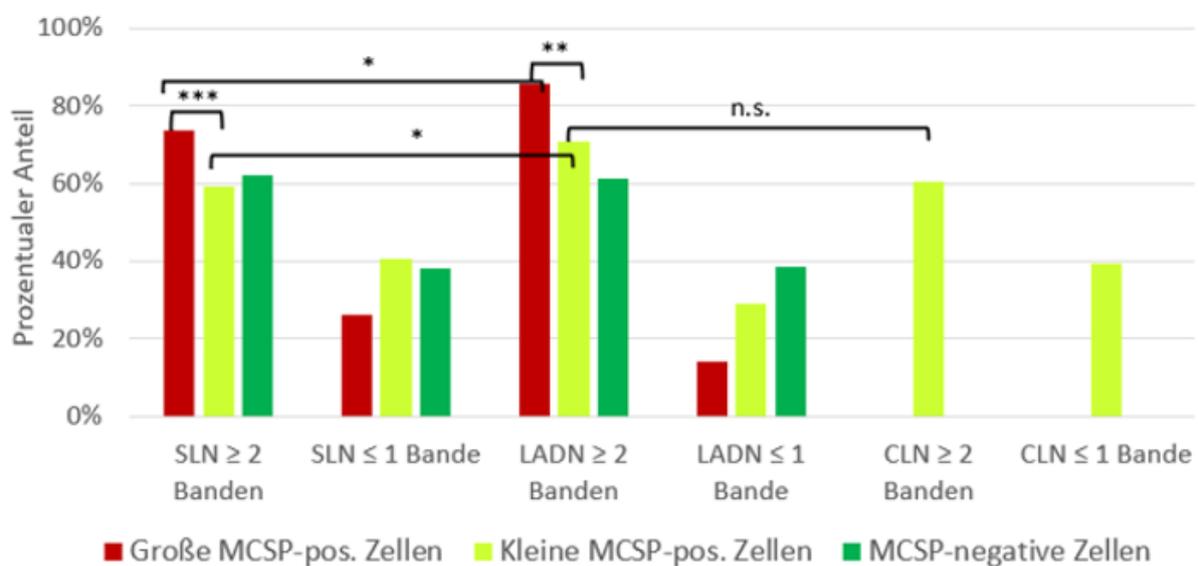
	Aus CLN (n=36)	Aus SLN (n=586)	Aus LADN (n=65)
Große MCSP-positive Zellen	-	340 (24,7 %)	146 (58,6 %)
Kleine MCSP-positive Zellen	71	1034 (75,3 %)	103 (41,4 %)
Gesamtzahl MCSP-positiver Zellen	71	1374	249
MCSP-negative Zellen	-	405	52
Gesamtzahl isolierter Zellen	71	1724	301

Bevor die Genexpression der Zellen untersucht wurde, wurde die cDNA-Qualität überprüft.

### 3.4.2 Untersuchung der WTA-Qualität

Da Teile der mRNA beim Transfer der isolierten Zelle in das Tube oder bei der Umschreibung in cDNA verloren gehen konnten, wurde die Qualität der WTA mittels einer Kontroll-PCR (Quality Control, QC) überprüft (s. 2.2.5). Als ausreichend gute Qualität wurde der Nachweis von mindestens 2 der 3 Kontrollgene gewertet.

An der cDNA aller isolierter Zellen wurde die QC durchgeführt. Sowohl in SLN als auch in LADN wiesen die großen MCSP-positiven Zellen signifikant am häufigsten mindestens 2 Banden in der PCR auf. Außerdem waren die LADN-Zellen signifikant häufiger von guter Qualität als die SLN-Zellen (*Abbildung 8*).



*Abbildung 8* Aufstellung der QC-Ergebnisse der isolierten Einzelzellen. Signifikanzen mittels Fisher's exact test. \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$

Für die weiteren Analysen wurden Zellen aus Lymphknoten, die eine positive Negativkontrolle hatten, ausgeschlossen, da diese eine Verunreinigung anzeigte. Alle anderen Zellen mit guter Qualität wurden dann für die Genexpressionsanalysen herangezogen.

### 3.4.3 Expression Melanom-assoziiierter Gene

#### 3.4.3.1 Überblick über das Markerexpressionsprofil in SLN-, LADN- und CLN-Zellen

Um unter den MCSP-positiven Zellen DCCs, also disseminierte Melanomzellen zu finden, wurde die Expression Melanom-assoziiierter Gene getestet.

Im Rahmen vorangegangener Arbeiten des Lehrstuhls wurde hierfür das sogenannte ‚Markerscreening‘ etabliert. In dieser Untersuchung wird die cDNA aller Zellen mit bestandener QC mittels Endpunkt-PCR auf Transkripte dreier Melanom-assoziiierter Gene

getestet. Das ‚Markerscreening‘ beinhaltet die Gene gp100, MelanA und TRP2. Die Auswertung erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese (s. 2.2.6).

Es zeigte sich, dass die großen MCSP-positiven Zellen signifikant am häufigsten die drei Marker exprimierten. Außerdem war die Expression in LADN signifikant höher als in SLN für alle drei untersuchten Zellgruppen. Interessanterweise zeigten die CLN-Zellen höhere Expressionsraten als die kleinen MCSP-positiven SLN-Zellen, allerdings ohne Erreichen des Signifikanzniveaus.

MelanA war der Marker, der am häufigsten exprimiert wurde und auch die stärksten Signifikanzen in der Unterscheidung zwischen großen und kleinen MCSP-positiven Zellen sowie MCSP-negativen Zellen zeigte (Abbildung 9).

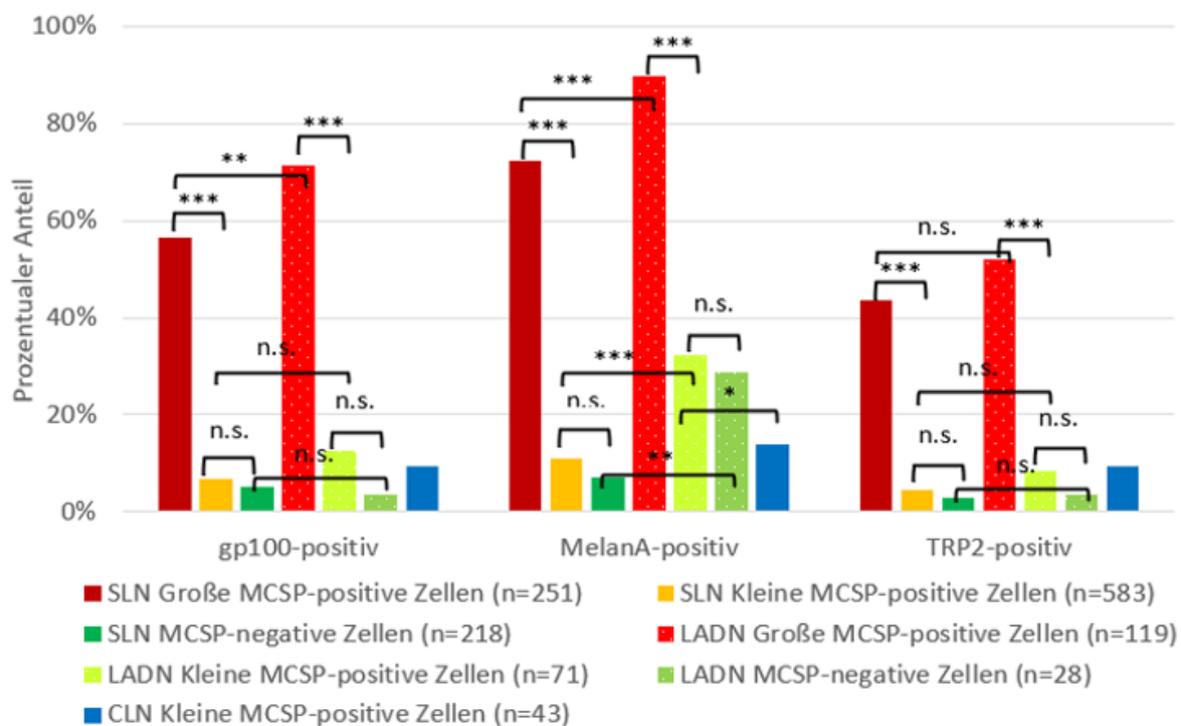


Abbildung 9 Prozentualer Anteil der Marker-exprimierenden SLN-, LADN- und CLN-Zellen. Signifikanzen mittels Fisher's exact test. \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$

Im ‚Markerscreening‘ exprimierten vornehmlich die großen MCSP-positiven Zellen die untersuchten Gene. Allerdings konnte der Nachweis eines Markergens nicht als beweisend für eine DCC gewertet werden, da auch CLN-Zellen Markerexpression zeigten.

Um eine Unterscheidung zwischen DCC, anderen SLN-Zellen und CLN-Zellen anhand der Markerexpression zu erreichen waren weitere Analysen notwendig.

### 3.4.3.2 Co-Expression mehrerer Melanommarker

Da DCC nicht anhand der Expression eines Melanommarkers zu definieren waren, wurde untersucht, wie häufig die Zellen eine gleichzeitige Expression (Co-Expression) mehrerer Melanommarker aufwiesen.

Hierfür wurden zur besseren Übersichtlichkeit Marker-negative Zellen ausgeschlossen. Danach wurden die Zellen je nach Expression von einem, zwei oder drei Markern in Gruppen eingeteilt.

Es war zu sehen, dass die großen MCSP-positiven Zellen hochsignifikant am häufigsten drei Marker co-exprimierten, kleine MCSP-positive Zellen deutlich seltener und die CLN-Zellen in keinem Fall. Die MCSP-negativen Zellen exprimierten in der Regel nur einen Marker. Jedoch gelang keine signifikante Auftrennung der kleinen MCSP-positiven Zellen und der CLN-Zellen (Abbildung 10).

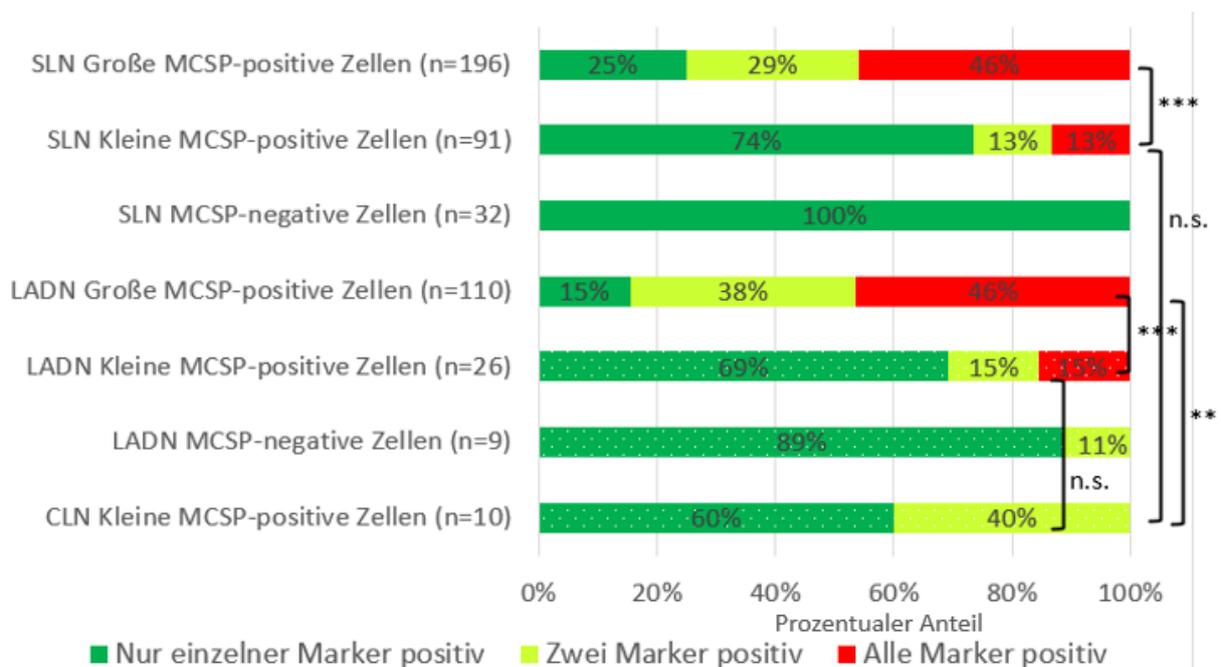


Abbildung 10 Prozentualer Anteil der Marker-co-exprimierenden SLN-, LADN- und CLN-Zellen. Marker-negative Zellen wurden ausgeschlossen. Signifikanzen mittels Fisher's exact test. \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$

Die Co-Expression der drei Markergene zeigte sich charakteristisch für die großen MCSP-positiven Zellen und wurde noch dazu in den CLN-Zellen und in den MCSP-negativen Zellen nicht gesehen. Damit gab es nun ein Genexpressionsprofil, welches mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Einzelzelle als DCC bestimmen konnte. Von den Marker-positiven kleinen MCSP-positiven Zellen traf dieses Profil auf etwa jede 7. Zelle zu (SLN: 13 %, LADN

15 %, *Abbildung 10*). Diese dreifach-positiven kleinen MCSP-positiven SLN-Zellen waren also die DCCs innerhalb der heterogenen Gesamtgruppe.

Da aufgefallen war, dass die großen MCSP-positiven Zellen sowohl am häufigsten die QC bestanden (*Abbildung 8*), als auch am häufigsten mehrere Melanommarker exprimierten, sollte der Einfluss der QC auf die Markerexpression näher betrachtet werden.

### 3.4.3.3 Markerexpression in Abhängigkeit von der WTA-Qualität

Die Hypothese, dass der Nachweis von 2/3 Kontrollgenen in der QC gute Qualität der cDNA und somit vergleichbare Ergebnisse mit 3/3 Kontrollgenen bedeutete, wurde getestet. Wenn sich ein signifikanter Unterschied in der Markerexpression zwischen den Gruppen 2/3 Kontrollgene und 3/3 Kontrollgene zeigte, musste die Hypothese abgelehnt werden.

Hierfür wurden die großen MCSP-positiven SLN-Zellen herangezogen und anhand ihrer Qualitätskontrolle aufgeteilt und dann die Ergebnisse des ‚Markerscreenings‘ der zwei Gruppen verglichen.

Die großen MCSP-positiven SLN-Zellen mit schlechterer Qualitätskontrolle waren mit mehr als 50 % Marker-negativen Zellen signifikant häufiger Marker-negativ als die mit besserer Qualitätskontrolle (*Tabelle 3*).

**Tabelle 3: Einfluss unterschiedlicher cDNA-Qualität auf die Ergebnisse des Markerscreenings in großen MCSP-positiven SLN-Zellen.**

	Marker-positiv	Marker-negativ
Qualitätskontrolle 2/3 (n=41)	19 (46,3 %)	22 (53,7 %)
Qualitätskontrolle 3/3 (n=210)	185 (88,1 %)	25 (11,9 %)
Fisher's exact test	p<0,0001	

Eine fehlende Markerexpression in Zellen mit leicht eingeschränkter QC konnte also an einem mRNA-Verlust liegen. Somit waren die zwei Qualitätsstufen nicht gleichwertig und die Hypothese musste abgelehnt werden.

Die bisherigen Ergebnisse basieren auf der MCSP-Fluoreszenzfärbung und PCR-Untersuchungen. Die MCSP-positiven Zellen mit dreifacher Markerexpression waren bereits als Melanomzellen definiert. Für die bessere Auftrennung der heterogenen kleinen MCSP-positiven Zellen war die Zielsetzung, neue Markergene unter Verwendung von Genexpressionsmikroarrays zu finden, mit denen mittels qPCRs eindeutig zwischen Melanomzellen und nicht-Melanomzellen unterschieden werden konnte.

## 3.5 Bestimmung neuer Genexpressionsmuster

### 3.5.1 Unterscheidung kleiner MCSP-positiver SLN-Zellen von CLN-Zellen

#### 3.5.1.1 Vorbereitung der Testkohorte

Zur Erweiterung der Melanommarker-Analyse konnte auf Ergebnisse bereits durchgeführter Genexpressionsmikroarrays zurückgegriffen werden, die an großen und kleinen MCSP-positiven SLN-Zellen und CLN-Zellen durchgeführt wurden. In diesen wurde die Expression mehrerer hundert Gene analysiert und bioinformatisch ausgewertet. Anhand der Ergebnisse dieser Mikroarray-Untersuchungen sollten Markergene für Malignität und Dignität bestimmt werden.

Die Arbeitshypothese lautete: Aus Lymphknoten von Melanompatienten und gesunden Kontrollpatienten isolierte MCSP-positive Zellen haben unterschiedliche Genexpressionsmuster, an denen man sie unterscheiden kann. Ziel war es, anhand eines neuen Genexpressionsmusters ('Gensignatur') eine sichere Identifizierung von Melanomzellen zu etablieren.

Der erste Ansatz bestand im Vergleich einer Gruppe kleiner MCSP-positiver SLN-Zellen, mit einer Gruppe CLN-Zellen. Die Auswahl des ersten Zellkollektivs, die sogenannte 'Testkohorte' für die Mikroarray-Analyse wurde von Moritz Friedmann getroffen und bestand aus 14 kleinen MCSP-positiven SLN-Zellen (im Folgenden 'SLN-Gruppe') und 13 kleinen MCSP-positiven CLN-Zellen (im Folgenden 'CLN-Gruppe').

Alle Zellen wiesen in der Kontroll-PCR (s. 2.2.5) 3 Banden auf und hatten daher sehr gute cDNA-Qualität. Während die 14 Zellen der 'SLN-Gruppe' jeweils mindestens ein Merkmal oder vermutetes Merkmal einer Melanomzelle aufwiesen (*Tabelle 4*), waren die 13 Zellen der 'CLN-Gruppe' für alle diese Eigenschaften negativ.

**Tabelle 4: Auflistung der kleinen MCSP-positiven Zellen der ‚SLN-Gruppe‘ der ‚Testkohorte‘**

Nummer	QC	‚Marker-screening‘	CGH-Aberration	BRAF	Histo-Status des SLN	DCCD <sub>MCSP</sub> des SLN
1	3/3	1/3	+	wt	-	2
2	3/3	<b>3/3</b>	ND	ND	+	8
3	3/3	1/3	ND	wt	-	1
4	3/3	1/3	ND	wt	-	8
5	3/3	1/3	+	wt	-	7
6	3/3	1/3	+	wt	-	7
7	3/3	0/3	+	<b>mt</b>	-	3
8	3/3	1/3	ND	wt	-	10
9	3/3	1/3	ND	wt	-	1
10	3/3	1/3	ND	wt	-	12
11	3/3	1/3	ND	wt	-	12
12	3/3	1/3	ND	wt	+	32
13	3/3	<b>3/3</b>	ND	ND	-	25
14	3/3	1/3	ND	wt	-	10

Die Durchführung und bioinformatische Auswertung der Genexpressionsmikroarrays erfolgten bereits vor Aufnahme dieser Dissertationsarbeit.

### 3.5.1.2 Analyse hoch- und niederregulierter Gene an der Testkohorte

Die Auswertung der Mikroarraydaten ergab eine Liste von 1401 Genen, die zwischen der ‚SLN-Gruppe‘ und der ‚CLN-Gruppe‘ signifikant unterschiedlich stark exprimiert waren. Zur Validierung dieser Ergebnisse wurden je drei in den Mikroarraygruppen signifikant hoch- bzw. niederregulierte Gene ausgewählt, um deren Expression mittels qPCR zu untersuchen.

Begonnen wurde mit den in der ‚SLN-Gruppe‘ hochregulierten Genen. Nach im Labor etablierten Kriterien wurden aus den Mikroarrays zwei Gene bestimmt (PRKCH und GRAP2), die zur qPCR-Testung herangezogen wurden (s. 2.2.7) Für diese Gene wurden spezifische Primer erstellt, die nach Evaluation der spezifischen Amplifikation und einer hohen Effizienz für die Untersuchungen verwendet wurden. Für das dritte ausgewählte Gen SSH2 konnten in vier Versuchen keine spezifischen Primer erstellt werden, da sich entweder zusätzlich zum erwarteten Amplifikat eine unspezifische Amplifikation zeigte oder die Effizienz der Amplifikation nicht ausreichte.

Zur Vergleichbarkeit der Ct-Werte der qPCRs, lief auf jeder Platte ein Kalibrator (eine 1:200 verdünnte cDNA einer MelHo-Zelllinie) mit.

Beide Primer zeigten eine vermehrte Expression in der ‘SLN-Gruppe’ im Vergleich zu der ‘CLN-Gruppe’, was anhand des Anstiegs der Kurven bereits bei etwa 20 Zyklen (*Abbildung 11, Abbildung 12*) verdeutlicht wird. Die späteren Kurvenanstiege ab Zyklus 30 wurden als nicht ausreichende Expression gewertet, diese Zellen wurden als PRKCH- bzw. GRAP2-negativ eingestuft.

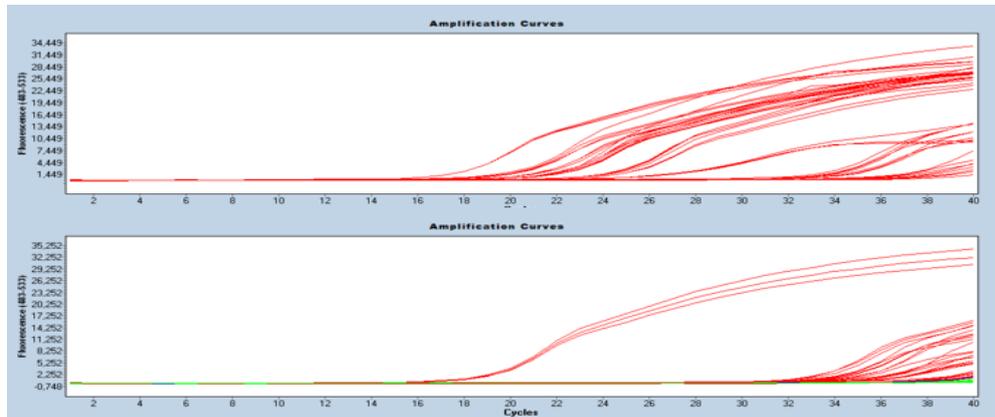


Abbildung 11 Amplifikationskurven der der ‘SLN-Gruppe’ (oben) und der der ‘CLN-Gruppe’ (unten); Primer: PRKCH\_qPCR2

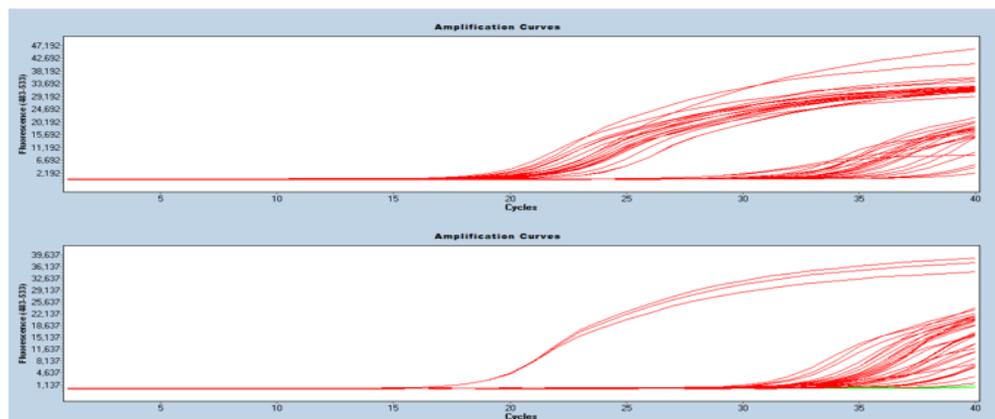


Abbildung 12 Amplifikationskurven der der ‘SLN-Gruppe’ (oben) und der der ‘CLN-Gruppe’ (unten); Primer: GRAP2

Bereits anhand nur eines Markers zeigte sich eine signifikante Unterscheidung der zwei Gruppen. Bei den doppelt-negativen Zellen ist der Unterschied sogar sehr signifikant. Aber auch in der ‘SLN-Gruppe’ gab es vier doppelt-negative Zellen (*Tabelle 5*).

**Tabelle 5: PRKCH- und GRAP2-Expression in der 'Testkohorte'**

	PRKCH positiv	PRKCH negativ	GRAP2 positiv	GRAP2 negativ	Doppelt positiv	Doppelt negativ	Mindestens ein Marker positiv
'SLN-Gruppe' (n=14)	9 (64 %)	5 (36 %)	8 (57 %)	6 (43 %)	7 (50 %)	4 (29 %)	10 (71 %)
'CLN-Gruppe' (n=13)	1 (8 %)	12 (92 %)	1 (8 %)	12 (92 %)	1 (8 %)	12 (92 %)	1 (8 %)
Fisher's exact test	p = 0,0044		p = 0,0128		p = 0,0329	p = 0,0013	

Der in den Genexpressionsmikroarrays herausgefundene signifikante Unterschied der Expression von PRKCH und GRAP2 innerhalb der ‚Testkohorte‘ konnte in den qPCR-Analysen bestätigt werden.

Die Testung der in der ‚SLN-Gruppe‘ niederregulierten Gene (RNF 150, DUSP7, CCDC66, RMB25, FBXO25, NFE2L1, VRTN, NDNF, RAPH1, SMOC, RELA) konnte die zwei Gruppen nicht unterscheiden, da zum einen entweder keine spezifischen Primer gefunden wurden oder sich ähnliche Expressionen in qPCR in beiden Gruppen herausstellten (Daten nicht gezeigt).

Somit konnten nur die Gene PRKCH und GRAP2 in der folgenden Validierung getestet werden.

### 3.5.1.3 Untersuchung der Validierungskohorte

Da die ‚Testkohorte‘ nur eine kleine Stichprobe des gesamten Kollektivs MCSP-positiver Zellen ausmachte, sollte getestet werden, ob die Gene PRKCH und GRAP2 auch von der ‚Testkohorte‘ unabhängige Gruppen aus kleinen MCSP-positiven SLN-Zellen von CLN-Zellen unterscheiden konnte.

Darum wurde die Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf eine ‚Validierungskohorte‘ untersucht. Diese bestand aus 50 SLN-Zellen und unterteilte sich wiederum in drei Gruppen:

- Gruppe 1: 20 kleine MCSP-positive Zellen, welche auf mindestens einen der Melanommarker (MelanA, gp100, TRP2) positiv getestet wurden,
- Gruppe 2: 20 kleine MCSP-positive Zellen ohne Melanommarker-Expression,

- Gruppe 3: 10 große MCSP-positive Zellen, welche auf mindestens einen der Melanommarker (MelanA, gp100, TRP2) positiv getestet wurden.

Die Erwartung war, dass sich die Ergebnisse der ‚Testkohorte‘ auf die ‚Validierungskohorte‘ übertragen ließen, dass sich also die kleinen MCSP-positiven Zellen mit positiven Melanommarkern ähnlich verhalten würden, wie die ‚SLN-Gruppe‘ der ‚Testkohorte‘. Die Melanommarker-negativen MCSP-positiven kleinen SLN-Zellen sollten analog zu der ‚CLN-Gruppe‘ seltener PRKCH und GRAP2 exprimieren. Außerdem wurde getestet, wie häufig die großen MCSP-positiven Zellen, welche als Melanomzellen bereits bekannt waren, PRKCH und GRAP2 exprimierten.

Die ‚SLN-Gruppe‘ unterschied sich signifikant von der Gruppe 1 (kleine MCSP-positive Zellen mit Melanommarker-Expression), der Gruppe 2 (kleine MCSP-positive Zellen ohne Melanommarker-Expression), sowie der Gruppe 3, welche sogar für beide Marker negativ testete (*Tabelle 6*).

**Tabelle 6: PRKCH- und GRAP2-Expression in der ‚SLN-Gruppe‘ und der ‚Validierungskohorte‘.**

	PRKCH positiv	Fisher's exact test gegen ‚SLN-Gruppe‘	GRAP2 positiv	Fisher's exact test gegen ‚SLN-Gruppe‘	Doppelt positiv	Doppelt negativ
‚SLN-Gruppe‘ (n=14)	9 (64 %)		8 (57 %)		4 (28,6 %)	
Kleine MCSP-positive Zellen, Melanommarker-positiv (n=20)	5 (25 %)	p=0,0351	2 (10 %)	p=0,0061	1 (5 %)	14 (70 %)
Kleine MCSP-positive Zellen Melanommarker-negativ (n=20)	3 (15 %)	p=0,0048	2 (10 %)	p=0,0061	0	15 (75 %)
Große MCSP-positive Zellen Melanommarker-positiv (n=10)	0	p=0,0020	0	p=0,0064	0	10 (100 %)

Somit konnten die Annahmen nicht bestätigt werden, da die Marker-positiven kleinen MCSP-positiven Zellen signifikant seltener PRKCH und GRAP2 exprimierten. Die ‚SLN-Gruppe‘

unterschied sich insgesamt gesehen sogar deutlicher von der ‘Validierungskohorte’ als von der ‘CLN-Gruppe’ (Abbildung 13).

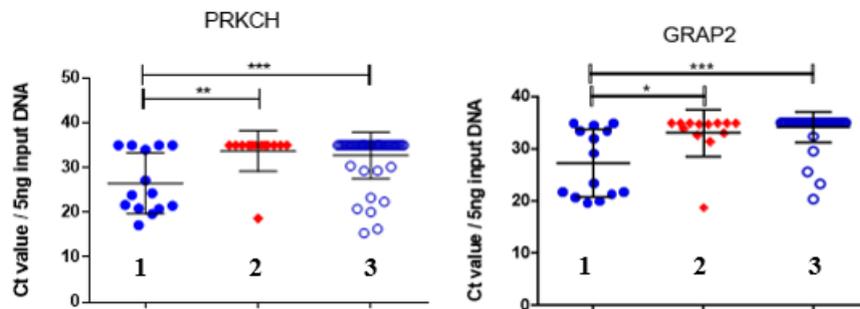


Abbildung 13 Ct-Werte von PRKCH und GRAP2 in der ‘Testkohorte’ (1: ‘SLN-Gruppe’, 2: ‘CLN-Gruppe’) und der ‘Validierungskohorte’ (3: kleine und große MCSP-positive SLN-Zellen). Je niedriger der Ct-Wert, desto stärker die Expression des jeweiligen Gens. Ct-Werte >30 wurden als negativ gewertet.

Auf der anderen Seite unterschied sich die ‘CLN-Gruppe’ von keiner Gruppe der ‘Validierungskohorte’ signifikant (Tabelle 7).

**Tabelle 7: PRKCH- und GRAP2-Expression in der ‘CLN-Gruppe’ und der ‘Validierungskohorte’.**

	PRKCH positiv	Fisher’s exact test gegen ‘CLN-Gruppe’	GRAP2 positiv	Fisher’s exact test gegen ‘CLN-Gruppe’	Doppelt positiv	Doppelt negativ
‘CLN-Gruppe’ (n=13)	1 (7,7 %)		1 (7,7 %)		4 (30,1 %)	
Kleine MCSP-positive Zellen, Melanommarker-positiv (n=20)	5 (25 %)	p=0,3644	2 (10 %)	p=1	1 (5 %)	14 (70 %)
Kleine MCSP-positive Zellen Melanommarker-negativ (n=20)	3 (15 %)	p=1	2 (10 %)	p=1	0	15 (75 %)
Große MCSP-positive Zellen Melanommarker-positiv (n=10)	0	p=1	0	p=1	0	10 (100 %)

Da sich die MCSP-positiven Zellen der ‘Validierungskohorte’ nicht signifikant von der ‘CLN-Gruppe’ in der Expression der Marker PRKCH und GRAP2 unterschieden, eigneten sich diese nicht als zusätzliche Melanommarkergene. Die Mikroarrayergebnisse konnten anhand der

unabhängigen Stichprobe daher nicht validiert werden. Interessanterweise zeigten gerade die großen MCSP-positiven Zellen, erwiesene DCCs, keine Expression der zwei Marker. Diese Versuchsreihe konnte also keine kleinen MCSP-positiven SLN-Zellen den DCCs zuordnen.

Da sich aus dem Mikroarrayvergleich zwischen der 'SLN-Gruppe' und der 'CLN-Gruppe' nicht auf geeignete Markergene schließen ließ, wurden als nächstes Mikroarrayergebnisse großer MCSP-positiver Zellen mit denen der 'SLN-Gruppe' und der 'CLN-Gruppe' verglichen.

Eine Gensignatur, die die Unterscheidung der großen MCSP-positiven Zellen von der 'CLN-Gruppe' ermöglicht, könnte auch an den kleinen MCSP-positiven Zellen angewendet werden, um die DCCs unter den kleinen MCSP-positiven Zellen zu erkennen.

### 3.5.2 Unterscheidung großer MCSP-positiver Zellen aus SLN von CLN-Zellen

Der Vergleich der Mikroarraydaten von acht großen MCSP-positiven SLN-Zellen (im Folgenden 'große Zellen') und der 'CLN-Gruppe' zeigte, dass MelanA, das von der Arbeitsgruppe bereits zum 'Markerscreening' aller gewonnenen Zellen eingesetzt wurde (*Abbildung 9*), signifikant höher ( $p=0,027$ , Daten nicht gezeigt) von den 'großen Zellen' exprimiert wurde als von den Kontrollzellen.

Das Vorgehen erfolgte wie bei den Genen PRKCH und GRAP2 (*s. 3.5.1.2*). Zuerst sollten die Mikroarrayzellen auf die MelanA-Expression getestet werden.

Um zu testen, ob die Signifikanz in den Mikroarraydaten auch mittels qPCR nachgewiesen werden konnte, musste kein neues Primerpaar erstellt werden. Die für die MelanA-Endpunkt-PCR verwendeten Primer zeigten auch in der qPCR die benötigten Qualitätseigenschaften (*s. 2.2.12*) und konnten deswegen auch in der qPCR verwendet werden.

Durch die Verwendung derselben Primer konnte zusätzlich die Endpunkt-PCR mit der qPCR verglichen werden.

Der signifikante Unterschied der Gruppen in den Mikroarraydaten konnte mittels qPCR ebenfalls gezeigt werden, da alle 8 großen MCSP-positiven Zellen positiv für das Markergen MelanA waren, wohingegen keine Zelle der 'CLN-Gruppe' MelanA exprimierte. MelanA-positiv wurden Zellen mit einem Ct-Wert  $\leq 30$  gewertet (*Tabelle 8*).

**Tabelle 8: MelanA-Expression in den Zellen der 'Testkohorte'**

	MelanA in Endpunkt-PCR	MelanA in qPCR
'Große' (n=8)	8 (100 %)	8 (100 %)
„CLN-Gruppe“ (n=13)	0	0
Fisher's exact test	p=0,0001	

Die Mikroarrayergebnisse konnten also in qPCR bestätigt werden, sodass nun die Validierung anhand einer 'Validierungskohorte' erfolgen sollte. Diese bestand aus 16 großen MCSP-positiven SLN-Zellen und den restlichen vorhandenen 9 CLN-Zellen guter QC. Unter den 9 CLN-Zellen befanden sich 5 in Endpunkt-PCR schwach MelanA-positive Zellen (Tabelle 9).

Die großen MCSP-positiven Zellen der 'Validierungskohorte' waren zu 87,5 % sowohl in Endpunkt-PCR als auch in qPCR MelanA-positiv. Bei den CLN-Zellen waren die qPCR-Ergebnisse unterschiedlich zu den Endpunkt-PCR-Ergebnissen. Keine CLN-Zelle war mittels qPCR als MelanA-positiv einzustufen (Tabelle 9).

Der Vergleich der großen MCSP-positiven Zellen der 'Validierungskohorte' mit den 'großen Zellen' der 'Testkohorte' zeigte keinen signifikanten Unterschied. Ebenfalls unterschieden sich die 'CLN-Gruppe' und die CLN-Zellen der Validierungskohorte nicht (Tabelle 9).

**Tabelle 9: Gegenüberstellung der MelanA-Expression in den Zellen der 'Testkohorte' und der 'Validierungskohorte'**

	MelanA in Endpunkt	MelanA in qPCR
'Große' (n=8)	8 (100 %)	8 (100 %)
Große MCSP-positive Zellen (n=16)	14 (87,5 %)	14 (87,5 %)
Fisher's exact test		p=0,536
„CLN-Gruppe“ (n=13)	0	0
CLN-Zellen (n=9)	5 (55,5 %)	0
Fisher's exact test		p=1

Der Unterschied der MelanA-Expression zwischen den 'großen Zellen' und der 'CLN-Gruppe' ließ sich in der 'Validierungskohorte' reproduzieren. Interessanterweise gelang dies trotz des Miteinbeziehens der Endpunkt-PCR-MelanA-positiven CLN-Zellen.

Da mittels qPCR keine MelanA-Expression in CLN-Zellen gefunden werden konnte, erwies sich MelanA als potenzieller Marker, um mittels qPCR die kleine MCSP-positive Zellen in DCCs und nicht-DCCs zu trennen.

Daher sollte nun getestet werden, ob auch kleine MCSP-positive Zellen in der MelanA-qPCR als positiv eingestuft werden konnten.

### 3.5.3 MelanA-Expression in qPCR in unterschiedlichen Zellgruppen

Es sollte getestet werden, wie im Vergleich zu den großen MCSP-positiven Zellen die MelanA-Expression mittels qPCR in den kleinen MCSP-positiven sowie den MCSP-negativen Zellen ausfiel.

Dafür stand eine Gruppe von 86 kleinen MCSP-positiven und eine Gruppe von 15 MCSP-negativen SLN-Zellen zur Verfügung. Von den MCSP-positiven waren 55 % in der Endpunkt-PCR MelanA-positiv. Die MCSP-negativen Zellen wurden gezielt aufgrund ihrer positiven MelanA-Expression in Endpunkt-PCR ausgewählt, um eine sinnvolle Kontrollgruppe für die MelanA-Expression zu erhalten. Die bereits untersuchten großen MCSP-positiven Zellen wurden in der weiteren Auswertung als eine Gruppe geführt.

Auffallend war, dass auch in den kleinen MCSP-positiven sowie den MCSP-negativen Zellen die Ergebnisse von Endpunkt-PCR und qPCR nicht übereinstimmten. Einerseits zeigte keine Endpunkt-PCR-MelanA-negative Zelle in qPCR MelanA-Expression, andererseits waren von den kleinen MCSP-positiven Zellen weniger als 50 % der in der Endpunkt-PCR MelanA-positiven in qPCR als MelanA-positiv zu werten, von den MCSP-negativen Zellen sogar nur 20 % (*Tabelle 10*).

Im Vergleich zu den großen MCSP-positiven Zellen waren alle Gruppen hochsignifikant seltener MelanA-exprimierend. Aber auch die kleinen MCSP-positiven Zellen zeigten vergleichsweise hohen Anteil an MelanA-Expression in der qPCR, was sie signifikant von den CLN-Zellen unterschied (*Tabelle 10*).

**Tabelle 10: Vergleich der MelanA-Expression in qPCR zwischen den unterschiedlichen Zellgruppen.**

	MelanA-positiv in Endpunkt-PCR	MelanA-positiv in qPCR	Fisher's exact test Vergleich mit Großen Zellen
Große MCSP-positive Zellen (n=24)	22 (91,7 %)	22 (91,7 %)	
CLN-Zellen (n=22)	5 (22,7 %)	0	p<0,0001
Fisher's exact test		p=0,0113	
Kleine MCSP-positive Zellen (n=86)	47 (55 %)	20 (23,3 %)	p<0,0001
MCSP-negative Zellen (n=15)	15 (100 %)	3 (20 %)	p<0,0001

Durch MelanA-Expression in qPCR konnten die kleinen MCSP-positiven Zellen von den CLN-Zellen getrennt werden. Eine statistische Analyse der MCSP-negativen Zellen war aufgrund der bewussten Auswahl aufgrund der MelanA-Positivität in Endpunkt-PCR nicht zielführend. Der prozentuale Anteil der durch qPCR bestätigt positiven Fälle lag bei den kleinen MCSP-positiven Zellen aber deutlich höher (20/47 im Vergleich zu 3/15, *Tabelle 10*).

Insgesamt war die MelanA-Expression der großen MCSP-positiven Zellen deutlich stärker als die der kleinen MCSP-positiven und der MCSP-negativen Zellen. Eine relevante MelanA-Expression in den CLN-Zellen war nicht nachweisbar.

Da die CLN-Zellen in der MelanA-qPCR durchgehend negativ blieben, eignete sich diese Methode besonders, um die kleinen SLN-Zellen in CLN-ähnliche nicht-DCCs und DCCs zu unterteilen. Für weitere Analysen sollte somit nach Möglichkeit der MelanA-Nachweis in qPCR berücksichtigt werden.

Im Zuge der qPCR-Analysen wurden auch weitere Gene untersucht.

### 3.5.4 T-Zell- und Proliferationsmarkeranalysen

Da DCCs nach den Ergebnissen des Markerscreenings und der qPCRs nur einen kleinen Teil der kleinen MCSP-positiven SLN-Zellen darstellten, sollte auch herausgefunden werden, welcher Herkunft die anderen kleinen MCSP-positiven Zellen waren.

Anhand der Mikroarraydaten konnte gezeigt werden, dass ein Großteil der kleinen MCSP-positiven Zellen T-Zell-ähnliche Charakteristika aufwiesen (Daten generiert von Dr. Markiewicz).

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden Primer erstellt (s. 2.2.7.2), die das Transkript von CD3e nachweisen konnten. CD3e ist ein T-Zell-Marker, der mit dem T-Zell-Rezeptor als Komplex an der Zellmembran von T-Zellen vorkommt.

Außerdem wurde noch die Expression der Proliferationsmarker Ki67 und PCNA untersucht. Hierfür waren bereits Primer im Labor etabliert. Diese Marker waren von Interesse, da mit ihnen die Zellteilungsrate eingeschätzt werden kann. Da große MCSP-positive Zellen gehäuft in kolonisierten Lymphknoten mit höherer DCCD gefunden wurden, wurde vermutet, dass diese vermehrt proliferieren müssten, die kleinen MCSP-positiven Zellen dagegen eher weniger.

Untersucht wurden alle Zellen, die auch mit der MelanA-qPCR getestet wurden. Die Zellgruppen wurden getrennt nach MelanA-qPCR-Status untersucht.

Auffallend war der hohe Anteil PCNA-positiver Zellen unter den MelanA-positiven großen MCSP-positiven Zellen. Auch bei den MelanA-positiven kleinen MCSP-positiven Zellen lag die PCNA-Rate höher als bei den MelanA-negativen Zellen. Ki67 wurde dagegen kaum exprimiert.

CD3e-positiv waren vor allem die MelanA-negativen kleinen MCSP-positiven Zellen und die MCSP-negativen Zellen (*Tabelle 11*).

**Tabelle 11: Expression von CD3e, Ki67 und PCNA in den mit MelanA-qPCR getesteten Zellen, aufgeteilt nach MelanA-positiv und -negativ.**

		CD3e in qPCR		Ki67 in qPCR		PCNA in qPCR	
		MelanA-positiv	MelanA-negativ	MelanA-positiv	MelanA-negativ	MelanA-positiv	MelanA-negativ
Große Zellen (n=24)		3 (13,6 %)	0	0	0	10 (45,5 %)	0
MelanA-positiv (n=22)	MelanA-negativ (n=2)						
Kleine Zellen (n=86)		2 (10 %)	16 (24,2 %)	0	3 (4,5%)	7 (35 %)	15 (22,7 %)
MelanA-positiv (n=20)	MelanA-negativ (n=66)						
MCSP-negative Zellen (n=15)		2 (66,7 %)	3 (25 %)	0	0	1 (33,3 %)	1 (8,3 %)
MelanA-positiv (n=3)	MelanA-negativ (n=12)						
CLN-Zellen (n=22)			1 (4,5 %)		5 (23 %)		7 (32 %)
MelanA-positiv (n=0)	MelanA-negativ (n=22)						

Bei den Proliferationsmarkern ergab sich eine Tendenz zur häufigeren Expression in MelanA-positiven MCSP-positiven Zellen, statistisch signifikante Unterschiede zeigten sich aber nicht. Eine Erweiterung der qPCR-Testgruppe könnte möglicherweise zu signifikanten Unterschieden führen.

Die Rate an MelanA- und CD3e-Co-Expression war niedrig, trat jedoch in allen SLN-Zellpopulationen auf, sodass eine Trennung der Zellen in MelanA-positive DCCs und CD3e-positiv T-Zellen nicht eindeutig möglich war.

Da die häufigste und stabilste MelanA-Expression in den großen MCSP-positiven Zellen gefunden wurde, die vor allem in SLN mit hoher  $DCCD_{MCSP}$  auftraten, sollte ein Zusammenhang der MelanA-Expression mit der  $DCCD_{MCSP}$  untersucht werden.

### 3.6 Korrelation der MelanA-Expression mit $DCCD_{MCSP}$

Es konnte gezeigt werden, dass sich SLN mit hoher  $DCCD_{MCSP}$  ( $DCCD > 100$ ) in einem Kolonisierungszustand befinden, was bedeutet, dass die Melanomerkrankung bereits manifeste Metastasen bilden konnte (Werner-Klein et al., 2018).

In dieser Arbeit wurde bereits gezeigt, dass die starke Expression von MelanA, welche in qPCR nachgewiesen werden konnte, SLN-Zellen von CLN-Zellen unterscheidet und somit DCCs definieren kann. Auch wurde gezeigt, dass die MelanA-Expression häufiger in kleinen MCSP-positiven Zellen aus SLN mit hohen  $DCCD_{MCSP}$  vorkommt als in Zellen aus SLN mit niedriger  $DCCD_{MCSP}$ .

Es stellte sich die Frage, ob es hierbei auch eine Korrelation des Expressionslevels des MelanA-Transkripts und der  $DCCD_{MCSP}$  gab.

Dafür wurden die in Endpunkt-PCR MelanA-positiven kleinen MCSP-positiven Zellen aus SLN und ihre in qPCR ermittelten Ct-Werte herangezogen und mit den  $DCCD_{MCSP}$ -Werten der zugehörigen Lymphknoten korreliert. Da niedrige Ct-Werte eine hohe Expression darstellten, mussten diese für die Berechnung der Korrelation invertiert werden.

Es war eine klare Trennung zwischen MelanA-positiven und MelanA-negativen Zellen zu erkennen, da keine Grenzfälle auftraten.

Es ergab sich eine moderate positive Korrelation der MelanA-Expression mit der  $DCCD_{MCSP}$  (Korrelation nach Pearson:  $r = 0,527$ ,  $p = 0,01$ , *Abbildung 14*).

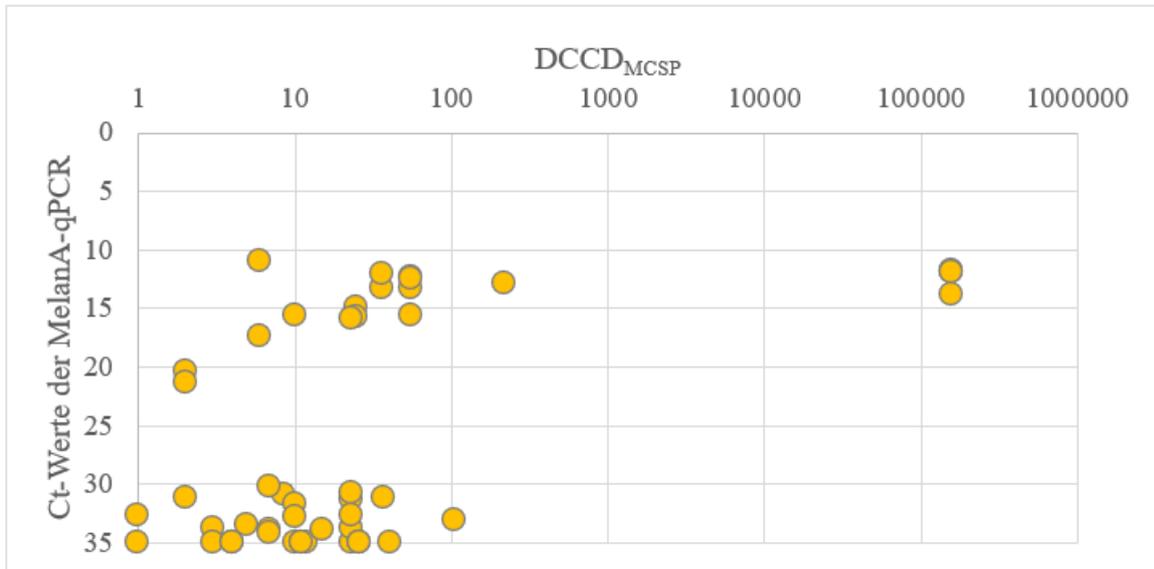


Abbildung 14 Darstellung der Ct-Werte der MelanA-qPCR der kleinen MCSP-positiven SLN-Zellen in Abhängigkeit des jeweiligen DCCD<sub>MCSP</sub>-Wertes des SLN. Die DCCD<sub>MCSP</sub>-Werte sind logarithmisch skaliert.

Auch bei den LADN zeigte sich eine ähnliche Korrelation (Korrelation nach Pearson:  $r=0,482$ ,  $p=0,05$ ). Abgesehen von einer Zelle mit einem Ct-Wert von 28 war auch in den LADN-Proben die Zuordnung zu MelanA-positiv oder MelanA-negativ wieder eindeutig (Abbildung 15).

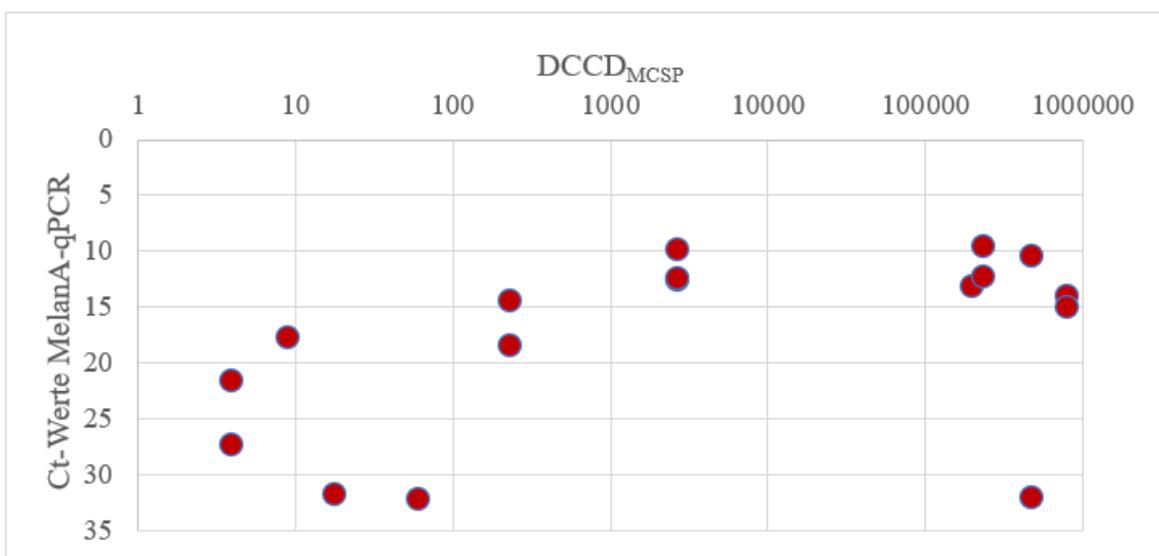


Abbildung 15 Darstellung der Ct-Werte der MelanA-qPCR der kleinen MCSP-positiven LADN-Zellen in Abhängigkeit des jeweiligen DCCD<sub>MCSP</sub>-Wertes der LADN. Die DCCD<sub>MCSP</sub>-Werte sind logarithmisch skaliert.

Dass die MelanA-Expression und die DCCD<sub>MCSP</sub> miteinander korrelierten, deutete auf einen allmählichen Anstieg der MelanA-Expression im Laufe der Lymphknotenbesiedelung hin.

Ob MelanA-positive Zellen auch klinische Relevanz aufweisen, wurde durch die gemeinsame Auswertung mit den Tumorzentrumsdaten überprüft.

### 3.7 Statistische Analysen der Daten des Tumorzentrums

Um die im Labor festgestellten Ergebnisse auch auf ihre klinische Relevanz zu testen, wurde die Datenbank der SLN-Melanompatienten des Tumorzentrums Regensburg ausgewertet. Eingeschlossen wurden alle Patienten, die auf MCSP-positive oder gp100-positive Zellen in SLN untersucht wurden und von denen ein post-OP-follow-up vorlag. Ausgeschlossen wurden Patienten, die nicht auf MCSP oder gp100 getestet wurden, oder von denen kein follow-up vorlag. Von 505 gelisteten Patienten mussten 46 ausgeschlossen werden. Zwei davon hatten weder MCSP- noch gp100-Ergebnisse, von den restlichen 44 lagen im Tumorzentrum keine follow-up-Daten vor. Von 9 Patienten lagen keine MCSP-Ergebnisse und von 63 Patienten keine gp100-Ergebnisse vor, da nicht ausreichend Zellsuspension aus SLN gewonnen werden konnte.

Die mediane Nachbeobachtung aller Patienten betrug 38 Monate (3-110, n=459; Stand 03/2020). Bei Analysen, die nur auf der gp100-Untersuchung beruhten, betrug die mediane Nachbeobachtung 36 Monate (3-109, n=396). Bei Analysen, die sich nur auf die MCSP-Untersuchung bezogen, betrug die mediane Nachbeobachtung 38 Monate (3-110, n=450).

#### 3.7.1 Überblick über das Patientenkollektiv

Zur Auswertung wurden unsere Laborergebnisse mit der Datenbank des Tumorzentrums verknüpft. Die klinischen und pathologischen Eigenschaften wurden durch das Tumorzentrum gesammelt, die MCSP- und gp100- Ergebnisse stammten aus unserer Arbeitsgruppe. Außerdem lag der Sentinellymphknotenstatus der Pathologie vor. Zuerst wurde die kombinierte Datenbank anhand grundlegender Merkmale ausgewertet (*Tabelle 12*).

**Tabelle 12: Überblick über die statistisch analysierten Patienten**

	Patienten (n=459)	Prozent [%]	Median	Spannweite	Interquar- tilabstand
<b>Geschlecht</b>					
Weiblich	200	43,6			
Männlich	259	56,4			
<b>Alter bei Operation [Jahre]</b>			56	15-85	24
<b>Breslow-Tumordicke [mm]</b>			1,6	0,2-15	1,7
Keine Angabe	18	3,9			
I (<0,75 mm)	39	8,5			
II (0,76- 1,5 mm)	169	36,8			
III (1,51- 4,0 mm)	175	38,1			
IV (>4,0 mm)	58	12,6			
<b>Ulzeration</b>					
Nein	277	60,3			
Ja	166	36,2			

Nicht angegeben	16	3,5			
<b>Clark Level</b>					
Keine Angabe	96	20,9			
1	0	0			
2	21	4,6			
3	107	23,3			
4	213	46,4			
5	22	4,8			
<b>Lokalisation</b>					
nicht angegeben	1	0,2			
Extremitäten	238	51,9			
Rumpf	220	47,9			
<b>Sentinellymphknotenstatus</b>					
nicht angegeben	155	33,8			
Negativ	240	52,3			
Positiv	64	13,9			
<b>Klinisches Stadium</b>					
nicht angegeben	<b>33</b>	<b>7,2</b>			
<b>I</b>	<b>212</b>	<b>46,2</b>			
davon IA	51	11,1			
davon IB	160	34,9			
<b>II</b>	<b>137</b>	<b>29,8</b>			
davon IIA	77	16,8			
davon IIB	42	9,2			
davon IIC	17	3,7			
<b>III</b>	<b>75</b>	<b>16,3</b>			
davon IIIA	23	5,0			
davon IIIB	32	7,0			
davon IIIC	8	1,7			
<b>IV</b>	<b>2</b>	<b>0,4</b>			
<b>MCSP</b>					
nicht angegeben	9	2,0			
Positiv	356	77,6			
Negativ	94	20,5			
<b>gp100</b>					
nicht angegeben	63	13,7			
Positiv	133	29,0			
Negativ	263	57,3			
<b>DCCD<sub>MCSP</sub></b>			5	0-400000	10,8
<b>DCCD<sub>gp100</sub></b>			0	0-500000	1,0

Im untersuchten Patientenkollektiv von 2008-2017 befanden sich mit 56,4 % etwas mehr Männer als Frauen im Vergleich zum Durchschnitt im Jahr 2013 in Deutschland (51,1 %), (Robert Koch-Institut [RKI], 2016). Das mediane Operationsalter betrug 56 Jahre, wobei der jüngste Patient nur 15 Jahre, der älteste 85 Jahre alt war. Damit waren die Patienten jünger als deutschlandweit (Frauen 59,6 J., Männer 64,2 J., Bericht zum Krebsgeschehen in

Deutschland). Die mediane Tumordicke nach Breslow betrug 1,6 mm, was dem Breslow-Stadium III entsprach. Die Aussage über den histopathologischen Sentinellymphknotenstatus lag in 33,8 % der Fälle nicht vor. Die mediane Nachbeobachtungszeit betrug 38 Monate. Die Verteilung der Tumorstadien zeigte einen großen Anteil von >75 % der Stadien I und II, die nach Einteilung des AJCC keine Lymphknotenbeteiligung hatten. Stadium IV war hingegen kaum vertreten, was daran liegt, dass es sich hierbei um Patienten mit vorliegenden Fernmetastasen handelte, bei denen eine Sentinelexstirpation nicht vorgesehen ist.

### 3.7.2 Univariate Überlebensanalysen

Im Laufe der Probengewinnung und der Durchführung der Markerscreenings und qPCR wurden die große Zellmorphologie und der MelanA-Status in qPCR als Malignitätsnachweise definiert. Um festzustellen, ob diese Laborergebnisse Einfluss auf den Erkrankungsverlauf der Patienten – also prognostische Bedeutung – hatten, wurden sie in Überlebensanalysen mithilfe von Kaplan-Meier-Kurven untersucht. Die Überlebenszeit wurde aus dem Operationsdatum des Wächterlymphknotens und dem Datum des letzten follow-up errechnet. Patienten, die zum Zeitpunkt des letzten follow-up kein Ereignis hatten, wurden zu diesem Zeitpunkt zensiert. Untersucht wurde das Gesamtüberleben, wofür alle verstorbenen Patienten, ungeachtet der Ursache, als Ereignis galten.

#### 3.7.2.1 Überlebensanalyse anhand der Zellmorphologie und des MelanA-Status

Da experimentell die große MCSP-positiven Zellen als DCCs definiert wurden, sollte getestet werden, ob der Nachweis großer MCSP-positiver Zellen in SLN zu einem schlechteren Gesamtüberleben führt. Von Interesse war auch, ob bereits der Nachweis kleiner MCSP-positiver Zellen das Gesamtüberleben verschlechterte.

Die Patienten wurden nach der MCSP-Zellmorphologie eingeteilt und gegen die MCSP-negativen Patienten getestet (*Abbildung 16 A*).

Um einen möglichen zusätzlichen Einfluss einer MelanA-Expression festzustellen, wurden die nach der Morphologie eingeteilten Gruppen mit dem MelanA-Status kombiniert analysiert. Hierfür wurden die MelanA-qPCR-Ergebnisse verwendet und gegen die MCSP-negative Gruppe getestet (*Abbildung 16 B*).

Das Auftreten von großen MCSP-positiven Zellen war immer mit schlechterem Überleben verknüpft. Durch den MelanA-Nachweis verschlechterte sich das Überleben weiter.

Die Patienten mit kleinen MCSP-positiven Zellen in SLN waren ohne Hinzunahme des MelanA-Status nicht signifikant von den MCSP-negativen Patienten zu unterscheiden, mit

Nachweis von MelanA ergab sich ein statistisch signifikant kürzeres Gesamtüberleben (Abbildung 16 A und B).

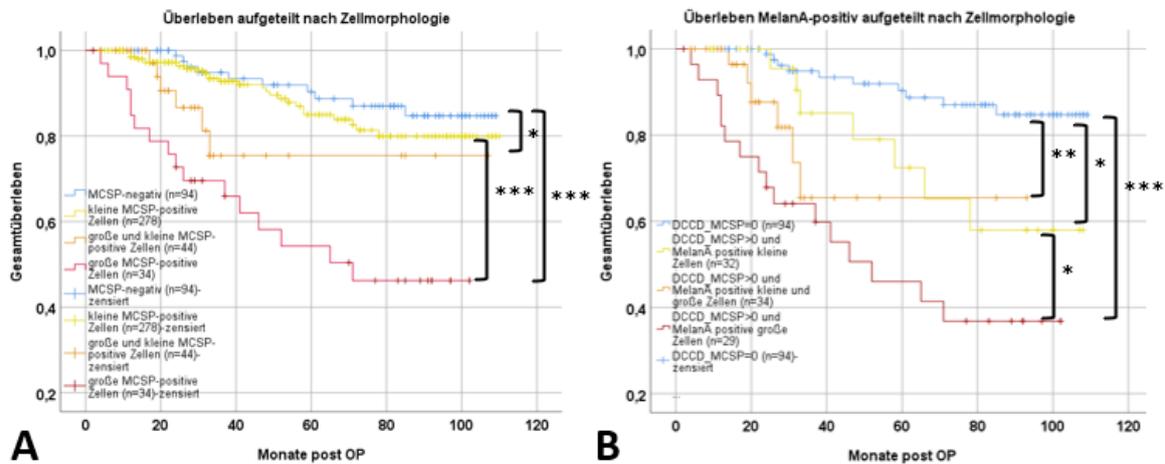


Abbildung 16 Kaplan-Meier-Überlebenskurve des Gesamtüberlebens abhängig von der Zellmorphologie der MCSP-positiven Zellen (A) und der Zellmorphologie bei Patienten mit MelanA-Expression in qPCR (B). Log Rank test, \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$

Durch die gemeinsame Analyse mit MelanA-Status konnte das Signifikanzniveau jeweils gesteigert werden. MelanA eignete sich somit ohne Rücksichtnahme auf die Zellmorphologie der MCSP-positiven Zellen als Marker, um Risikopatienten zu detektieren.

Nachdem gezeigt worden ist, dass MelanA-Expression aus den MCSP-positiven Patienten Untergruppen mit höherem Risiko detektieren kann, sollte überprüft werden, ob die Hinzunahme der MelanA-Expression auch in den Parametern Tumordicke und Lymphknotenstatus eine verbesserte Aufteilung ermöglichte.

### 3.7.2.2 Überlebensanalyse anhand der Tumordicke und des MelanA-Status

Zu den Überlebensdaten unserer Patienten wurde auch die Tumordicke des Melanoms festgehalten. Hierdurch ließen sich die Patienten nach Breslow in 4 Stadien einteilen. Die Fragestellung war, ob die Aufteilung der Breslow-Stadien in MelanA-qPCR-positiv und -negativ signifikante Unterschiede des Gesamtüberlebens ergab.

Hierfür wurden die Information über die Tumordicke mit den MelanA-qPCR-Daten kombiniert, Patienten ohne Information über die Tumordicke oder über den MelanA-qPCR-Status wurden vor der Analyse ausgeschlossen. Die Analyse erfolgte getrennt nach MelanA-Status.

Der MelanA-Nachweis zeigte eine Verschlechterung des Gesamtüberlebens bei den Breslow-Stadien 2-4 (Abbildung 17).

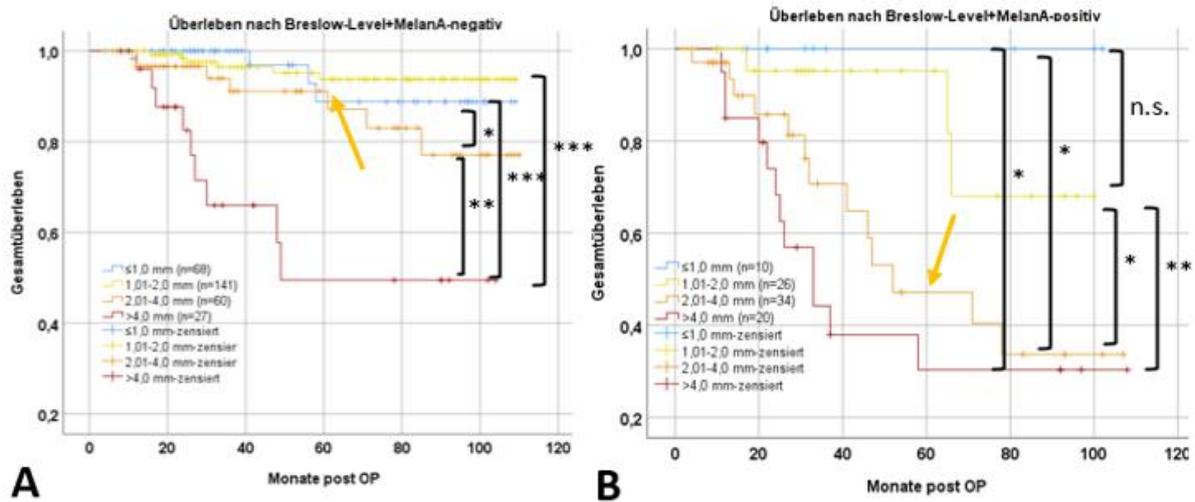


Abbildung 17 Kaplan-Meier-Überlebenskurve des Gesamtüberlebens abhängig vom Breslow-Level und der MelanA-Expression in qPCR. MelanA-negativ (A) und MelanA-positiv (B). Zwischen A und B signifikanter Unterschied zwischen Gruppen 2  $p < 0,001$  und auch Gruppen 3  $p = 0,049$ . Log Rank test, \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$

Der MelanA-Nachweis konnte in den Breslow-Stadien 2 und 3 Risikopatienten bestimmen. Dies zeigte sich exemplarisch durch die etwa halbierte 5-Jahresüberlebensrate der Breslow-Stadium 3 Patienten (Abbildung 17 A und B, Pfeilmarkierungen). Auch der fehlende signifikante Unterschied zwischen Stadium 3 und 4 bei den MelanA-positiven Patienten zeigte deren erhöhtes Risiko.

Ebenso wie die Breslow-Tumordicke, ist die histopathologische Aufarbeitung der SLN ein wichtiger Parameter, auch hier sollten die MelanA-qPCR-Ergebnisse getestet werden.

### 3.7.2.3 Überlebensanalyse anhand der $DCCD_{gp100}$ , des histopathologischen Status und des MelanA-Status

Die Färbung der Lymphknotensuspensionen mit gp100 wurde in unserer Arbeitsgruppe routinemäßig durchgeführt, sodass diese Daten auch für die Überlebensanalysen zur Verfügung standen. Außerdem wurde auch der histopathologische SLN-Status untersucht. Die Frage war, ob mit den Daten der MelanA-qPCR auch Gruppen mit gleicher  $DCCD_{gp100}$  oder histopathologischem Status in bessere und schlechtere Verläufe aufgeteilt werden können.

Hierfür wurden die MelanA-Ergebnisse in MCSP-positiven Zellen mit den Daten der gp100-Färbung der Zellsuspensionen sowie mit dem histopathologischen SLN-Status kombiniert. Da

die gp100-Färbung und die MCSP-Färbung unabhängig voneinander durchgeführt wurden, konnte es Patienten geben, die gp100-negativ waren, aber MCSP-positiv und damit auch MelanA-positiv (s. 3.2). In diese Analysen wurden nur Patienten eingeschlossen, zu deren SLN jeweils die notwendigen Daten vorhanden waren.

Es fiel auf, dass jeweils die doppelt positiven Gruppen das schlechteste Gesamtüberleben zeigten.

Patienten mit positiver gp100-Färbung, die keine MelanA-Expression aufwiesen, überlebten nicht kürzer als gp100-negative Patienten, jedoch verschlechterte der MelanA-Nachweis sowohl in gp100-negativen als auch -positiven Patienten das Gesamtüberleben signifikant (Abbildung 18 A).

Patienten mit histopathologischem Nachweis einer SLN-Metastase, die keine MelanA-Expression aufwiesen, überlebten nicht kürzer als histopathologisch unauffällige Patienten. Dahingegen verschlechterte der MelanA-Nachweis sowohl in histopathologisch negativen als auch positiven Patienten das Gesamtüberleben signifikant (Abbildung 18 B).

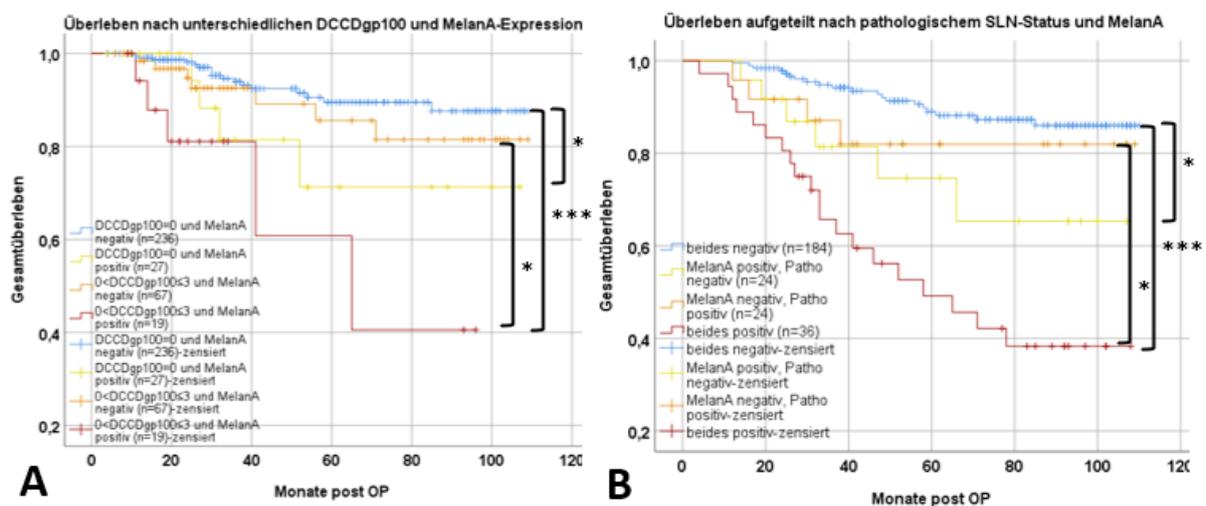


Abbildung 18 Kaplan-Meier-Überlebenskurve des Gesamtüberlebens abhängig von  $DCCD_{gp100}$  mit MelanA-Expression (A) sowie vom histopathologischen SLN-Status mit MelanA-Expression (B). Log Rank test, \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$

Für das Gesamtüberleben spielte das Vorhandensein von MelanA also sogar bei negativer Routineuntersuchung des SLN eine statistisch signifikante Rolle. Patienten mit MelanA-Expression zeigten ein signifikant kürzeres Überleben als MelanA-negative Patienten.

Insgesamt zeigte sich in den univariaten Analysen die in qPCR nachgewiesene MelanA-Expression in jeder Konstellation als signifikanter Einflussfaktor auf das Gesamtüberleben mit einem Zusatznutzen, sogar für die Standardmethoden der Pathologie sowie der klinischen Tumoreinstufung.

Da aber bis jetzt in jeder Analyse nur ein Teil der klinischen und experimentellen Daten betrachtet werden konnte, sollte in einer multivariaten Analyse untersucht werden, ob sich die MelanA-Expression gegen die anderen möglichen Einflussfaktoren durchsetzen konnte.

### 3.7.3 Multivariate Analysen

Von Ulmer et al. (Ulmer et al., 2014) wurde ein Modell zur Vorhersage des Patientenüberlebens publiziert, das aus der Betrachtung der  $DCCD_{gp100}$ , der Tumordicke nach Breslow und der Ulzeration des Melanoms bestand. Diese drei Patientenmerkmale setzten sich durch multivariate Testung (Cox-Regression) gegen vier weitere Faktoren (Lokalisation, Geschlecht, Alter, Lymphknotenstatus) durch. Dafür wurde eine schrittweise rückwärts verlaufende Cox-Regression berechnet. Nach jedem Schritt wurde die Eigenschaft mit dem höchsten p-Wert (also der geringsten Signifikanz) ausgeschlossen. Als Ereignis wurde ein melanombedingter Todesfall definiert.

Da dieses Modell auf den Daten des Tübinger Patientenkollektivs von 2000 bis 2008 beruhte, konnte das Modell auf die Regensburger Datenbank angewandt werden, um es zu überprüfen.

#### 3.7.3.1 Anwendung des Ulmer-Modells zur Vorhersage des Patientenüberlebens

Ebenso wie Ulmer wurden die maximalen  $DCCD_{gp100}$ -Werte der Patienten umgestaltet und logarithmiert. Die Tumordicke wurde ebenfalls logarithmiert. Die Variable der Ulzeration war dichotom, der Tumor war entweder ulzeriert oder nicht.

Untersuchte Prädiktoren:

- Logarithmierte  $DCCD_{gp100+1}$
- Logarithmierte Tumordicke
- Ulzeration ja oder nein

Ulmer et al. gaben die Hazard Ratio mit dem dazugehörigen 95 % Konfidenzintervall an. Für die Ulzeration ergab sich eine Hazard Ratio von 2,04 (1,40-2,97).  $DCCD_{gp100}$  1,47 (1,31-1,65). Tumordicke 18,63 (10,68-32,24) (Ulmer et al., 2014, Tabelle 3).

In meine Analyse mit der Cox-Regression nach dem gleichen Muster wie Ulmer et al. wurden 377 Patienten eingeschlossen. In diesen 377 Patienten traten 32 Ereignisse auf.

Bei den Regensburger Patienten zeigte sich die Ulzeration ohne signifikanten Einfluss auf das Patientenüberleben. Hier konnte das Ergebnis von Ulmer et al. also nicht bestätigt werden (Tabelle 13).

Dagegen waren die  $DCCD_{gp100}$  und die Tumordicke auch im Regensburger Kollektiv signifikant. Die Hazard Ratio der Tumordicke lag aber im Regensburger Kollektiv deutlich höher.

**Tabelle 13: Prädiktionsmodell aus Ulmer et al., 2014: Vergleich der Tübinger mit den Regensburger Patientendaten**

	Ulmer et al. – Tübinger Patienten		Regensburger Patienten	
	Hazard Ratio	Konfidenzint.	Hazard Ratio	Konfidenzint.
Ulzeration	2,04	1,40-2,97	1,24	0,58-2,65
$\log_{10}(DCCD_{gp100+1})$	1,47	1,31-1,65	1,24	1,01-1,52
$\log_{10}(\text{Tumordicke})$	18,63	10,68-32,24	26,49	7,99-87,88

*Hazard Ratio und 95 %-Konfidenzintervall des Prädiktionsmodells bestehend aus drei Merkmalen.*

Bis auf den Einfluss der Ulzeration konnte das Prädiktionsmodell von Ulmer also bestätigt werden. Im Anschluss sollten nun die neuen Prädiktoren mituntersucht werden.

### 3.7.3.2 Einschluss neuer Kriterien

In univariaten Analysen erwiesen sich große MCSP-positive Zellen und die MelanA-Expression als signifikant lebensverkürzend.

Der Einfluss dieser Prädiktoren sowie der  $DCCD_{MCSP}$  und der kleinen MCSP-positiven Zellen wurde gemeinsam mit dem Ulmer-Modell aus Tumordicke,  $DCCD_{gp100}$  und Ulzeration mit der schrittweise rückwärts verlaufenden Cox-Regression untersucht. Damit konnte das Risiko der neuen Marker im Vergleich mit den bereits publizierten Einflussfaktoren untersucht werden.

Hinzugenommen wurden:

- Große MCSP-positive Zellen als dichotome Variable
- Kleine MCSP-positive Zellen als dichotome Variable
- $\log_{10}(DCCD_{MCSP+1})$
- MelanA-Expression als dichotome Variable

Durch die neu eingeschlossenen Variablen verringerte sich die Anzahl der eingeschlossenen Patienten von 377 auf 328. Darunter waren 29 Ereignisse.

Im neuen Modell setzten sich die Tumordicke und das Vorhandensein von großen MCSP-positiven Tumorzellen vor allen anderen Prädiktoren durch. Die mit Abstand höchste Hazard Ratio hatte dabei die Tumordicke.

Als drittbester Prädiktor erwies sich die MelanA-Expression, die allerdings in Schritt 5 aufgrund eines p-Werts von 0,173 aus der weiteren Berechnung entfernt wurde. Unter Berücksichtigung der neuen Prädiktoren (große MCSP-positive Zellen, MelanA-Expression, kleine MCSP-positive Zellen,  $\log(\text{DCCD}_{\text{MCSP}+1})$ ) zeigten sich die Ulzeration und die  $\log(\text{DCCD}_{\text{gp100}+1})$  nicht signifikant für das Überleben der Patienten (Tabelle 14).

**Tabelle 14: Multivariate Analyse des Patientenüberlebens**

Schritt	Anzahl der Faktoren im Rechenmodell	Log (Tumordicke)	Große MCSP-positive Zellen	MelanA-Expression	Log ( $\text{DCCD}_{\text{gp100}+1}$ )	Ulzeration	Kleine MCSP-positive Zellen	Log ( $\text{DCCD}_{\text{MCSP}+1}$ )
1	7	27,68 (6,78-113,07)	2,43 (0,80-7,35)	2,38 (0,81-6,99)	0,77 (0,49-1,22)	1,37 (0,59-3,15)	0,77 (0,35-1,73)	1,12 (0,66-1,92)
2	6	27,87 (6,84-113,55)	2,59 (0,89-7,52)	2,38 (0,81-7,02)	0,83 (0,62-1,12)	1,42 (0,63-3,19)	0,79 (0,36-1,74)	
3	5	27,24 (6,86-108,16)	2,65 (0,94-7,46)	2,37 (0,83-6,81)	0,85 (0,64-1,13)	1,44 (0,65-3,20)		
4	4	32,79 (8,79-122,36)	2,57 (0,92-7,21)	2,46 (0,87-7,00)	0,86 (0,65-1,15)			
5	3	27,22 (7,58-96,66)	2,22 (0,79-6,25)	2,03 (0,73-5,62)				
6	2	26,41 (7,60-91,81)	3,64 (1,72-7,72)					

Darstellung der Hazard Ratio mit 95 %-Konfidenzintervallen. Nach jedem Schritt wurde der Prädiktor mit dem höchsten p-Wert entfernt. Die Tumordicke und die großen MCSP-positiven Zellen waren in Schritt 6 beide signifikant.

Die Auswertung der sieben Prädiktoren mit den Daten der Regensburger Melanompatienten sah also die Information über das Vorkommen der großen MCSP-positiven Zellen und die

MelanA-Expression als einflussreicher an als die  $\log(\text{DCCD}_{\text{gp}100+1})$  und die Ulzeration. Ein Einschluss dieser zwei Prädiktoren in das Prädiktionsmodell erschien also sinnvoll.

### 3.7.3.3 Entwicklung eines neuen Prädiktionsmodells

Zur Bildung eines neuen Prädiktionsmodells wurde die  $-2\log$ -likelihood, ‘ein Maß für die Güte der Anpassung des Modells an die Daten, auch Abweichung genannt‘ (Handbuch IBM SPSS Statistics, Version 25), herangezogen. Je niedriger die  $-2\log$ -likelihood, desto näher ist das Modell den Daten.

Der Einschluss der zwei signifikanten Prädiktoren aus der Cox-Regression ergab eine  $-2\log$ -likelihood von 374,00.

Durch die Hinzunahme des drittbesten Prädiktors, MelanA-Expression, sank die  $-2\log$ -likelihood auf 332,42.

Zwar waren die Prädiktoren  $\log(\text{DCCD}_{\text{gp}100+1})$  und Ulzeration im Regensburger Kollektiv nicht signifikant, sie führten aber dennoch zu einer Verringerung der  $-2\log$ -likelihood auf 255,61 (Tabelle 15).

**Tabelle 15: Entwicklung der  $-2\log$ -likelihood mit Hinzunahme der Prädiktoren.**

Anzahl der Prädiktoren im Modell	$-2\log$ -likelihood	Log (Tumordicke)	Große MCSP-positive Zellen	MelanA-Expression	$\log(\text{DCCD}_{\text{gp}100+1})$	Ulzeration
2	374,00	$p < 0,0001$	$p = 0,001$			
3	332,42	$p < 0,0001$	$p = 0,186$	$p = 0,059$		
4	259,17	$p < 0,0001$	$p = 0,106$	$p = 0,132$	$p = 0,457$	
5	255,61	$p < 0,0001$	$p = 0,065$	$p = 0,108$	$p = 0,270$	$p = 0,374$

*P-Werte geben die Wahrscheinlichkeit an, dass fälschlicherweise ein Einfluss des Prädiktors angenommen wurde.*

Das bedeutete, dass das Modell mit den Prädiktoren  $\log(\text{DCCD}_{\text{gp}100+1})$  und Ulzeration die Daten besser beschrieb als ohne.

Die Hinzunahme von kleinen MCSP-positiven Zellen und dem  $\log(\text{DCCD}_{\text{MCSP}+1})$  ergab nur noch eine geringfügige Verringerung des  $-2\log$ -likelihood von 255,61 auf 255,08.

Ein Ulmer-Modell aus den Prädiktoren  $\log(\text{Tumordicke})$ ,  $\log(\text{DCCD}_{\text{gp}100+1})$  und Ulzeration sollte also um die Prädiktoren große MCSP-positive Zellen und MelanA-Expression erweitert werden, um die beste Vorhersage für das Risiko der Patienten zu treffen.

## 4 Diskussion

Die Arbeitsgruppe von Professor Christoph Klein untersucht seit 20 Jahren die Metastasierungswege des Malignen Melanoms. Es war bereits gelungen, MCSP-positive Melanomzellen aus Wächterlymphknoten zu isolieren. Nachgewiesen wurde der Ursprung dieser Zellen aus dem Malignen Melanom durch die Identifizierung genetischer Aberrationen und Mutationen in Onkogenen. Durch die Bildung von Melanomen in immundefizienten Mäusen nach Injektion einiger dieser Zellen konnten die genetischen Untersuchungen auch in vivo bestätigt werden.

Durch Genexpressionsanalysen sollten die MCSP-positiven Zellen weiter analysiert werden, ein Genexpressionsprofil der Melanomzellen (DCC) sollte etabliert werden, um die MCSP-positiven DCC eindeutig zu erkennen.

### 4.1 Lymphknotenscreening - Vergleich der Färbemethoden

#### 4.1.1 gp100

Durch die gp100-Färbung der Lymphknotensuspensionen mit dem HMB45-Antikörper gegen das zytoplasmatische Antigen gp100 konnten spezifisch Melanomzellen in den Lymphknoten detektiert werden, in CLN wurden keine Zellen angefärbt (Ulmer et al., 2005). Ein positiver Nachweis von gp100 in einem SLN konnte also als Lymphknotenbefall gewertet werden. Im Vergleich der Histopathologie mit der Einzelzell-Immunzytochemie konnte weiterhin die höhere Sensitivität der HMB45-Immunzytochemie nachgewiesen werden (Ulmer et al., 2005). In den Leitlinien zur Behandlung des Malignen Melanoms werden einzelne Melanomzellen in den Wächterlymphknoten bereits als N1 und somit mindestens als Stadium IIIA kategorisiert (Gershenwald et al., 2017). Damit wird dem negativen prognostischen Einfluss auch der beginnenden Lymphknotenmetastasierung Rechnung getragen, der auch für den Nachweis von bis zu 3 gp100-positiven Zellen ( $DCCD_{gp100} \leq 3$ ) in der Lymphknotensuspension gezeigt wurde (Ulmer et al., 2014).

Die in der Arbeitsgruppe routinemäßig durchgeführte gp100-Färbung und die damit gewonnene  $DCCD_{gp100}$  konnte also als Referenz dienen, dass in einem SLN tatsächlich Melanomzellen vorhanden waren.

#### 4.1.2 MCSP

Da nur das Genom, nicht aber die mRNA der gp100-positiven Zellen untersucht werden konnte, wurde mit der MCSP-Immunfluoreszenzfärbung eine Methode zur Gewinnung vitaler

Zellen entwickelt. Mithilfe der MCSP-Immunfluoreszenzfärbung konnten einzelne lebende Zellen isoliert und deren mRNA gewonnen werden, um die Genexpression der Zellen zu untersuchen.

Mit dem Transmembranprotein MCSP verwendeten wir ein Klasse I Onkoantigen. Als Onkoantigen werden Tumor-assoziierte Antigene bezeichnet, die in gesunden Geweben kaum, in Tumoren dagegen stark exprimiert werden und außerdem an der Krebsentwicklung beteiligt sind (Cavallo et al., 2007; Rolih et al., 2017). Durch die Lage an der Zelloberfläche sind Klasse I Onkoantigene für T-Zellen und Antikörper erreichbar und stellen somit mögliche Angriffspunkte für Immuntherapien dar (Cavallo et al., 2011). MCSP wurde durch das National Cancer Institute der USA als ein möglicher Therapieansatzpunkt gewertet (Cheever et al., 2009) und ist auch aktuell Gegenstand der Immuntherapieforschung mit CAR-T-Zellen und Zytokin-induzierten T-Killer-Zellen (Harrer et al., 2022; Giraud et al., 2023).

Bei Untersuchungen von Lymphknotenschnitten mittels monoklonaler Antikörper gegen MCSP zeigte sich das Oberflächenantigen in über 90 % der untersuchten Makro- und Mikrometastasen in SLN von Malignen Melanomen exprimiert. Damit konnte MCSP häufiger nachgewiesen werden als MelanA und gp100. In tumorfreien Lymphknotenschnitten war keine MCSP-Detektion festgestellt worden, somit zeigte sich die MCSP-Färbung spezifisch (Goto et al., 2008).

In unseren Analysen der Zellsuspensionen konnten wir die hohe Sensitivität bestätigen. Sogar in 72 % der histopathologisch-negativen SLN konnten MCSP-positive Zellen gefunden werden (*Abbildung 3*). Im Vergleich zur gp100-Färbung, die immunhistochemisch eine geringere Sensitivität als H&E, S-100 und MelanA zeigte (Abrahamsen et al., 2004), war die MCSP-Färbung ebenfalls sensitiver (*Abbildung 5*).

Die Spezifität der MCSP-Färbung konnte mit der Einzelzellfärbung nicht bestätigt werden, da MCSP-positive Zellen in 83 % der untersuchten CLN gefunden wurden (*Abbildung 2*).

Für das Screening der Lymphknoten standen in gp100 ein spezifischer und in MCSP ein sensitiver, aber weniger spezifischer Marker zur Verfügung. In dieser Arbeit mussten also die MCSP-positiven Zellen in falsch-positive Zellen und tatsächliche Melanomzellen anhand der Genexpression unterschieden werden.

## 4.2 Zellmorphologien

Dieser Unterscheidung ging die rein morphologische Aufteilung der MCSP-positiven Zellen voran. Mittels MCSP-Färbung konnten zwei unterschiedliche Zellmorphologien detektiert werden: die kleinen Zellen waren eher schwach fluoreszierend und hatten einen Mittelwert von 7,54  $\mu\text{m}$  im Durchmesser, die großen Zellen waren stark fluoreszierend mit einem Mittelwert von 14,63  $\mu\text{m}$  im Durchmesser (Naimer, 2016).

### 4.2.1 Bestimmung der großen Zellen als sichere Melanomzellen

Interessanterweise zeigten sich in CLN keine großen MCSP-positiven SLN-Zellen, was diese wahrscheinlicher zu DCCs machte. In genomischen Untersuchungen bestätigte sich diese Einschätzung, da in CGH-Analysen große MCSP-positive Zellen häufig genomische Aberrationen (z.B. Deletionen auf Chromosom 9p und 10, Gewinne auf 17q, 18q, 20q, und 21q, (Scheitler, 2013) aufwiesen und auch in immundefizienten NSG-Mäusen Tumore induzierten (Werner-Klein et al., 2018). Außerdem bestand eine Korrelation zwischen der Tumordicke und dem Vorkommen großer MCSP-positiver Zellen (Naimer, 2016). Die Tumordicke ist weithin als ein wichtiger negativer Prognosefaktor bekannt, wobei dickere Melanome mit einem schlechteren Überleben assoziiert sind (Abbas et al., 2014; Gershenwald et al., 2017). Der Beweis konnte zwar nicht für jede große MCSP-positive Zelle einzeln erbracht werden, insgesamt konnten die großen MCSP-positiven Zellen aber als Melanomzellen eingestuft werden.

### 4.2.2 Bestimmung der kleinen Zellen als heterogene Gruppe

Die Einordnung der kleinen MCSP-positiven Zellen war dagegen schwieriger. Bereits in Vorarbeiten waren zwar ebenfalls genetische Aberrationen und Onkogenmutationen festgestellt worden (Scheitler, 2013), jedoch wurden auch MCSP-positive Zellen in tumorfreien Kontrolllymphknoten gefunden. Es war also sicher, dass die kleinen MCSP-positiven Zellen eine heterogene Gruppe darstellten, unter der sich mindestens zwei Zellgruppen verbargen: Melanomzellen und nicht-Melanomzellen unklarer Entität.

Die CLN-Zellen wurden in 83 % der CLN gefunden, jedoch stets vereinzelt mit einer  $DCCD_{MCSP}$  von maximal 15 (*Abbildung 2*), in über 80 % der Fälle lag nur eine  $DCCD_{MCSP} \leq 5$  vor, was einen signifikanten Unterschied zu den SLN darstellte (*Tabelle 1*). MCSP-positive Zellen ohne Bezug zum Malignen Melanom schienen also nur einen kleinen Teil der kleinen MCSP-positiven Zellen auszumachen.

In der Literatur werden als mögliche MCSP-exprimierende Zellen unter anderem Nävuszellen genannt, die in bis zu 28 % der Lymphknoten gefunden wurden (Natali et al., 1983; Abrahamsen et al., 2004).

Weitere Möglichkeiten für MCSP-positive Zellen in CLN könnten verschiedene Immunzellen sein. In Mäusen wurde das zu MCSP homologe NG2 in etwa 80 % der T-Zellen und Makrophagen, sowie in etwa 50 % der Dendritischen Zellen mittels FACS-Analysen nachgewiesen (Ferrara et al., 2016).

#### 4.2.3 Kleine Zellen als Vorstufe der großen Zellen

Durch die Betrachtung der  $DCCD_{MCSP}$  und des Vorkommens der zwei Zellmorphologien ließ sich feststellen, dass die großen MCSP-positiven Zellen vermehrt bei hohen  $DCCD_{MCSP}$  vorkamen, die kleinen Zellen vor allem bei niedrigen  $DCCD_{MCSP}$ . Lymphknoten, die beide Zellmorphologien aufwiesen, lagen mit ihrer  $DCCD_{MCSP}$  dazwischen (*Abbildung 6*). Die kleinen MCSP-positiven Zellen schienen von den großen MCSP-positiven Zellen verdrängt zu werden bei fortschreitender  $DCCD_{MCSP}$ . Es könnte sich hierbei also um eine Vorläuferpopulation handeln, welche sich im Laufe der Metastasierung allmählich zu großen Zellen differenziert. Diese Theorie wird durch die gleichen, jedoch seltener auftretenden, genomischen Aberrationen in den kleinen MCSP-positiven Zellen gestützt (Scheitler, 2013).

Obwohl der Zusammenhang zwischen Tumordicke und Sterblichkeit eindeutig beschrieben wird, weisen mehrere Autoren übereinstimmend darauf hin, dass auch Patienten mit niedriger Tumordicke und kompletter Resektion des Primärtumors einen metastatischen Verlauf nehmen können (Abbas et al., 2014; Gershenwald et al., 2017). Auch unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass etwa 50 % der Disseminierungen bereits bei einer Primärtumordicke von  $\leq 0,5$  mm geschahen und das Risiko einer neu beginnenden Disseminierung mit Zunahme der Tumordicke abnahm (Werner-Klein et al., 2018). Dies passt gut in die Modelle der frühen Disseminierung und parallelen Progression, welche für das Maligne Melanom bereits beschrieben wurden. Früh disseminierte Zellen können sich hierbei unabhängig vom Primärtumor differenzieren und weitere Mutationen erwerben (Klein, 2009, 2020). Ein Teil der kleinen MCSP-positiven Zellen könnte in diesem Modell die früh disseminierten Zellen darstellen, welche allmählich u.a. ihren Phänotyp ändern und die Fähigkeit zur Metastasenbildung erwerben. Der Verlauf einer Melanomkrankung wird auch von anderen Autoren mit einer Änderung des Phänotyps von epithelial zu mesenchymal beschrieben (Aris et al., 2012; Pessoa et al., 2021).

## 4.3 Interpretation der Genexpressionsanalysen

In dieser Arbeit sollten die MCSP-positiven Zellen auf ihre Genexpression untersucht und anhand der Genexpression Melanomzellen beschrieben werden. Bereits gezeigt wurde, dass die großen MCSP-positiven Zellen Melanomzellen darstellten und sich auch unter den kleinen MCSP-positiven Zellen Melanomzellen befanden. Untersucht wurde, ob sich diese Einteilung auch in den Genexpressionsanalysen zeigte. Eine Nachweismethode von Melanomzellen anhand einer spezifischen Genexpression sollte etabliert werden.

### 4.3.1 Nachweis von Melanomzellen durch Markerscreening

Die gesamte MCSP-Probenbank mit ausreichender QC wurde im sogenannten ‚Markerscreening‘ auf die Expression der Melanom-assoziierten Transkripte MelanA, gp100 und TRP2 getestet.

Im laufenden Projekt wurde bereits eine schwache Bande in der Gelelektrophorese als PCR-Nachweis eines Markers gewertet. Im Markerscreening auf gp100, MelanA und TRP2 zeigten kleine MCSP-positive SLN-Zellen und CLN-Zellen überwiegend schwache Banden, große MCSP-positive SLN-Zellen hingegen meist starke Banden.

Es zeigte sich, dass die gleichzeitige Expression der drei Marker charakteristisch für die großen MCSP-positiven Zellen war und diese darin hochsignifikant von den kleinen MCSP-positiven und den MCSP-negativen Zellen zu unterscheiden waren. Diese dreifache Markerexpression kam in den CLN-Zellen nicht vor (*Abbildung 9, Abbildung 10*). Durch Nachweis einer dreifachen Markerexpression konnte eine Melanomzelle definiert werden.

Bei den kleinen MCSP-positiven Zellen traf die dreifache Markerexpression auf etwa jede siebte Marker-positive Zelle zu (*Abbildung 10*).

Diese seltenere Markerexpression in den kleinen MCSP-positiven Zellen fügte sich in die Vorüberlegungen ein, dass die kleinen Zellen als Vorstufe der großen Zellen und als beginnende Disseminierung angesehen werden können.

Durchgehend Marker-negative Zellen kamen in allen Zellgruppen vor, am seltensten in den großen MCSP-positiven Zellen. Diese Zellen wurden somit nicht als Melanomzellen gewertet.

In den LADN-Patienten waren die Expressionsraten in allen Zellgruppen höher (*Abbildung 9, Abbildung 10*). Da diese Patienten eine fortgeschrittenere Erkrankungssituation mit nachgewiesenen Lymphknotenmetastasen hatten, stützten diese Ergebnisse die Einschätzung der Marker-positiven Zellen als Melanomzellen.

Einen interessanten Aspekt zeigte der Vergleich der Marker-Expression und der QC. In der QC wurden Zellen mit 2/3 und 3/3 exprimierten Haushaltsgenen als ausreichend für die weiteren Analysen eingestuft. Jedoch waren die großen MCSP-positiven Zellen mit 2/3 Haushaltsgenen hochsignifikant häufiger Marker-negativ als die mit 3/3 (53,7 % zu 11,9 %, *Tabelle 3*).

Dieser Befund könnte daran liegen, dass bereits ein einzelnes nicht nachweisbares Kontrollgen für einen relevanten Verlust von mRNA steht. Bei der Untersuchung der Zellen mit leicht eingeschränkter QC wurde also die Markerexpression systematisch unterschätzt. Das könnte auch zu der niedrigeren Expressionsrate der Melanom-assoziierten Marker in den kleinen SLN-Zellen führen, da diese signifikant seltener von guter QC waren (*Abbildung 8*).

Für weiterführende, teurere Untersuchungen sollten nur Zellen mit einwandfreier Qualitätskontrolle, d.h. 3/3 Banden in der PCR, ausgewählt werden.

#### 4.3.2 Keine Unterscheidung der kleinen Zellen von CLN-Zellen durch Mikroarray-Untersuchungen

Für die Bestimmung eines Genexpressionsprofils der kleinen MCSP-positiven SLN-Zellen wurden Genexpressionsmikroarrays durchgeführt. Durch den Vergleich der kleinen MCSP-positiven Zellen und der CLN-Zellen sollten unterschiedlich exprimierte Gene gefunden werden, die es dann als qPCR-Test ermöglichen sollten, die heterogene Gruppe der kleinen Zellen in Melanomzellen und nicht-Melanomzellen zu trennen.

Die bioinformatisch errechnet signifikant unterschiedlich exprimierten Gene konnten in den qPCR-Untersuchungen nur sehr eingeschränkt die erwartete Unterscheidung der zwei Gruppen herbeiführen. Lediglich zwei in der SLN-Gruppe hochreguliert erscheinende Gentranskripte (GRAP2 und PRKCH) konnten die SLN-Zellen von den CLN-Zellen unterscheiden. Die in den CLN-Zellen hochregulierten Gene hingegen konnten in qPCR keine zuverlässigen Ergebnisse erbringen. Außerdem gelang es nicht, die in der Testkohorte gesehene Trennung der zwei Gruppen an einer unabhängigen Validierungskohorte zu reproduzieren. Die untersuchten Gene schienen also keine Aussagekraft zu haben (3.5).

Ursächlich hierfür könnte eine falsche Zusammenstellung der Gruppen gewesen sein. Zwar wurden die SLN-Zellen anhand der Marker-Expression (MelanA, gp100 oder TRP2) ausgewählt, jedoch wiesen sie meist nur einen der drei Marker auf. Nach den Ergebnissen des Markerscreenings konnte durch die Expression nur eines Markers keine Melanomzelle definiert werden. Innerhalb der SLN-Gruppe könnten sich also einige nicht-Melanomzellen befunden haben. Da die Auswahl der Mikroarrayzellen während der Anfangsphase der

Untersuchungen der MCSP-positiven Zellen erfolgt war, konnten die Erkenntnisse nach Auswertung der zwischenzeitlich angewachsenen Probenbank noch nicht in diese einfließen.

Um verlässliche Ergebnisse zu bekommen, wurden als weiterer Schritt die Genexpressionsmikroarraydaten der CLN-Zellen mit großen MCSP-positiven Zellen verglichen. Bioinformatisch zeigte sich hierbei ein bereits eingesetzter Marker – MelanA – als signifikant unterschiedlich exprimiert (*Tabelle 9*).

#### 4.4 Höhere Sensitivität der Endpunkt-PCR im Vergleich zur MelanA-qPCR

Mit einer qPCR kann die Stärke der Genexpression quantifiziert werden, im Gegensatz zur Endpunkt-PCR mit anschließender Gelelektrophorese. Durch die MelanA-qPCR, die mit demselben Primerpaar durchgeführt wurde, wie die MelanA-Endpunkt-PCR, konnten beide Nachweismethoden miteinander verglichen werden. Vor der qPCR musste von den WTAs der zu untersuchenden Zellen allerdings noch eine Reamplifikation und eine Verdünnung auf eine cDNA-Konzentration von 1 ng/µl durchgeführt werden (s. 2.2.10, 2.2.11).

Beim Vergleich der MelanA-Expression in Endpunkt-PCR und qPCR fiel auf, dass bei den großen MCSP-positiven Zellen in 100 % (n=22) der untersuchten Zellen die mittels Endpunkt-PCR nachgewiesene MelanA-Expression durch die qPCR bestätigt werden konnte. Hingegen waren die 5 MelanA-Endpunkt-PCR-positiven CLN-Zellen in qPCR MelanA-negativ.

In kleinen MCSP-positiven SLN-Zellen konnte zu 42,6 % (n=47) eine in Endpunkt-PCR nachgewiesene MelanA-Expression durch die qPCR bestätigt werden (*Tabelle 10*).

Im Vergleich zu den kleinen Zellen war die MelanA-Expression in den großen MCSP-positiven Zellen stärker ausgeprägt, da sich hier Endpunkt- und qPCR nicht unterschieden (*Tabelle 9*).

Die Vergleiche zeigten, dass die Endpunkt-PCR eine höhere Sensitivität besitzt als die qPCR. Dafür spricht auch, dass keine Endpunkt-MelanA-negative Zelle in der qPCR MelanA-positiv war. Ursächlich könnte dafür der unterschiedliche Einsatz von cDNA sein. In der Endpunkt-PCR setzten wir eine 1:5 Verdünnung der primären WTA ein (2.2.8), für die qPCR nahmen wir immer 5 ng cDNA auf ein Reaktionsvolumen von 20 µl. Wenn also in der Endpunkt-PCR anfangs mehr Kopien der für MelanA codierenden cDNA vorhanden waren, könnte dies die häufigere Rate an positiv getesteten Zellen erklären. Da die 1:5 Verdünnungen der primären WTA auch untereinander unterschiedliche Konzentrationen haben, ist eine Quantifizierung der

positiven Ergebnisse der Endpunkt-PCR durch die qPCR, um die Zellen mit nur geringer MelanA-Expression zu erkennen, überlegenswert.

Auch die höhere Anzahl an Amplifikationszyklen im Endpunkt-PCR-Protokoll im Vergleich zum qPCR-Protokoll (40 statt 35) kann zu den unterschiedlichen Ergebnissen geführt haben.

Um sich einer tatsächlichen Genexpression, bzw. einer Genexpression in relevantem Ausmaß, sicher zu sein sollte zur Verifizierung eines positiven Ergebnisses der Endpunkt-PCR noch eine qPCR zur Quantifizierung der Expression folgen.

## 4.5 Nachweis von Melanomzellen durch MelanA-qPCR

Andere Autoren beschreiben, dass MelanA sowohl in benignen Melanozyten als auch in Malignen Melanomen vorkommt (Kawakami & Rosenberg, 1997). MelanA wurde sogar in benignen Nävi innerhalb von Lymphknoten nachgewiesen. Die Nachweismethode stellte die Immunhistochemie an Lymphknotenschnitten dar (Abrahamsen et al., 2004). Dass MelanA mit Melanozyten und auch Melanomen assoziiert ist, war also bekannt. Mit dem immunhistochemischen MelanA-Nachweis konnten benigne nicht von malignen Läsionen unterschieden werden.

Obwohl also MelanA nur den melanozytären Ursprung von Zellen, nicht jedoch ihre Malignität nachweisen konnte, konnte durch die Quantifizierung der MelanA-Expression dennoch zwischen gutartigen Zellen mit geringer Expression und bösartigen Zellen mit hoher Expression unterschieden werden.

Durch die Vergleiche der MelanA-Endpunkt-PCR mit der MelanA-qPCR konnte nämlich gezeigt werden, dass die CLN-Zellen keine relevante MelanA-Expression aufwiesen, die großen MCSP-positiven Zellen jedoch fast durchgängig. Diese Unterscheidung gelang sowohl an den Mikroarraygruppen als auch an einer unabhängigen Validierungskohorte (*Tabelle 9, Tabelle 10*). Außerdem bestand eine Korrelation der MelanA-Expression mit der  $DCCD_{MCSP}$ , was bedeutete, dass eine Zunahme der Lymphknotenbesiedelung mit einer stärkeren MelanA-Expression der Einzelzellen einherging (*Abbildung 14, Abbildung 15*). Eine starke Expression von MelanA war also charakteristisch für DCCs, insbesondere bei hoher  $DCCD_{MCSP}$ . Hierfür spricht auch, dass MelanA auch von anderen Autoren in proliferierenden Melanomzellen beschrieben wurde (Aris et al., 2012).

## 4.6 Unterdiagnostik durch stochastische Genexpression

Die Genexpression erfolgt fluktuierend und wird auch als stochastisch beschrieben (Raj & van Oudenaarden, 2008). Auch die Proteinsynthese verläuft nicht immer in gleichem Maße. Wenn die Transkriptionsrate hoch ist, wird ein Protein gleichmäßig hergestellt. Bei niedriger Transkriptionsrate gibt es sogenannte ‚bursts‘, eine plötzliche Steigerung der Proteinsynthese mit anschließend raschem Abfall (Cai et al., 2006; Yu et al., 2006).

Ob das untersuchte Gen zum Untersuchungszeitpunkt auch exprimiert wird, ist also teilweise zufällig. Bei der Untersuchung einzelner Zellen könnte es vorkommen, dass die Zelle das Protein aufweist, das Transkript jedoch bereits nicht mehr oder nur in geringem Maße. Eine solche Zelle würde also fälschlicherweise als negativ eingestuft werden. Umso bemerkenswerter ist die regelmäßige co-Expression mehrerer Marker in den untersuchten großen MCSP-positiven Zellen (*Abbildung 10*) und umso wichtiger scheinen die durch die Transkripte codierten Proteine für diese Zellen zu sein.

Zur Vermeidung einer niedrigen Sensitivität und somit einer Unterdiagnostik ist die Untersuchung mehrerer Marker sowie die Untersuchung mehrerer Zellen pro Patient notwendig. Die alleinige MelanA-qPCR zeigte zwar spezifisch Melanomzellen an, könnte aber bei tatsächlichen Melanomzellen auch negativ verbleiben.

## 4.7 Einordnung der nicht-Melanomzellen

Für die Melanommarker-negativen Zellen wurde ein lymphozytärer Ursprung vermutet, da Lymphozyten in Lymphknoten ubiquitär vorhanden sind. Aus diesem Grund wurde eine qPCR zum Nachweis von CD3e, einem als T-Zell-Marker verwendeten Polypeptid, welches Teil des T-Zell-Rezeptor-CD3-Komplexes ist, etabliert.

Die erwartete Auftrennung in MelanA-positive Zellen auf der einen und CD3e-positive Zellen auf der anderen Seite konnte nicht gezeigt werden. In allen Zellgruppen gab es doppelt-positive Zellen. Bei den kleinen MCSP-positiven Zellen waren die MelanA-negativen CD3e-positiven Zellen jedoch häufiger als die MelanA- und CD3e-positiven Zellen. Die CLN-Zellen, unter denen der höchste Anteil an Lymphozyten vermutet wurde, zeigten fast keine CD3e-Expression (*Tabelle 11*).

Mithilfe von CD3e konnten die MCSP-positiven nicht-Melanomzellen nur teilweise als T-Zellen definiert werden.

In einem parallelen Experiment wurden die gleichen Zellen von Courtney König auf die Expression von CD45 mittels qPCR untersucht. Sie fand heraus, dass die CLN-Zellen zu etwa 70 % CD45-positiv waren. Die kleinen MCSP-positiven SLN-Zellen hingegen teilten sich in zwei Untergruppen auf: CD45-positiv und MelanA-negativ, sowie CD45-negativ und MelanA-positiv (König et al., zur Publikation eingereicht).

Hierdurch wird die Zuordnung der qPCR-MelanA-positiven kleinen MCSP-positiven SLN-Zellen zu den Melanomzellen bestärkt. Die MelanA-negativen dagegen werden als Immunzellen eingestuft.

## 4.8 Verschlechtertes Überleben durch MelanA-Nachweis

In den Genexpressionsanalysen zeigte sich die MelanA-qPCR als spezifischer Nachweis von Melanomzellen. An den vorliegenden klinischen Daten wurde außerdem gezeigt, dass der MelanA-Expressionsnachweis in qPCR prognostische Bedeutung für die Patienten hat.

Die großen MCSP-positiven Zellen wurden bereits früh als Melanomzellen identifiziert. Bei Betrachtung des Gesamtüberlebens der Patienten wurde deutlich, dass das Vorkommen großer MCSP-positiver Zellen ein Risikofaktor für früheres Versterben darstellte. Interessanterweise zeigten Patienten mit sowohl kleinen als auch großen MCSP-positiven Zellen, wenn auch statistisch nicht signifikant, das bessere Überleben. Dies unterstützt die Theorie, dass es sich bei den kleinen MCSP-positiven Zellen um Vorstufen der großen Zellen handelte und in den Lymphknoten gerade der Übergang von klein zu groß stattfand. Der Nachweis von ausschließlich kleinen MCSP-positiven Zellen führte dagegen nicht zu vorzeitigem Versterben (*Abbildung 16 A*).

Nach Hinzunahme der MelanA-qPCR-Ergebnisse änderte sich das Bild: alle Patientengruppen mit MelanA-Nachweis verstarben signifikant früher als die MCSP-negativen Patienten. Während bei der Betrachtung aller Patienten mit kleinen MCSP-positiven Zellen anscheinend einige Patienten ohne disseminierte Melanomzellen diesen statistischen Unterschied verdeckten, konnten durch die genauere Eingrenzung durch MelanA offensichtlich Risikopatienten identifiziert werden (*Abbildung 16 B*).

### 4.8.1 Verbesserung klinischer Einteilungen

Auch klinische Risikomerkmale wurden ohne und mit der MelanA-qPCR analysiert. Die Tumordicke ist als Kriterium zur Bestimmung des T-Stadiums der TNM-Klassifikation von essenzieller Bedeutung bei der Einstufung des Patientenrisikos. In unserem Patientenkollektiv hatten T1-, T2- und T3-Patienten annähernd gleiches 5-Jahres-Überleben von etwa 90 %,

wenngleich sich die T3-Patienten nach 8-9 Jahren dann doch signifikant von den anderen Patienten entfernten. Die T4-Patienten hatten ein schlechtes 5-Jahres-Überleben von etwa 50 % (Abbildung 17 A).

Nach Hinzunahme der MelanA-qPCR-Analyse zeigten sich die 5-Jahres-Überlebensraten von T3- und T4-Patienten deutlich verringert. Nach 8-9 Jahren war auch für die T2-Patienten ein stark verringertes Gesamtüberleben zu verzeichnen. Lediglich die T1-Patienten verschlechterten sich durch den MelanA-Nachweis nicht (Abbildung 17 B).

Durch den MelanA-Nachweis in Einzelzellen aus Wächterlymphknoten konnten also innerhalb desselben T-Stadiums Patienten mit höherem Risiko eines schlechten Verlaufs identifiziert werden, was für die klinische Therapieentscheidung genutzt werden könnte.

Auch die histopathologische Einteilung der Lymphknoten in ‚befallen‘ oder ‚tumorfrei‘ konnte der MelanA-Nachweis verfeinern. Interessanterweise war der Verlauf bei histologisch SLN-negativen aber MelanA-positiven Patienten schlechter als umgekehrt histologisch positiven, aber MelanA-negativen Patienten, wenngleich statistisch nicht signifikant. (Abbildung 18 B). Die fehlende MelanA-Expression in den Patienten mit histologisch befallenem SLN konnte in unseren Daten das eigentlich erwartete schlechtere Patientenüberleben ausgleichen. Das ist bemerkenswert, da in der AJCC-Klassifikation N1-Patienten als Stadium III eingeordnet werden, woraus die Empfehlung zur adjuvanten Therapie mit einem anti-PD1-Antikörper oder einem BRAF- oder MEK-Inhibitor ergeht. Für die Einstufung als N1 reicht der Nachweis einzelner Melanomzellen im Lymphknoten aus (S3-Leitlinie Melanom 2020).

In unserer Arbeitsgruppe wurde bereits der Nachweis geführt, dass schon bis zu drei gp100-positive Zellen pro Million Lymphknotenzellen in der Lymphknotensuspension ( $DCCD_{gp100} \leq 3$ ) ein signifikant schlechteres Überleben vorhersagten (Ulmer et al., 2014). Es konnte auch hier durch den MelanA-Nachweis ein schlechteres Überleben der gp100-negativen Patienten gegenüber den gp100-positiven, aber MelanA-negativen Patienten gezeigt werden (Abbildung 18 A, Unterschied nicht statistisch signifikant)

#### 4.8.2 Prädiktionsmodell zur Identifizierung von Risikopatienten

Das Auftreten und der Einfluss einzelner Eigenschaften der MCSP-positiven SLN-Zellen auf das Patientenüberleben wurden bereits diskutiert. Das Patientenüberleben beruht aber auf vielen unterschiedlichen Einflussfaktoren, die durch univariate Analysen nicht gemeinsam erfasst werden können. Da die Einflussfaktoren auch zusammenhängen können, fehlt eine Aussage über die Stärke des Einflusses der jeweiligen Faktoren.

Aus diesem Grund wurde bereits von Ulmer et al. eine multivariate Analyse mittels Cox-Regression durchgeführt (Ulmer et al., 2014), die als wichtigste Einflussfaktoren für melanombedingtes Versterben die  $DCCD_{gp100}$ , die Tumordicke nach Breslow und die Ulzeration des Melanoms ergab. Lokalisation, Geschlecht, Alter und Lymphknotenstatus fielen aus der Cox-Regression schrittweise heraus. Es wurde anhand der Cox-Regression ein Prädiktionsmodell erstellt, das die wichtigsten Einflussfaktoren beinhaltet.

Mit unserem Patientenkollektiv führte ich ebenfalls eine schrittweise rückwärts verlaufende Cox-Regression durch, um den Einfluss der während meiner Laborarbeit herausgefundenen potentiellen Einflussfaktoren zu untersuchen. Durch die mittels der MCSP-Untersuchungen neu hinzugewonnenen Daten konnten mit den großen MCSP-positiven Zellen und dem qPCR-MelanA-Nachweis neue Einflussfaktoren definiert werden, die das Prädiktionsmodell von Ulmer et al. verbessern. Es zeigte sich, dass der qPCR-MelanA-Nachweis tatsächlich einen eigenen Einfluss besaß und nicht nur zufällig den Einfluss der häufig simultan vorkommenden großen MCSP-positiven Zellen widerspiegelte. Somit kann durch die Kombination der klinischen Daten mit den experimentellen Daten die Einschätzung, dass MelanA spezifisch Melanomzellen detektiert, bestätigt werden.

Die Hinzunahme der Information über große MCSP-positive Zellen und die MelanA-Expression konnten die Risikoabschätzung verbessern (*Tabelle 15*). Hieraus ergeben sich potenziell neue Ansatzpunkte für klinische Forschungsvorhaben.

## 5 Zusammenfassung

Um die Therapie des metastasierten Malignen Melanoms zu verbessern, wird am Lehrstuhl für experimentelle Medizin und Therapieverfahren der Universität Regensburg die Metastasierung in den Wächterlymphknoten (SLN) untersucht. Mittels der MCSP-Immunfluoreszenzfärbung von Einzelzellsuspensionen der SLN werden dabei Einzelzellen aus den SLN isoliert, um die Genexpression der Zellen analysieren zu können. Das Ziel dieser Arbeit war, disseminierte Melanomzellen anhand ihrer Genexpression zu identifizieren. Hierfür lag eine Probenbank aus MCSP-positiven Zellen aus SLN von über 400 Patienten vor.

In den SLN war der Anteil der MCSP-positiven Zellen sehr unterschiedlich mit einem Median von 5 MCSP-positiven Zellen pro Million untersuchter Zellen ( $DCCD_{MCSP}$ ), und einer Range von 0-400000. In Lymphknoten tumorfreier Patienten (CLN) war der Median 4 und die Range 0-15. Die MCSP-Immunfluoreszenz detektierte also nicht spezifisch Melanomzellen.

Gesehen wurden große, intensiv angefärbte und kleine, meist weniger intensiv angefärbte Zellen. Die CLN-Zellen waren alle klein und schwach gefärbt. Es gab einen Zusammenhang zwischen hoher  $DCCD_{MCSP}$  und dem Vorkommen großer MCSP-positiver Zellen.

Aus Vorarbeiten war bekannt, dass sowohl große als auch kleine MCSP-positive Zellen Melanomzellen sein konnten. Eine Entwicklung der disseminierten Zellen von kleinen zu großen MCSP-positiven Zellen wurde angenommen.

In Endpunkt-PCR-Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass die Co-Expression der drei Differenzierungsmarker MelanA, gp100 und TRP2 ein Merkmal der großen MCSP-positiven Zellen darstellte, das in CLN-Zellen nicht vorhanden war. Einige kleine MCSP-positive Zellen zeigten dieses Merkmal ebenfalls.

Auf Grundlage von Genexpressionsmikroarraydaten wurde MelanA als potenzieller Marker zur Identifizierung von Melanomzellen ausgewählt. Es konnte eine qPCR zur Detektion von MelanA etabliert werden. Durch die mögliche Quantifizierung der Genexpression wurde gezeigt, dass MelanA in CLN-Zellen nicht relevant exprimiert wird, dafür in sehr hohem Maße in großen MCSP-positiven Zellen. Einige kleine MCSP-positive Zellen hatten auch starke MelanA-Expression. Die in qPCR MelanA-positiven Zellen wurden als Melanomzellen definiert.

Die kombinierte Auswertung mit Patientendaten des Regensburger Tumorzentrums zeigte, dass der qPCR-Nachweis von MelanA in Einzelzellen aus SLN, egal ob in kleinen oder großen

MCSP-positiven Zellen, einen negativen prognostischen Einfluss auf das Patientenüberleben hatte. Durch die Kombination der MelanA-qPCR-Ergebnisse mit der Breslow-Tumordicke oder dem histopathologischen Lymphknotenstatus konnten Patienten mit besonders hohem Risiko definiert werden.

Der Einfluss der MelanA-qPCR wurde durch eine multivariate Analyse mit weiteren bekannten Risikofaktoren für eine ungünstige Prognose bestätigt. Ein bereits publiziertes Prädiktionsmodell konnte somit verbessert werden.

Die Kenntnis von Risikopatienten könnte als Risikostratifizierung genutzt werden und in klinische Studien zur Therapieverbesserung einfließen.

## 6 Literaturverzeichnis

- Abbas, O., Miller, D. D., & Bhawan, J. (2014). Cutaneous malignant melanoma: Update on diagnostic and prognostic biomarkers. *The American Journal of Dermatopathology*, *36*(5), 363–379. <https://doi.org/10.1097/DAD.0b013e31828a2ec5>
- Abrahamsen, H. N., Hamilton-Dutoit, S. J., Larsen, J., & Steiniche, T. (2004). Sentinel lymph nodes in malignant melanoma: Extended histopathologic evaluation improves diagnostic precision. *Cancer*, *100*(8), 1683–1691. <https://doi.org/10.1002/cncr.20179>
- Ambrosini-Spaltro, A., Dal Cappello, T., Deluca, J., Carriere, C., Mazzoleni, G., & Eisendle, K. (2015). Melanoma incidence and Breslow tumour thickness development in the central Alpine region of South Tyrol from 1998 to 2012: A population-based study. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*, *29*(2), 243–248. <https://doi.org/10.1111/jdv.12501>
- Aris, M., Zubietta, M. R., Colombo, M., Arriaga, J. M., Bianchini, M., Alperovich, M., Bravo, A. I., Barrio, M. M., & Mordoh, J. (2012). Mart-1- and gp100-expressing and -non-expressing melanoma cells are equally proliferative in tumors and clonogenic in vitro. *The Journal of Investigative Dermatology*, *132*(2), 365–374. <https://doi.org/10.1038/jid.2011.312>
- Bataille, V., & Vries, E. de (2008). Melanoma--Part 1: Epidemiology, risk factors, and prevention. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, *337*, a2249. <https://doi.org/10.1136/bmj.a2249>
- Berneburg, M., & Surber, C. (2009). Children and sun protection. *The British Journal of Dermatology*, *161 Suppl 3*, 33–39. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2009.09447.x>
- Bilimoria, K. Y., Balch, C. M., Wayne, J. D., Chang, D. C., Palis, B. E., Dy, S. M., & Lange, J. R. (2009). Health care system and socioeconomic factors associated with variance in use of sentinel lymph node biopsy for melanoma in the United States. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *27*(11), 1857–1863. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.18.7567>
- Brastianos, P. K., Carter, S. L., Santagata, S., Cahill, D. P., Taylor-Weiner, A., Jones, R. T., van Allen, E. M., Lawrence, M. S., Horowitz, P. M., Cibulskis, K., Ligon, K. L., Taberner, J., Seoane, J., Martinez-Saez, E., Curry, W. T., Dunn, I. F., Paek, S. H., Park, S.-H., McKenna, A., . . . Hahn, W. C. (2015). Genomic Characterization of Brain Metastases Reveals Branched Evolution and Potential Therapeutic Targets. *Cancer Discovery*, *5*(11), 1164–1177. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-0369>
- Bumol, T. F., & Reisfeld, R. A. (1982). Unique glycoprotein-proteoglycan complex defined by monoclonal antibody on human melanoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *79*(4), 1245–1249. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.4.1245>
- Cai, L., Friedman, N., & Xie, X. S. (2006). Stochastic protein expression in individual cells at the single molecule level. *Nature*, *440*(7082), 358–362.
- Campoli, M. R., Chang, C.-C., Kageshita, T., Wang, X., McCarthy, J. B., & Ferrone, S. (2004). Human high molecular weight-melanoma-associated antigen (HMW-MAA): A melanoma cell surface chondroitin sulfate proteoglycan (MSCP) with biological and clinical significance. *Critical Reviews in Immunology*, *24*(4), 267–296. <https://doi.org/10.1615/critrevimmunol.v24.i4.40>
- Cavallo, F., Calogero, R. A., & Forni, G. (2007). Are oncoantigens suitable targets for anti-tumour therapy? *Nature Reviews. Cancer*, *7*(9), 707–713. <https://doi.org/10.1038/nrc2208>
- Cavallo, F., Giovanni, C. de, Nanni, P., Forni, G., & Lollini, P.-L. (2011). 2011: The immune hallmarks of cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy : CII*, *60*(3), 319–326. <https://doi.org/10.1007/s00262-010-0968-0>
- Chang, Y.-m., Barrett, J. H., Bishop, D. T., Armstrong, B. K., Bataille, V., Bergman, W., Berwick, M., Bracci, P. M., Elwood, J. M., Ernstoff, M. S., Gallagher, R. P., Green, A. C., Gruijs, N. A., Holly, E. A., Ingvar, C., Kanetsky, P. A., Karagas, M. R., Lee, T. K., Le Marchand, L., . . .

- Newton-Bishop, J. A. (2009). Sun exposure and melanoma risk at different latitudes: A pooled analysis of 5700 cases and 7216 controls. *International Journal of Epidemiology*, 38(3), 814–830. <https://doi.org/10.1093/ije/dyp166>
- Cheever, M. A., Allison, J. P., Ferris, A. S., Finn, O. J., Hastings, B. M., Hecht, T. T., Mellman, I., Prindiville, S. A., Viner, J. L., Weiner, L. M., & Matrisian, L. M. (2009). The prioritization of cancer antigens: A national cancer institute pilot project for the acceleration of translational research. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 15(17), 5323–5337. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-0737>
- Eggermont, A. M. M., Chiarion-Sileni, V., Grob, J.-J., Dummer, R., Wolchok, J. D., Schmidt, H., Hamid, O., Robert, C., Ascierto, P. A., Richards, J. M., Lebbe, C., Ferraresi, V., Smylie, M., Weber, J. S., Maio, M., Bastholt, L., Mortier, L., Thomas, L., Tahir, S., . . . Testori, A. (2016). Prolonged Survival in Stage III Melanoma with Ipilimumab Adjuvant Therapy. *The New England Journal of Medicine*, 375(19), 1845–1855. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1611299>
- Elwood, J. M., & Jopson, J. (1997). Melanoma and sun exposure: An overview of published studies. *International Journal of Cancer*, 73(2), 198–203. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0215\(19971009\)73:2<198::aid-ijc6>3.0.co;2-r](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0215(19971009)73:2<198::aid-ijc6>3.0.co;2-r)
- Farber, E. (1984). The Multistep Nature of Cancer Development. *Cancer Research*, 44(10), 4217–4223.
- Ferrara, G., Errede, M., Girolamo, F., Morando, S., Ivaldi, F., Panini, N., Bendotti, C., Perris, R., Furlan, R., Virgintino, D., Kerlero de Rosbo, N., & Uccelli, A. (2016). Ng2, a common denominator for neuroinflammation, blood-brain barrier alteration, and oligodendrocyte precursor response in EAE, plays a role in dendritic cell activation. *Acta Neuropathologica*, 132(1), 23–42. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1563-z>
- Friedman, R. J., Rigel, D. S., & Kopf, A. W. (1985). Early detection of malignant melanoma: The role of physician examination and self-examination of the skin. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 35(3), 130–151. <https://doi.org/10.3322/canjclin.35.3.130>
- Gandini, S., Sera, F., Cattaruzza, M. S., Pasquini, P., Picconi, O., Boyle, P., & Melchi, C. F. (2005). Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: Ii. Sun exposure. *European Journal of Cancer (Oxford, England : 1990)*, 41(1), 45–60. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2004.10.016>
- Gershenwald, J. E., Scolyer, R. A., Hess, K. R., Sondak, V. K., Long, G. V., Ross, M. I., Lazar, A. J., Faries, M. B., Kirkwood, J. M., McArthur, G. A., Haydu, L. E., Eggermont, A. M. M., Flaherty, K. T., Balch, C. M., & Thompson, J. F. (2017). Melanoma staging: Evidence-based changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 67(6), 472–492. <https://doi.org/10.3322/caac.21409>
- Giraudò, L., Cattaneo, G., Gammaitoni, L., Iaia, I., Donini, C., Massa, A., Centomo, M. L., Basiricò, M., Vigna, E., Pisacane, A., Picciotto, F., Berrino, E., Marchiò, C., Merlini, A., Paruzzo, L., Poletto, S., Caravelli, D., Biolato, A. M., Bortolot, V., . . . Sangiolo, D. (2023). Cspg4 CAR-redredirected Cytokine Induced Killer lymphocytes (CIK) as effective cellular immunotherapy for HLA class I defective melanoma. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR*, 42(1), 310. <https://doi.org/10.1186/s13046-023-02884-x>
- Green, A. C., Williams, G. M., Logan, V., & Strutton, G. M. (2011). Reduced melanoma after regular sunscreen use: Randomized trial follow-up. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 29(3), 257–263. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.28.7078>
- Harrer, D. C., Schenkel, C., Berking, C., Herr, W., Abken, H., Dörrie, J., & Schaft, N. (2022). Decitabine-Mediated Upregulation of CSPG4 in Ovarian Carcinoma Cells Enables Targeting by CSPG4-Specific CAR-T Cells. *Cancers*, 14(20). <https://doi.org/10.3390/cancers14205033>
- Kawakami, Y., & Rosenberg, S. A. (1997). Immunobiology of human melanoma antigens MART-1 and gp100 and their use for immuno-gene therapy. *International Reviews of Immunology*, 14(2-3), 173–192. <https://doi.org/10.3109/08830189709116851>

- Klein, C. A. (2009). Parallel progression of primary tumours and metastases. *Nature Reviews. Cancer*, 9(4), 302–312. <https://doi.org/10.1038/nrc2627>
- Klein, C. A. (2020). Cancer progression and the invisible phase of metastatic colonization. *Nature Reviews. Cancer*, 20(11), 681–694. <https://doi.org/10.1038/s41568-020-00300-6>
- Klein, C. A., Seidl, S., Petat-Dutter, K., Offner, S., Geigl, J. B., Schmidt-Kittler, O., Wendler, N., Passlick, B., Huber, R. M., Schlimok, G., Baeuerle, P. A., & Riethmuller, G. (2002). Combined transcriptome and genome analysis of single micrometastatic cells. *Nature Biotechnology*, 20(4), 387–392. <https://doi.org/10.1038/nbt0402-387>
- König, C., Gütter, S., Koerkel-Qu, H., Markiewicz, A., Scheitler, S., Katzer, M., Berneburg, M., Renner, P., Cucuruz, B., Jaser, H., Guttenberger, L., Naimer, V., Weidele, K., Treitschke, S., Werno, C., Limm, K., Rachel, R., Baumann, F., Schmidleithner, L., . . . Werner-Klein, M. Metastasis founder cells activate immunosuppression early in human melanoma metastatic colonization. *Zur Publikation eingereicht*.
- Larkin, J., Chiarion-Sileni, V., Gonzalez, R., Grob, J.-J., Rutkowski, P., Lao, C. D., Cowey, C. L., Schadendorf, D., Wagstaff, J., Dummer, R., Ferrucci, P. F., Smylie, M., Hogg, D., Hill, A., Márquez-Rodas, I., Haanen, J., Guidoboni, M., Maio, M., Schöffski, P., . . . Wolchok, J. D. (2019). Five-Year Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *The New England Journal of Medicine*, 381(16), 1535–1546. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1910836>
- Linos, E., Swetter, S. M., Cockburn, M. G., Colditz, G. A., & Clarke, C. A. (2009). Increasing burden of melanoma in the United States. *The Journal of Investigative Dermatology*, 129(7), 1666–1674. <https://doi.org/10.1038/jid.2008.423>
- Naimer, V. (2016). *Identifikation und Genexpressionsanalyse disseminierter Tumorzellen des malignen Melanoms* [Dissertation]. Universität Regensburg, Regensburg.
- Natali, P. G., Giacomini, P., Russo, C., Steinbach, G., Fenoglio, C., & Ferrone, S. (1983). Antigenic profile of human melanoma cells. Analysis with monoclonal antibodies to histocompatibility antigens and to melanoma-associated antigens. *Journal of Cutaneous Pathology*, 10(4), 225–237. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0560.1983.tb01489.x>
- Newton-Bishop, J. A., Chang, Y.-m., Iles, M. M., Taylor, J. C., Bakker, B., Chan, M., Leake, S., Karpavicius, B., Haynes, S., Fitzgibbon, E., Elliott, F., Kanetsky, P. A., Harland, M., Barrett, J. H., & Bishop, D. T. (2010). Melanocytic nevi, nevus genes, and melanoma risk in a large case-control study in the United Kingdom. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention : A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 19(8), 2043–2054. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-10-0233>
- Olsen, C. M., Zens, M. S., Green, A. C., Stukel, T. A., Holman, C. D.'A. J., Mack, T., Elwood, J. M., Holly, E. A., Sacerdote, C., Gallagher, R., Swerdlow, A. J., Armstrong, B. K., Rosso, S., Kirkpatrick, C., Zanetti, R., Bishop, J. N., Bataille, V., Chang, Y.-m., Mackie, R., . . . Whiteman, D. C. (2011). Biologic markers of sun exposure and melanoma risk in women: Pooled case-control analysis. *International Journal of Cancer*, 129(3), 713–723. <https://doi.org/10.1002/ijc.25691>
- Pessoa, D. d. O., Rius, F. E., Papaiz, D. D.'A., Ayub, A. L. P., Morais, A. S., Souza, C. F. de, da Paixão, V. F., Setubal, J. C., Newton-Bishop, J., Nsengimana, J., Azevedo, H., Reis, E. M., & Jasiulionis, M. G. (2021). Transcriptional signatures underlying dynamic phenotypic switching and novel disease biomarkers in a linear cellular model of melanoma progression. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 23(4), 439–455. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2021.03.007>
- Psaty, E. L., Scope, A., Halpern, A. C., & Marghoob, A. A. (2010). Defining the patient at high risk for melanoma. *International Journal of Dermatology*, 49(4), 362–376. <https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2010.04381.x>
- Raj, A., & van Oudenaarden, A. (2008). Nature, nurture, or chance: Stochastic gene expression and its consequences. *Cell*, 135(2), 216–226.

- Rigel, D. S., Russak, J., & Friedman, R. (2010). The evolution of melanoma diagnosis: 25 years beyond the ABCDs. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 60(5), 301–316. <https://doi.org/10.3322/caac.20074>
- Robert Koch-Institut (2016). Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016.
- Rolih, V., Barutello, G., Iussich, S., Maria, R. de, Quaglino, E., Buracco, P., Cavallo, F., & Riccardo, F. (2017). Cspg4: A prototype oncoantigen for translational immunotherapy studies. *Journal of Translational Medicine*, 15(1), 151. <https://doi.org/10.1186/s12967-017-1250-4>
- S3-Leitlinie Melanom 2020. S3-Leitlinie Melanom. [https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user\\_upload/Downloads/Leitlinien/Melanom/Melanom\\_Version\\_3/L\\_Melanom\\_Langversion\\_3.3.pdf](https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Melanom/Melanom_Version_3/L_Melanom_Langversion_3.3.pdf) (Onkologie, Leitlinienprogramm).
- Scheitler, S. (2013). *Klonale Diversität und phänotypische Heterogenität bei der Progression maligner Melanome* [Dissertation]. Universität Regensburg.
- Szeimies, R., Hauschuld, A., Garbe, C., Kaufmann, R., & Landthaler, M. (2010). *Tumoren der Haut. Grundlagen, Diagnostik und Therapie in der dermatologischen Onkologie ; 167 Tabellen*. Thieme.
- Ulmer, A., Dietz, K., Hodak, I., Polzer, B., Scheitler, S., Yildiz, M., Czyz, Z., Lehnert, P., Fehm, T., Hafner, C., Schanz, S., Röcken, M., Garbe, C., Breuninger, H., Fierlbeck, G., & Klein, C. A. (2014). Quantitative measurement of melanoma spread in sentinel lymph nodes and survival. *PLoS Medicine*, 11(2), e1001604. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001604>
- Ulmer, A., Fischer, J. R., Schanz, S., Sotlar, K., Breuninger, H., Dietz, K., Fierlbeck, G., & 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(15), 5425–5432. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-1995>
- Werner-Klein, M., Scheitler, S., Hoffmann, M., Hodak, I., Dietz, K., Lehnert, P., Naimer, V., Polzer, B., Treitschke, S., Werno, C., Markiewicz, A., Weidele, K., Czyz, Z., Hohenleutner, U., Hafner, C., Haferkamp, S., Berneburg, M., Rümmele, P., Ulmer, A., & Klein, C. A. (2018). Genetic alterations driving metastatic colony formation are acquired outside of the primary tumour in melanoma. *Nature Communications*, 9(1), 595. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02674-y>
- Yu, J., Xiao, J., Ren, X., Lao, K., & Xie, X. S. (2006). Probing gene expression in live cells, one protein molecule at a time. *Science (New York, N.Y.)*, 311(5767), 1600–1603. <https://doi.org/10.1126/science.1119623>
- Yu, L. L., Flotte, T. J., Tanabe, K. K., Gadd, M. A., Cosimi, A. B., Sober, A. J., Mihm, M. C., & Duncan, L. M. (1999). Detection of microscopic melanoma metastases in sentinel lymph nodes. *Cancer*, 86(4), 617–627.

## 7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Statistischer Vergleich des Anteils der Patienten mit $DCCD_{MCSP} \leq 5$ .....	30
Tabelle 2: Auflistung der für die Genexpressionsanalysen verfügbaren Zellen .....	37
Tabelle 3: Einfluss unterschiedlicher cDNA-Qualität auf die Ergebnisse des Markerscreenings in großen MCSP-positiven SLN-Zellen.....	41
Tabelle 4: Auflistung der kleinen MCSP-positiven Zellen der ‚SLN-Gruppe‘ der ‚Testkohorte‘ .....	43
Tabelle 5: PRKCH- und GRAP2-Expression in der ‚Testkohorte‘ .....	45
Tabelle 6: PRKCH- und GRAP2-Expression in der ‚SLN-Gruppe‘ und der ‚Validierungskohorte‘ ...	46
Tabelle 7: PRKCH- und GRAP2-Expression in der ‚CLN-Gruppe‘ und der ‚Validierungskohorte‘....	47
Tabelle 8: MelanA-Expression in den Zellen der ‚Testkohorte‘.....	49
Tabelle 9: Gegenüberstellung der MelanA-Expression in den Zellen der ‚Testkohorte‘ und der ‚Validierungskohorte‘ .....	49

Tabelle 10: Vergleich der MelanA-Expression in qPCR zwischen den unterschiedlichen Zellgruppen.	51
Tabelle 11: Expression von CD3e, Ki67 und PCNA in den mit MelanA-qPCR getesteten Zellen, aufgeteilt nach MelanA-positiv und -negativ	53
Tabelle 12: Überblick über die statistisch analysierten Patienten	56
Tabelle 13: Prädiktionsmodell aus Ulmer et al., 2014: Vergleich der Tübinger mit den Regensburger Patientendaten	63
Tabelle 14: Multivariate Analyse des Patientenüberlebens	64
Tabelle 15: Entwicklung der -2log-likelihood mit Hinzunahme der Prädiktoren	65

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Struktureller Aufbau des Ergebnisteils	28
Abbildung 2 Verteilung der $DCCD_{MCSP}$ in CLN- (Median 4, Range 0-15), SLN- (Median 5, Range 0-400000) und LADN-(Median 50000, Range 0-800000) Patienten. Der Lymphknoten mit der höchsten $DCCD_{MCSP}$ wurde bei Patienten mit mehreren Lymphknoten gewertet.	29
Abbildung 3 Verteilung der $DCCD_{MCSP}$ in CLN- (Median 4, Range 0-15), histopathologisch negativen SLN- (Median 4, Range 0-106), histopathologisch positiven SLN- (Median 15, Range 0-400000) und LADN-(Median 50000, Range 0-800000) Patienten. Der Lymphknoten mit der höchsten $DCCD_{MCSP}$ wurde bei Patienten mit mehreren Lymphknoten gewertet.	31
Abbildung 4 $DCCD_{MCSP}$ -Verteilung in SLN, aufgeteilt nach Histopathologie-Status negativ und positiv. Histo-negativ: Range 0-106, Histo-positiv Range 0-400000. Signifikanzen mittels Mann-Whitney-U-Test berechnet. *: $p < 0,05$ , **: $p < 0,01$ , ***: $p < 0,001$ . Skala der y-Achse logarithmisch. Die Boxen beinhalten 50 % der Daten, die Antennen geben die minimalen und maximalen $DCCD_{MCSP}$ an. Sterne sind extreme Ausreißer größer dem dreifachen Interquartilsabstand.	31
Abbildung 5 Vergleich der $DCCD_{MCSP}$ und $DCCD_{gp100}$ von SLN; Achsen mit logarithmischer Skalierung. Korrelationskoeffizient $r$ nach Pearson. Signifikanz (2-seitig): 0,01	33
Abbildung 6 $DCCD_{MCSP}$ in SLN (A) und LADN (B) in Abhängigkeit von den gefundenen Zelltypen. Median im Diagramm links der Box angegeben. Range von links nach rechts: A 1: 1-47, 2: 1-160000, 3: 1-400000, B 1: 1-14, 2: 3-900000, 3: 80-700000. Signifikanzen mittels Mann-Whitney-U-Test berechnet. *: $p < 0,05$ , **: $p < 0,01$ , ***: $p < 0,001$ . Skala der y-Achse logarithmisch. Die Boxen beinhalten 50 % der Daten, die Antennen geben die minimalen und maximalen $DCCD_{MCSP}$ an. Kreise sind milde Ausreißer zwischen dem 1,5- bis 3-fachen Interquartilsabstand. Sterne sind extreme Ausreißer größer dem dreifachen Interquartilsabstand.	34
Abbildung 7 Zellmorphologien MCSP-positiver Zellen in CLN-, SLN- und LADN-Lymphknoten. Signifikanzen mittels Fisher's exact test. *: $p < 0,05$ , **: $p < 0,01$ , ***: $p < 0,001$	36
Abbildung 8 Aufstellung der QC-Ergebnisse der isolierten Einzelzellen. Signifikanzen mittels Fisher's exact test. *: $p < 0,05$ , **: $p < 0,01$ , ***: $p < 0,001$	38
Abbildung 9 Prozentualer Anteil der Marker-exprimierenden SLN-, LADN- und CLN-Zellen. Signifikanzen mittels Fisher's exact test. *: $p < 0,05$ , **: $p < 0,01$ , ***: $p < 0,001$	39
Abbildung 10 Prozentualer Anteil der Marker-co-exprimierenden SLN-, LADN- und CLN-Zellen. Marker-negative Zellen wurden ausgeschlossen. Signifikanzen mittels Fisher's exact test. *: $p < 0,05$ , **: $p < 0,01$ , ***: $p < 0,001$	40
Abbildung 11 Amplifikationskurven der der 'SLN-Gruppe' (oben) und der der 'CLN-Gruppe' (unten); Primer: PRKCH_qPCR2	44
Abbildung 12 Amplifikationskurven der der 'SLN-Gruppe' (oben) und der der 'CLN-Gruppe' (unten); Primer: GRAP2	44
Abbildung 13 Ct-Werte von PRKCH und GRAP2 in der 'Testkohorte' (1: 'SLN-Gruppe', 2: 'CLN-Gruppe') und der 'Validierungskohorte' (3: kleine und große MCSP-positive SLN-Zellen). Je	

niedriger der Ct-Wert, desto stärker die Expression des jeweiligen Gens. Ct-Werte >30 wurden als negativ gewertet.....	47
Abbildung 14 Darstellung der Ct-Werte der MelanA-qPCR der kleinen MCSP-positiven SLN-Zellen in Abhängigkeit des jeweiligen DCCD <sub>MCSP</sub> -Wertes des SLN. Die DCCD <sub>MCSP</sub> -Werte sind logarithmisch skaliert.....	55
Abbildung 15 Darstellung der Ct-Werte der MelanA-qPCR der kleinen MCSP-positiven LADN-Zellen in Abhängigkeit des jeweiligen DCCD <sub>MCSP</sub> -Wertes der LADN. Die DCCD <sub>MCSP</sub> -Werte sind logarithmisch skaliert.....	55
Abbildung 16 Kaplan-Meier-Überlebenskurve des Gesamtüberlebens abhängig von der Zellmorphologie der MCSP-positiven Zellen (A) und der Zellmorphologie bei Patienten mit MelanA-Expression in qPCR (B). Log Rank test, *: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001.....	59
Abbildung 17 Kaplan-Meier-Überlebenskurve des Gesamtüberlebens abhängig vom Breslow-Level und der MelanA-Expression in qPCR. MelanA-negativ (A) und MelanA-positiv (B). Zwischen A und B signifikanter Unterschied zwischen Gruppen 2 p<0,001 und auch Gruppen 3 p=0,049. Log Rank test, *: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001 .....	60
Abbildung 18 Kaplan-Meier-Überlebenskurve des Gesamtüberlebens abhängig von DCCD <sub>gp100</sub> mit MelanA-Expression (A) sowie vom histopathologischen SLN-Status mit MelanA-Expression (B). Log Rank test, *: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001 .....	61



## ERKLÄRUNG ZUM PROMOTIONSVERFAHREN

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

<b>Name</b>	Guttenberger
<b>Vorname</b>	Leonhard
<b>geb. am</b>	11.04.1994
<b>in</b>	Waldkirch

Ich erkläre,

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

Außerdem erkläre ich,

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

<b>(Ort/Datum)</b>	<b>(Unterschrift)</b>

