

Aus dem  
Institut für Immunologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Brocker

**GENOMISCHE INSTABILITÄT BEIM MALIGNEN  
MELANOM:**

Genomische Analyse und Vergleich von Primärtumoren und  
disseminierten Tumorzellen in Wächterlymphknoten

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

**Murat Yildiz**

aus  
Schweinfurt

Jahr  
2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Christoph Klein

Mitberichterstatter: Prof. Dr. V. Heinemann  
Prof. Dr. M. Vollkenandt

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 05.07.2007

## **INHALTSVERZEICHNIS**

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>5</b>
1.1	Das maligne Melanom	5
1.1.1	Epidemiologie	5
1.1.2	Histologie, Klinik und Diagnostik	5
1.2	Genetik des Melanoms	9
1.3	Disseminierte Tumoreinzellzellen	14
1.4	Zielsetzung der Doktorarbeit	16
<b>2</b>	<b>PATIENTEN, MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>17</b>
2.1	Patienten	17
2.2	Methoden	18
2.2.1	Gewinnung der Wächterlymphknoten	20
2.2.2	Aufbereitung und immunohistochemische Färbung des Lymphknotengewebes	18
2.2.3	Aufbereitung und immunohistochemische Färbung des Lymphknotengewebes	19
2.2.4	Vereinzelung disseminierter Tumorzellen	20
2.2.5	Einzelzell-PCR	22
2.2.6	Kontroll-PCR	23
2.2.7	Gelelektrophorese	23
2.2.8	PCR-Protokoll für mikrodissektierte Tumorareale	24
2.2.9	Mikrodissektion von Tumorarealen	25
2.2.10	Markierung genomischer DNA	26
2.2.11	Komparative Genom Hybridisierung	27
2.2.12	CGH Auswertung	30
2.3	Statistik	31
2.3.1	Hierarchische Ähnlichkeitsanalysen	31
2.3.2	t-Test	31
2.4	Material	31
2.4.1	Primer und Oligonukleotide	31
2.4.2	Geräte	31
2.4.3	Verbrauchsmaterialien	33
2.4.4	Antikörper und Enzyme	33
2.4.5	Chemikalien	36

2.4.6	Puffer	36
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>37</b>
3.1	Gewinnung der Wächterlymphknoten in der Hautklinik der Universität Tübingen	37
3.2	Aufbereitung der Wächterlymphknoten in der Hautklinik der Universität Tübingen	39
3.3	Isolation von disseminierten Zellen aus Wächterlymphknoten und Einzelzell-PCR	40
3.4	Genomische Charakterisierung disseminierter Tumorzellen	42
3.5	Genomische Charakterisierung von Primärtumoren	46
3.6	Vergleich genomischer Aberrationen von Primärtumoren und disseminierten Tumorzellen in den Wächterlymphknoten	49
3.7	Chromosomale Veränderungen in disseminierten Zellen in Relation zur Dicke des Primärtumors	52
3.8	Vergleich chromosomaler Veränderungen von disseminierten Tumorzellen aus histopathologisch positiven und histopathologisch negativen Wächterlymphknoten	53
3.9	Vergleich chromosomaler Veränderungen von disseminierten Tumorzellen aus Wächterlymphknoten von superfiziell spreitenden Melanomen und nodulären Melanomen	55
3.10	Hierarchische Ähnlichkeitsanalysen von Primärtumoren und ihren dazugehörigen disseminierten Tumorzellen in Wächterlymphknoten anhand von chromosomalen Veränderungen	57
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>61</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>67</b>
<b>6</b>	<b>ABKÜRZUNGEN</b>	<b>68</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>71</b>
<b>8</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>82</b>
<b>9</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>83</b>

# **1 Einleitung**

## **1.1 Das maligne Melanom**

### **1.1.1 Epidemiologie**

Das Melanom entsteht aus der Entartung von pigmenthaltigen Zellen, den Melanozyten. Melanome entwickeln sich nicht nur in der Haut, sondern auch an vielen anderen Orten im Körper wie in den Meningen, den Augen und der Speiseröhre. Schon 1820 konnte Norris den Verdacht einer familiären Häufung des Melanoms bei Menschen mit heller Haut und hellen Haaren aufstellen (Norris, 1820).

Die empirische Erkenntnis der Abhängigkeit der Melanominzidenz vom geografischen Breitengrad, wird in einen kausalen Zusammenhang mit der UV-Licht Exposition gebracht (Armstrong und Krickler, 2001). Das Lebenszeitrisko von Europäern am Melanom zu erkranken, ist um den Faktor 20 von 1:1500 vor dem Zweiten Weltkrieg auf 1:75 im Jahre 2000 angestiegen (Balch, 1992). Dieser Anstieg kann zum Teil durch das weit verbreitete intensive Sonnen im Urlaub und die damit verbundene Exposition mit hohen Dosen UV-Licht erklärt werden (Gilchrest et al., 1999). Im Gegensatz dazu nahm der Anstieg der Melanominzidenz in Australien und den Vereinigten Staaten in den Geburtsjahrgängen nach 1960 ab. Man bringt dies in Zusammenhang mit den dortigen Kampagnen zur Primärprävention des malignen Melanoms mit dem Ziel, den Menschen die Notwendigkeit einer effektiven Sonnenprotektion nahezu legen (Marrett et al., 2001 und Beddingfield, 2003).

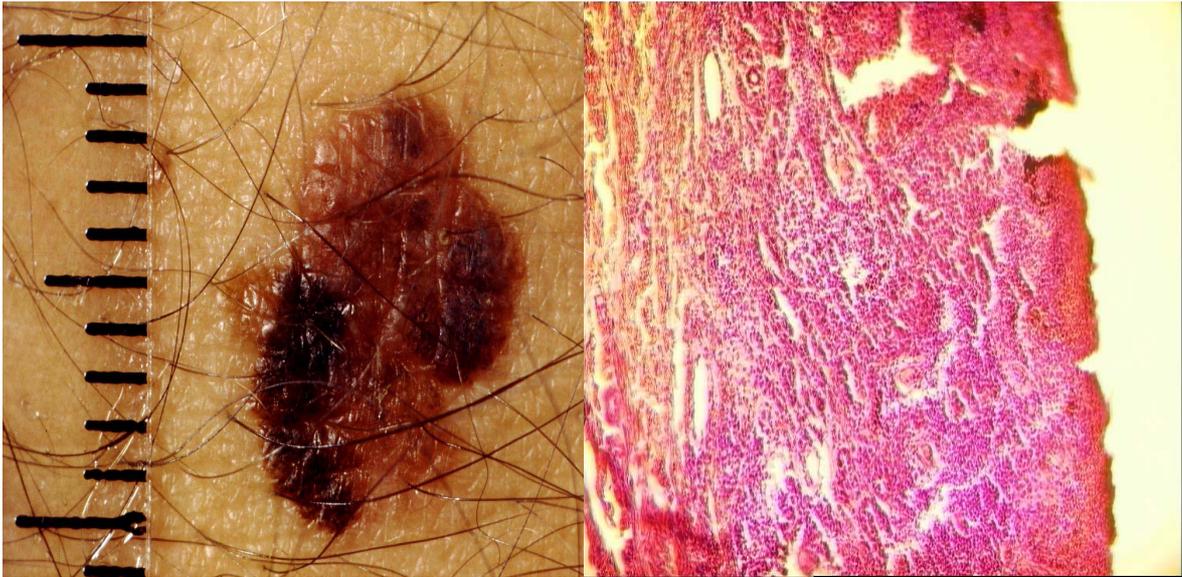
### **1.1.2 Histologie, Klinik und Diagnostik**

Melanozyten besitzen Zellfortsätze, die Kontakte zu benachbarten Keratinozyten in der Haut herstellen. Durch diese Dendriten werden Vesikel, die voll bepackt mit Melanin sind, an die Keratinozyten verteilt. Diese Melanosomen werden durch Phagozytose von den Epithelzellen aufgenommen. Dadurch kommt es nicht nur zu einer dunkleren Verfärbung der Haut, sondern auch zu einer Protektion durch Absorption der UV-Strahlung durch das

Melanin. Die umgebenden Zellen erhalten nicht nur Melanin, sondern beeinflussen ihrerseits das Wachstum der Melanozyten (Hsu et al., 2002). Eine unkontrollierte Proliferation der Melanozyten führt letztendlich zum Melanom.

Meist sind Melanome asymptomatisch, sie können sich jedoch auch selten durch Pruritus bemerkbar machen. Oft führt erst ihre morphologische Erscheinung zu weiteren diagnostischen Untersuchungen. Die klinische Diagnose richtet sich dabei nach folgenden Kriterien: Asymmetrie, unregelmäßige Begrenzung, Farbvarianz und ein Durchmesser von mehr als 6 mm (**Abbildung 1**). Etwa 10% aller Melanome sind jedoch nicht pigmentiert (Giuliano et al., 1982), was die Diagnose erheblich erschwert und deswegen auch die Prognose des Patienten erheblich verschlechtert. Wenn keine eindeutige Klassifizierung möglich ist, muss eine Biopsie mit einem Sicherheitsabstand von 2mm entnommen werden. Anschließend erfolgt eine histologische Untersuchung. Dabei ist zu beachten, dass die verdächtige Läsion komplett entfernt werden muss, da sonst die Gefahr besteht, dass bei Bestätigung der Malignität eine Bestimmung der Tumordicke und der Nachweis der vollständigen Entfernung des Tumors im Nachhinein nicht möglich ist (Scolyer et al., 2004).

Man unterscheidet histologisch zwei wichtige Phasen der Melanomentwicklung. Es wird zurzeit angenommen, dass sich Melanome in seltenen Fällen aus Nävuszellnävi entwickeln können (Clark WH Jr. et al., 1984). Nävuszellnävi sind gutartige Veränderungen der Haut, die histologisch aus Melanozyten-Zellnestern entlang der Basalmembran bestehen (Miller AJ und Mihm MC Jr., 2006). In der ersten Stufe der Progression zum Melanom findet ein radiales Tumorwachstum statt. Dabei bleibt die Basalmembran intakt, es liegt somit ein „Carcinoma in situ“ vor. In der vertikalen Wachstumsphase wird die Basalmembran durchbrochen und die Dermis und Subkutis werden infiltriert (**Abbildung 1**). Histologisch dominieren dysplastische Zellen, die aberrant angeordnet sind. Nun kann es auch zu metastatischen Absiedlungen kommen.



**Abbildung 1** makroskopisches und histologisches Bild eines malignen Melanoms

**Linkes Bild:** morphologisches Bild (10 fache Vergrößerung) eines Melanoms: Deutlich erkennbar sind folgende Malignitätskriterien: Asymmetrie, unregelmäßige Begrenzung, Farbvarianz der Hautläsion (Abstand der schwarzen Linien am linken Bildrand in mm; aufgenommen durch Dr. med. S. Schanze in der Hautklinik der Universität Tübingen). **Rechtes Bild:** histologisches Bild (40 fache Vergrößerung): In der Abbildung kommen die Melanom-Zellen als dunkel gefärbte Zellnester zur Darstellung (Aufnahme im Institut für Immunologie der Ludwig-Maximilians-Universität zu München).

Im neuen Melanom-Klassifizierungssystem des American Joint Committee on Cancer (AJCC) spielen prognostisch wichtige Faktoren eine entscheidende Rolle (Balch et al., 2001). So hat sich gezeigt, dass sich die Prognose mit zunehmender Dicke des Primärtumors verschlechtert (Balch, 1992). Ein weiterer prognostisch sehr wichtiger Faktor ist die Ulzeration von Läsionen. Von einem ulzeriertem Melanom spricht man, wenn ein Großteil der Oberfläche des Melanoms keine intakte Epidermis mehr aufweist (McGovern et al., 1982), was die Prognose wesentlich verschlechtert. Der Grad der Invasion nach Clark spielt nur bei Tumoren mit einer Dicke von weniger als einem Millimeter eine prognostische Rolle (Clark et al., 1969). Weitere negative Prädiktoren sind männliches Geschlecht, hohes Alter, sowie Tumorlokalisierung am Kopf, Hals oder Körperstamm (Balch et al., 2001). Die Arbeitsgruppe von Balch fand ferner heraus, dass die 5-Jahres-Überlebensrate mit der Anzahl der Lymphknotenmetastasen sinkt. Ferner kam man zu der Erkenntnis, dass makroskopisch evidente Lymphknotenmetastasen eine schlechtere Überlebensrate besitzen als solche mit mikroskopischer Tumorlast (Cascinelli et al., 2000). Unter einer mikroskopischen Lymphknotenmetastase versteht man einen Lymphknoten, der weder klinisch noch radiologisch sondern lediglich histopathologisch

aufgefallen ist. Die Tumormitoserate, die wahrscheinlich genauso von Bedeutung ist wie der Ulzerationsstatus, wurde in der Klassifizierung des AJCC von 2002 nicht berücksichtigt (Francken et al., 2004).

Die Untersuchung des Wächterlymphknotens bezweckt zum einen eine Aussage zur Prognose und zum anderen ist sie eine Entscheidungshilfe für die Lymphknotenausräumung. Zur Lokalisation des Wächterlymphknotens werden ein blauer Farbstoff und radioaktiv markiertes Kolloid injiziert. Präoperativ wird die Lokalisation des Wächterlymphknotens mit der Szintigraphie bestimmt. Intraoperativ kann der Wächterlymphknoten anhand seiner blauen Farbe und mit Hilfe einer portablen Gammakamera lokalisiert werden (Morton et al., 1999). Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt 90% für histopathologisch negative Patienten und 56% für histopathologisch positive Patienten (Ka et al., 2004).

Durch eine rechtzeitige Entdeckung und chirurgische Resektion des Melanoms kann in 85% der Fälle eine Heilung erzielt werden (Houghton und Polsky, 2002). Wenn es jedoch bereits zur metastatischen Absiedlung gekommen ist, beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate lediglich elf Prozent (Balch et al., 2001).

Die Hochdosis-Interferon-Alpha-Behandlung ist zurzeit die einzige adjuvante systemische Therapie, die in randomisierten klinischen Studien den Auftritt von Metastasen zeitlich verzögern konnte. Jedoch vermochte sie nicht die Überlebenszeit positiv zu beeinflussen (Eggermont, 2001). Die Strahlentherapie hat in der Melanombehandlung einen festen Platz als Palliativbehandlung bei Skelett- und Hirnmetastasen (Fife et al., 2004). Auch kann die chirurgische Entfernung von Metastasen die Prognose verbessern. So steigt die 5-Jahres-Überlebensrate bei vollständiger Exzision von Lungenmetastasen um 20% (Harpole et al., 1992).

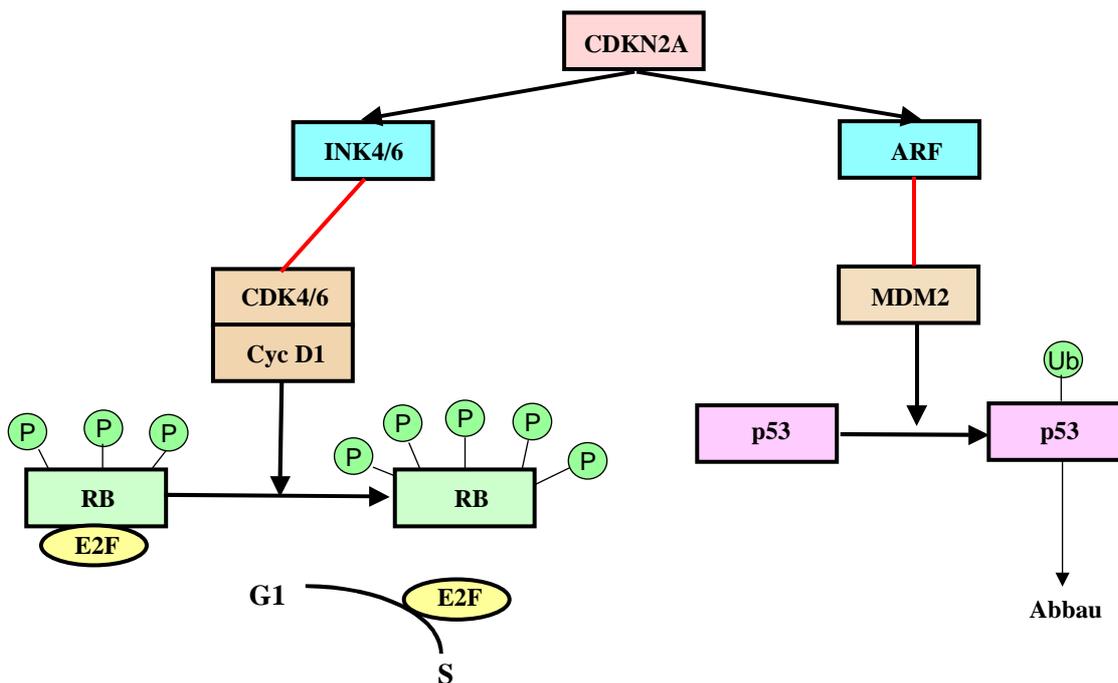
## 1.2 Genetik des Melanoms

Im Folgenden werden die zum Zeitpunkt wichtigsten genetischen Veränderungen aufgeführt, die zur Entstehung und Progression des Melanoms beitragen.

### *INK4a und ARF*

Ungefähr 10% aller Melanome treten familiär bedingt auf (Fountain et al., 1990). Sie sind hervorragend geeignet, um durch Kopplungsanalysen mit Hilfe von Stammbäumen Genloci zu identifizieren, die eine Rolle bei der Melanomentstehung spielen könnten.

So wurde CDKN2A auf dem Locus 9p21, ein bekanntes Tumorsuppressorgen (Nobori et al., 1994 und Kamp et al., 1994), als ein gehäuft auftretender Mutationsort bei familiären Melanomen identifiziert (Hussassian et al., 1994). In **Abbildung 2** wird der Signalweg von CDKN2A veranschaulicht. CDKN2A kodiert zwei Proteine, nämlich INK4a (p16) und ARF (p14) (Quelle et al., 1995). INK4a inhibiert CDK 4/6 und verhindert damit die Inaktivierung des RB Gens (Serrano et al., 1993). ARF inhibiert seinerseits mdm2 und verhindert damit die Inaktivierung von p53 (Kamijo et al., 1998 und Pomerantz et al., 1998). Der Nachweis, dass p53 eine Rolle beim Melanom spielt, wurde durch Tyr-RAS/Trp53<sup>-/-</sup> Mäuse erbracht, die Melanome entwickelten (Bardeesy et al., 2001). Ferner konnte in INK4a/ARF doppelt negativen Mäusen, die zusätzlich noch eine Mutation in HRAS hatten, eine hohe Anfälligkeit für Melanome nachgewiesen werden (Chin et al., 1997). Darüber hinaus konnte durch knock-out von INK4a oder ARF bei Tyr-RAS transgenen Mäusen gezeigt werden, dass die Entstehungshäufigkeit von Melanomen bei den Mäusen zunahm (Sharpless et al., 2001).



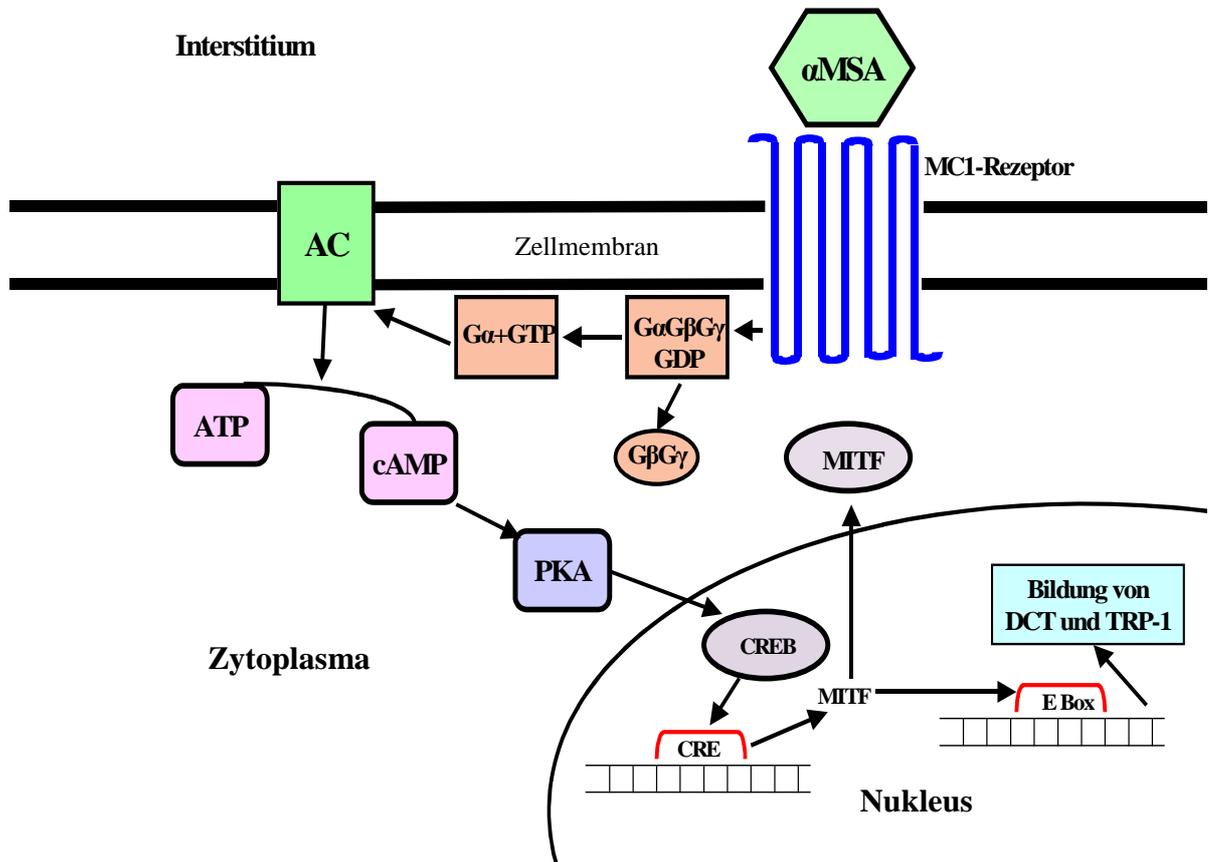
**Abbildung 2 CDKN2A, INK4A und ARF**

CDKN2A kodiert für die beiden Proteine INK4A und ARF. INK4A hemmt CDK4/6, wodurch CDK4/6 zusammen mit Cyclin D nicht das Retinoblastom-Protein (RB) hyperphosphorylieren kann. Dadurch bleibt der Komplex von RB und dem Transkriptionsfaktor E2F stabil. Dieser Komplex aus RB und E2F blockiert die Expressierung von Genen, die den Übertritt von der G1- in die S-Phase ermöglichen. Das Resultat ist ein G1-Arrest der Zellproliferation. ARF seinerseits inhibiert MDM2 und verhindert damit die Ubiquitinierung von p53, wodurch der Abbau von p53 vermindert wird. Die Stabilisierung von p53 führt je nach Zelltyp zu Zellzyklusarrest, Seneszenz oder Apoptose (Jin und Levine, 2001).

### **MC1R**

Bei Menschen mit roten Haaren und Sommersprossen spricht man vom RHC-Phänotypen (red hair colour). Bei diesen Patienten spielt der Melanokortin1-Rezeptor (MC1R), ein Rezeptor mit sieben Transmembran-Domänen und dem Liganden Melanozyten-stimulierendes Hormon (MSH) eine große Rolle (**Abbildung 3**). Er befindet sich auf Melanozyten und reguliert über eine Signalkaskade, mit den wichtigsten Bestandteilen G-Protein, cAMP und Protein-Kinase A, die Bildung von Melanin. Beim RHC-Phänotypen kommen drei MC1R-Isotypen verstärkt vor: Arg151Cys, Arg160Trp und Asp294His (Box et al., 1997; Smith et al., 1998 und Bastiaens et al., 2001). Wenn eine Person auch nur heterozygot für eines der Alle für diese Isotypen ist, nimmt die Fähigkeit der Haut ab, UV-Licht bedingte Schäden zu reparieren. Damit nimmt auch das Risiko zu, ein Melanom zu entwickeln (Healy et al., 2000). In einer australischen Studie mit Familien mit hereditären

Melanomen konnte gezeigt werden, dass einige MC1R-Isotypen die Penetranz von Mutationen im CDKN2A Locus erhöhen (Box et al., 2001).

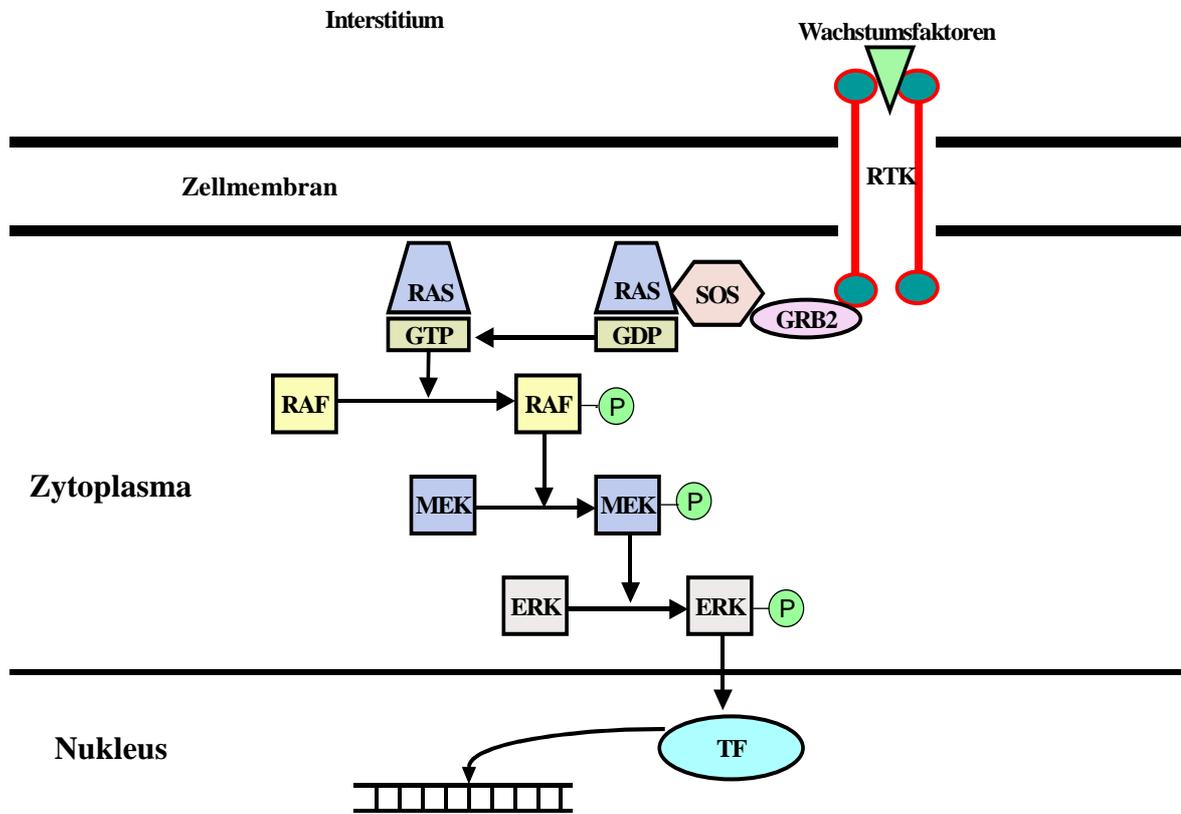


**Abbildung 3 MITF-Signalweg**

Das Melanozyten-Stimulierende-Hormon (MSH) aktiviert den Melanokortin-1-Rezeptor (MC1R). Der MC1-Rezeptor phosphoryliert ein G-Protein. Dadurch wird das Trimer in Gα mit GTP und ein Dimer aus Gβ und Gγ gespalten. Gα mit GTP stimuliert die Adenylat-Cyclase (AC). AC stellt aus ATP cAMP her, das an Protein-Kinase A (PKA) bindet. Die aktivierte PKA gelangt in den Zellkern und überträgt Phosphat an das CREB-Bindeprotein (CREB). CREB induziert die Expression von Genen, die die CRE-Sequenz in ihren Promotoren enthalten. Dadurch kommt es auch zur Bildung von MITF. MITF bindet an der E-Box der Promotorregion von TRP-1 (tyrosinase-related protein) und DCT (Dopachrom Tautomerase).

### ***RAS-RAF-MEK-ERK-MAP Signalweg***

Wachstumsfaktoren aktivieren Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK). Diese stimulieren ihrerseits Proteine der RAS-Familie (NRAS, HRAS, KRAS) und diese wiederum Proteine der RAF-Familie (c-RAF1, BRAF, ARAF) (Avruch et al, 2001). RAF phosphoryliert MEK und MEK phosphoryliert dann ERK1 und ERK2. Letztlich aktivieren ERK1 und ERK2 Transkriptionsfaktoren, die das Zellwachstum anregen, wie in **Abbildung 4** dargestellt (Peyssonnaud und Eychene, 2001). Eine Mutation in dieser Signalkaskade kann zu einer von Wachstumsfaktoren unabhängigen Zellproliferation führen. Bei der Aufrechterhaltung und Entstehung von Melanomen spielt ein aktivierter RAS-Signalweg eine erhebliche Rolle (Chin et al., 1999). In 66% der malignen Melanome kommen BRAF Mutationen vor (Davies et al., 2002), 80% dieser Mutationen stellt die Substitution einer einzigen Base dar: V599E. Diese Mutation führt zu einer ständigen Aktivierung von BRAF. In der Untersuchung der Arbeitsgruppe von Omholt kamen BRAF-Mutationen nur in Tumoren vor, die Wildtyp-Allele für NRAS besaßen. Insgesamt hatten 89% der Tumore entweder eine Mutation im BRAF oder NRAS Gen (Omholt et al. 2003). Diese Beobachtung unterstreicht die Bedeutung dieser Signalkaskade bei der Entstehung von Melanomen. Allerdings sind Mutationen in diesem Signalweg für sich alleine genommen nicht ausreichend für die Entstehung eines Melanoms, da auch bei 82% aller nicht entarteten Nävi BRAF-Mutationen festgestellt werden konnten (Moses et al., 2002).



**Abbildung 4 Der RAS-RAF-MEK-ERK Signalweg**

Der RAS-RAF-MEK-ERK Signalweg wird durch Bindung von Wachstumsfaktoren an Rezeptor-Tyrosin-Protein-Kinasen (RTK) initiiert. Nach der Dimerisation des Rezeptors kommt es zu einer Autophosphorylierung des Rezeptors. Dadurch kann sich GRB2, ein Adaptorprotein, an den Rezeptor anlagern. Im nächsten Schritt wird son of sevenless (SOS) durch GRB2 aus dem Zytoplasma eingefangen. SOS und GRB2 bilden mit RAS einen Komplex, durch den RAS eine Konformationsänderung widerfährt. GDP kann sich loslösen und statt dessen GTP angelagert werden. Das aktivierte RAS phosphoryliert RAF und RAF dann die MEKs (MEK1 und MEK2), die ihrerseits ERKs (ERK1 und ERK2) phosphorylieren. Die ERKs gelangen in den Zellkern und aktivieren Transkriptionsfaktoren (TF), die für die Expression einer Reihe von Genen sorgen.

### ***HGF-MET Signalweg***

HGF/SF ist ein Ligand des c-Met Rezeptors, der auch auf der Oberfläche von Melanozyten vorkommt (Bottaro et al., 1991). HGF/SF schwächt die Bindung zwischen Melanozyten und Keratinozyten, indem die Expression von E-Cadherin und Desmoglein-1 herunterreguliert wird. Damit liegt nahe, dass die autokrine Wirkung von HGF/SF die Proliferation und Migration von Melanozyten fördert (Li et al., 2001). In bereits

metastasierten Melanomen kann eine erhöhte Expression von c-Met nachgewiesen werden (Natali et al., 1993).

### ***PTEN***

Das Tumorsuppressorgen PTEN wurde durch homozygote Deletionsversuche auf dem Chromosomenabschnitt 10q23 lokalisiert (Li et al., 1997). PTEN hemmt den PI3K-AKT Signalweg, der in ungedrosseltem Zustand für Zellproliferation und –überleben sorgt (Stambolic et al., 1998). Deletionen und Mutationen von PTEN wurden bei Melanomen in 5-15% festgestellt (Guldberg et al., 1997). Bei einer alleinigen Mutation von PTEN bei Mäusen konnten keine Melanome festgestellt werden. Dies änderte sich bei PTEN +/- und INK4a/ARF +/- Mäusen, bei denen kutane Melanome beobachtet werden konnten (You et al., 2002). Dieses Zusammenspiel mit einem zweiten bekannten Melanom-assoziierten Signalweg macht die PTEN-Mutationen besonders interessant.

## **1.3 Disseminierte Tumoreinzellen**

Mit den bisherigen Behandlungsmethoden von metastasierten Tumoren, wie Chemotherapie und Immuntherapie konnten keine bahnbrechenden Erfolge erzielt werden. Dies könnte an der Tatsache liegen, dass diese Therapieformen größtenteils auf der Basis von Informationen über Primärtumoren oder Zelllinien von Metastasen ruhen. Dabei wird die enorme Heterogenität der einzelnen disseminierten Tumorzellen nicht berücksichtigt (Klein et al., 2002). Dies ist eines der Hauptprobleme in der Entwicklung von wirksamen Wirkstoffen gegen Metastasenbildung und Disseminierung von malignen Tumoren. Die große Anzahl von genetischen Aberrationen in den Tumoren beeinträchtigt das Auffinden von Genen, die für die Streuung und das Überleben in fremden Geweben verantwortlich sein könnten.

Die Entnahme und anschließende zytologische Färbung von disseminierten Zellen in den Wächterlymphknoten, stellt eine Möglichkeit dar, diese einzelnen Tumorzellen zu untersuchen. Dabei wurden immunzytochemische Färbungen zur Detektion der disseminierten Tumorzellen verwendet. Bei diesen Färbungen kommen epitheliale Marker

zum Einsatz, die im mesenchymalen Gewebe des Lymphknotens nicht exprimiert werden (Pantel et al., 1994).

Ob diese disseminierten einzelnen Tumorzellen beim malignen Melanom tatsächlich Ursprung für Metastasen sein können, muss noch bewiesen werden. Einen Hinweis, dass dies tatsächlich der Fall sein könnte, liefern Untersuchungen zum Mammakarzinom. So konnte beim Mammakarzinom gezeigt werden, dass Patienten mit nachgewiesenen disseminierten Zellen im Knochenmark eine signifikant kürzere metastasenfreie Zeit haben (Braun et al., 2000).

Ferner konnte beim Ösophaguskarzinom in Mausexperimenten das metastatische Potential disseminierter einzelner Tumorzellen in Lymphknoten nachgewiesen werden. Dabei wurden von histopathologisch negativen Lymphknoten beim Ösophaguskarzinom immunhistochemisch markierte Zellen isoliert. Anschließend wurden Zelllinien aus diesen Zellen generiert. In SCID Mäusen eingebracht, entstanden durch diese Zellen Tumoren und Metastasen bei den immundefizienten Mäusen (Hosch et al., 2000).

In fünf Prozent aller detektierten Metastasen findet man keinen entsprechenden Primärtumor (Bell et al., 1989). Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen (cancer of unknown primary, CUP) könnte sein, dass sich Zellklone von Primärtumor und Metastase früh in der Entwicklung des Tumors trennen (Klein, 2000). Tatsächlich konnte diese Hypothese bei der Untersuchung von Mammakarzinomen weiter untermauert werden. Dabei wurden disseminierte Zellen von metastasierten und nicht metastasierten Patienten mit ihren Primärtumoren verglichen. Die Ergebnisse dieser Studie legt nahe, dass die Disseminierung von Tumorzellen nicht wie bisher angenommen vom am weitesten fortentwickelten Klon im Primärtumor ausgeht, sondern das Ereignis viel früher eintreten muss. CGH-Untersuchungen zeigten, dass die disseminierten einzelnen Tumorzellen geringere und andere Aberrationen durchgemacht hatten als ihre dazugehörigen Primärtumore. Ferner wiesen sie im Gegensatz zu den Primärtumoren keine Telomerkrise auf (Schmidt-Kittler et al., 2003).

Inwieweit diese Beobachtungen auch beim malignen Melanom zutreffen, bleibt noch zu beantworten. Diese Dissertation hat zum Ziel einen Beitrag zur Klärung dieser offen gebliebenen Fragen beim malignen Melanom zu leisten.

## 1.4 Zielsetzung der Doktorarbeit

Ziel dieser Dissertation war die genomische Charakterisierung von disseminierten Tumorzellen aus Wächterlymphknoten und von Primärtumoren von Patienten mit Melanomen.

Zunächst galt es, disseminierte Melanomzellen in Wächterlymphknoten zu detektieren. Hierfür sollte eine Färbung gegen gp100 (HMB45) durchgeführt, die gefärbten Zellen isoliert und die genomische DNA der einzelnen Zellen amplifiziert werden. Der neoplastische Ursprung der HMB45 positiven disseminierten Zellen aus den Wächterlymphknoten sollte anschließend durch den Nachweis chromosomaler Veränderungen über die komparative genomische Hybridisierung (CGH) belegt werden.

Um einen Vergleich mit den Primärmelanomen der Patienten zu ermöglichen, sollte die DNA aus den Paraffinblöcken durch Mikrodissektion gewonnen und ebenfalls mit der CGH untersucht werden. Der Vergleich der Datensätze von disseminierten Melanomzellen und Primärmelanomen hatte zum Ziel, folgende Fragen zu beantworten:

- 1) Weisen disseminierte Melanomzellen aus Wächterlymphknoten ähnliche chromosomale Aberrationen auf wie ihre Primärtumore?
- 2) Lassen sich aufgrund der chromosomalen Aberrationen Rückschlüsse auf den Zeitpunkt der Disseminierung oder auf spezifische Selektionsprozesse treffen?
- 3) Sind disseminierte Melanomzellen aus Wächterlymphknoten, die histopathologisch als tumorfrei klassifiziert sind, genetisch anders als Tumorzellen, die bereits erfolgreich eine Lymphknotenmetastase gegründet haben?

Die Beantwortung dieser Fragen sollte beitragen, den Prozess der lymphogenen Metastasierung beim malignen Melanom besser zu verstehen.

## 2 Patienten, Material und Methoden

### 2.1 Patienten

Die Wächterlymphknoten und die Paraffinblöcke von den dazugehörigen Primärtumoren wurden von der Hautklinik der Universitätsklinik Tübingen zur Verfügung gestellt. Die Verwendung der Proben erfolgte nach Genehmigung der Ethikkommission und Einwilligung der Patienten (**Tabelle 1**).

**Tabelle 1: Charakteristika der Patienten**

<b>Patienten</b>	<b>Anzahl der Patienten (%)</b>
Gesamtzahl	28
Geschlecht	
weiblich	10 (36%)
männlich	18 (64%)
Alter in Jahren	
Median (Spannweite)	67,5 (25-79%)
Melanomlokalisierung	
Extremitäten	15 (54%)
Körperstamm	12 (43%)
Kopf und Nacken	1 (3%)
Histopathologie der SLN	
Positiv	5 (18%)
Negativ	23 (82%)
Histologischer Typ	
Superfiziell spreitendes Melanom	13 (46%)
Noduläres Melanom	8 (29%)
Akrolentiginöses Melanom	3 (11%)
Nicht spezifiziert	4 (14%)
Breslows Tumordicke	
Median (Spannweite)	2,0 mm (0.9-10 mm)
T1 (< 1 mm)	2 (7%)
T2 (1,01 - 2,00 mm)	13 (47%)
T3 (2,01 - 4,00 mm)	6 (21%)
T4 (> 4,00 mm)	6 (21%)
Nicht spezifiziert	1 (4%)
Ulzeration	
Ja	17 (61%)
Nein	6 (21%)
Nicht spezifiziert	5 (18%)

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Gewinnung der Wächterlymphknoten**

Das Staging der Patienten erfolgte nach den Kriterien der American Joint Committee on Cancer guidelines von 2001 (Balch, 2001). Im ersten Schritt der Aufbereitung der Wächterlymphknoten wird vor der Operation Technetium 99m Nanocolloide mit 100 MBq Strahlenintensität und ein bis zwei Milliliter Isosulfan blue dye (Patent blue-V, Attana Pharma, Konstanz) intrakutan injiziert. Die Wächterlymphknoten werden intraoperativ durch Messung der Radioaktivität oder den Nachweis von blue dye im Wächterlymphknoten bzw. durch Detektion von blue dye in den abführenden Lymphknoten des Wächterlymphknoten bestimmt. Die Messung der Strahlung am Patienten erfolgt durch ein Gammameßgerät (C-Trak, Care, Wise Medical Products, CA).

### **2.2.2 Aufbereitung und immunohistochemische Färbung des Lymphknotengewebes**

Nach der Entfernung von Geweberesten wird mit einem sterilen Skalpell der Wächterlymphknoten in ein Millimeter kleine Stückchen zerkleinert. Die Lymphknotenstückchen werden in ein Nährmedium (RPMI 1640, Penicillin, Streptomycin, FCS und L-Gluthamin) eingebracht und in einer Dako Medimaschine (Dako, Hamburg) mit rotierenden Klingen zerkleinert. Das Homogenisat wird dann mit Hank´s Balanced Salt Solution (Life Technology Gibco, Heidelberg) gewaschen. Anschließend wird durch Zentrifugation (bei 4°C, 205 rpm, RZB 300) für fünf Minuten und darauf folgender Überstandbeseitigung Fett entfernt. Das Pellet wird in 20 mm 1x PBS (pH 7,4) resuspendiert und dann in eine Tube mit 15 ml 60% Percoll Solution (Amersham, Uppsala, Schweden) eingebracht. Danach wird entlang eines Dichtegradienten für fünf Minuten zentrifugiert (bei 4°C, 205 rpm, RZB 300). Der Überstand mit der Interphase wird entnommen und in 50 ml 1x PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und der Rest in 1 ml 1x PBS resuspendiert. Die Zellzahl wird mit der Zählkammer von Neubauer bestimmt und auf eine Konzentration von einer Million Zellen pro Milliliter eingestellt. Auf jeden Haftobjektträger (Menzel, Deutschland) werden dann eine Million Zellen in 1 ml 1x PBS aufgetragen. Nach einer Stunde Sedimentationszeit wird die Suspension vom Objektträger entfernt. Schließlich werden die Objektträger über Nacht zum Trocknen bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Zur Blockierung von nicht spezifischen Bindungsstellen werden die Objektträger 20 min lang mit AB-Serum in 1x PBS überschichtet. Die Färbung wird dann mit der Alkalische Phosphatase-Anti-Alkaline Phosphatase (APAAP) Methode durchgeführt. Dazu werden Antikörper gegen gp100 (HMB45, Dako, Hamburg) oder gegen Melan A (A103, Dako, Hamburg) gegeben und für 45 min inkubiert. Als Positivkontrollen dienten Objektträger mit Zellen der Melanom-Zelllinie Mel 30. Als Negativkontrolle werden die OT mit MOPC21-Antikörper als IgG1-Isotypkontrolle versetzt. Zwischen den Antikörperauftragungen werden die Objektträger dreimal mit 1x PBS für jeweils drei Minuten gewaschen. Danach wird ein anti-Maus-Brückenantikörper (Z259, Dako, Hamburg) eine halbe Stunde lang inkubiert und anschließend gewaschen mit 1x PBS. Die OT werden dem Maus-APAAP-Antikörper eine halbe Stunde lang ausgesetzt. Daraufhin werden die Melanomzellen für 20 min mit BCIP/NBT-Fertiglösung (Dakro, Hamburg) behandelt. Im letzten Schritt werden die Objektträger für 10 min in 1% PFA-Lösung zur Fixierung gebracht. Die Lagerung erfolgt in PBS.

### 2.2.3 Vereinzlung disseminierter Tumorzellen

Für jede zu isolierende Melanomzelle wird ein Proteinase K-Gemisch hergestellt:

H <sub>2</sub> O	1,28 µl
OPA plus Puffer	0,20 µl
Tween 10%ig	0,13 µl
Igepal 10%ig	0,13 µl
Proteinase K 10 mg/ml	0,26 µl
Gesamt pro Tube	2,00 µl

Die Tubes mit dem Gemisch werden auf Eis gelagert, damit es zu keinem Selbstverdau des Enzyms kommt.

Die Objektträger mit den gefärbten Zellen werden mit 200 µl 1x PBS + 0,5% Igepal benetzt. Danach werden die Melanomzellen mit Hilfe eines Invertmikroskops (Leica DM IRB) bei zehnfacher Vergrößerung auf dem Objektträger gesucht.

Nachdem eine Melanomzelle gefunden worden ist, wird die Zelle unter zwanzigfacher Vergrößerung mit Hilfe einer Hohlkapillare, die vor Gebrauch in FCS eingetaucht wird, von den sie umgebenden Normalzellen und anderem Zellmaterial freigelegt. Dazu muss die Hohlkapillare mit dem Mikromanipulator herabgesenkt werden und um die Melanomzelle herum so bewegt werden, dass das umgebende Material verschoben wird. Dadurch wird verhindert, dass nach dem vorsichtigen Lösen der Tumorzelle, Normalzellen durch die Kapillare mit aufgesaugt werden. Die Kapillare wird anschließend mit der Zelle aus der Flüssigkeit des Haftobjektträgers entfernt und in die PBS Flüssigkeit eines achtkammerigen Objektträgers eingefahren. Dort wird die Zelle auf dem Boden abgelegt. Mit einer Pipette wird dann unter mikroskopischer Kontrolle die Zelle zusammen mit 1 µl PBS-Flüssigkeit aufgesaugt und letztendlich in den Tube mit dem Proteinase-Gemisch eingebracht.

Die so gewonnenen Zellen werden für zehn Stunden in einem Thermocycler bei 42°C mit Proteinase K verdaut. Am Ende wird das Enzym innerhalb von zehn Minuten durch die Erwärmung der Tubes auf 80°C inaktiviert.

#### 2.2.4 Einzelzell-PCR

Die Einzelzell-PCR richtet sich nach den Arbeiten von Klein (Klein et al., 1999 und 2002). Zuerst wird ein Mse I-Verdau mit folgendem Ansatz durchgeführt:

OPA plus Puffer	0,20 µl
Mse I (50.000 U/ml)	0,25 µl
H <sub>2</sub> O	1,55 µl
Pro Tube	2,00 µl

Dieser Ansatz wird dem Tube mit der Proteinase K verdauten Zelle zugegeben. Das Restriktionsenzym Mse I mit der Schnittstelle T TAA wirkt dann bei 37°C für drei Stunden und wird am Ende für die Dauer von zehn Minuten bei einer Temperatur von 65°C inaktiviert.

Vor der Ligation der Adapter an die durch den Mse-Verdau entstandenen Überhänge, müssen die Adapter durch Basenbindungen aneinander gelagert werden. Dies geschieht im

Thermocycler in dem das Gemisch der nachfolgenden Tabelle, in einminütigen Abständen jeweils um ein Grad schrittweise von 65°C auf 15°C abgekühlt wird.

H <sub>2</sub> O	1,50 µl
OPA plus Puffer	0,50 µl
LIB1 (100 µM)	0,50 µl
ddMSE11 (100 µM)	0,50 µl
Pro Tube	3,00 µl

Die so entstandene Adapterlösung wird dem Mse I-verdauten DNA-Material zugefügt. Das Gemisch wird mit je 1 µl T4 DNA-Ligase (5 U/µl) und 10 mM ATP versetzt und über Nacht bei 15°C ligiert. Schließlich findet am nächsten Tag die Amplifikation der DNA über folgenden Reaktionsansatz statt:

H <sub>2</sub> O	35,0 µl
Expand Long Template Puffer 1	3,0 µl
dNTP's (10 mM)	2,0 µl
Expand Long Template PolMix (3,5 U/µl)	1,0 µl
<b>Gesamt</b>	<b>41,0 µl</b>

Der Thermocycler ist folgendermaßen programmiert:

	1 Zyklus	14 Zyklen	3 Zyklen	22 Zyklen	1 Zyklus
94°C		40 s	40 s	40 s	
57°C		30 s	30 s + 1°C pro Zyklus		
65°C				30 s	
68°C	3 min	1 min 30 s + 1 s pro Zyklus	1 min 45 s + 1 s pro Zyklus	1 min 53 s + 1 s pro Zyklus	Von 68°C auf 4°C in 3 min 40 s

Der erste Zyklus im Programm dient zum Auffüllen der 3' Enden der Adapter-Fragment Bindungsstelle. Erst dadurch wird die komplementäre Bindungsstelle des Primers zusammengefügt.

### 2.2.5 Kontroll-PCR

Um zu prüfen, ob das primäre PCR-Produkt sich für weitere Experimente eignet, muss eine Kontroll-PCR auf spezifische Mse-Fragmente durchgeführt werden. Dazu werden die Primerpaare p53 Exon 2/3 und CK 19 für disseminierte Tumorzellen und D17S800 und D5S1360 für Primärtumordissektate verwendet. Alle vier Primer liegen auf MSE I-Fragmenten und ermöglichen durch ihre erfolgreiche Amplifikation einen Hinweis auf die Verwendbarkeit des Primäramplifikats in CGH-Experimenten.

H <sub>2</sub> O	7,55 µl
PCR-Puffer (10 mM MgCl <sub>2</sub> , 100 mM Tris pH 8,5, 500 mM KCl, 1 mM dNTP)	1,00 µl
dNTP's 10 mM	0,10 µl
BSA	0,25 µl
3'-Primer	0,50 µl
5'-Primer	0,50 µl
Taq-Polymerase (5U/µl)	0,10 µl
<b>Gesamt</b>	<b>10,00 µl</b>

	1 Zyklus	14 Zyklen	24 Zyklen	1 Zyklus
94°C	2 min	15 s	15 s	
58°C	30 s	30 s	30 s	
72°C	2 min	20 s	30 s	2 min

### **2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese**

Zuerst werden die Kontroll-PCR Produkte mit 1  $\mu$  Sybr-Gold und 2  $\mu$ l Dye versetzt und anschließend in Geltaschen eingebracht. Die Produkte der Kontroll-PCR werden in einem 1,5 Agarose-Gel in TBE in einem elektrischen Feld mit 160 V und 400 mA für 45 min mit Hilfe eines Horizontal-Gelelektrophorese-Systems getrennt. Danach wird das Gel auf einen UV-Schirm aufgelegt. Abschließend wird mit einer CCD-Kamera ein digitales Photo generiert und mit einem Thermodrucker ein Ausdruck hergestellt.

### **2.2.7 Mikrodisektion von Tumorarealen**

Bei der Analyse von Primärtumoren ist es insbesondere von großer Bedeutung normales Gewebe von Tumorgewebe zu separieren. Dies kann durch die Lasermikrodisektion erreicht werden (Becker et al., 1996; Schütze et al. 1998; Stoecklein et al. 2002). Von den in Paraffin eingebetteten Primärtumoren werden 5  $\mu$ m dicke Schnitte mit einem Mikrotom angefertigt und auf einfache Glasobjektträger oder auf Glasobjektträger mit Polyethylen-Membran aufgetragen.

Zum Zwecke der Entfernung des Paraffins werden die Objektträger jeweils zweimal hintereinander für 10 min in Xylol-Lösung eingetaucht und anschließend für jeweils eine Minute in 100%, 90% und 70% Ethanollösung eingebracht. Vor der Färbung mit Hämatoxylinlösung (30 s für Objektträger mit Polyethylen-Membran und 45 s für einfache Objektträger) werden die Objektträger für eine Minute in destilliertem Wasser rehydriert. Nach der Färbung werden die Polyethylen-Membran Objektträger für 5 min und die einfachen Objektträger für 30 min in Leitungswasser aufbewahrt. Anschließend werden die einfachen Objektträger für 2 min mit Eosin gefärbt. Danach werden die Objektträger für jeweils eine Minute zuerst in destilliertes Wasser und dann in eine aufsteigende Alkoholreihe in 70%, 90% und 100% Ethanol eingetaucht. Zum Abschluss werden die einfachen Objektträger nochmals für 15 min Xylol ausgesetzt.

Mit Hilfe der Schnitte auf den einfachen Objektträgern werden die Tumor-Areale identifiziert und anschließend werden die korrespondierenden Tumorgebiete auf den Folienobjektträgern mit dem PALM-Laser-Microbeam-System mikrodisektiert. Die so freigelegten Bereiche können mit einem Laserimpuls in einen Tropfen PCR-Öl, der sich in einem Tube-Deckel befindet, hochgeschossen werden. Der Inhalt des Deckel wird in einem Tube 5 min lang bei 14.000 rpm zentrifugiert.

### 2.2.8 PCR-Protokoll für mikrodisezierte Tumorareale

Für die PCR von mikrodisezierten Tumorarealen für die CGH muss das Einzelzell-PCR Protokoll nach Stoecklein (Stoecklein et al., 2002) abgewandelt werden. Als erstes werden die gelaserten Zellen, nachdem sie von dem Tube-Deckel mit 14.000 rpm herunterzentrifugiert worden sind mit einem etwas abweichenden Proteinase K-Ansatz verdaut:

H <sub>2</sub> O	3,61 µl
OPA plus Puffer	0,50 µl
Tween 10%	0,13 µl
Igepal 10%	0,13 µl
Proteinase K (10mg/ml)	0,13 µl
<b>Gesamt pro Tube</b>	<b>4,50 µl</b>

Der PK-Verdau muss im Gegensatz zur Einzelzell-PCR nach empirischer Erfahrung 15 Stunden lang bei 42°C durchgeführt werden. Die Inaktivierung findet zehn Minuten bei 80°C statt. Eine hohe Konzentration und lange Einwirkzeit von Proteinase K sind essentiell für die DNA-Extraktion von mit Paraffin behandelten Geweben (Speicher et al., 1993). Als nächstes wird das genetische Material durch Mse I an der Schnittstelle T TAA zerstückelt. Dadurch entstehen an den 5'-Enden TA-Überhänge. Der Verdau findet bei 37°C für drei Stunden statt. Die Enzyminaktivierung dauert 5 min bei 65°C.

H <sub>2</sub> O	0,25 µl
Mse I (50 000 U/µl)	0,25 µl

Das Preannealing der Adapter fängt bei 65°C an und wird jede Minute um einen Grad Celsius reduziert bis eine Temperatur von 15°C erreicht ist:

H <sub>2</sub> O	1,5 µl
OPA plus Puffer	0,5 µl
LIB1 (100 µM)	0,5 µl
ddMse11 (100 µM)	0,5 µl

Zu den 3 µl preannealten Adaptern wird ATP und DNA-Ligase pipettiert und über Nacht bei 15 °C ins Thermocycler gestellt:

ATP 10 mM	1,0 µl
T4-DNA-Ligase 5U/µl	1,0 µl

Ein PCR-Mix wird hergestellt:

Expand Long Template Puffer 1	3,0 µl
dNTP's (10 mM)	2,0 µl
Expand Long Template PolMix	1,0 µl
H <sub>2</sub> O	35,0 µl

Nun wird dem PCR-Mix das ligierte DNA-Material zugefügt. Das PCR-Programm ist mit dem für die Einzelzell-PCR identisch.

### 2.2.9 Markierung genomischer DNA

In der Markierungs-PCR wird das amplifizierte Tumorzell-Genom mit Digoxigenin-11-dUTP und das Genom einer diploiden Referenz-Zelle mit Biotin-16-dUTP nach folgendem Schema markiert:

Primäres PCR-Produkt	1,00 µl
H <sub>2</sub> O	28,35 µl
Expand Long Template Puffer 1	4,00 µl
LIB 1 10 µM	4,00 µl
7/8-Nucleotid-Mix (8,75 mM dTTP, 10 mM dATP, 10 mM dCTP und 10 mM dGTP)	1,40 µl
1 mM Biotin-dUTP (Referenz)	1,75 µl
1 mM Dig-dUTP (Melanom)	1,75 µl
Taq-Polymerase 5 U/µl	1,00 µl
<b>Gesamt</b>	<b>41,50 µl</b>

Diese Mischung muss noch im PCR-Cycler nach folgendem Programm behandelt werden:

Temperatur	1 Zyklus	10 Zyklen
94°C	1 min	30 s
60°C	30 s	30 s
72°C	2 min	2 min + 20 s/Zyklus

Nach dem Labeln müssen noch die Primer entfernt werden. Dies geschieht mit dem Restriktionsenzym Tru I. Dazu wird das Reamplifikat drei Stunden lang mit Tru I im Thermocycler inkubiert:

Puffer R <sup>+</sup>	2,0 µl
Tru I (50 U/µl)	1,0 µl
Gelabeltes PCR-Produkt	41,0 µl
<b>Gesamt</b>	<b>44,0 µl</b>

### 2.2.10 Metaphasen-Objektträger Präparation

Im ersten Schritt werden 20 ml venöses Blut von einem gesunden männlichen Probanden entnommen. Das Blut wird heparinisiert und anschließend mit 37,5 ml Kälberserum, 250 ml RPMI Medium, 2,5 ml Streptomycin (200 U/ml), 2,5 ml Penicillin (200 U/ml), L-Glutamin 2 mM und 3 mg Phytohämagglutinin gemischt. Das Gemisch wird in 10 ml Kulturflaschen aliquotiert und dann bei 37°C über 72 Stunden inkubiert.

Die Arretierung des Zellzyklus wird durch die Zugabe von Colcemidlösung (10 µg/ml) eine Stunde vor dem Ende der Inkubationszeit erreicht. Danach wird die Suspension in 15 ml Tubes umgeschüttet. Die Lymphozytenkulturen werden anschließend 10 min lang bei 1500 Umdrehungen pro Minute abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 10 ml 0,075 mM hypotoner KCl-Lösung resuspendiert. Die Zellen werden dann

20 min lang bei 37°C aufgequollen. Daraufhin werden die Zellen wieder zentrifugiert und in 10 ml 4°C kaltem Fixativ (Eisessig-Methanol Mischung im Verhältnis 1:3) resuspendiert. Das Zentrifugieren und Resuspendieren in Fixativ wird mindestens dreimal wiederholt, bis die Lösung eine klare Farbe annimmt und damit Erythrozyten aus der Suspension entfernt wurden. Die Suspension kann dann bei -20°C über mehrere Monate gelagert werden.

Über Nacht werden die Glasobjektträger in 100% unvergälltem Ethanol zur Entfettung gelagert. Vor dem Auftragen der Metaphasen werden die Objektträger in 4°C kaltem destilliertem Wasser abgekühlt. Je Slide werden zwei Tropfen (pro Tropfen 70 µl) Suspensionslösung mit Hilfe einer Pipette auf jeweils eine Hälfte der Objektträger herunterfallen gelassen. Die aufgetropften Objektträger werden auf feuchten Papiertüchern auf einer Heizplatte für drei Stunden gelagert. Dadurch kommt es zur Spreitung der Metaphasen. Die so gewonnen Objektträger werden in 70% Ethanollösung in einem 4°C kalten Kühlschrank gelagert.

### 2.2.11 Komparative Genom-Hybridisierung (CGH)

Die Reamplifikate vom Tumor- und Referenz-Genom werden über Nacht bei -20°C in der Gefriertruhe zur Fällung gebracht:

Digoxigenin-markiertes PCR-Produkt (Melanom)	44 µl
Biotin-markiertes PCR-Produkt (Referenz)	44 µl
Humane Cot-1 DNA (1µg/µl)	75 µl
Heringssperm DNA (10 µg/µl)	10 µl
Natrium-Acetat (3 M pH 5,2)	17 µl
100% Ethanol -20°C kalt und unvergällt	490 µl
<b>Gesamt</b>	<b>680 µl</b>

Als erstes wird die gefällte Proben-DNA für 45 min in einer Kühlzentrifuge bei 4°C mit 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird mit Hilfe einer Pipette verworfen. Danach werden der Probe 700 µl 70% unvergällter Ethanol zugefügt und das ganze wird bei Raumtemperatur für fünf Minuten mit 14.000 rpm zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wird das Pellet luftgetrocknet, damit sich der restliche Alkohol verflüchtigen kann. Anschließend wird 7 µl Formamid-Lösung zugefügt und die Probe wird in einem Thermoschüttler bei 37°C für eine halbe Stunde gemischt. Dasselbe wird dann mit 7 µl Mastermix (Dextran Sulfat 30% in 4x SSC, Mr >500.000) wiederholt. Nun können die DNA-Stränge bei 78°C für sechs Minuten denaturiert werden. Vor dem Auftragen auf die Metaphasenobjektträger muss der Cot-1 DNA für eine Stunde bei 37°C die Möglichkeit geboten werden, sich an die Proben-DNA anzulagern. Danach ist die Probe bereit für die Hybridisierung auf die Metaphasen.

Parallel dazu wird der Metaphasenobjektträger für die Hybridisierung vorbereitet. Zuerst wird eine geeignete Auftragsstelle im Phasenkontrast unter dem Mikroskop (Leica DM IRB) bei zehnfacher Vergrößerung aufgesucht. Dabei wird eine Stelle ausgewählt, die in ausreichendem Maße gut gespreizte Metaphasen bietet. Zur späteren Wiederauffindung wird dieser Ort mit einem Glasschneider markiert. Der Objektträger wird dann für drei Minuten in 2x SSC eingetaucht und anschließend werden 200 µl RNase A Lösung (100 µg/ml in 2x SSC) auf den Objektträger aufgetragen. Die Inkubation findet in einer Feuchtkammer bei 37°C statt. Dadurch wird RNA als Störgröße der Hybridisierung eliminiert. Zur Entfernung der RNase wird der Objektträger dreimal für jeweils 5 min in 2x SSC gewaschen. Anschließend werden die Objektträger in 100 ml 10 mM HCl Lösung mit 50 µl Pepsin-Lösung (100 mg/ml) bei 37°C für drei Minuten und fünfzig Sekunden eingetaucht. Durch den Pepsin-Verdau werden Proteine entfernt, die an den Chromosomen angelagert sind und für eine effektive Hybridisierung hinderlich sind. Durch zweimaliges fünfminütiges waschen in 1x PBS wird der Pepsin-Verdau gestoppt. Anschließend wird der Objektträger für fünf Minuten in 50 mM Magnesiumchlorid in 1x PBS eingebracht. Danach können die Chromosomen mit 200 µl 1% PFA-Lösung (50 mM Magnesiumchlorid in PBS mit PFA 1%) auf dem Objektträger fixiert werden. Im Anschluss daran wird der Objektträger zweimal für jeweils fünf Minuten in 1x PBS gewaschen. Nach einer Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe bei vier Grad Celsius für jeweils drei Minuten mit 70%, 85% und 100% unvergälltem Ethanol, werden die Chromosomen auf

dem Objektträger in einer 70°C heißen Denaturierungslösung (70 ml Formamid 100%, 10 ml 20x SSC, 20 ml H<sub>2</sub>O, eingestellt auf 7,5 pH) für eine Minute und fünfundvierzig Sekunden denaturiert. Anschließend wird die Alkoholreihe wiederholt.

Nun wird die denaturierte Probe auf das markierte Feld des Objektträgers aufgetragen und mit einem 18 x 18 mm Deckgläschen bedeckt. Das ganze wird mit einem Kleber (Fixogum) verschlossen und in einer Feuchtkammer bei 37°C für zwei Nächte untergebracht.

Nach der Hybridisierung wird das Deckgläschen entfernt und der Objektträger dreimal in 4x SSC + Tween auf dem Variospeed-Schüttler für jeweils fünf Minuten gewaschen. Damit soll das Dextransulfat, der Hauptbestandteil des Mastermixes, entfernt werden. Anschließend wird der Objektträger für je fünf Minuten in Formamid-Lösung bei 42°C eingetaucht, um gleich im nächsten Schritt dreimal für fünf Minuten bei 42°C in 1x SSC eingebracht zu werden. Vor dem nächsten Schritt wird der Objektträger kurz für fünf Sekunden in 1x PBS + 0,2% Tween eingetaucht. Jetzt kann der Objektträger mit 1 ml 3% Blocking-Reagenz (1x PBS pH 7,5, Tween 0,2%, BSA Fraktion V 3%, FCS 5%) überschichtet werden und in der Feuchtkammer für 45 min bei 42°C gelagert werden. Dieser Schritt dient dem Besetzen von ungesättigten Proteinbindungsstellen. Das überschüssige Blocking-Reagenz wird durch 1x PBS + 0,2% Tween entfernt. Als nächstes wird auf den Objektträger 200 µl Antikörperlösung, bestehend aus 180 µl 1 % Blocklösung (1x PBS pH 7,5, Tween 0,2%, BSA Fraktion V 1 %, FCS 5%), 18 µl Anti-Digoxigenin-FITC und 2 µl Avidin-Cy 3.5) aufgetragen. Damit eine Eintrocknung verhindert wird, wird der Objektträger mit einem 24 x 55 mm großen Deckgläschen versehen. Die Inkubation findet in der Feuchtkammer bei 42°C statt. Alle folgenden Schritte müssen unter Lichtschutz erfolgen, da die Fluorochrome lichtempfindlich sind. Nach der Anlagerung der Antikörper werden die ungebundenen Antikörper durch dreimal 5 min Waschen in 4x SSC + 0,2% Tween beseitigt. Zur Darstellung der Chromosomenbänderung wird der Objektträger mit 1 ml Dapi-Lösung (1 ml 4x SSC + 10 µg DAPI) für zwei Minuten überschichtet. Die Dapi-Lösung wird mit destilliertem Wasser weggespült. Nach der Trocknung wird ein Tropfen von ca. 20 µl Vektashield auf den Objektträger gegeben und mit einem Deckglas (24 x 55 mm) verschlossen.

### 2.2.12 CGH-Auswertung

Für die Auswertung wird mit einem Fluoreszenz-Mikroskop, das an eine CCD Kamera gekoppelt ist, jeweils ein digitales Foto von einer Metaphase mit den Fluoreszenzfiltern DAPI, Cy 3.5 und FITC aufgenommen. Bei der Auswahl der zehn bis zwölf Metaphasen müssen mehrere Faktoren beachtet werden: Die Hybridisierungssignale sollten stark und homogen sein, granuläre Metaphasen sind von der Auswertung auszuschließen und sich überlappende Chromosomen müssen ausselektiert werden. Die Chromosomen der fotografierten Metaphasen sollten sich in einem ähnlichen Größenbereich befinden (Weiß et al., 1999).

Anschließend werden die Daten mit dem Programm QCGH von Leica weiter verarbeitet. Das Programm normalisiert die FITC- und Cy 3.5- Fluoreszenzintensitäten automatisch, jedoch erfolgen die Definition der Zentromerpositionen und die Sortierung der Chromosomen manuell. Danach kann mit Hilfe des Programms ein graphisches Profil erstellt werden, wobei eine Abweichung von der Mittelgerade nach links einen Verlust und nach rechts einen Gewinn darstellt. Der optische Effekt wird noch durch eine Farbkodierung unterstrichen. Dabei steht Rot für die Deletion von Chromosomenabschnitten und Grün für deren Amplifikation. Wenn das Verhältnis von FITC zu Cy 3.5 größer als 1,25 ist liegt ein Gewinn, wenn es kleiner als 0,75 ist liegt ein Verlust im korrespondierenden Chromosomenabschnitt vor.

## 2.3 Statistik

### 2.3.1 Hierarchische Ähnlichkeitsanalyse

Die Software Cluster und Tree View (Eisen et al., 1998) ist gut geeignet zur Analyse von Ähnlichkeiten in CGH-Datensätzen. Diese Programme sind auf folgender Internetseite <http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm> frei verfügbar. Cluster kam in der Version 2.11 und Tree View in der Version 1.60 in dieser Arbeit zum Einsatz. Durch sie können Ähnlichkeiten in einem Dendrogramm graphisch dargestellt werden. Die Ähnlichkeiten genomischer Veränderungen zweier verschiedener Datensätze werden dabei durch ihre Nähe im Dendrogramm visualisiert.

### 2.3.2 t-Test

Mit dem t-Test wurde getestet, ob es in den durchschnittlichen Anzahlen der chromosomalen Aberrationen pro Zelle bzw. Primärtumor statistisch signifikante Unterschiede gibt.

## 2.4 Material

### 2.4.1 Primer und Oligonukleotide

Lib1-Primer	5´ -AGT GGG ATT CCT GCT GTC AGT- 3´
ddMse-Primer	5´ -TAA CTG ACA GCdd- 3´
p53 exon 2/3-5´	5´ -GAA GCG TCT CAT GCT GGA TC- 3´
p53 exon 2/3-3´	5´ -CAG CCC AAC CCT TGT CCT TA- 3´
CK 19-5´	5´ -GAA GAT CCG CGA CTG GTA C- 3´
CK 19-3´	5´ -TTC ATG CTC AGC TGT GAC TG- 3´
D17S800-5´	5´-CTT ATG GTC TCA TCC ATC AGG- 3´
D17S800-3´	5´-GAC AGA AAG ATG GAT AAG ACA AG- 3´
D5S1360-5´	5´-ACA AAC AAA ACC AAG AGT GC- 3´
D5S1360-3´	5´-TGG CTC ATG TAT CCC TAT GT- 3´

Die Oligonukleotide wurden von Metabion in München bezogen.

#### 2.4.2 Geräte

Brutschrank	Heraeus 6000
CCD-Kamera für das Agarose-Gel	INTAS, Göttingen
CCD Kamera für CGH	Photometrix, Tucson, USA
Fluoreszenzmikroskop	Leica DMXA-RF8, Cambridge, England
Heizblock	Thermomixer 5436, Eppendorf
Heizplatte	Bachofer, Reutlingen
Horizontal Gelelektrophorese	Invitrogen, Karlsruhe
Invertmikroskop	Leica DM IRB, Cambridge, England
Kryotom	Leica Jung Frigocut 2800 E
Lasermikroskop	P.A.L.M. Microlaser Technologies, Bernried
Mikromanipulator	Microinjector 5242, Eppendorf
Mikrotom	Leica RM 2025, Cambridge, England
Robocycler-PCR-Maschine	Robocycler Gradient 96, Stratagene, Amsterdam, Niederlande
Spannungsquelle für das Agarose-Gel	EPS 200, Amersham Biosciences, Freiburg
Thermoprinter	Sony, Köln
UV-Schirm	INTAS, Göttingen
Wasserbad	Lauda MT2, Königshofen

### 2.4.3 Verbrauchsmaterialien

Deckgläschen	Langenbrinck
Falcon	Sarsted
Glas-Küvetten	Roth
Objektträger mit Mattrand	Langenbrinck
Pipetten	Gilson International B.V., Bad
Camberg	
Polyethylenmembran	P.A.L.M. Microlaser Technologies, Bernried
Tubes 1,5 ml	Eppendorf
Tubes 200 µl	Thermo-Fast 96, Abgene
Handschuhe	Gentle Skin, Meditrade GmbH, Kiefersfelden, Deutschland
Handschuhe für den Umgang mit Syber	TNT Blue, Ansell, Coshocton, USA

### 2.4.4 Antikörper und Enzyme

Anti-Digoxigenin-Fluorescein Fab Fragments	Roche, Mannheim
APAAP	Dako, Hamburg
Avidin-Cy3.5	Roche, Mannheim
Biotin-16-dUTP	Roche, Mannheim
DNA-Polymerase I	New England Biolabs, Frankfurt
Expand Long Template	Roche, Mannheim
Mse I 50 U/µl	New England Biolabs, Frankfurt
Pepsin	Roche, Mannheim
Proteinase K	Roche, Mannheim
RNase A	Roche, Mannheim
T4 DNA Ligase	Roche, Mannheim

Taq-Polymerase	Roche, Mannheim
Tru I	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

#### 2.4.5 Chemikalien

Agarose GTG Seaken	Biozym, Hameln
Borsäure	Sigma, Deisenhofen
BSA	Roche, Mannheim
ATP	Roche, Mannheim
BSA für PCR	Roche, Mannheim
BSA Fraktion V	Paesel + Lorei, Hanau
Borsäure	Sigma, Deisenhofen
Di-Natriumhydrogen-phosphat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Colcemid	Sigma, Deisenhofen
DAPI	Roche, Mannheim
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Amersham Biosciences, Freiburg
Digoxigenin-11-dUTP	Roche, Mannheim
EDTA	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Eisessig 100%	Merck, Darmstadt
Eosin	Sigma, Deisenhofen
Ethanol unvergällt	JT Baker, Griesheim
Ethanol vergällt	Roth, Karlsruhe
FCS	PAA Laboratories, Cölbe
Formamid	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Sigma, Deisenhofen
Hämatoxylinlösung	Sigma, Deisenhofen
Hering Sperm DNA	Invitrogen, Karlsruhe

Human Cot-1 DNA	Invitrogen, Karlsruhe
Igepal	Sigma, Deisenhofen
Kaliumchlorid	Sigma, Deisenhofen
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Sigma, Deisenhofen
Montagekleber, Fixogum	Marabu, Tamm
Natriumchlorid	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid-Plätzchen	Merck, Darmstadt
OPA	Amersham Biosciences, Freiburg
PCR-Öl	Sigma, Deisenhofen
Penicillin	Sigma, Deisenhofen
Paraformaldehyd	Merk, Darmstadt
Phytohämaglutinin M-Form	Invitrogen, Karlsruhe
RPMI ohne L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
Salzsäure, rauchend	Merck, Darmstadt
SDS	Sigma, Deisenhofen
Streptomycin	Sigma, Deisenhofen
SYBER Gold	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Tween 20	Sigma, Deisenhofen
Tris	Biomol, Hamburg
Vectashield	Linearis, Hamburg
Xylol	Roth, Karlsruhe

## 2.4.6 Puffer

PBS	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8,5 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 mM
	NaCl	150 mM
	pH	7,4
SSC	NaCitrat	15 mM
	NaCl	150 mM
	pH	7,4
TBE	Tris	89 mM
	Borat	89 mM
	EDTA	2 mM
	pH	8,3

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Gewinnung der Wächterlymphknoten in der Hautklinik der Universität Tübingen

Die Biopsie von Wächterlymphknoten gehört inzwischen zum Standard im Staging von primären Melanomen (Topar et al, 2006). Die Gewinnung der Wächterlymphknoten erfolgte in der Arbeitsgruppe von Prof. Fierlbeck in der Hautklinik der Universität Tübingen in den Jahren 2003 und 2004. Alle Patienten waren zur Zeit des Eingriffs metastasenfrem und hatten weder eine Chemotherapie noch eine Strahlentherapie erhalten. Um den Vergleich der genomischen Veränderungen von Primärtumoren und ihren disseminierten Tumorzellen in den Wächterlymphknoten zu erleichtern, wurde jede Probe mit einem Code versehen bestehend aus drei Ziffern und zwei Buchstaben. Die ersten zwei Ziffern ergeben die Patientenummer. Die folgenden zwei Buchstaben PT oder LK stehen für die Art des Probenmaterials. PT steht für Primärtumor und LK für den Wächterlymphknoten. Die letzte Ziffer numeriert im Falle der Primärtumoren das Gewebedissektat und im Falle der Wächterlymphknoten die disseminierte Tumorzelle. Insgesamt wurden bei 28 Patienten (10 Frauen und 18 Männer) Wächterlymphknoten operativ entfernt (**Tabelle 2**). Im ersten Schritt der Aufbereitung der Wächterlymphknoten wurden vor der Operation Technetium 99m Nanocolloide mit 100 MBq Strahlenintensität und 1-2 ml Isosulfan blue dye (Patent blue-V, Atlanta Pharma, Konstanz) intrakutan injiziert. Die Identifizierung der Wächterlymphknoten erfolgte intraoperativ durch Messung der Radioaktivität oder durch den Nachweis von blue dye im Lymphknoten bzw. durch Detektion von blue dye in den abführenden Lymphknoten des Wächterlymphknoten. Die Messung der Strahlung am Patienten wurde mit einem Gammameßgerät (C-Trak, Care, Wise Medical Products, CA) durchgeführt. Die anschließende klinische Einstufung der Patienten erfolgte nach den Kriterien der American Joint Committee on Cancer guidelines von 2001 (Balch, 2001).

**Tabelle 2: Charakteristika der einzelnen Proben sind geordnet nach Patientennummern.**

Patientennummer	Ulzeration <sup>f</sup>	Tumor-dicke in mm	Geschlecht <sup>a/b</sup>	Anzahl HBM45 gefärbter Zellen	Alter	Histologischer Typ <sup>c/d/e</sup>	Melanom-Lokalisation <sup>g/h/i</sup>	Histopathologie der Wächterlymphknoten
1	nein	1,35	w	1	69	SSM	E	negativ
2	nein	1,45	w	3	53	SSM	E	negativ
3	nein	2,85	w	98	78	SSM	T	negativ
4	ja	5	m	190	67	NM	T	positiv
5	n.s.	1,12	m	5	68	ALM	E	negativ
6	nein	1,7	w	2	48	SSM	E	negativ
7	ja	2,35	m	153	68	SSM	T	negativ
8	ja	7	m	80	72	SSM	T	negativ
10	nein	1,02	w	2	50	SSM	E	negativ
11	nein	1,06	m	248	65	SSM	T	positiv
12	n.s.	1,55	m	5	69	n.s.	T	negativ
13	n.s.	10	w	16	70	ALM	E	negativ
14	nein	1	w	1	70	SSM	E	negativ
15	nein	1,35	w	5	68	SSM	E	negativ
27	nein	1,25	m	38	46	SSM	E	negativ
28	ja	7,2	m	57000	56	NM	T	positiv
29	ja	8	m	412	62	ALM	E	positiv
30	ja	1,3	m	11	76	NM	T	negativ
31	nein	4,8	m	20	39	NM	E	negativ
35	ja	2	m	3	64	SSM	T	positiv
37	nein	2	w	7	60	NM	E	negativ
39	n.s.	0,9	m	388	65	n.s.	T	negativ
42	nein	3,1	m	48	25	n.s.	E	negativ
43	n.s.	n.s.	m	3	37	n.s.	E	negativ
44	nein	2,3	m	1	77	NM	HN	negativ
46	nein	1,4	m	215	79	SSM	T	negativ
50	ja	2,7	m	32	77	NM	T	negativ
52	nein	3	w	5	68	NM	E	negativ

<sup>a</sup> w (weiblich), <sup>b</sup> m (männlich), <sup>c</sup> NM (Primär noduläres malignes Melanom), <sup>d</sup> ALM (Akrolentiginöses malignes Melanom), <sup>e</sup> SSM (Superfiziell spreitendes Melanom), <sup>f</sup> n.s. (nicht spezifiziert), <sup>g</sup> E (Extremitäten), <sup>h</sup> HN (Kopf und Hals), <sup>i</sup> T (Körperstamm).

### **3.2 Aufbereitung der Wächterlymphknoten in der Hautklinik der Universität Tübingen**

Nach der Entfernung der Gewebereste wurden in der Hautklinik der Universität Tübingen die 28 Wächterlymphknoten in 1 mm kleine Stückchen zerkleinert. Die Lymphknotenstückchen wurden anschließend in ein Nährmedium (RPMI 1640, Penicillin, Streptomycin, FCS und L-Gluthamin) eingebracht und in einer Dako Medimaschine (Dako, Hamburg) mit rotierenden Klingen zerkleinert. Nach der Zentrifugation hat die medizinisch technische Assistentin die Zellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Auf jeden Haftobjektträger (Menzel, Deutschland) wurden dann eine Million Zellen in 1 ml 1x PBS aufgetragen. Nach einer Stunde Sedimentationszeit wurde die Suspension vom Objektträger entfernt. Schließlich wurden die Objektträger über Nacht zum Trocknen bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Die Färbung der disseminierten Zellen in den Wächterlymphknoten wurde dann mit der Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase (APAAP) Methode durchgeführt. Zum Einsatz kamen Antikörper, die gegen Oberflächenbestandteile von Melanomzellen reagieren: gp100 (HMB45, Dako, Hamburg) oder Melan A (A103, Dako, Hamburg). Zur Positivkontrolle wurden Mel 30-Melanomzellen enthaltende Objektträger mit HMB-45- und Melan A- Antikörper aufgetragen. Als Negativkontrolle wurden die Objektträger mit MOPC21-Antikörper als IgG1-Isotypkontrolle versetzt. Danach wurden die Objektträger mit dem anti-Maus-Brückenantikörper (Z259, Dako, Hamburg) inkubiert und dem Maus-APAAP-Antikörper ausgesetzt. Die Mel 30-Melanomzellen konnten erfolgreich gefärbt werden. Es kam zu keiner falsch positiven Färbung. Im letzten Schritt wurden die Objektträger nach der Fixierung mit 1% PFA-Lösung in einfacher PBS Lösung gelagert und in das Institut für Immunologie der Ludwig Maximilians Universität München versendet. Da sich in den weiteren Experimenten zeigte, dass die mit Melan A gefärbten Zellen schwierig zu isolieren und die DNA wenig erfolgreich zu amplifizieren waren, wurden von mir nur HMB45 positive Zellen weiterverarbeitet.

### 3.3 Isolation von disseminierten Zellen aus Wächterlymphknoten und Einzelzell-PCR

Vor der Amplifikation der DNA mußte die Vereinzelnung der disseminierten Tumorzellen mittels Mikromanipulation mit Glaskapillaren erfolgen. Im Median habe ich neun (Spannweite 1-57.000) HBM45 positive Zellen auf den Objektträgern, die ich aus der Hautklinik der Universität Tübingen erhalten habe, vorgefunden. Beim Versuch 131 gefärbte Zellen von Adhäsions-Objektträgern zu lösen gingen bei der Mikromanipulation 28 Zellen (21,4%) verloren. Dadurch konnte ich insgesamt 103 mit HMB45 gefärbte Zellen erfolgreich von den zur Verfügung stehenden 28 Adhäsions-Objektträgern isolieren (**Abbildung 5**).

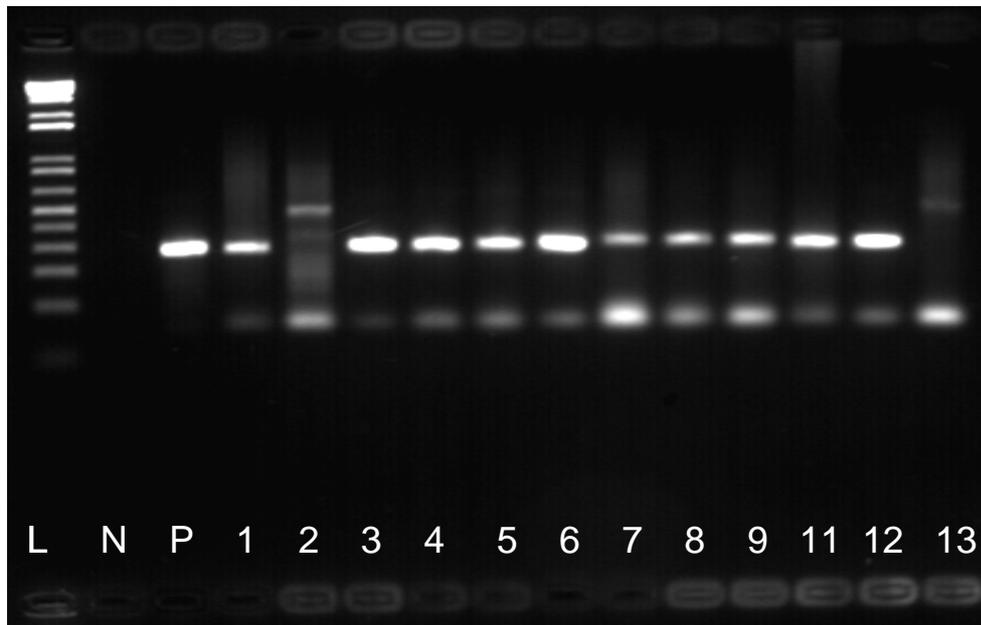


**Abbildung 5** Mikromanipulation einer disseminierten Tumorzelle bei 20 facher Vergrößerung.

Zwanzig fache Vergrößerung einer Einzelzelle bei der Mikromanipulation mit einer Glaskapillaren unter mikroskopischer Vergrößerung. In der Umgebung der gefärbten Zelle befinden sich zahlreiche ungefärbte Normalzellen.

Im nächsten Schritt erfolgte die globale Amplifikation des Ausgangsmaterials mit Hilfe der Mse-Adapter-PCR. Diese Methode ermöglicht die genomische Amplifikation der DNA einer einzelnen Zelle ohne das numerische Verhältnis der chromosomalen Aberrationen zu verändern (Klein et al., 1999). Dabei wird nach der Fragmentierung des gesamten Genoms mit dem Restriktionsenzym Mse I eine Adaptersequenz an die DNA-Bruchstücke ligiert. Zur Beurteilung der Effizienz der Mse-Adapter-PCR, wurden die primären PCR-Produkte jeder einzelnen Zelle auf zwei spezifische Mse-Fragmente hin untersucht. In der Kontroll-

PCR nach der primären Amplifikation waren dabei 59/103 Zellen (57 %) für zwei und 37/103 Zellen (36 %) für ein spezifisches Mse-Fragment positiv (**Abbildung 6**). Nur Zellen die durch die Kontroll-PCR erfolgreich reamplifiziert werden konnten und damit eine sichtbare Bande erbrachten, wurden weiteruntersucht. Somit wurde die DNA von 96 disseminierten Tumorzellen (Erfolgsquote: 93 %) bei -20 archiviert.

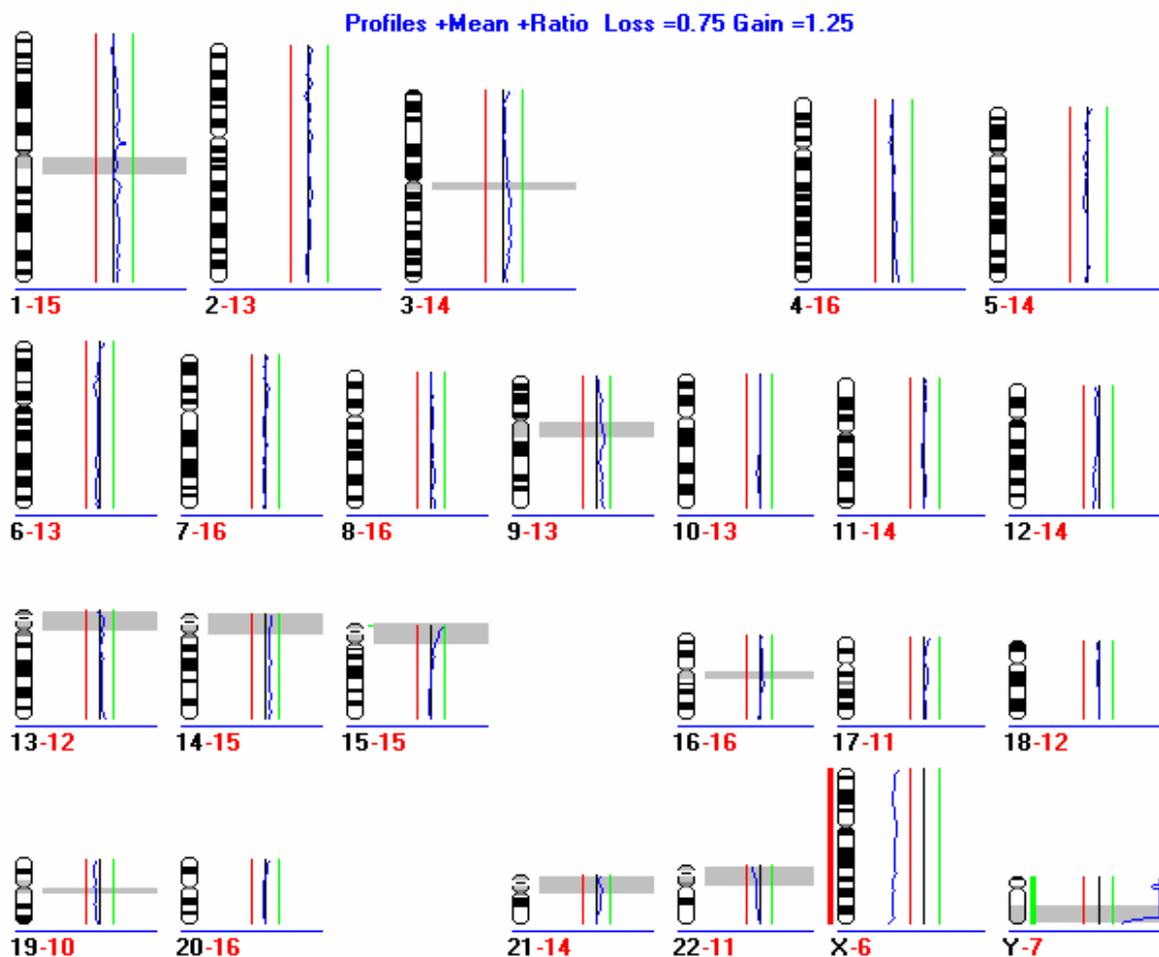


**Abbildung 6 Kontroll-PCR nach genomischer Reamplifikation von DNA aus disseminierten Tumorzellen.**

Um zu prüfen, ob das primäre PCR-Produkt sich für weitere Experimente eignet, muss eine Kontroll-PCR auf spezifische Mse-Fragmente durchgeführt werden. Dazu wurde im vorliegenden Fall p53 Exon 2/3 als Primer verwendet. Diese Sequenz ermöglicht durch ihre erfolgreichen Nachweis einen Hinweis auf die Verwendbarkeit der DNA in CGH-Experimenten. L: Leiter, N: Negativkontrolle, P: Positivkontrolle, 1: 08LK1 2: nicht verwendet, 3: 08LK2, 4: 08LK3, 5: 07LK1, 6: 07LK2, 7: 07LK3, 8: 40LK1, 9: 40LK2, 10: 40LK3, 11: 43LK1, 12: 39LK1 13: Zelle nicht verwendet.

### 3.4 Genomische Charakterisierung disseminierter Tumorzellen

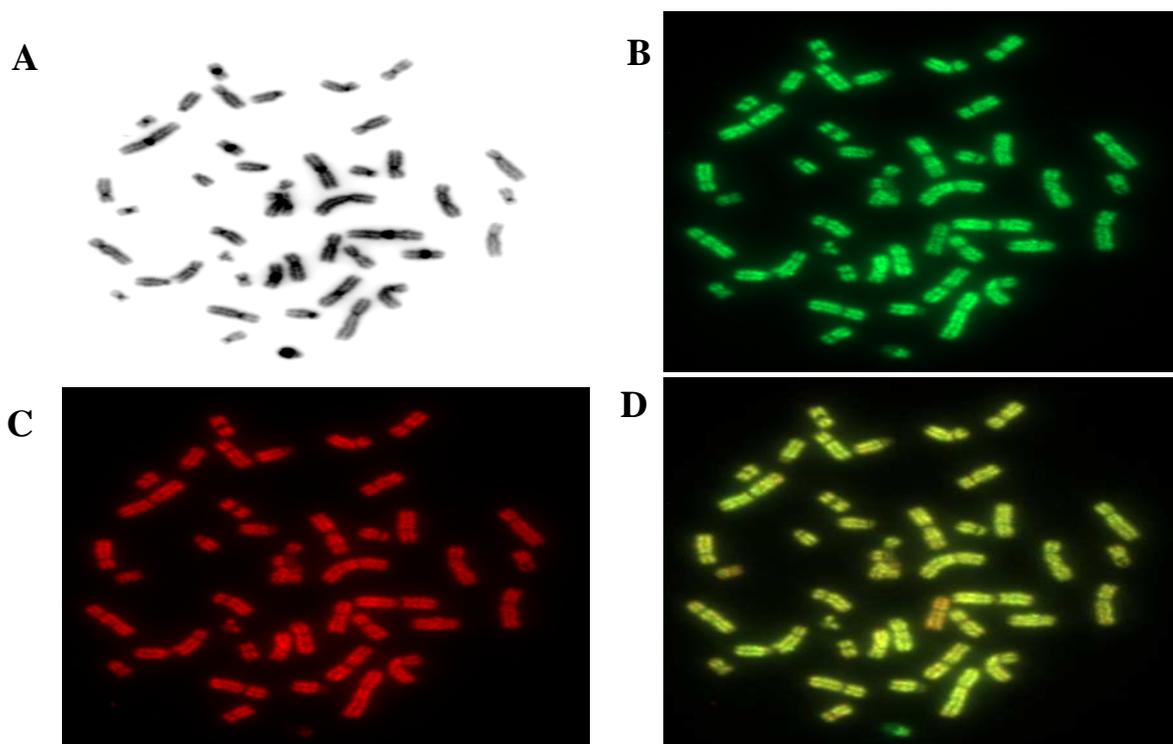
Zur Qualitätskontrolle der Einzelzell-CGH-Versuche wurden zwei ungefärbte Zellen aus dem Wächterlymphknoten von Patienten mit malignem Melanom entnommen. Anschließend wurde wie zuvor mit den disseminierten Tumorzellen auch Mse-PCR und Einzelzell-CGH durchgeführt. Beide Zellen wiesen ein balanciertes Profil auf. Somit wiesen sie weder Gewinne noch Verluste von Chromosomenregionen auf (**Abbildung 7**).



**Abbildung 7** CGH einer ungefärbten Einzelzelle aus einem Wächterlymphknoten.

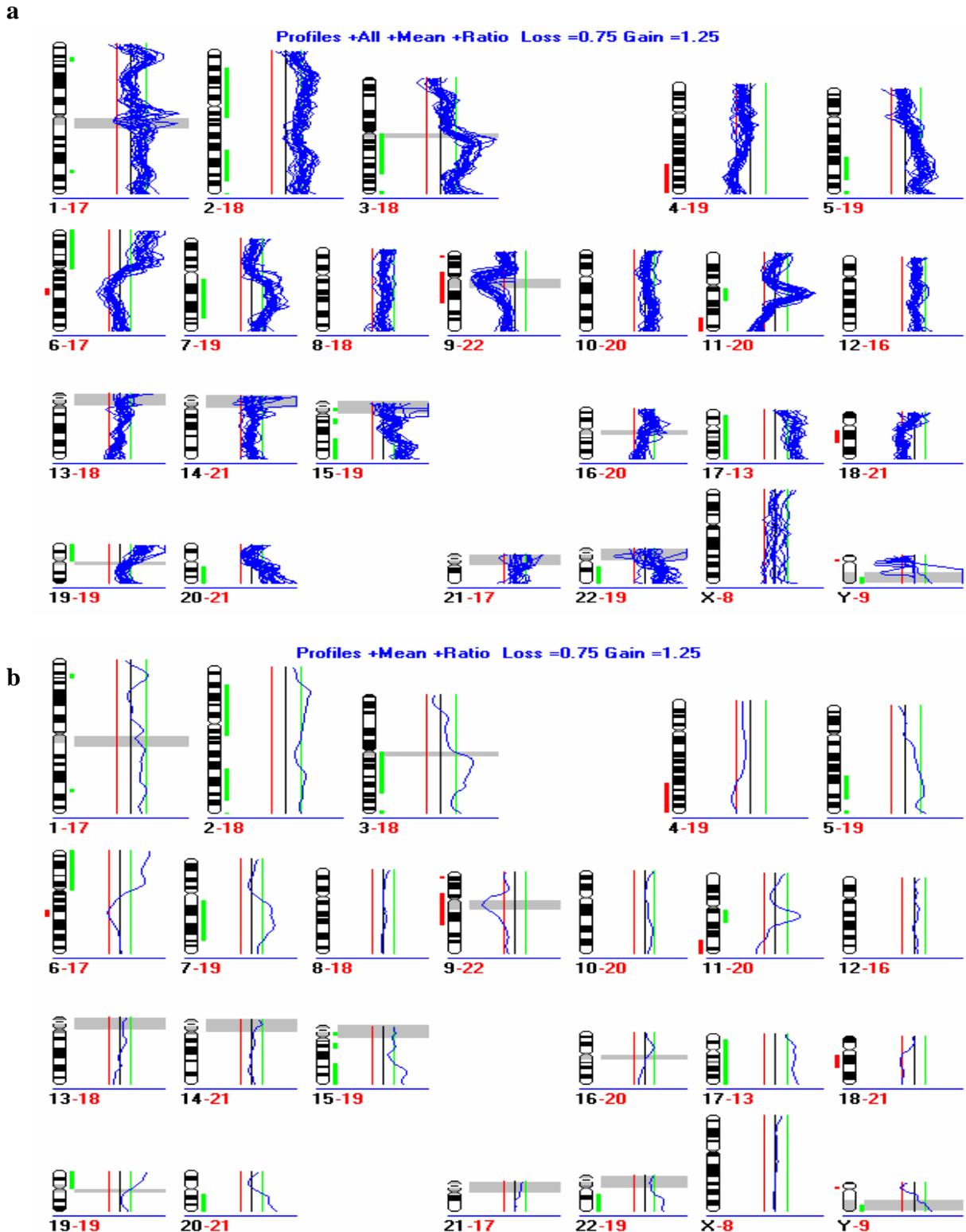
In dieser Abbildung ist als Beispiel für ein balanciertes Profil ein CGH-Profil der DNA einer ungefärbten einzelnen Zelle, die von Wächterlymphknoten isoliert worden ist, dargestellt. Grauen Balken kennzeichnen Chromosomenregionen mit repetitiven Sequenzen, die von der Auswertung ausgeschlossen werden. Die erste Zahl steht für das betreffende Chromosom und die zweite Zahl in rot steht für die Anzahl der Chromosomen, die in die Auswertung eingeschlossen werden konnten. Es ist leicht ersichtlich, dass die roten Zahlen voneinander abweichen. Dies kommt dadurch zustande, dass nicht immer alle Chromosomen einer fotografierten Metaphase sich für die Auswertung eignen. Im vorliegenden Fall gibt es keine Überschreitungen weder der roten Linie nach links (Deletion) noch der grünen Linie (Amplifikation).

Für die genomische Charakterisierung habe ich die DNA von 47 der archivierten disseminierten Tumorzellen reamplifiziert. Die komparative genomische Hybridisierung (CGH) erfolgte mit dem Protokoll für Einzellzellen. Zuerst habe ich die Mse-Adapter-PCR amplifizierte DNA mit Digoxigenin-dUTP markiert. Die markierte Tumor-DNA wurde dann zusammen mit der Biotin-dUTP markierten DNA aus Normalzellen auf humane Metaphasen von Lymphozyten gesunder Spender hybridisiert. Die DNA-Fragmente der Normalzellen und der Tumorzellen lagern sich dabei an die Chromosomen der Metaphasen an. Anschließend können sie über fluoreszierende Antikörper sichtbar gemacht werden. Im Durchschnitt habe ich 16 Metaphasen fotografiert. Zehn bis zwölf der fotografierten Metaphasen wurden ausgewertet. Von diesen Metaphasen habe ich Karyogramme erstellt (**Abbildung 8**). Das Programm QCGH von Leica normalisiert die FITC- und Cy 3.5- Fluoreszenzintensitäten automatisch. Dadurch konnten die numerischen Veränderungen der genomischen DNA von Einzelzellen als Deletionen und Amplifikationen sichtbar gemacht werden (**Abbildung 9**).



**Abbildung 8 Fotografierte Metaphasen**

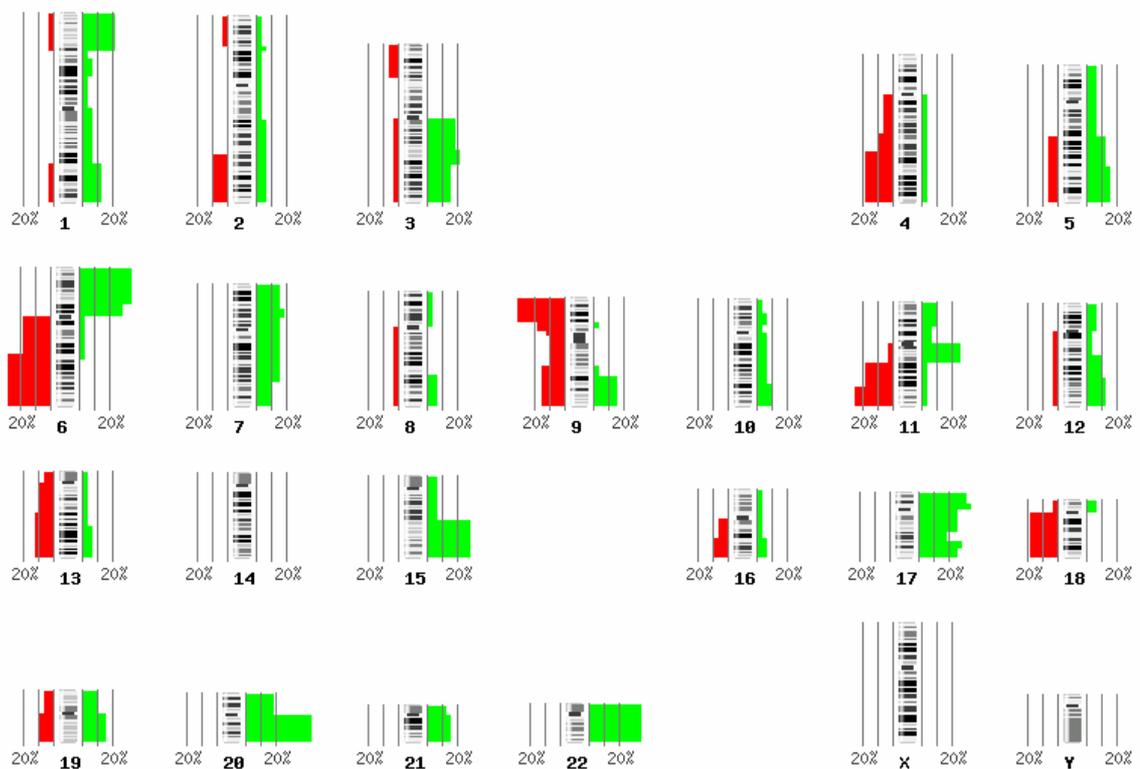
**8A** Die DAPI Färbung einer Metaphase dient der Erleichterung der Identifikation der einzelnen Chromosomen. **8B** Cy-3.5 bindet an hybridisierter Tumor-DNA **8C** FITC Färbung derselben Metaphase zur Darstellung der hybridisierten Referenz-DNA **8D** beim FITC und Cy-3.5 Überlagerungsbild werden Tumor-DNA Gewinne und Verluste ab 10 Mb erkennbar.



**Abbildung 10 Erstellung eines CGH-Profiles.**

Chromosomenregionen mit repetitiven Sequenzen sind von der Auswertung ausgeschlossen. Die grauen Balken kennzeichnen diese Bereiche. Die erste Zahl steht für das betreffende Chromosom und die zweite rote Zahl steht für die Anzahl der Chromosomen, die in die Auswertung eingeschlossen werden konnten. **10 a** Wenn das durchschnittliche Fluoreszenzverhältnis von Tumor-DNA (Cy 3.5) zur Referenz-DNA (FITC) über 1,25 liegt wird ein Gewinn und wenn es unter 0,75 liegt ein Verlust am jeweiligen Chromosomenabschnitt festgestellt. **10 b:** CGH Profil der DNA einer einzelnen disseminierten Tumorzelle. Als chromosomaler Verlust werden Abweichungen registriert, die die rote Linie und im Fall von chromosomalen Gewinnen, die die grüne überschreiten.

Achtunddreißig CGH-Untersuchungen (81%) der Einzelzellen waren auswertbar. Chromosomale Veränderungen wiesen 28 der so gewonnenen CGH-Profile auf. Die DNA der disseminierten Tumorzellen aus Wächterlymphknoten wiesen auf *20q*, *Chromosom 17*, *6p* und *Chromosom 22* am häufigsten Gewinne auf. Verluste waren insbesondere auf *6q*, *9p*, *18q* und *11q* zu beobachten (**Abbildung 10**). Vier CGH-Profile (14%) wiesen keine genomischen Veränderungen auf. Diese Einzelzellen könnten trotzdem durchaus Tumorzellen sein, da bei diesen Zellen die Veränderungen sich unterhalb der Auflösungsgrenze für die CGH von 10-20 MB befinden könnten. Eine zweite Erklärungsmöglichkeit ist, dass es sich dabei um Färbeartefakte handeln könnte. Deswegen wurden diese Profile von der weiteren Auswertung ausgeschlossen. Über Gewinne oder Verluste im X und Y Chromosom können keine Aussagen getroffen werden, da Referenz- und Tumor DNA gegengeschlechtlich markiert worden sind.

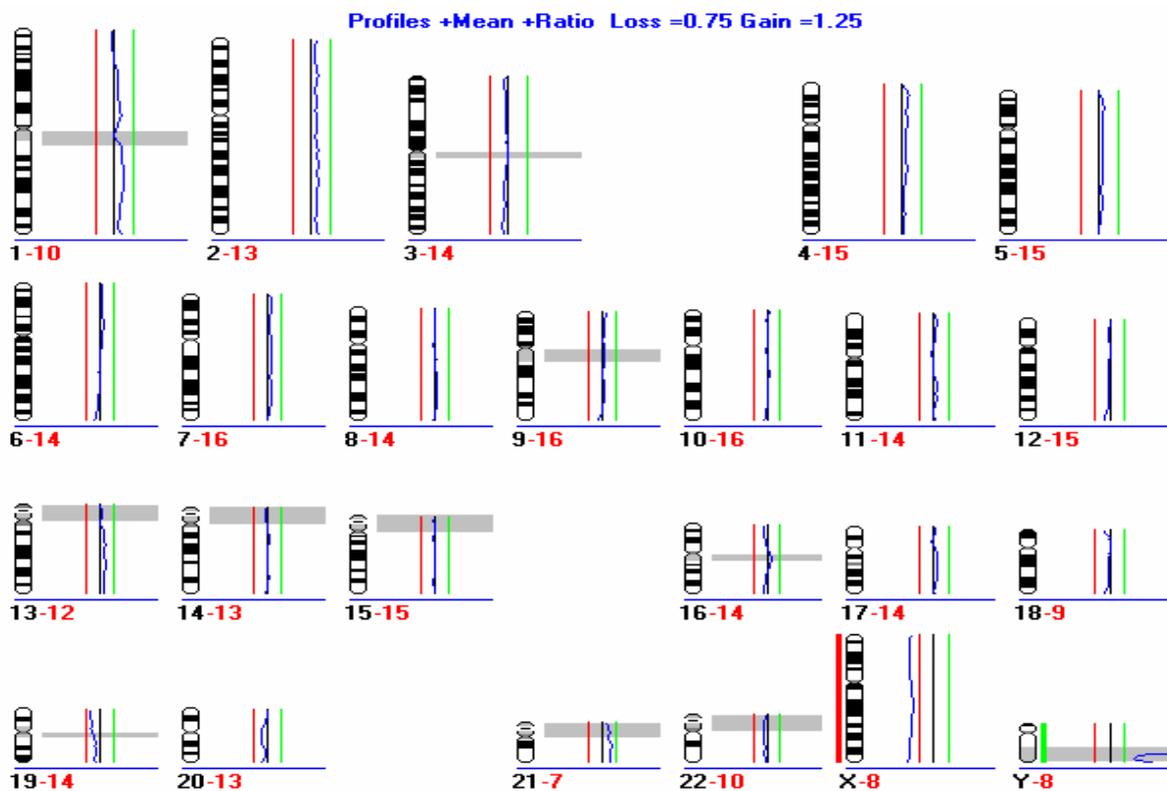


**Abbildung 10** CGH-Ergebnisse der untersuchten disseminierten Tumorzellen aus Wächterlymphknoten

Die Häufigkeit und Ausdehnung der CGH-Veränderungen von 32 disseminierten Tumorzellen aus Wächterlymphknoten (n=32) sind in diesem Histogramm dargestellt. Die roten Blöcke links der Chromosomen symbolisieren Deletionen, die grünen Blöcke auf der rechten Seite stehen für Gewinne. Über Gewinne oder Verluste im X und Y Chromosom können keine Aussagen getroffen werden, da Referenz- und Tumor DNA gegengeschlechtlich markiert worden sind.

### 3.5 Genomische Charakterisierung von Primärtumoren

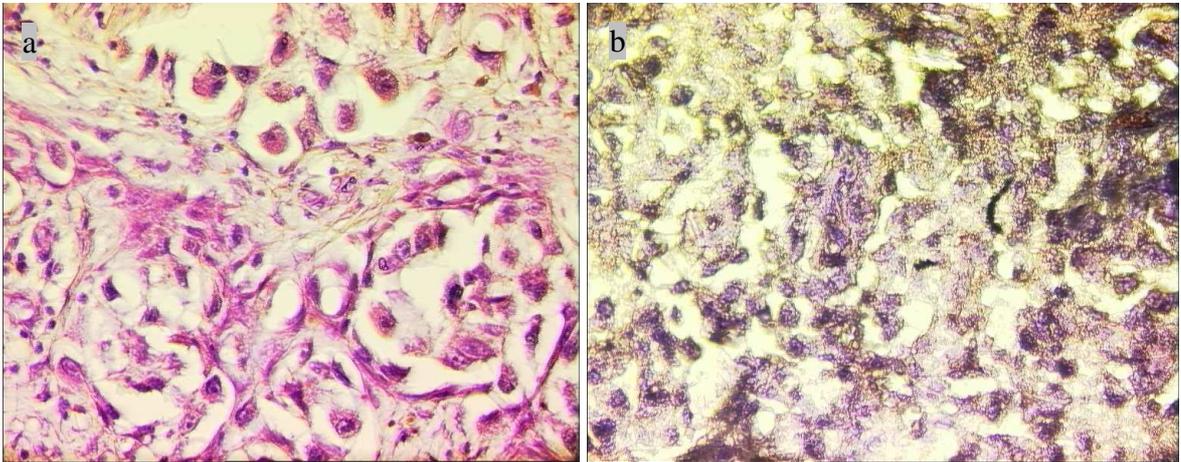
Die Entnahme von zwölf Primärtumoren mit ihren dazugehörigen Wächterlymphknoten fand in der Hautklinik der Universität Tübingen statt. Die Biopsien wurden in Parafin-Blöcken eingebettet. Anschließend habe ich im Institut für Immunologie der Universität München von den Primärtumoren (PT) 5 µm dicke Schnitte auf Objektträger angefertigt. Von zwei Primärtumorschnitten wurde zur Kontrolle vom umliegenden Gewebe durch Lasermikrodissektion Nicht-Melanom-Zellen gewonnen. Die CGH-Untersuchung dieser Proben erbrachten ausbalancierte Profile. Somit lagen weder Deletionen noch Amplifikationen vor (Abbildung 11).



**Abbildung 11** CGH der DNA vom umgebendem Gewebe eines Primärtumors.

In dieser Abbildung ist als Beispiel für ein balanciertes Profil ein CGH-Profil der DNA des umliegenden Gewebes, die durch Lasermikrodissektion Nicht-Melanom-Zellen gewonnen wurde. Die erste Zahl steht für das betreffende Chromosom und die zweite Zahl in rot steht für die Anzahl der Chromosomen, die in die Auswertung eingeschlossen werden konnten.

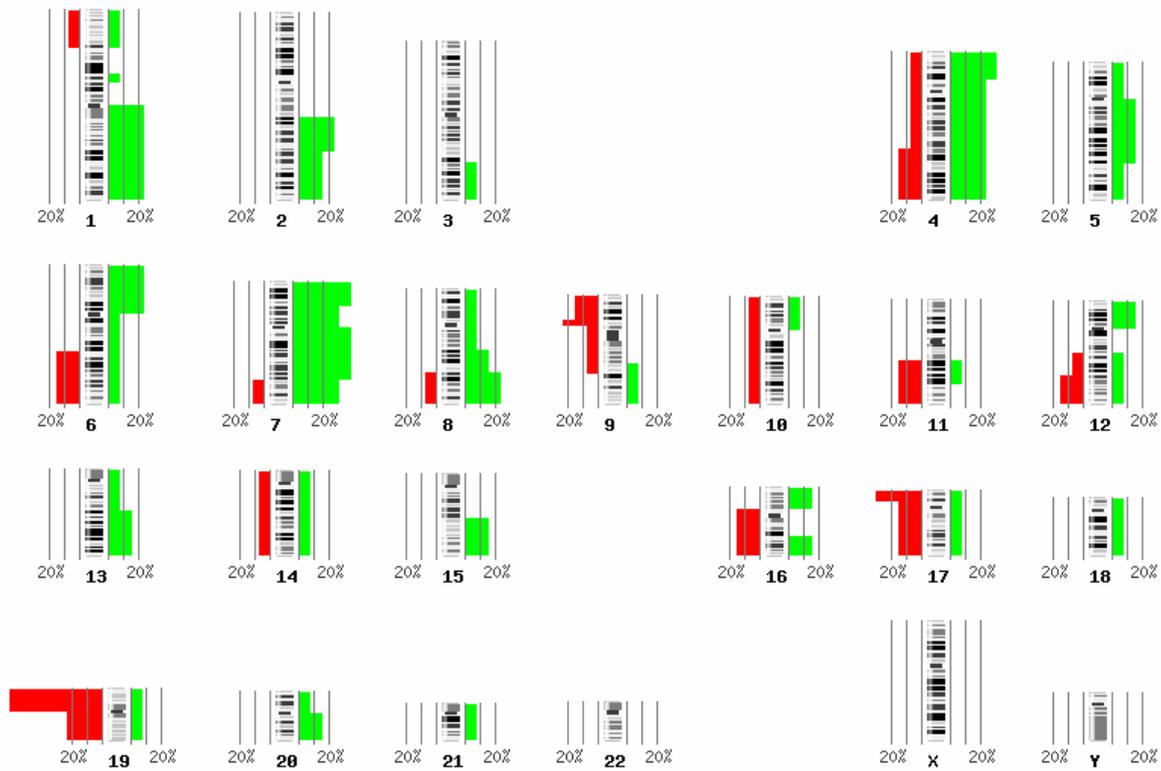
Nach der Identifikation der Tumorareale in den Übersichtsschnitten (**Abbildung 12a**), wurden anschließend die entsprechenden Areale von den Membran-Objektträgern mit dem PALM Mikrodisektionsgerät von dem übrigen Gewebe getrennt (Hämatoxylin-Färbung, **Abbildung 12b**).



**Abbildung 12 Primärtumorschnitte**

**12a:** H/E-Übersichtsquerschnitt durch ein malignes Melanom (40fach vergrößert) **12b** Tumorgewebe eines sich auf einer Polyethylenmembran befindlichen, Hämatoxylin gefärbten Primärtumorschnittes eines malignes Melanoms (40fach vergrößert).

Die mikrodisezierten Tumorareale wurden genomisch amplifiziert für die komparative genomische Hybridisierung. Dabei wurde ein spezielles PCR-Protokoll für in Paraffin eingebetetes Tumorgewebe eingesetzt (Stoecklein et al., 2002). Anschließend erfolgte eine Kontroll-PCR. Die DNA von drei Dissektaten konnten nicht erfolgreich durch die Kontroll-PCR erfolgreich amplifiziert werden. Von diesen drei Primärtumoren wurden neue Gewebsschnitte angefertigt und anschließend erneut mikrodisektiert. Die so gewonnenen Mikrodisektate konnten in der Kontroll-PCR nachgewiesen werden. Die genomische Charakterisierung erfolgte parallel zu der der disseminierten Tumorzellen. Alle Primärtumore wiesen Gewinne und Verluste in Chromosomenregionen oder ganzen Chromosomen auf (**Abbildung 13**).



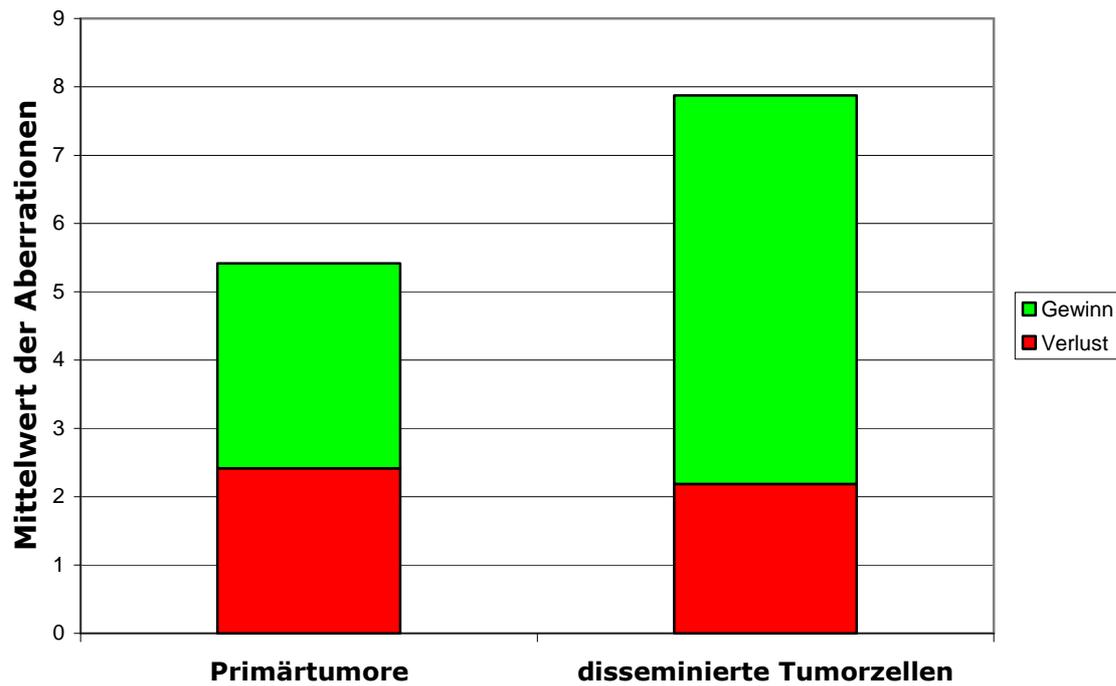
**Abbildung 13** CGH-Ergebnisse der untersuchten Primärtumore

Die Häufigkeit und Ausdehnung der CGH-Veränderungen von zwölf Primärtumoren sind in diesem Histogramm dargestellt. Die roten Blöcke links der Chromosomen symbolisieren Deletionen. Die grünen Blöcke auf der rechten Seite stehen für Gewinne. Es sind einzelne prozentuale Aberrationsfrequenzen neben den entsprechenden chromosomalen Loci aufgezeichnet. Über Gewinne oder Verluste im X und Y Chromosom können keine Aussagen getroffen werden, da Referenz- und Tumor DNA gegengeschlechtlich markiert wurden.

### **3.6 Vergleich genomischer Aberrationen von Primärtumoren und disseminierten Tumorzellen in den Wächterlymphknoten**

Chromosomale Veränderungen in zwölf Primärtumoren und ihren 16 dazugehörigen disseminierten Tumorzellen in den Wächterlymphknoten wurden verglichen mit der Fragestellung nach chromosomalen Aberrationen, die in Zusammenhang mit der Metastasierung von Melanomen gebracht werden könnten. **Tabelle 3** faßt die aufgetretenen Gewinne und Verluste für Primärtumore und ihre disseminierten Tumorzellen in den Wächterlymphknoten zusammen. Es wurden nur Aberrationsfrequenzen von über 20% berücksichtigt. Aberrationen könnten involviert sein im Metastasierungsprozess, da sie in disseminierten Tumorzellen und Primärtumoren häufig vorkommen. Auffallend ist, dass in sieben von 32 (22%) disseminierten Tumorzellen kamen Verluste in *6q* zusammen mit Gewinnen in *6p* vor. Bei den Primärtumoren gab es keine Kombination aus *6q* Verlust und *6p* Gewinn.

Balazs und Mitarbeiter haben beim genomischen Vergleich zwischen Primärtumoren und Metastasen von Melanomen einen Mittelwert der genetischen Veränderungen von 6,3 (Spannweite 1–14) in Primärtumoren und 7,8 (Spannweite 1–16) in metastatischen Läsionen festgestellt (Balazs et al., 2001). Da die Gruppe von Balazs mit soliden Metastasen gearbeitet hatte, war es von besonderem Interesse, ob diese Beobachtung in ähnlicher Weise mit disseminierten Einzellzellen wiederholt werden könnte. Der Mittelwert der Anzahl der genetischen Veränderungen der primären Melanome in dieser Studie war mit 5,4 (Spannweite 1-12) signifikant geringer als der Mittelwert für disseminierte Zellen von 7,9 (Spannweite 1-15, T-Test,  $p < 0,01$ ). Jedoch waren die Unterschiede zwischen beiden Gruppen beeindruckender bei der Unterteilung in Gewinne und Verluste: Der Mittelwert für Amplifikationen lag bei 3 für Primärtumore und bei 5,7 für disseminierte Zellen und für Deletionen bei 2,4 für Primärtumore und 2,2 für die disseminierten Zellen (**Abbildung 14**).



**Abbildung 14: Vergleich chromosomaler Aberrationen von Primärtumoren mit ihren dazugehörigen disseminierten Tumorzellen in den Wächterlymphknoten**

Der Mittelwert der genetischen Veränderungen in dieser Studie war für Primärtumore (n=12) signifikant geringer als der Mittelwert von 7,9 (Spannweite 1-15) für disseminierte Zellen (n=16;  $p < 0,01$ ; T-Test). Grün: Mittelwert der Amplifikationen; Rot: Mittelwert der Deletionen.

**Tab. 3: Die häufigsten chromosomalen Veränderungen, die durch CGH bei zwölf Primärtumoren und ihren 16 dazugehörigen disseminierten Zellen aus Wächterlymphknoten festgestellt wurden.**

Chromosomale Region	Frequenz der chromosomalen Veränderungen in zwölf Primärtumoren	Frequenz der chromosomalen Veränderungen in den 16 disseminierten einzelnen Tumorzellen
	Anzahl (Prozent)	Anzahl (Prozent)
+1p <sup>a</sup>	2 (17)	6 (38)
+1q	3 (25)	3 (19)
+4p	3 (25)	0 (0)
+4q	3 (25)	6 (38)
+6p	3 (25)	8 (50)
+7	5 (42)	5 (31)
+8q	3 (25)	4 (25)
+12q	3 (25)	6 (38)
+15q	2 (17)	7 (44)
+17p	1 (8)	6 (38)
+17q	1 (8)	7 (44)
+20q	2 (17)	9 (56)
+22	0 (0)	6 (38)
-6q <sup>b</sup>	2 (17)	5 (31)
-9p	4 (33)	4 (25)
-9q	4 (33)	3 (19)
-17p	4 (33)	0 (0)
-18q	0 (0)	5 (31)
-19p	7 (58)	0 (0)
-19q	3 (25)	3 (19)

<sup>a</sup> ein Plus vor der Chromosomenzahl steht für einen Gewinn in diesem Chromosom

<sup>b</sup> ein Minus vor der Chromosomenzahl steht für einen Verlust in diesem Chromosom

### **3.7 Chromosomale Veränderungen in disseminierten Zellen in Relation zur Dicke des Primärtumors**

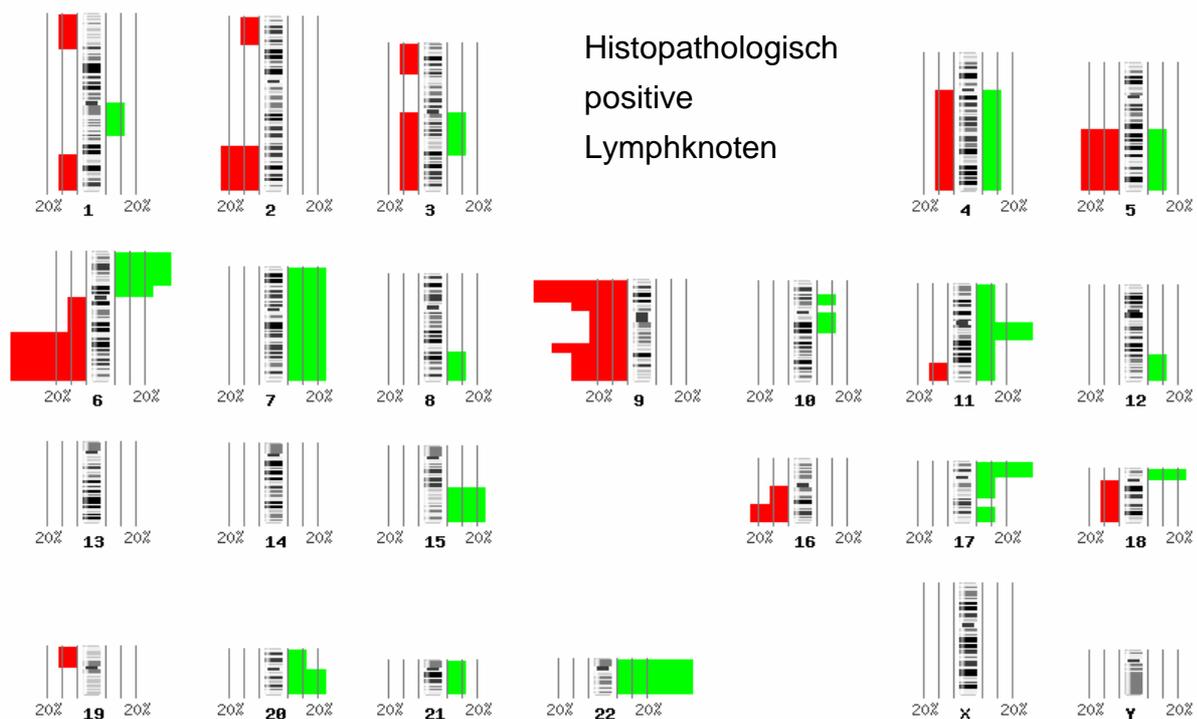
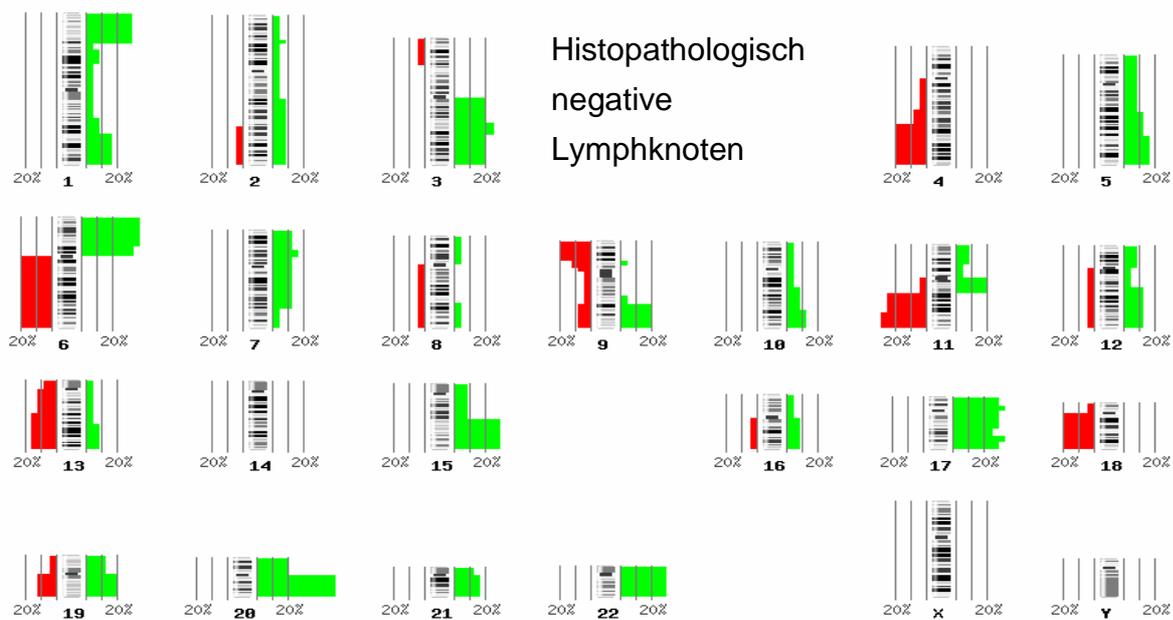
In der Studie von Balazs aus dem Jahre 2001 wurde festgestellt, dass bei Primärtumoren dünnere Tumore geringere genomischen Veränderungsraten haben als dickere Tumore. Ferner konnte keine Korrelation gefunden werden zwischen dem Alter der Patienten und dem Mittelwert der genomischen Veränderungsrate bei den Primärtumoren (Balazs et al., 2001). Es stellte sich die Frage, ob eine ähnliche Beobachtung nicht nur in den Primärtumoren gemacht werden kann, sondern auch in den disseminierten Tumorzellen in den Wächterlymphknoten.

Die Aberrationsrate bei disseminierten Tumorzellen (n=15) von Primärtumoren, die  $\leq 2$  mm dick sind, betrug 7,1 und war damit signifikant höher als die Aberrationsrate 4,8 von disseminierten Tumorzellen (n=12) von Primärtumoren, die eine Dicke von mehr als 2 mm besaßen ( $p < 0,01$ , T-Test).

Bei Primärtumoren konnte kein signifikanter Unterschied in der Aberrationsrate zwischen Primärtumoren  $\leq 2$  mm (n=7) und  $> 2$  mm (n=3) festgestellt werden ( $p = 0,7$ , T-Test).

### **3.8 Vergleich chromosomaler Veränderungen von disseminierten Tumorzellen aus histopathologisch positiven und histopathologisch negativen Wächterlymphknoten**

Der histopathologisch nachweisliche Befall der Wächterlymphknoten stellt einen der ersten Schritte in der malignen Progression des Melanoms dar. Der Vergleich genomischer Aberrationen zwischen diesen beiden Stadien könnte Aberrationen identifizieren, welche mit dem Fortschreiten der Metastasierung einhergehen. In dieser Studie hatten fünf Patienten histopathologisch positive Wächterlymphknoten. Aus ihnen konnten acht disseminierte Tumorzellen isoliert werden. Ferner hatten 23 Patienten histopathologisch negative Wächterlymphknoten. Aus ihnen konnten 24 disseminierte Tumorzellen isoliert werden. Beim Vergleich der Aberrationsmittelwerte zwischen histopathologisch negativen und histopathologisch positiven Lymphknoten gibt es keine statistisch relevanten Unterschiede ( $p = 0,7$ , T-Test). Jedoch fallen beim direkten Vergleich der einzelnen Chromosomenregionen auf, dass disseminierten Tumorzellen von histopathologisch positiven Wächterlymphknoten (5/8, 63%) häufiger eine Deletion in Chromosom 9 aufgewiesen haben als disseminierten Tumorzellen von histopathologisch negativen Wächterlymphknoten (8/24, 33 %). Im langen Arm von Chromosom 6 traf es ebenfalls zu, dass disseminierten Tumorzellen von histopathologisch positiven Wächterlymphknoten (4/8, 50%) häufiger Deletionen besaßen als disseminierten Tumorzellen von histopathologisch negativen Wächterlymphknoten (6/24, 25%). In Chromosom 22 hatten histopathologisch positiven Wächterlymphknoten häufiger Amplifikationen (4/8, 50%) als disseminierten Tumorzellen von histopathologisch negativen Wächterlymphknoten (7/24, 29%, **Abbildung 15**).

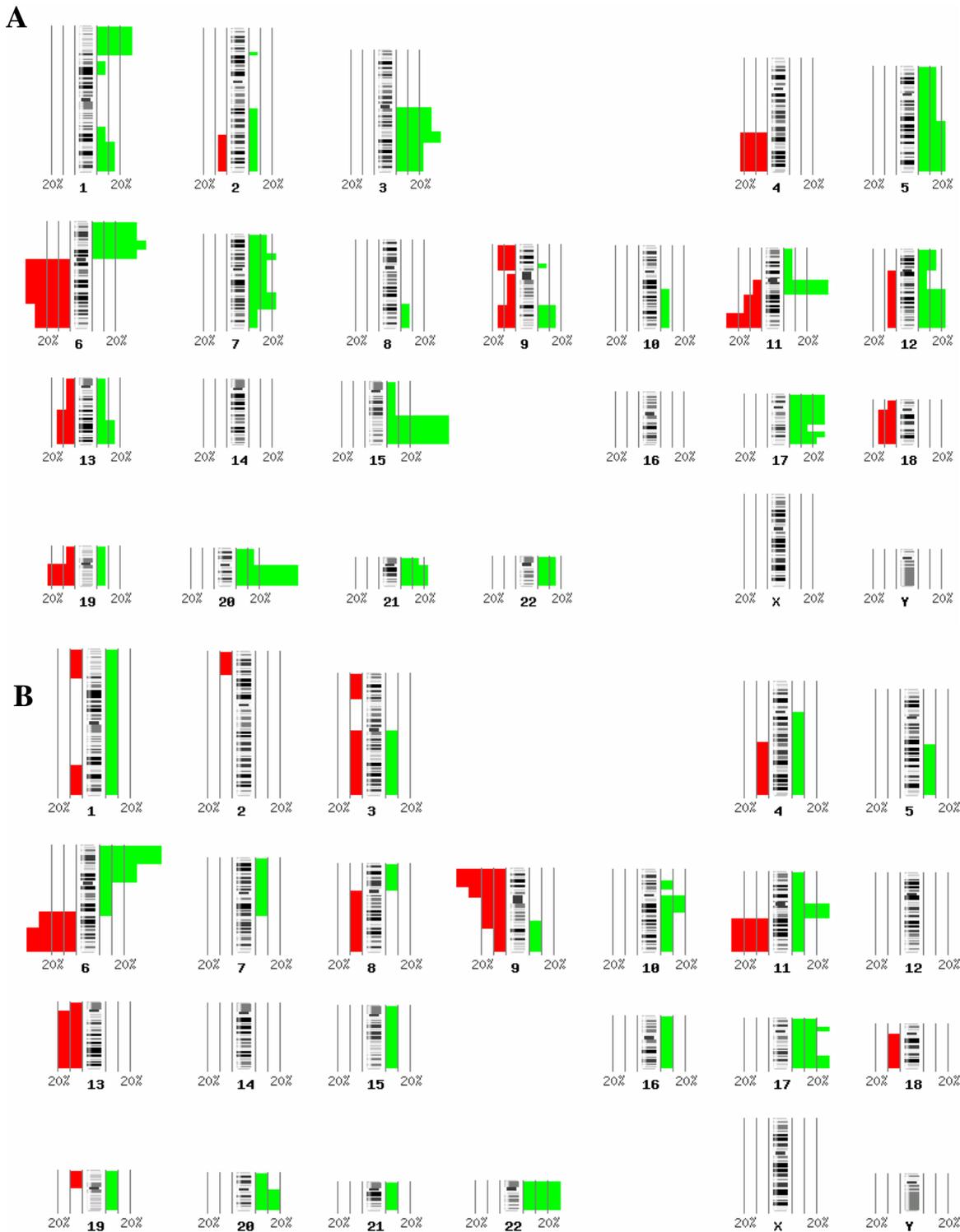


**Abbildung 15** CGH-Ergebnisse von disseminierte Zellen aus histopathologisch negativen und positiven Wächterlymphknoten

Die Darstellung erfolgt in einem Histogramm. Die roten Blöcke links der Chromosomen symbolisieren Deletionen, die grünen Blöcke auf der rechten Seite stehen für Gewinne. Abbildung A: disseminierte Zellen von histopathologisch negativen Wächterlymphknoten (n=24) und Abbildung B: disseminierte Zellen von histopathologisch positiven Wächterlymphknoten (n=8).

### **3.9 Vergleich chromosomaler Veränderungen von disseminierten Tumorzellen aus Wächterlymphknoten von superfiziell spreitenden Melanomen und nodulären Melanomen**

Es gibt nur wenige Untersuchungen über chromosomale Aberrationen für die verschiedenen Subtypen beim malignen Melanom. Eine Untersuchung von disseminierten Tumorzellen von superfiziell spreitenden Melanomen und nodulären Melanomen ist in der Literatur nicht beschrieben. Deswegen habe ich die genomischen Veränderungen von insgesamt 13 disseminierten Tumorzellen aus Wächterlymphknoten von Primärtumoren von superfiziell spreitenden Melanomen (SSM) und zehn disseminierten Tumorzellen aus Wächterlymphknoten von Primärtumoren von nodulären Melanomen (NM) verglichen (**Abbildung 16**). Ein Vergleich beider Subtypen könnte unterschiedliche chromosomale Aberrationen identifizieren, die eventuell einen Einfluß auf das Wachstumsmuster des jeweiligen Subtyps haben könnte. Bei *Chromosom 12* kam es bei 5/13 (39%) in disseminierten Tumorzellen aus Wächterlymphknoten von superfiziell spreitenden Primärtumoren zu genomischen Aberrationen. Bei disseminierten Tumorzellen aus Wächterlymphknoten von Primärtumoren von nodulären Melanomen konnten keine chromosomalen Veränderungen bei diesem Chromosom festgestellt werden. In *15q22qter* konnte bei mehr als der Hälfte der untersuchten disseminierten Tumorzellen, 7/13 (54%), von SSM zu Amplifikationen. Während nur eine disseminierte Tumorzelle von NM, 1/10 (10%), eine Amplifikation des *Chromosoms 15* aufwies. Der Lange Arm von *Chromosom 20* von disseminierten Tumorzellen aus SSM, 7/13 (54%), bietet eine Amplifikation an. Bei disseminierten Tumorzellen von NM gab es in *20q* in zwei von zehn Fällen (20%) eine entsprechende Amplifikation.

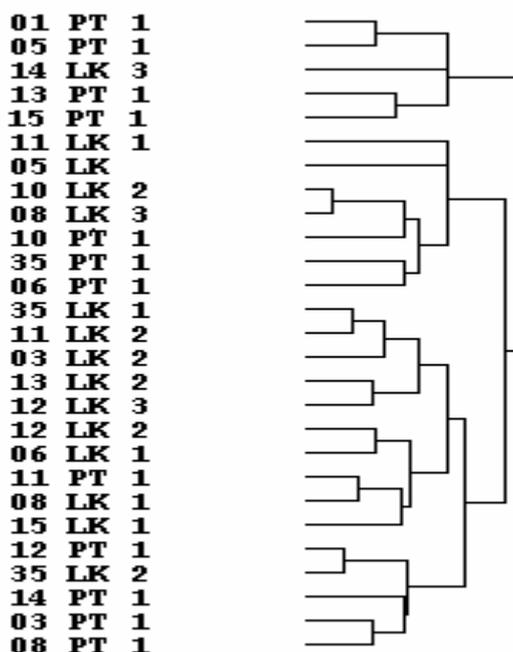


**Abbildung 16** CGH-Ergebnisse von disseminierten Tumorzellen aus Wächterlymphknoten von superfiziell spreitenden Melanomen (SSM) und von nodulären Melanomen (NM)

Die Häufigkeit und Ausdehnung der CGH-Veränderungen von **A** disseminierte Tumorzellen aus Wächterlymphknoten von SSM (n=13) **B** Tumorzellen aus Wächterlymphknoten von NM (n=10) sind in diesem Histogramm dargestellt. Die roten Blöcke links der Chromosomen symbolisieren Verluste, die grünen Blöcke auf der rechten Seite stehen für Gewinne. Über Gewinne oder Verluste im X und Y Chromosom können keine Aussagen getroffen werden, da Referenz- und Tumor DNA gegengeschlechtlich wurden.

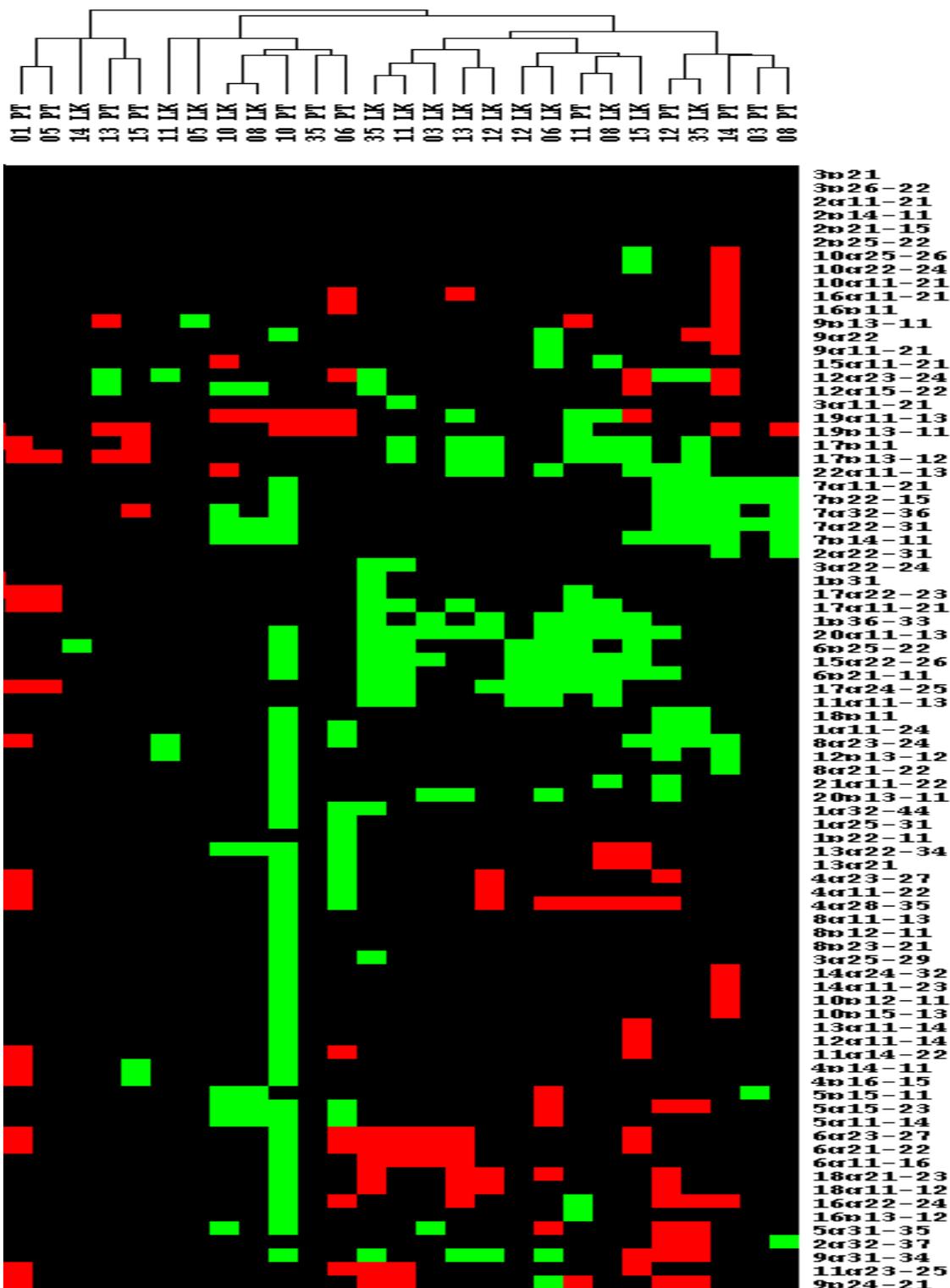
### 3.10 Hierarchische Ähnlichkeitsanalysen von Primärtumoren ihren dazugehörigen disseminierten Tumorzellen in Wächterlymphknoten anhand von chromosomalen Veränderungen

Es konnte bei Brust-, Prostata- und gastrointestinalen Tumoren gezeigt werden, dass Einzellzellen, die sich früh aus dem Primärtumor herauslösen, eine hohe genetische Instabilität aufweisen (Klein et al, 2002). Um dies auch beim Melanom darzustellen, wurde anhand eines Vergleichs genomischer Aberrationen in einer hierarchischen Ähnlichkeitsanalyse die klonale Verwandtschaft zwischen den Primärtumoren und ihren dazugehörigen disseminierten Einzellzellen in den Wächterlymphknoten dargestellt (Abbildung 17 und 18). Dabei wird deutlich, dass die Primärtumore nicht mit ihren dazugehörigen disseminierten Zellen gemeinsam gruppiert werden.



**Abbildung 17** Dendrogramm der Ähnlichkeitsanalyse von Primärtumoren und ihren dazugehörigen disseminierten Tumorzellen in den Wächterlymphknoten.

Dendrogramm erstellt durch hierarchische Ähnlichkeitsanalyse von Zelldissektaten von Primärtumoren und ihren dazugehörigen disseminierten Zellen dar. PT: Primärtumor; LK/LD: disseminierte Tumorzellen aus Wächterlymphknoten



**Abbildung 18** Hierarchische Ähnlichkeitsanalyse aller Primärtumore und ihrer dazugehörigen disseminierten Tumorzellen

Darstellung der genomischen Veränderungen von zwölf Primärtumoren und ihren 16 dazugehörigen disseminierten Tumorzellen mit Hilfe hierarchischer Ähnlichkeitsanalyse. PT: Primärtumor; LK und LD einzelne disseminierte Tumorzellen aus Wächterlymphknoten. In den Spalten sind die untersuchten Proben eingetragen und in den Zeilen die Chromosomenregionen. Oben ist ein hierarchisches Dendrogramm eingezeichnet, das die Ähnlichkeit zwischen zwei Datensätzen in der Höhe des Bäumchens darstellt, in welchem beide gerade enthalten sind. Die gleiche Zahl vor der Abkürzung für Primärtumoren und disseminierten Tumorzellen bedeutet, daß die Proben vom selben Patienten abstammen. Grüne Kästchen stehen für Amplifikationen und rote Kästchen stehen für Deletionen.

## 4 Diskussion

Die Inzidenz des malignen Melanoms nimmt in der westlichen Welt stetig zu (Tucker and Goldstein, 2003). Meine Untersuchungen beabsichtigten chromosomale Aberrationen von Melanomen mit ihren dazugehörigen disseminierten Tumorzellen zu vergleichen. Zu diesem Zweck habe ich das Genom einzelner disseminierter Tumorzellen in Wächterlymphknoten mit der Mse-Adapter-PCR amplifiziert. Diese Methode ermöglicht eine verlässliche genomische Amplifikation einzelner Zellen, dabei wird das numerische Verhältnis der chromosomalen Aberrationen nicht verändert. Anschließend erfolgte die komparative genomische Hybridisierung (CGH) mit einem Protokoll für Einzelzellen (Klein et al., 1999). Das Ziel war die Identifikation von chromosomalen Aberrationen, die zur Metastasierung von Primärtumoren führen könnten und die zu unterschiedlichen Wachstumsmustern in superfiziell spreitenden und nodulären Melanomen beitragen könnten. Ein weiteres Ziel war es, chromosomale Veränderungen zwischen disseminierten Tumorzellen aus histopathologisch positiven und histopathologisch negativen Wächterlymphknoten zu vergleichen. Es wird angenommen, dass Fernmetastasen durch lymphogene oder hämatogene Streuung der Tumorzellen entstehen (Skobe et al., 2001). Die erste Station bei der lymphatischen Absiedlung von Melanomzellen stellen die Wächterlymphknoten dar (Leiter et al., 2004). Der Vergleich genomischer Aberrationen von histopathologisch positiven und histopathologisch negativen Wächterlymphknoten könnte chromosomale Aberrationen identifizieren, welche mit dem Fortschreiten der Metastasierung einhergehen. Die bei diesen Vergleichen festgestellten chromosomalen Aberrationen können Anhaltspunkte für genauere Untersuchungen erbringen, die zur Identifizierung von neuen Tumorgenen beitragen könnten.

### *Vergleich der genomischen Aberrationen zwischen Primärtumoren und disseminierten Tumorzellen in den Wächterlymphknoten*

Die von mir festgestellten chromosomalen Aberrationen in den zwölf Primärtumoren decken sich zum größten Teil mit den Ergebnissen von anderen CGH-Untersuchungen (Bastian et al., 1998 und Balazs et al., 2001; **Tabelle 4**). Jedoch haben Balazs und Kollegen Primärtumore mit soliden Metastasen verglichen. Wohingegen ich in meiner Arbeit einzelne disseminierte Tumorzellen aus Wächterlymphknoten verwendet habe. Die Arbeitsgruppe von Ulmer hat ebenfalls disseminierte Zellen von Wächterlymphknoten für

ihre CGH-Untersuchungen benutzt. Aber ein Vergleich mit den dazugehörigen Primärtumoren blieb aus (Ulmer et al., 2005; **Tabelle 5**).

**Tabelle 4:** Vergleich der häufigsten chromosomalen Veränderungen, die durch CGH in dieser Arbeit, in der Arbeitsgruppe von Bastian et al., 1998 und Balazs et al., 2001 festgestellt wurden. Die Angabe erfolgt in Prozent.

Chromosomale Region	Frequenz der chromosomalen Veränderungen Primärtumoren (n=12) aus meiner Arbeit	Frequenz der chromosomalen Veränderungen in PT bei Bastian et al.	Frequenz der chromosomalen Veränderungen in PT (n=16) bei Balazs et al.
+1p <sup>a</sup>	17	25	31
+1q	25		38
+6p	25	28	63
+7	42	50	56
+8q	25	34	50
+17	8	13	
+20p	8	13	
-6q <sup>b</sup>	17	28	
-9	33	81	69

<sup>a</sup> ein Plus vor der Chromosomenzahl steht für einen Gewinn in diesem Chromosom

<sup>b</sup> ein Minus vor der Chromosomenzahl steht für einen Verlust in diesem Chromosom

Vier von den untersuchten disseminierten Einzelzellen hatten balancierte CGH Profile (14%). Diese Einzellzellen könnten Tumorzellen sein. Diese Zellen könnten genomische Veränderungen unterhalb der Auflösungsgrenze von CGH-Versuchen von 10 bis 20 Mb besitzen. Eine zweite Erklärungsmöglichkeit ist, dass es sich dabei um Färbeartefakte handeln könnte. Deswegen wurden diese Profile von den weiteren Auswertungen ausgeschlossen. In der Melanom-Studie von Bastian konnte bei vier Prozent der Primärtumoren in einer Untersuchungsreihe keine chromosomalen Veränderungen mit der CGH nachgewiesen werden. Jedoch bildeten sich bei einem Teil der Patienten mit einem balancierten CGH-Profil im Primärtumor zu einem späteren Zeitpunkt Fernmetastasen (Bastian et al., 2003).

**Tabelle 5:** Vergleich der häufigsten chromosomalen Veränderungen, die durch Einzelzell-CGH in der Arbeitsgruppe von Ulmer (Ulmer et al., 2005) und in dieser Arbeit festgestellt worden sind.

Chromosomale Region	Frequenz der chromosomalen Veränderungen in 24 disseminierten Tumorzellen aus Wächterlymphknoten (Ulmer et al., 2005)	Frequenz der chromosomalen Veränderungen in 28 disseminierten Tumorzellen aus Wächterlymphknoten (aus dieser Arbeit)
+1q <sup>a</sup>	5 (21%)	7 (22%)
+6p	11 (46%)	15 (47%)
+7q	6 (25%)	6 (19%)
+8q	9 (38%)	4 (13%)
+15q	9 (38%)	10 (31%)
+20p	6 (25%)	7 (22%)
+20q	8 (38%)	16 (50%)
-6q <sup>b</sup>	8 (33%)	11 (34%)
-9q	10 (42%)	12 (38%)
-11q	6 (25%)	8 (25%)

<sup>a</sup> ein Plus vor der Chromosomenzahl steht für einen Gewinn in diesem Chromosom

<sup>b</sup> ein Minus vor der Chromosomenzahl steht für einen Verlust in diesem Chromosom

Durch den Vergleich zwischen disseminierten Tumorzellen und Primärtumoren kann man erste Anhaltspunkte für chromosomalen Veränderungen gewinnen, die in Zusammenhang mit der Metastasierung gebracht werden könnten. Zum Beispiel fällt bei der Gegenüberstellung der chromosomalen Aberrationen von disseminierten Tumorzellen und ihren dazugehörigen Primärtumoren chromosomale Imbalancen für *Chromosom 6* ins Auge. Insbesondere wurden Gewinne auf *6p* mit einer schlechten Prognose bei der Melanomerkrankung in Zusammenhang gebracht (Namiki et al., 2005). Es wurden zwischen 28% und 63% Gewinne bei *6p* beim malignen Melanom berichtet (Balazs et al., 2001; Bastian et al., 1998 und Namiki et al., 2005). In meiner Studie kam es in der Hälfte der disseminierten Tumorzellen von Wächterlymphknoten (8/16, 50%) zu Gewinnen bei *6p*. In Primärtumoren kam es bei einem Viertel der Proben (4/12, 25%) zu Gewinnen bei *6p*. Die erhöhte Gewinnrate bei disseminierten Tumorzellen in den Wächterlymphknoten unterstützt die Hypothese, dass sich Gene auf dem kurzen Arm von *Chromosom 6* befinden könnten, die zur Tumorprogression beitragen könnten (Santos et al., 2007). Auch bei anderen Tumorerkrankungen konnten Gewinne auf *6p* festgestellt werden, so zum Beispiel beim Blasenkarzinom (Veltman et al., 2003). Einer der putativen Onkogene auf *6p* könnte

beim Melanom E2F3 sein. Es befindet sich im kurzen Arm von *Chromosom 6*. E2F3 ist ein Transkriptionsfaktor, der den Übertritt von der G1- in die S-Phase kontrolliert (Humbert et al., 2000). E2F3 wird unter anderem durch das Retinoblastoma Protein Rb kontrolliert. Es konnte nachgewiesen werden, dass E2F3 bei Melanomzellen unabhängig von äußeren Faktoren im erhöhtem Maße exprimiert wird (Halaban et al., 2000).

Auch der lange Arm von *Chromosom 6* könnte zur Tumorprogression beitragen. In meiner Studie kam es bei fünf disseminierten Tumorzellen (n=16, 31%) und zwei Primärtumoren (n=12, 17%) zu Verlusten von *6q*. Damit gab es mehr Verluste auf *6q* in den disseminierten Tumorzellen als in den Primärtumoren. Auch in anderen Melanom-Studien konnten Verluste von *6q* beobachtet werden: 28% (Bastian et al., 1998), 31% (Healey 1996) und 40% (Milikin et al., 1991). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Tumorsuppressorgene sich in der Region *6q16.3-q23* befinden (Miele et al., 2000). Deletionen oder Translokationen konnten in dieser Region in über 80% bei fortgeschrittenen Melanomen festgestellt werden (Thompson et al., 1995). Ein weiterer Kandidat auf *6q*, der die Aussaat von Tumorzellen begünstigen könnte, ist sicherlich Cx43, das sich in der Region *6q21-q23* befindet und das Protein Connexin 43 kodiert. Cx43 ist Bestandteil der Gap Junctions und somit beteiligt an der Zell-Zell-Kommunikation, Zelldifferenzierung, Proliferation und Zelladhäsion (Yamasaki, 1990). Ein Verlust von Connexin 43 stört den Aufbau der gap junctions und kann Tumorzellen helfen in fremden Geweben zu überleben (Rivedal, 2001). Tatsächlich konnte durch eine Erhöhte Cx43 Expression in Melanomzelllinien eine Unterdrückung des Substrat-unabhängigen Wachstums erzielt werden (Su et al., 2000). Die Suche nach weiteren Tumorsuppressorgenen sollte auf *6q* viel versprechend sein.

### ***Genomische Instabilität beim Melanom***

Chromosomale Instabilität ist einer der Hauptfaktoren für die genomische Instabilität in malignen Tumoren (Lengauer et al., 1998). Die chromosomale Instabilität tritt sehr früh in der Entwicklung von Tumoren auf (Duesberg et al., 2001). Ein Hinweis für die Bedeutung der chromosomalen Instabilität bei der Entstehung von Tumoren ist, dass chromosomale Instabilität auch in präcancerösen Geweben auftritt (Ai et al., 1999).

Die mittlere Aberrationsrate disseminierter Tumorzellen aus Wächterlymphknoten von dünnen Primärtumoren ( $\leq 2\text{mm}$ ) war höher als die von disseminierten Tumorzellen in

Wächterlymphknoten von Primärtumoren, die dicker als 2 mm waren (**Abbildung 14**). Diese Beobachtung könnte man dadurch erklären, dass die Mutationsrate in nicht wachsenden Tumoren zunimmt (Richards et al., 1997). Die erhöhte Mutationsrate führt dazu, dass die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Aberrationen, die einen Proliferationsvorteil erbringen könnten zunimmt (Jackson und Loeb, 1998). Namiki und Kollegen konnten beim Vergleich von vier Gruppen von 20 Primärtumoren, die nach unterschiedlichen Tumordicken eingeteilt waren, keinen Unterschied im Mittelwert der genomischen Veränderungsrate feststellen (Namiki et al., 2005). Ich konnte ebenfalls in diesem Punkt bei Primärtumoren keinen Unterschied feststellen. Jedoch muss man hinzufügen, dass ich, wie auch Namiki, durch Mikrodissektion von Tausenden Tumorzellen Primärtumore mit CGH untersucht habe. Dadurch erhält man einen Durchschnittswert der Chromosomalen Veränderungen in einem Primärtumor. In Gegensatz dazu habe ich bei der Analyse der disseminierten Tumorzellen in den Wächterlymphknoten einzelne Zellen verwendet. Dies könnte die unterschiedlichen Ergebnisse erklären.

Eine weitere wichtige Beobachtung war, dass in der hierarchischen Ähnlichkeitsanalyse der klonalen Verwandtschaft zwischen Primärtumoren und ihren dazugehörigen disseminierten Einzellzellen in den Wächterlymphknoten die Primärtumore nicht mit ihren dazugehörigen disseminierten Zellen gemeinsam gruppiert wurden (**Abbildung 17 und Abbildung 18**). Dies spricht für eine hohe genomische Heterogenität der disseminierten Zellen in den Wächterlymphknoten und ihren dazugehörigen Primärtumoren. Bei einer Reihe von Tumoren, Brust-, Prostata- und gastrointestinalen Karzinomen, konnte gezeigt werden, dass Einzellzellen, die sich früh aus dem Primärtumor herauslösen, eine hohe genetische Instabilität aufweisen (Klein et al, 2002). Man kann die Liste der Tumoren mit hoher genomischer Instabilität der früh disseminierten Tumorzellen um das maligne Melanom erweitern. Möglicherweise könnten die großen Unterschiede in chromosomalen Aberrationen zwischen Primärtumoren und ihren dazugehörigen disseminierten Tumorzellen in den Wächterlymphknoten an den unterschiedlichen selektiven Faktoren liegen, die auf disseminierte Tumorzellen und Tumorzellen im Primärtumor einwirken. Die starke Heterogenität von disseminierten Tumorzellen könnte die Ineffektivität von Therapien erklären, die gegen Ziele in den Primärtumoren entwickelt wurden (Klein et al., 2002).

## **Vergleich chromosomaler Veränderungen zwischen disseminierten Tumorzellen aus histopathologisch positiven und histopathologisch negativen Wächterlymphknoten**

Der wichtigste prognostische Faktor für Patienten ohne Fernmetastasen ist der histopathologische Befund der Wächterlymphknoten (Balch et al., 2001). Der histopathologisch nachweisliche Befall der Wächterlymphknoten stellt einen Schritt in der malignen Progression des Melanoms dar. Der Vergleich genomischer Aberrationen von disseminierten Tumorzellen aus histopathologisch positiven und histopathologisch negativen Wächterlymphknoten könnte Aberrationen identifizieren, welche mit dem Fortschreiten der Metastasierung einhergehen.

In ungefähr der Hälfte der Fälle kommt es beim malignen Melanom primär zur Metastasierung in den Lymphknoten. In ungefähr 20% werden Absiedlungen in den drainierenden Lymphgefäßen entdeckt. In den restlichen ungefähr 30% der Fälle werden Tumorabsiedlungen als Fernmetastasen aufgefunden (Reintgen et al., 1992). Der histopathologisch nachweisbarer Befall von Wächterlymphknoten ist vom hohen prognostischen Wert (Balch et al., 2003; Roberts und Cochran 2004). Die Biopsie von Wächterlymphknoten dient dazu bei histopathologisch negativen Wächterlymphknoten unnötige Lymphadenektomien zu vermeiden (Gad et al., 2006).

Ich möchte ein Beispiel beim Vergleich chromosomaler Veränderungen zwischen disseminierten Tumorzellen aus histopathologisch positiven und histopathologisch negativen Wächterlymphknoten stellvertretend für eine mögliche Betrachtungsweise dieser Daten herausnehmen. In den von mir analysierten Proben konnte ich keinen Verlust in *9p21* in den 21 von mir untersuchten disseminierten Zellen von histopathologisch negativen Lymphknoten feststellen. Jedoch konnte ich in fünf von acht (63%) disseminierten Zellen von histopathologisch positiven Lymphknoten Verluste in diesem Abschnitt des *Chromosoms 9* feststellen. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass Verluste von *9p21* für die Disseminierung von Tumorzellen nicht von entscheidender Bedeutung ist. Jedoch könnten Verluste auf *9p21* das Wachstum der Metastase begünstigen. In der Region *9p21* befindet sich das Tumorsuppressorgen CDKN2A/p16 (Nobori et al, 1994 und Kamp et al., 1994). Eine verminderte Expression des Gens p16 wurde in Zusammenhang gebracht mit einer schlechten Prognose beim malignen Melanom (Sauter et al., 1998). Die Region *9p21* ist auch bei vielen Zelllinien in einer Reihe von Tumoren (Brustkrebs, Lungenkrebs, usw.) homozygot deletiert (Kamb et al., 1994). In einer kürzlich veröffentlichten Studie mit 47 Melanomzelllinien gehörten Verluste auf *Chromosom 9* zu den am häufigsten beobachteten chromosomalen Aberrationen (Jönsson

et al., 2007). Ferner fand die Arbeitsgruppe von Cachia bei 35 % der ihnen zur Verfügung stehenden Melanome, die dicker als 0,75 mm waren, eine LOH in *9p21* Region und keine LOH bei 18 Melanomen, die dünner waren als 0,75 mm (Cachia et al., 2000). Dies führte die Arbeitsgruppe zu der These, dass die Inaktivierung von *CDKN2A* eine Rolle bei der Tumorprogression und nicht bei der Tumorentstehung spielt. Auch in meiner Studie waren alle Primärtumoren von disseminierten Tumorzellen mit einem Verlust in *9p21*, dicker als 1,06 mm (Spannweite 1,06 - 15 mm).

### **Vergleich chromosomaler Veränderungen zwischen disseminierten Tumorzellen aus Wächterlymphknoten von superfiziell spreitenden Melanomen und nodulären Melanomen**

Es gibt nur wenige Untersuchungen über chromosomale Aberrationen für die verschiedenen Subtypen beim malignen Melanom. Eine Untersuchung von einzelnen disseminierten Tumorzellen von superfiziell spreitenden Melanomen und nodulären Melanomen ist in der Literatur nicht beschrieben. Deswegen habe ich die genomischen Veränderungen von insgesamt 13 disseminierten Tumorzellen aus Wächterlymphknoten von Primärtumoren von superfiziell spreitenden Melanomen (SSM) und zehn disseminierten Tumorzellen aus Wächterlymphknoten von Primärtumoren von nodulären Melanomen (NM) verglichen (Abbildung 19). Auf *Chromosom 12* kam es bei 5/13 (39%) in disseminierten Tumorzellen aus Wächterlymphknoten von superfiziell spreitenden Primärtumoren zu genomischen Aberrationen. Bei disseminierten Tumorzellen aus Wächterlymphknoten von Primärtumoren von nodulären Melanomen konnten keine chromosomalen Veränderungen von diesem Chromosom festgestellt werden. Auf *15q* konnte bei mehr als der Hälfte der untersuchten disseminierten Tumorzellen, 7/13 (54%), von SSM zu Gewinnen. Während nur eine disseminierte Tumorzelle von NM, 1/10 (10%), einen Gewinn des *15q* aufwies. Disseminierte Tumorzellen aus SSM wiesen auf dem langen Arm von *Chromosom 20* in sieben Fällen (n=13, 54%) einen Gewinn auf. Bei disseminierten Tumorzellen von NM gab es in *20q* in zwei von zehn Fällen (20%) eine entsprechende Amplifikation. Auf dem langen Arm von Chromosom 20 befinden sich die Onkogene *WNT7B*, *PDGFB* und *FBLN1* (Freier et al., 2005). *WNT7B* enthält die Informationen für einen Bestandteil des WNT-Signalweges, das Bestandteil der Zell-Zell-Kommunikation, Zellwachstum und Differenzierung ist (Kirikoshi et al., 2002). Eine Überexpression von *WNT7B* wurde schon bei Melanomen beschrieben (Pham et al., 2003). Inwiefern *PDGFB* und *FBLN1* beim malignen Melanom auch zur Tumorbildung beitragen, müssen weiterführende Untersuchungen ergeben.

Einzelne disseminierte Tumorzellen können Vorläufer von Metastasen sein (Wittekind und Tannapfel, 1996). Jedoch gehen die meisten dieser disseminierten Tumoreinzellen unter. Ein Teil der disseminierten Tumorzellen kann Ursprung einer klinisch manifesten Metastasierung werden. Dieser Prozess der Metastasierung, ist beim malignen Melanom noch unzureichend experimentell untersucht worden. Deswegen wurden in dieser Arbeit chromosomale Aberrationen disseminierter Melanomzellen aus Wächterlymphknoten mit den chromosomalen Aberrationen der dazugehörigen Primärtumore verglichen. Anschliessend wurde die klonale Verwandtschaft zwischen den Primärtumoren und ihren dazugehörigen disseminierten Tumoreinzellen in den Wächterlymphknoten durch den Vergleich ihrer genomischen Aberrationen in einer hierarchischen Ähnlichkeitsanalyse dargestellt. Die untersuchten einzelnen disseminierten Tumorzellen wiesen bezüglich chromosomaler Aberrationen große Abweichungen zu ihren dazugehörigen Primärtumoren auf. Dieses Ergebnis ist ein Argument für eine frühe Disseminierung von Tumorzellen. Diese disseminierten Tumorzellen entwickeln sich unabhängig vom Primärtumor. Dies ist eines der Probleme bei der Entwicklung spezifischer antimetastatischer Therapien.

Jedoch gibt es neue Ansätze in der Immuntherapie mit Interleukin 2, die bereits in klinischen Studien eingesetzt werden (Atkins, 2006). Da die Ansprechrate niedrig ist (Rosenberg, 2001) und die Nebenwirkungen den Einsatz stark limitieren, ist die Interleukin 2 Therapie in Deutschland bis jetzt nicht zugelassen worden. Olbimersen ist ein Antisense-Oligonukleotid, das Bcl-2 hemmt. In präklinischen Studien konnte gezeigt werden, dass es in Kombination mit dem Chemotherapeutikum Decarbazin das metastasenfremde Intervall vergrößern konnte (Millward et al., 2004). Weitere Wirkstoffe, die in Signalkaskaden eingreifen, sind BRAF-Inhibitoren. An Mäusen getestet, konnten BRAF-Inhibitoren die Metastasenbildung unterdrücken (Collisson et al., 2003). Klinische Versuche an menschlichen Probanden sind im Moment Gegenstand von Untersuchungen.

## 5 Zusammenfassung

Der Prozess der Metastasierung, gerade in der frühen Phase, ist beim malignen Melanom noch unzureichend verstanden. In der vorliegenden Studie wurden 28 einzelne disseminierte Melanomzellen, die aus Wächterlymphknoten immunzytochemisch isoliert wurden, mit der komparativen genomischen Hybridisierung auf genomische Veränderungen untersucht. Für 16 dieser disseminierten Tumorzellen standen die entsprechenden dazugehörigen Primärtumore zur Verfügung. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, chromosomale Aberrationen disseminierter Melanomzellen aus Wächterlymphknoten mit den chromosomalen Aberrationen der dazugehörigen Primärtumore zu vergleichen. Die global amplifizierte genomische DNA einzelner disseminierter Tumorzellen und korrespondierender Primärtumore wurde auf chromosomale Gewinne und Verluste analysiert. Es sollte nachgeprüft werden, ob sich für disseminierte Tumorzellen anhand der chromosomalen Veränderungen Rückschlüsse auf spezifische Selektionsprozesse ziehen lassen. Die klonale Verwandtschaft zwischen den Primärtumoren und ihren dazugehörigen disseminierten Tumorzellen in den Wächterlymphknoten wurde durch den Vergleich ihrer genomischen Aberrationen in einer hierarchischen Ähnlichkeitsanalyse demonstriert. Die untersuchten einzelnen disseminierten Tumorzellen wiesen bezüglich chromosomaler Aberrationen zu ihren dazugehörigen Primärtumoren große Abweichungen auf. Dieses Ergebnis spricht für eine frühe Disseminierung von Tumorzellen, die sich anschliessend unabhängig vom Primärtumor entwickeln. Die oft nach einer vollständigen Resektion des Primärtumors beobachtete zeitlich verzögerte Entstehung von Fernmetastasen beim malignen Melanom, kann durch die frühe Disseminierung der Tumorzellen erklärt werden. Es gab Unterschiede in den genomischen Aberrationen zwischen disseminierten Melanomzellen aus Wächterlymphknoten, die histopathologisch als tumorfrei klassifiziert waren, und Tumorzellen, die bereits erfolgreich eine Lymphknotenmetastase gegründet hatten. Mit der Progression zum histopathologisch nachweisbaren Befall in den Wächterlymphknoten werden bestimmte genomische Veränderungen in den Tumorzellen beim malignen Melanom selektiert, die eine Expansion in manifeste Metastasen fördern. Diese Ergebnisse können nur als Ausgangspunkt für weiterführende Arbeiten zur Identifizierung von Tumorgenen sein, da die Auflösung der komparativen genomischen Hybridisierung (CGH) lediglich zehn Megabasen beträgt.

## 6 Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
AC	Adenylat-Cyclase
AJCC	American Joint Committee on Cancer
ALM	Akrolentiginöses malignes Melanom
APAAP	Alkalische Phosphatase-Anti-Alkaline Phosphatase
ARF	alternative reading frame
BSA	bovine serum albumin
C	Cytosin
cAMP	cyclisches AMP
CDK	cyclin-dependent kinase
CGH	komparative Genomhybridisierung
CK	Zytokeratin
CUP	cancer of unknown primary
CRE	cAMP-Responsive Element
CREB	CRE-Bindeprotein
Cyc D1	Cyclin D1
DAPI	4, 6-Diamidino-2-Phenylindol-Dihydrochlorid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dig	Digoxigenin
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
ERK	extracellular-related kinase
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein
G	Guanin

GRB2	growth factor receptor-bound protein-2
HGF	hepatocyte growth factor
HRAS	c-Harvey-Ras-1
INK4a	inhibitor of cyclin-dependent kinase 4 a
k.A.	keine Angabe
LD	Lymphdissektat, Lymphknoten jedoch nicht der Wächterlymphknoten
LK	Lymphknoten
LOH	loss of heterozygosity
LMM	Lentigo-maligna-Melanom
m	männlich
MAP	mitogen-activated protein
MC1R	melanocortin 1 receptor
mdm2	mouse double minute 2
MEK	MAPK/ERK kinase
min	Minute
MITF	microphthalmia-associated transcription factor
MSH	Melanozytenstimulierendes Hormon
neg	negativ
NM	noduläres Melanom
OPA	OnePhorAll
OT	Objektträger
PBS	Phosphatbuffer-Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PKA	Protein-Kinase A
pos	positiv
PT	Primärtumor

PTEN	Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10
Rb	Retinoblastoma
RHC	red hair colour
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Protein-Kinase
s	Sekunde
SCID	severe combined immunodeficient (mice)
SN	Sentinel Lymph Node, Wächterlymphknoten
SOS	son of sevenless
SSC	Salins-Sodiumcitrat
SSM	superfiziell spreitendes Melanom
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
TD	Tumordicke
TF	Transkriptionsfaktor
Tris	Trishydroxymethyl
UV	Ultraviolett
w	weiblich

## 7 Literaturverzeichnis

- Ackerman AB (1980): Malignant melanoma: a unifying concept. *Hum Pathol* 11: 591-595
- Ai H, Barrera JE, Pan Z, Meyers AD and Varella-Garcia M (1999): Identification of individuals at high risk for head and neck carcinogenesis using chromosome aneuploidy detected by fluorescence in situ hybridization. *Mutat. Res.* 439:223–232
- Al-Batran S-E, Rafiyan M-R, Atmaca A, Neumann A, Karbach J, Bender A, Weidemann E, Altmannsberger H-M, Knuth A, Jäger E (2005): Intratumoral T-cell infiltrates and MHC Class I expression in patients with stage IV melanoma. *Cancer Res* 65: 3937-3941
- Armstrong BK, Krickler A (2001): The epidemiology of UV induced skin cancer. *J. Photochem. Photobiol. B.*: 63: 8-18
- Atkins MB (2006): Cytokine-based therapy and biochemotherapy for advanced melanoma. *Clin Cancer Res.* 12: 2353-2358
- Avruch J, Khokhlatchev A, Kyriakis JM, Luo Z, Tzivion G, Vavvas D, Zhang XF (2001): Ras activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade. *Recent Prog. Horm. Res.* 56: 127 – 155
- Balazs M, Adam Z, Treszl A, Begany A, Hunyadi und Adany R. (2001): Chromosomal Imbalances in Primary and Metastatic Melanomas Revealed by Comparative Genomic Hybridization. *Cytometry* 46: 222 - 232
- Balch CM (1992): Prognosis and treatment results worldwide. *Semin Surg Oncol* 8: 400-414
- Balch CM, Soong SJ, Bartolucci AA, Urist MM, Karakousis CP, Smith TJ, Temple WJ, Ross MI, Jewell WR, Mihm MC, Barnhill RL, Wanebo HJ (1996): Efficacy of an elective regional lymph node dissection of 1 to 4 mm thick melanomas for patients 60 years of age and younger. *Ann Surg* 224: 255 – 263
- Balch CM, Soong SJ, Gershenwald JE, Thompson JF, Reintgen DS, Cascinelli N, Urist M, McMasters KM, Ross MI, Kirkwood JM, Atkins MB, Thompson JA, Coit DG, Byrd D, Desmond R, Zhang Y, Liu PY, Lyman GH, Morabito A (2001): Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. *J. Clin. Oncol.* 19: 3622 - 3634
- Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG, Fleming ID, Gershenwald JE, Houghton A Jr, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MF, Morton DL, Reintgen DS, Ross MI, Sober A, Thompson JA, Thompson JF (2001): Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol*: 19: 3635-3648
- Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, et al.: New TNM melanoma staging system: Linking biology and natural history to clinical outcomes. *Semin Surg Oncol* 2003;21:43–52

- Bardeesy N, Bastian BC, Hezel A, Pinkel D, DePinho RA, Chin L (2001): Dual inactivation of RB and p53 pathways in RAS-induced melanomas. *Mol. Cell Biol.* 21: 2144 – 2153
- Barnhill RL, Fine JA, Roush GC, Berwick M. Predicting five-year outcome for patients with cutaneous melanoma in a population-based study. *Cancer* 1996;78:427-32
- Bastiaens M, ter Huurne J, Gruis N, Bergman W, Westendorp R, Vermeer BJ, Bouwes Bavinck JN (2001): The melanocortin-1-receptor gene is the major freckle gene. *Hum. Mol. Genet.* 10: 1701 – 1708
- Bastian BC, LeBoit PE, Hamm H, Brocker EB, Pinkel D (1998): Chromosomal gains and losses in primary cutaneous melanomas detected by comparative genomic hybridization. *Cancer res* 58: 2170 – 2175.
- Bastian BC, Ohlshen AB, LeBoit PE, Pinkel D (2003): Classifying melanocytic tumors based on DNA copy number changes. *AM J Pathol* 163: 1765 – 1770
- Becker I, Becker KF, Rohrl MH, Minkus G, Schütze K, Höfler H (1996): Single-cell mutation analysis of tumors from stained histologic slides. *Lab Invest* 75: 801 – 807
- Beddingfield FC 3<sup>rd</sup> (2003): The melanoma epidemic: res ipsa loquitur. *Oncologist* 8: 459-65
- Bell CW, Pathak S, Frost P (1989): Unknown primary tumors: establishment of cell lines, identification of chromosomal abnormalities, and implications for a second type of tumor progression. *Cancer Res* 49: 4311-4315
- Bieligk SC, Ghossein R, Bhattacharya S, Coit DG (1999) : Detection of tyrosinase mRNA by reverse transcription-polymerase chain reaction in melanoma sentinel nodes. *Ann Surg Oncol* 6: 232 – 240
- Biroccio A, Amodei S, Antonelli A, Benassi B, Zupi G (2003): Inhibition of c-myc oncoprotein limits the growth of human melanoma cells by inducing cellular crisis. *The Journal of Biological Chemistry* 278: 35693-35701
- Bottaro DP, Rubin JS, Faletto DL, Chan AM, Kmiecik TE, Vande Woude GF, Aaronson SA (1991): Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. *Science* 251: 802 – 804
- Box NF, Wyeth JR, O’Gorman LE & Sturm RA (1997): Characterization of melanocyte stimulating hormone receptor variant alleles in twins with red hair. *Hum. Mol. Genet.* 6: 1891 – 1897
- Box NF, Duffy DL, Chen W, Stark M, Martin NG, Sturm RA, Hayward NK (2001): MC1R genotype modifies risk of melanoma in families segregating CDK2N mutations. *Am. J. Hum. Genet.* 69: 765 – 773
- Braun S, Pantel K, Muller P, Janni W, Hepp F, Kentenich CR, Gastroph S, Wischnik A, Dimpfl T, Kindermann G, Riethmuller G, Schlimok G (2000): Cytokeratin-positive cells in

the bone marrow and survival of patients with stage I, II or III breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 342: 525-533

Cahill DP, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C (1999): Genetic instability and darwinian selection in tumours. *Trends Cell Biol.* 9(12):M57-60

Cascinelli N, Belli F, Santinami M, fait V, testori A, Ruka W, Cavaliere R, Mozzillo N, Rossi CR, MacKie RM, Nieweg O, Pace M, Kirov K (2000): Sentinel lymph node biopsy in cutaneous melanoma: the WHO Melanoma Program experience. *Ann Surg Oncol* 7: 469-474

Chin L, Pomerantz J, Polsky D, Jacobson M, Cohen C, Cordon-Cardo C, Horner JW and DePinho RA (1997): Cooperative effects of INK4a and ras in melanoma susceptibility in vivo. *Genes Dev.* 11: 2822 – 2834

Chin L, Tam A, Pomerantz J, Wong M, Holash J, Bardeesy N, Shen Q, O'Hagan R, Pantginis J, Zhou H, Horner JWII, Cordon-Cardo C, Yancopoulos GD and DePinho RA (1999): Essential role of oncogenic Ras in Tumor maintenance. *Nature* 400: 468 – 472

Clark WH Jr, From L, Bernardino EA, Mihm MC (1969): The histogenesis and biological behavior of primary human malignant melanoma of the skin. *Cancer res* 29: 817-822

Clark WH Jr., Greene MH, Van Horn M (1984): A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Hum Pathol.* 15: 1147-1165

Collison EA, De A, Suzuki H, Gambhir SS und Kolodney S (2003): Treatment of Metastatic Melanoma with an Orally Available Inhibitor of the Ras-Raf-MAPK Cascade. *Cancer res* 63: 5669-5673

Cook MG, Green MA, Anderson B, Eggermont AM, Ruitter DJ, Spatz A, Kissin MW, Powell BW; EORTC Melanoma Group (2003): The development of optimal pathological assessment of sentinel lymph nodes for melanoma. *J Pathol* 200: 314 – 319

Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave J, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JWC, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR & Futreal PA (2002): Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417: 949 – 954

Duesberg P, R. Stindl and R. Hehlmann (2001): Origin of multidrug resistance in cells with and without multidrug resistance genes: Chromosome reassortments catalyzed by aneuploidy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 11283–11288

Duesberg P, Li R, Fabarius A and Hehlmann R. (2005): The chromosomal basis of cancer. *Cellular Oncology* 27 293–318

Du Manoir S, Speicher MR, Joos S, Schrock E, Popp S, Dohner H, Kovacs G, Robert-Nicoud M, Lichter P, Cremer T (1993): Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomic hybridization. *Hum Gent* 90: 590 – 610

Du Manoir S, Schröck E, Bentz M, Speicher MR, Joos S, Ried T, Lichter P, Cremer T (1995): Quantitative Analysis of Comparative Genomic Hybridization. *Cytometry* 19: 27 – 41

Eggermont AM (2001): The role interferon-alpha in malignant melanoma remains to be defined. *Eur J Cancer* 37: 2147-2153

Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D (1998): Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 14863 – 14868

Freier K, Flechtenmacher C, Walch A, Ohl S, Devens F, Burke B, Hassfeld S, Lichter P, Joos S, Hofele C (2005): Copy number gains on 22q13 in adenoid cystic carcinoma of the salivary gland revealed by comparative genomic hybridization and tissue microarray analysis. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 159: 89-95

Etienne-Manneville S und Hall A (2002): Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420: 629-635

Fife KM, Colman MH, Stevens GN, Firth IC, Moon D, Shannon KF, Harman R, Petersen-Schaefer K, Zacest AC, Besser M, Milton GW, McCarthy WH, Thompson JF (2004): Determinants of outcome in melanoma patients with cerebral metastases. *J Clin Oncol* 22: 1293-1300

Fountain JW, Bale SJ, Housman DE, Dracopoli NC (1990): Genetics of melanoma. *Cancer Surv.* 9: 645 – 671

Forozan F, Karhu R, Kononen J, Kallioniemi A, Kallioniemi O-P (1997): Genome screening by comparative genomic hybridization. *TIG* 13: 405 – 409

Francken AB, Shaw HM, Thompson JF, Soong SJ, Accortt NA, Azzola MF, Scolyer RA, Milton GW, McCarthy WH, Colman MH, McGovern VJ (2004): The prognostic importance of tumor mitotic rate confirmed in 1317 patients with primary cutaneous malignant melanoma and long follow-up. *Ann Surg Oncol* 11: 426-433

Gad D, Hoiland-Carlsen PF, Bartram P, CLEMMENSEN O AND BISCHOFF-MIKKELSEN M (2006): Staging Patients With Cutaneous Malignant Melanoma by Same-Day Lymphoscintigraphy and Sentinel Lymph Node Biopsy: A Single-Institutional Experience With Emphasis on Recurrence. *Journal of Surgical Oncology* 2006; 94:94–100

Gietema HA, Vuylsteke RJ, de Jonge IA, van Leeuwen PA, Molenkamp BG, van der Sijp JR, Meijer S, van Diest PJ (2004): Sentinel lymph node investigation in melanoma: detailed analysis of the yield from step sectioning and immunohistochemistry. *J Clin Pathol* 57: 618 – 620

Gilchrest BA, Eller MS und Yaar M (1999): The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. *N. Engl. J. Med.* 340: 1341-1348

- Giuliano AE, Cochran AJ, Morton DL (1982): Melanoma from unknown primary site and amelanotic melanoma. *Semin Oncol* 9: 442-447
- Gogel BM, Kuhn JA, Ferry KM, Fisher TL, Preskitt JT, O'Brien JC, leiberman ZH, Stephens JS, Krag DN (1998): Sentinal lymph node biopsy for melanoma. *Am J Surg* 176: 544 – 547
- Guldberg P, thor Straten P, Birck A, Ahrenkiel V, Kirkin A, Zeuthen J (1997): Disruption of the MMAC1/PTEN gene by deletion or mutation is a frequent in malignant melanoma. *Cancer Res.* 57: 3660 – 3663
- Gussow D, Rein R, Ginjaar I, Hochstenbach F, Seemann G, Kottman A, Ploegh HL (1987): The human beta 2-microglobulin gene. Primary structure and definition of the transcriptional unit. *J Immunol* 139: 3132-3138
- Haigh PI, DiFronzo LA, McCready DR (2003): Optimal excision margins for primari cutaneous melanoma: a systematic review and metaanalysis. *Can J Surg* 46: 419-426
- Halaban R, Cheng E, Smicun Y, Germino J (2000): Deregulated e2f transcriptional activity in autonomously growing melanoma cells. *J Exp Med* 191: 1005-1016
- Harpole DH Jr., Johnson CM, Wolfe WG, George SL, Seiger HF (1992): Analysis of 945 cases of pulmonary metastatic melanoma. *J Thorac Cardiovasc Surg* 103: 743-748
- Healy E, Flannagan N, Ray A, Todd C, Jackson IJ, Matthews JN, Birch-Machin MA, Rees JL (2000): Melanocortin-1-receptor gene and sun sensivity in individuals without red hair. *Lancet* 355: 765 – 773
- Healy E, Belgaid CE, Takata M, Vahlquist A, Rehman I, Rigby H, Rees JL (1996) Allelotypes of primary cutaneous melanoma and benign melanocytic nevi. *Cancer Res* 56:589–593
- Hicklin DJ, Wang Z, Arienti F, Rivoltini L, Parmiani G, Ferrone S (1998): Beta2-Microglobulin mutations, HLA class I antigen loss, and tumor progression in melanoma. *J Clin Invest* 101: 2720-2729
- Houghton AN, Polsky D (2002): Focus on melanoma. *Cancer Cell* 2: 275 - 278
- Hosch S, Kraus J, Scheunemann P, Izbicki JR, Schneider C, Schumacher U, Witter K, Speicher MR, Pantel K (2000): Malignant Potential and Cytogenetic Characteristics of Occult Disseminated Tumor Cells in Esophageal Cancer. *Cancer Research* 60: 6836-6840
- Hsu MY, Meier F und Herlyn M (2002): Melanoma development and progression: a conspiracy between tumor and host. *Differentiation* 70: 522-536
- Humbert PO, Verona A, Trimarchi JM, Rogers C, Dandapani S, Lees JA (2000): E2f3 is critical for normal cellular proliferation. *Genes Dev.* 14: 690-703

Hussassian CJ, Stuewing JP, Goldstein AM, Higgins PA, Ally DS, Sheahan MD, Clark WH Jr, Tucker MA, Dracopoli NC (1994): Germline p16 mutations in familial melanoma. *Nature Genetic.* 8: 15 – 21

Hussein MR (2004): The TP53 tumor suppressor gene and melanoma tumorigenesis: Is there a relationship? *Tumor Biol* 25: 200-207

Jin S, Levine AJ (2001): The p53 functional circuit. *J Cell Sci* 114: 4139-4140

Jackson and Loeb (1999): The mutation rate and cancer. *Genetics* 148: 1483

Ka VSK, Thompson JF, McKinnon JG, Scolyer RA, Li LX-L, Uren RF (2004): Outcome in 846 cutaneous melanoma patients from a single center after negative sentinel node biopsy. *Ann Surg Oncol* 11: S60

Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D (1992): Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258: 818 – 821

Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Piper J, Tanner M, Stokke T, Chen L, Smith HS, Pinkel D, Gray JW, Waldman FM (1994): Detection and mapping of amplified DNA sequences in breast cancer by comparative genomic hybridization. *Proc Natl Acad USA* 95: 2156-2160

Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavtigian SV, Stockert E, Day RS 3<sup>rd</sup>, Johnson BE, Skolnick MH (1994): A cell cycle regulator potentially involved in the genesis of many tumor types. *Science* 264: 436 – 440

Kamb A, Shattuck-Eidens D, Eeles R, Liu Q, Gruis NA, Ding W, Hussey C, Tram T, Miki Y, Weaver-Feldhaus J, McClure M, Aitken JF, Anderson DE, Bergman W, Frants R, Goldgar DE, Green A, MacLennan R, Martin NG, Meyer LJ, Youl P, Zone JJ, Skolnick MH, Cannon-Albright LA (1994): Analysis of the p16 gene (CDKN2) as a candidate for the chromosome 9p melanoma susceptibility locus. *Nature Genet.* 8: 23 – 26

Kamijo T, Weber JD, Zambetti G, Zindy F, Roussel MF, Sherr CJ (1998): Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 8292 – 8297

Kirikoshi H, Katoh M (2002): Expression of WNT7A in human normal tissues and cancer, and regulation of WNT7A in human normal tissues and cancer, and regulation of WNT7A and WNT7B in human cancer. *Int. J. Oncol.* 21: 895-900

Klein CA (2000): The biology and analysis of single disseminated tumor cells. *Trends in Cell Biology* 10: 489 – 49

Klein CA (2004): Single cell amplification methods for the study of cancer and cellular ageing. *Mechanisms of Ageing and Development* 126: 147–151

Klein CA, Blankenstein TJF, Schmidt-Kittler O, Petronio M, Polzer B, Stoecklein NH, Riethmüller G (2002): Genetic heterogeneity of single disseminated tumour cells in minimal residual cancer. *The Lancet* 360: 683-689

- Klein CA, Schmidt-Kittler O, Schardt JA, Pantel K, Speicher MR, Riethmüller G (1999): Comparative genomic hybridization, loss of heterozygosity, and DNA sequence analysis of single cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 4494 – 4499
- Klein CA, Seidl S, Petat-Dutter K, Offner S, Geigl JB, Schmidt-Kittler O, Wendler N, Passlick B, Huber RM, Schlimok G, Baeuerle PA and Riethmüller G (2002): Combined transcriptome and genome analysis of single micrometastatic cells. *Nature Biotechnology* 20: 387 – 392
- Kraehn GM, Utikal J, Udart M, Greulich KM, Bezold G, Kaskel P, Leiter U and Peter RU (2001): Extra c-myc oncogene copies in high risk cutaneous malignant melanoma metastases. *Br J Cancer* 84: 72 – 79.
- Leiter U, Meier F, Schitteck B, Garbe C(2004): The natural course of cutaneous melanoma. *J Surg Oncol* 86(4): 172-8
- Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B (1998): Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396: 643-649
- Li G, Schaidler H, Satyamoorthy K, Hanakawa Y, Hashimoto K and Herlyn M (2001): Downregulation of E-catherin and Desmoglein-1 by autocrine hepatocyte growth factor during melanoma development. *Oncogene* 20: 8125 – 8135
- Loeb LA (1991): Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res.* 51: 3075-3079
- Marincola FM, Jaffee EM, Hicklin DJ and Ferrone S (2000): escape of human solid tumors from T-cell recognition. *Adv Immunol* 74: 181-273
- Marrett LD, Nguyen HL, Armstrong BK (2001): Trends in the incidence of cutaneous malignant melanoma in New South Wales. *Int. J. Cancer* 92: 457-462
- McGovern VJ, Shaw HM, Milton GW and McCarthy WH (1982): Ulceration and prognosis in cutaneous malignant melanoma. *Histopathology* 6: 399-407
- Mertens F, Johansson B, Hoglund M and Mitelman F (1997): Chromosomal imbalance maps of malignant solid tumors: a cytogenetic survey of 3185 neoplasms. *Cancer Res* 57: 2765 – 2780
- Miele ME, Jewett MD, Goldberg SF, Hyatt DL, Morelli C, Gualandi F, Rimessi P, Hicks DJ, Weissman BE, Barbanti-Brodano G, Welch DR (2000) A human melanoma metastasis suppressor locus maps to 6q16.3-q23. *Int J Cancer* 86:524–528
- Miller AJ und Mihm MC Jr. (2006): Melanoma. *N Engl J Med.* 355: 51-65
- Millikin D, Meese E, Vogelstein B, Witkowski C, Trent J (1991) Loss of heterozygosity for loci on the long arm of chromosome 6 in human malignant melanoma. *Cancer Res* 51: 5449–5453

Morton DL, Thompson JF, Essner R, Elashoff R, Stern SL, Nieweg OE, Roses DF, Karakousis CP, Mozzillo N, Reintgen D, Wang HJ, Glass EC and Cochran AJ (1999): Validation of the accuracy of intraoperative lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for early-stage melanoma: a multicenter trial. *Ann Surg* 230: 453-463

Namiki T, Yanagawa S, Izumo T, Ishikawa M, Tachibana M, Kawakami Y, Yokozeki H, Nishioka K, Kaneko Y (2005): Genomic alterations in primary cutaneous melanomas detected by metaphase comparative genomic hybridization with laser capture or manual microdissection: 6p gains may predict poor outcome. *Cancer Genet Cytogenet* 157: 1-11

Natali PG, Nicotra MR, Di Renzo MF, Prat M, Bigotti A, Cavaliere R, Comoglio PM (1993): Expression of the c-met/HGF receptor in human melanocytic neoplasms: demonstration of the relationship to malignant melanoma tumour progression. *Br. J. Cancer* 68: 746 – 750

NIH consensus conference (1992): Diagnosis and treatment of early melanoma. *JAMA* 268:1314-1319

Nobori T, Miura K, Wu DJ, Lois A, Takabayashi K, Carson DA (1994): Deletion of the cyclin-dependent-kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* 368: 753 – 756

Norris W (1820): A case of fungoid disease. *Edinburgh Medicine and Surgery* 16: 562-565

Omholt K, Platz A, Kanter L, Ringborg U und Hansson J (2003): NRAS and BRAF mutations arise early during melanoma pathogenesis and are preserved throughout tumor progression. *Clinical Cancer Research* 9: 6483 – 6488

Pantel K, Schlimok G, Angstwurm M, Weckermann D, Schmaus W, Gath H, Passlick B, Izbicki JR and Riethmuller G (1994). Methodological analysis of immunocytochemical screening for disseminated epithelial tumor cells in bone marrow. *J Hematother* 3: 165-73

Peyssonnaud C und Eychene A (2001): The Raf/MEK/ERK pathway: new concepts of activation. *Biol. Cell* 93: 53 – 62

Pham K, Milovanovic T, Barr RJ, Truong T, Holcombe RF (2003): Wnt ligand expression in malignant melanoma: pilot study indicating correlation with histopathologic features. *Mol Pathol* 56: 280-285

Pomerantz J, Schreiber-agus N, Liegeois NJ, Silverman A, Alland L, Chin L, Potes J, Chen K, Orlow I, Lee HW, Cordon-Cardo C, De-Pinho RA (1998): The INK4a tumor suppressor gene product p19Arf, interacts with MDM2, and neutralizes of MDM2's inhibition of p53. *Cell* 92: 713 – 723

Probst DM, Zhao J, Saremaslani P, Baer A, Komminoth P, Heitz PU (2001): Spitzoid malignant melanoma with lymph node metastasis. *Virchows Arch* 439: 823-826

Quelle DE, Zindy F, Ashmun RA und Sherr CJ (1995): Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell* 83: 993–1000

- Reintgen DS, Cox C, Slingluff CL, Jr., et al.(1992): Recurrent malignant melanoma: The identification of prognostic factors to predict survival. *Ann Plast Surg*; 28:45–49
- Richards, B., H. Zhang, G. Phear and M. Meuth, (1997): Conditional mutator phenotypes in hMSH2 deficient tumor cell lines. *Science* 277(5331):1523-1526
- Rivedal E, Opsahl H (2001): Role of PKC and MAP kinase in EGF- and TPA- induced connexin43 phosphorylation and inhibition of gap junction intercellular communication in rat liver epithelial cells. *Carcinogenesis* 22: 1543-1550
- Roberts AA, Cochran AJ: Pathologic analysis of sentinel lymph nodes in melanoma patients: Current and future trends. *J Surg Oncol* 2004; 85:152–161.
- Rosenberg SA (2001): Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature* 411: 380-384
- Santos GC, Zielenska M, Prasad M, Squire J A (2007): Chromosome 6p amplification and cancer progression. *J. Clin. Pathol.* 60:1-7
- Sauter ER, Herlyn M (1998): Molecular biology of human melanoma development and progression. *Mol Carcinog* 23:132–143
- Schmidt-Kittler O, Ragg T, Daskalakis A, Granzow M, Ahr A, Blankenstein TJ, Kaufmann M, Diebold J, Alnholdt H, Muller P, Bischoff J, Harich D, Schlimok G, Riethmuller G, Eils R, Klein CA (2003): From latent disseminated cells to overt metastasis: genetic analysis of systemic breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 7737-7742
- Schütze K, Lahr G, (1998): Identification of expressed genes by laser-mediated manipulation of single cells. *Nat Biotechnol* 16: 737 – 742
- Scolyer RA, McCarthy SW, Elder DE (2004): Frontiers in melanocytic pathology. *Pathology* 121(suppl): 3-32
- Serrano M, Hannon GJ, Beach D (1993): A new regulatory motif in cell-cycle control causes specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 366: 704 – 707
- Skobe M, Hamberg LM, Hawighorst T, et al.: Concurrent induction of lymphangiogenesis, angiogenesis, and macrophage recruitment by vascular endothelial growth factor-C in melanoma. *Am J Pathol* 2001;159:893–903
- Smith R, (1998): Melanocortin 1 receptor variants in an Irish population. *J. Invest. Dermatol.* 111: 119 – 122
- Speicher MR, du Manoir S, Schrock E, Holtgreve Grez H, Schoell B, Lengauer C, Cremer T, Ried T (1993): Molecular cytogenetic analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded solid tumors by comparative genomic hybridization after universal DNA-amplification. *Hum Mol Genet* 2: 1907 -1914
- Speicher MR, Jauch A, Walt H, du Manoir S, Ried T, Jochum W, Sulser T, Cremer T (1995): Correlation of microscopic phenotype with genotype in a formalin-fixed, paraffin-

embedded testicular germ cell tumor with universal DNA amplification, comparative genomic hybridization, and interphase cytogenetics. *Am J Pathol* 146: 1332 – 1340

Stambolic V, Suzuki A, de la Pompa JL, Brothers GM, Mirtsos C, Sasaki T, Ruland J, Penninger JM, Siderovski DP, Mak TW (1998): Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by tumor suppressor PTEN. *Cell* 95: 29 – 39

Starz H, Balada BR, Kramer KU, Buchels H, Wang H (2001): A micromorphometrybased concept for routine classification of sentinel lymph node metastases and its clinical relevance for patients with melanoma. *Cancer* 91: 2110 – 2121

Stoecklein NH, Erbersdobler A, Schmidt-Kittler O, Diebold J, Schardt JA, Izbicki JR, Klein C A (2002): SCOMP is superior to degenerated oligonucleotide primed-polymerase chain reaction. *Am J Pathol* 161: 43 – 51

Su YA, Bittner ML, Chen Y, Tao L, Zhang Y, Stephan D, Trent JM (2000): Identification of tumor-suppressor genes using human melanoma cell lines UACC903, UACC903(+6), and SRS3 by comparison of expression profiles. *Molecular Carcinogenesis* 28: 119-127

Thompson FH, Emerson J, Olson S, Weinstein R, Leavitt SA, Leong SP, Emerson S, Trent JM, Nelson MA, Salmon SE, et al. (1995) Cytogenetics of 158 patients with regional or disseminated melanoma. Subset analysis of near-diploid and simple karyotypes. *Cancer Genet Cytogenet* 83:93–104

Treszl A, Adany R, Rakosky Z, Kardos L, Begany A, Gilde K, Balazs M (2004): Extra copies of c-myc are more pronounced in nodular melanomas than in superficial spreading melanomas as revealed by fluorescence in situ hybridization. *Clinical Cytometry* 60B: 37 – 46

Tucker MA, Goldstein AM. (2003). Melanoma etiology: where are we? *Oncogene* 22: 3042–3052

Ulmer A, Schmidt-Kittler O, Fischer J, Ellwanger U, Rassner G, Riethmüller G, Fierlbeck G, Klein CA (2004): Immunomagnetic Enrichment, Genomic Characterization, and Prognostic Impact of Circulating Melanoma Cells. *Clinical Cancer Research* 10: 531 – 537

Ulmer A, Fischer JR, Schanz S, Sotlar K, Breuninger H, Dietz K, Fierlbeck G, Klein CA (2005): Detection of Melanoma Cells Displaying Multiple Genomic Changes in Histopathologically Negative Sentinel Lymph Nodes. *Clin Cancer Res* 11: 5427 – 5432

Van-Diest PJ (2003): Histopathological workup of sentinel lymph nodes: how much is enough? *J Clin Pathol* 52: 871 – 873

Van Dekken H, Rosenberg C, Krijtenburg PJ, Alers JC (1997): Interphase cytogenetics and comparative genomic hybridization of human epithelial cancers and precursor lesions. *Histochem Cell Biol* 108: 419–430

Veltman JA, Fridlyand J, Pejavar P, Olshen AB, Korkola JE, De Vries S, Carrol P, Kuo WL, Pinkel D, Albertson D, Cordon-Cardo C, Jain AN, Waldman FM (2003): Array-based

comparative genomic hybridization for genome-wide screening of DNA copy number in bladder tumors. *Cancer Res* 63: 2872-2880

Wang X, Heller R, Van Voorhis N, Cruse CW, Glass F, Fenske N, Berman C, Leo-Messina J, Rappaport D, Wells K (1994). Detection of submicroscopic lymph node metastases with polymerase chain reaction in patients with malignant melanoma. *Ann Surg* 220: 768-774

Weiss MM, Hermsen MAJA, Meijer GA, van Grieken NCT, Baak JPA, Kuipers EJ, van Diest PJ (1999): Comparative genomic hybridisation. *Clin Pathol* 52: 243-251

Wittekind C, Tannapfel A (1996) Die Entstehung von Metastasen und ihre Klassifikation. *Strahlenther Onkol* 172: 287-294

Yamasaki H. (1990): Gap junctional intercellular communication and carcinogenesis. *Carcinogenesis* 11: 1051-1068

Yu LL, Flotte TJ, Tanabe KK, Gadd MA, Cosimi AB, Sober AJ, Mihm MC Jr, Duncan LM (1999): Detection of microscopic melanoma metastases in sentinel lymph nodes. *Cancer* 86: 617 - 627

## 8 Danksagungen

Ich möchte mich herzlich bei Prof. Dr. med. Christoph A. Klein für seine geduldige und freundschaftliche Betreuung meiner Dissertation bedanken. Insbesondere bin ich zu Dank verpflichtet für sein Engagement für die Finanzierung meiner Dissertation. Prof. Dr. Gert Riethmüller möchte ich mich für die Schaffung meiner Stelle an der Ludwig Maximilians Universität München bedanken.

Ich danke allen Patienten, die sich für den medizinischen Fortschritt zur Verfügung gestellt haben. Prof. Dr. Gerhard Fierlbeck möchte ich insbesondere erwähnen für die reibungslose Kooperation mit der Hautklinik der Universität Tübingen.

Besonders hervorheben möchte ich, dass Dr. med. Bernhard Polzer durch zahlreiche Korrekturen und Anregungen zu meiner Dissertation beigetragen hat. Für die wissenschaftliche Hilfestellung möchte ich mich herzlich bei Dr. med. Stefan Schanz, Dr. med. Stöcklein, Dr. Oleg Schmidt-Kittler und Dr. med. Christian Vay bedanken.

Die Arbeit wurde durch die großzügige Bereitstellung von Geldern durch Wilhelm Sander Stiftung ermöglicht.

Frau Ursel Schiebel möchte ich für die Färbung der disseminierten Tumorzellen erwähnen. Bei Frau Elke Burghart möchte ich mich bedanken für die Unterweisung in die Technik der Mikrodissektion von Primärtumoren.

Herr Manfred Meyer hat mich freundlicherweise beim Anfertigen der Primärtumorschnitte angeleitet.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern, Frau Kamila Drzyzga und Dr. Stefan Seyfried für ihre moralische Unterstützung bedanken.

## 9 Lebenslauf

**Name** Murat Yildiz  
**Geburtstag** 23.05.1974  
**Geburtsort** Schweinfurt, Bayern  
**Familienstand** ledig

### Schulbildung

**1982-1985** Friedrich-Rückert-Volksschule Schweinfurt  
**1985-1988** Walther-Rathenau-Gymnasium Schweinfurt  
**1988-1995** Alexander-von-Humboldt-Gymnasium Schweinfurt  
Abschluß mit der allgemeinen Hochschulreife , Endnote 1,7

### Hochschulstudium

**05/96 – 06/03** Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg  
**03/00** Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung „gut“ (2,0)  
**03/02** Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung „gut“ (1,6)  
**05/03** Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung „gut“ (1,8)

### Beruflicher Werdegang

**12/03 - 09/04** Arzt im Praktikum im Institut für Immunologie der Ludwig-Maximilians-Universität München, Thema der Promotionsarbeit: Progression und Disseminierung von Melanom-Tumorzellen  
**10/04-12/05** Assistenzarzt on der Neurologischen Klinik der Universität zu Münster  
**Seit 01/06** Assistenzarzt in der Psychiatrischen Poliklinik des Universitätsspitals Basel