

Inaugural –Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

Identifizierung und Isolierung zirkulierender Melanomzellen  
aus Elutrafraktionen und aus Vollblut von humanen  
Melanompatienten

Anna Vogel

Nürnberg

München 2015

Aus dem Department für Veterinärwissenschaften der  
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

Lehrstuhl für Anatomie, Histologie und Embryologie

Arbeit angefertigt unter Leitung von  
Univ.-Prof. Dr. Dr. Dr. habil. Fred Sinowatz

Angefertigt an der Hautklinik des Universitätsklinikums Erlangen

Mentoren: Prof. Eckhart Kämpgen, Dr. Stefanie Gross



Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan:

Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter:

Univ.-Prof. Dr. Dr. Dr. habil. Fred Sinowatz

Korreferent: Priv. Doz. Dr. Petra Kölle

Tag der Promotion: 31.01.2015

Solange Menschen denken, dass Tiere nicht fühlen, müssen Tiere fühlen,  
dass Menschen nicht denken.

(unbekannt)

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>2</b>
<b>1.</b>	<b>Inzidenz.....</b>	<b>2</b>
1.1.	Humanmedizin .....	2
1.2.	Tiermedizin .....	3
<b>2.</b>	<b>Ursachen der Entstehung und Prädispositionen.....</b>	<b>4</b>
2.1.	Haut- und Fellfarbe und familiäre Häufung .....	4
2.2.	UV-Belastung.....	5
2.3.	Immunsystem.....	5
<b>3.</b>	<b>Klinik .....</b>	<b>5</b>
3.1.	Humanmedizin .....	5
3.2.	Tiermedizin .....	7
<b>4.</b>	<b>Diagnose, Prognose und Staging.....</b>	<b>8</b>
4.1.	Diagnose, prognostische Faktoren und Staging in der Humanmedizin .....	8
4.2.	Diagnose, prognostische Faktoren und Staging in der Tiermedizin	10
<b>5.</b>	<b>Therapieformen.....</b>	<b>11</b>
5.1.	Humanmedizin .....	11
5.2.	Tiermedizin .....	13
<b>6.</b>	<b>Charakterisierung und Identifizierung von Melanomzellen.....</b>	<b>15</b>
6.1.	Melanomtypische Marker .....	15
6.2.	Zelladhäsion.....	19
6.3.	Chemoresistenz: ABCG2 .....	22
6.4.	T-Zell-Erkennung: HLA-ABC und HLA-DR.....	23
6.5.	Negativkontrolle: CD45 .....	24
<b>7.</b>	<b>Tumorentstehung und Metastasierung – die Rolle von Krebsstammzellen .....</b>	<b>24</b>
7.1.	Krebsstammzellen.....	25
7.2.	Die metastatische Kaskade.....	27
7.3.	Die Keimruhe („Dormancy“) .....	29

7.4.	Möglichkeiten zur Identifizierung von Krebsstammzellen.....	30
7.5.	Identifizierung von Melanomstammzellen .....	31
<b>8.</b>	<b>Chemosensitivität .....</b>	<b>35</b>
<b>9.</b>	<b>Wichtige Signalwege im malignen Melanom .....</b>	<b>36</b>
9.1.	Die MAPK-Signalkaskade (MAPK= Mitogen activated protein kinase) .....	37
9.2.	Die PI3K/Akt-Signalkaskade .....	38
9.3.	Die mTor-Signalkaskade.....	38
9.4.	Hemmung der Signalwege durch Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) .	39
9.5.	TKIs in der Veterinärmedizin .....	41
9.6.	Andere Medikamente in den Chemosensitivitätstests.....	42
<b>10.</b>	<b>Fragestellung .....</b>	<b>44</b>
<b>III.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>45</b>
<b>1.</b>	<b>Material .....</b>	<b>45</b>
1.1.	Puffer und Lösungen.....	45
1.2.	Verbrauchsmaterialien .....	46
1.3.	Geräte .....	46
1.4.	Antikörper und Kits für die Charakterisierung und Identifizierung von Melanomzellen .....	47
1.5.	Medikamente und Kits für die Chemosensitivitätstestung von Melanomzellen aus der Zellkultur .....	52
<b>2.</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>53</b>
2.1.	Blutentnahme .....	53
2.2.	PBMC-Gewinnung mittels Dichtegradientenzentrifugation .....	54
2.3.	Leukapherese .....	55
2.4.	Durchflusszytometrie.....	55
2.5.	Sortierung von Zellen .....	58
2.6.	Melanomzellkultur .....	61
2.7.	Herstellung von konditioniertem Tumorstammzellenmedium .....	62
2.8.	Charakterisierung von Melanomzellen aus der Zellkultur.....	63
2.9.	Detektion und Anreicherung von Melanomzellen aus Vollblut: Spiking-Experimente .....	64
2.10.	Analyse der Melanomzellen hinsichtlich Stammzellen-ähnlicher	

	Charakteristika .....	67
2.11.	Sortierung zirkulierender Melanomzellen aus Blut von Melanompatienten.....	70
2.12.	Chemosensitivitätstestung von Melanomzellen aus der Zellkultur .....	73
2.13.	Übersichtsdarstellungen.....	76
<b>IV.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>78</b>
<b>1.</b>	<b>Charakterisierung von Melanomzelllinien .....</b>	<b>78</b>
1.1.	Charakterisierung von Melanomzelllinien mittels verschiedener Oberflächen- und intrazellulären Marker .....	80
1.2.	Zelladhäsionsmarker .....	83
1.3.	Stammzellenmarker .....	93
1.4.	Charakterisierung von Melanomzelllinien mittels ALDH- und Hoechst-Färbung .....	104
<b>2.</b>	<b>Identifizierung und Sortierung von zirkulierenden Melanomzellen.....</b>	<b>113</b>
2.1.	Spiking: Detektion von Melanomzellen aus PBMCs .....	113
2.2.	Anreicherungsverfahren.....	116
2.3.	Vorversuch: Tumorzellsorts auf Blut .....	118
2.4.	Isolierung von Melanomzellen aus Patientenmaterial .....	119
2.5.	Kultivierung .....	123
<b>3.</b>	<b>Chemosensitivitätstests .....</b>	<b>125</b>
3.1.	Überleben .....	128
3.2.	Proliferation.....	130
3.3.	Mitochondrienaktivität .....	131
3.4.	Glukoseaufnahmefähigkeit.....	133
<b>V.</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>136</b>
<b>1.</b>	<b>Komparative Onkologie.....</b>	<b>136</b>
<b>2.</b>	<b>Charakterisierung von Melanomzellen.....</b>	<b>137</b>
2.1.	Charakterisierung mit melanomspezifischen Markern, Adhäsionsmolekülen und T-Zell-Erkennungsmolekülen .....	138
2.2.	Charakterisierung mit Stammzellmarkern .....	142
2.3.	Funktionelle Assays zur Detektion einer stammzellähnlichen	

	Subpopulation .....	146
<b>3.</b>	<b>Zirkulierende Melanomzellen .....</b>	<b>148</b>
3.1.	Identifizierung und Isolierung .....	148
3.2.	Kultivierung .....	150
3.3.	Zirkulierende Tumorzellen in anderen Krebsarten .....	151
3.4.	Prognostische Relevanz zirkulierender Tumorzellen .....	151
<b>4.</b>	<b>Chemosensitivität .....</b>	<b>153</b>
4.1.	Langzeitassay: Überleben und Proliferation.....	155
4.2.	Kurzzeitassay: Überleben, Mitochondrienaktivität, Glukoseaufnahmefähigkeit.....	156
4.3.	Zusammenfassung der Chemosensitivitätstest-Resultate .....	157
<b>5.</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>158</b>
5.1.	Zirkulierende Melanomzellen .....	158
5.2.	Therapie des malignen Melanoms .....	158
5.3.	Kooperation mit Advalytix: Einzelzellsortierung und Charakterisierung auf Einzelzelebene.....	159
<b>VI.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>162</b>
<b>VII.</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>164</b>
<b>VIII.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>166</b>
<b>IX.</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>181</b>
<b>X.</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>1855</b>

---

Abkürzungsverzeichnis

AJCC	American Joint Committee on Cancer
ALDH	Aldehyd-Dehydrogenase
APC	Antigen-präsentierende Zelle, von engl. antigen-presenting Cell
ATP	Adenosintriphosphat
bzw	beziehungsweise
BSA	Bovines Serum Albumin
°C	Grad Celcius
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMA	European Medicines Agency
EZM	extrazelluläre Matrix
FDA	Food and Drug Administration, USA
FSC	Forward Scatter
HLA	Humanes Leukozytenantigen-System
HS	Humanserum
IL	Interleukin
KOF	Körperoberfläche
MM	malignes Melanom
MFI	Mean Fluorescence Intensity = mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	engl. Major Histocompatibility complex, Haupthistokompatibilitätskomplex
MZ	Melanomzellen
o.ä.	oder ähnliches

ORR	overall response rate = die Gesamt-Ansprechrte
PBS	phosphate buffered saline
PBS-EDTA	PBS mit 0,2% EDTA
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	Platelet derived growth factor
RTK	Rezeptortyrosinkinase
RT-PCR	reverse Transkriptase-Polymerase Chain Reaction
SSC	Side Scatter
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor
TNF	Tumornekrosefaktor
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WHO	World Health Organisation
ZMZ	zirkulierende Melanomzelle
ZTZ	zirkulierende Tumorzelle

### Anglizismen

Beads	Partikel im Mikrometerbereich, die in Suspension vorliegen und kommerziell mit verschiedenen Eigenschaften (z.B. Beschichtung mit Antikörpern zur Anreicherung von Zellen) erhältlich sind
Crosstalk	Zusammenwirken verschiedener Signalwege, Kommunikation mehrerer Moleküle untereinander
Dot Plot	Darstellungsform der am FACS gemessen Daten
Dupletten	Aggregate von Zellen, die wenn möglich durch Gaten ausgeschlossen werden
Gate/Gating	Auswahl/Bestimmung einer Region im DotPlot zur weiteren Einzeldarstellung und Analyse



Kit	kommerziell erhältliches Paket, dass mehrere Reagenzien für eine bestimmte Versuchsanordnung enthält
Multi Drug Resistance	multiple Zytostatikaresistenz
Overlay	Darstellungsform der am FACS gemessenen Daten, bei dem mehrere Histogramme zum Vergleich übereinander gelegt werden
Side Population	Bezeichnung einer geringen Anzahl von Zellen, die eine bestimmte Eigenschaft besitzen und sich dadurch als kleine Randpopulation darstellen
Sort	Vorgang der Zellsortierung
Staging	Einteilung einer Erkrankung anhand bestimmter Parameter in verschiedene Stadien
Target	Ziel, Zielstruktur

### SI Einheiten

µm Mikrometer

m<sup>2</sup> Quadratmeter

sec Sekunden

min Minuten

h Stunden

g Gramm

mg Milligramm

µg Mikrogramm

M Molar

mM Millimolar

µM Mikromolar

nM Nanomolar

l Liter

ml Milliliter

μl Mikroliter

mW Milliwatt

## **I. EINLEITUNG**

### **Das maligne Melanom**

Das maligne Melanom (im Folgenden mit MM abgekürzt) ist ein von entarteten Melanozyten ausgehender Tumor. Es wird im Volksmund auch „schwarzer Hautkrebs“ genannt – sowohl in der Human- wie auch der Tiermedizin. Das MM tritt zumeist an der Haut auf, kann sich aber auch am Auge (Konjunktiva und Uvea) sowie an Hirn- und Schleimhäuten bilden. Bei Hunden kommt es am häufigsten in der Maulhöhle sowie an den Zehen vor. Zum größten Teil sind Melanome dunkel pigmentiert, aber auch amelanotische Formen sind möglich. Das MM wächst anfangs unauffällig, metastasiert jedoch bereits sehr frühzeitig. Nach wie vor gestaltet sich die Behandlung von Melanompatienten für Human- sowie Tiermediziner schwierig.

Obwohl die vorliegende Arbeit die Charakterisierung und Isolierung von Zellen des humanen malignen Melanoms beschreibt, wird auch auf das maligne Melanom der Tiere, v.a. des Hundes, eingegangen. Bei der Erforschung neuer Behandlungsmöglichkeiten können sich beide Disziplinen unterstützen und voneinander profitieren. Tierbesitzer sind immer mehr dazu bereit, ein tumoröses Geschehen detailliert aufklären zu lassen und alle Behandlungsstrategien in Erwägung zu ziehen. Daher sind humanmedizinische Therapieansätze auch in der Tiermedizin vertreten und von zunehmender Bedeutung. Umgekehrt kann auch die Tiermedizin neue Formen der MM-Therapie bieten, die ebenso für die Humanmedizin vielversprechend sind. Klinische Studien sind in der Tiermedizin aufgrund der im Vergleich nicht so strengen Vorschriften eher durchführbar. Dagegen ist es oftmals schwer, ausreichend hohe Fallzahlen zu bekommen. Die Humanmedizin wiederum hat mehr Forschungsgelder zur Verfügung, und es können höhere Patientenzahlen erreicht werden.

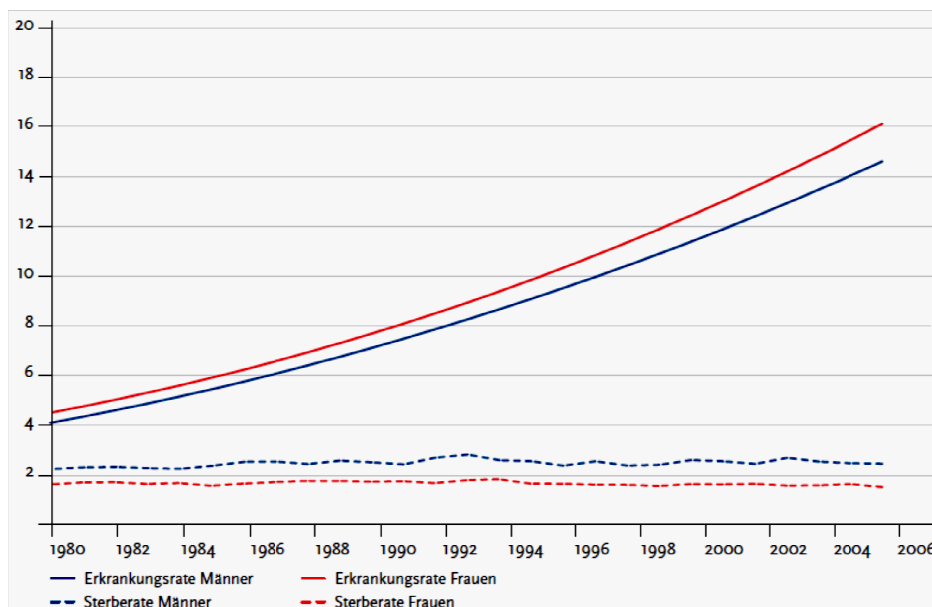
## II. LITERATURÜBERSICHT

### 1. Inzidenz

#### 1.1. Humanmedizin

In der Humanmedizin ist das MM für circa 90% aller durch Hautkrebs und für etwa 1% aller durch Krebs im Allgemeinen verursachten Todesfälle verantwortlich. Weltweit nimmt die Inzidenz zu, wobei die Mortalitätsrate stabil bleibt<sup>1</sup>. Wie in Abb. II.1 für Deutschland dargestellt, hat sich die Rate der Neuerkrankungen fast vervierfacht, wohingegen die Sterberate gleichbleibend ist. In Mitteleuropa gibt es jährlich pro 100 000 Einwohner 10-12 Neuerkrankungen<sup>1</sup>. Diese Zahlen sowie die nachfolgende Darstellung zur Inzidenz und der Mortalität stammen aus den Krebsregisterdaten des Robert-Koch-Instituts; sie wurden in der Publikation "Krebs in Deutschland 2005/06. Häufigkeiten und Trends" vorgestellt<sup>2</sup>.

Abb. II.1 Altersstandardisierte Neuerkrankungs- und Sterberaten in Deutschland, 1980 – 2006 ; Fälle pro 100 000 (Europastandard)



Besonders häufig betroffen sind Menschen in ihrer zweiten Lebenshälfte: bei Frauen liegt das durchschnittliche Erkrankungsalter bei 58 Jahren, bei Männern liegt es bei 64 Jahren<sup>2</sup>. Bei Bevölkerungsgruppen mit ohnehin starker Pigmentierung (Afrikaner, Asiaten) ist eine Erkrankung am malignen

Melanom selten und tritt fast ausschließlich im Bereich der Schleimhäute oder an den Fußsohlen auf<sup>3</sup>.

## 1.2. Tiermedizin

Die Veterinärmedizin kennt das MM bei vielen Tierarten, es unterscheidet sich aber in der Häufigkeit: Hunde, Pferde und verschiedene Schweinerassen sind häufiger betroffen. Bei Katzen, Rindern, Schafen und Ziegen ist es sehr selten. Wie das humane MM zeigt das Melanom bei den Tieren ebenfalls ein hohes Potential dafür, invasiv ins umliegende Gewebe vorzudringen sowie frühzeitig aggressiv zu metastasieren<sup>4</sup>.

### 1.2.1. Hunde und Katzen:

Bei Hunden macht das MM ca 2-7% aller Hauttumoren aus<sup>5</sup>. Es tritt vor allem in der Maulhöhle auf, seltener auch an der Haut und an den Zehen. In den meisten Fällen sind Tiere, die älter als 9 Jahre sind, betroffen. Nach ersten Erhebungen sind männliche Individuen häufiger betroffen als weibliche. Bei einigen Rassen treten Melanome, eventuell durch eine genetische Prädisposition, vergleichsweise gehäuft auf<sup>6</sup>:

- Melanome der Zehen und der Haut: Terrier (Boston, Scottish, Irish), Cocker Spaniel, Boxer, Chihuahua, Dobermann Pinscher
- Melanome der Maulhöhle: Golden Retriever, Scottish Terrier, Dachshund, Pudel



Abb. II.2 Orales MM beim Hund (Coyle et al, 2009)<sup>4</sup>

MM bei einem Hund am Zahnfleisch, ausgehend von der bukkalen Mukosa. Auch die kaudale Mandibula ist mit betroffen.

Bei Katzen wird das MM seltener beobachtet als bei Hunden. Es tritt ebenfalls bevorzugt in der Maulhöhle auf. Von dort ausgehend befällt es in der Folge häufig die Kieferknochen, auch Metastasierung in die Lymphknoten und die Lunge sind möglich<sup>4</sup>. Bei Katzen sind anscheinend ausschließlich alte Tiere betroffen<sup>5</sup>.

### 1.2.2. Pferde

Meistens sind Tiere mit heller (weiß, grau) Fellfärbung und älter als 15 Jahre betroffen. Die Melanome treten bevorzugt in der Analregion, der Leistenregion und im Nacken im Bereich der Ohrspeicheldrüsen auf<sup>7</sup>. Johnson et al geben bei Pferden für das MM eine Prävalenz von 4-15% an<sup>8</sup>. Damit gehört das MM auch bei Pferden zu den häufigeren Hauttumoren. Zu den genetisch prädisponierten Rassen gehören offensichtlich Quarter Horses und Araber.

## 2. Ursachen der Entstehung und Prädispositionen

Eine Vielzahl exogener und endogener Faktoren können die Entstehung des malignen Melanoms beeinflussen<sup>1</sup>. Bemerkenswert ist hierbei die Tatsache, dass jeder der im Folgenden genannten Faktoren das individuelle Risiko am MM zu erkranken nur leicht erhöht.

### 2.1. Haut- und Fellfarbe und familiäre Häufung

Besonders anfällig sind Menschen, die viele Muttermale (Nävi) tragen oder einen hellen Hauttyp haben. Diese Nävi können sich zu Melanomvorläufern, sog. dysplastischen Nävi, entwickeln. Durch polygene Erbfaktoren kann auch eine familiäre Häufung und somit eine erbliche Vorbelastung auftreten. Dies ist bei 5-10% aller Melanompatienten der Fall<sup>9</sup>.

In der Veterinärmedizin wird ebenfalls eine familiäre Veranlagung vermutet<sup>7</sup>. Die genetische Prädisposition gilt in der Tiermedizin als größter Faktor, der zur Entstehung eines MM führt<sup>7,8</sup>. Auch bei Tieren, vor allem bei Pferden, sind vorwiegend solche mit hellem Fell betroffen. Die Entstehungsursache ist unbekannt, aber es wird eine Reihe von Schlüsselmutationen vermutet, die vor allem in hellen Tieren auftreten. Diese Faktoren werden diskutiert, es gibt jedoch keine wissenschaftlichen Anhaltspunkte für die Relevanz von Fellfarbe und Mutationen bei der Entstehung eines MM. Am Center for Comparative Oncology des Virginia-Maryland College of Veterinary Medicine sind mehrere Forschungsprojekte zum equinen Melanom eingeleitet worden<sup>7</sup>, darunter: eine Analyse von Rasse- und Familienmerkmalen sowie eine Genomanalyse von grauen Pferden im Vergleich zu anderen Farben; eine Computeranalyse von Serumproben

gesunder und von am Melanom erkrankter Pferde, um eventuelle Markermoleküle aufzuspüren; eine Bewertung verschiedener chirurgischer Vorgehensweisen um das Tumorigen zu verringern sowie die Entwicklung neuer Therapien.

## 2.2. UV-Belastung

Neben dem erblichen Faktor wird beim Menschen der UV-Belastung eine große Rolle bei der Entstehung des MM zugeschrieben. Melanome treten vor allem an Hautpartien auf, die oft der Sonne ausgesetzt sind. Dabei ist eine akute und intensive Sonnenbestrahlung, z.B. während des Urlaubs, gefährlicher als eine ständige, langandauernde Sonnenbestrahlung. Besonders Sonnenbrände im Kindesalter können sich nachteilig auswirken. Wiecke et al fanden eine Korrelation zwischen der Entstehung von Melanomen und der UV-Exposition<sup>1,10,11,12</sup>.

Die UV-Strahlung wird bei Tieren, anders als in der Humanmedizin, nicht als ein auslösendes Agens für das MM angesehen<sup>6</sup>. Es wird aber vermutet, dass eine Schädigung der Haut durch konstante Stressfaktoren wie z.B. exzessives Kratzen oder Belecken oder wiederholte Traumata zur Entstehung eines MM führen können<sup>6</sup>.

## 2.3. Immunsystem

Beim Menschen ist bekannt, dass das Immunsystem den Schweregrad und den Krankheitsverlauf des MM beeinflusst. Spontanremissionen zeigen z.B. dass das Immunsystem eine zentrale Rolle in der Tumorbekämpfung spielt. Ebenso zeigen besonders aggressive Verläufe bei immunsupprimierten Patienten, dass das Immunsystem auch hinsichtlich der Tumorigen eine Rolle spielt<sup>1</sup>.

## 3. Klinik

### 3.1. Humanmedizin

Das Melanom entwickelt sich häufig unauffällig. Es geht von der ursprünglichen Veränderung, dem dysplastischen Nävus, über in die

sogenannte radiale Wachstumsphase. Schleichend geschieht auch der Übergang in die vertikale Wachstumsphase, in der der Tumor die Basalschicht der Dermis durchbricht. Letztlich kommt es, ausgehend vom Primärtumor, zur Metastasierung in andere Körperregionen. Die Malignität steigt während dieser Entwicklung mit jeder Wachstumsphase an. In einigen Fällen können Juckreiz und/oder Blutungen an der betroffenen Stelle auftreten. Am leichtesten bemerkbar ist die optische Veränderung des betroffenen Nävus. Ein Anhaltspunkt hierfür ist die sog. ABCD – Regel<sup>1</sup> (A = Asymmetrie, B = Begrenzung, C = Colorierung, D = Durchmesser). Verändern sich die in der ABCD–Regel genannten Parameter, ist eine ärztliche Abklärung auf jeden Fall sinnvoll. Die Metastasierung kann sowohl hämatogen als auch lymphogen erfolgen. Am häufigsten ist der Metastasenbefall in den Lymphknoten, in Lunge, Leber, Knochen sowie im Gehirn. Es gibt aber auch Fallberichte über Metastasen im Pankreas. Eine Präferenz für ein bestimmtes Organ konnte noch nicht festgestellt werden. Eine Besonderheit ist der Fall des Uvea-Melanoms. Hier muss die Metastasierung auf hämatogenem Weg erfolgen, da das Auge keinen Anschluss an das lymphatische System hat. Metastasen des Uvea-Melanoms treten am häufigsten in der Leber auf<sup>1</sup>. In der Humanmedizin gibt es unterschiedliche Melanomformen, die sich klinisch und histologisch voneinander unterscheiden lassen. Mischformen, die sich nicht eindeutig zuordnen lassen, kommen selten vor. Sie machen circa 5% der Melanome aus. Zu diesen 5% gehört auch das schwer behandelbare Schleimhautmelanom. Folgende Melanomtypen kann man in der Humanmedizin klinisch und histologisch gut voneinander trennen<sup>1</sup>:

- superfiziell spreitendes Melanom (abgekürzt: SSM), 65-70% aller Melanome
- noduläres Melanom (NM), 20% aller Melanome
- akrolentiginöses Melanom (ALM), 10% aller Melanome
- Lentigo Maligna Melanom (LMM), 5% aller Melanome

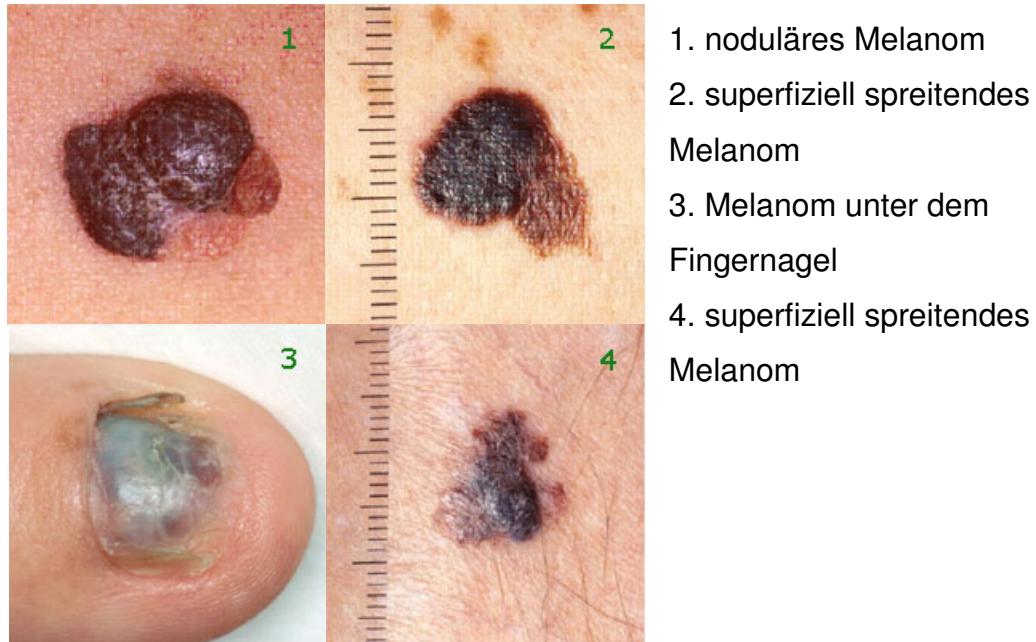
Außerdem unterscheidet man noch

- Schleimhautmelanom



➤ Uvea-/Aderhautmelanom

Abb. II.3 Beispiele für maligne Melanome des Menschen; Bildquelle: [http://www.krebsgesellschaft.de/pat\\_ka\\_hautkrebs\\_melanom,107801.html](http://www.krebsgesellschaft.de/pat_ka_hautkrebs_melanom,107801.html); 29.01.2012



### 3.2. Tiermedizin

Tierische Patienten werden meist erst in einem späten Stadium der Erkrankung in der tierärztlichen Praxis vorgestellt. In den meisten Fällen entdecken die Besitzer eine schwarze, erhabene, manchmal auch blutende Masse in der Maulhöhle des betroffenen Tieres. Das MM kann einhergehen mit vermehrtem Speicheln, Mundgeruch, Blutungen oder auch Schwierigkeiten bei der Futteraufnahme<sup>4,13</sup>. Beim MM der Zehe können Schwellungen der entsprechenden Zehe, der Verlust des entsprechenden Zehennagels oder auch eine Lahmheit der betroffenen Gliedmaße auftreten. Bei Pferden wächst das Melanom oft sehr langsam<sup>14</sup>. Dennoch treten besonders beim Pferd häufig Metastasen in Lunge und anderen inneren Organen auf, ohne dass der Primärtumor gefunden wird<sup>5</sup>. Auch bei Rindern, Schafen und Ziegen erfolgt die Metastasierung sehr schnell und frühzeitig. In der Veterinärmedizin werden histologisch sechs Wachstumsformen des malignen Melanoms unterschieden<sup>5</sup>:

- Dermalmelanom
- Spindelzellmelanom

- Klarzellmelanom
- In-Situ-Melanom
- Desmoplastisches Melanom
- Riesenzelliges Epitheloidmelanom

Die im Tierreich auftretenden Melanome entsprechen am ehesten dem humanen akrolentiginösen Melanom oder dem humanen Schleimhautmelanom.

#### 4. Diagnose, Prognose und Staging

##### 4.1. Diagnose, prognostische Faktoren und Staging in der Humanmedizin

In der Kurzleitlinie der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft (DDG) und der Deutschen Krebsgesellschaft (September 2007) sind die zur Diagnose „Malignes Melanom“ nötigen Untersuchungen aufgeführt<sup>10</sup>. Dazu gehört neben der klinischen Untersuchung die Auflichtmikroskopie, eine Sonografie des Abdomens sowie der regionären Lymphknoten, Exzisionsbiopsie, Histopathologie mit Angaben des Melanomtyps, der Tumordicke nach Breslow, dem Invasionslevel nach Clark und zur Ulzeration des Tumors, sowie eine Blutuntersuchung und Röntgenaufnahmen des Thorax<sup>10</sup>. Wie auch in der Tiermedizin erfolgt die Suche nach Metastasen mittels Bildgebung.

Es gibt mehrere Parameter, anhand derer eine prognostische Aussage getroffen werden kann. Die folgenden Parameter, die mittlerweile als etabliert und aussagekräftig angesehen werden, wurden in mehreren Studien untersucht<sup>15-17</sup>. Der Vollständigkeit halber wird hier auch noch der Clark-Level beschrieben, der zwar mittlerweile als Parameter an Bedeutung verliert, in der Klinik aber als prognostischer Faktor dennoch oft angewandt wird.

- *Vertikale Tumordicke nach Breslow:* die Tumordicke wird am histologischen Präparat beurteilt. Bei nicht ulzerierten Tumoren mit einer Dicke von < 1,0 mm beträgt die tumorspezifische 10-Jahres-Überlebensrate 88-95%, bei einer Tumordicke von > 4,0 mm ist diese bereits auf 52-54% reduziert.

- *Ulzeration*: sobald histologisch eine Ulzeration diagnostiziert werden kann, wird der Tumor ein Stadium höher als der nicht-ulzerierte Tumor mit gleicher Tumordicke klassifiziert. Dies wurde in der neuen AJCC-Klassifikation festgelegt<sup>18</sup>.
- *Invasivität*: Die Feststellung des Invasionslevels nach Clark<sup>19</sup>, besonders die Unterscheidung zwischen Level II/III und IV/V hat weitreichende Folgen: die Prognose verschlechtert sich mit dem Eindringen in die Subkutis dramatisch. Die unterschiedlichen Eindringtiefen des Melanoms sind wie folgt gegliedert:
  - Clark-Level I: Alle Tumorzellen befinden sich oberhalb der Basalmembran (entspricht einem Melanoma in situ)
  - Clark-Level II: Überschreitung der Basalmembran, Invasion in das Stratum papillare der Dermis.
  - Clark-Level III: Invasion bis an die Grenze des Stratum reticulare der Dermis.
  - Clark-Level IV: Invasion in das Stratum reticulare
  - Clark-Level V: Invasion in die Subkutis
- *Mikrometastasierung*: Diese wird mittels einer Wächterlymphknotenbiopsie der regionären Lymphknoten nachgewiesen.
- *Geschlecht*: Männer haben eine signifikant ungünstigere Prognose<sup>15</sup>.
- *Tumorlokalisierung*: Melanome am oberen Stamm, Oberarmen, Hals und an der behaarten Kopfhaut haben eine schlechtere Prognose<sup>20</sup>.

Das humane MM wird anhand bestimmter Parameter in unterschiedliche Krankheitsstadien eingeteilt. Die Leitlinien zur Stadieneinteilung, dem sog. Staging, werden regelmäßig vom American Joint Committee on Cancer (AJCC) aktualisiert. Die Beurteilung des Krankheitsstadiums erfolgt nach dem TNM-System. Dabei steht das T für die Klassifikation des Primärtumors (berücksichtigt werden dabei die Tumordicke, die Anzahl der Mitosen pro mm<sup>2</sup> sowie eine eventuell vorliegende Ulzeration des Tumors). N steht für die Klassifikation der Metastasierung in die regionalen Lymphknoten und M steht für die eventuell bereits erfolgte Fernmetastasierung<sup>1</sup>. Das MM wird in die Stadien 0, I A-B, II A-C, III A-C und IV eingeteilt. Abhängig von der Tumordicke, der Mitoserate und der Ulzeration erfolgt die Einteilung in die

Stadien 0, I und II. Hier liegen weder Metastasen in den regionären Lymphknoten noch Fernmetastasen vor. Im Stadium III kann eine Metastasierung in die regionären Lymphknoten nachgewiesen werden, im Stadium IV liegt eine Fernmetastasierung vor. Übersichten zu Staging und Stadieneinteilung befindet sich im Anhang.

#### 4.2. Diagnose, prognostische Faktoren und Staging in der Tiermedizin

In der Tiermedizin erfolgt eine Unterscheidung zwischen dem gutartigen Melanom, dem Melanozytom, und dem malignen Melanom. Eine Faustregel besagt, dass Melanozytome der behaarten Haut als gutartig behandelt werden, wohingegen mukokutane, okuläre und auch zentralnervöse Tumore melanozytären Ursprungs als bösartig gelten<sup>5</sup>. Die Diagnose muss auf jeden Fall durch eine Feinnadelaspiration von Tumormaterial oder eine Biopsieentnahme histologisch abgesichert werden<sup>4,13</sup>. Makroskopisch sind die gut- und die bösartige Form nicht voneinander unterscheidbar. Die histologisch voneinander abgrenzbaren Wachstumsformen (s. Kapitel 3.2) lassen keine prognostische Aussage zu.

Im Rahmen der Diagnosestellung werden wie in der Humanmedizin ein Tumorstaging sowie eine Blutuntersuchung angeraten<sup>4</sup>. Nach Vissiennon et al kann mithilfe des Mitoseindex (MI) die Überlebensrate von Hunden prognostiziert werden<sup>5,21</sup>. Da meist ältere Tiere betroffen sind, werden routinemäßig die Blutwerte sowie die Organfunktionen überprüft. Dies nimmt unter Umständen auch Einfluss auf die Entscheidung, wie bzw. ob das betroffene Tier behandelt wird. Um den Tumor und seine eventuell bereits erfolgte Ausbreitung beurteilen zu können, wird empfohlen, ein Lymphknotenpunktat für eine zytologische Untersuchung zu entnehmen<sup>4</sup>. Werden auch in den Lymphknoten maligne Zellen gefunden, verschlechtert sich die Prognose. Ein Röntgenbild des Thorax kann eventuelle Metastasen in der Lunge sichtbar machen. Bei 14% der vorgestellten Patienten sind bei der Erstdiagnose bereits Lungenmetastasen vorhanden<sup>4</sup>, was die Prognose drastisch verschlechtert. Die meisten Patienten sterben, auch nach einer kompletten lokalen Tumorentfernung, an den Metastasen. Nachdem auch in der Tiermedizin die moderne Bildgebung via Computertomografie und/oder Magnetresonanztomografie zunimmt, kann auch diese Form der

Untersuchung in Zukunft Teil des Routinestagings werden. Besonders beim amelanotischen MM kann es hilfreich sein, die Marker MelanA, Vimentin und S-100 immunhistochemisch untersuchen zu lassen, da diese eine Bestätigung der Diagnose MM liefern können<sup>4</sup>.

In der Veterinärmedizin orientiert man sich für das Staging am humanmedizinischen Schema. Die Stadieneinteilung ist für das canine orale MM wie folgt (Berman et al, 2008)<sup>22</sup>:

- Stadium I: Tumor mit < 2 cm Durchmesser, keine Metastasierung in die regionären Lymphknoten
- Stadium II: Tumor mit < 2-4 cm Durchmesser, keine Metastasierung in die regionären Lymphknoten
- Stadium III: Tumor mit > 4cm Durchmesser und/oder Metastasierung in die regionären Lymphknoten
- Stadium IV: Tumor jeglichen Durchmessers mit Fernmetastasen

Das Schema hat aber auch Defizite: Es sind keinerlei histologische Merkmale zur näheren Unterteilung berücksichtigt. Außerdem ist die Einteilung hinsichtlich der Größe des Hundes nicht standardisiert – ein 2 cm großer Tumor in einem Chihuahua ist nicht gleich einem 2 cm großen Tumor in einem Bernhardiner. Für nicht-orale MM orientiert man sich am TMN-Staging der WHO.

## 5. Therapieformen

Wird ein Melanom im frühen Stadium entdeckt, sind die Heilungschancen durch eine chirurgische Entfernung des kompletten Tumors am besten. Wird es in einem fortgeschrittenen Stadium festgestellt, fallen die Chancen auf Heilung rapide. Im Mensch und im Tier metastasiert das MM sehr frühzeitig, so dass häufig nicht der Primärtumor, sondern die Metastasen zum Tod führen.

### 5.1. Humanmedizin

Die chirurgische Entfernung des Melanoms ist wann immer möglich Mittel der Wahl. Ist eine chirurgische Entfernung des Melanoms nicht durchführbar, oder ist sie nicht sinnvoll, da bereits Fernmetastasen vorliegen oder es zum

wiederholten Male zum Ausbruch des MM kommt, kann zur alternativen oder auch zusätzlichen Behandlung Bestrahlung oder Chemotherapie eingesetzt werden<sup>1</sup>. In beiden Fällen wird versucht, die Tumore in ihrer Größe zu reduzieren und dadurch dem Patienten eine längere Überlebenszeit mit möglichst wenigen Beschwerden zu ermöglichen. Welche Form der Bestrahlung eingesetzt wird, wird individuell entschieden. Trotz intensiver Forschung konnte jahrzehntelang kein Fortschritt in der medikamentellen Therapie des MM erreicht werden. Als Standardtherapie hatte sich seit 1976 Dacarbazin (=DTIC) etabliert. Erst in der jüngeren Vergangenheit gab es Neuzulassungen mit verbesserten Ansprechraten. Weiterhin gängige Chemotherapeutika in der humanmedizinischen Melanomtherapie neben Dacarbazin sind Temozolomid, aber auch Taxol und Platinderivate. Im Zuge der Behandlung sind unterstützende Maßnahmen für den Patienten notwendig, da die Chemotherapie und besonders die Polychemotherapie aufgrund ihrer Toxizität immer mit Nebenwirkungen einhergehen. Die Chemotherapie wird häufig auch palliativ eingesetzt. Wie in der Tiermedizin auch, muss die Lebensqualität des Patienten so hoch wie möglich gehalten werden, insofern gilt es immer, die Behandlung kritisch zu hinterfragen. In den Leitlinien sind die gängigen Chemotherapieschemata aufgelistet<sup>1</sup>.

Ein besonderer Fall für die Therapie ist das Uvea-Melanom. Da hier die Metastasierung hämatogen erfolgen muss treten Metastasen zumeist als erstes in der Leber auf. Hierbei können lokoregionäre Therapieformen, wie z.B. eine intrahepatische Chemotherapie, in Betracht gezogen werden. Als adjuvante Therapieform steht eine Behandlung mit Interferon- $\alpha$  zur Verfügung<sup>1</sup>, die besonders bei Patienten mit hohem Metastasierungsrisiko angewandt wird. Mehrere Studien ergaben, dass sich die rezidivfreie Überlebenszeit signifikant verbessert<sup>1</sup>. Auch neuere zielgerichtete medikamentelle Therapieformen, z.B. Multi-Kinase-Inhibitoren wie Sorafenib und Sunitinib werden angewandt. Ein weiterer Erfolg für die Therapie des MM in der Humanmedizin ist die Entwicklung von Vemurafenib, einem Kinaseinhibitor, der selektiv eine in 50% der Melanome mutierte Kinase hemmt. Auch im Bereich der Immuntherapie und der Vakzinierung wird viel geforscht, z.B. mit einer dendritischen Zellvakzine, Peptidimmunisierung und adoptivem T-Zell-Transfer<sup>1</sup>. Eine erfolgreiche Entwicklung in der

Immuntherapie ist der monoklonale Antikörper Ipilimumab. Ipilimumab ist ein CTLA-4-Blocker. Es blockiert einen negativen Regulator der T-Zellen und verstärkt damit die autologe Immunantwort. In Sachen Tumorstudien ist die Tiermedizin der Humanmedizin einen Schritt voraus: Es gibt bereits eine zugelassene therapeutische Impfung für den Hund<sup>23</sup> (s.u.). Kombinationen der unterschiedlichen Therapieansätze können durchgeführt werden. Oftmals können diese Kombinationen besser die tumorassoziierten Beschwerden lindern, wenngleich eine verlängerte Überlebenszeit im Vergleich mit Monotherapien noch nicht nachgewiesen werden konnte<sup>1</sup>.

## 5.2. Tiermedizin

In der Tiermedizin werden Therapieformen, die die Lebensqualität des Tieres erheblich einschränken oder einen längeren Klinikaufenthalt nötig machen, vermieden. Dies setzt eine genaue Abklärung der Überlebenschancen und der Sinnhaftigkeit der einzelnen Therapieformen im Vorfeld voraus. Der behandelnde Tierarzt hat bei der Entscheidungsfindung eine beratende Funktion, denn letztendlich trifft immer der Tierbesitzer die Entscheidung, welche Therapieform gewählt wird und wie lange behandelt wird. Der Tierbesitzer kann am besten die noch bestehende Lebensqualität seines Tieres einschätzen.

Auch in der Veterinärmedizin gibt es mehrere therapeutische Möglichkeiten. Eine chirurgische Entfernung des Melanoms ist, genau wie in der Humanmedizin, auf jeden Fall das Mittel der Wahl. Wird das MM chirurgisch entfernt, sollte mit mindestens mit 1,5 cm, besser mit 2-3 cm Abstand im gesunden Gewebe entfernt werden<sup>5</sup>. Die durchschnittliche Überlebenszeit nach alleiniger chirurgischer Therapie beträgt 6-8 Monate, wobei Tiere mit größeren Tumoren (> 2 cm) oder Lymphknotenmetastasen unterhalb dieses Wertes liegen<sup>4</sup>. Besonders bei den häufig auftretenden Melanomen der Mundschleimhaut wird der Tumor in den meisten Fällen erst in einem späten Stadium entdeckt, da die Maulhöhle für den Tierbesitzer schlecht einzusehen ist. Dadurch sind oft sehr umfangreiche invasive chirurgische Maßnahmen erforderlich, manchmal müssen sogar Kieferresektionen durchgeführt werden. Wird ein fortgeschrittenes malignes Melanom an einer Gliedmaße diagnostiziert, wird eine Amputation angeraten<sup>5</sup>. Vor dem Ergreifen solch

umfangreicher chirurgischer Maßnahmen muss abgeklärt werden, ob es Hinweise auf eine bereits bestehende Metastasierung gibt (Röntgen des Thorax, Lymphknotenpunktat)<sup>4</sup>. Um die Überlebenszeit zu verlängern, kann gegebenenfalls über zusätzliche Maßnahmen wie Bestrahlung, Chemo- oder Immuntherapie nachgedacht werden, sofern dies im konkreten Fall sinnvoll ist. Eine Bestrahlung kann durchaus gute Erfolge bringen. Meistens wird ein Protokoll gewählt, bei dem das MM direkt stark mit ionisierender Strahlung bestrahlt wird. Hierdurch wird erreicht, dass der Tumor an Größe verliert. Nach chirurgischer Entfernung kann die Bestrahlung ein Rezidiv verzögern oder sogar ganz aufhalten<sup>4</sup>. Ist eine chirurgische Entfernung aufgrund der anatomischen Gegebenheiten nicht möglich, wird die Bestrahlung zum Mittel der Wahl.

Auch eine Chemotherapie kann in der Tiermedizin erwogen werden. Carboplatin wird sehr gut vertragen, es gibt aber noch keine aussagekräftigen Studien, ob sich eine Behandlung mit Carboplatin vorteilhaft auf das Überleben auswirkt. Eine Studie von Rassnick et al, in der Hunde mit 300-350mg/m<sup>2</sup> Carboplatin behandelt wurden, zeigte eine Ansprechrate von 28%, darunter eine Komplettremission und sechs partielle Remissionen<sup>24</sup>. Die Studie umfasste 25 Hunde, von denen 80% (=20 Hunde) bereits im Stadium III oder IV erkrankt waren. Murphey et al konnten zeigen, dass eine kombinierte Therapie mit Bestrahlung und Carboplatin gegenüber einer alleinigen Radiotherapie keine Vorteile hat<sup>25</sup>. Auch unterschiedliche Protokolle mit Cisplatin und Piroxikam, einem nicht-steroidalem Antiphlogistikum, wurden untersucht, werden aber derzeit nicht angeraten<sup>4</sup>. Eine chemotherapeutische Behandlung, die einen sicheren und nachweisbaren Erfolg bringt, gibt es in der Tiermedizin, ebenso wie in der Humanmedizin, nicht.

Bei der Behandlung von Hunden mit MM gibt es aber gute Erfolge mit verschiedenen Formen der Immuntherapie. In einer Studie über die Behandlung mit TNF $\alpha$  und humanem rekombinanten IL-2 konnten bei 5 von 13 behandelten Hunden (=38%) anti-Tumor Effekte festgestellt werden<sup>26,27</sup>. Auch Tumervakzine wurden bereits entwickelt. Eine allogene Tumorzellvakzine, die Glycoprotein 100 exprimiert, erreichte eine ORR von 17%, bei 35% davon konnte der Tumor länger als 6 Wochen unter Kontrolle



gehalten werden<sup>28</sup>. Größter Erfolg ist jedoch eine für die Behandlung in Amerika zugelassene xenogene Impfung für Hunde der Firma Merial, die Canine Melanoma Vaccine, DNA (ONCEPT<sup>TM</sup>)<sup>23</sup>. Die Plasmid-DNA-Vakzine nutzt das humane Antigen Tyrosinase, welches der caninen sehr ähnlich ist. Das Immunsystem des Hundes erkennt die eingeschleuste humane Tyrosinase als fremd und entwickelt eine Immunreaktion gegen die Zellen, die dieses Antigen tragen. Die Impfung wird insgesamt 4x im Abstand von je 2 Wochen intramuskulär gegeben. Eine Booster-Impfung alle 6 Monate wird empfohlen. Erste Daten besagen, dass die Vakzine gut vertragen wird und bei den behandelten Hunden in den Stadien II-IV eine mittlere Überlebenszeit von 13 Monaten erreicht wird<sup>29</sup> (im Vergleich: eine chirurgische Tumoresektion allein ergibt eine Überlebenszeit von 6-8 Monaten<sup>4</sup>). Mehrere Studien, die die Vorteile und eventuelle Risiken dieser Vakzine darlegen sollen, wurden eingeleitet.

## 6. Charakterisierung und Identifizierung von Melanomzellen

Eine Voraussetzung für das Projekt, Melanomzellen aus dem Blut zu isolieren, ist es einen Marker oder eine Kombination von Markern zu finden, die eine Melanomzelle im Gegensatz zu anderen im Blut zirkulierenden Zellen markieren und damit identifizieren kann. Im Folgenden werden die Marker beschrieben, die im Rahmen der Melanomzellcharakterisierung getestet wurden. Ein besonderes Augenmerk liegt auf den Markern MCSP und MCAM, da diese hauptsächlich in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden.

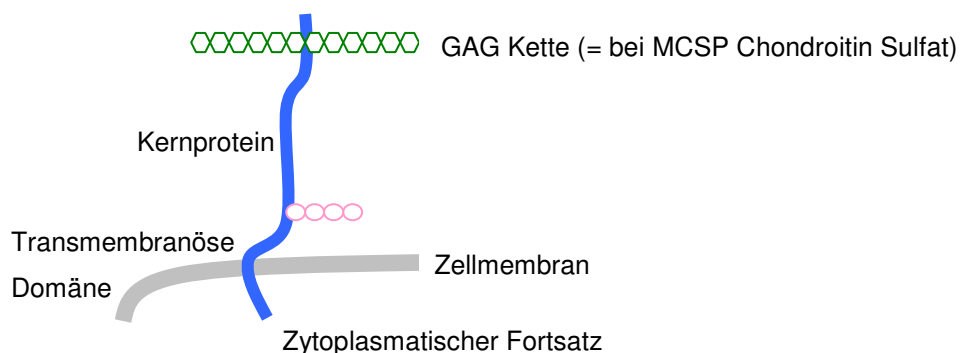
### 6.1. Melanomtypische Marker

#### 6.1.1. MCSP

MCSP steht für Melanoma Cell Surface Chondroitin Sulfate Proteoglycan und ist auch bekannt als HMW-MAA (Human High Molecular Weight-Melanoma Associated Antigen). Es ist ein Proteoglycan, das auf der Zelloberfläche von ca 90% aller Melanome exprimiert wird. Es wurde Ende der 1970er Jahre durch die Hybridom-Technologie entdeckt<sup>30</sup> und ist seither Gegenstand zahlreicher biochemischer und molekularbiologischer Analysen und Untersuchungen. MCSP ist für die Charakterisierung deshalb so

interessant, da es auf nahezu allen Melanomzellen, aber nur in sehr geringen Mengen in anderen Geweben auftritt. MCSP besteht aus zwei Komponenten, einer 280 kDa Glykoprotein-Komponente und einer 450 kDa Chondroitin-Sulfat-Proteoglycan-Komponente. Die beiden Komponenten sind durch ein N (Stickstoff) verbunden und enthalten beide dasselbe Kernprotein<sup>30</sup>. Das Kernprotein kann mit oder ohne das kovalent gebundene Chondroitin-Sulfat-Glycosaminoglycan (=GAG-Kette) exprimiert werden und wird deshalb auch als sogenanntes „Teilzeit“-Zelloberflächen-Proteoglycan bezeichnet<sup>31</sup>. Die biologische Bedeutung dieser „Teilzeit“-Proteoglycane ist noch nicht komplett verstanden. Es wird vermutet, dass die Proteoglycane, die eine GAG-Kette tragen, auf andere Liganden spezifiziert sind als die, die keine GAG-Kette tragen.

Abb.II.4 Schematische Darstellung eines Zelloberflächen-Chondroitin-Sulfat-Proteoglycans; frei nach Campoli et al, 2004<sup>30</sup>



MCSP stellt eine Art „Hilfsrezeptor“ für Wachstumsfaktoren auf der Zelloberfläche dar. Es kann so die Fähigkeit des eigentlichen Rezeptors die entsprechende Rezeptor-Tyrosin-Kinase zu aktivieren um ein vielfaches heraufsetzen<sup>30</sup>. Es steigert so entscheidend die Effektivität von Signalübertragungen. Eine Beteiligung von Adapterproteinen, die das MCSP-Signal an weitere intrazelluläre Signalwege koppeln, ist sehr wahrscheinlich.

Wie 2004 durch Yang et al gezeigt wurde, kann MCSP zwei wichtige Signalwege beeinflussen: FAK (focal adhesion kinase) und ERK (extracellular signal-regulated kinase)<sup>31</sup>. Die durch MCSP verstärkte Signalgebung führt zu gesteigerter Invasivität und erhöhtem Metastasierungspotential. Die Ergebnisse von Versuchen mit dem MCSP-

Homolog NG2 der Ratte bestätigen, dass MCSP als signalgebendes Molekül bestimmte intrazelluläre Signalkaskaden initiieren und/oder modifizieren kann<sup>30</sup>.

Weiterhin beeinflusst MCSP die Adhäsion und die Ausbreitung von Melanomzellen über das Integrin  $\alpha 4 \beta 1$ , als dessen Corezeptor es fungiert<sup>32</sup>. Die Interaktion zwischen MCSP und Integrin  $\alpha 4 \beta 1$  kann direkt erfolgen (beide Rezeptoren formen einen Komplex, an den der Ligand bindet) oder indirekt (ein Rezeptor steigert die Aktivität des anderen Rezeptors durch zwischengeschaltete Mechanismen). Auch die Möglichkeit einer Affinitätssteigerung für den Liganden durch das gemeinsame Wirken der Rezeptoren wird in Betracht gezogen<sup>33</sup>.

Durch Interaktion mit verschiedenen Komponenten der extrazellulären Matrix (z.B. Matrix-Metalloproteinasen<sup>34</sup>) kann MCSP zusätzlich die Motilität von Melanomzellen fördern und somit einen wesentlichen Beitrag zu ihrem Metastasierungspotential leisten. Desweiteren wurde gezeigt, dass MCSP-exprimierende Zellen mehr Filopodien (Microspikes) bilden als solche, die kein MCSP exprimieren<sup>31</sup>. An den Spitzen dieser Filopodien wird MCSP in hoher Zahl exprimiert, was darauf hindeutet, dass es Kontakt mit Liganden in der zellulären Mikroumgebung herstellen soll, die die Adhäsion herbeiführen<sup>33</sup>. Ferner wird MCSP auf aktivierten Perizyten exprimiert, was die Vermutung zulässt, dass es auch Einfluss auf die Angiogenese im Tumor hat.

#### 6.1.2. MCAM

MCAM steht für Melanoma Cell Adhesion Molecule. Es ist auch bekannt unter den Namen CD146, MelCam und Muc-18. Es ist, wie auch MCSP, ein Zelloberflächen-Glycoprotein. MCAM vermittelt Adhäsion sowohl homotypisch (Melanomzelle und Melanomzelle) als auch heterotypisch (Melanomzelle und Endothelzelle) und kann sowohl homophile (zwischen zwei MCAM-Molekülen) als auch heterophile (zwischen MCAM und einem anderen Adhäsionsmolekül) Bindungen eingehen. In seinem zytoplasmatischen Teil enthält MCAM mehrere Erkennungsmotive für Protein-Kinasen; dies ist ein Hinweis darauf, dass MCAM auch an Signalkaskaden beteiligt sein kann<sup>35</sup>. Auf normalen Melanozyten tritt MCAM nicht auf; auf

Nävi-Zellen kann man eine MCAM Expression nachweisen, jedoch sehr viel niedriger als auf primären oder metastatischen Melanomen<sup>35,36</sup>. Im normalen adulten Gewebe tritt MCAM auf Muskelzellen<sup>37</sup> auf. Auch auf verschiedenen Subpopulationen aktivierter T-Zellen<sup>38</sup> und vaskulären Endothelzellen<sup>39</sup> konnte MCAM nachgewiesen werden.

MCAM wird, wie vielen anderen Adhäsionsmolekülen auch, eine wichtige Rolle beim Durchlaufen der „metastatischen Kaskade“ (s.u.) zugeschrieben. Die Expression von MCAM steigt im Verlauf von der radialen zur vertikalen Wachstumsphase an, am höchsten ist die MCAM-Expression im metastatischen Melanom. Je dicker der Tumor (Messung der Tumordicke nach Breslow) desto höher ist auch die MCAM-Expression<sup>40</sup>.

MCAM steigert die Metastasierung und Invasivität. Die heterotypischen Interaktionen mit Endothelzellen können die Intra- und Extravasation zirkulierender Melanomzellen vorantreiben, während die homotypischen Interaktionen zwischen den Melanomzellen das lokale Tumorstadium fördern und/oder spätere Schritte in der Metastasierung, wie z.B. intravaskuläres Überleben, begünstigen können<sup>35</sup>. In mehreren Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass eine Expression von MCAM auf Melanomzelllinien, die normalerweise kein MCAM tragen, deren Tumorigenität und Metastasierungsfähigkeit erheblich steigert<sup>35,41</sup>. Mit dem Anstieg der MCAM-Expression geht die Herunterregulierung von E-Cadherin einher. E-Cadherin fungiert als Adhäsionsmolekül zwischen Melanozyten und Keratinozyten. Keratinozyten kontrollieren unter normalen homeostatischen Bedingungen das Melanozyten-Wachstum. Fehlt diese Kontrolle, ist ein invasives Wachstum möglich. MCAM scheint zusätzlich als co-Rezeptor für N-Cadherin (s.u.) eine Rolle zu spielen<sup>36</sup>. MCAM führt außerdem zu einer Expressionssteigerung von MMP-2, einer Matrix-Metallo-Proteinase<sup>35</sup>. MMP-2 spielt eine Rolle bei der Degradation von Typ IV Kollagen in der Basalmembran, es fördert also die Dissoziation von Tumorzellen und die Invasion ins umliegende Gewebe. So begünstigt MCAM bereits einen frühen Schritt in der Metastasierungskaskade.

### 6.1.3. MelanA

MelanA ist auch bekannt unter der Bezeichnung Mart-1. Es wurde 1994 von

zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander entdeckt<sup>42,43</sup>. Es hat eine Größe von 18 kDa und besitzt eine transmembranäre Domäne. Zu seiner Entdeckung führte die Tatsache, dass zytotoxische T-Zellen das MelanA-Antigen auf Tumoren erkennen können. MelanA wird auf Melanozyten exprimiert und auch auf der Retina. In anderen Geweben wurde es bislang nicht nachgewiesen. MelanA stellt einen Marker für die melanozytäre Differenzierung dar – daher kann es als Marker für das von Melanozyten ausgehende MM angesehen werden. Jedoch muss man die Einschränkung erwähnen, dass MelanA auch auf gutartigen Nävi exprimiert wird. Es wurde mittels RT-PCR bereits erfolgreich für die Identifizierung zirkulierender Melanomzellen verwendet<sup>44</sup>.

#### 6.1.4. Tyrosinase

Tyrosinase ist an der Synthese von Melanin in Melanozyten beteiligt. Es hilft dadurch, die Haut vor UV-Strahlung zu schützen. Durch sein natürliches Vorkommen in Melanozyten tritt es auch im MM auf. Zu beachten ist jedoch, dass in amelanotischen Formen mitunter auch keine Tyrosinase-Expression vorkommt<sup>45</sup>. Es konnte gezeigt werden, dass Tyrosinase in Melanompatienten ein Ziel für die zytotoxische T-Zell-Reaktion darstellt<sup>46,47</sup>. Mittels der Polymerasekettenreaktion wurde Tyrosinase zusammen mit MCAM und MelanA auch schon zur Detektion zirkulierender Melanomzellen verwendet<sup>48-50</sup>. In Melanommetastasen ist Tyrosinase jedoch nicht immer nachweisbar<sup>51,52</sup>.

### 6.2. Zelladhäsion

#### 6.2.1. CD54 = ICAM

ICAM steht für Intercellular Adhesion Molecule-1. Es gehört, wie MCAM, zur Superfamilie der Immunoglobuline, stellt ein Zelloberflächenprotein dar und hat eine Größe von 89 kDa<sup>53</sup>. Es vermittelt Adhäsion von Mitgliedern der Immunoglobulin-Superfamilie, kann aber auch als Rezeptor für Integrine und extrazelluläre Matrix Proteine fungieren<sup>54</sup>. Eine ICAM Expression tritt normalerweise nur in Endothelzellen, Gewebemakrophagen und in den Keimzentren von Lymphknoten auf<sup>53</sup>. ICAM kann nicht auf Melanozyten nachgewiesen werden. In benignen Nävi wird es sporadisch nachgewiesen.

Im MM jedoch ist seine Expression positiv mit der Tumordicke korreliert<sup>55</sup>. Obwohl die Rolle von ICAM in der metastatischen Kaskade nicht vollständig geklärt ist, so ist doch eine wesentliche Beteiligung an der Metastasierung nachweisbar. So trägt es maßgeblich zur Disseminierung von Zellen des Primärtumors bei. Der hierfür zugrundeliegende Mechanismus ist der, das ICAM durch die Bindung an LFA-1 (= lymphocyte function-associated molecule-1) eine Adhäsion an Leukozyten vermitteln kann<sup>53</sup>. Durch die Adhäsion von Melanomzelle an Leukozyten wird das Überleben der Tumorzelle in der Blutzirkulation sowie die Extravasation ins Gewebe gefördert<sup>56</sup>.

#### 6.2.2. CD166 = ALCAM

ALCAM steht für activated leukocyte cell adhesion molecule und trägt auch die Bezeichnung CD166. Wie auch MCAM gehört es zu den Adhäsionsmolekülen, die beiden Moleküle sind zu fast 27% identisch<sup>57</sup>. ALCAM kann homo- und heterophile Zell-Zell-Interaktionen vermitteln. ALCAM stellt den Liganden für CD6 dar, welches zur Aktivierung von T-Zellen dient. Da Melanomzellen kein CD6 exprimieren, kann ALCAM im MM nur homophile Adhäsion vermitteln. Dadurch kommt es zur Aggregation von Melanomzellen<sup>58</sup>. Außerdem findet eine ALCAM-Expression in Langerhans-Zellen der Haut, in Haarfollikelzellen sowie in Nervenendigungen<sup>59</sup> statt. Auch in anderen Krebsarten konnte ALCAM nachgewiesen werden<sup>58</sup>. Im MM wurde ALCAM als Marker für den Tumorprogress identifiziert. Van Kempen et al konnten zeigen, dass ALCAM ausschließlich ab der Stufe der vertikalen Wachstumsphase exprimiert wird und dass es im weiteren Verlauf der Tumordinvasion (gemessen am Clark Level) noch weiter signifikant ansteigt<sup>59</sup>. In Melanommetastasen jedoch war die Expression von ALCAM weniger stark ausgeprägt als in den Stufen davor. Van Kempen et al stellten aufgrund ihrer Untersuchungsergebnisse die These auf, dass ALCAM vor allem für die lokale Invasion des Tumors unbedingt notwendig ist, aber entbehrlich wird, sobald die Tumorzelle eine Nische gefunden hat in der sie dann eventuell zur Metastasenbildung führt. ALCAM ist also als Unterscheidungsmerkmal zwischen dem nicht-invasiven, nicht-metastasierenden Melanom in der radialen Wachstumsphase und dem invasiven und metastasierenden Melanom der vertikalen Wachstumsphase geeignet.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass ALCAM notwendig ist für die Aktivierung der Matrix Metalloproteinase 2 (MMP2), die in starkem Ausmaß an der Metastasierung beteiligt ist<sup>60</sup>. Auch MCAM steigert durch eine Aktivierung von MMP2 die Fähigkeit zur Metastasierung (s.Kapitel 6.1.2). Eine weitere Hypothese ist die, dass ALCAM-exprimierende Melanomzellen in der Lage sind, sich an CD6-exprimierende Leukozyten zu heften und somit der Überwachung des Immunsystems entkommen<sup>58</sup>.

### 6.2.3. CD325 = N-Cadherin

N-Cadherin (Neuronales Cadherin) gehört in die Familie der Cadherine, die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige transmembrane Zelladhäsionsmoleküle darstellen. Die Cadherine spielen schon in der Embryogenese eine wichtige Rolle. Später ist N-Cadherin unter anderem daran beteiligt, die Homeostase in der Haut aufrecht zu erhalten<sup>35</sup>. Neben seiner Funktion als Signalmolekül vermittelt N-Cadherin sowohl homo- wie auch heterotypische Adhäsion. Dies geschieht durch die Vermittlung interzellulärer Interaktionen zwischen Melanozyten, Keratinozyten, Fibroblasten und Endothelzellen. MCAM scheint als ein co-Rezeptor für N-Cadherin eine Rolle zu spielen<sup>36</sup>. Die Expression von N-Cadherin wird während der Melanomprogression kontinuierlich gesteigert<sup>35</sup>, während die des E-Cadherins mehr und mehr schwindet (sog. Cadherin-Switch). Der Cadherin Switch bewirkt, dass die Tumorzelle phänotypisch einer Stammzelle näherkommt. Diese Umstellung von E- auf N-Cadherin wird in vielen Tumoren epithelialen Ursprungs beobachtet<sup>61</sup>. Nach Untersuchungen von Hsu et al im Jahr 1996 ist die E-Cadherin Expression in den meisten humanen Melanomzelllinien signifikant reduziert oder nicht vorhanden<sup>62</sup>. Im Gegenteil dazu ist die Expression von N-Cadherin sehr hoch, obwohl N-Cadherin normalerweise nicht von Melanozyten exprimiert wird. Durch die Vermittlung interzellulärer Adhäsion zwischen Tumorzellen und ihrer Mikroumgebung sowie der intrazellulären Kommunikation fördert N-Cadherin Migration, Metastasierung und Überleben von Melanomzellen<sup>35,63</sup>.

In der vorliegenden Arbeit wurde N-Cadherin nach den ersten Charakterisierungen von Melanomzelllinien aufgrund einer sehr geringen oder ganz fehlenden Expression nicht weiter analysiert.

### 6.3. Chemoresistenz: ABCG2

ABCG2 steht für ATP-binding cassette G2. Es stellt ein Transporterprotein dar. Es ist auch bekannt unter der Bezeichnung BCRP (= Breast Cancer Resistance Protein). ABCG2 ist ein 72 kDa großes Protein und gehört in die Superfamilie der ABC (= ATP-binding cassette) Transporter. Beim aktiven Transport, das heißt z.B. entgegen eines Konzentrationsgradienten in die Zelle hinein oder aus der Zelle heraus, muss Energie aufgewendet werden. Im Fall der ABC-Transporter wird diese Energie durch die Bindung und Hydrolyse von ATP gewährleistet<sup>64</sup>. Verschiedene Studien zur Verteilung von ABCG2 im Gewebe (u.a. Plazenta, Endothelzellen, Blut-Hirn-Schranke, Verdauungstrakt u.v.m.) lassen darauf schließen, dass der Transporter eine Schutzfunktion einnimmt. Außerdem wurde gezeigt, dass ABCG2 auch zur Identifizierung von Zellen mit stammzell-ähnlichen Eigenschaften genutzt werden kann<sup>64</sup>. ABCG2 ist in der Lage den Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33342 aktiv aus Zellen heraus zu pumpen. Diese durch den geringeren Hoechst-33342-Gehalt definierten Zellen werden als stammzell-ähnlich betrachtet<sup>65,66</sup>.

ABCG2 spielt offensichtlich auch eine Rolle beim „Multi-drug resistance“ (MDR)-Phänomen. Dieses Phänomen beschreibt, wie Tumorzellen gleichzeitig eine Resistenz gegenüber mehreren Chemotherapeutika erwerben<sup>67</sup>. Dies wird auch beim MM beobachtet – der Tumor wird resistent gegen die aktuelle Therapie. Ein wichtiger Bestandteil des MDR-Phänomens ist ein aus verschiedenen Transportern bestehendes System, welches schädliche Substanzen wieder aus der Zelle heraus befördert. ABCG2 bildet zusammen mit MDR-1 (Multi-drug-resistance gene 1) und MRPs (Multidrug-Resistance-Related Proteins) die Haupttransporter, die für den Efflux schädlicher Substanzen verantwortlich sind<sup>64</sup>. Durch den vermehrten Efflux des Chemotherapeutikums wird die intrazelluläre Konzentration zu niedrig, um die Zelle effektiv bekämpfen zu können. Es gibt jedoch auch eine Vielzahl von Substanzen, die in der Lage sind, ABCG2 zu inhibieren. Die für die vorliegende Arbeit interessanteste Tatsache ist, dass auch Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI), z.B. Imatinib, diese Fähigkeit besitzen<sup>64</sup>. Der Effekt ist wahrscheinlich durch eine kompetitive Bindung bedingt. Das macht ABCG2 auch interessant für die zielgerichtete Therapie des MM: Mit einer



Hemmung der ABCG2-Transporter kann zumindest eine Verminderung der Chemoresistenz erreicht werden. Kombinationstherapien mit anderen TKI/Chemotherapeutika können dann eventuell für einen größeren Therapieerfolg sorgen.

#### 6.4. T-Zell-Erkennung: HLA-ABC und HLA-DR

Die Haupthistokompatibilitätskomplexe (im Folgenden MHC abgekürzt; von engl. Major Histocompatibility Complex) sind für Transport und Präsentation von Peptiden sowohl aus intrazellulären als auch von phagozytierten Proteinen an die Oberfläche von antigen-präsentierenden Zellen (im Folgenden APCs abgekürzt) verantwortlich. MHC ist dabei ein spezieübergreifender Begriff. Im Menschen werden die MHCs als humanes Leukozytenantigen (abgekürzt HLA)-System bezeichnet. Jede Zelle trägt ein HLA-Erkennungsmuster und wird so als körpereigene Zelle erkannt. Daher wird sie vom Immunsystem toleriert und nicht angegriffen. Die T-Zellen des Immunsystems können körperfremde Peptide (= Proteinfragmente) nur dann erkennen, wenn sie mithilfe der MHCs auf der Zelloberfläche präsentiert werden, das heißt die T-Zellen erkennen sowohl das MHC-Molekül sowie das präsentierte Peptid und können anhand dessen die Unterscheidung körpereigen oder körperfremd vornehmen und entsprechend reagieren. Die MHC-Antigene werden in 2 Klassen unterteilt:

- Klasse I: diese MHC-Antigene werden in A, B und C unterteilt und sind auf nahezu allen kernhaltigen Zellen exprimiert. Damit können endogene Peptide abgebildet werden. Das Immunsystem kann so z.B. auf intrazelluläre Infektionen oder entartete Zellen mittels einer adaptiven Immunantwort reagieren: zytotoxische T-Zellen (CD8+) erkennen die präsentierten fremden endogenen Peptide.

- Klasse II: MHC-Antigene der Klasse II werden in DR, DP und DQ unterteilt und sind nur auf spezialisierten APCs exprimiert. Sie präsentieren exogene Proteinfragmente. Diese gelangen z.B. durch rezeptorvermittelte Endozytose oder Phagozytose in die APC. T-Helferzellen (CD4+) erkennen dann die körperfremden Strukturen, somit wird auch hier eine adaptive Immunantwort induziert.

HLA-DR konnte bereits auf Melanomzellen nachgewiesen werden. Es wird besonders an der invasiven Front des fortschreitenden Tumors gefunden und kann auch mit der Tumordicke und der Aggressivität des Tumors korreliert werden<sup>68</sup>.

Die Expressionsmuster der MHC-Antigene sind auch im Hinblick auf die Immunogenität der Tumorzellen interessant. Je weniger dieser Antigene exprimiert werden, desto geringer ist die Immunogenität der Zelle. Bei einer hohen HLA-DR und/oder HLA-ABC Expression müssten die Zellen also anfälliger für die körpereigene Abwehr bzw. eine Immuntherapie sein.

#### 6.5. Negativkontrolle: CD45

CD45, auch bekannt als common leukocyte antigen oder T200, kommt in allen hematopoietischen Zellen außer Erythrozyten und Thrombozyten vor. CD45 ist eine Tyrosinphosphatase, von der es mehrere Isoformen gibt<sup>69</sup>. Es spielt eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion. In der vorliegenden Arbeit wurde es als Negativkontrolle bzw. Marker verwendet, da es auf allen Leukozyten aber nicht auf Melanozyten oder Melanomzellen exprimiert ist.

### 7. Tumorentstehung und Metastasierung – die Rolle von Krebsstammzellen

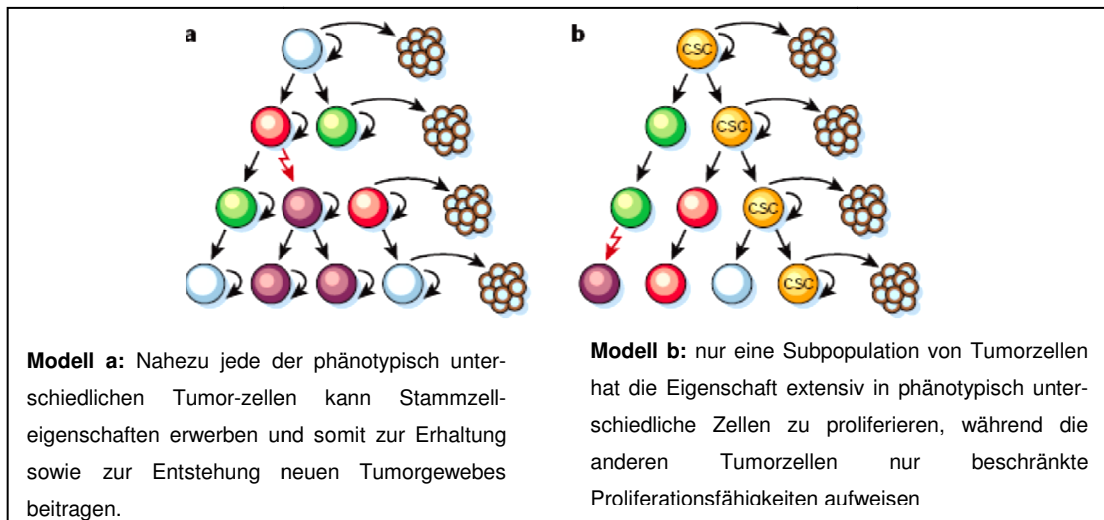
Als Stammzellen bezeichnet man Zellen, die in der Lage sind, sich zu verschiedenen Zelltypen oder Geweben auszudifferenzieren. Ihre besondere Eigenschaft ist, dass sie sich durch asymmetrische Zellteilung selbst erneuern und erhalten können. Man unterscheidet embryonale Stammzellen von adulten Stammzellen. Embryonale Stammzellen sind pluripotent, können sich also in alle Körpergewebe ausdifferenzieren. Adulte Stammzellen können sich nur noch in bestimmte festgelegte Gewebe ausdifferenzieren, z.B. Haut. Sie werden als multipotent bezeichnet. Stammzellen haben einige besondere Eigenschaften. Sie teilen sich im Vergleich zu anderen Körperzellen sehr selten. Dadurch haben sie einen sehr geringen Energieumsatz und sind sehr langlebig. Weiterhin verfügen sie über bestimmte Transporter, die potentiell schädliche Substanzen aus der Zelle heraus schleusen können. Ein vergleichbares Transporter-System wird dem Multi-Drug-Resistance-Phänomen (s. Kapitel 6.3) zugrunde gelegt. Diese

Eigenschaften führen zu einer verbesserten Überlebensfähigkeit der Stammzellen. Zusätzlich wird davon ausgegangen, dass Stammzellen zeitlebens in bestimmten Nischen bleiben<sup>70</sup>. Die Nischen bilden eine besondere Mikroumgebung, die dazu beiträgt, die Stammzelle zu erhalten. Durch Adhäsion wird die Stammzelle in der Nische verankert. Die Stammzelle kann in der Nische in einer Art „Keimruhe“ verharren. Im Englischen wird dieser Zustand mit „Dormancy“, also eine schlafende Zelle, beschrieben. Bestimmte Oberflächenmoleküle sind ein wichtiger Teil der Mikroumgebung, z.B. Cadherine und Integrine. Die Signale, die sie an die Stammzelle abgeben sind auch Regulatoren für Überleben, Zellteilung und Selbsterneuerung.

### 7.1. Krebsstammzellen

Es gibt unterschiedliche Ansätze, die sowohl auf zellulärer als auch auf molekularer Ebene die Tumorentstehung sowie die Fähigkeit zur Metastasierung und das Resistenzverhalten von Tumoren erklären sollen. Die wohl bekannteste Theorie ist die der sogenannten Krebsstammzellen<sup>71,72</sup>. Als Vordenker und Verfechter dieser Hypothese gilt die Arbeitsgruppe um Irving L. Weissman, die 2001 erstmals diese Theorie vorstellten<sup>71</sup>. Sie postulieren, dass durch die Anhäufung von Mutationen normale Körperstammzellen zu Krebsstammzellen werden können, die durch ihr entartetes Wachstum den Ursprung eines Tumors bilden. Die Krebsstammzellen sollen ebenfalls den Ausgangspunkt für Metastasen bilden. Als Erklärungsansatz werden zwei unterschiedliche Modelle präsentiert: Im Modell **a** wird zugrunde gelegt, dass jede Tumorzelle potentiell dazu in der Lage ist, stammzell-ähnliche Eigenschaften zu erwerben und somit zur Vermehrung der Tumorzellen beitragen kann. Dies kann auch die große Heterogenität der Zellen innerhalb eines Tumors erklären. Im Modell **b** wird postuliert, dass lediglich eine kleine Subpopulation von Tumorzellen als Stammzellen dient, während die anderen Tumorzellen diese Stammzell-Eigenschaften nicht besitzen.

Abb. II.5 Modelle der Stammzelltheorie aus: Stem cells, cancer, and cancer stem cells. Reya T., Morrison S.J., Clarke M.F., Weissmann I.L. Nature, 2001



Die Gruppe um Zabierowski et al postuliert ebenfalls, dass Krebsstammzellen an der Spitze einer hierarchisch gegliederten Tumorzellpopulation stehen<sup>73</sup>, entsprechend dem oben vorgestellten Modell **b**. Krebsstammzellen können demnach zu allen im Tumor vorkommenden Zellen ausdifferenzieren. Sie werden auch TICs = tumor initiating cells, genannt, da sie in der Lage sind, neue Tumore zu bilden. Außerdem besagt die Hypothese, dass im Tumor stets eine kleine Population dieser Krebsstammzellen präsent ist<sup>71,72</sup>.

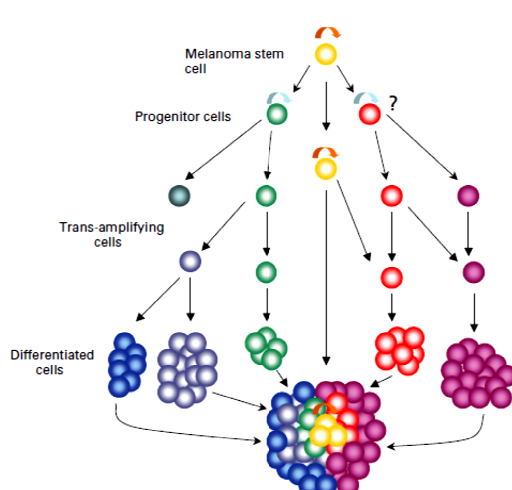


Abb. II.6: Hierarchische Gliederung eines Tumors mit einer Tumorstammzelle als Ausgangspunkt; aus Melanoma Stem Cells: The Dark Seed of Melanoma Zabierowski S.E., Herlyn M. Journal of Clinical Oncology, 2008, Fig.2

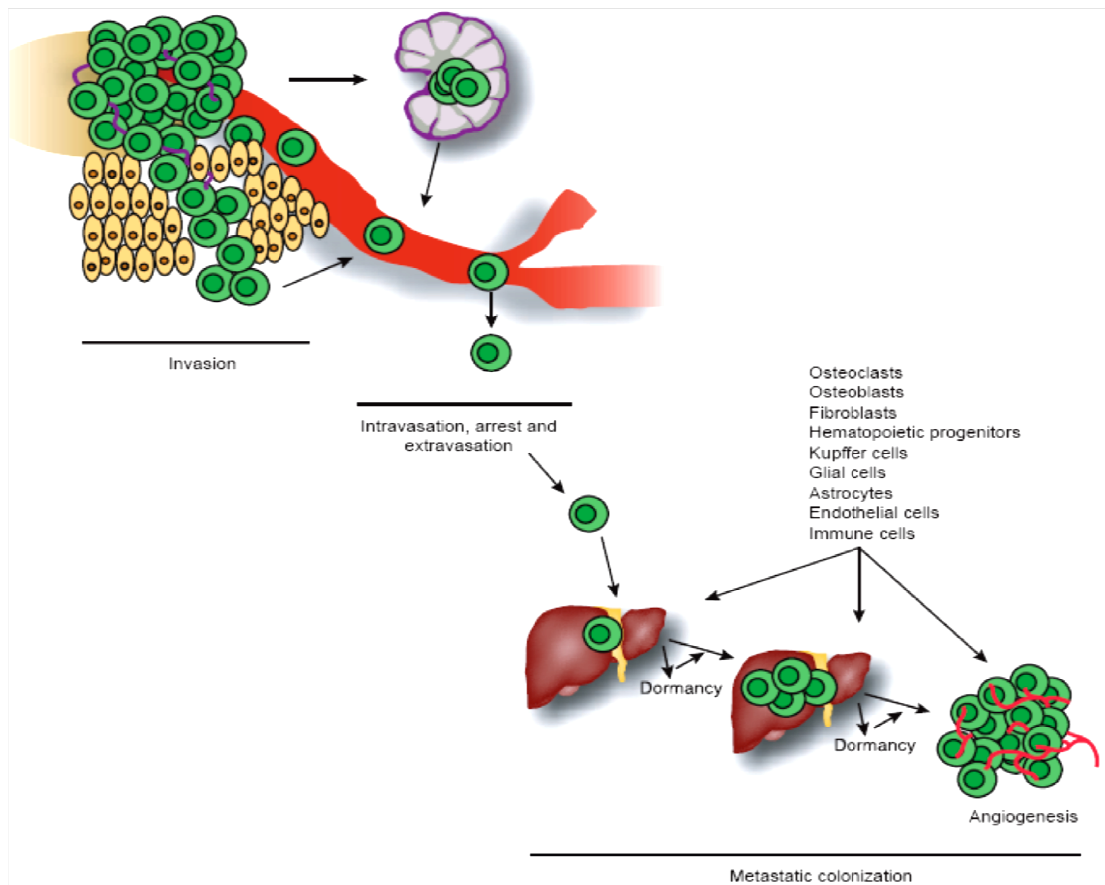
Dieses „statische Modell“ ist jedoch viel diskutiert. Quintana et al z.B. postulieren, dass es sich bei den stammzelligen Tumorzellen eher um ein dynamisches Modell handelt<sup>74</sup>. Das würde bedeuten, dass potentiell jede Tumorzelle dazu imstande ist, als Stammzelle zu fungieren, entsprechend

dem oben vorgestellten Modell **a**. Der Erwerb von stammzellähnlichen Charakteristika kann dabei z.B. von der Mikroumgebung der Zelle abhängen: von der Nische, in der sie sich befindet oder auch von verschiedenen Signalmolekülen, die die Zelle erreichen. Bei der reversiblen Umschaltung einer normalen Tumorzelle zur Tumorstammzelle werden verschiedene Gene an- bzw. ausgeschaltet, so dass zumindest zeitweise Charakteristika wie Langlebigkeit, Selbsterneuerung und bestimmte Mechanismen zur Chemoresistenz erworben werden können<sup>72,75</sup> – Eigenschaften also, die eine Stammzelle definieren. Zusammenfassend postuliert die Theorie der Krebsstammzellen, dass der gesamte Tumor aus einer multipotenten Krebsstammzelle entsteht. Diese multipotente Krebsstammzelle könnte nach Irving et al aus einer mutierten Stammzelle hervorgehen. Anmerken muss man an dieser Stelle allerdings noch, dass diese Theorie auf dem hematopoietischen System beruht. Ob diese Theorie auch auf solide Tumoren zutrifft, ist noch nicht bewiesen.

## 7.2. Die metastatische Kaskade

Nach den oben genannten Hypothesen sind es ebenfalls Krebsstammzellen, die zur Metastasierung führen. Die Metastasierung an sich geht in mehreren Schritten von staten, der sogenannten „metastatischen Kaskade“<sup>76</sup>. Die frühe Metastasierung wird durch das aggressive und invasive Wachstum des MM gefördert. Hat das MM die Dermis durchbrochen und Anschluss an Blut- und Lymphgefäße, können sich Tumorzellen vom Primärtumor absiedeln – der erste Schritt der metastatischen Kaskade. Sowohl Lymphe als auch der Blutstrom werden zum Transportmedium für die disseminierten Zellen. Außerdem beinhaltet dieser Schritt auch die Fähigkeit der Zellen, im Blut zu überleben. Dies geschieht z.B. dadurch, dass sich die Tumorzellen mittels bestimmter Oberflächenantigene an Leukozyten haften (z.B. mit ICAM). Diese Zellen werden als zirkulierende Tumorzellen (im Folgenden als ZTZ abgekürzt) bezeichnet. ZTZ sind zur Intra- und Extravasation fähig. Die metastatische Kolonisation stellt den letzten Schritt der Kaskade dar.

Abb. II.7 Die Metastatische Kaskade aus: Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges; Patricia S. Steeg, Nat. Med, 2006



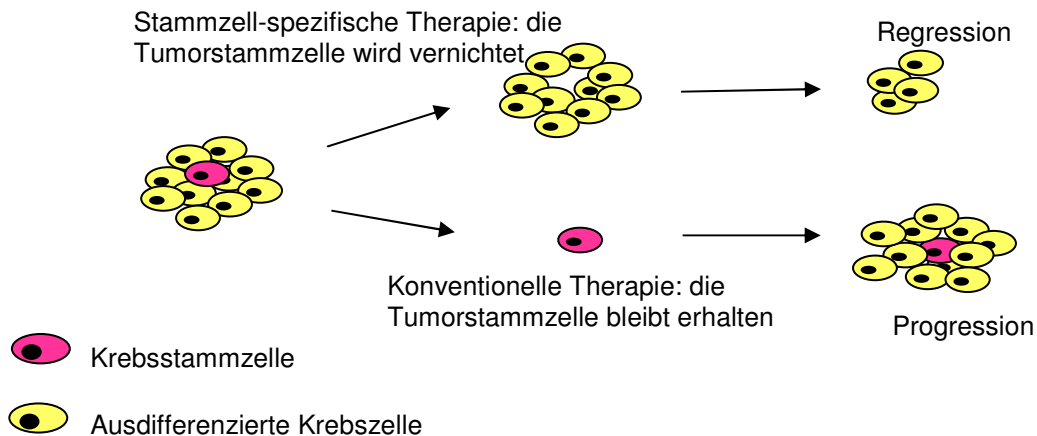
Im Fall des Uvea-Melanoms muss die Metastasierung auf hämatogenem Weg erfolgen, da das Auge keinen Anschluss an das lymphatische System hat. Metastasen des Uvea-Melanoms treten am häufigsten in der Leber auf<sup>1</sup>. In einem experimentellen Modell wurde von Luzzi et al gezeigt, dass von den Zellen, die im Blutstrom überleben und die die Extravasation in die Leber geschafft haben, eine aus 40 Zellen eine Mikrometastase formt. Wiederum eine aus 100 der Mikrometastasen war dazu fähig, eine makroskopisch erkennbare Metastase zu bilden<sup>77</sup>. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten mittels RT-PCR zeigen, dass es bei zahlreichen soliden Krebsformen im Blut ZTZ gibt<sup>78-80</sup>. In der Literatur wird berichtet, dass im Melanom ZTZ schon durch Tyrosinase-PCR detektiert wurden<sup>44,49,50</sup>. Einen Erklärungsansatz dafür, warum das MM in einem so frühem Stadium metastasiert, bietet die Gruppe um van Kempen. Sie postuliert aus ihren Beobachtungen um das Adhäsionsmolekül ALCAM (=CD166), dass die Proliferation von Tumorzellen und die Invasion des Tumors ins umliegende Gewebe unabhängige Prozesse sein können<sup>81</sup>. Während seiner Entwicklung vom Nävus hin zum

bösartigen Tumor verändert sich der Phänotyp des Melanoms. Es konnte gezeigt werden, dass zwischen der radialen und der vertikalen Wachstumsphase molekulare Veränderungen auftreten, die direkt mit dem Tumorprogress korreliert werden können<sup>59,82-84</sup>. In der radialen Phase seines Wachstums besitzt das MM noch keine metastatischen Eigenschaften, jedoch erreicht es diese mit dem Fortschritt in die vertikale Wachstumsphase, in der das MM in die Dermis vordringt. Auch die Untersuchungen zur MCAM-Expression von Xie et al unterstützen diese Ergebnisse<sup>40</sup>. Der Tumor treibt einerseits die lokale Invasivität voran, während es andererseits bereits zu einer Metastasierung kommt. Demnach würden schon einige wenige molekulare Veränderungen jeweils den einen oder den anderen Prozess begünstigen. So nimmt eine Erkrankung am malignen Melanom nicht nur wegen des schnellen Wachstums des Tumors, sondern auch wegen seinem Metastasierungsverhalten oft einen fatalen Verlauf.

### 7.3. Die Keimruhe („Dormancy“)

Beim MM kommt es häufig vor, dass Patienten Monate oder Jahre nach einer erfolgreichen Therapie mit Metastasen vorstellig werden. Dies führte zu der Vermutung, dass metastasierte Melanomzellen einen längeren Zeitraum im Körper überdauern können. Voraussetzung für das lange Überleben ist, dass die ZTZ eine Nische findet – ähnlich wie es bei hämatopoietischen Stammzellen der Fall ist<sup>85</sup>. In dieser Nische mit ihrer besonderen Mikroumgebung sowie der erworbenen stammzell-ähnlichen Eigenschaften können die Krebsstammzellen Tage, Wochen oder sogar Jahre überdauern. Nach einer bestimmten Zeit oder auf einen noch unbekannten Stimulus hin kann eine solche Tumorstammzelle dann anfangen, sich zu teilen, differenzierte Zellen zu bilden, eine neue Tumormasse zu formen – die Entstehung einer Metastase aus nur einer einzigen Zelle ist so, auch noch nach Wochen oder sogar Jahren des tumorfreien Überlebens, möglich. Ziel neuer Therapieformen muss also auch sein, diese „ruhenden“ Zellen mit zu bekämpfen.

Abb. II.8 Stammzellspezifische Therapie gegenüber konventioneller Therapie



#### 7.4. Möglichkeiten zur Identifizierung von Krebsstammzellen

Seit einem Jahrzehnt beschäftigt sich die Krebsforschung auch damit, ob man Krebsstammzellen aus dem Tumorgewebe isolieren kann und wie man sie am besten bekämpft. Trotz intensiver Forschung gibt es bislang keine etablierten Marker, die mit Sicherheit Stammzellen aus adulten Geweben oder Krebsstammzellen aus Tumorgewebe identifizieren können. Als Goldstandard gilt die Xenotransplantation von Tumorzellen in immundefiziente Mäuse. Bilden sich Tumore in den Mäusen, schließt man daraus dass diese Zellen eine hohe Tumorigenität<sup>86,87</sup> und stammzell-ähnliche Eigenschaften aufweisen. Im Fall des MM sind nach ersten Angaben in der Literatur z.B. CD133, ABCB5 sowie ABCG2 als Marker für Melanomstammzellen beschrieben<sup>73,66,88</sup>.

Neben der Möglichkeit, Krebsstammzellen mittels verschiedener Oberflächenmarker zu identifizieren gibt es einen weiteren, funktionellen Ansatz: die Analyse der „Side Population“. Damit wird eine kleine Gruppe von Zellen bezeichnet, die bestimmte Stoffe mit Hilfe eines Systems aus mehreren Transportern wieder aus dem Zellinneren heraus transportieren kann. Stammzellen wird eine solche Fähigkeit zum besseren Selbstschutz zugeschrieben. Dadurch können sie über einen längeren Zeitraum unbeschadet von unterschiedlichen von außen wirkenden Noxen im Körper verbleiben. Diese Fähigkeit unterscheidet die Krebsstammzellen von der großen Masse der „normalen“ Tumorzellen, die diesen Mechanismus nicht zur Verfügung haben und deshalb auch leichter mit Medikamenten zu



bekämpfen sind.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit verschiedenen Methoden versucht, Stammzellen aus dem MM zu identifizieren. Hierzu wurden drei unterschiedliche Methoden angewandt, welche allesamt mit der Durchflusszytometrie gemessen wurden.

## 7.5. Identifizierung von Melanomstammzellen

### 7.5.1. Identifizierung von Melanomstammzellen mithilfe von Stammzellenmarkern

Es wurde in der vorliegenden Arbeit mit bestimmten Antikörpern die als mögliche Marker für Melanomstammzellen beschrieben sind, nach einer Subpopulation innerhalb von Melanomzellen aus der Kurzzeit-Zellkultur gesucht. Im Folgenden werden die einzelnen Antigene kurz beschrieben.

#### 7.5.1.1. CD20

CD20 ist ein Antigen der B-Lymphozyten, das während der gesamten Reifung der Lymphozyten exprimiert wird. Seine genaue Funktion ist noch ungeklärt.

CD20 wurde unter anderem auf Melanomzellen nachgewiesen<sup>89</sup>, die offenbar Krebsstammzellen darstellen. In einer Genexpressionsstudie von Klein et al ist CD20 unter den Top 22 Genen, die einen aggressiven Melanomtyp charakterisieren<sup>90</sup>.

#### 7.5.1.2. CD117 = cKit

cKit ist auch bekannt als Tyrosin-Protein-Kinase Kit und SCFR (Stem Cell Growth Factor Receptor). cKit ist eine transmembrane Rezeptor-Tyrosin-Kinase, die den Rezeptor für SCF (= stem cell factor, auch bekannt als Steel factor oder cKit-Ligand) bildet. Zusammen bilden Rezeptor und Ligand ein Dimer, das mittels der Tyrosin-Kinasen-Aktivität eine Signalkaskade in Gang setzt. Es stellt außerdem einen wichtigen Marker für die Identifizierung von hematopoietischen Vorläuferzellen des Knochenmarks dar. Es wird in hematopoietischen Stammzellen und multipotenten Vorläuferzellen hoch exprimiert. cKit ist ein Proto-Onkogen und kann zur Malignität führen, wie es auch beim MM der Fall ist<sup>91,92</sup>. Dies kann durch eine Überexpression oder

aber durch aktivierende Mutationen<sup>93</sup> bedingt sein. Die Signalgebung durch cKit hat Einfluss auf Differenzierung, Proliferation, Überleben und auch auf die Mobilisierung der Zelle<sup>94</sup>. Die Gruppe um Huang hat gezeigt, dass die Expression von cKit während der Entwicklung des malignen Melanoms kontinuierlich abnimmt<sup>95</sup>. Die Expression von cKit wird weniger, sobald die Zellen des Melanoms die Dermis durchbrechen<sup>96</sup>. SCF, der cKit-Ligand, wird unter anderem auch von Keratinozyten gebildet. Er kann bei der Bindung an cKit das Apoptoseprogramm der Zelle auslösen. Daher stammt die Annahme, dass Melanomzellen durch den Verlust von cKit der SCF-vermittelten Apoptose entkommen können und somit Tumorstadium und auch Metastasierung gefördert werden<sup>95</sup>. Daher überrascht es nicht, dass in Melanommetastasen und auch in Melanomzelllinien cKit nicht nachweisbar ist<sup>97-99</sup>.

cKit stellt auch einen vielversprechenden Angriffspunkt zielgerichteter Therapie dar<sup>93</sup>: Imatinib, ein Tyrosinkinasehemmer, inhibiert eine bestimmte mutierte Form von cKit. Es wird momentan erfolgreich in der Therapie von myeloischen Leukämien eingesetzt. Auch bei Schleimhautmelanomen, die eine cKit-Mutation aufweisen, wird Imatinib mit Erfolg eingesetzt<sup>100</sup>.

#### 7.5.1.3. CD133

CD133 wird auch als Prominin 1 (PROM1) bezeichnet. Es ist ein transmembranes Glykoprotein, das bevorzugt in zellulären Fortsätzen lokalisiert ist. Seine genaue Funktion ist noch ungeklärt. Es wird in zahlreichen Geweben und Zelltypen exprimiert. CD133 gilt als Stammzellenmarker; es wird auf hematopoietischen Stammzellen<sup>101</sup>, endothelialen Vorläuferzellen<sup>102</sup> sowie auf neuronalen Stammzellen exprimiert. Zum anderen kommt es auch in zahlreichen Geweben vor: Niere, Speicheldrüsen, Verdauungstrakt, um nur einige zu nennen<sup>103,104</sup>. CD133 wurde aber auch in Tumoren nachgewiesen, z.B. in verschiedenen Gehirntumoren<sup>105</sup>.

Im MM wurde 2007 eine CD133+ Population von Zellen identifiziert, die Stammzellencharakteristika aufweist<sup>66,73</sup>. Auch in anderen Krebsarten konnte eine solche CD133+ Population nachgewiesen werden<sup>106,107</sup>. Dies wurde zum Anlass genommen, die Expression von CD133 auch in der vorliegenden

Arbeit zu untersuchen.

#### 7.5.1.4. CD271 = NGFR

CD271 wird auch als “low affinity neural growth factor receptor” bezeichnet. Er ist einer von insgesamt zwei Rezeptortypen für Neutrophine. Neutrophine sind Wachstumsfaktoren, die in neuronalen Zellen Differenzierung und Überleben stimulieren. Die genaue Funktion von CD271 ist nicht vollständig geklärt. Die Expression von CD271 wurde in einigen aus der Neuralleiste stammenden Geweben nachgewiesen. Aber auch in einigen Krebsarten wurde CD271 nachgewiesen, u.a. im MM<sup>108,109</sup>. Nachdem Boiko et al 2010 gezeigt haben, dass CD271 auf sog. MTSCs (= melanoma tumour stem cells) exprimiert wird und sogar als Marker für deren Isolierung genutzt werden kann<sup>110</sup>, wurden auch in der vorliegenden Arbeit einige Melanomzelllinien hinsichtlich dieses Markers untersucht. Boiko et al berichten außerdem, dass CD271+ Melanomzellen die als melanomtypisch angesehenen Marker Tyrosinase, MelanA und MAGE nicht exprimieren.

#### 7.5.1.5. Notch 1

Der Notch-Signaltransduktionsweg ist evolutionär konserviert. Notch hat eine zentrale Bedeutung hinsichtlich der Determinierung der Zelle und beeinflusst eine Vielzahl verschiedener Prozesse, die unter anderem das Überleben, die Proliferation und die Differenzierung einer Zelle steuern<sup>111</sup>. Notch spielt daher auch bei der Entwicklung (Synchronisation der Entwicklung) und der Gewebhomeostase (durch Vermittlung der lateralen Inhibition) eine wichtige Rolle. Bei Bindung zwischen Rezeptor und Ligand kommt es zu einer Proteolyse, die die Signalkaskade in Gang setzt.

Nachdem in mehreren Krebsarten eine abnorme Notch-Signalgebung festgestellt wurde, wird eine Rolle von Notch als Tumorpromotor oder - je nach Zelltyp und Kontext - auch als Tumorsuppressor diskutiert. Auch an der Tumorgenese des MM ist Notch beteiligt<sup>111</sup>. Es konnte gezeigt werden, dass der Notch-Signalweg im MM aktiv ist<sup>112</sup>. Unter anderem werden hierbei die im MM wichtigen Signaltransduktionswege PI3K und MAPK/MEK/Erk aktiviert bzw. verstärkt<sup>113</sup>. Außerdem wird die Expression von N-Cadherin gefördert. Weitere onkogene Effekte, die durch Notch vermittelt werden, sind unter anderem eine Hochregulierung von  $\beta$ -Catenin und MCAM. Beide

Moleküle fördern die Tumorprogression und den Metastasierungsprozess<sup>112</sup>. Ein aktiver Notch-Signalweg kann demnach als Auslöser der malignen Transformation von Melanozyten wirken<sup>114</sup> und ist an der Tumorprogression, vor allem während der vertikalen Wachstumsphase maßgeblich beteiligt.

#### 7.5.2. Identifizierung von Melanomstammzellen anhand funktioneller Eigenschaften

Neben der Charakterisierung mit Stammzellmarkern wurden auch Versuche durchgeführt, die mittels Analyse der Side Population eine stammzell-ähnliche Untergruppe innerhalb der Melanomzellen darstellen sollen. Hierzu wurden zwei unterschiedlich Ansätze verwendet, die im Folgenden erläutert werden.

##### 7.5.2.1. ALDH-Aktivität

Eine Möglichkeit, Zellen mit stammzellähnlichen Eigenschaften zu identifizieren, ist die ALDH-Enzymaktivität. Im Menschen gibt es aktuell 19 identifizierte ALDH-Gene, die im ganzen Körper vorkommen<sup>115</sup> (siehe auch [www.aldh.org](http://www.aldh.org)). Aldehyd-Dehydrogenasen sind Enzyme, die im Stoffwechsel die wichtige Aufgabe erfüllen, den Körper zu entgiften. Sie sind Oxidoreduktasen, die z.B. Vitamin A in Retinolsäure überführen und für den Alkoholabbau sorgen. Durch seine Funktion kann ALDH dazu beitragen, in einer Zelle die Wirksamkeit von Medikamenten herabzusetzen. Deshalb kann man durch eine Messung der ALDH-Aktivität in der Zelle Aussagen über ihren Status treffen: je höher die ALDH-Aktivität, desto wahrscheinlicher besitzt diese Zelle auch andere stammzellähnliche Eigenschaften. Für einige Krebsformen, z.B. Brustkrebs, wurde bereits gezeigt, dass das Vorkommen einer ALDH-hochpositiven Zellpopulation klinisch mit einer schlechten Prognose korreliert werden kann<sup>116</sup>.

##### 7.5.2.2. Hoechst-Färbung

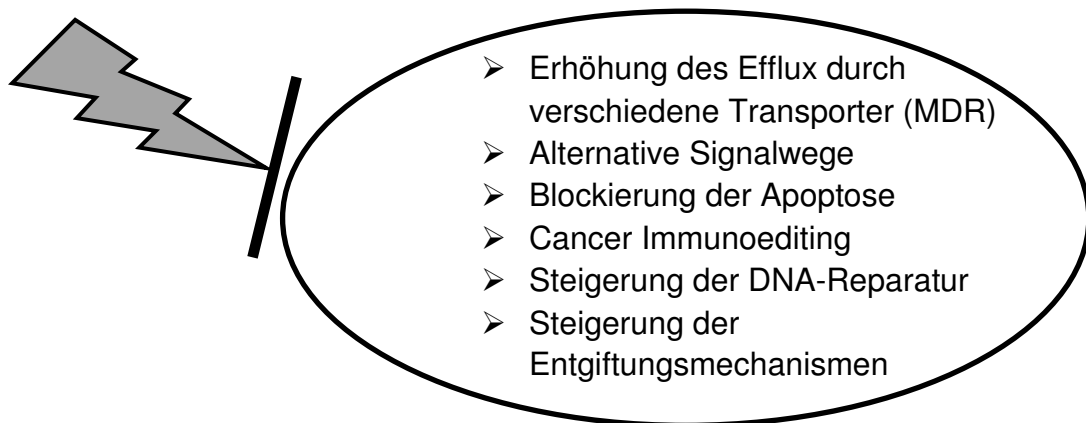
Zusätzlich wurde die Side-Population-Analyse mittels der Hoechst-Färbung durchgeführt. Die Färbung erfolgte nach dem von Goodell et al etablierten Protokoll von 1996<sup>65</sup>. Zu beachten ist, dass man sich mit der Hoechst-Färbung einen aktiven biologischen Prozess zu Nutzen macht: der Hoechst-Farbstoff wird mittels multi-drug-like Transportern (u.a. ABCG2) aus der Zelle

herausgepumpt. Stellt sich nach der Färbung eine Gruppe von Zellen dar, die den Farbstoff nicht mehr enthält, kann man davon ausgehen, dass sie multi-drug-like Transporter besitzt und somit eine stammzell-ähnliche Eigenschaft.

## 8. Chemosensitivität

Das MM ist ein außergewöhnlich chemoresistenter Tumor. Die Mechanismen, die diese Resistenz vermitteln, sind nicht vollständig geklärt. Es gibt jedoch Erklärungsansätze. Ein Grund für die Therapieresistenz kann von der Ähnlichkeit der Melanomzellen mit Stammzellen herrühren.

Abb. II.9 Übersicht über die Chemoresistenzmechanismen maligner Zellen



➤ Multi-Drug-Resistance<sup>67</sup> (s.o.): Hierzu gehören u.a. verschiedene Transporter und Pumpen, die schädliche Stoffe – wie z.B. Chemotherapeutika – wieder aus der Zelle hinaus schleusen. In der vorliegenden Arbeit wurde der Transporter ABCG2 auf den Melanomzellen getestet.

➤ Alternative Signalwege: Maligne Zellen können einer Behandlung durch die kompensatorische Aktivierung alternativer Signalwege entgehen<sup>117</sup>. In der zielgerichteten Therapie, in der man spezifische Signalwege blockiert, kann die Wirkung also dadurch eingeschränkt sein, dass die Zelle einen alternativen Signalweg zur Verfügung hat und dieser dann vermehrt aktiviert wird.

➤ Apoptosedefekte: Ein weiterer Mechanismus, der ebenfalls zum chemoresistenten Erscheinungsbild des MM beiträgt, ist der der modulierten Apoptose<sup>118</sup>. Es konnte gezeigt werden, dass im MM im Vergleich zu anderen Neoplasien ein sehr geringer Level an spontaner Apoptose zu finden ist. Dies lässt die Vermutung zu, dass ein oder mehrere defekte

Apoptose-mechanismen und damit eine erhöhte Reizschwelle zur Apoptoseauslösung für den geringeren Grad an Chemosensitivität mit verantwortlich ist.

➤ Ein weiterer Faktor, der die Resistenz eines Tumors steigern kann, ist die Hochregulierung von DNS-Reparaturmechanismen sowie von Enzymen, die das jeweilige Medikament metabolisieren<sup>118</sup>.

Für die Behandlung von Krebspatienten bedeutet dies wiederum, dass es keine stetige Behandlung mit ein und demselben Medikament über einen längeren Zeitraum geben kann<sup>161</sup>. Die Tumorzellen werden mit der Zeit Resistenzmechanismen entwickeln und unempfindlich für die Behandlung werden. Eines der gegenwärtigen Forschungsziele besteht darin vorherzusagen, welche Therapie für einen Patienten geeignet ist und wie lange sie erfolgreich gegen den Tumor wirken kann. Dies wäre ein großer Schritt in Richtung der personalisierten Therapie. In einem Teilprojekt der vorliegenden Arbeit wurden deshalb Chemosensitivitätstests an Melanomzellen aus der Zellkultur durchgeführt. Mit der Isolierung von ZTZ aus dem behandelten Patienten, die in dieser Arbeit ebenfalls etabliert wurde, wäre durch Chemosensitivitätstestung der ZTZ auch eine Überprüfung der Wirksamkeit der aktuellen Chemotherapie gegen diese Zellen möglich.

## 9. Wichtige Signalwege im malignen Melanom

Da im Rahmen der Chemosensitivitätstestung mehrere Inhibitoren getestet wurden, die eine Blockade eines bestimmten Signalwegs bewirken sollen, wird hier kurz auf die wichtigsten Signalwege im MM eingegangen. Die Weiterleitung von Reizen bezeichnet man allgemein als Signaltransduktion. Oftmals sind daran Enzyme in mehreren hintereinander geschalteten Ebenen beteiligt, man spricht dann von Signalkaskaden. Zum Teil erfolgt im Rahmen einer Signalkaskade auch eine Amplifikation, also eine Verstärkung, des ursprünglichen Signals. Im Zellkern oder im Zytoplasma können Signale mehrerer Signalkaskaden verbunden und so miteinander integriert werden („Crosstalk“). Die Gesamtheit aller Signalkaskaden in einer Zelle wird als ihr Signalnetzwerk bezeichnet. Diese Netzwerke sind, je nach Bedarf oder Entwicklungsstufe, anpassungsfähig und damit variabel. Am Ende der

Signalkaskade steht immer die Aktivierung eines Effektorproteins, z.B. eines Transkriptionsfaktors, der bestimmte zelluläre Antworten vermittelt. Ausgangspunkt einer jeden Signalkaskade ist ein extra- oder intrazellulärer Stimulus<sup>162</sup>.

Die Übermittlung und Weiterleitung von extrazellulären Signalen in eine Zelle hinein wird zu einem großen Teil durch Proteinkinasen gewährleistet. Proteinkinasen sind Enzyme, die Phosphorylierungen durchführen: sie übertragen einen Phosphatrest von einem Nukleosidtriphosphat auf andere Moleküle, vor allem auf Hydroxygruppen. Durch diesen Vorgang werden Moleküle aktiviert und Signalkaskaden im Zellinneren ausgelöst. Wichtige Proteinkinasen sind die Rezeptor-Tyrosinkinasen (im Folgenden abgekürzt mit RTKs). RTKs gehören, neben den Ionenkanälen und den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, zu den Transmembranrezeptoren. Sie bestehen aus einer extrazellulären, einer transmembranären und einer intrazellulären Domäne. Sie können so Signale außerhalb der Zelle empfangen und durch eine Konformationsänderung das Signal in das Zellinnere weiterleiten. In ihrer intrazellulären Domäne tragen RTKs eine Tyrosinkinase, die die Phosphorylierung an Tyrosinresten von Proteinen ermöglicht<sup>162</sup>.

Bei einer tumorösen Entartung kann es vorkommen, dass wachstumsfördernde Signalwege durch Mutationen ständig aktiviert sind. Durch eben diese Aktivität bieten die ständig aktiven Proteinkinasen aber auch einen Ansatzpunkt für eine Intervention von außen. Blockiert man durch einen Inhibitor der entsprechenden Kinase den Signalweg, kann dies unter Umständen zum Zelltod oder zumindest zu einer Beeinträchtigung des Tumorwachstums führen. Im Folgenden werden drei Signalkaskaden vorgestellt, die in vielen MM konstitutiv aktiv sind.

#### 9.1. Die MAPK-Signalkaskade (MAPK= Mitogen activated protein kinase)

Die MAPK-Signaltransduktion besteht aus mehreren Phosphorylierungsstufen, die Übermittlung des Signals ist hierarchisch gegliedert<sup>119,158</sup>. Es sind mindestens drei Kinasen hintereinander geschaltet: eine MAP-Kinase-Kinase-Kinase (auch MAP-KKK oder MAP3K genannt), eine MAP-Kinase-Kinase (auch MAP-KK oder MAP2K) und eine MAP-Kinase

(MAPK). Diese Kinasen werden in der aufgeführten Reihenfolge hintereinander aktiviert. An die MAPK-Phosphorylierung schließen sich dann weitere Signalwege an. Je nach dem auslösenden Stimulus variieren die spezifischen Komponenten, aber die Struktur des Signalweges, die hierarchische Gliederung der hintereinander geschalteten Kinasen, bleibt gleich. Die für das Melanom wichtige MAP-Signaltransduktionkaskade setzt sich wie folgt zusammen<sup>119</sup>: Erster Schritt ist die Aktivierung von Ras, einem GTP-bindenden Protein durch einen extrazellulären Stimulus. Nachfolgend wird Raf, die MAPKKK, aktiviert und anschließend die MAPKK Mek1/2. Daraufhin aktiviert Mek1/2 die MAPK Erk. Erk kann sowohl im Zytosol verschiedene Zielproteine kontrollieren, als auch in den Nukleus translozieren. Dort kann es verschiedene Transkriptionsfaktoren phosphorylieren und somit die Genexpression seiner Zielgene regulieren.

Im MM kommt in 50-60% der Fälle eine Mutation im Gen BRAF vor<sup>117,120</sup>, was eine konstitutive Aktivierung des MAPK-Signalweges zur Folge hat. Nachdem im MM einige Driver-Mutationen, wie z.B. die BRAF V600E-Mutation, bekannt sind, wird immer mehr versucht, das Tumorstadium durch eine spezifische Blockade der entsprechenden Signalwege einzudämmen.

## 9.2. Die PI3K/Akt-Signalkaskade

Auch die PI3K Kaskade kann durch RTKs aktiviert werden. Eine Aktivierung von PI3K hat hauptsächlich die Aktivierung von Akt, einer Serin/Threonin-Kinase zur Folge. Akt ist ein Proto-Onkogen und spielt eine wichtige Rolle im Tumorstadium. Akt reguliert unter anderem durch seine Effekte auf mTOR das Zellwachstum. Aber auch andere wichtige Bereiche wie der Zellzyklus und die Proliferation werden von Akt vermittelt. Außerdem kann Akt durch die Inhibition von pro-apoptotischen Signalen ein verbessertes Überleben der Zelle erreichen<sup>121,122</sup>.

## 9.3. Die mTOR-Signalkaskade

mTOR (= mammalian target of rapamycin) ist eine atypische Serin/Threonin-Proteinkinase. mTOR tritt in zwei unterschiedlichen Komplexen in Erscheinung: mTORC1 (= mTOR Komplex 1) und mTORC2 (= mTOR Komplex2).



Bei Krebserkrankungen, auch beim MM, tritt eine abnorme mTor-Signalgebung auf<sup>117</sup>. mTor erfüllt zahlreiche Funktionen und ist am Stoffwechsel, Wachstum und Proliferation der Zellen beteiligt. In Gang gesetzt werden kann diese Signalkaskade z.B. durch die Bindung von Wachstumsfaktoren wie VEGF.

#### 9.4. Hemmung der Signalwege durch Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI)

Im Feld der RTK-Inhibitoren hat sich in den letzten Jahren und Jahrzehnten viel bewegt. Zahlreiche neue Inhibitoren wurden entdeckt, aber das Potential der einzelnen Inhibitoren ist noch weitestgehend unbekannt. Nachdem das MM ein sehr heterogener Tumor ist, kann man davon ausgehen, dass es zahlreiche unterschiedliche Mutationen gibt; das bedeutet, dass jedes Melanom etwas anders auf die Blockierung eines Signalweges reagiert. Es gibt also kein schematisiertes Behandlungsregime. Man muss für jeden Patienten eine individuelle Therapie finden. In der vorliegenden Arbeit wurden mehrere Inhibitoren des MAPK- und der PI3K-Akt-Kaskade getestet: Axitinib, Cediranib, Motesanib, Pazopanib, Sorafenib und Sunitinib stellen Multikinaseinhibitoren dar, die nicht spezifisch für einzelne Kinasen sind, sondern an mehreren Angriffspunkten ansetzen.

Sorafenib greift an mehreren Zielstrukturen an und inhibiert dort ATP-kompetitiv die Kinaseaktivitäten. Sorafenib war als Raf-Inhibitor konzipiert und wurde in einem Entwicklungsprogramm entdeckt. Erst später stellte man fest, dass es auf mehrere Zielstrukturen wirkt. So kann durch Sorafenib u. a. der wichtige MAPK-Signalweg unterbrochen werden. Dies kann einerseits durch die Hemmung der konstitutiv aktiven Ras- und Raf-Kinasen geschehen, andererseits aber auch durch die Hemmung der exogenen Kinaseaktivierung durch Wachstumsfaktoren wie z.B. VEGF und PDGF<sup>123,124</sup>. Sorafenib kann verschiedene Isoformen der Ras-Kinase hemmen<sup>123,124</sup>: C-Raf, Wildtyp B-Raf und die im Melanom häufige B-Raf Mutation<sup>117,120</sup>. Die Dosierung beträgt 400mg zweimal täglich, seine Halbwertszeit liegt zwischen 25 und 48h<sup>123</sup>.

In Kombinationstherapien von Sorafenib mit Zytostatika wie Temozolomid oder Carboplatin hoffte man auf synergistische Effekte; jedoch sind diese,

zumindest in der Behandlung des MM, noch nicht nachgewiesen<sup>125</sup>. Sorafenib ist seit 2006 zugelassen für die Behandlung des Nierenzell- und des Leberzellkarzinoms.

Auch Sunitinib ist ein Multikinaseinhibitor und hat daher eine ähnliche Wirkung wie Sorafenib. Die Dosierung beträgt 50mg einmal täglich, es wird oral verabreicht. Die Halbwertszeit liegt bei 40-60h<sup>126</sup>.

Axitinib, Cediranib, Motesanib, und Pazopanib werden als die „Angiogeneseinhibitoren der Zukunft“<sup>127</sup> oder auch als TKIs der 2. Generation bezeichnet. Sie inhibieren VEGF, PDGF, Kit und z.T. auch noch andere Kinasen. Ihre Wirkung ist momentan Gegenstand zahlreicher Studien.

Neben den Multikinaseinhibitoren wurden auch die spezifischeren Bcr-Abl-Inhibitoren getestet. Bcr/Abl ist ein chimäres Fusionsgen. Es entsteht durch eine Translokation. Beide Fusionsproteine sind konstitutiv aktive Tyrosinkinase, die nicht membrangebunden sind<sup>128</sup>. Die TKIs Imatinib, Nilotinib und Dasatinib stellen ATP-kompetitive Inhibitoren für Bcr-Abl dar.

Imatinib hemmt neben Bcr/Abl auch cKit und PDGF, aber keine anderen Tyrosinkinase. Es wurde 2001 von der FDA und der EMEA für die Behandlung der chronischen myeloischen Leukämie (CML) zugelassen. Ebenso ist es für die Behandlung von gastrointestinalen Stromatumoren zugelassen. Durch Imatinib hat die Behandlung von CML erhebliche Fortschritte gemacht, da es erstmals möglich war, die molekulare Ursache der CML anzugreifen. Beim MM wurden bislang widersprüchliche Publikationen hinsichtlich der Wirkung von Imatinib veröffentlicht<sup>129-131</sup>. Die Halbwertszeit des oral verabreichten Imatinib beträgt 18 h. Dosierte wird es mit 400mg/d<sup>132</sup>.

Nilotinib wurde entwickelt, um im Vergleich zu Imatinib noch stärker und noch selektiver wirksam zu sein. Es ist in der Behandlung der CML gegen 32 der 33 Mutationen wirksam, die zu einer Imatinib-Resistenz führen können. Wie Imatinib ist auch Nilotinib gegen cKit und PDGF wirksam<sup>133</sup>. Seit 2007 ist Nilotinib in der EU und den USA zugelassen<sup>135</sup>. Seine Halbwertszeit beträgt 17h, die eingesetzte Dosierung bei CML beträgt 300-400mg zweimal täglich<sup>134</sup>.

Dasatinib ist, nach der Imatinib-Generation, ein Bcr/Abl-Inhibitor der 2.

Generation. Es hat ein weites Wirkungsspektrum und greift an mehreren Kinasen an. Dasatinib wird als hochpotenter Bcr/Abl-Inhibitor eingestuft, der gegenüber Imatinib eine um das 325fache gesteigerte Wirkung auf Wildtyp Bcr/Abl hat<sup>135</sup>. Darüber hinaus hat Dasatinib die Fähigkeit, aktive und inaktive Formen von Bcr/Abl zu binden<sup>136</sup>. Weder Imatinib noch Nilotinib besitzen diese Fähigkeit. Neben der Bcr/Abl-Hemmung kommt es auch zu einer nahezu kompletten Inhibierung von Src<sup>137</sup>. Dadurch werden Migration und Invasion der Tumorzellen beeinträchtigt. Beim MM wurde eine Wirkung gegenüber Src, cKit, aktivierenden Kit-Mutationen und Knochenmetastasen gezeigt<sup>138,139</sup>. Die terminale Halbwertszeit von Dasatinib beträgt 35,4h. Als klinisch relevante Plasmakonzentration werden 100-500ng/ml angegeben. Dasatinib kann oral verabreicht werden, die Dosierung wird mit 100-140mg/d veranschlagt, bei einmaliger täglicher Gabe<sup>128</sup>.

Ebenfalls getestet wurden in der vorliegenden Arbeit die beiden mTor-Inhibitoren Everolimus und Temsirolimus. Bei beiden Inhibitoren handelt es sich um Rapamycin-Analoga. Beide Stoffe entfalten ihre inhibitorische Wirkung durch Bindung an das intrazelluläre Protein FK506-binding protein 12 (FKBP12), wodurch die Kinasenaktivität von mTor gehemmt wird. Sie beeinträchtigen jeweils nur mTorC1. Dadurch können Everolimus und Temsirolimus gegen das Tumorwachstum wirken. Temsirolimus wird intravenös verabreicht, während Everolimus zur oralen Gabe geeignet ist<sup>140</sup>. Beide Stoffe sind von der FDA zugelassen für die Behandlung des fortgeschrittenen Nierenzellkarzinoms, sofern Sorafenib und Sunitinib keine Wirkung erzielen konnten<sup>140,141</sup>. Für das MM liegen noch keine Therapieschemata vor.

## 9.5. TKIs in der Veterinärmedizin

Auch in der Krebstherapie bei Tieren werden TKIs angewendet. Bei Mastzelltumoren der Hunde wird z.B. Masitinib verwendet. Es inhibiert cKit, PDGFR und FGFR-3. Es wurde 2009 für die Veterinärmedizin zugelassen und ist als Tablette zur oralen Gabe verfügbar<sup>142</sup>. Auch Toceranib kann bei Hunden mit Mastzelltumoren eingesetzt werden<sup>143</sup>; es wirkt durch Inhibierung von Kit und hat auch antiangiogenetische Wirkung. Ganz neu im Feld der

tiermedizinischen TKIs ist Oclaticinib. Es erreichte die Zulassung im September 2013. Oclaticinib hemmt die Januskinase und damit die Ausschüttung des Juckreiz fördernden IL-31. Es kommt bei allergischen Hunden sowie bei atopischer Dermatitis mit guten Erfolgen zum Einsatz<sup>144,145</sup>.

#### 9.6. Andere Medikamente in den Chemosensitivitätstests

In der vorliegenden Arbeit wurden außer den TKIs auch noch andere Wirkstoffe aus der Gruppe der klassischen Chemotherapeutika getestet:

➤ Carboplatin ist ein Alkylanz, es handelt sich um einen Cisplatin-Abkömmling. Seine Wirkung erzielt es durch seine Fähigkeit, an die DNS binden zu können. In der DNS-Helix entstehen dadurch intermolekulare Verknüpfungen zwischen den Strängen, was den Zelltod zur Folge hat. Carboplatin wirkt besonders auf sich schnell teilende Zellen, daher resultieren auch seine Nebenwirkungen. Es wird als Infusion intravenös, meistens als Teil einer Kombinationschemotherapie, verabreicht. Seine Halbwertszeit im Körper beträgt etwa 30h. Bei einem Erwachsenen beträgt die Dosierung  $400 \text{ mg/m}^2 \text{ KOF}$ , wenn es als Monochemotherapie angewendet wird. In der Regel wird es in mehreren Zyklen verabreicht. Beim Einsatz mehrerer Chemotherapeutika in einer Kombinationstherapie kann die Dosis reduziert werden.

➤ Temozolomid ist ebenfalls ein Alkylanz. Es handelt sich um einen Dacarbazin-Abkömmling. Temozolomid ist die Vorstufe von Methyltriazeno-Imidazolcarboxamid (MTIC), welches das aktive Alkylanz ist. Temozolomid wird bei physiologischen pH spontan in MTIC konvertiert. Dieses schädigt durch Alkylierung die DNS und der Zelltod wird ausgelöst. Erwähnenswert ist hier, dass einige Tumorzellen in der Lage sind, die durch Temozolomid hervorgerufenen Schäden wieder zu reparieren. Dies geschieht durch das Enzym O-6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) oder auch O-6-alkylguanine-DNA-alkyltransferase (abgekürzt als AGT oder AGAT)<sup>146</sup>. Wird dieses vermehrt exprimiert, resultiert daraus eine Unempfindlichkeit der Tumorzelle gegenüber Temozolomid. Temozolomid wird oral verabreicht. Seine Dosierung beträgt  $150 \text{ mg/m}^2 \text{ Tag}$  1-5 alle 4 Wochen. Im Gegensatz zu Dacarbazin ist es liquorgängig und kann auch bei Hirnmetastasen

eingesetzt werden. Die Erfolgsrate betreffend die Tumorremission beim Einsatz als Monochemotherapie ist ähnlich wie die von Dacarbazin<sup>147</sup>.

➤ Paclitaxel ist ein Mitosehemmer. Es stabilisiert in der Mitose die Mikrotubuli, welche dann nicht mehr abgebaut werden können. Seine terminale Halbwertszeit beträgt 8-12 h. Paclitaxel wird als Infusion verabreicht. Beim MM wird es oft in Kombination mit Carboplatin angewendet; die Dosierung beträgt dann 225 mg/m<sup>2</sup> KOF alle 3 Wochen<sup>148</sup>.

## 10. Fragestellung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden drei Projekte bearbeitet, deren Fragestellungen ineinander greifen.

### Die Charakterisierung von Melanomzellen aus der Zellkultur

Ziel ist es, eine Markerkombination zu finden, die auf allen oder zumindest sehr vielen Melanomzellen vorkommt und sie somit zuverlässig charakterisieren kann. Zusätzlich soll die Heterogenität der Melanomzellen innerhalb eines Patienten bzw innerhalb eines Tumors untersucht werden. Es wird getestet, ob verschiedene Untergruppen von Melanomzellen, wie z.B. Melanomstammzellen, darstellbar sind. Zur Melanomzellcharakterisierung wird die Durchflusszytometrie angewendet, die es erlaubt, eine Vielzahl von Markern gleichzeitig zu testen.

### Die Identifizierung und Isolierung zirkulierender Melanomzellen

Im Anschluss an die Melanomzellcharakterisierung soll im zweiten Projekt getestet werden, ob die Markerkombination dazu fähig ist, zirkulierende Melanomzellen aus dem peripheren Blut von Melanopatienten heraus zu identifizieren. Darüber hinaus sollen die zirkulierenden Melanomzellen isoliert und kultiviert werden. Die Zellen sollen dann für weitere Analysen, z.B. Chemosensitivitätstests, zur Verfügung stehen, weshalb eine sehr schonende Isolierung sowie eine anschließende Kultivierung und Expansion nötig ist.

### Chemosensitivitätstestung an Melanomzellen aus der Zellkultur

Für die spätere Untersuchung der kultivierten zirkulierenden Melanomzellen, aber auch expandierter Melanomzellen aus soliden Tumoren, sollen Chemosensitivitätstestungen etabliert werden um in vitro verschiedene Therapieoptionen testen zu können. Untersucht wurden verschiedene Zytostatika sowie Kinaseinhibitoren. So soll erreicht werden, dass dem Patienten unwirksame Therapien erspart bleiben und die wirksamen Medikamente schnellstmöglich zum Therapieerfolg führen.

### III. MATERIAL UND METHODEN

#### 1. Material

##### 1.1. Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Genaue Bezeichnung	Hersteller
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline 0,0095 M (PO <sub>4</sub> ) ohne Ca und Mg, Bio Whittaker®, steril filtriert für Zellkultur, 500 ml	Lonza, Verviers, Belgien
L-Glutamine	Bio Whittaker®, 200 mM in 0.85% NaCl Solution, steril filtriert für Zellkultur, 100 ml	Chambrex
EDTA	AccuGENE® 0,5 M EDTA Solution, Disodium Salt, pH 8,0, 100 ml	Lonza, Verviers, Belgien
PBS-EDTA	500 ml DPBS + 1ml 0,5M EDTA	Lonza, Verviers, Belgien
Human Serum	Bio Whittaker® steril filtriert, 500 ml,	Lonza, Verviers, Belgien
RPMI 1640	ohne L-Glutamin, Bio Whittaker®, steril filtriert für Zellkultur, 500 ml	Lonza, Verviers, Belgien
Tumormedium	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ 500 ml RPMI 1640</li> <li>➤ 50 ml Human Serum</li> <li>➤ 5 ml L-Glutamin</li> <li>➤ 200 µl Gentamycin</li> </ul>	Selbst hergestellt
Gentamycin	Gentamycin 50mg/ml	PAA
Glucosteril 40%	Wirkstoff: Glucose Monohydrat; Injektionslösung zur intravenösen Anwendung, 10 ml	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg
HSA	Human Albumin 200 g/l, Infusionslösung, 50 ml	Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim
DMSO	Dimethylsulfoxide 100 ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Einfriermedium	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ 50 ml 40% Glucosteril</li> <li>➤ 110 ml 20% HSA</li> <li>➤ 40 ml DMSO</li> </ul>	Selbst hergestellt
Lymphoprep™	Density: 1,077 +/- 0,001 g/ml (20°C); Osmolality: 290 +/- 15 mOsm; steril und auf Endotoxine geprüft; 500 ml	produziert von Fresenius Kabi Norge AS für Axis Shield Poc AS, Oslo

## 1.2. Verbrauchsmaterialien

Material	Genau Bezeichnung	Hersteller
Falcons	15 und 50 ml	BD, Heidelberg
FACS-Röhrchen	Falcon 5 ml Polystyrol Rundboden-Röhrchen, 12 x 75 mm, nicht steril, mit und ohne integriertem Zellsieb	BD, Heidelberg
1x Pipetten 5, 10 und 25 ml	einzelnd verpackt, sterilisiert	Corning Incorporated, Corning, USA
Pipettenspitzen (blau 1000 µl; gelb 200 µl; weiß 10 µl)	Nicht sterilisiert	Sarstedt, Nümbrecht
Einfrier Röhrchen	Cryovials mit Innengewinde	Nunc, Langenselbold
Zellkulturflaschen, 25 mm <sup>2</sup> , 75 mm <sup>2</sup> und 175 mm <sup>2</sup>	Nunc	Nunc, Langenselbold
Zellkulturplatten, 6-, 12-, 24-, 48- und 96 Wells	Sterilisiert, Flachboden-Multiwell-Platten	BD, Heidelberg
Zellsieb	Cell Strainer 100 µm und 70 µm, BD Falcon	BD, Heidelberg
Vakuum-Filter	Presterilized Stericup Express™ Plus 0,22 µm	Millipore, Massachusetts, USA
Pasteurpipetten aus Glas	sterilisiert	Brand, Wertheim
20 ml Spritzen	Steril, BD Discardit™ II	BD, Heidelberg
Membran Adapter für 20 ml Spritzen		Sarstedt, Nümbrecht
Heparin	Heparin-Natrium 5000 IE/0,2 ml; Antithrombotikum	Ratiopharm, Ulm
Kanülen	Safety-Multifly-Set, pyrogenfrei 21Gx3/4"TW 0,8x19 mm	Sarstedt, Nümbrecht
MACS Columns	Large Cell Separation Columns, steril	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Handschuhe	Peha Soft, puderfrei	Paul Hartmann AG, Heidenheim

## 1.3. Geräte

Gerät	Hersteller
Zellzähler Casy-1	Schärfe System GmbH, Reutlingen
Megafuge 2.0R (Zentrifuge für FACS-Röhrchen)	Heraeus Instruments, Hanau
Multifuge 3 S-R (Zentrifuge für 15 und 50 ml Falcons)	Heraeus Instruments, Hanau
Pipetten 1 – 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe Pipet Aid	Drummond, Broomall, Pennsylvania, USA
Durchflußzytometer Canto II	BD, Heidelberg
Durchflußzytometer, Zellsortierer Aria II, SORP	BD, Heidelberg
Wasserbad	Julabo, Seelbach
Begasungsbrutschrank	Heraeus, Hanau
Sterilbank	Heraeus Hera Safe, Hanau



Gerät	Hersteller
MACS-Separator MiniMACS	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

#### 1.4. Antikörper und Kits für die Charakterisierung und Identifizierung von Melanomzellen

##### 1.4.1. Antikörper

Eine Beschreibung der einzelnen Marker, die auch den Zusammenhang des jeweiligen Markers mit dem MM erläutert, ist in der Einleitung enthalten.

Zielstruktur	Konjugat	Eingesetzte Menge in $\mu\text{l}/100\mu\text{l}$	Hersteller
ABCG2	Biotin	4	R&D Systems
CD20	APC-H7	5	BD Biosciences
CD20	PE	5	BD Biosciences
CD45	PerCp	5	BD Biosciences
CD45	PE	5	BD Pharmigen
CD54 = ICAM	Biotin	5	BD Pharmigen
CD133	APC	5	Miltenyi Biotec
CD166	PE	5	BD Pharmigen
CD271 = NGFR	FITC	5	Miltenyi Biotec
CD325 = N-Cadherin	PE	10	Ebioscience
cKit = CD117	FITC	3	Chemicon International
HLA-ABC	PE-Cy5	5	BD Pharmigen
HLA-DR	APC-H7	2	BD Biosciences
Integrin $\beta 7$	PE	5	BD Pharmigen
MCAM = CD146	FITC	3	Miltenyi Biotec
MCSP	APC	1	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
MelanA	PE	5	Santa Cruz Biotechnology
Notch1	PE	5	Bio Legend
Tyrosinase	PE	5	Santa Cruz Biotechnology
Streptavidin	PE-Cy7	1	BD Pharmigen
7AAD	PerCP	$1\mu\text{l}/1000\mu\text{l}$	Molecular Probes, Inc., Eugene, USA
Live/Dead	Pacific Orange	$1\mu\text{l}/500\mu\text{l}$	Molecular Probes, Inc., Eugene, USA

#### 1.4.2. Antikörper und Kits für die Identifizierung von Melanomzellen mit stammzell-ähnlichen Eigenschaften

- Antikörper (s. auch Antikörper zur Charakterisierung von Melanomzellen):

CD20, CD133, CD271, cKit, Notch1

- Kits

Kits	Farbe	Hersteller
Aldefluor	FITC	StemCell Technologies
Hoechst 33342 trihydrochloride, trihydrate 16,2 mM, (10mg/ml), solution in water	UV-Laser (Excitation/ Emission: 350/461)	Invitrogen Molecular Probes

#### 1.4.3. Antikörper und Kits für die Identifizierung und Isolierung von zirkulierenden Melanomzellen aus Patientenblut

- Antikörper für die Identifizierung von zirkulierenden Melanomzellen aus Patientenblut: CD45, MCAM, MCSP (Sorts 1-13) (s.o.)

Außerdem noch CD14 und CD16 (Sorts 14-20)

Zielstruktur	Farbe	Eingesetzte Menge in µl/100µl	Hersteller
CD14	V450	5	BD Biosciences
CD16	Pacific Orange	5	Invitrogen Molecular Probes

- Kits für die Isolierung von zirkulierenden Melanomzellen aus Patientenblut

RosetteSep	Eingesetzte Menge	Hersteller
CD45 Depletion Cocktail for Enrichment of Circulating Epithelial Tumor Cells (5 x 2ml → for labelling 200 ml blood)	50 µl/ml Vollblut	Stem Cell Technologies, Grenoble, Frankreich
MACS® Microbeads	Eingesetzte Menge	Hersteller
MCSP	100 µl/5x10 <sup>7</sup> Zellen	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD45	20 µl/1x10 <sup>6</sup> Zellen	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

Tab.III.1 Übersicht Patientenmaterial

Sortnummer/ Gruppe	Jahrgang/ Alter bei Sort	Sex	Sortdatum	ml Blut/ Anzahl ZTZ	Melanomform	Stadium	Sonstiges
ErSo1/nb	1943/66	M	18.08.2010	55/2,2	nb	nb	nb
ErSo2/III	1962/48	M	25.08.2010	60/30,8	nb	nb	MIA↑, S100↑
ErSo3/II und III	1926/84	M	07.09.2010	25/6,4	nb	nb	MIA↑, S100↑, Knochenmarksmetastase
ErSo4/III	1949/60	M	08.09.2010	25/4	Kutanes High Risk Melanom	IIB; pT3b	MIA ↑
ErSo5/III	1934/75	W	27.10.2010	47/22,8	IIB	nb	S100↑
ErSo6/III	1961/49	W	24.02.2011	60/12	Kutanes Low Risk Melanom	IB; pT1b	S100↑
ErSo7/III	1956/54	M	24.02.2011	60/16,3	nb	nb	MIA↑ konstant
ErSo8/III	1933/77	M	25.02.2011	40/5,8	Kutanes High Risk Melanom	IIB; pT3b	MIA↑, S100↑
ErSo9/III	1937/73	M	06.10.2010	40/2,8	Schleimhaut-Melanom	IIIB; N2b	MIA↑; 2003 Filiae im Lymphknoten
ErSo10/I	1967/43	M	11.05.2011	60/19,3	Kutanes High Risk Melanom	IIIA; N2a	Mikrometastasen in 2 Lymphknoten; Lymphangiome
ErSo11/I	1945/66	M	30.05.2011	40/29,8	Uvea Melanom	nb	Hautmetastase ohne Leberbeteiligung
ErSo12/III	1953/58	M	08.06.2011	40/23,5	Kutanes Low Risk Melanom	IA; pT1a/b	MIA↑, S100↑
ErSo13/I und III	1945/66	M	06.07.2011	60/20,8	nb	nb	MIA und S100 ondulierend
ErSo14/III	1960/51	M	03.08.2011	54/21,7	nb	nb	MIA↑, S100↑
ErSo15/III	1962/49	M	03.08.2011	25/31,6	nb	nb	MIA↑, S100↑
ErSo16/III	1938/73	M	10.08.2011	60/34,7	Uvea Melanom	nb	Metastasiert, MIA↑
ErSo17/III	nb	W	21.10.2011	60/61,5	Uvea Melanom	nb	MIA ↑
ErSo18/nb	1971/39	M	26.10.2011	60/104,7	nb	nb	nb
ErSo19/III	1963/49	M	09.11.2011	34/47,4	nb	IV	MIA und S100 ondulierend
ErSo20/III	1961/51	M	09.11.2011	60/25,2	nb	nb	nb
ErSo21/nb	1932/78	M	16.11.2011	40/20,3	nb	nb	nb

nb = nicht bekannt

Tab. III.2 Übersicht Melanomzellkultur

Zelllinie	Jahrgang/ Alter bei OP	Stadium	Melanomform	Bemerkung
ErMel1	-	gekauft	-	-
ErMel2a,b	1965/44	MUP	IV	Hirnmetastasen; Erhöhte Tumormarker (S100 7,59, MIA 201,4)
ErMel3	1972/36	MM	IV	Hirnmetastasen
ErMel4	1949/59	NMM	IV	multiple eingeblutete Hirnfilae
ErMel5	nb	nb	nb	nb
ErMel6a,b	1938/72	Kutanes NMM	IV	Metastasiertes MM
ErMel7	1944/65	ALM	IV	nb
ErMel8	1946/62	Schleimhaut Melanom	Keine cKit Mutation Knochenmarksmetastasen	1) DTIC, Zometa 3x 2) HV Sorafenib, DTIC Kurzes Ansprechen auf Sorafenib
ErMel9	1960/49	NMM	IV	Hirnfilae
ErMel10	1974/34	SSM, sekundär nodulär	IV,M1c	Hirnfilae
ErMel11	1955/53	MM	IV	nb
ErMel12	1954/53	NMM	IV	Metastasiert S100 erhöht

nb = nicht bekannt

Tab. III.2 Übersicht Melanomzellkultur

ErMel13	1940	Kutanes MM	IV	nb	keinerlei Ansprechen auf Chemo, KI, oder Radiatio
ErMel14a,b,c	1955/1. OP 52, 2. OP 54	SSM	IV	Hirnmetastasen	1) Radatio, IFN $\alpha$ 2) DTIC 7x in Kombination mit Sorafenib; Sehr gutes Ansprechen auf DTIC + Sorafenib für 12 Monate – von 1/09 bis 2/10 3) Fotemustine, Sorafenib
ErMel15	nb	nb	nb	nb	nb
ErMel16	1988	MM	IV	nb	Sorafenib, schlechter Verlauf, Hirnfiliae
ErMel17	1992	nb	nb	nb	Sorafenib-, BRAf600D Mutation
ErMel18	1929	SSM pT1b	nb	nb	nach 1 Jahr multiple intransit Filiae; DTIC / DNCB ohne Erfolg, HEP – 1 Jahr später Radiatio, dann ONTAK; unter IL2 intraläsional, Grössenwachstum, Amputation 9/2010, rezidivfrei bis jetzt
ErMel19	nb	nb	nb	nb	nb
ErMel20	1982	Kutanes MM	IV	nb	V600E+, kurzes Ansprechen auf Sorafenib
ErMel21	nb	nb	nb	nb	nb
ErMel22	1960	nb	nb	nb	nb
ErMel23	1940	Kutanes MM	IV	nb	keinerlei Ansprechen auf Chemo, KI, oder Radiatio
ErMel24a,b,c	1938	SSM	IV	Metastasiert	SSM 96, IV 2007, 1 Jahr stabil unter DTIC (8x), 1 Jahr unter Fotemustine (13x), ab 2/10 DC Vakzine und Bestrahlung
ErMel25a,b,c	1957/52	nb	nb	Unb. pT, Hirnfiliae Multipel metastasiert Zellen aus F5 angewachsen	1) Ganzhirnradiatio, Sorafenib und Temozolomid; Heilversuch abgebrochen 2) Carboplatin/Taxol; temporäre Wirksamkeit von Sorafenib und Carboplatin/Taxol

nb = nicht bekannt

## 1.5. Medikamente und Kits für die Chemosensitivitätstestung von Melanomzellen aus der Zellkultur

### 1.5.1. Medikamente

Medikament	Wirkungs- mechanismus	Konzen- tration im Plasma*	verwendete Konzent- ration**	Stamm- lösung	Hersteller
Axitinib	VEGFR und PDGFR Inhibitor	500 nM	2,5 µM	10mM	Selleck Chemicals LLC, Houston, USA
Cediranib	VEGFR Inhibitor	500 nM	2,5 µM	10mM	Selleck Chemicals LLC, Houston, USA
Motesanib Diphosphate	Hoch spezifischer VEGFR Inhibitor	3 µM	15 µM	10mM	Selleck Chemicals LLC, Houston, USA
Pazopanib Hydrochlorid	VEGFR und PDGFR Inhibitor	10 µM	50 µM	10 mM	Selleck Chemicals LLC, Houston, USA
Sorafenib Tosylate	VEGFR und PDGFR Inhibitor	500 nM	2,5 µM	30mM	Selleck Chemicals LLC, Houston, USA
Sunitinib Malate	VEGFR und PDGFR Inhibitor	500 nM	2,5 µM	10mM	Selleck Chemicals LLC, Houston, USA
Imatinib Mesylate	BCR/ABL Inhibitor	4 µM	20 µM	10 mM	Selleck Chemicals LLC, Houston, USA
Dasatinib	SCR und BCR/ABL Inhibitor	2 µM	10 µM	10 mM	Selleck Chemicals LLC, Houston, USA
Nilotinib	BCR/ABL Inhibitor	3 µM	15 µM	9,4 mM	Selleck Chemicals LLC, Houston, USA
Everolimus	mTor-Inhibitor	500 nM	2,5 µM	10 mM	Selleck Chemicals LLC, Houston, USA
Temsirolimus	mTor-Inhibitor	500 nM	2,5 µM	10 mM	Selleck Chemicals LLC, Houston, USA

Medikament	Wirkungs- mechanismus	Konzentration im Plasma*	verwendete Konzentration**	Stamm- lösung	Hersteller
Carboplatin	Alkylanz	5 $\mu$ M	25 $\mu$ M	38 mM	LKT Laboratories, Inc., St. Paul, USA
Paclitaxel	Mitosehemmer	4 $\mu$ M	20 $\mu$ M	10 mM	Selleck Chemicals LLC, Houston, USA
Temozolomid	Alkylanz	20 $\mu$ M	100 $\mu$ M	10 mM	LKT Laboratories, Inc., St. Paul, USA

\* in Patienten gemessene Plasmakonzentration

\*\* nach mehreren Vortests in den Chemosensitivitätstestungen verwendete Konzentration

### 1.5.2. Kits für die Messung der Chemosensitivität

Kit	Farbe	Konzentration Stammlösung/Arbeitslösung*	Exzitation/ Emission	Hersteller
CFSE	FITC	10 mM/1,25 mM	492/517 nm	Molecular Probes, Inc. Eugene, USA
7AAD	PerC P	Stock 1mg/ml (= 787 $\mu$ M) Verd. 1:1000 (also Färbelsg 7 nM)	488/647 nm	Molecular Probes, Inc. Eugene, USA
Sytox <sup>®</sup> Red Dead Cell Stain	APC	5 $\mu$ M in DMSO/5 nM	640/658 nm	Molecular Probes, Inc. Eugene, USA
MitoTracker <sup>®</sup> Mitochondrio- n-Selective Probes	APC	1mM/10nM	644/665 nm	Molecular Probes, Inc. Eugene, USA
6NBDG	FITC	10 mM/100 $\mu$ M	465/540 nm	Molecular Probes, Inc. Eugene, USA

\* wurde in mehreren Vorversuchen ausgetestet

## 2. Methoden

### 2.1. Blutentnahme

Blutspenden von gesunden Spendern erfolgten auf freiwilliger Basis nach einer ärztlichen Aufklärung über die Risiken einer Blutspende und auch darüber, was mit dem Blut passieren soll. Patienten, die auf zirkulierende Tumorzellen (ZTZ) untersucht wurden, wurden durch Herrn Prof. Eckhart Kämpgen über die Blutentnahme an sich sowie das Verfahren und den Zweck der Suche nach zirkulierenden Melanomzellen und der Zellsortierung

informiert und aufgeklärt. Die Blutentnahme erfolgte mittels einer Punktion mit einer Kanüle vom Typ Safety-Multifly-Set aus der mittleren Ellenbeugenvene (Vena mediana cubiti) in sterile Spritzen. Jede Spritze wurde vorher unter sterilen Bedingungen mit 50 µl Heparin als Antikoagulans präpariert. Es wurden für die ZTZ-Isolierung zwischen 20 und 60 ml Blut entnommen. Bei gesunden Spendern wurden zum Zweck der PBMC-Gewinnung und für Kontrollsorts zwischen 60 und maximal 300 ml Blut entnommen.

## 2.2. PBMC-Gewinnung mittels Dichtegradzentrifugation

Für die Vorversuche (Spiking-Experimente, Tests der verschiedenen Anreicherungsverfahren) wurden PBMCs aus dem Blut gesunder Spender verwendet. Die Isolierung der PBMCs wird durch eine Dichtegradzentrifugation erreicht. Diese stellt ein physikalisches Trennverfahren dar und ermöglicht eine Auftrennung der roten und weißen Blutkörperchen aus Vollblut. Diese Methode ist bereits mehrfach beschrieben und gilt als ein etabliertes Verfahren<sup>163-165</sup>.

Das gespendete Blut wird baldmöglichst nach der Spende weiter verarbeitet. Es wird im Verhältnis 2:1 (Blut:PBS) mit zimmerwarmem PBS verdünnt. Es werden je nach der Menge des gespendeten Blutes 50ml-Falcons vorbereitet, in die jeweils 15 ml Ficoll gegeben wird. Das Ficoll wird dann mit dem verdünnten Blut überschichtet. Das Ficoll hat eine Dichte von 1,077 g/ml und damit eine größere Dichte als Lymphozyten und Monozyten. Während der Zentrifugation (Beschleunigung 4, Bremse 2, 1500 U/min, 30 min, 23°C) erfolgt die Auftrennung aufgrund der unterschiedlichen Dichten in weiße und rote Blutbestandteile. Die Erythrozyten werden zusammen mit Thrombozyten, Granulozyten und toten Zellen nach unten sedimentiert, während die PBMCs in der Phase zwischen dem Ficoll und dem Serum angesammelt werden. Die Schichtung von unten nach oben ist also Erythrozyten – Ficoll – Lymphozyten und Monozyten – Serum. Der Ring aus PBMCs kann abpipettiert werden und wird dann in zwei Schritten nochmals gewaschen, da das Ficoll auch zelltoxisch wirken kann. Anschließend werden die Zellen im Casy-1 gezählt. Dann werden die Zellen mit jeweils 500µl EM und HSA eingefroren und bei -80°C bis zu ihrer Verwendung



aufbewahrt.

### 2.3. Leukapherese

Die Leukapherese stellt eine gängige und in der Klinik häufig angewandte Methode dar, Zellen aus Blut zu gewinnen. Dem Patienten wird während einer Leukapherese über einen Venenkatheder Blut entnommen. Dieses wird zentrifugiert und durch einen Zellseparator geleitet, welcher im Fall der Leukapherese die Leukozyten von den restlichen Blutbestandteilen trennt. Die restlichen Blutbestandteile werden dann wieder vermischt und über einen zweiten Venenkatheder wieder dem Patienten zugeführt.

### 2.4. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren, mit dem man Zelleigenschaften auf Einzelzellebene untersuchen kann. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei unterschiedliche Durchflusszytometer verwendet<sup>166,167</sup>.

- BD FACS CANTO II:
  - Charakterisierung von Melanomzellen
  - Messung der ALDH-Aktivität
  - Messung der Chemosensitivitätstests
- BD FACS ARIA, Special Order System:
  - Zellsortierung von Patientenblut
  - Messung des Hoechst-Farbstoffes

FACS ist ein eingetragenes Warenzeichen von Becton Dickinson. Entwickelt wurde es bereit in den 1970er Jahren<sup>168,169</sup>. Das Herzstück jedes Durchflusszytometers ist die Messküvette. In dieser werden die Zellen in einem Flüssigkeitsstrom einzeln an einem Laserstrahl vorbeigeführt. Damit die Zellen den Laserstrahl einzeln passieren, wird der Flüssigkeitsstrom hydrodynamisch fokussiert. Die hydrodynamische Fokussierung wird dadurch erreicht, dass dem schnell fließenden Transportstrom der langsamer fließende Probenstrom zugemischt wird. Eine schnellere Fließgeschwindigkeit der Probe während der Messung führt zwar zur Aufnahme einer größeren Datenmenge, die jedoch durch kleine Ungenauigkeiten beeinträchtigt wird. Wählt man eine langsamere

Fließgeschwindigkeit, kann man zwar weniger Zellen untersuchen, hat aber die größtmögliche Genauigkeit gewährleistet.

Abb. III.1 schematische Zeichnung einer Messküvette

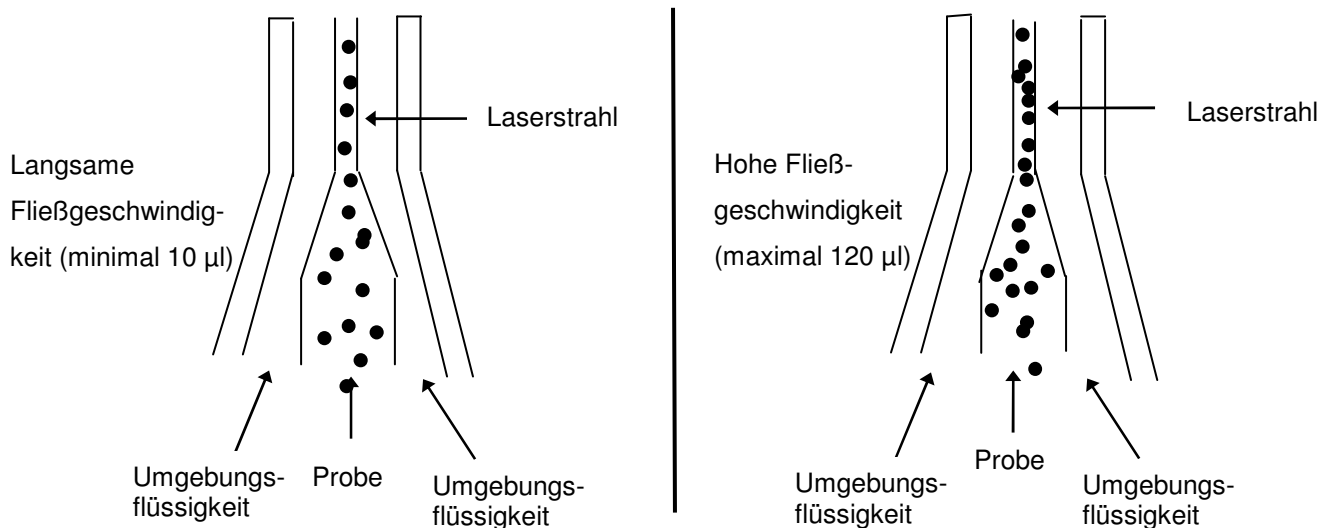
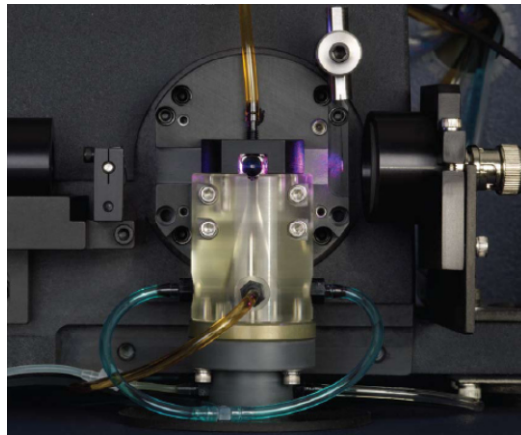


Abb. III.2 Messküvette des BD Canto II aus BD Broschüre



Das Laserlicht wird durch die vorbeifließende Zelle gestreut, woraus sich die ersten zwei Messparameter ergeben: das Vorwärts- und das Seitwärtsstreulicht, welche im Folgenden als FSC („forward scatter“) und SSC („side scatter“) bezeichnet werden. Das Vorwärtstreulicht dient dabei als Maß für die Zellgröße (detektierbar sind Partikel in der Größe von 1 µm bis maximal 50 µm), das Seitwärtsstreulicht dient als Maß für die Granularität der Zelle (Unterschiede ab 0,5 µm sind detektierbar). Durch die Verwendung unterschiedlicher Laser (s.u.) sind außerdem bis zu 12 Farben detektierbar. Dadurch hat man die Möglichkeit, mit einer einzigen Färbung viele Informationen über die zu untersuchenden Zellen zu gewinnen, und zwar auf

Einzelzellebene. Indem man den an die gesuchte Struktur gebundenen, mit einem Fluorochrom gekoppelten Antikörper detektiert ist es möglich festzustellen, welche Moleküle auf der Zelloberfläche bzw. auch intrazellulär (mit speziellen Intrazellulärfärbungen) exprimiert werden. Je heller die Fluoreszenz ist, desto mehr Antikörper ist auf der Zelle gebunden.

#### 2.4.1. Die Laser

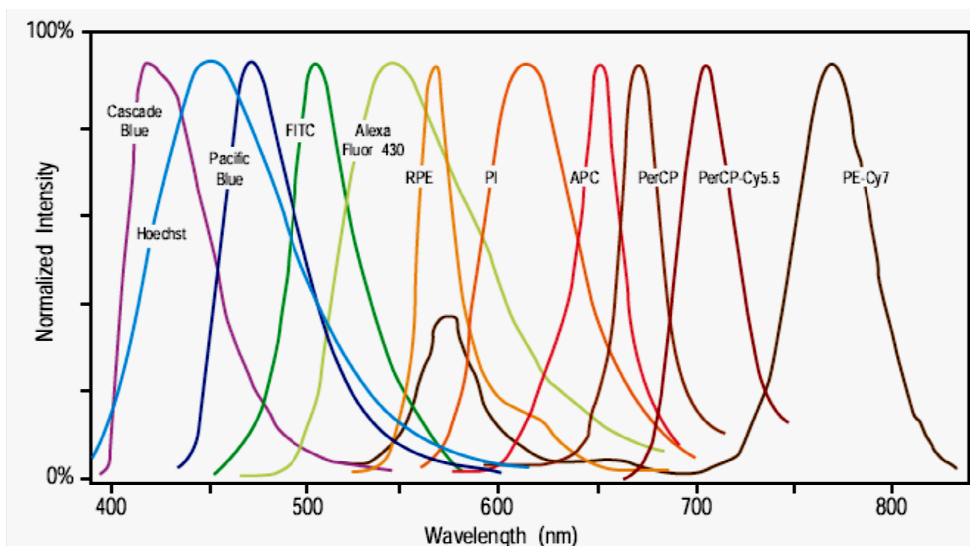
Der verwendete BD FACSCanto™ II enthält 3 Laser:

- Blau Exzitation bei 488 nm, 20mW, Feststofflaser
- Rot Exzitation bei 633 nm, 17mW, Helium-Neon-Laser
- Violett Exzitation bei 405 nm, 30 mW

Der verwendete BD FACSAria (Special Order System) enthält 5 Laser:

- Blau Exzitation bei 488 nm, 20mW
- Grün Exzitation bei 561 nm, 50 mW
- Rot Exzitation bei 640 nm, 17mW Helium-Neon-Laser
- Violett Exzitation bei 405 nm, 30 mW
- UV Exzitation bei 355 nm, 7 mW, Feststofflaser

Abb. III.3 Emissionsspektren der geläufigsten BD Fluorochrome

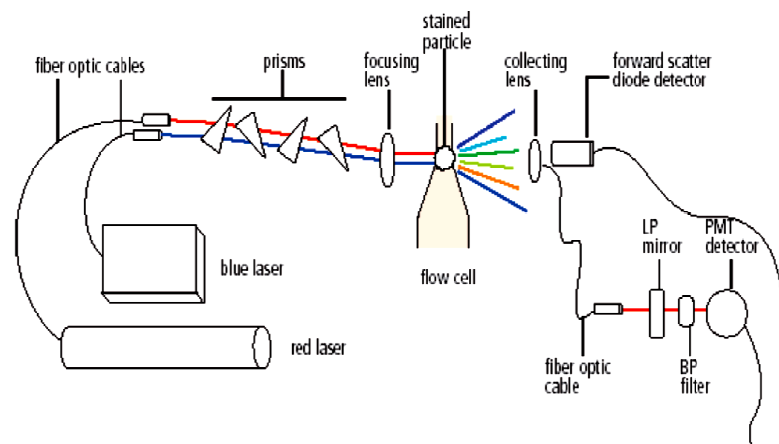


#### 2.4.2. Das optische System: Detektion der Fluoreszenzsignale

Die unterschiedlichen Laser des Durchflusszytometers regen die an die Zellen gebundenen Fluorochrome an. Das emittierte Licht, also die Fluoreszenz der angeregten Fluorochrome, wird von der Durchflusszelle durch eine bestimmte Anordnung aus Filtern, Verstärkern und

Photomultipliern geleitet. Die Filter und Verstärker bilden das optische System des Geräts. Das eingehende Lichtsignal wird dann mittels Photomultipliern in ein elektrisches Signal digitalisiert und kann am Computer in DotPlots bildlich dargestellt werden.

Abb. III.4 Optisches System der Durchflusszytometrie aus: Technische und methodische Grundlagen der Durchflusszytometrie, Sack U, Tarnok A, Rothe G (Hrsg): Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie. Basel, Karger, 2007, pp 27–70,



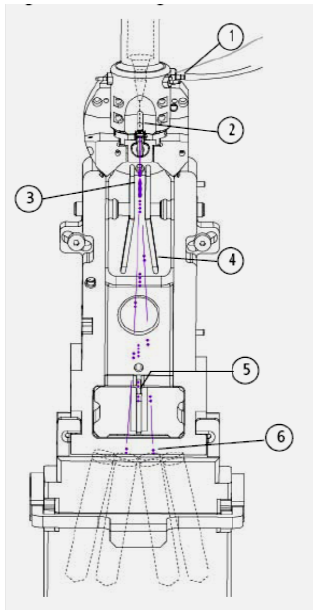
Mittels dieser Methode sind in der vorliegenden Arbeit zahlreiche Melanomzelllinien mit Oberflächenmarkern und auch intrazellulären Markern charakterisiert worden. Außerdem sind die Effekte auf die Zellen nach medikamenteller Behandlung durchflusszytometrisch analysiert worden.

## 2.5. Sortierung von Zellen

Der BD FACSAria<sup>167</sup> ist nicht nur dazu konzipiert, Zellen hinsichtlich ihrer Eigenschaften zu untersuchen, sondern sie zusätzlich nach bestimmten Charakteristika zu sortieren. Dies hat den großen Vorteil, dass man die sortierten Zellen – deren Eigenschaften man nun kennt – wieder in Kultur nehmen kann. Außerdem enthält er einen Near-UV-Laser, der es erlaubt, Side-Population-Analysen (wie z.B. mittels den Hoechst-Farbstoffen) durchzuführen. Damit man die Zellen einzeln sortieren kann, wird der Strom der an den Lasern vorbeifließenden Zellen nach jeder einzelnen Zelle unterbrochen, so dass Tropfen entstehen, von denen jeder genau eine Zelle enthält. Je nach den vorgegeben Sort-Charakteristika erhält dann jeder Tropfen, kurz nachdem er vom Strom abgetrennt wurde, eine elektrische

Ladung. Mittels der elektrischen Ladung wird unterschieden, wie die Zelle sortiert wird: der Tropfen wird an zwei elektrisch aufgeladenen Platten vorbeigeleitet. Durch die Abstoßung bzw Anziehung der Ladung wird der Tropfen nach links oder rechts abgelenkt und in ein entsprechendes Gefäß sortiert (z.B. FACS-Tubes, Falcons, 96-Well-Platte o.ä.). Bleibt der Tropfen ungeladen, wird er verworfen.

Abb.III.5 Prinzip der Zellsortierung; aus BD FACSAria II User's Guide



- 1: Der Strom wird aufgeladen
- 2: Der Tropfen wird hinsichtlich Lichtstreuung und Fluoreszenzsignal analysiert
- 3: Der Tropfen wird vom Strom abgetrennt
- 4: Der Tropfen wird von den elektrischen Platten angezogen oder abgestoßen
- 5: ungeladene Tropfen werden verworfen
- 6: Zellen, die den Sortkriterien entsprechen, werden sortiert

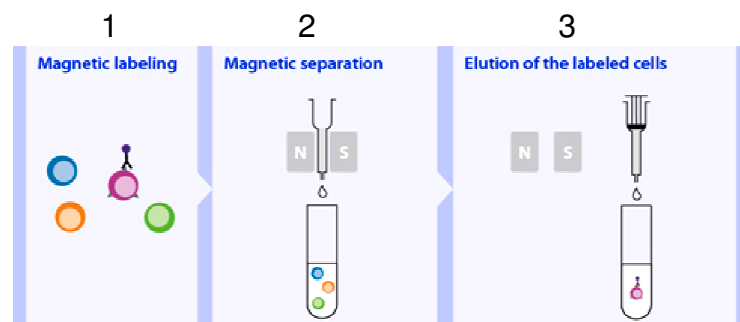
Die Zellsortierung wurde genutzt, um aus dem Blut von Melanompatienten Zellen mit entsprechenden Melanommarkern heraus zu sortieren. Weiterhin wurden Side Population-Analysen durchflusszytometrisch durchgeführt.

#### 2.5.1. MACS: magnetische Anreicherung von Zellen<sup>170</sup>

Die MACS-Technologie der Firma Miltenyi Biotech wurde bereits 1990 entwickelt. Sie arbeitet mit MACS® Microbeads. Diese sind 50nm große, superparamagnetische Partikel, die an hochspezifische Antikörper gebunden sind. Durch die Antikörper können die Microbeads an bestimmte Oberflächenantigene binden (Schritt 1, siehe Abb. III.6). Durch ihre geringe Größe wird dabei die Zelle weder aktiviert noch werden alle Oberflächenantigene besetzt. Dies ermöglicht nach der magnetischen Markierung mit den Microbeads eine weitere Färbung, z.B. mit FACS-Antikörpern. Die Microbeads werden in einer Suspension gehalten, die für Zellen nicht toxisch ist. Die Suspension wird in der entsprechenden Verdünnung zu einer Zellsuspension gegeben. In der Inkubationszeit von 20

min erfolgt dann die Bindung an die entsprechenden Antigene. Die markierte Zellsuspension wird dann durch eine magnetische Säule geleitet, die sich in einem Separator befindet. Die Säule besteht aus einer Matrix ferromagnetischer Kügelchen, die mit einer speziellen, „zellfreundlichen“ Schicht ummantelt sind. Wird diese Säule in einen magnetischen Separator installiert, verstärkt sie das magnetische Feld um das 10 000fache. So entsteht innerhalb der Säule ein starker Gradient. Die Zellen, die durch die Microbeads magnetisch markiert sind, bleiben in der Säule hängen, während die unmarkierten hindurchfließen können (Schritt 2, Abb. III.6). Die unmarkierten Zellen können aufgefangen werden. Die in der Säule gehaltenen Zellen gehen allerdings keine richtige Bindung ein, sondern werden zwischen den ferromagnetischen Kügelchen in Suspension gehalten, was den Stress für die Zellen vermindert und auch die Bildung von Zellaggregaten verhindert. So ist, nach einem kurzen Waschschrift, ein einfaches Auswaschen der Zellen aus der Säule möglich, sobald diese aus dem magnetischen Separator entfernt ist (Schritt 3, Abb. III.6).

Abb. III.6 MACS-Prinzip aus [www.miltenyibiotech.com](http://www.miltenyibiotech.com), MACS Technology Basic principles



Bei der Anreicherung mittels Magnetic Cell Enrichment wurden zwei Möglichkeiten getestet:

Eine Positivanreicherung mittels MCSP-Beads: MCSP positiv markierte Zellen bleiben in der magnetischen Säule hängen, MCSP negative Zellen passieren die Säule. In der Säule verbleiben also die angereicherten Melanomzellen.

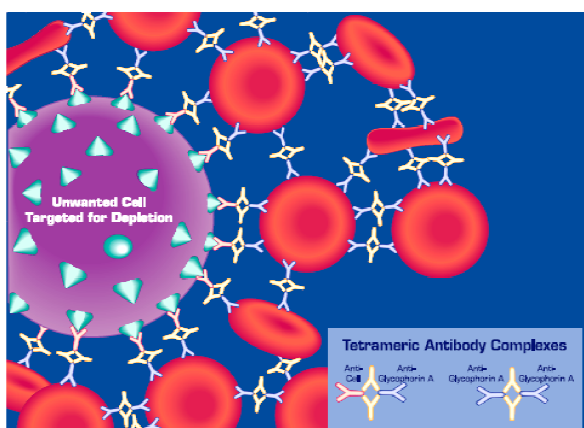
Die Negativselektion mittels CD45-Beads: Depletion CD45 positiver Zellen, indem die magnetische Säule die CD45-positiv markierten Zellen festhält und

nur CD45 negative Zellen, im Fall der vorliegenden Experimente also die Melanomzellen, die Säule passieren können.

### 2.5.2. Die RosetteSep-Methode

RosetteSep ist ein neuartiges Verfahren zur Zelltrennung der Firma StemCell Technologies<sup>171</sup>. Es werden zur Auftrennung der Zellen Tetrameric Antibody Complexes (TACs) verwendet. TACs haben unterschiedliche Bindungsstellen, die es möglich machen, zwei unterschiedliche Zelltypen aneinander zu koppeln. Im Fall des verwendeten Kits erkennen die TACs sowohl CD45 als auch CD66b und Glycophorin A auf roten Blutkörperchen. Mit dieser Methode ist es also möglich, über die TACs CD45positive Zellen an Erythrozyten zu koppeln. Bei der anschließenden Dichtegradientenzentrifugation werden die aneinander gekoppelten Zellen aufgrund der hohen Dichte auf den Boden des Falcons sedimentiert. Zellen, die CD45 negativ sind und deshalb nicht durch die TACs an Erythrozyten gekoppelt wurden, können dann in der Phase zwischen dem Ficoll und dem Serum abgesammelt werden. Nach einigen Vorversuchen (s. Ergebnisse, Spiking Experimente, Kapitel 6.2) wurde diese Methode aufgrund der guten Ergebnisse und der einfachen Handhabung für die Isolierung von zirkulierenden Melanomzellen aus dem Blut von Melanompatienten verwendet.

Abb.III.7 RosetteSep Schema aus [www.stemcell.com](http://www.stemcell.com)



Bildung einer Rosette durch die TACs: die zu depletierende Zelle, im vorliegenden Fall eine CD45 positive Zelle, wird durch die TACs an Erythrozyten gekoppelt.

### 2.6. Melanomzellkultur

Die Zelllinien wurden aus Tumormaterial generiert, welches Patienten chirurgisch entfernt wurde. Es wurden Primärtumore und auch Metastasen

verwendet. Die Tumore wurden nach der chirurgischen Entfernung schnellstmöglich in die Zellkultur aufgenommen. Die Untersuchungen an den Zellen wurden so nah wie möglich am Entnahmezeitpunkt durchgeführt, um zu verhindern, dass sich die Zellen in der Kultur verändern; deshalb werden diese Zellen als Kurzzeitkultur-Zellen bezeichnet.

Hierzu wird nach folgendem Protokoll vorgegangen:

Nach Erhalt des steril gehaltenen Tumors wird dieser mithilfe eines Skalpells in einer Zellkulturschale von Geweberesten, z.B. subkutanem Fettgewebe, gesäubert und anschließend in möglichst kleine Stückchen zerkleinert. Die gesäuberten Tumorstücke werden anschließend im Wasserbad unter Einwirkung von Collagenase, DNAase und Hyaluronidase bei 37°C über 45 min verdaut. Die Zellen werden daraufhin mehrmals in die Pipette aufgezogen und dann durch ein 100µm Sieb pipettiert, um eine Einzelzellsuspension zu erhalten. Die Kultivierung erfolgt in Tumormedium bestehend aus RPMI 1640 mit 10% HS, 5% L-Glutamin sowie 0,04% Gentamycin im Begasungsbrutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Bis die aus dem Patientenmaterial gewonnen Zellen anwachsen und proliferieren werden sie in einem 6-Well kultiviert, sobald die Zelldichte hoch genug ist werden sie gesplittet oder in eine Zellkulturflasche von 75 cm<sup>2</sup> verbracht.

## 2.7. Herstellung von konditioniertem Tumorwachstumsmedium

Im Rahmen der Anzüchtung der isolierten, sortierten zirkulierenden Melanomzellen (ZMZ) wurden verschiedene Medien getestet, um die Zellexpansion zu fördern. Unter anderem wurde zu den Zellen konditioniertes Tumorwachstumsmedium gegeben. Dieses Medium besteht aus normalem Tumormedium (s.o., RPMI 1640 mit 10% HS, 5% L-Glutamin sowie 0,04% Gentamycin), welches allerdings über 24-48h schon mit einer Melanomzelllinie kultiviert wurde. Nach 24-48h wurde der Überstand aus der Kultur genommen, zentrifugiert, filtriert und dann als konditioniertes Tumorwachstumsmedium verwendet. Durch die Zentrifugation und Filtration wird verhindert, dass Zellen aus der ursprünglichen Kultur in der ZMZ-Kultur wachsen.





## 2.8. Charakterisierung von Melanomzellen aus der Zellkultur (inkl. Gatingstrategie)

Für die Charakterisierung wurden jeweils 10 ml der entsprechenden Zelllinie aus der Zellkulturflasche entnommen und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in PBS-EDTA resuspendiert und 50 µl wurden für die Zellzählung am Casy-1 Zellzähler entnommen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen resuspendiert und mit  $1 \times 10^6$  Zellen pro ml in FACS-Tubes (Round bottom, 12 x 75 mm) pipettiert und erneut zentrifugiert. Für die Färbung der Zellen zur Charakterisierung wurde ein Färbecocktail aus den unterschiedlichen Antikörpern angesetzt. Es wurden zwei Panels gefärbt, da einige Fluoreszenzen doppelt verwendet wurden. Zusätzlich wurde von jeder Zelllinie eine ungefärbte Probe eingemessen. Pro Probe wurden mindestens  $1 \times 10^6$  Zellen eingemessen.

Das Färbeendvolumen pro Tube liegt bei 100 µl. Nach der Zugabe des Antikörper-Cocktails wurden die Zellen im Dunkeln für 20 Minuten bei 4°C inkubiert. Bei den biotinylierten Antikörpern ICAM (=CD54) und ABCG2 war ein weiterer Färbeschritt mit Streptavidin-PE-Cy7 nötig. Die Zellen wurden dafür in PBS gewaschen und anschließend in 100 µl PBS mit 1 µl Streptavidin-PE-Cy7 für 5 Minuten inkubiert, ebenfalls im Dunkeln bei 4°C. Anschließend wurde in alle Tubes 500 µl PBS gegeben und die Zellen durch ein 100µM Zellsieb in frische FACS-Tubes pipettiert, um die Zellen zu vereinzeln. Nach einem Waschschrift um ungebundene Antikörper heraus zu waschen, wurden die Zellen je nach Zelldichte in 200 – 300 µl PBS resuspendiert. Bis zur Einmessung am Durchflusszytometer Canto II wurden die angefärbten Melanomzellen im Dunkeln und auf Eis gehalten.

Die Auswertung aller Messungen erfolgte mit dem Programm FlowJo 7.6.4 für Windows. Es wurde im ersten Plot der FSC gegen den SSC gegatet, um Zelldebris und Dupletten auszuschließen. Diese Region wurde mit „Cells“ beschrieben. Aus dieser Region wurde der Mean, also der Mittelwert der Fluoreszenz, jeder Farbe errechnet, die im entsprechenden Panel verwendet wurde. Zusätzlich wurde die Fluoreszenz in Histogrammen gegenüber der ungefärbten Probe dargestellt. In Overlays lässt sich gut erkennen, wie stark ein Oberflächenantigen im Vergleich zu der ungefärbten Kontrollprobe exprimiert wird.

Tab. III.3 Übersicht welche Zelllinien mit welchen Markern charakterisiert wurden  Charakterisierung erfolgt  keine Charakterisierung erfolgt

	MCSP	MCAM	MelanA	Tyrosinase	cKit	Notch1	CD20	CD133	CD166	CD271	N-Cadherin	ABCG2	HLA-ABC	HLA-DR	ICAM	CD45
PBMC																
ErMel1																
ErMel2a																
ErMel2b																
ErMel3																
ErMel4																
ErMel5																
ErMel6a																
ErMel6b																
ErMel7																
ErMel8																
ErMel9																
ErMel10																
ErMel11																
ErMel12																
ErMel13																
ErMel14a																
ErMel14b																
ErMel14c																
ErMel15																
ErMel16																
ErMel17																
ErMel18																
ErMel19																
ErMel20																
ErMel21																
ErMel22																
ErMel23																
ErMel24a																
ErMel24b																
ErMel24c																
ErMel25a																
ErMel25b																
ErMel25c																

## 2.9. Detektion und Anreicherung von Melanomzellen aus Vollblut: Spiking-Experimente

Die Anzahl im Blut zirkulierender Tumorzellen ist sehr gering, deshalb wurden zunächst zwei unterschiedliche Anreicherungsverfahren (MACS und Rosette Sep) getestet. Dazu wurden Spiking Experimente durchgeführt. Hierbei wird eine bestimmte, bekannte Anzahl Melanomzellen zu PBMCs gesunder Spender gegeben, dann folgte die Anreicherung und anschließend die Färbung mit FACS-Antikörpern. Anschließend wurde am Durchflusszytometer die Detektion der hinzugefügten Melanomzellen durchgeführt. Durch die Färbung kann man die Melanomzellen von den

PBMCs unterscheiden und als eigene Population darstellen. Als Melanommarker wurden MCSP und MCAM eingesetzt, als Negativmarker für die Melanomzellen bzw als Marker für die PBMCs wurde CD45 verwendet. Im vorliegenden Fall wurden für die Experimente, denen ein MACS zur Anreicherung folgte, PBMCs gesunder Spender verwendet. Die PBMCs wurden mittels Dichtegradzentrifugation gewonnen und in  $1 \times 10^7$ -Aliquots bei  $-80^\circ\text{C}$  aufbewahrt. Nach dem Auftauen der PBMCs bei Zimmertemperatur wurden diese einmal in vorgewärmtem Medium gewaschen und dann in PBS resuspendiert. Sodann wurden die Melanomzellen, die vorher mittels einer Verdünnungsreihe auf eine bestimmte Anzahl verdünnt wurden, dazugegeben. Bei der Anreicherung mit dem RosetteSep-System wurde ebenfalls Blut eines gesunden Spenders verwendet. Auch in diesem Fall wurde das Blut mit einer geringen Anzahl Melanomzellen gespickt. Die Einmessung der Spiking-Experimente erfolgte am Canto II.

#### 2.9.1. Anreicherung mittels MACS

Die Verwendung der Microbeads sowie die anschließenden Färbungen mit FACS-Antikörpern wurden nach Herstellerangaben (Miltenyi Biotec) durchgeführt. Es wurden unterschiedliche Mengen an Melanomzellen zu den PBMCs dazugegeben.

##### 2.9.1.1. CD45-Microbeads

Die Zellmischung aus PBMCs und Melanomzellen wurde zentrifugiert und je nach Anzahl der Zellen in PBS-EDTA-BSA resuspendiert. Dann wurden die CD45 Microbeads zugegeben, 20  $\mu\text{l}$  pro 10 Millionen Zellen. Es folgte eine Inkubation von 15 min bei  $4^\circ\text{C}$ . Anschließend wurden die Zellen in 1-2 ml PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in 500  $\mu\text{l}$  PBS resuspendiert und dann durch die magnetische Säule geleitet, die sich im magnetischen Separator befand und bereits mit 500  $\mu\text{l}$  PBS vorgewaschen wurde. Nachdem die Zellsuspension durch die Säule geleitet wurde, wurde dreimal mit jeweils 500  $\mu\text{l}$  PBS nachgewaschen, um alle negativen Zellen aus der Säule heraus zu waschen. Die durchfließenden Zellen wurden als CD45-negatives Eluat in einem 15ml-Falcon aufgefangen. Dann wurde die Säule aus dem Separator genommen und die in der Säule verbliebenen Zellen wurden mit einem Stempel, ebenfalls mit PBS, herausgedrückt. Auch hier wurde mehrmals

nachgewaschen, die Zellen wurden als CD45-positives Eluat in einem 15ml-Falcon aufgefangen. Nach der Zentrifugation der Zellen wurden diese nochmals filtriert und in FACS-Röhrchen gegeben. Dann wurden die FACS-Antikörper dazugegeben (MCSP-APC, MCAM-FITC sowie CD45-PerCP) und für 5 min, ebenfalls bei 4°C, inkubiert. Nach nochmaliger Zentrifugation erfolgte dann die Einmessung.

#### 2.9.1.2. MCSP-Microbeads

Das Protokoll ist das gleiche wie bei der Markierung mit den CD45-Microbeads. Die MCSP-Microbeads wurden mit 100µl pro 50 Millionen Zellen eingesetzt, die Inkubation beträgt hier 30 min. Ansonsten wurde wie beim CD45-MACS-Protokoll verfahren. Bei dieser Anreicherungs-methode wurden als negatives Eluat die MCSP-negativen Zellen aufgefangen, in vorliegenden Fall also die PBMCs. Im positiven Eluat befanden sich demnach die MCSP-positiven Melanomzellen.

#### 2.9.2. Anreicherung mittels RosetteSep

Anders als beim MACS erfolgte die Inkubation mit dem RosetteSep in Vollblut und nicht in vorher isolierten PBMCs. Das erste Experiment wurde mit einem vom Hersteller zur Verfügung gestellten Testkit durchgeführt. Hierzu wurden 15ml Vollblut eines gesunden Spenders mit 75000 Melanomzellen gespickt. Das Protokoll zur Anreicherung wurde vom Hersteller (StemCell Technologies) übernommen.

Nachdem die Melanomzellen zum Vollblut gegeben und alles mit einer 5ml Pipette gut durchmischt wurde, wurde das RosetteSep-CD45-Depletion Kit mit 50µl pro ml Vollblut zugegeben und alles nochmals gut durchmischt. Die anschließende Inkubationszeit beträgt 20 min. Danach wurde das Vollblut mit der gleichen Menge PBS verdünnt, im vorliegenden Fall also mit 15ml. Das verdünnte Blut wurde dann in einem 50 ml Falcon vorsichtig auf 15ml vorgelegtes Ficoll geschichtet. Anschließend wurde eine Dichtegradzentrifugation durchgeführt. Nach dem Absammeln der in der Phase zwischen dem Ficoll und dem Serum angereicherten Zellen in einen 15ml Falcon wurden diese zentrifugiert und anschließend in PBS resuspendiert. Es folgte die Färbung mit den FACS-Antikörpern (MCSP-APC, MCAM-FITC, CD45-PerCP) mit einer Inkubationszeit von 20 min bei 4°C.

Danach wurden die Zellen in PBS gewaschen, anschließend wurden sie am Durchflusszytometer gemessen.

## 2.10. Analyse der Melanomzellen hinsichtlich Stammzellen-ähnlicher Charakteristika

### 2.10.1. Analyse unterschiedlicher Oberflächenmarker mittels FACS-Antikörper

Im Zuge der Charakterisierung der Melanomzellen wurden auch für Stammzellen typische Oberflächenantigene mitgefärbt, wie z.B. CD133, cKit und andere. Das hierzu verwendete Protokoll ist gleich dem Charakterisierungsprotokoll (siehe Punkt 2.8)

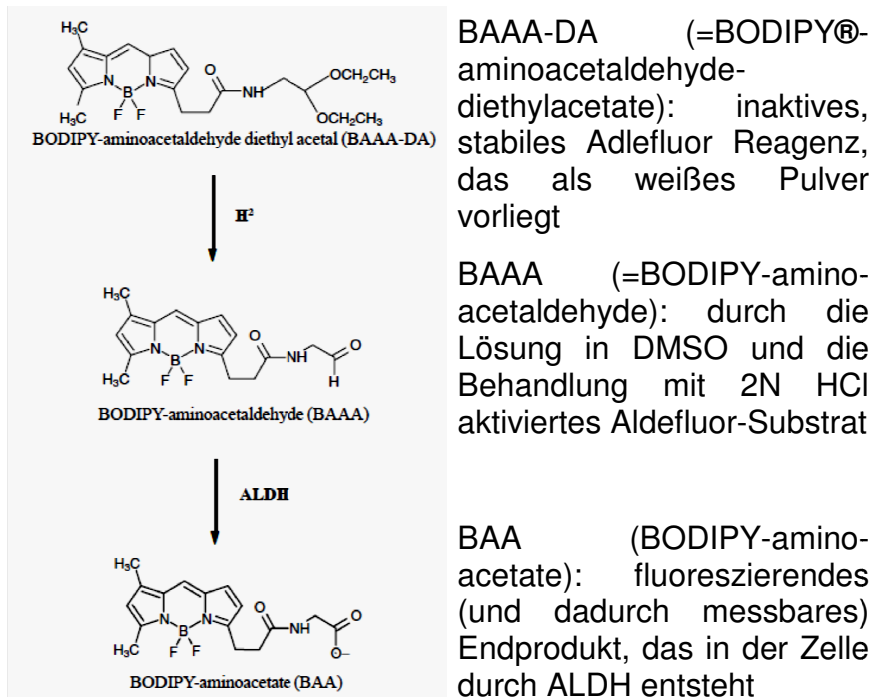
### 2.10.2. Analyse mittels der Aldehyd-Dehydrogenasen-Aktivität<sup>115,116</sup>

Das Aldefluor Kit wurde nach Herstellerangaben gelöst und verwendet. Alle hierzu verwendeten Lösungen werden vom Hersteller (StemCell Technologies, Grenoble, Frankreich) mitgeliefert. Die Verwendung des Aldefluor Assay Buffer ist deshalb von Wichtigkeit, weil er die besondere Eigenschaft hat Efflux aus der Zelle zu hemmen. So bleibt der Zustand in der Zelle nach der Färbung konstant. Es werden nur lebende Zellen mit einer intakten Zellmembran angefärbt<sup>172</sup>.

#### ➤ Funktionsweise des Aldefluor Reagenz

Das Aldefluor-Substrat (BAAA) diffundiert in die Zellen, wo es durch die Aktivität der Aldehyd-Dehydrogenasen in das fluoreszierende Endprodukt (BAA) umgewandelt wird. Die entstehende Fluoreszenz wird im Durchflusszytometer gemessen. Je höher die Fluoreszenz, desto höher ist die ALDH-Enzymaktivität in der Zelle.

Abb. III.8 Funktionsweise ALDH: Umformung des Aldefluor Reagenzes in seine aktive Form sowie in das fluoreszierende Endprodukt (aus: Product Information Sheet - 01700, Lot# All, Aldagen Inc., 2010)



Der Negativkontrolle wird DEAB (= Diethylaminobenzaldehyd), ein spezifischer ALDH-Inhibitor zugesetzt. Dieser verhindert die Umformung in das fluoreszierende Endprodukt<sup>172</sup>.

#### ➤ Aktivierung des Aldefluor Reagenz

Es wurde nach den Herstellerangaben (StemCell Technologies) verfahren. Das Aldefluor Reagenz wird aktiviert, indem das in pulveriger Form vorliegende Aldefluor Reagenz gelöst wird. Dies geschieht durch die folgenden Schritte: Das Pulver wird in 25 µl DMSO durch gründliches Durchmischen gelöst; der Mix ruht dann für 1 min bei Raumtemperatur, bevor 25 µl einer 2N HCl zugegeben werden und der Mix wieder gut durchmischt wird. Daraufhin inkubiert die Lösung für 15 min bei Raumtemperatur. Dann werden 360 µl des Aldefluor Assay Buffer zugegeben und alles gut durchmischt. Das aktivierte Aldefluor muss während der Benutzung bei 2-8°C gehalten werden. Bei mindestens -20°C kann das aktivierte Substrat aliquotiert bis zu einem Jahr ohne Verlust seiner Eigenschaften aufbewahrt werden.

### Testung verschiedener Melanomzelllinien hinsichtlich ihrer ALDH-Aktivität

Auch hier wurde nach den Herstellerangaben (StemCell Technologies) verfahren. Die Melanomzellen wurden aus der Zellkultur genommen, zentrifugiert und am Casy-1 gezählt. Daraufhin wurden pro Linie 2 FACS-Röhrchen – ein Test- und ein Kontrollröhrchen – mit je  $1 \times 10^6$  Zellen in 1 ml Aldefluor Assay Buffer vorbereitet. Die folgenden Schritte wurden schnellstmöglich durchgeführt, da DEAB in 95%igem Ethanol gelöst ist und sich sehr schnell verflüchtigt. Es wurden 5  $\mu$ l der DEAB-Lösung in das Kontrollröhrchen gegeben, welches sofort verschlossen wurde. Sodann wurden 5  $\mu$ l/ml des aktivierten Aldefluor-Substrats in das Teströhrchen gegeben und im Röhrchen gut vermischt. Schnellstmöglich wurden dann 500  $\mu$ l der Zellsuspension aus dem Teströhrchen in das Kontrollröhrchen überführt. Das schnelle Arbeiten ist auch deshalb von großer Wichtigkeit, da die enzymatische Reaktion des ALDH sofort nach Zugabe zu der Zellsuspension beginnt. Deshalb müssen die Zellen aus dem Teströhrchen möglichst ohne Verzögerung in das mit DEAB vorbereitete Kontrollröhrchen gegeben werden. Die Inkubationszeit beträgt 30 bis maximal 45 min bei 37°C. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das Pellet wurde in 150-200  $\mu$ l des Aldefluor Assay Buffers resuspendiert. Die Proben wurden bis zur Einmessung am BD Canto II FACS auf Eis gehalten. Die Analyse von Test- und Kontrollröhrchen erfolgt in zwei Schritten: das erste Gate wird im Plot FSC-H gegen SSC-H gesetzt. Hierbei werden Dupletten und Zelldebris ausgeschlossen. Das zweite und wichtigste Gate ist das Gate auf die Aldefluor, also FITC-positiven Zellen im Plot FITC-A gegen SSC-H. Zusätzlich wird auch die MFI, also die mittlere Fluoreszenzintensität, berechnet. Je höher die Fluoreszenz, desto höher ist die ALDH-Aktivität. Eine hohe ALDH-Aktivität wiederum spricht dafür, dass diese Zellen stammzellähnlich sind und somit wichtig für die Progression und Metastasierung des Tumors<sup>172</sup>.

#### 2.10.3. Analyse mittels Hoechst 33342 – Färbung

Die Hoechst-Färbung erfolgte mit leichten Modifikationen hinsichtlich der verwendeten Medien nach dem Protokoll von Goodell et al, das 1996 entwickelt wurde<sup>65</sup>. Zu beachten ist, dass man sich mit der Hoechst-Färbung einen aktiven biologischen Prozess zu Nutzen macht: der Hoechst-Farbstoff

wird mittels multi-drug-like Transportern aus der Zelle herausgepumpt. Es ist daher für die Detektion der Side Population von äußerster Wichtigkeit, sich genau an die Angaben aus dem Protokoll zu halten. Als erstes wurden die zu färbenden Zellen aus der Zellkultur entnommen und zentrifugiert. Währenddessen wurde das Wasserbad auf 37°C temperiert. Nachdem die Zellen gezählt und nochmals gewaschen wurden, wurden sie in 1 ml vorgewärmten Tumorwachstumsmedium resuspendiert. Der Hoechst 33342-Farbstoff wurde im Verhältnis 1:2000 zugegeben. Die Endkonzentration des Hoechst-Farbstoffs im Falcon beträgt 5 µg/ml. Es folgte eine Inkubationszeit im Wasserbad bei 37°C, möglichst ohne Temperaturschwankungen. Hin und wieder sollen die Zellen sanft geschwenkt und so durchmischt werden. Alle nachfolgenden Schritte wurden bei 4°C ausgeführt, um einen nachträglich Efflux des Hoechst 33342 zu verhindern. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen kalt zentrifugiert und in kaltem PBS resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in Tumorwachstumsmedium aufgenommen und ohne Zeitverzögerung am FACS ARIA eingelesen.

## 2.11. Sortierung zirkulierender Melanomzellen aus Blut von Melanompatienten

### 2.11.1. Patientencharakteristika

Die Patienten wurden, je nach Krankheitsverlauf und den aktuellen Symptomen in drei Gruppen unterteilt:

- I      Patienten mit erheblicher Tumorlast      (3)
- II      Patienten mit Knochenmarksmetastasen (1)
- III    Erhöhung der Tumormarker MIA und S100, aber kein in der Bildgebung detektierbarer Tumor (16)

Bei ErSo 3 treffen zwei Kriterien zu, dieser Patient fällt in Gruppe II und III. Ebenso der Sort ErSo13, dieser Patient konnte den Gruppen I und III zugeordnet werden. Bei einem Patient wurden zwei Zellsortierungen durchgeführt, so dass insgesamt 21 Zellsortierungen aus Patientenblut durchgeführt wurden.

### 2.11.2. Aufarbeitung des Patientenbluts

Die Blutentnahme erfolgte immer im Rahmen des Tumorstagings in der

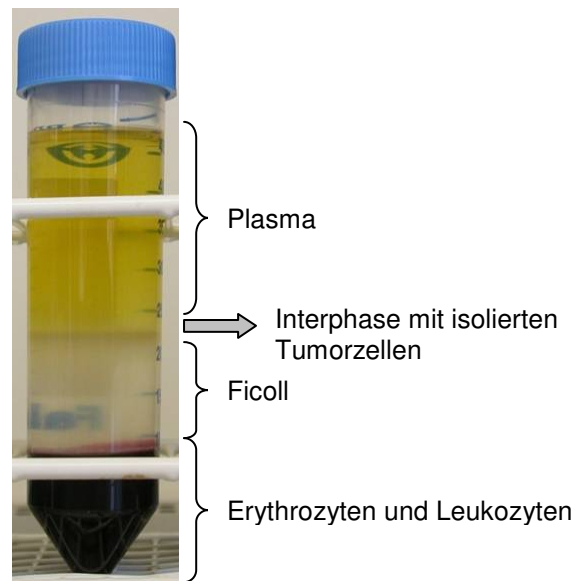


Melanomambulanz der Tagesklinik der Dermatologie des Universitätsklinikums Erlangen. Das Blut wurde anschließend ins Labor gebracht und es wurde unverzüglich mit der Aufarbeitung begonnen.

#### 2.11.2.1. Isolierung und Identifizierung der zirkulierenden Melanomzellen

Das Blut wurde aus den 20ml-Spritzen in 50ml Falcons gegeben, pro Falcon maximal 20 ml Vollblut. Zu dem Vollblut wurde sofort die erforderliche Menge RosetteSep® CD45 Depletion Kit gegeben (50µl/ml Vollblut, dh bei 20 ml Vollblut wurde 1 ml des RosetteSep® CD45 Depletion Kits zugegeben). Mittels mehrmaligem Aufziehen mit einer 10ml-Pipette wurde das Blut gut durchmischt. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur für eine Dauer von 20 Minuten. Als Vorbereitung für die Dichtegradientenzentrifugation wurde das Blut-RosetteSep®-Gemisch mit demselben Volumen PBS verdünnt. In 50ml Falcons wurden dann 15 ml Ficoll vorgelegt, welches dann langsam und vorsichtig mit dem verdünnten Blut überschichtet wurde. Die Dichtegradientenzentrifugation erfolgte mit 1200 Umdrehungen/Minute, 20 Minuten lang bei 22°C, bei einer Beschleunigung von 4 und einer Abbremsung von 2. Während der Zentrifugation werden die Erythrozyten sowie die an sie gekoppelten CD45-positiven Leukozyten wegen ihrer höheren Dichte am Boden des Falcons gesammelt; die zirkulierenden Melanomzellen hingegen sammeln sich in der Phase zwischen dem Ficoll und den Plasma an und können dann mit einer 5ml Pipette abgesammelt werden. Aus jeweils 2 Falcons wurden die abgesammelten Tumorzellen in einen Falcon überführt. Nach der Isolierung folgte ein Waschschrift mit PBS, um das verbliebene Ficoll von den Zellen zu waschen (Zentrifugation 15 min, 1000 Umdrehungen/Minute, 22°C, Beschleunigung 9, Bremse 7). Der Überstand wurde abgesaugt, die letzten Milliliter vorsichtig abpipettiert, um den Zellverlust möglichst gering zu halten. Sodann wurden die Pellets aus allen Falcons in je 100 µl PBS resuspendiert und in einen gemeinsamen Falcon gegeben.

Abb. III.9: Phasentrennung nach Dichtegradientenzentrifugation



#### 2.11.2.2. Färbung der isolierten zirkulierenden Melanomzellen mit FACS-Antikörper:

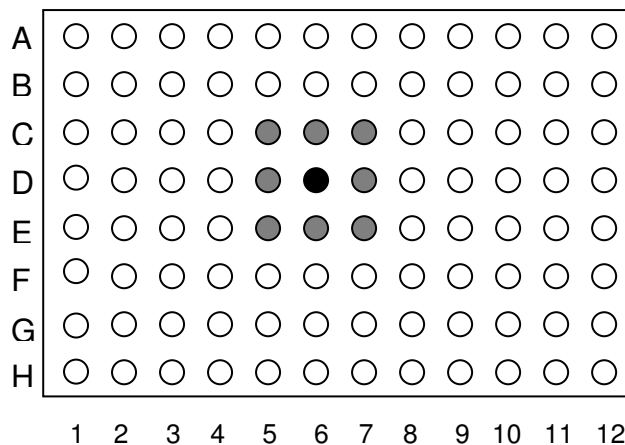
Die Sorts 1-13 wurden mit folgendem Panel gefärbt: CD45, MCAM, MCSP. Bei den nachfolgenden Sorts wurde das Panel durch das Hinzufügen von zwei zusätzlichen Markern zum Ausschluß von Monozyten und Makrophagen verbessert: Die Sorts 14-21 wurden mit folgendem Panel gefärbt: CD45, CD14, CD16, MCAM, MCSP. Nach Zugabe der Antikörper zu den isolierten zirkulierenden Tumorzellen wurde alles mit einer 1000 µl-Pipette mit blauer Spitze resuspendiert. Die Inkubation erfolgte bei 4°C im Dunkeln für eine Dauer von 20 Minuten. Nach der Inkubation wurden die Zellen aus dem 50 ml Falcon in ein 15 ml Falcon überbracht, das 50 ml Falcon wurde mehrmals gespült. Die Zellen wurden in dem zur Überführung der Zellen benötigtem PBS (zwischen 5 und 7 ml) gewaschen und anschließend in 750 µl – 1500 µl resuspendiert, je nach Zelldichte. Auf eine Zellzählung wurde zur Vermeidung weiterer Zellverluste verzichtet. Direkt im Anschluß wurde mit dem Zellsort begonnen.

#### 2.11.2.3. Sortierung der zirkulierenden Melanomzellen (ZMZ)

Die Sortierung der Zellen erfolgte am BD ARIA II mit Special Order Products-Ausstattung. Gated wurde zuerst FSC gegen SSC, um Zelldebris auszuschließen. Dann wurde auf die CD45 negativen Zellen gated, also wurden im nächsten Gate nur noch die Zellen dargestellt, die kein CD45

tragen. Dieses Gate enthält die isolierten ZMZ. Die Zellen werden in einer 96Well-Platte aufgefangen, das vorgelegte Medium sowie der Plattenträger wurden auf 37°C vortemperiert, um den gesorteten Zellen gleich wieder ein möglichst „körperwarmes Medium“ anbieten zu können. In das Well D6 sowie in die umgebenden Wells wurden jeweils 100 µl Tumorstromungsmedium vorgelegt, welches als Zusatz zu RPMI 1640 50% Humanserum, 5% L-Glutamin und 0,04% Gentamycin enthält. Der Zellsorter platzierte die entsprechend getageten Zellen in das vorgegebene Well D6 der 96Well-Platte.

Abb. III.10: 96Well-Platte mit Zielwell D6 (rot) für die sortierten Zellen; auch in die umliegenden Wells (hellrot) wurde Tumorstromungsmedium vorgelegt



Um die Zellen zu schonen wurde mit einer sehr langsamen Geschwindigkeit sortiert. Nach Beendigung des Sorts wurden die Zellen umgehend im Brutschrank bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> gelagert.

#### 2.11.2.4. Kultivierung

Die sortierten Zellen wurden in Tumorstromungsmedium mit o.g. Zusätzen aufgefangen. Die Zellen wurden mindestens dreimal pro Woche mikroskopisch kontrolliert und gefüttert (Entnahme von 50-100 µl Medium pro Well und Hinzufügen von derselben Menge frischem Medium). Die Kultivierung erfolgte im Begasungsbrutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>.

#### 2.12. Chemosensitivitätstestung von Melanomzellen aus der Zellkultur

Es wurden ein Kurzzeit- und ein Langzeitassay etabliert. Gemessen wurden

- im Kurzzeit-Assay:
  - Lebend/Tot-Rate durch 7AAD

- Stoffwechseltätigkeit anhand der Glukoseaufnahme durch 6NBDG
- Stoffwechseltätigkeit anhand der Mitochondrienaktivität durch MitoTracker

7AAD (7-Aminoactinomycin-D) ist ein Lebend/Tot-Marker. Er kann nicht in lebende Zellen eindringen und kann folglich nur tote Zellen markieren. 6NBDG ist ein Glukoseanalogon, das in die Zelle aufgenommen wird und so Auskunft über deren Stoffwechselzustand geben kann. Der MitoTracker gibt Auskunft über den momentanen Stoffwechselzustand in der Zelle. Er diffundiert passiv durch die Zellmembran und reichert sich in aktiven Mitochondrien an.

➤ im Langzeit-Assay

- Lebend/Tot-Rate durch 7AAD
- Proliferationsrate durch CFSE

CFSE (Carboxyfluorescein-diacetate-succinimidyl-ester) gibt Aufschluss über die Proliferationsrate der Zelle. Es diffundiert passiv in die Zellen. Bei jeder Zellteilung wird es gleichmäßig auf die Tochterzellen aufgeteilt. Jede neue Zellgeneration ist also weniger fluoreszent als die Elterngeneration.

Getestete Zelllinien:

Zelllinie	Kurzzeit-Assay	Langzeit-Assay
ErMel1	Ja	Ja
ErMel3	Ja	Ja
ErMel5	Ja	Ja
ErMel9	Nein	Ja
ErMel10	Ja	Ja
ErMel11	Ja	Ja
ErMel14b	Nein	Ja
ErMel15	Ja	Ja
ErMel17	Nein	Ja
ErMel18	Ja	Ja
ErMel19	Ja	Ja
ErMel20	Nein	Ja
ErMel22	Ja	Ja

### 2.12.1. Kurzzeitassay

Die Zellen wurden aus der Zellkultur entnommen und warm zentrifugiert (Beschleunigung 9, Bremse 7, 1200 U, 22°C, 10 min), dann in PBS-EDTA

zum Zählen am Casy-1 resuspendiert und nochmals warm zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in insgesamt 18 Wells einer 24-Well-Platte überführt. In die Wells wurden jeweils 500 µl serumfreies Medium vorgelegt, die Zellen wurden ebenfalls in 500 µl serumfreiem Medium hinzugegeben, so dass das Endvolumen im Well 1 ml betrug. Die Zellen ruhten nach dem Ausplattieren für mehrere Stunden. Dann wurden 500 µl pro Well entnommen und 500 µl der entsprechenden Medikamentenverdünnung (in serumfreiem Tumormedium) dazugegeben. Getestet wurde jeweils eine Medikamentenkonzentration, die der 5fachen Konzentration dessen entspricht, was im Serum von mit dem Medikament behandelten Patienten messbar ist. Nach 4 Stunden wurden die Zellen in FACS-Tubes geerntet und warm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 450 µl warmen PBS resuspendiert, dann folgte eine „Hungerperiode“ von 1h im Brutschrank für die Zellen, um eine spätere Glukoseaufnahme zu gewährleisten. Dann wurden 50 µl einer 1mM 6NBDG-Färbelösung zu den Zellen gegeben. Die Endkonzentration an 6NBDG im Tube beträgt 100 µM. Die Zellen wurden zusammen mit dem 6NBDG für eine weitere Stunde im Brutschrank inkubiert. Die Negativkontrolle wurde ebenfalls eine Stunde, jedoch auf Eis, inkubiert. Nach 45 min der Inkubationszeit erfolgte die Zugabe des MitoTrackers in einer 200 nM-Färbelösung; nachdem das Tube bereits 500 µl enthält ergibt sich eine Endkonzentration von 10 nM des MitoTrackers im Tube. Nach 15 weiteren Minuten folgte ein Waschschriff mit PBS, dh die Gesamtinkubationszeit des 6NBDG beträgt 1h, die des MitoTrackers 15 min. Nachdem der Überstand dekantiert wurde, wurden die Zellen in 100 µl PBS resuspendiert und jedes Tube wurde ca 5 min vor der Einmessung am Durchflusszytometer mit 100 µl einer 7AAD-Färbelösung versetzt.

#### 2.12.2. Langzeitassay

Wie beim Kurzzeitassay wurden die zu testenden Zellen aus der Zellkultur entnommen und warm zentrifugiert (Beschleunigung 9, Bremse 7, 1200 U, 22°C, 10 min), dann in PBS-EDTA zum Zählen am Casy-1 resuspendiert und nochmals warm zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 2 ml einer 1:8000 verdünnten CFSE-Färbelösung resuspendiert und für 5 min unter leichtem Schwenken inkubiert. Es folgte ein weiterer Waschschriff in 10 ml PBS-EDTA. Daraufhin wurden die Zellen in serumfreiem Medium zu

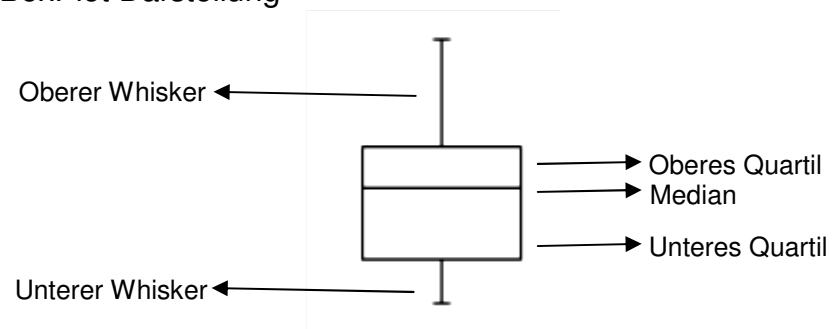
gleichen Teilen in insgesamt 16 Wells einer 24-Well-Platte überführt. Die Zellen ruhten dann für 24h im Brutschrank. Nach der Ruhephase wurden 500µl pro Well entnommen und die Medikamente in 500µl der entsprechenden Verdünnung zugegeben. Wie beim Kurzzeittest wurde auch beim Langzeittest die 5fache Medikamentenkonzentration dessen getestet, was beim behandelten Patienten im Serum messbar ist. Die Inkubationsdauer beim Langzeittest betrug drei Tage, mit einer Fütterung der entsprechenden Medikamentenverdünnung in Medium am Tag 2. Nach Abschluss der Inkubation wurden die Zellen in FACS-Tubes geerntet und abzentrifugiert. Jedes Tube wurde ca 5 min vor der Einmessung am Durchflusszytometer mit 100 µl einer 7AAD-Färbelösung versetzt.

### 2.13. Übersichtsdarstellungen

Die Darstellung im BoxPlot bietet eine gute Übersicht über die Gesamtmenge an Daten; deshalb wurde diese Darstellungsform gewählt, um die Ergebnisse aus den Chemosensitivitätstests zu präsentieren<sup>173,174</sup>. Der Überblick ergibt sich aus der Betrachtung fünf aussagekräftiger Punkte (Box, oberes Quartil, unteres Quartil, oberer Whisker, unterer Whisker). Die Box umfasst den Bereich, in dem die mittleren 50% der Daten liegen. Sie wird vom oberen und vom unteren Quartil begrenzt, wobei das obere Quartil die obere Grenze und das untere Quartil die untere Grenze der Box darstellt. Die Gesamtlänge der Box wird als Interquartilsabstand bezeichnet; dieser ist ein Maß für die Streuung der Daten. Auch der Median wird in der Darstellung berücksichtigt: er wird durch einen Strich in der Box erkenntlich; das heißt 50% der Werte liegen oberhalb bzw unterhalb des Striches. Die Lage des Medians in der Box gibt dem Betrachter einen Eindruck von der Verteilung (symmetrische oder schiefe Verteilung) der Daten. Die Whisker, die maximal eine Länge von 1,5 Interquartilsabständen haben, stellen den größten bzw kleinsten Wert außerhalb der Box dar. Die Box inklusive der Whisker kennzeichnet den Bereich, in dem der Großteil der Daten liegt. Ist der BoxPlot stark asymmetrisch, liegen hohe Ausreißerzahlen vor oder liegen die Ausreißer weit von der Box entfernt, spricht das gegen eine Normalverteilung der Daten. Zudem werden von einzelnen Zelllinien die Ergebnisse der einzelnen Tests gezeigt. Als Referenzwert dient jeweils eine unbehandelte gefärbte

Kontrolle.

Abb. III.11 BoxPlot Darstellung



## IV. ERGEBNISSE

### 1. Charakterisierung von Melanomzelllinien

Mit der Charakterisierung von Melanomzellen aus der Zellkultur wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

- Gibt es einen Marker oder eine Kombination von Markern, mit der es möglich ist Melanomzellen zuverlässig von anderen im Blut zirkulierenden Zellen zu unterscheiden?
- Welches Expressionsprofil besitzen Melanomzellen und sind die Expressionsprofile der einzelnen Marker in den unterschiedlichen Zelllinien vergleichbar?

Gibt es eine stammzellähnliche Population innerhalb der Melanomzellen?

Tab. IV.1 Zur Charakterisierung verwendete Marker

Gruppe	Marker
<b>Melanomspezifisch</b>	MCSP
	MelanA*
	Tyrosinase*
<b>Zelladhäsion</b>	MCAM
	ICAM
	N-Cadherin
	CD166
<b>Stammzellenmarker</b>	cKit
	CD20
	CD133
	CD271
	ABCG2
	Notch1*
<b>T-Zell-Erkennung</b>	HLA-DR
	HLA-ABC
<b>Negativkontrolle</b>	CD45

\* intrazelluläre Marker

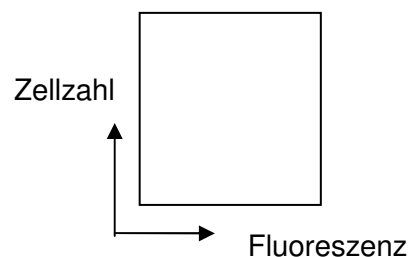
Es wurden verschiedene Oberflächenantigene getestet, darunter z.B. MCSP, von dem bekannt ist, dass es auf Melanomzellen exprimiert wird. Aber auch



Antigene wie z.B. CD45, das auf normalen Blutzellen exprimiert wird, sind im Charakterisierungspanel enthalten. Ein besonderes Interesse bestand darin, die Expression der Marker auf Melanomzellen im Vergleich zu PBMCs zu testen. Für die Identifizierung und Sortierung von Melanomzellen aus dem Blut von Melanompatienten müssen die Marker gegenüber PBMCs ein möglichst unterschiedliches Expressionsprofil aufweisen. Bis auf die melanom-spezifischen Marker MelanA und Tyrosinase sowie die Marker CD166 und CD271 wurden die Marker daher auch auf PBMCs gefärbt. Die intrazellulären Marker MelanA, Tyrosinase und Notch1 wurden nur zur Charakterisierung verwendet, nicht aber für die darauffolgenden Versuche. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Charakterisierung dargestellt.

Mittels der MFI (engl. Mean Fluorescence Intensity) wird in den logarithmisch skalierten Balkendiagrammen die Expressionsstärke der Marker auf den einzelnen Melanomzelllinien abgebildet. Es wurde zur Vereinheitlichung der Darstellung bei jeder Linie die Autofluoreszenz im jeweiligen Farbkanal abgezogen. Die Autofluoreszenz kann sehr unterschiedlich ausfallen und sonst die Ergebnisse verfälschen. Zum Vergleich der Expressionshöhe gibt die rote Linie die Höhe der Expression des jeweiligen Markers auf PBMCs an. Alle Fluoreszenzen, die sich unter einem MFI von 100 darstellten, wurden als Hintergrundrauschen definiert und daher als negativ gewertet. Es werden zudem charakteristische Histogramme einiger Zelllinien gezeigt. Als Darstellungsform wurde der Overlay gewählt. Hier werden zum direkten Vergleich sowohl die Autofluoreszenz der ungefärbten sowie die gefärbten Melanomzellen und auch die Färbung des jeweiligen Markers auf PBMCs abgebildet. Die y-Achse stellt die Anzahl der gezählten Zellen dar, während auf der x-Achse die Fluoreszenz im jeweiligen Farbkanal abgebildet ist.

Abb. IV.1 Histogramm-Darstellungen



## 1.1. Charakterisierung von Melanomzelllinien mittels verschiedener Oberflächen- und intrazellulären Marker

### 1.1.1. Der melanomspezifische Marker MCSP

MCSP (Melanoma Cell Surface Chondroitin Sulfate Proteoglycane) ist aus zwei Gründen hochinteressant, um die Zielsetzung der Arbeit zu verfolgen.

- MCSP wird auf ca 90% aller Melanome exprimiert. Daher ist die Wahrscheinlichkeit, dass es als Teil einer Markerkombination dienen kann sehr hoch.
- MCSP kann durch die Aktivierung bestimmter Schlüssel-Signalwege zu einer Malignitätssteigerung des Melanoms führen<sup>30,31</sup>.

Abb. IV.2 Logarithmische Darstellung der MCSP-Expression auf Melanomzellen im Vergleich zur MCSP-Expression auf PBMCs; die Autofluoreszenz ist abgezogen. Die rote Linie gibt das PBMC-Expressionslevel an und dient lediglich als Orientierungshilfe.

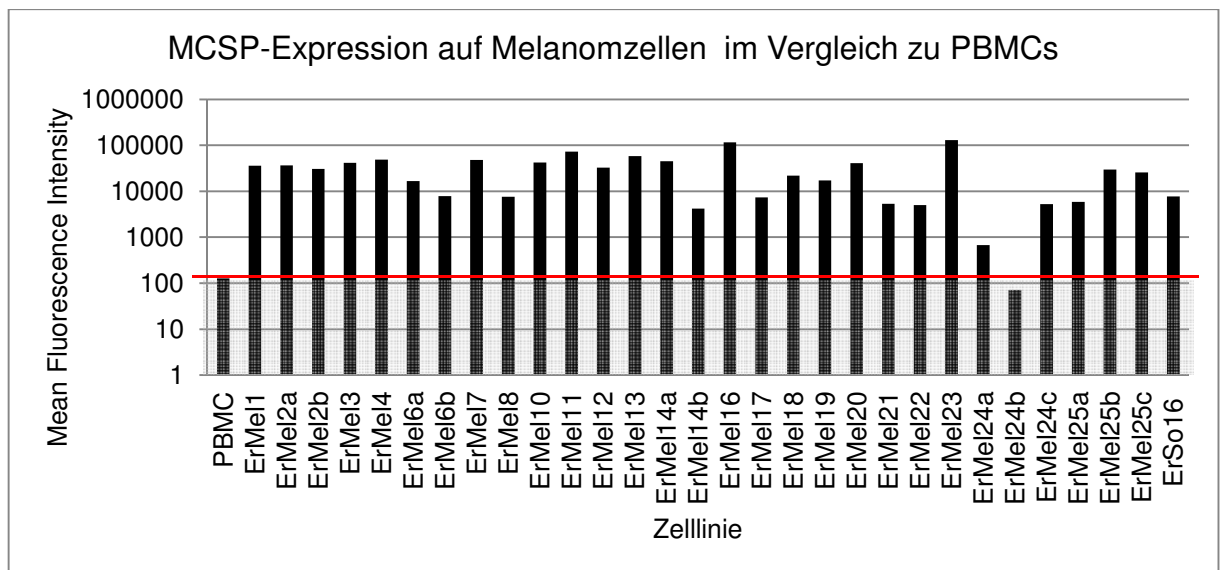
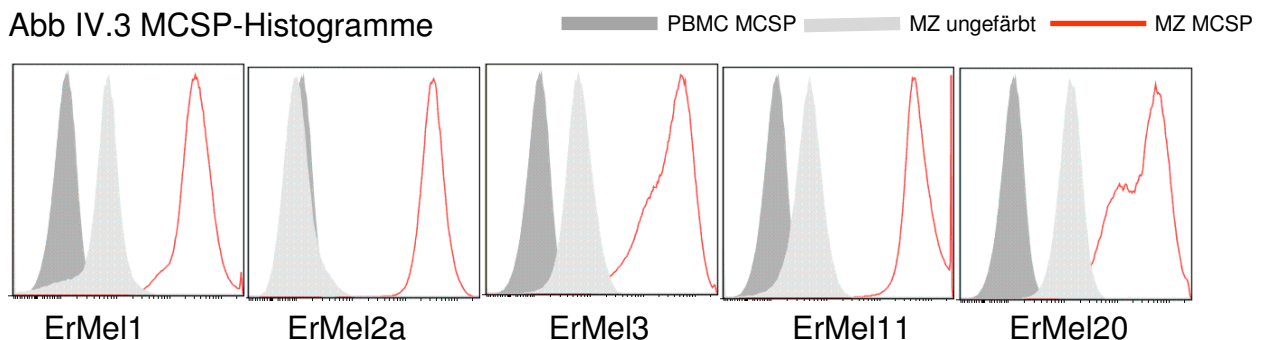


Abb IV.3 MCSP-Histogramme



Die MCSP-Expression auf MM-Zellen ist durchweg hoch. 28 von 29

getesteten Melanomzelllinien exprimieren MCSP deutlich im Vergleich zu PBMC. Dies entspricht 96,6% der getesteten Linien. Aufgrund dessen wurde MCSP in die Markerkombination für die später folgende Isolierung aus Vollblut aufgenommen. Die Melanomzelllinie 24b, deren MCSP-Expression unter dem Niveau auf PBMCs bleibt, wurde aus einer Leukapherese eines Patienten angezüchtet. Die Zellen der Linie ErMel24a, die kurz nach Etablierung der Zelllinie eingemessen wurden, exprimieren MCSP höher. ErMel24b ist die gleiche Zelllinie, aber nach längerer Zeit in Kultur. Die MCSP-Expression sank also in Kultur zuerst, bevor sie dann erneut anstieg (Linie ErMel24c). ErSo16 ist eine Zelllinie, die mittels der später beschriebenen Zellsortierung aus Patientenblut isoliert und erfolgreich angezüchtet wurde. Auch sie ist positiv für MCSP.

#### 1.1.2. Intrazelluläre melanomspezifische Marker

Die intrazellulären Marker MelanA und Tyrosinase wurden nur zur Charakterisierung verwendet, nicht aber für die darauffolgenden Versuche. Begründet wird dies zum einen damit, dass die aus Blut isolierten ZTZ in Kultur genommen und expandiert werden sollen, für eine intrazelluläre Färbung die Zellen aber fixiert werden müssen. Zum anderen ist aus einer Sortierung nur eine geringe Zellzahl zu erwarten; für eine intrazelluläre Färbung sind mehrere Färbeschritte nötig die mit größeren Zellverlusten einher gehen. Um diese zu vermeiden, wurden zur Identifizierung und Sortierung nur Oberflächenantigene verwendet. Daher wurde auch auf den Vergleich mit PBMCs verzichtet.

##### 1.1.2.1. MelanA

- MelanA ist ein Marker für die melanozytäre Differenzierung. Da das MM von Melanozyten ausgeht, kann MelanA als Marker für das MM verwendet werden.
- MelanA wird in keinem anderen Gewebe außer den Melanozyten der Haut und der Retina nachgewiesen. Allerdings wird MelanA auch auf gutartigen Nävi exprimiert.
- MelanA wurde mittels RT-PCR bereits erfolgreich für die Identifizierung zirkulierender Melanomzellen verwendet<sup>44</sup>.

Abb. IV.4 Logarithmische Darstellung der MelanA-Expression auf Melanomzellen; die Autofluoreszenz ist abgezogen.

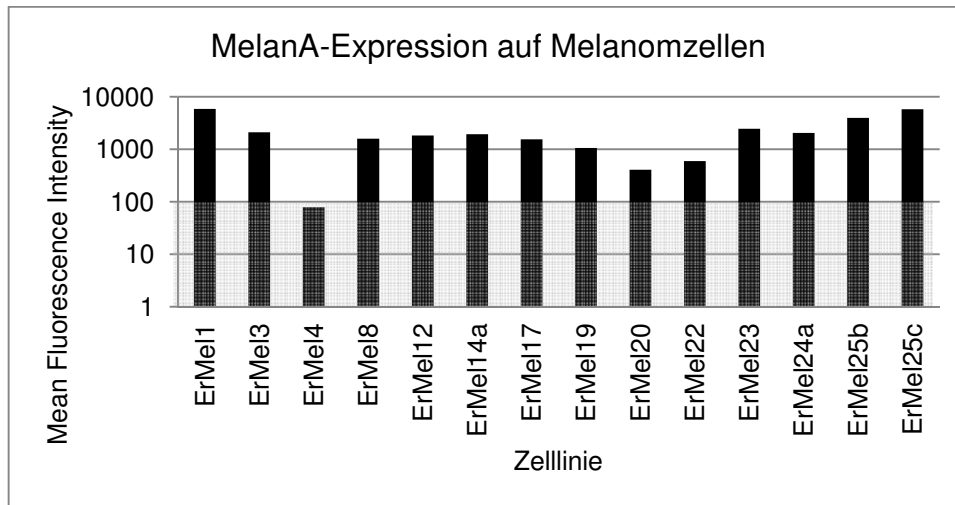
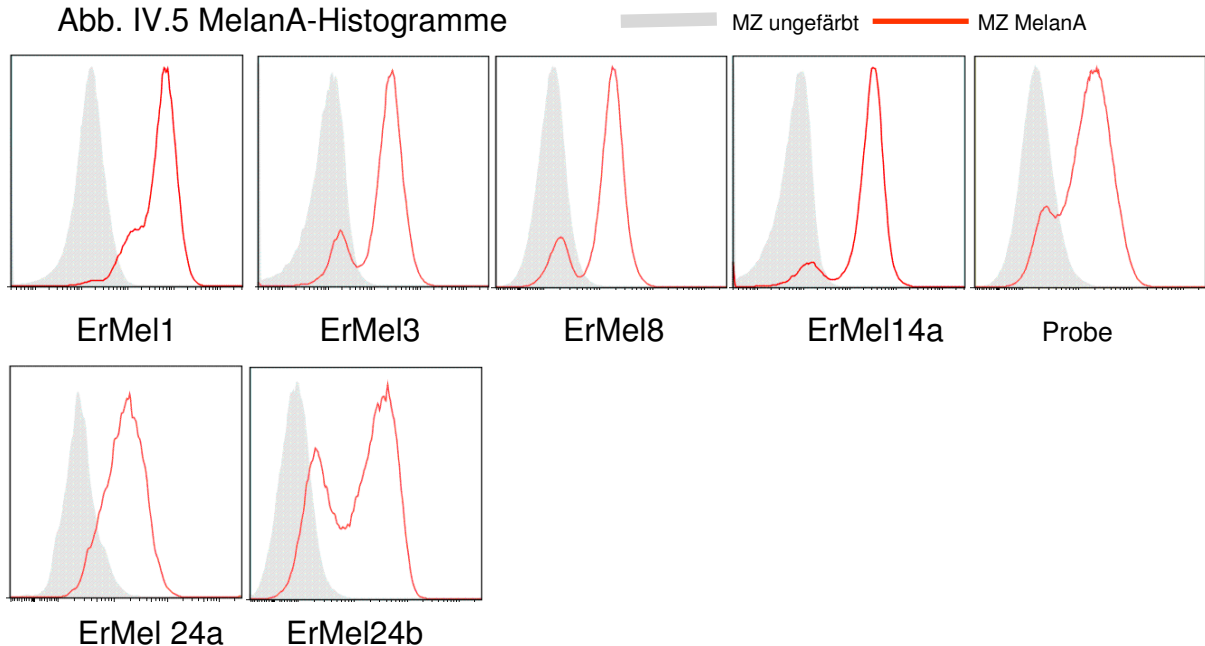


Abb. IV.5 MelanA-Histogramme



MelanA ist auf 13 von 14 getesteten Zelllinien nachgewiesen worden. Nur bei ErMel4 wird der als Grenzwert festgelegt MFI von 100 nicht überschritten. Auch in den Linien 24a und 25c, die beide aus Leukaphereseprodukten angezüchtet wurden und somit ihren Ursprung in zirkulierenden Tumorzellen haben, konnte MelanA detektiert werden. Wie in den Histogrammen erkennbar wird, ist in den meisten Linien (10 von 14, entsprechend 71%) eine Subpopulation vorhanden, die kein oder ein deutlich niedrigeres Level an MelanA-Expression aufweist als die restlichen Zellen.

### 1.1.2.2. Tyrosinase

Tyrosinase ist an der Synthese von Melanin in Melanozyten beteiligt. Durch sein natürliches Vorkommen in Melanozyten tritt es auch im MM auf. Es konnte gezeigt werden, dass Tyrosinase in Melanompatienten ein Ziel für die zytotoxische T-Zell-Reaktion darstellt<sup>46,47</sup>. Zudem wurde es bereits zur Detektion zirkulierender Melanomzellen mittels Polymerasekettenreaktion verwendet<sup>48,-50</sup>.

Abb. IV.6 Logarithmische Darstellung der Tyrosinase-Expression auf Melanomzellen; die Autofluoreszenz ist abgezogen.

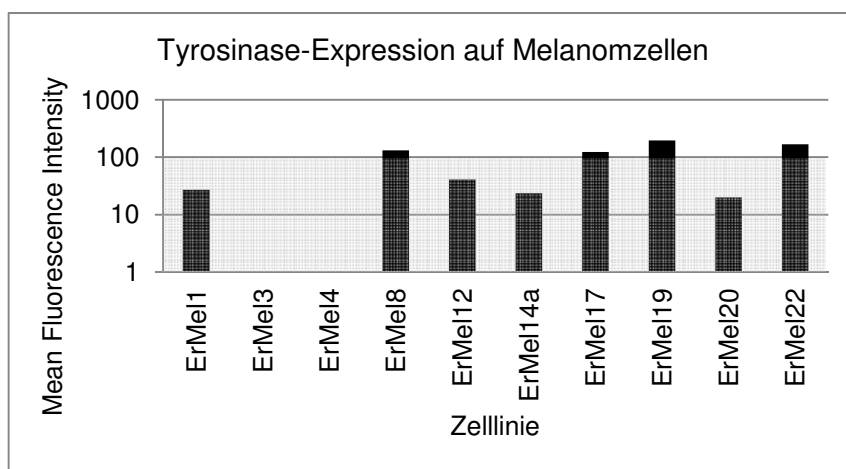
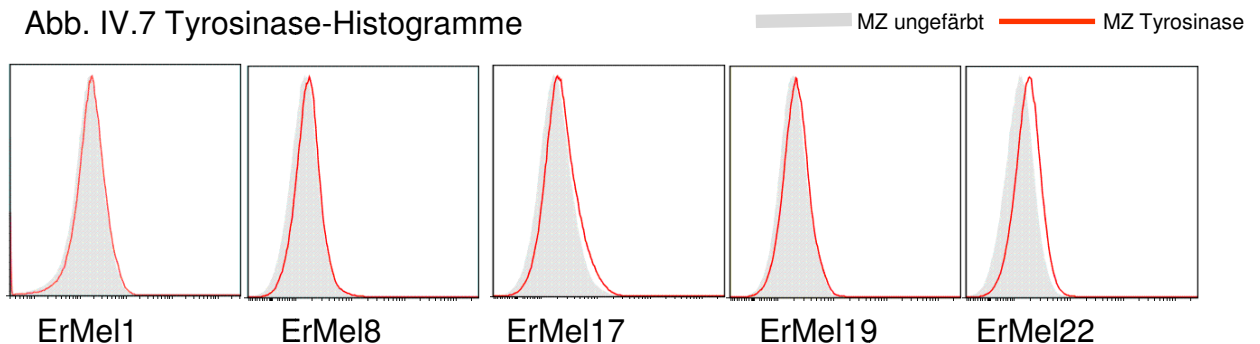


Abb. IV.7 Tyrosinase-Histogramme



Tyrosinase als Marker der Melanin-Produktion wird wie MelanA auf den MM-Zellen erwartet. Es konnte jedoch nicht (6 Zelllinien) bzw nur auf 4 Zelllinien (ErMel8,17,19 und 22) in geringer Höhe nachgewiesen werden.

### 1.2. Zelladhäsionsmarker

Adhäsion hat für das Tumorwachstum in doppelter Hinsicht Bedeutung. Zum einen fördert sie das lokale invasive Wachstum, zum anderen wird sie zur Metastasierung benötigt.

### 1.2.1. MCAM (=CD146)

- Homotypische Interaktionen von MCAM fördern das lokale Tumorstadium und damit die Invasion ins umliegende Gewebe. Heterotypische Interaktionen fördern die Intra- und Extravasation von Melanomzellen, was das Metastasierungspotential erhöht<sup>35</sup>.
- MCAM enthält Erkennungsmotive für Protein-Kinasen. Dies ist ein Hinweis darauf, dass es auch an Signalkaskaden beteiligt sein kann<sup>35</sup>.
- Auf normalen Melanozyten tritt MCAM nicht auf; auf Nävi-Zellen kann man eine MCAM Expression nachweisen, jedoch sehr viel niedriger als auf primären oder metastatischen Melanomen<sup>35,36</sup>. Die Tumordicke korreliert positiv mit der MCAM-Expression<sup>40</sup>.

Abb. IV.8 Logarithmische Darstellung der MCAM-Expression auf Melanomzellen im Vergleich zur MCAM-Expression auf PBMCs; die Autofluoreszenz ist abgezogen. Die rote Linie gibt das PBMC-Expressionslevel an und dient lediglich als Orientierungshilfe.

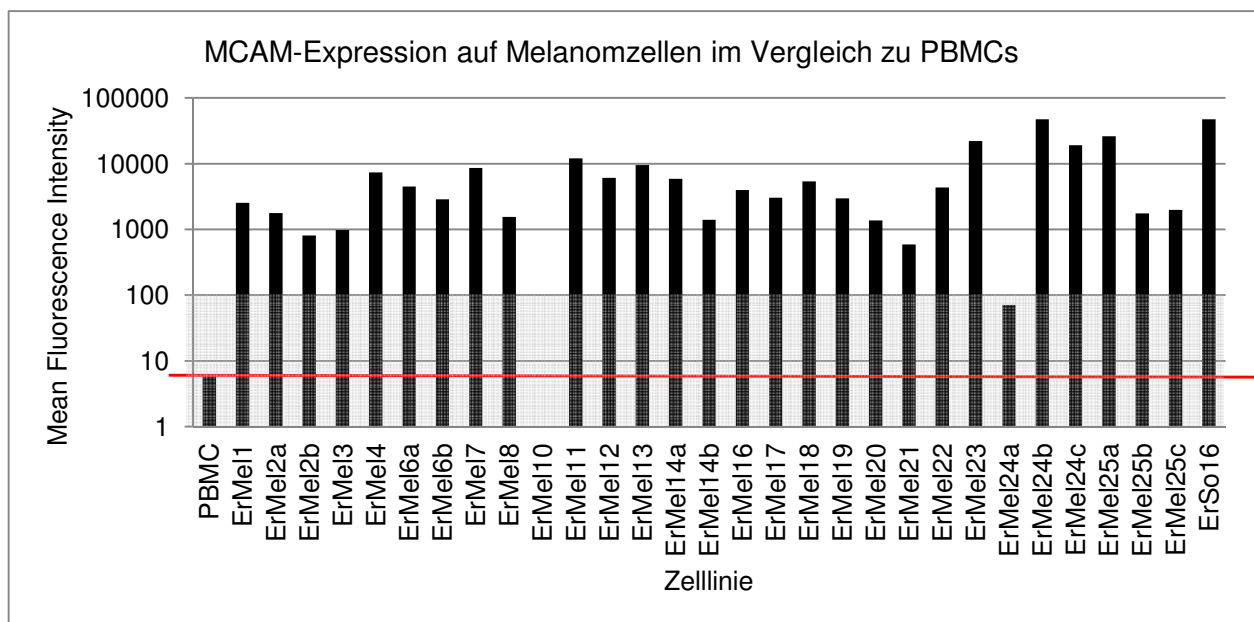


Abb. IV.9 MCAM-Histogramme

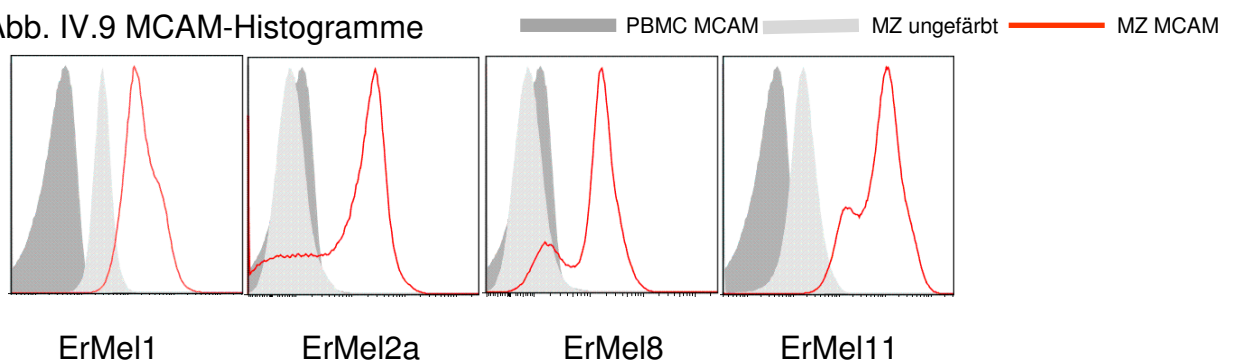
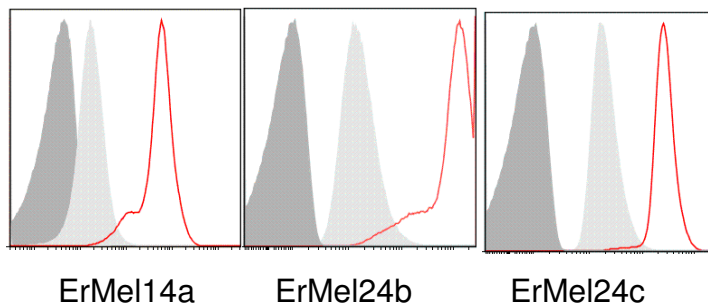


Abb. IV.9 MCAM-Histogramme



Durch seine beständig hohe Expression auf 93,1% (27 von 29) der getesteten Zelllinien kann MCAM als melanomtypisch angesehen werden. Einzige Ausnahme bildet ErMel10, auf dieser Zelllinie ist keine MCAM-Expression nachweisbar. Linie ErMel 24a überschreitet einen MFI von 100 nicht und wird somit ebenfalls als negativ gewertet. Diese Linie stammt aus einer Leukapherese. Die MCAM-Expression steigt nach längerer Kultivierung an (Linien 24b und 24c). Auch ErSo16, ausgewachsen aus einer Zell-sortierung, weist eine sehr hohe MCAM Expression auf. MCAM wird nur in sehr geringem Ausmaß auf PBMCs exprimiert – ein großer Vorteil für die später beschriebene Isolierung der Melanomzellen aus Vollblut von MM-Patienten. MCAM wurde aufgrund seines Expressionsprofils ebenfalls in die Markerkombination für die Zellsortierung aufgenommen. Die meisten Linien zeigen eine einheitliche MCAM-Expression, nur in einigen Linien kann auch eine Subpopulation mit geringerer Expression abgegrenzt werden (z.B. ErMel8 und ErMel11).

#### 1.2.2. ICAM (=CD54)

ICAM stellt wie MCAM ein Adhäsionsmolekül dar. Hinsichtlich der Charakterisierung ist es interessant, da

- seine Expression im MM positiv mit der Tumordicke korreliert ist<sup>55</sup>.
- eine wesentliche Beteiligung an der Metastasierung nachgewiesen ist<sup>56</sup>. ICAM vermittelt Adhäsion an Leukozyten<sup>53,54</sup>. Dadurch wird das Überleben der Tumorzelle in der Blutzirkulation sowie die Extravasation ins Gewebe gefördert<sup>56</sup>. ICAM trägt so maßgeblich zur Disseminierung von Zellen des Primärtumors bei.

Abb. IV.10 Logarithmische Darstellung der ICAM-Expression auf Melanomzellen im Vergleich zur ICAM-Expression auf PBMCs; die Autofluoreszenz ist abgezogen. Die rote Linie gibt das PBMC-Expressionslevel an und dient lediglich als Orientierungshilfe.

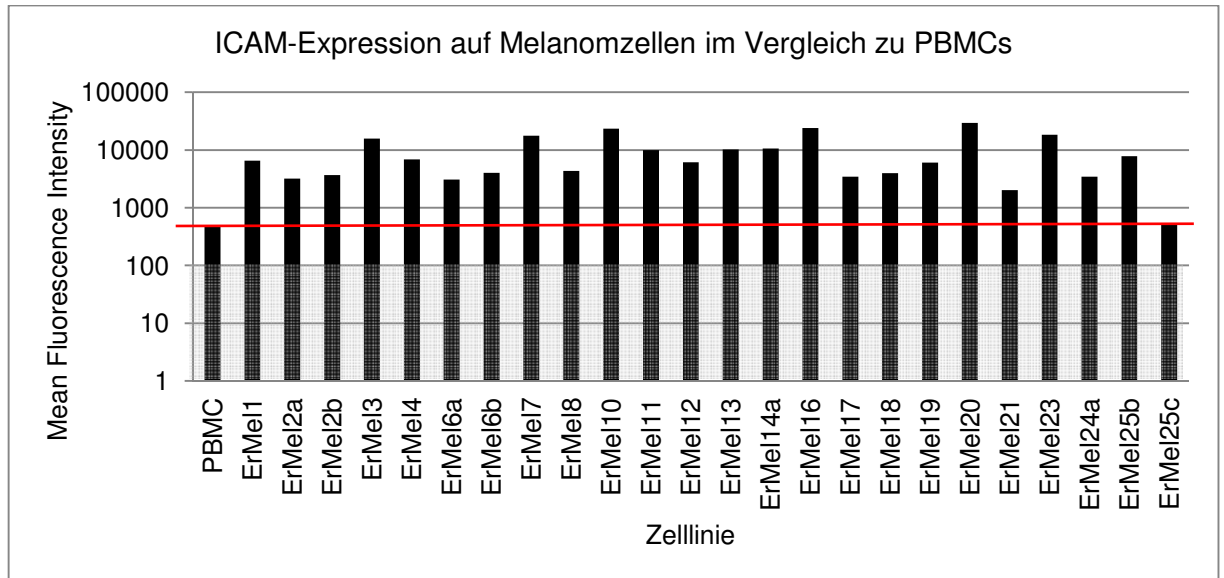
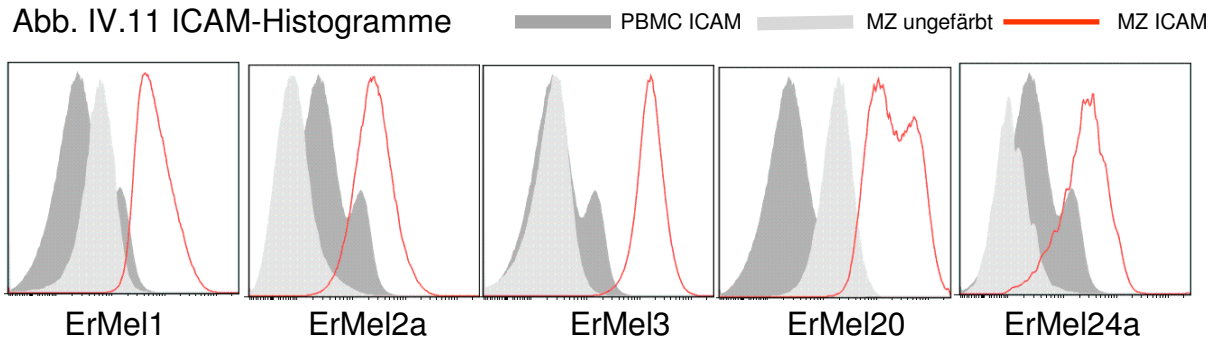


Abb. IV.11 ICAM-Histogramme



Das Adhäsionsmolekül ICAM wird auf allen untersuchten Melanomzelllinien exprimiert. Auch auf PBMCs ist es in einer Subpopulation nachzuweisen, jedoch auf einem niedrigeren Level. In den Histogrammen ist, wie in den Beispielen ErMel2a und 24a, erkennbar dass sich die Expression auf der PBMC-Subpopulation mit der auf Melanomzellen deckt. Daher kann ICAM nicht zur Separierung dieser beiden Zellarten verwendet werden.

### 1.2.3. N-Cadherin (=CD325)

N-Cadherin hat zwei wichtige Funktionen: es ist Adhäsionsmolekül für homo- und heterotypische Adhäsion sowie Signalmolekül für intrazelluläre Kommunikation. Durch die Vermittlung interzellulärer Adhäsion zwischen Tumorzellen und ihrer Mikroumgebung sowie der intrazellulären Kommunikation ergibt sich eine wichtige Rolle hinsichtlich der Migration, der



Metastasierung und dem Überleben von Melanomzellen<sup>35,63</sup>.

Abb. IV.12 Logarithmische Darstellung der N-Cadherin-Expression auf Melanomzellen im Vergleich zur N-Cadherin-Expression auf PBMCs; die Autofluoreszenz ist abgezogen. Die rote Linie gibt das PBMC-Expressionslevel an und dient lediglich als Orientierungshilfe.

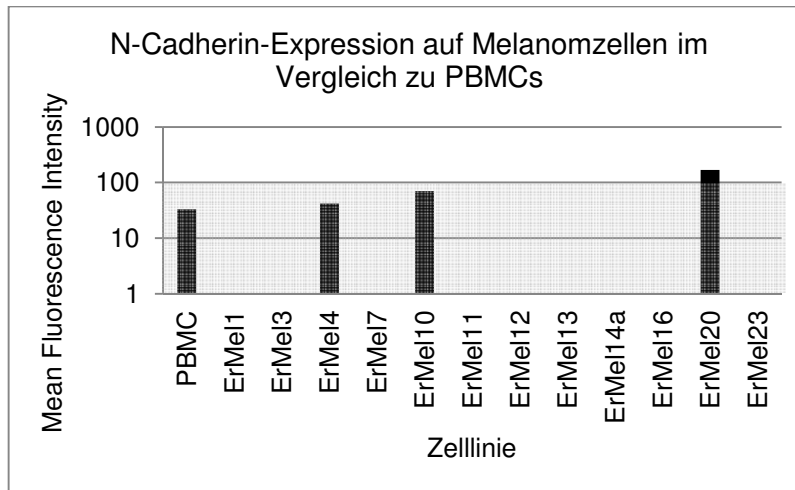
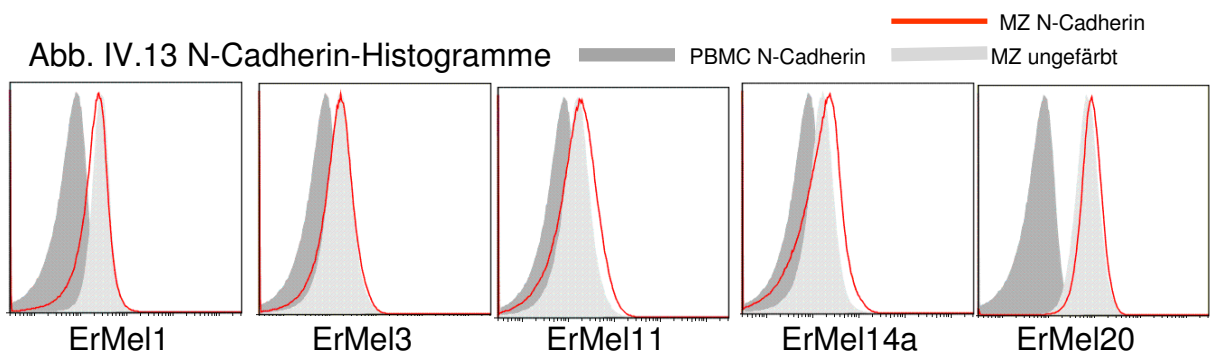


Abb. IV.13 N-Cadherin-Histogramme



N-Cadherin wurde nur bei wenigen Zelllinien, und dann auch nur in sehr geringer Stärke (MFI < 100) im Vergleich zu den ungefärbten Melanomzellen nachgewiesen. N-Cadherin wurde nach den Ergebnissen der ersten Färbungen nicht weiter im Färbepanel behalten.

1.2.4. CD166 (=ALCAM) ist aus mehreren Gründen interessant:

- CD166 ist ein Adhäsionsmolekül, das homo- und heterophile Zell-Zell-Interaktionen vermitteln kann. Beim MM führt es zur Aggregation von Melanomzellen<sup>58</sup>.
- CD166 wurde von Van Kempen et al intensiv untersucht. Die Gruppe hat CD166 beim malignen Melanom als Marker für den Tumorprogress identifiziert<sup>59</sup>. Es kann demnach als Unterscheidungsmerkmal zwischen dem nicht-invasiven, nicht-

metastasierenden Melanom der radialen Wachstumsphase und dem invasiven und metastasierenden Melanom der vertikalen Wachstumsphase geeignet sein.

- Auch in anderen Krebsarten konnte ALCAM nachgewiesen werden<sup>58</sup>.

Abb. IV.14 Logarithmische Darstellung der CD166-Expression auf Melanomzellen; die Autofluoreszenz ist abgezogen.

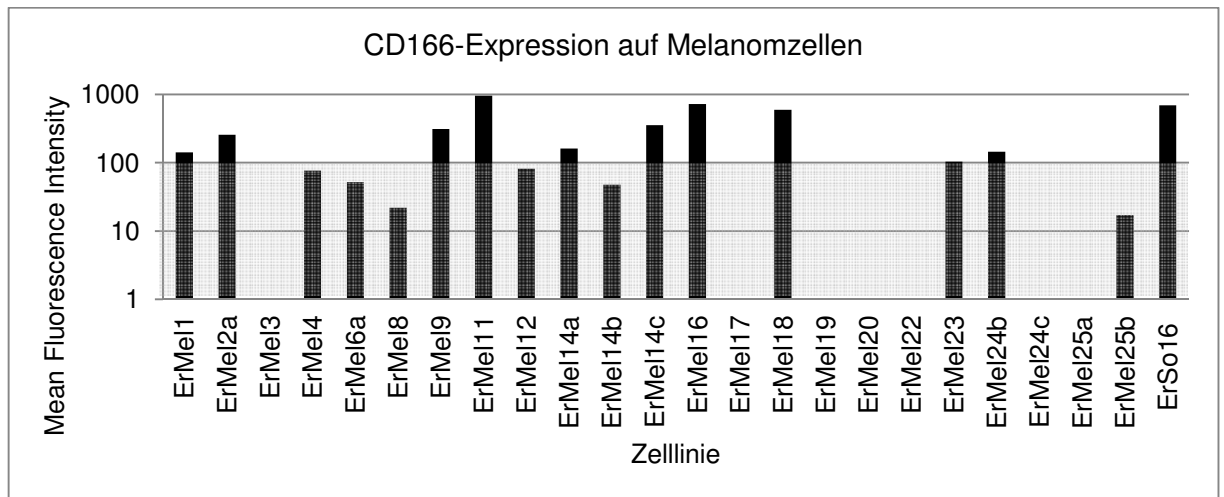
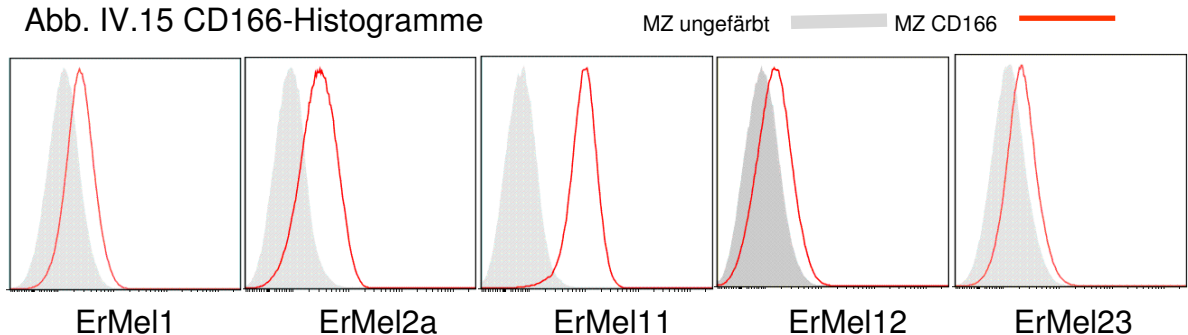


Abb. IV.15 CD166-Histogramme



Bei CD166 zeichnet sich ein variables Bild betreffend der Expression auf Melanomzellen ab. Während es auf 7 von 24 Zelllinien nicht detektierbar ist, zeigen immerhin 10 Linien eine messbare CD166-Expression (MFI>100), die restlichen 7 Linien liegen unter einer MFI von 100.

#### 1.2.5. Weitere getestete Marker

##### 1.2.5.1. HLA-DR

HLA-DR stellt ein Klasse II Antigen des humanen Haupthistokompatibilitätskomplex dar. HLA-DR wurde bereits auf Melanomzellen

nachgewiesen. Es dient der Erkennung für Zellen des Immunsystems. Bröcker et al beschrieben bereits 1984, dass HLA-DR an der invasiven Front des fortschreitenden Tumors nachweisbar ist und auch mit der Tumordicke und der Aggressivität des Tumors korreliert werden kann<sup>68</sup>.

Abb. IV.16 Logarithmische Darstellung der HLA-DR-Expression auf Melanomzellen im Vergleich zur HLA-DR-Expression auf PBMCs; die Autofluoreszenz ist abgezogen. Die rote Linie gibt das PBMC-Expressionslevel an und dient lediglich als Orientierungshilfe.

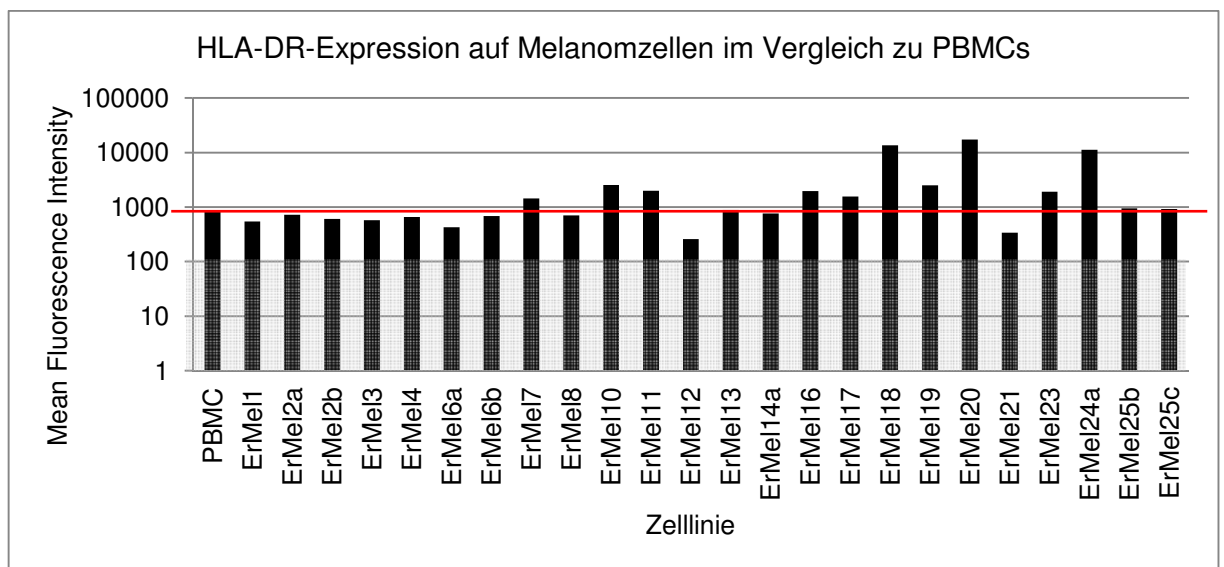
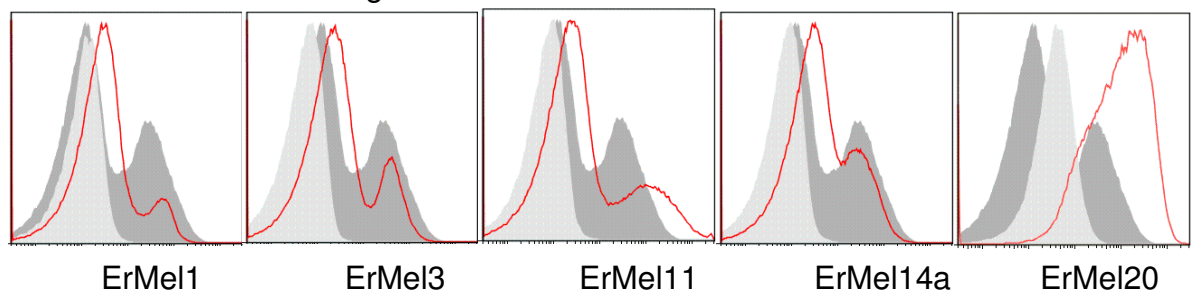


Abb. IV.17 HLA-DR-Histogramme —■— PBMC HLA-DR —■— MZ ungefärbt —■— MZ HLA-DR



Sowohl auf den MM-Zellen als auch auf PBMCs ist eine deutliche HLA-DR-Expression erkennbar. Es besteht kein Unterschied der Expressionsstärke zwischen den beiden Zellarten. Bei den MM-Zellen wie auch bei PBMCs stellen im sich Histogramm zwei Populationen dar, was unterschiedliche hohe Expressionslevel in der Gesamtpopulation aufzeigt.

#### 1.2.5.2. HLA-ABC

HLA-ABC stellt ein Klasse I Antigen des MHC dar. Es dient der Vermittlung der zytotoxischen Immunität.

Abb. IV.18 Logarithmische Darstellung der HLA-ABC-Expression auf Melanomzellen im Vergleich zur HLA-ABC-Expression auf PBMCs; die Autofluoreszenz ist abgezogen. Die rote Linie gibt das PBMC-Expressionslevel an und dient lediglich als Orientierungshilfe.

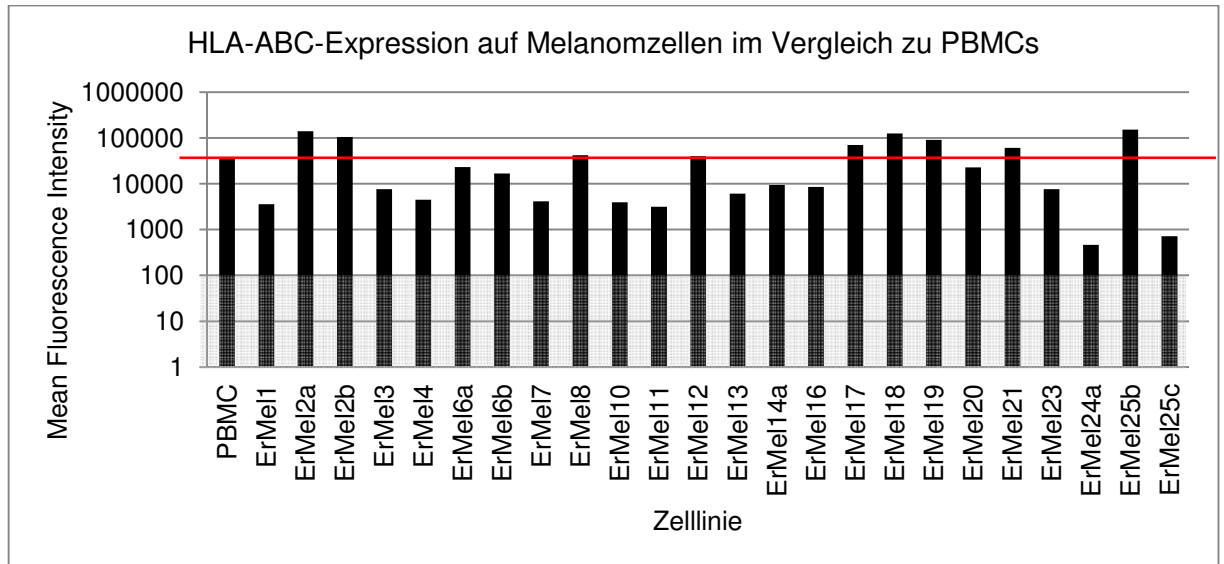
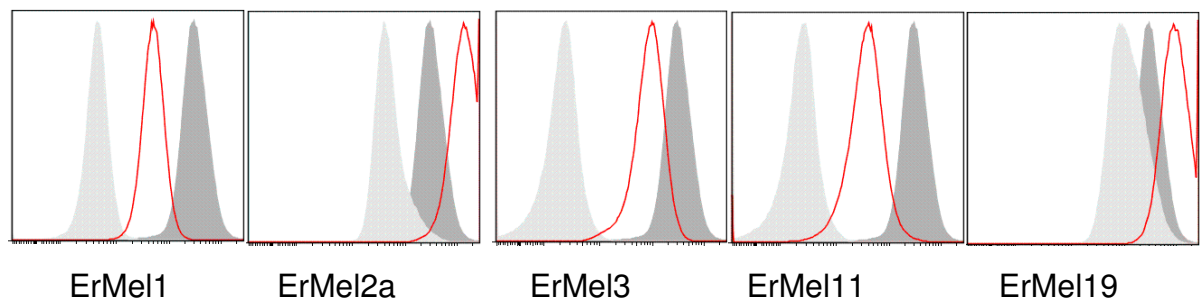


Abb. IV.19 HLA-ABC-Histogramme — PBMC HLA-ABC — MZ ungefärbt — MZ HLA-ABC



Auch eine Expression von HLA-ABC ist deutlich nachweisbar. Die Expressionsstärke auf den MM-Zellen ist im Vergleich mit der auf PBMCs in den meisten Fällen geringer. Die Expressionslevel innerhalb der MM-Zellpopulation sind gleichmäßig, dh es zeichnen sich im Vergleich zu z.B. HLA-DR keine Subpopulationen ab.

#### 1.2.6. CD45

CD45 kommt in allen hematopoietischen Zellen außer Erythrozyten und Thrombozyten vor<sup>69</sup>. Somit dient es der Unterscheidung der hematopoietischen Zellen von anderen Zelltypen wie z.B. Melanomzellen.

Abb. IV.20 Logarithmische Darstellung der CD45-Expression auf Melanomzellen im Vergleich zur CD45-Expression auf PBMCs; die Autofluoreszenz ist abgezogen. Die rote Linie gibt das PBMC-Expressionslevel an und dient lediglich als Orientierungshilfe.

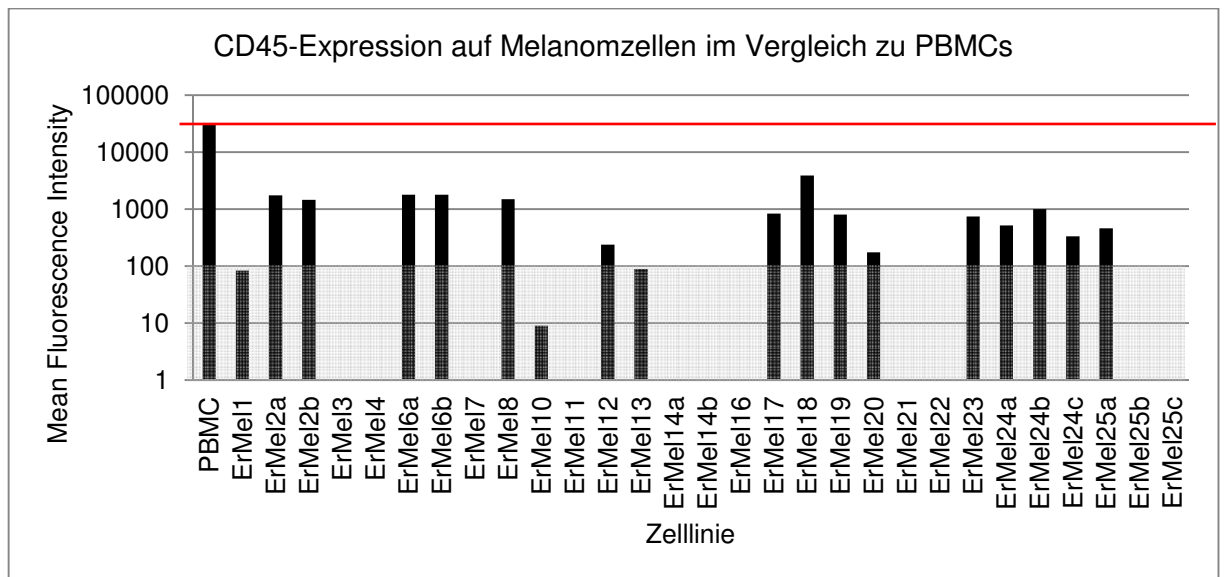
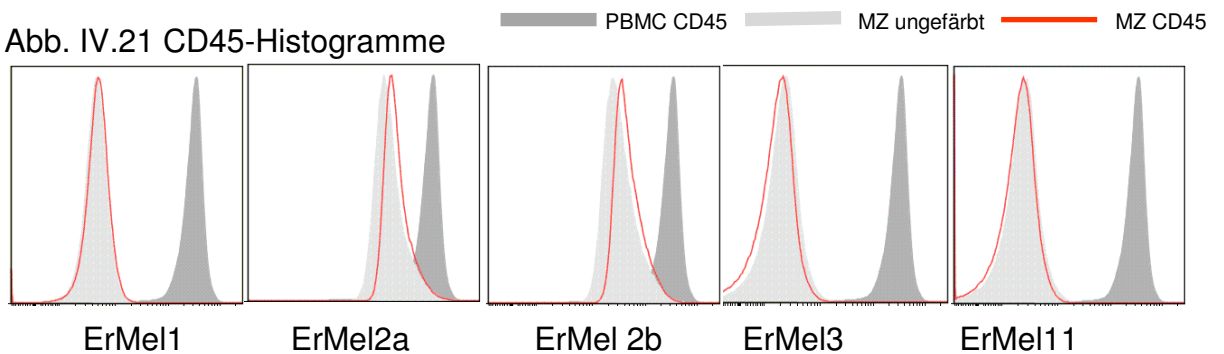


Abb. IV.21 CD45-Histogramme



Eine Färbung mit dem CD45-Antikörper ist zwar auf einigen MM-Zellen minimal nachzuweisen (15 von 29 Linien, entsprechend 51,7%), jedoch ist die Färbung auf PBMCs deutlich und um ein Vielfaches stärker. Somit ist CD45 als Unterscheidungsmerkmal zwischen PBMCs und MM-Zellen geeignet.


#### 1.2.7. Zusammenfassung

Es wurden 10 Marker aus unterschiedlichen Bereichen getestet: melanomspezifische Marker, Zelladhäsionsmarker, T-Zell-Erkennungsmarker sowie ein Negativ-Kontrollmarker. Der Vergleich der Expression der getesteten Marker auf PBMCs war deshalb von Wichtigkeit, weil ein möglichst unterschiedliches Expressionsprofil dieser Zellarten gesucht wurde. Die Markerkombination CD45-MCSP+MCAM+ erfüllt diese

Bedingungen und wurde deshalb anschließend für die Isolierung und Zellsortierung zirkulierender Tumorzellen aus Patientenblut verwendet. Die Marker, die gegenüber den PBMCs kein deutlich unterscheidbares Expressionsverhalten auf Melanomzellen zeigen können bei der Analyse der sortierten Zellen hinsichtlich der Zelleigenschaften hilfreich sein (Adhäsionsverhalten, T-Zell-Erkennung).

Tab. IV.1 Zusammenfassung der Melanomzellen-Charakterisierung mittels der mittleren Fluoreszenzintensität

	MCSP	MelanA	Tyr	MCAM	ICAM	CD 325	CD 166	HLA-DR	HLA-ABC	CD 45
ErMel1										
ErMel2a		-	-			-				
ErMel2b		-	-			-	-			
ErMel3										
ErMel4										
ErMel6a		-	-			-				
ErMel6b		-	-			-	-			
ErMel7		-	-				-			
ErMel8						-				
ErMel9	-	-	-	-	-	-		-	-	-
ErMel10		-	-				-			
ErMel11		-	-							
ErMel12										
ErMel13		-	-				-			
ErMel14a										
ErMel14b		-	-		-	-		-	-	
ErMel14c	-	-	-		-	-		-	-	-
ErMel16		-	-							
ErMel17						-				
ErMel18		-	-			-				
ErMel19						-				
ErMel20										
ErMel21		-	-			-	-			
ErMel22					-	-		-	-	
ErMel23			-							
ErMel24a			-			-	-			
ErMel24b		-	-		-	-		-	-	
ErMel24c		-	-		-	-		-	-	
ErMel25a		-	-		-	-		-	-	
ErMel25b			-			-				
ErMel25c			-			-	-			
PBMC		-	-				-			



Negativ      MFI 100 – 1000      MFI 1000 – 10 000      MFI > 10 000

### 1.3. Stammzellenmarker

Im Folgenden wird die Expression von Stammzellmarkern dargestellt. Diese Marker wurden untersucht, um festzustellen, ob Melanomzellen stammzellähnliche Eigenschaften aufweisen. Solche Zellen wurden in der Literatur bereits durch die Expression unterschiedlicher Moleküle charakterisiert<sup>66,73-75,90</sup>. Ihnen werden die gleichen Eigenschaften zugeschrieben wie normalen Körperstammzellen, also Selbsterneuerung, Langlebigkeit, verbesserter Selbstschutz. Dadurch werden diese Zellen für Therapien schwer greifbar. Insbesondere bei den im Blut zirkulierenden Tumorzellen könnte es sich um Zellen mit solchen Eigenschaften handeln. Wie in der Einleitung erläutert gibt es hinsichtlich der Melanomstammzellen zwei Modelle. Im dynamischen Modell wird postuliert dass es eine generelle Eigenschaft von Melanomzellen ist, wie eine Stammzelle zu fungieren. Damit könnte potentiell jede Melanomzelle zur Melanomstammzelle werden. Das hierarchische Modell geht davon aus, dass es nur einige wenige Melanomzellen sind, die Stammzeleigenschaften besitzen und dass die Masse an Tumorzellen diese Eigenschaften nicht hat und auch nicht erwerben kann. Aus dieser kleinen, aber stammzell-ähnlichen Zellpopulation entsteht dann die gesamte heterogene Tumormasse. In beiden Fällen ist die Anzahl der zu erwartenden Stammzellmarker-exprimierenden Melanomzellen gering<sup>66,87,88</sup>. Im Folgenden wird die Expression von cKit, CD20, CD133, CD271, ABCG2 und Notch1 näher erläutert.

#### 1.3.1. cKit (=CD117)

cKit hat mehrere Aspekte, die es zu einem interessanten Molekül machen.

- Es wird in hematopoietischen Stammzellen und multipotenten Vorläuferzellen hoch exprimiert.
- Als Rezeptor-Tyrosinkinase spielt es eine wichtige Rolle in der Signalgebung<sup>94</sup>. cKit kann als Proto-Onkogen fungieren: es kann durch Überexpression oder durch aktivierende Mutationen<sup>93</sup> zur Malignität führen, wie es auch beim MM der Fall sein kann<sup>91,92</sup>. SCF, der cKit-Ligand, kann bei Bindung an cKit das Apoptoseprogramm der Zelle auslösen. Daher stammt die Annahme, dass Melanomzellen

durch den Verlust von cKit der SCF-vermittelten Apoptose entkommen können und somit Tumorwachstum und auch Metastasierung gefördert werden<sup>95</sup>.

- cKit stellt auch einen vielversprechenden Angriffspunkt zielgerichteter Therapie dar<sup>93</sup>: Imatinib, ein Tyrosinkinasehemmer, inhibiert eine bestimmte mutierte Form von cKit. Es wird bei chronischer myeloischer Leukämie erfolgreich eingesetzt.

Abb. IV.22 Logarithmische Darstellung der cKit-Expression auf Melanomzellen im Vergleich zur cKit-Expression auf PBMCs; die Autofluoreszenz ist abgezogen. Die rote Linie gibt das PBMC-Expressionslevel an und dient lediglich als Orientierungshilfe.

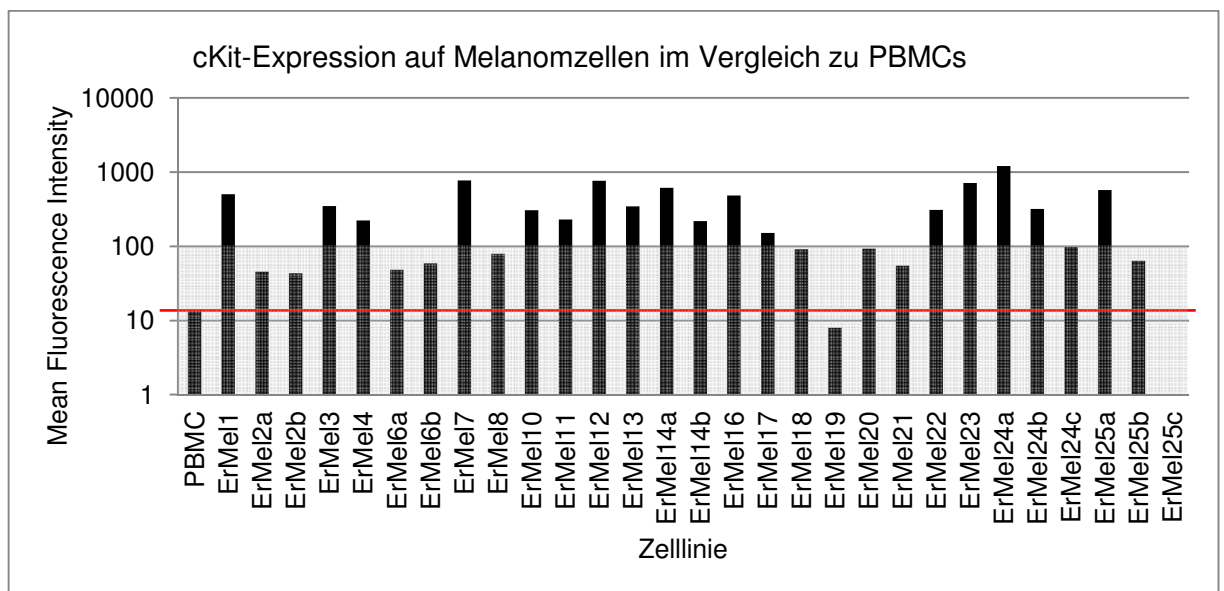
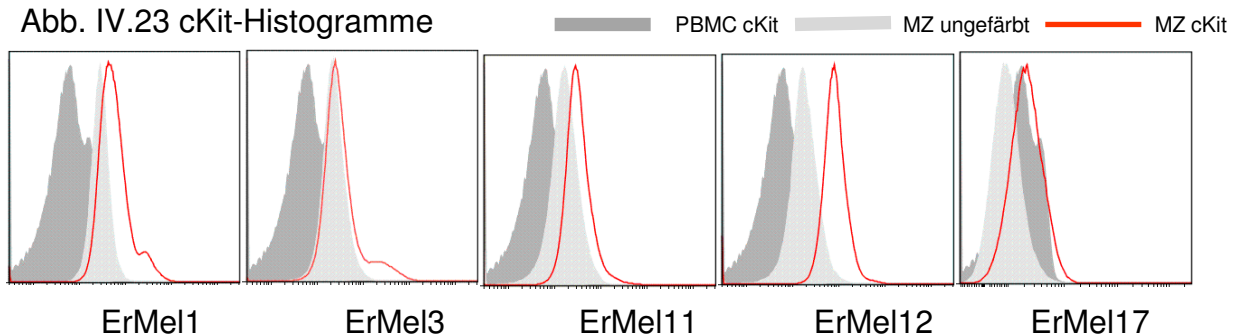


Abb. IV.23 cKit-Histogramme



cKit ist auf dem Großteil (58,6%, 17 von 29 Linien) der MM-Zellen nachweisbar. Die Expressionsstärke ist sehr unterschiedlich und reicht von einer mehr oder weniger stark ausgeprägten Expression der gesamten Zellpopulation (wie in den Linien ErMel11 und ErMel12) bis hin zur



Expression in einer Subpopulation (wie in den Linien ErMel1 und ErMel3) von Zellen, die sich vom Rest der Zellen durch eine stärkere cKit-Expression abgrenzt.

### 1.3.2. CD20

Die genaue Funktion von CD20 ist noch ungeklärt. Es wurde aber von Fang et al auf Melanomzellen nachgewiesen<sup>89</sup>, die sog. TICs darstellen (= „tumor initiating cells“), Zellen also, die Ausgangspunkt einer Metastase sind.

Abb. IV.24 Logarithmische Darstellung der CD20-Expression auf Melanomzellen im Vergleich zur CD20-Expression auf PBMCs; die Autofluoreszenz ist abgezogen. Die rote Linie gibt das PBMC-Expressionslevel an und dient lediglich als Orientierungshilfe.

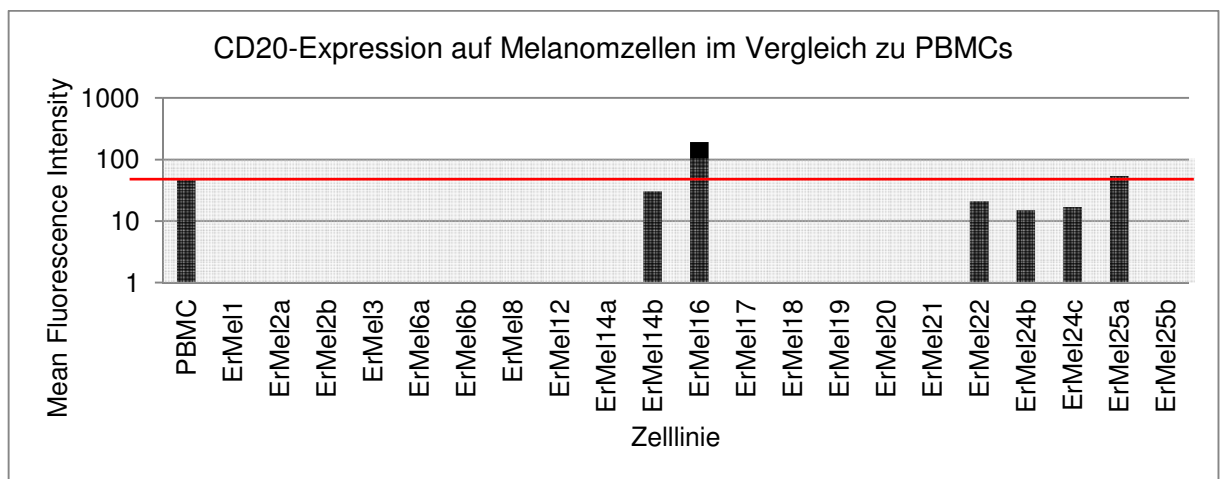
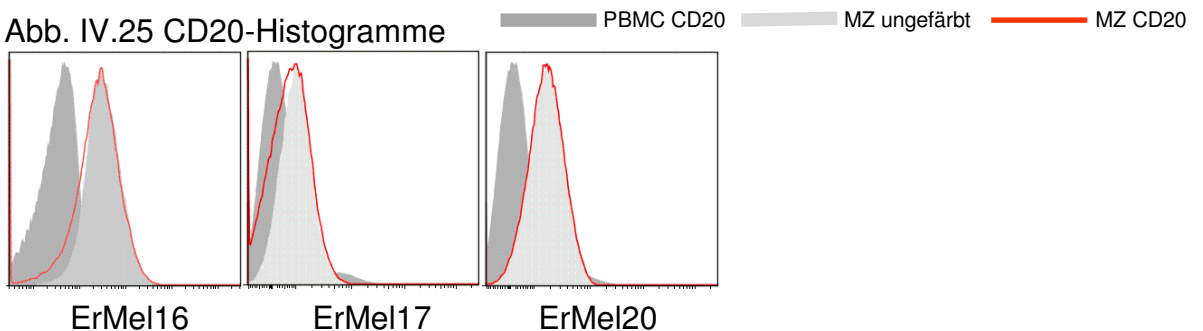


Abb. IV.25 CD20-Histogramme



Eine Expression von CD20 auf den MM-Zelllinien war nicht nachweisbar. Die Histogramme der gefärbten und ungefärbten MM-Zelllinien sind nahezu deckungsgleich. Auf PBMCs ist CD20 in einer Subpopulation der Zellen nachweisbar, da CD20 insbesondere von B-Zellen exprimiert wird. In der Literatur beschrieben wurde zwar die Detektion einer Melanomzellpopulation mit Stammzeleigenschaften mittels CD20<sup>73</sup>, aber in den hier analysierten Melanomzellen konnte kein CD20-positives Subset detektiert werden. Die

beschriebene CD20-positive Population soll allerdings nur aus einer minimalen Anzahl von Zellen bestehen, daher wäre es auch möglich dass die hier verwendete Messung aufgrund zu geringer Zellzahl nicht sensitiv genug für die Detektion dieses Subsets ist.

### 1.3.3. CD133

Die genaue Funktion ist noch ungeklärt. Es wird in zahlreichen Geweben und Zelltypen exprimiert.

- CD133 gilt als Stammzellenmarker; es wird auf hematopoietischen Stammzellen<sup>101</sup>, endothelialen Vorläuferzellen<sup>102</sup> sowie auf neuronalen Stammzellen exprimiert.
- Im MM wurde 2007 von Monziana et al eine CD133+ Population von Zellen identifiziert, die Stammzellencharakteristika aufweist<sup>66</sup>.

Abb. IV.26 Logarithmische Darstellung der CD133-Expression auf Melanomzellen im Vergleich zur CD133-Expression auf PBMCs; die Autofluoreszenz ist abgezogen. Die rote Linie gibt das PBMC-Expressionslevel an und dient lediglich als Orientierungshilfe.

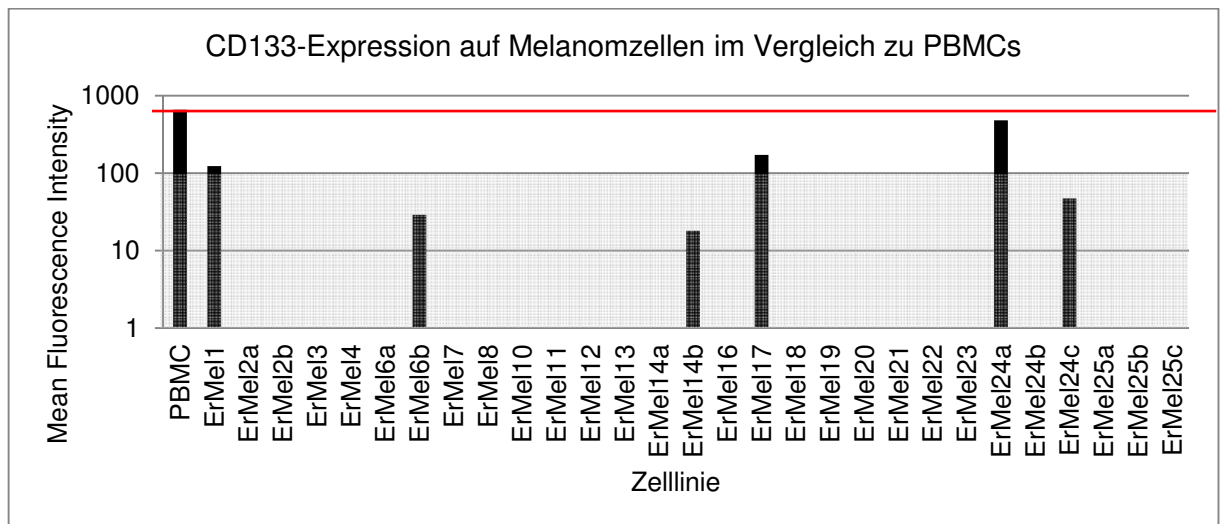
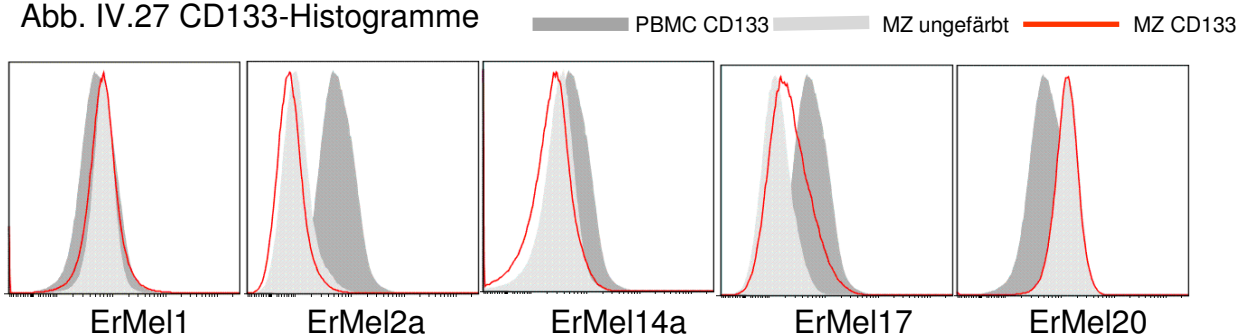


Abb. IV.27 CD133-Histogramme



Eine Expression von CD133 auf den MM-Zelllinien war nicht bzw nur auf sehr geringem Niveau nachweisbar. Nur 3 von 29 Melanomzelllinien (10,3%) exprimieren es überhaupt. Die Expression ist auf PBMCs außerdem deutlich höher. Wie bereits erläutert, wurde nur eine sehr kleine Population an Zellen mit Stammzell-Eigenschaften erwartet.

#### 1.3.4. CD271 (=NGFR)

Die genaue Funktion von CD271 ist nicht vollständig geklärt. Dennoch gibt es zwei Aspekte, die eine Untersuchung innerhalb der Charakterisierung rechtfertigen:

- CD271 ist Rezeptor für Neutrophine. Diese Wachstumsfaktoren stimulieren in neuronalen Zellen Differenzierung und Überleben.
- CD271 wurde in einigen Krebsarten nachgewiesen, u.a. im MM<sup>108,109</sup>. Boiko et al konnten 2010 zeigen, dass CD271 auf sog. MTSCs (= melanoma tumour stem cells) exprimiert wird und sogar als Marker für deren Isolierung genutzt werden kann<sup>110</sup>.

Abb. IV.28 Logarithmische Darstellung der CD271-Expression auf Melanomzellen; die Autofluoreszenz ist abgezogen.

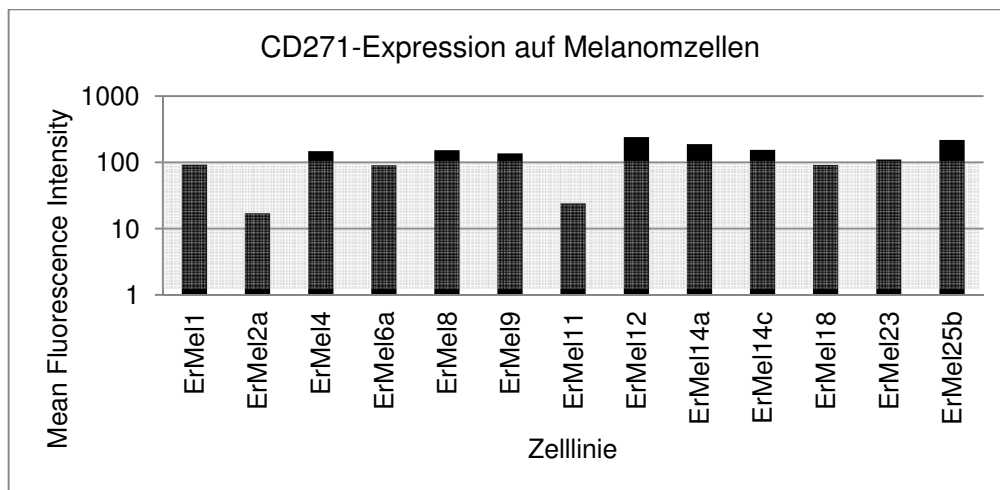
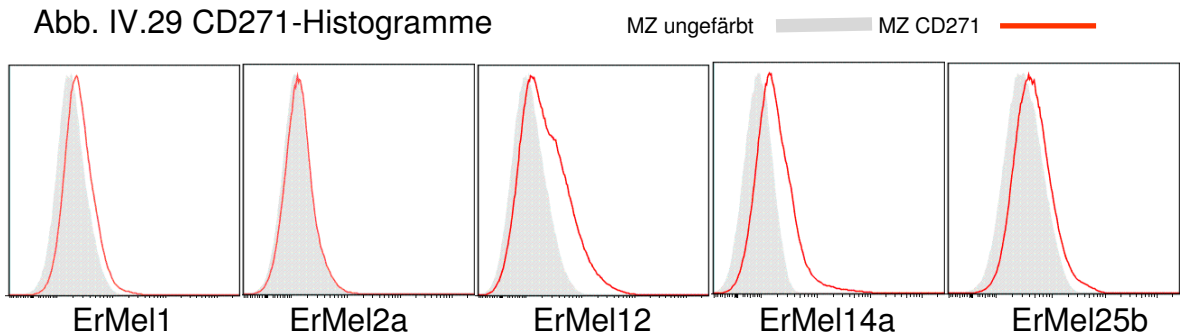


Abb. IV.29 CD271-Histogramme



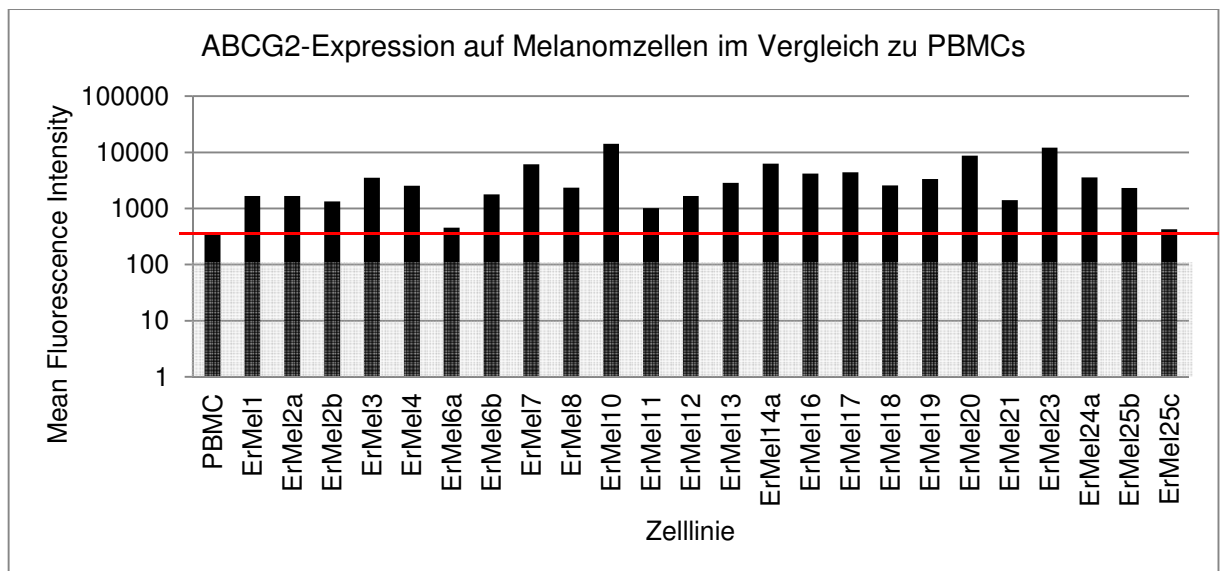
Die CD271-Expression ist gering. Das Expressionsniveau reicht von kaum detektierbar wie in Linie ErMel2a bis hin zu einem deutlichen Shift der Zellen wie in den Histogrammen ErMel12 und 14a klar wird. Insgesamt wird CD271 auf 9 von 13 getesteten Linien nachgewiesen (entsprechend 69,2%).

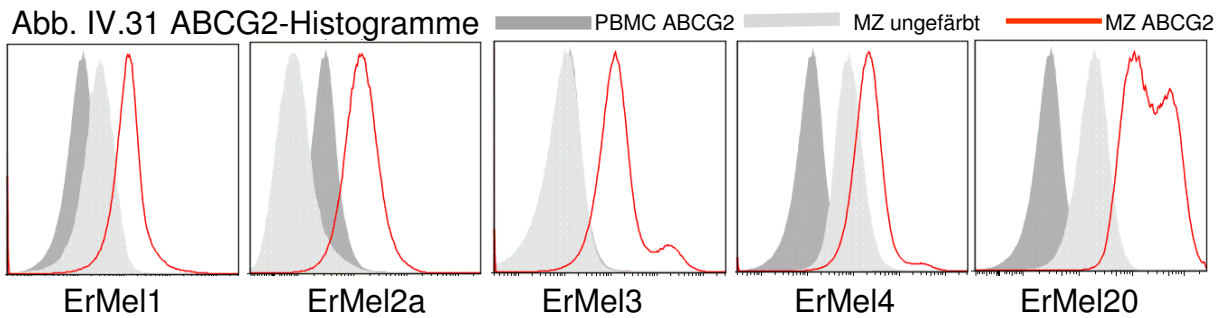
### 1.3.5. ABCG2

ABCG2 stellt ein Transportprotein dar. Es zeigt interessante Eigenschaften:

- Es wurde gezeigt, dass ABCG2 zur Identifizierung von Zellen mit stammzell-ähnlichen Eigenschaften genutzt werden kann<sup>64</sup>.
- ABCG2 spielt eine Rolle als Vermittler von Chemoresistenz.
- Mehrere Substanzen können ABCG2 inhibieren, darunter Tyrosinkinaseinhibitoren. Aus diesem Grund ist ABCG2 interessant für die zielgerichtete Therapie des MM: Mit einer Hemmung der ABCG2-Transporter kann eine Verminderung der Chemoresistenz erreicht werden.

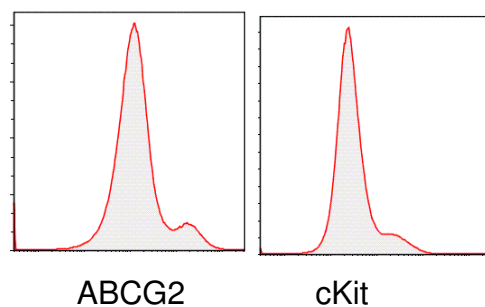
Abb. IV.30 Logarithmische Darstellung der ABCG2-Expression auf Melanomzellen im Vergleich zur ABCG2-Expression auf PBMCs; die Autofluoreszenz ist abgezogen. Die rote Linie gibt das PBMC-Expressionslevel an und dient lediglich als Orientierungshilfe.





ABCG2 lässt sich durchgehend auf den MM-Zelllinien nachweisen. Auch hier deutet sich, ähnlich wie bei cKit, in drei Zelllinien eine Subpopulation von MM-Zellen an, die ABCG2 deutlich höher exprimiert als der Rest der Zellen (z.B. ErMel3, 4 und 20). ErMel3 weist auch bei cKit eine Subpopulation auf.

Abb. IV.32 Histogramme der Linie ErMel3



Im Vergleich der Histogramme wird die Ähnlichkeit in der Größe der Subpopulation, die jeweils positiv ist für ABCG2 bzw. cKit, deutlich. Da die Marker in unterschiedlichen Panels gefärbt wurden, ist ein direkter Vergleich nicht möglich. Dennoch könnte es sich dabei um die gleichen Zellen handeln, diese wären dann positiv für beide Stammzellmarker.

#### 1.3.6. Notch1

Nachdem in mehreren Krebsarten eine abnorme Notch-Signalgebung festgestellt wurde, wird auch eine Rolle von Notch als Tumorpromotor oder - je Zelltyp und Kontext - auch als Tumorsuppressor, diskutiert.

- Notch1 ist an der Tumorgenese des malignen Melanoms beteiligt<sup>111</sup>. Es konnte gezeigt werden, dass der Notch-Signalweg im MM aktiv ist, nicht jedoch in normalen Melanozyten<sup>112</sup>.
- Notch vermittelt onkogene Effekte: Hochregulierung von  $\beta$ -Catenin und MCAM. Beide Moleküle fördern die Tumorprogression und den

Metastasierungsprozess<sup>112</sup>.

- Die im MM wichtigen Signaltransduktionswege PI3K und MAPK/MEK/Erk werden durch Notch-Signalgebung aktiviert<sup>113</sup>

Abb. IV.33 Logarithmische Darstellung der Notch-Expression auf Melanomzellen im Vergleich zur Notch1-Expression auf PBMCs; die Autofluoreszenz ist abgezogen. Die rote Linie gibt das PBMC-Expressionslevel an und dient lediglich als Orientierungshilfe.

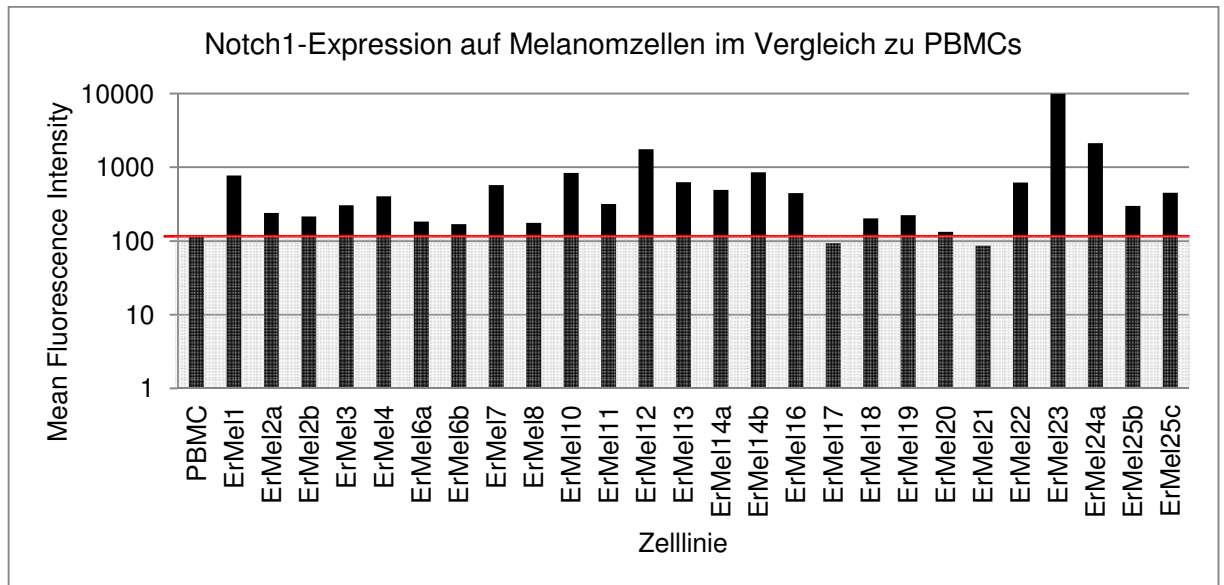
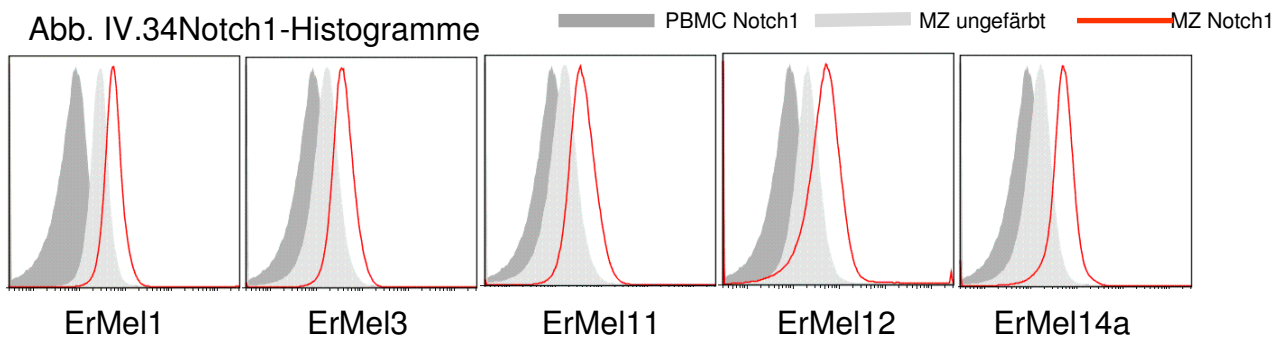
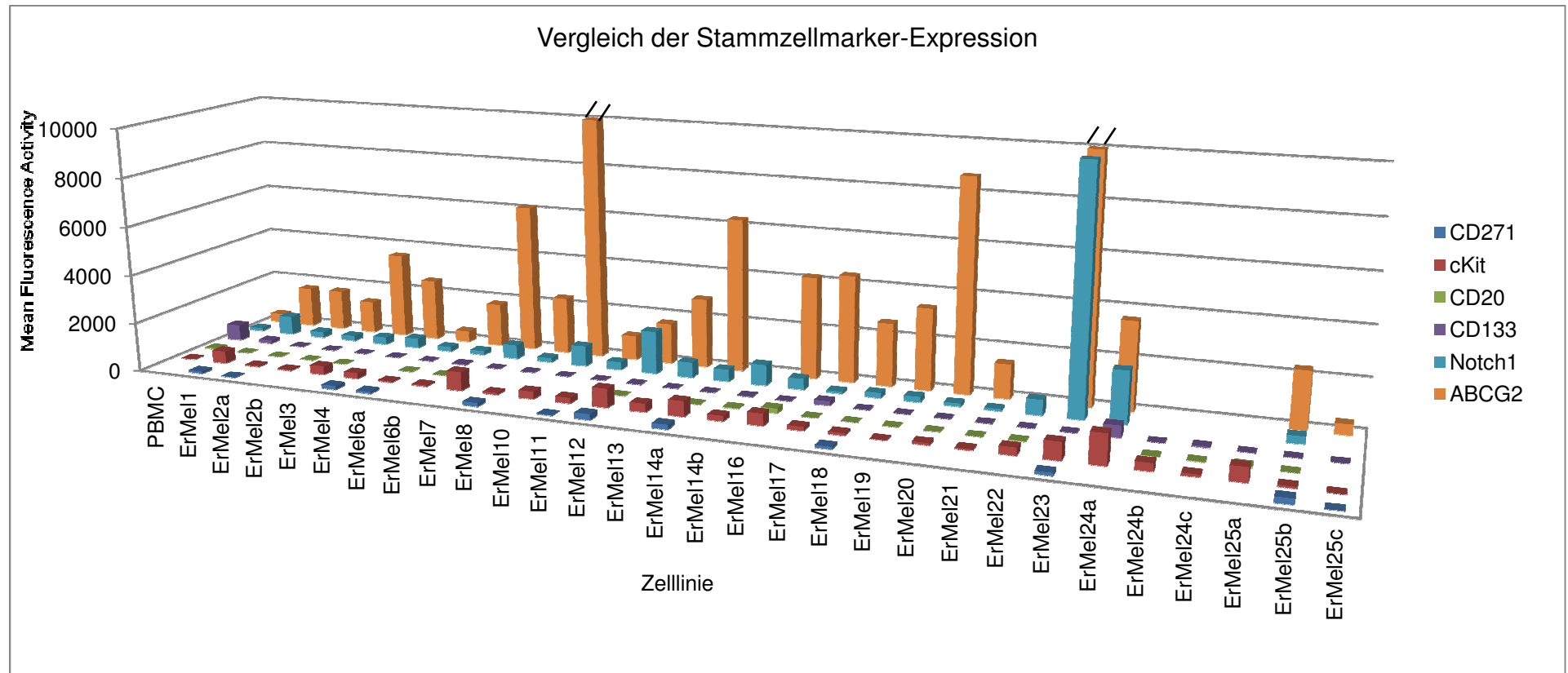


Abb. IV.34 Notch1-Histogramme



Notch1 wird auf 24 von 26 getesteten Linien detektiert, dies entspricht 92,3% der getesteten Melanomzelllinien. In den positiv getesteten Linien ist die Expression gleichförmig und auch höher als die auf PBMCs.

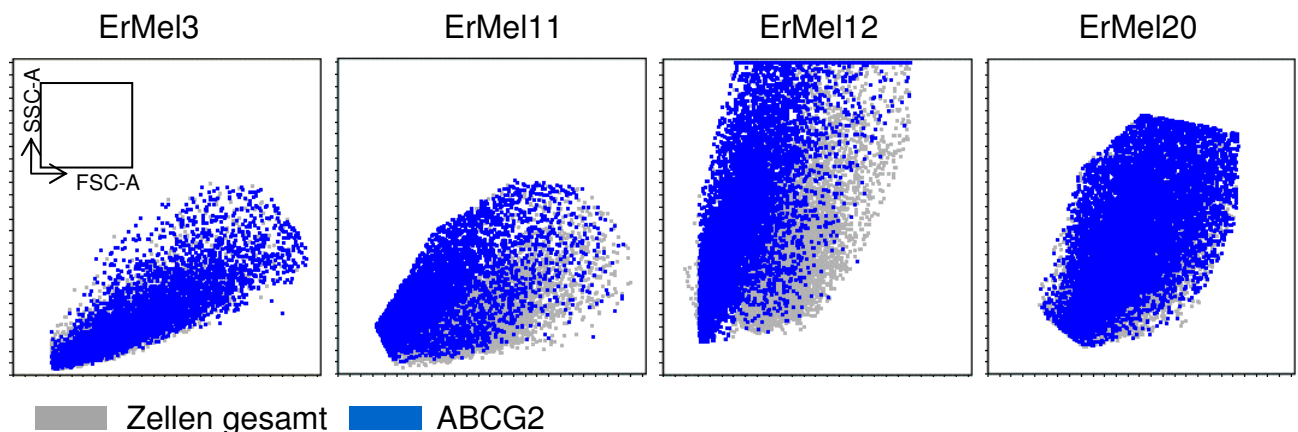
Abb. VI.35 Zusammenfassung der Expression der in der Charakterisierung verwendeten Stammzellmarker



Von den sechs getesteten Markern wurde CD20 nicht exprimiert. Auffällig war in den Melanomzelllinien die Expression des Transporters ABCG2. Er war auf allen getesteten Linien nachweisbar und war auch immer höher exprimiert als auf PBMCs. Die Höhe des Expressionslevels schwankte innerhalb der Melanomzelllinien stark. Am höchsten war sie in den Zelllinien ErMel10 und ErMel23. Auch cKit und Notch1 ließen sich auf Melanomzellen nachweisen. In einigen Linien stellte sich eine cKit+ Subpopulation dar, die sich deutlich vom Rest der Zellen absetzt (s. Abb. IV.22). Notch1 wurde in unterschiedlichen Levels exprimiert. Sehr hoch war es auf den Linien 12, 23 und 24a. CD271 wurde von 9 der 13 getesteten Linien (69,2%) in geringer Höhe exprimiert (Linie 9 hier nicht dargestellt, da die Expression der anderen Marker an dieser Linie nicht getestet wurde). CD133 konnte auf 3 von 29 getesteten Linien (10,3%) nachgewiesen werden.

Um eine definierte Population von Melanomstammzellen zu detektieren, wurde in den DotPlots der Linien ErMel3, 11, 12 und 20 auf diejenigen Zellen gegatet, die den Stammzellmarker ABCG2 exprimieren. Das größte ABCG2+ Subset ist in Linie ErMel20 mit 18,5% der Gesamtpopulation detektierbar. Auch in den Linien ErMel 3 und 12 sind die Subsets mit 9,09% bzw. 7,53% deutlich. Linie ErMel 11 zeigte mit 0,75% ABCG2+ Zellen das kleinste Subset. Im dargestellten Plot Forward-Scatter gegen Sideward-Scatter wird deutlich, dass die Zellen hinsichtlich Größe und Granularität variieren und keine klar abgegrenzte Population darstellen.

Abb. IV.36 Darstellung Melanomzellen mit stammzellähnlicher Marker-Expression Panel1



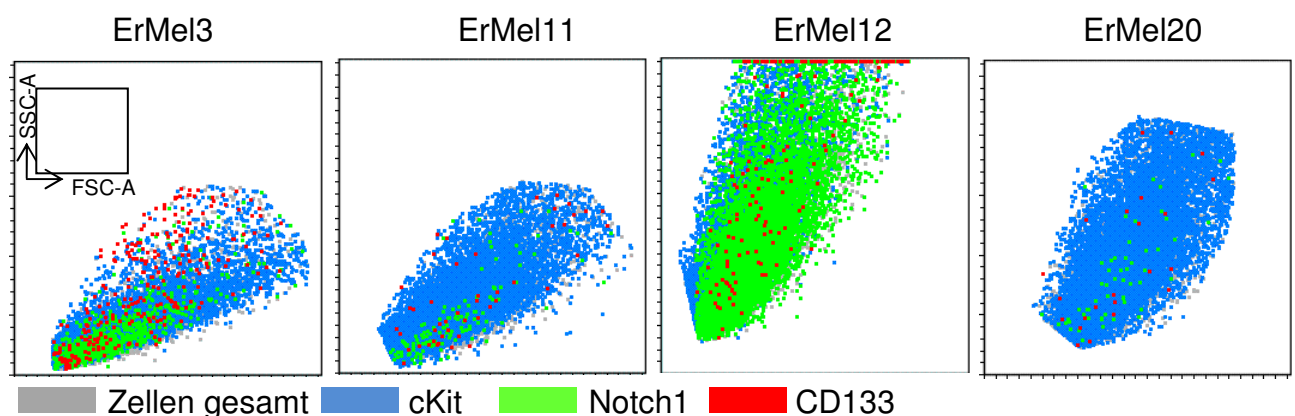
Zellen, die positiv für ABCG2 sind, werden als stammzellig bezeichnet. Durch



die Expression des Chemoresistenz-vermittelnden Transporters ABCG2 haben diese Zellen eine Eigenschaft, die sonst Stammzellen zugeschrieben wird. Die Zellen schützen sich durch den Transporter aktiv vor Medikamenten, die im Zellinneren wirken sollen. Die anderen Marker geben zusätzliche Auskunft über die Eigenschaften der Zellen dieser kleinen Populationen: Durch die Expression von MCSP können die Zellen eindeutig dem MM zugeordnet werden. In Linie ErMel3 sind 92% der ABCG2+ Zellen auch positiv für MCSP. In den Linien ErMel11, 12 und 20 sind jeweils 99,1%, 93,9% und 87,1% der ABCG2+ Zellen auch MCSP+. Die Adhäsionsmoleküle MCAM und N-Cadherin, die im gleichen Panel untersucht wurden (nicht dargestellt), fördern sowohl das lokale invasive Wachstum als auch die Disseminierung von Tumorzellen vom Primärtumor. Sowohl Überleben als auch Metastasierung werden also begünstigt<sup>35</sup>. Außerdem können sie die Zelle durch interzelluläre Adhäsion in einer Nische verankern<sup>35,63</sup>. Die T-Zell-Erkennungsmarker HLA-DR und HLA-ABC sind auf den meisten der ABCG2+MCSP+ Zellen detektierbar (nicht dargestellt). Sie aktivieren durch Präsentation körperfremder Antigene das Immunsystem; die Zellen könnten also bei entsprechender Stimulation vom Immunsystem attackiert werden. Die Zellen, die kein HLA-DR und HLA-ABC tragen, können folglich auch nicht vom Immunsystem erkannt werden. Diese Zellen können dann ungehindert zirkulieren.

Im Panel 2 wurden die Marker cKit, Notch1, CD133 untersucht. Die DotPlots zeigen auch hier wieder, dass die Zellen hinsichtlich Größe und Granularität nicht einheitlich sind, sondern dass diese beiden Parameter variabel sind.

Abb. IV.37 Darstellung Melanomzellen mit stammzellähnlicher Marker-Expression Panel2



In der Melanomzelllinie ErMel3 wurden 134 Zellen detektiert, die positiv für alle 3 getesteten Stammzellmarker sind (cKit, Notch1, CD133). Linie ErMel11 weist 6 solcher Zellen auf, ErMel12 13 Zellen und Linie ErMel20 9. Zusätzlich positiv für das Adhäsionsmolekül ICAM und damit alle 4 Marker sind in Linie ErMel3 73 Zellen, in Linie ErMel11 sind in dieser Population 6 Zellen, in ErMel12 4 Zellen und in Linie ErMel20 9 Zellen. Die Marker lassen auf folgende Eigenschaften der Zellen dieser kleinen Populationen schließen: cKit, Notch1 und CD133 gehören in die Gruppe der Stammzellmarker. Außerdem wird hier auch ICAM nachgewiesen, was zusammen mit MCAM und N-Cadherin aus Panel1 zur Gruppe der Adhäsionsmoleküle gehört und auch mit der Metastasierung in Verbindung gebracht wird<sup>53,56</sup>. MCAM kann auch als ein melanomtypischer Marker angesehen werden, da er, wie die Ergebnisse aus der Charakterisierung zeigen, durchweg hoch auf Melanomzellen exprimiert wird. Es ist also aus der Masse an Melanomzellen eine, wenn auch sehr kleine, Population an Zellen detektierbar, die stammzellähnliche Eigenschaften aufweisen. Dafür spricht auch die Expression von ABCG2 im Panel1. Innerhalb der einzelnen Subpopulationen, also z.B. der cKit+ Population, ist kein Anstieg der anderen Stammzellmarker-Expression nachweisbar. Bei im Blut zirkulierenden Tumorzellen (ZTZ) kann durchaus ein Profil erwartet werden, das sowohl Stammzellmarker, Adhäsionsmoleküle und melanomtypische Strukturen abbildet. Dieses Expressionsprofil erfüllt wichtige Voraussetzungen bei der Metastasierung: Stammzeleigenschaften sind nötig, um in einer Nische zu überleben und eine neue Tumormasse zu formen. Adhäsionsmoleküle fördern sowohl das intravaskuläre Überleben der ZTZ als auch die Extravasation und metastatische Kolonisierung.

#### 1.4. Charakterisierung von Melanomzelllinien mittels ALDH- und Hoechst-Färbung

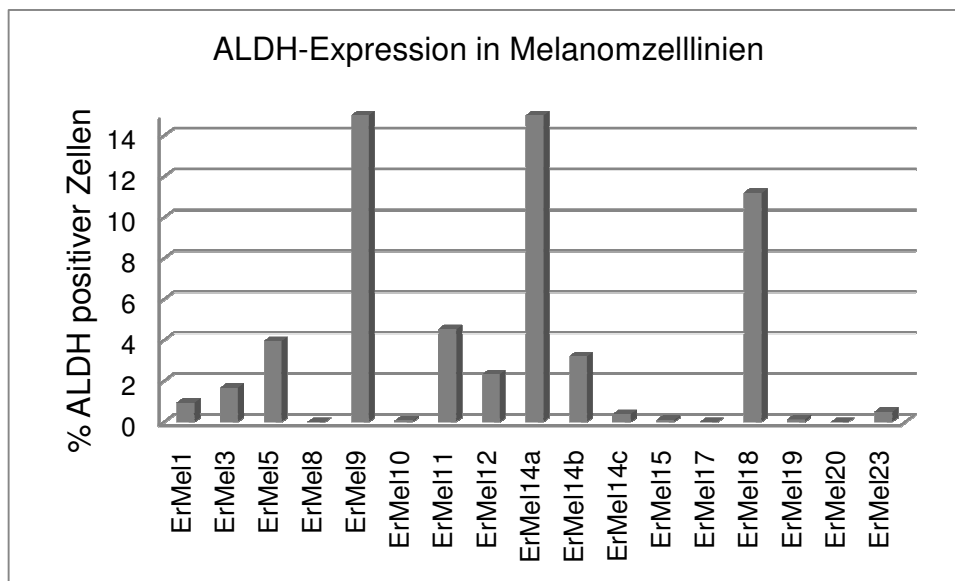
Mit den folgenden Versuchen wurde anhand von funktionellen Tests analysiert, ob es innerhalb der Melanomzellen eine Subpopulation gibt, die stammzellähnliche Charakteristika aufweist.

#### 1.4.1. ALDH-Expression

Das Enzym Aldehyd-Dehydrogenase (Abk. ALDH) ist eine Oxidoreduktase, die innerhalb der Zelle eine entgiftende Funktion übernimmt. Die protektiven Eigenschaften des ALDHs führen zu besserem Schutz der Zelle vor äußerlichen Noxen und damit zu einer verbesserten Überlebensfähigkeit bzw auch zur Chemoresistenz. ALDH könnte damit zum einen Teil des Chemoresistenz-Mechanismus des Melanoms sein, zum anderen vermittelt es Eigenschaften, die Stammzellen zugeschrieben werden. Daher soll getestet werden, ob es innerhalb der Melanomzellen eine Subpopulation gibt, welche über eine erhöhte ALDH-Aktivität verfügt und somit stammzellähnliche Eigenschaften nachweisbar sind. Im Probenröhrchen kann ALDH ungehindert das Aldefluor-Substrat umwandeln und das fluoreszierende Endprodukt kann im FITC-Kanal gemessen werden. Dem Kontrollröhrchen wird ein ALDH-Hemmer zugesetzt, der die Umformung des Aldefluor-Substrats in das fluoreszierende Endprodukt verhindert. Zellen mit einer hohen ALDH-Enzymaktivität erscheinen im DotPlot als FITC-positive Zellen.

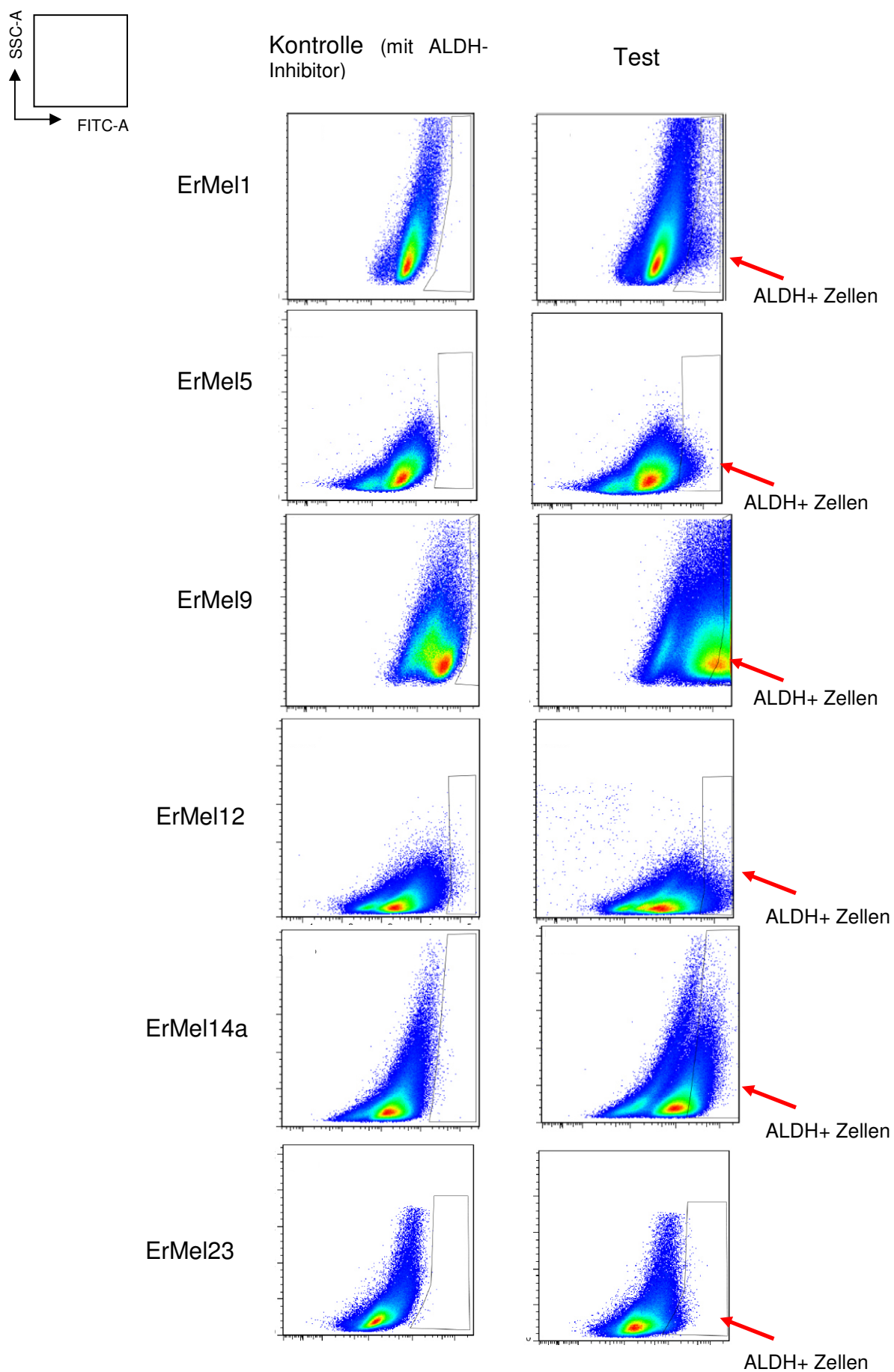
Zusammenfassend zeigen 3 Linien eine positive ALDH-Population von mehr als 10% (ErMel 9,14a,18). In 5 weiteren Linien beträgt die Größe der ALDH+ Population eine Größe von 1-10% (in absteigender Reihenfolge ErMel11,5,14b,12,3). Eine Subpopulation ALDH+ Zellen von kleiner als 1% wurde in 6 Linien nachgewiesen (ErMel1,23,14c,19,15,10). In 3 Linien ist die Subpopulation mit weniger als 0,01% verschwindend gering (ErMel17,20,8). Dieser Versuch zeigt, dass über 47% der Melanomzelllinien eine positive ALDH-Subpopulation von mehr als 1% der Gesamtzellzahl besitzen und damit eine Eigenschaft aufweisen welche auch Stammzellen nachgewiesen wird.

Abb. IV. 38 ALDH-Expression in Melanomzelllinien



In den Histogrammen sind die ALDH+ Zellen deutlich zu erkennen. Das Gating erfolgte in 2 Schritten: „R1“ stellt im DotPlot FSC-H gegen SSC-H ein Gate dar, in dem tote Zellen sowie Zelldebris ausgegated wurden. Aus diesem Gate erfolgt dann „R2“ im DotPlot FITC-A gegen SSC-H auf FITC-positive Zellen. In den folgenden DotPlots ist jeweils „R2“ dargestellt. Je höher die FITC-Fluoreszenz, desto höher ist die ALDH-Aktivität in der Zelle. In den DotPlots der Linien ErMel1, 5 und 12 kann man eine deutliche SidePopulation (SP) mit erhöhter ALDH-Aktivität abgrenzen. Ebenso zeigt der DotPlot der Linie 23 eine solche SP. Die Linien 1, 12, und 23 wurden auch charakterisiert. Alle exprimieren auch die Stammzellmarker cKit, Notch1 und ABCG2.

Abb. IV.39 ALDH-Histogramme



Tab. IV.2 Vergleich der Melanomzellen-Stammzellencharakterisierung mittels der MFI (= mittlere Fluoreszenzintensität) mit der ALDH-Expression

	ALDH	ABCG2	cKit	Notch1	CD133	CD271	CD20
ErMel1							
ErMel3						-	
ErMel5		-	-	-		-	-
ErMel8							
ErMel9		-	-	-	-		-
ErMel10						-	-
ErMel11							-
ErMel12							
ErMel14a							
ErMel14b		-				-	
ErMel14c		-		-	-		-
ErMel15		-	-	-	-	-	-
ErMel17						-	
ErMel18							
ErMel19						-	
ErMel20						-	
ErMel23							-

Negativ



Marker MFI 100-1000



ALDH 0,01-1%

Marker MFI 1000-10 000



ALDH 1-10%

Marker MFI &gt; 10 000

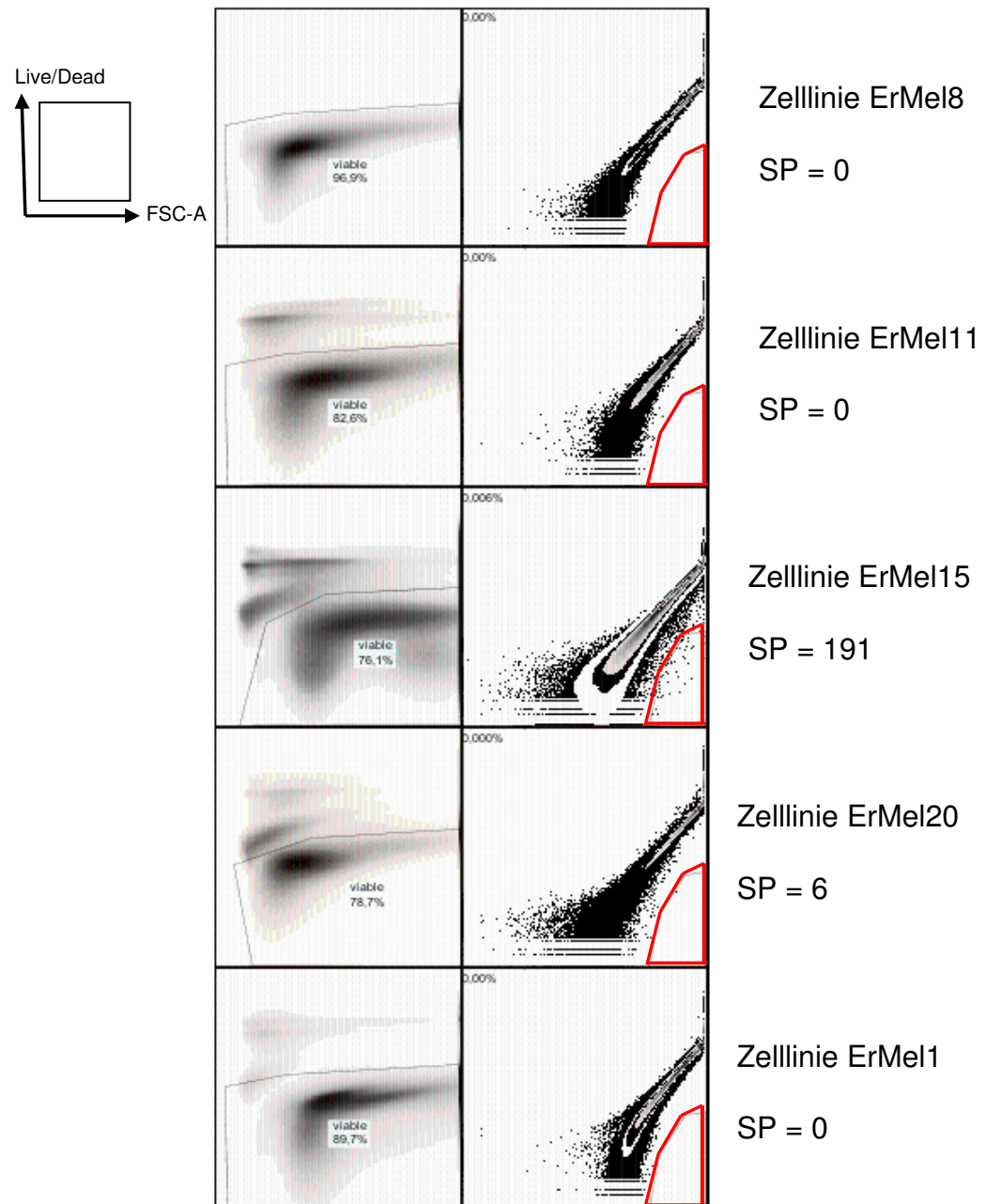


ALDH &gt; 10%

#### 1.4.2. Hoechst-Färbung

Ähnlich wie bei der Messung der ALDH-Aktivität soll auch hier getestet werden, ob es in den Melanomzellen eine Subpopulation gibt, die die Fähigkeit besitzt, den Hoechst-Farbstoff aus den Zellen heraus zu transportieren. Der Hoechst-Farbstoff wird mittels multi-drug-like Transportern aus der Zelle eliminiert. Mit dieser Methode charakterisiert und definiert man z.B. Stammzellen des hämatopoietischen Systems<sup>65</sup>. Im Versuch wurde nur auf die lebenden Zellen gegatet, abgestorbene Zellen sowie Zelldebris wurden ausgeschlossen. Im dargestellten DotPlot wird dann auf die Region gegatet, in der die Suppopulation (SP) erwartet wird (rot umrandet).

Abb. IV.40 Darstellung der Hoechst-SP in verschiedenen Melanomzelllinien

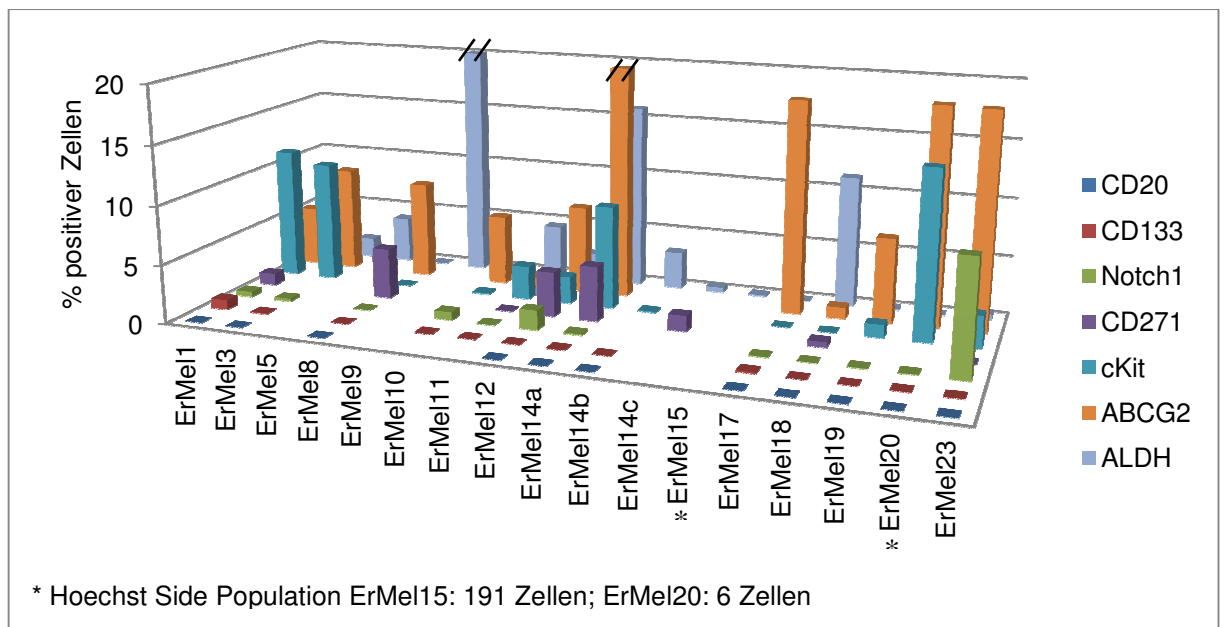


Lediglich 2 von getesteten 5 Linien (= 40%), ErMel15 und ErMel20, zeigten die Tendenz zur Fähigkeit, Hoechst 33342 wieder aus der Zelle heraus schleusen zu können. ErMel20 zeigt keine erhöhte ALDH-Aktivität. In der Charakterisierung zeichnet es sich durch eine hohe ABCG2-Expression aus. Die anderen Stammzellmarker werden nicht exprimiert. Bei den anderen getesteten Linien gibt es offensichtlich keine Zellen, die die Fähigkeit zur Entfernung von Hoechst aus dem Zellinnern besitzen.

Zusammenfassend sind in mehreren Melanomzelllinien Subpopulationen

nachweisbar, die stammzelltypische Charakteristika aufweisen. Diese Subpopulationen stellen sich jedoch in ihrer Größe recht unterschiedlich dar. Dies kann aufgrund der unterschiedlichen Melanomformen sowie der unterschiedlichen Krankheitsstadien sein. Zudem unterstreicht die variable Größe sowie die unterschiedliche starke Markerexpression in der stammzellähnlichen Untergruppe der verschiedenen Melanomzelllinien ein weiteres Mal, wie heterogen sich das Melanom darstellen kann und warum die Behandlung sich so problematisch gestaltet.

Abb. 41 Zusammenfassung der Stammzellmarker-Expression der ALDH-gemessenen Linien (n=17) in Prozent

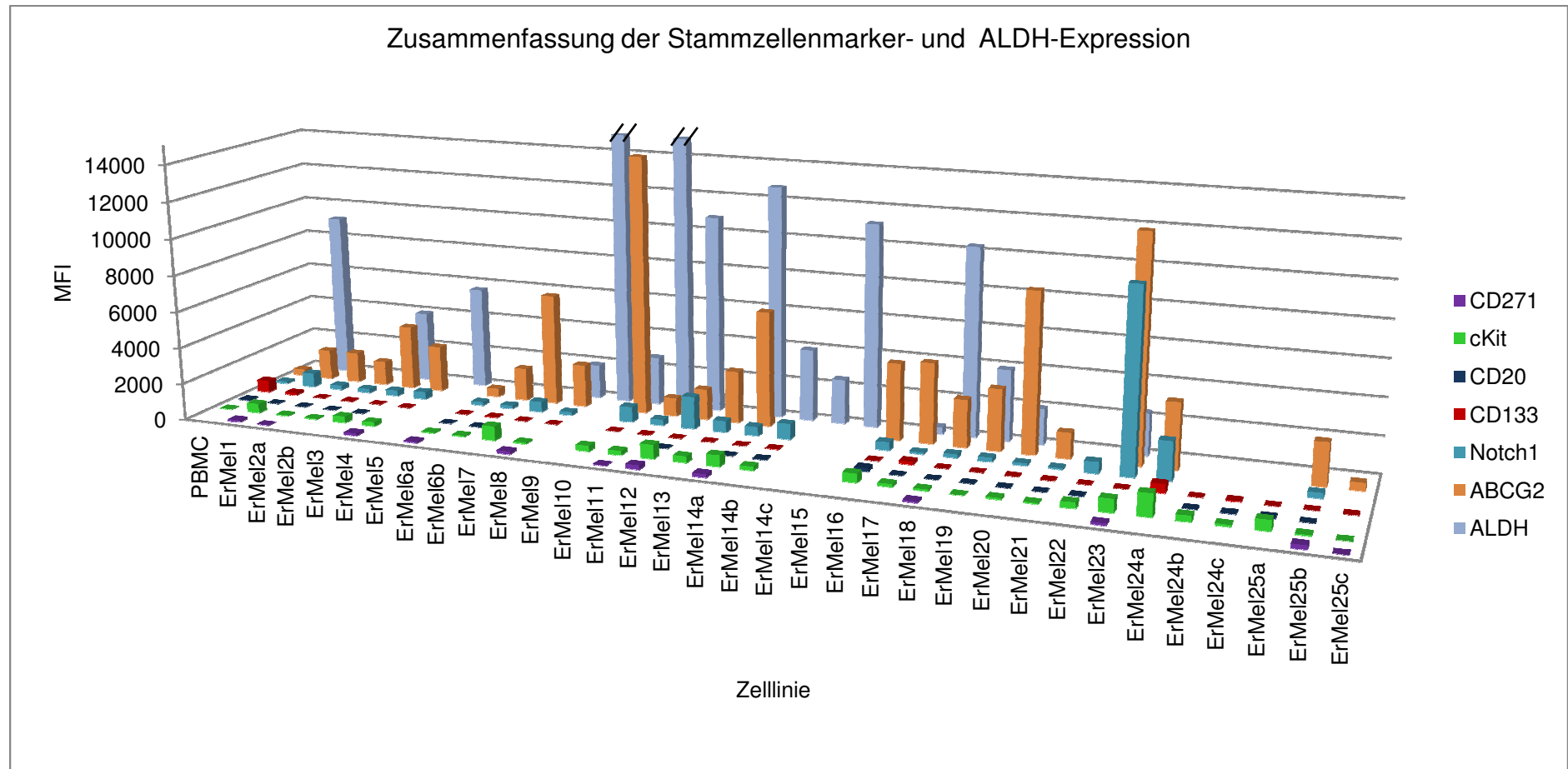


In den Linien ErMel12, ErMel14a, ErMel18 und ErMel23 wurden bis auf die Hoechst Analyse alle 6 Stammzellmarker sowie ALDH untersucht. Linie ErMel14a, die einem Patienten aus Stadium IV mit Hirnmetastasen nach Behandlung mit Sorafenib und Dacarbazin entstammt, zeigt sowohl eine hohe ALDH-Expression sowie eine hohe Expression der Marker ABCG2, cKit und CD271. Die Marker CD133, CD20 sowie Notch1 werden auch exprimiert, aber wesentlich geringer. Dennoch konnten alle 6 Marker detektiert werden. Dies könnte hinweisend dafür sein, dass der Tumor klinisch so chemoresistent ist und metastasiert. ErMel12 wurde ebenfalls aus einem Melanompatienten im Stadium IV angezüchtet, dessen Tumor bereits metastasiert hatte. Hier wurde zusätzlich zur Expression von ALDH, ABCG2, cKit und CD271 auch eine hohe Notch1-Expression festgestellt. CD20 und



CD133 werden nur geringgradig exprimiert. ErMel18 wurde aus einem Patienten im Stadium I generiert, dessen Tumor allerdings ein aggressives Wachstum sowie in-transit Filiae zeigte. Es wurde eine Gliedmaße amputiert, um das Tumorwachstum einzudämmen. Auch hier war eine Expression aller Marker feststellbar, am höchsten wurde ALDH exprimiert. Die ABCG2-Expression ist im Vergleich mit den anderen Linien eher gering. CD271 wird ebenfalls deutlich exprimiert. Zelllinie ErMel23 wiederum entstammt einem Patienten im Stadium IV, ebenfalls nach Therapie. In diesem Fall hat das Melanom weder auf Chemotherapie noch auf Kinaseinhibitoren noch auf Bestrahlung angesprochen, war also außerordentlich resistent. Neben einer ALDH-Expression werden v.a. ABCG2, cKit und Notch1 hoch exprimiert, die restlichen Marker waren nur auf einem geringen Anteil der Zellen nachweisbar. Offensichtlich ist die Kombination der Marker ABCG2, cKit, Notch1, CD271 und ALDH mit aggressivem Wachstum, Metastasierung sowie Chemoresistenz in Verbindung zu bringen. Zelllinie ErMel1, die auch eine im Vergleich hohe CD133-Expression zeigte, ist eine kommerzielle Melanomzelllinie. Auch sie zeigte eine hohe Expression von ALDH, ABCG2, cKit, Notch1 und CD271.

Abb. 42 Zusammenfassung Stammzellenmarker aller charakterisierten Linien (29 Zelllinien sowie PBMCs) sowie die ALDH-Expression (17 Zelllinien) mittels der MFI (=mittlere Fluoreszenzintensität)





## 2. Identifizierung und Sortierung von zirkulierenden Melanomzellen

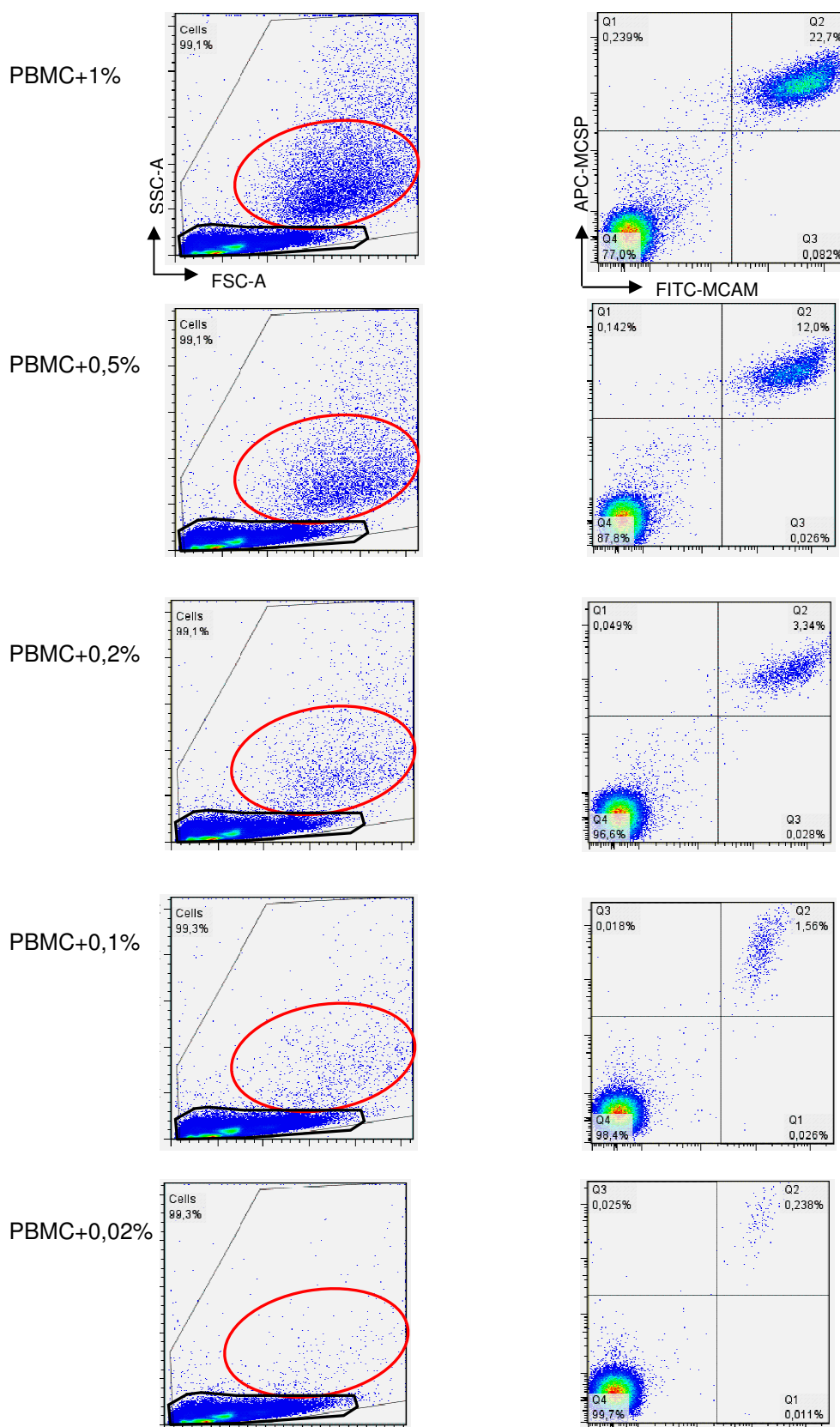
Im ersten Abschnitt dieser Arbeit wurde mit MCSP, MCAM und CD45 eine Markerkombination ermittelt, die es gewährleistet Melanomzellen von anderen im Blut zirkulierenden Zellen zu unterscheiden. Da zirkulierende Tumorzellen nur in sehr geringen Zahlen vorkommen (Ulmer et al: 1-5 Zellen in 50ml Vollblut<sup>149</sup>; Budd et al: 1 Zelle in  $10^5 - 10^6$  PBMCs<sup>150</sup>), wurden Experimente zur Optimierung des Prozesses durchgeführt. Es wurden Detektionsexperimente eingesetzt, in denen jeweils eine bestimmte Menge Melanomzellen zu PBMCs gesunder Spender gegeben wurde („Spiking“). Dann wurde ermittelt, wie viele der zugegebenen Melanomzellen sich mittels der FACS-Färbung wieder detektieren lassen. Zusätzlich wurde mithilfe des Zellsorters eine sehr geringe Anzahl von Melanomzellen auf Blut gesunder Spender sortiert, und danach wieder als separate Zellpopulation dargestellt. Beide Ansätze dienen dazu, die Situation im Patienten nachzubilden. Der Zellsorter bietet hier die Möglichkeit, genaue Zahlen an Zellen vorzulegen. Beim manuellen Erstellen von Verdünnungsreihen und Hinzufügen der Verdünnungsreihen auf Blut kann eine solche Genauigkeit nicht gewährleistet werden. Die erwarteten geringen Zahlen zirkulierender Tumorzellen waren auch der Grund für die Testung unterschiedlicher Anreicherungsverfahren. Durch die Vorarbeiten wurde das Verfahren der Anreicherung, Identifizierung und Sortierung von zirkulierenden Melanomzellen aus Vollblut optimiert und schließlich auch an Patientenblut angewendet.

### 2.1. Spiking: Detektion von Melanomzellen aus PBMCs

Beim Spiking wird zu einer bekannten Anzahl von PBMCs gesunder Spender eine bestimmte Anzahl Melanomzellen gegeben. Aus dieser Mischung wird ermittelt, ob sich nach der Färbung mit den Fluoreszenzmarkern MCSP, MCAM und CD45 beide Zellpopulationen getrennt darstellen lassen. Außerdem soll untersucht werden, wie sensitiv das FACS hinsichtlich der Menge an zugegebenen MM-Zellen ist. Die Zugabe der Melanomzellen erfolgte aus einer Verdünnungsreihe. In den folgenden DotPlots ist eine Detektion dargestellt, in der jeweils 4,64 Millionen PBMCs (Zellzählung am Casy-1) mit einer bestimmten Menge Zellen aus der Zellkultur ErMel1 gemischt wurden:

Abb. IV.43 DotPlots Detektion

 Zugegebene MM-Zellen  
 PBMC

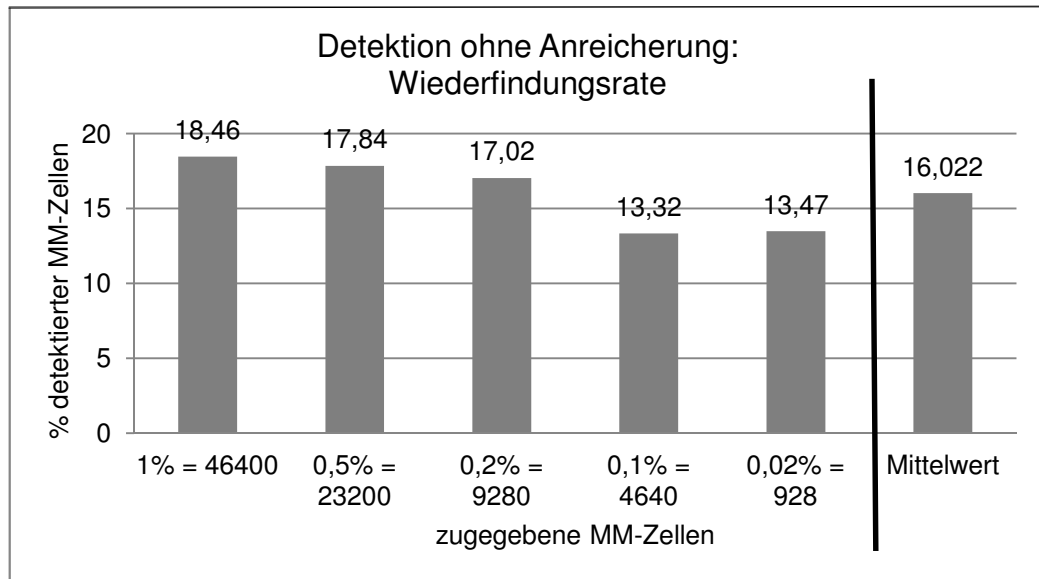


Im Dot Plot wird ersichtlich, dass sich bereits durch das Vorwärtsstreulicht (FSC) zwei getrennte Zellpopulationen ergeben. Die MM-Zellen sind deutlich größer als die PBMCs. Jedoch ist zu erwarten, dass die MM-Zellen in Kultur an Größe zunehmen, da sie unter optimalen Bedingungen gehalten werden. Bei durchflusszytometrischen Untersuchungen aus Patientenblut kann nicht ohne weiteres von einem vergleichbaren Größenunterschied der Zellen ausgegangen werden. Vielmehr kann erwartet werden, dass die Tumorzellen in ihrer Größe den PBMCs entsprechen. Daher kann die Größe allein nicht als Unterscheidungsmerkmal zur Detektion von zirkulierenden MM-Zellen dienen, sondern die Markerkombination CD45-MCSP+MCAM+ definiert die MM-Zellen. Das Gating erfolgte so, wie es später auch bei der Isolierung von zirkulierenden Melanomzellen aus Patientenblut erfolgte: das erste Gate auf CD45 negative Zellen, aus diesem Gate werden dann nach Ausschluss von Zelldebris MCSP+, MCAM+ sowie MCSP+MCAM+ Zellen gegatet. Nach der Färbung konnten folgende Mengen an Zellen wieder detektiert werden:

Tab. IV.3 Spiking Detektionsrate

Vorgelegte PBMCs	Zugegebene Zellen ErMel1	Wieder detektierte ErMel1-Zellen	in % von zugegebenen ErMel1-Zellen
46400000	46400 (1%)	8566	18,46
46400000	23200 (0,5%)	4140	17,84
46400000	9280 (0,2%)	1579	17,02
46400000	4640 (0,1%)	618	13,32
46400000	928 (0,02%)	125	13,47

Abb. IV.44 Detektion ohne Anreicherung: Wiederfindungsraten  
Mittelwert: 16,02



Im Durchschnitt betrug die Wiederfindungsrate 16,02% der vorher zugegebenen Melanomzellen. Zu berücksichtigen sind hier die Zellverluste, die bei den Wasch- und Färbeschritten zustande kommen. Auch die Anzahl der PBMCs verringert sich dabei. Der Mittelwert kann also tatsächlich etwas höher liegen, da zu seiner Berechnung hier die Ausgangszahl der PBMCs vor der Färbung herangezogen wurde.

## 2.2. Anreicherungsverfahren

Da die Anzahl ZTZ im Blut sehr gering ist<sup>149,150</sup>, mussten die Melanomzellen vor der Isolierung angereichert werden. Es wurden unterschiedliche Anreicherungsverfahren getestet: MACS und RosetteSep (s. Material und Methoden Kapitel 2.9). RosetteSep ist ein Depletionsverfahren, das mit TACs (Tetrameric Antibody Complexes) arbeitet. Dabei werden unerwünschte Zellen mithilfe der TACs an Erythrozyten gekoppelt und in der Dichtegradzentrifugation depletiert. Im magnetischen Zellseparationssystem MACS wurde die Anreicherung in der positiven Fraktion (MCSP-Beads) sowie in der negativen Fraktion (CD45-Beads) getestet. In einem Dreifachansatz erfolgte der direkte Vergleich, mit welcher Methode sich die vorher zugegebenen Zellen am besten reisolieren lassen. Dazu wurden  $20 \times 10^6$  PBMCs eines gesunden Spenders mit je 75 000 Melanomzellen aus der Zellkultur ErMel1 vermischt, dh die Menge an zugegebenen Melanomzellen

beträgt 0,38%. Nach der Anreicherung wurden die Zellen mit der 3fach-Marker-Kombination CD45, MCSP und MCAM gefärbt, die auch für die nachfolgenden Sortierungen verwendet werden sollte.

Abb. IV.45 DotPlots der Anreicherungsverfahren

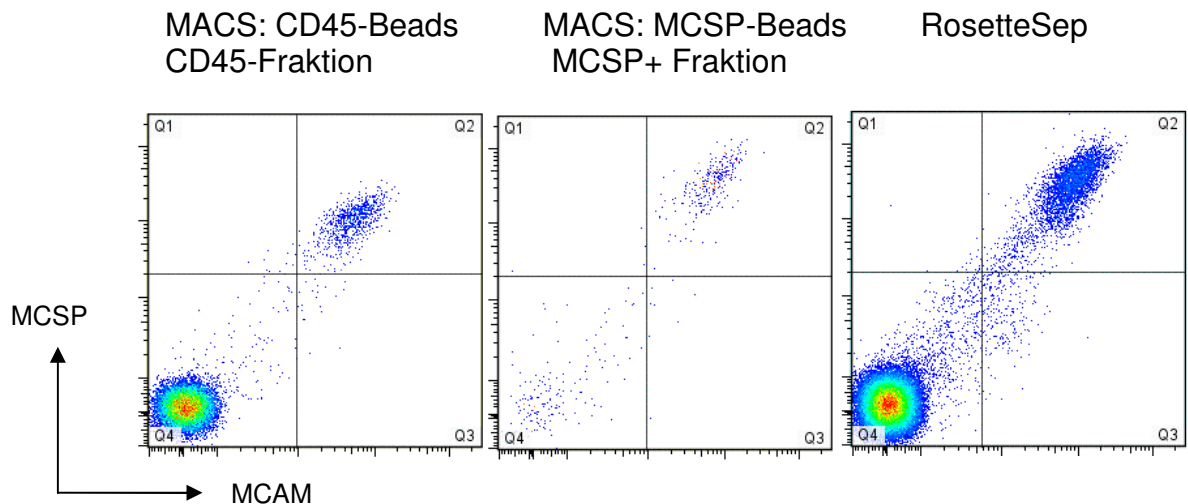
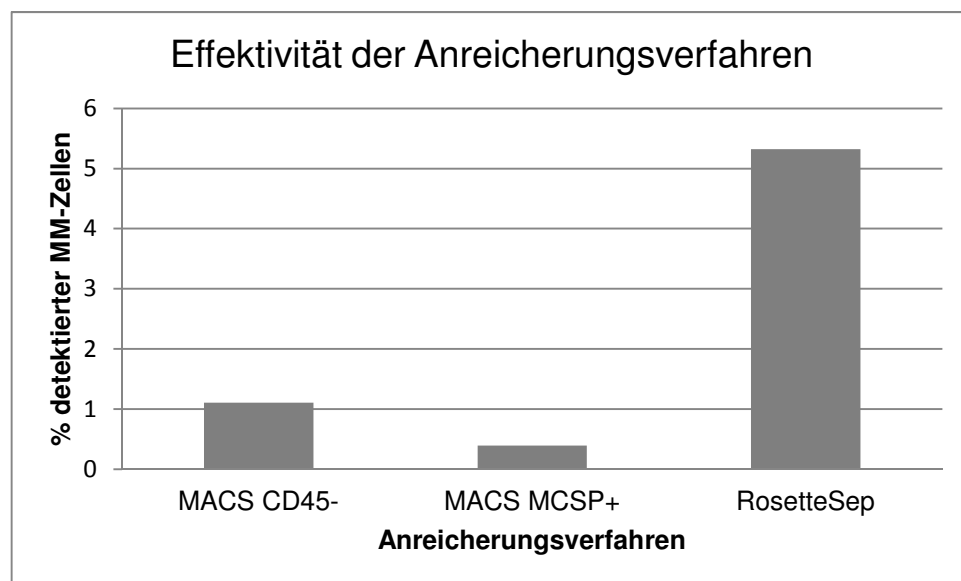


Abb. IV.46 Übersicht über die Effektivität der getesteten Anreicherungsverfahren

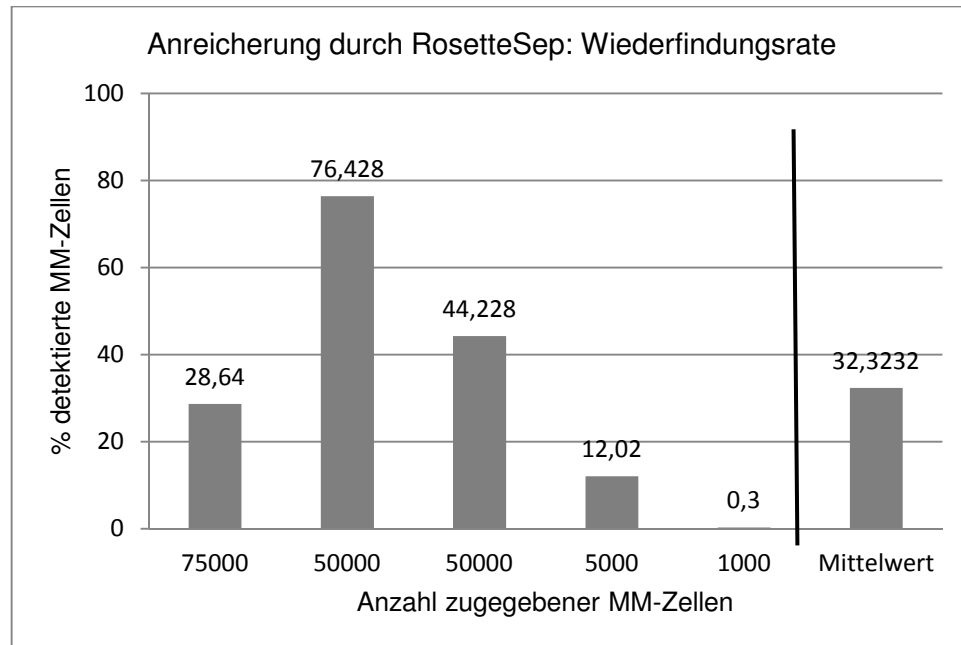


Die DotPlots zeigen deutlich, dass die Abgrenzung zwischen den beiden Zellpopulationen sehr klar ist. Die Ergebnisse aus Abb. IV.45 zeigen, dass im Vergleich zum MACS die Anreicherung mit RosetteSep am höchsten ist. Daher wurde dieses System im weiteren Verlauf für die Anreicherung von Melanomzellen aus Patientenblut genutzt.

Es wurden noch weitere Tests durchgeführt, um zu testen ob die verbesserte Anreicherung auch mit einer besseren Wiederfindungsrate der zirkulierenden

Tumorzellen einher geht. Dazu wurden jeweils 15 ml Blut eines gesunden Spenders mit einer bestimmten Anzahl MM-Zellen aus der Zellkultur ErMel27 versetzt.

Abb. IV.47 Übersicht Wiederfindungsrate nach Anreicherung mit RosetteSep



Die Wiederfindungsrate sinkt bei kleiner werdenden Zahlen hinzugegebener Melanomzellen deutlich. In diesem Zusammenhang spielt sicherlich auch der größer werdende statistische Fehler bei zunehmender Verdünnung der Melanomzellen eine Rolle. Aus den Ergebnissen der Tests mit gespicktem Blut ergibt sich ein Mittelwert von 32,32%, eine wesentlich höhere Wiederfindungsrate als in den Detektionsversuchen ohne Anreicherung. In diesen lag der Mittelwert der Wiederfindungsrate bei 16,02%.

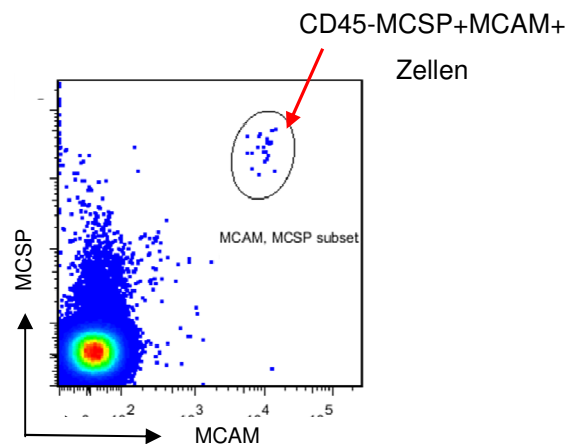
### 2.3. Vorversuch: Tumorzellsorts auf Blut

Dieser Vorversuch zeigt, dass die RosetteSep-Anreicherung auch mit einer sehr kleinen Anzahl an Zellen funktioniert. Hierzu wurden mit dem Zellsorter 30 bzw 300 Melanomzellen aus der Zellkultur zu Blut eines gesunden Spenders sortiert. Auf diese Weise hat man eine sehr kleine, aber exakt



definierte Anzahl Melanomzellen in der Probe. Anschließend wurde die Anreicherung mit Rosette Sep durchgeführt, sowie darauf folgend die Färbung mit den FACS-Antikörpern CD45, MCSP und MCAM. Der DotPlot (Abb. IV.48) verdeutlicht, dass sich die wenigen MCSP+MCAM+ Melanomzellen als gut abgegrenzte Zellpopulation darstellen. Auf diese Population wurde nachfolgend für die Zellsortierungen aus Patientenblut gegatet, um die zirkulierenden Melanomzellen zu isolieren.

Abb IV.48 Anreicherung mit RosetteSep nach Tumorzellsort

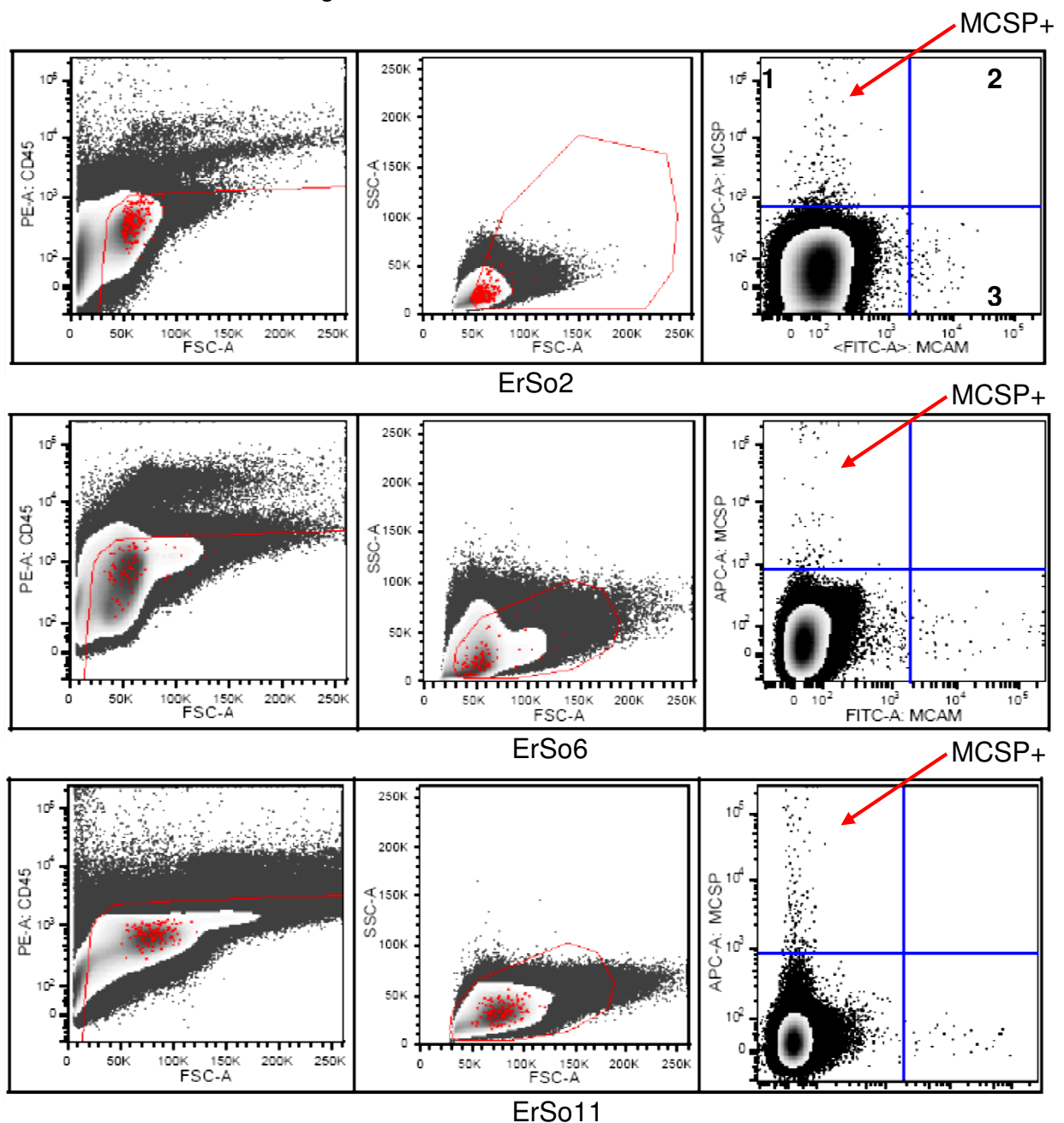


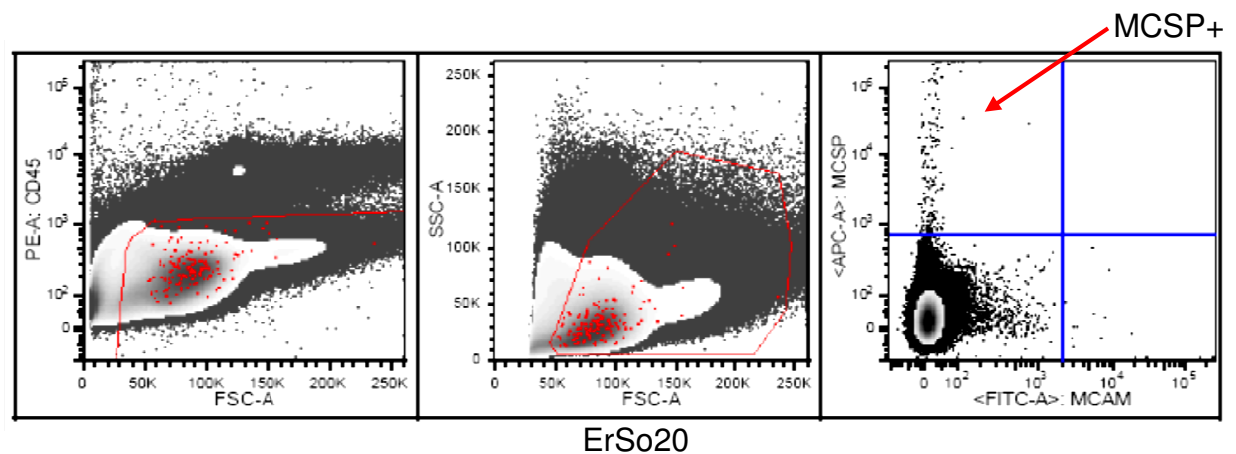
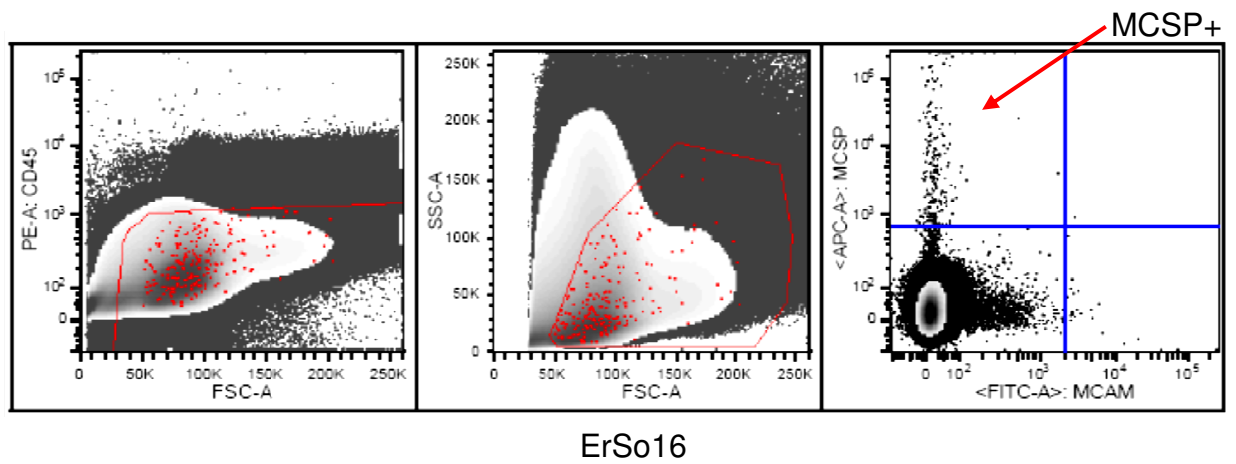
#### 2.4. Isolierung von Melanomzellen aus Patientenmaterial

Nach der oben beschriebenen Optimierung und Validierung des Verfahrens erfolgten die Untersuchungen an Patientenblut. Die zirkulierenden Melanomzellen wurden aus dem Patientenblut mittels RosetteSep angereichert, anschließend folgte die Färbung mit den FACS-Antikörpern. Im späteren Verlauf der Arbeit wurde das Färbepanel aus MCSP, MCAM, und CD45 um zwei weitere Marker ergänzt: CD14 und CD16. Sie sollen zur besseren Abgrenzung der zu sortierenden Zellpopulation von Monozyten, Makrophagen, Granulozyten und NK-Zellen beitragen. Diese Zellen können aufgrund ihrer Fc-Rezeptoren unspezifisch Antikörper binden oder auch aufgrund ihrer erhöhten Granularität und Autofluoreszenz falsch-positiv erscheinen; sie werden durch das erweiterte Panel ausgeschlossen. Insgesamt wurde das Blut von 20 Patienten in 21 Vorgängen auf das Vorhandensein zirkulierender Melanomzellen untersucht. Die Gating-Strategie war wie folgt: Im ersten DotPlot wurde auf CD45 negative Zellen gegatet. Dann erfolgte das Gate Vorwärts- gegen Seitwärts-Scatter, um Zelldebris auszuschließen. Im Folgenden DotPlot wurde dann auf

MCSP+MCAM+Zellen gegatet. Dieses Gate stellt das Sorting-Gate dar, also das Gate, aus dem der Zellsorter die Zellen isoliert. Die Gates 1, 2 und 3 kennzeichnen das Sorting-Gate. Es wurden MCSP+, MCAM+ und MCSP+MCAM+ Zellen sortiert. Zellen, die für keinen der beiden Marker positiv waren, wurden verworfen. Die in den Sort-Darstellungen rot gekennzeichneten Zellen sind zurückgegatete MCSP+ Zellen; das bedeutet man kann erkennen, wo in den vorhergehenden DotPlots die MCSP+ Zellen liegen.

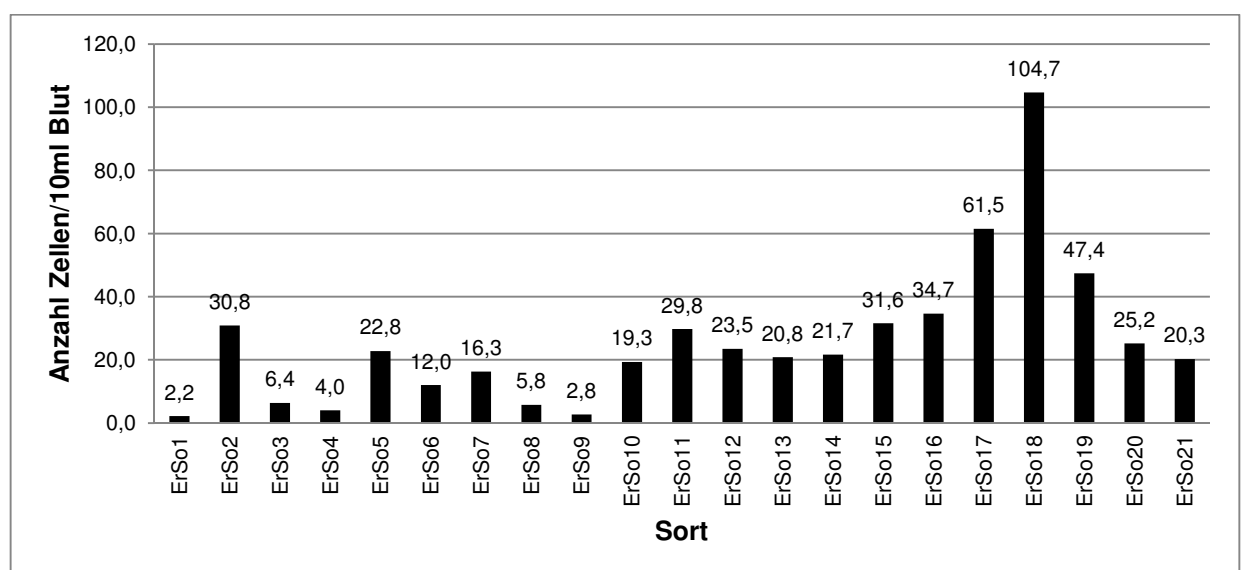
Abb. IV.49 Sort-Darstellungen





In den Plots FSC-A gegen CD45 und FSC-A gegen SSC-A erkennt man deutlich, wo die MCSP+ Zellen, und damit die zirkulierenden Melanomzellen, liegen. Sie sind von der Größe uneinheitlich. Die Ergebnisse der Patientensorts zeigen eine große Spannbreite von detektierten zirkulierenden MM-Zellen.

Tab. IV.4 Anzahl detektierter zirkulierender Melanomzellen in 10 ml Blut



Tab. IV.5 Patienteninformation zu den Sorts ( nb = nicht bekannt)

Sortnummer/ Gruppe	Alter bei Sort/Geschlecht	Anzahl ZTZ/ 10ml Blut	Melanom- form	Stadium	Sonstiges
ErSo1/nb	66/m	2,2	nb	nb	nb
ErSo2/III	48/m	30,8	nb	nb	MIA↑, S100↑
ErSo3/II und III	847/m	6,4	nb	nb	MIA↑, S100↑, Knochenmarks- metastase
ErSo4/III	607m	4,0	Kutanes High Risk Melanom	IIB; pT3b	MIA ↑
ErSo5/III	75/w	22,8	nb	IIB	S100↑
ErSo6/III	49/w	12,0	Kutanes Low Risk Melanom	IB; pT1b	S100↑
ErSo7/III	54/m	16,3	nb	nb	MIA↑ konstant
ErSo8/III	77/m	5,8	Kutanes High Risk Melanom	IIB; pT3b	MIA↑, S100↑
ErSo9/III	73/m	2,8	Schleimhaut- Melanom	IIIB; N2b	MIA↑; 2003 Filiae im Lymphknoten
ErSo10/I	43/m	19,3	Kutanes High Risk Melanom	IIIA; N2a	Mikrometastasen in 2 Lymphknoten
ErSo11/I	66/m	29,8	Uvea Melanom	nb	Hautmetastase, ohne Leberbeteiligung
ErSo12/III	58/m	23,5	Kutanes Low Risk Melanom	IA; pT1a/b	MIA↑, S100↑
ErSo13/I und III	66/m	20,8	nb	nb	MIA und S100 ondulierend
ErSo14/III	51/m	21,7	nb	nb	MIA↑, S100↑
ErSo15/III	49/m	31,6	nb	nb	MIA↑, S100↑
ErSo16/III	73/m	34,7	Uvea Melanom	nb	Metastasiert, MIA↑
ErSo17/III	/w	61,5	Uvea Melanom	nb	MIA ↑
ErSo18/nb	39/m	104,7	nb	nb	nb
ErSo19/III	49/m	47,4	nb	IV	MIA und S100 ondulierend
ErSo20/III	51/m	25,2	nb	nb	nb
ErSo21/nb	78/m	20,3	nb	nb	nb

Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass z.B. die Sorts ErSo16 und 17, die beide sehr hohe ZMZ-Zahlen aufweisen, aus Patienten stammen, die am Uvea-Melanom erkrankt waren. Eine Metastasierung muss in diesem Fall hämatogen erfolgen, da kein Anschluss ans Lymphsystem besteht. Auch

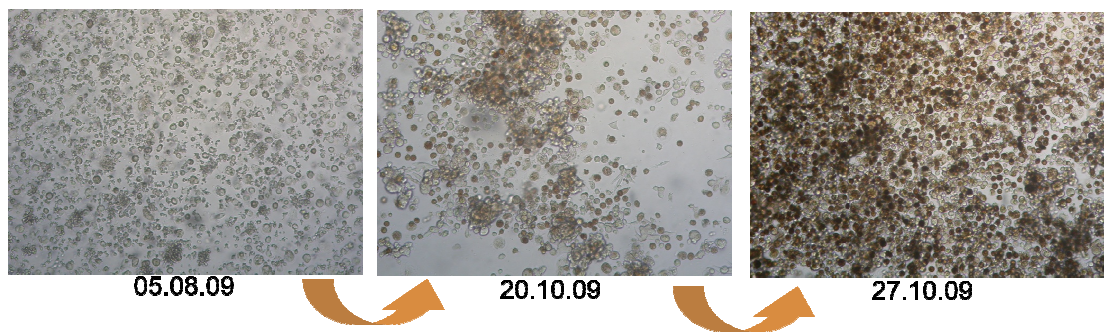
ErSo19 hat eine hohe Anzahl ZMZ, diese entstammen einem Patienten aus Stadium IV. In diesen drei Fällen waren auch jeweils einer bzw beide Tumormarker erhöht (s. Tab.IV.5). Die Sorts ErSo4 und 8 dagegen, die eine niedrige ZMZ-Zahl aufweisen, entstammen Patienten aus dem Stadium II. Um die prognostische Relevanz der ZMZ-Zahlen zu testen müssten weitere Sorts durchgeführt und so die Fallzahl deutlich erhöht werden. Die Ergebnisse zeigen, dass die hier verwendete Methode zur Isolierung von im Blut zirkulierender Tumorzellen funktioniert. Großer Vorteil des Zellsortings ist, dass die Zellen für weitere Untersuchungen zur Verfügung stehen können. Durch den Zellsorter werden auch Analysen auf Einzelzellebene möglich. Wenn es gelingt, die Zellen zu kultivieren und expandieren, kann man sie weiter untersuchen, sowohl in Chemosensitivitätstest als auch hinsichtlich ihrer Eigenschaften.

## 2.5. Kultivierung

### 2.5.1. Anzüchtung von Melanomzellen aus einer Elutrafraktion

Dieser Test wurde im Vorfeld der Zellsortierungen durchgeführt. Zielsetzung war es zu zeigen, dass prinzipiell die Anzüchtung von Melanomzellen aus Patientenblut in einem Zellmedium möglich ist. Es wurden Zellen aus einer Leukapherese verwendet. Die Zellen aus der Elutra-Fraktion, die die Lymphozyten enthält, wurden über mehrere Wochen in Tumorstadiumsmedium kultiviert. Nach 76 Tagen (ca. 2,5 Monate) waren erstmals dunkel pigmentierte Zellen auffällig. Nach diesem langen Zeitraum wird außerdem ein Wachstum der Lymphozyten in Kultur nicht mehr erwartet. Nach weiterer Expansion dieser dunkel pigmentierten Zellen konnten sie im Durchflusszytometer charakterisiert werden.

Abb. IV.50 Melanomzellen aus Leukapherese angezüchtet

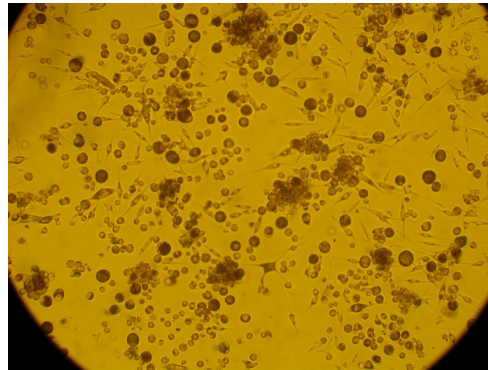


Im FACS waren diese Zellen positiv für MCSP und MCAM. Es war keine CD45-Expression messbar. Diese Markerkombination weist daraufhin, dass es sich hierbei um Zellen eines malignen Melanoms handelt, wofür auch die makroskopisch sichtbare bräunliche Pigmentierung der Zellen spricht. Nachdem sie aus einer Leukapherese stammen, muss davon ausgegangen werden, dass sie sich zum Zeitpunkt der Entnahme in der Blutbahn befanden und somit als zirkulierende Tumorzellen isoliert wurden. Es konnte also gezeigt werden, dass ZMZ kultivierbar und auch in vitro zur Expansion fähig sind. Allerdings kann es unter den verwendeten Kulturbedingungen sehr lange dauern (bis zu 2,5 Monaten), bis ZMZ anfangen sich zu teilen und zu wachsen.

#### 2.5.2. Kultivierung der sortierten Melanomzellen

Die gesorteten Melanomzellen wurden in Tumorstrommedium kultiviert. Bei den meisten gelang die Expandierung nicht. Dies kann mehrere Gründe haben: die geringe Zellzahl, eine hohe Mortalitätsrate der Zellen durch das Prozedere der Anreicherung und Sortierung, das Fehlen bestimmter Stimulanzien oder anderer Faktoren im Tumormedium. Bei einigen der sortierten Zellen jedoch war tatsächlich ein Wachstum festzustellen. Besonders gut expandiert hat die Linie aus Sort ErSo16, die mit einem konditionierten Tumormedium kultiviert wurde. Das konditionierte Tumormedium entstammt dem Überstand der Melanomzelllinie ErMel24a, die aus einer Leukapherese ausgewachsen ist. Es wurde nach 24-48h Inkubation entnommen. In den Tagen nach Zugabe des konditionierten Mediums proliferierte ErSo16 im Vergleich zu konventionell kultivierten Melanomzellen überraschend schnell.

Abb. IV.51 Melanomzellen, die aus dem Patientenblut von Sort ErSo16 ausgewachsen sind



Mit hoher Wahrscheinlichkeit enthält das konditionierte Medium Faktoren, die als Stimulus für das Wachstum der Melanomzellen dienen. ErSo16 entstammt einem Uvea-Melanom Patienten im Stadium IV, der auch wegen Lebermetastasen behandelt wurde. ErSo16 wurde mit dem melanomspezifischen Marker MCSP sowie dem Marker für das Adhäsionsmolekül MCAM gefärbt. Diese Marker wurden in der Charakterisierung als Identifikationsmarker für Melanomzellen ermittelt. ErSo16 zeigte eine deutliche Expression beider Marker. Dadurch werden die Zellen als Melanomzellen identifiziert.

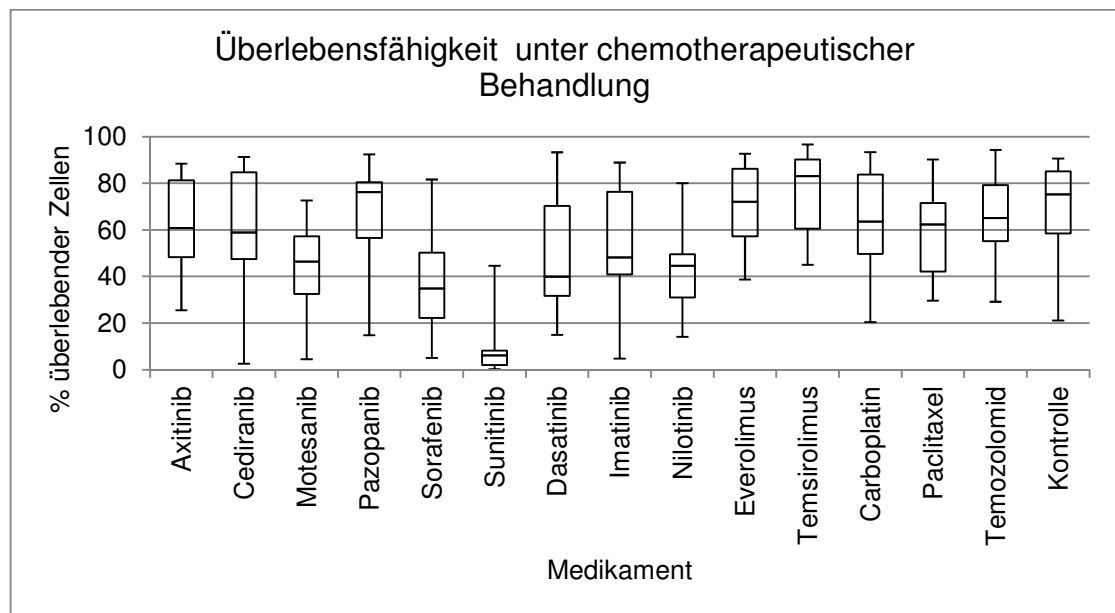
### 3. Chemosensitivitätstests

Das MM ist ein sehr heterogener Tumor, auch die Charakterisierung der Melanomzellen aus dieser Arbeit kann dies bestätigen. Dadurch wird die Therapie sehr schwierig: ein Medikament, das bei einem Melanompatienten anschlägt, ist unter Umständen bei einem anderen wenig oder gar nicht wirksam. Daher wäre es von großem Vorteil, wenn man die Sensitivität der Melanomzellen individuell hinsichtlich der vorgesehenen Therapie testen bzw. überprüfen konnte. Aus chirurgisch entfernten Melanomen wurden Zelllinien etabliert. Im Folgenden wurden verschiedene, auch regulär im Patienten verwendete Therapeutika wie Alkylantien und Tyrosinkinaseinhibitoren (TKIs) an den Zelllinien getestet. Die Wirksamkeit wurde anhand folgender Parameter beurteilt:

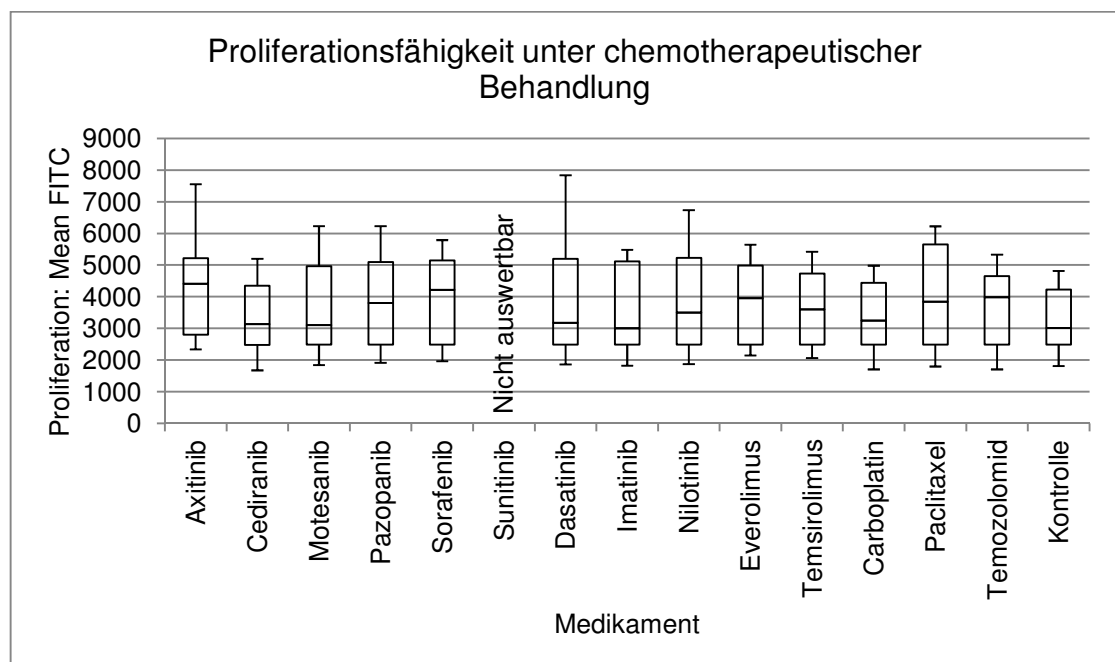
- Überleben: Lebend/Tot-Rate mittels 7AAD
- Proliferationsfähigkeit mittels CFSE
- Stoffwechseltätigkeit mittels Glucose Uptake (6NBDG) und MitoTracker

Die folgenden BoxPlots geben eine Zusammenfassung über die Wirksamkeit der Medikamente insgesamt, dh die Ergebnisse aus allen Zelllinien sind hier zusammengefasst. Zu beachten ist, dass der TKI Sunitinib selbst eine hohe Fluoreszenz im FITC-Kanal zeigt. Er ist daher in den Parametern, die mit FITC gemessen werden, nicht auswertbar.

BoxPlot IV.1 Überleben

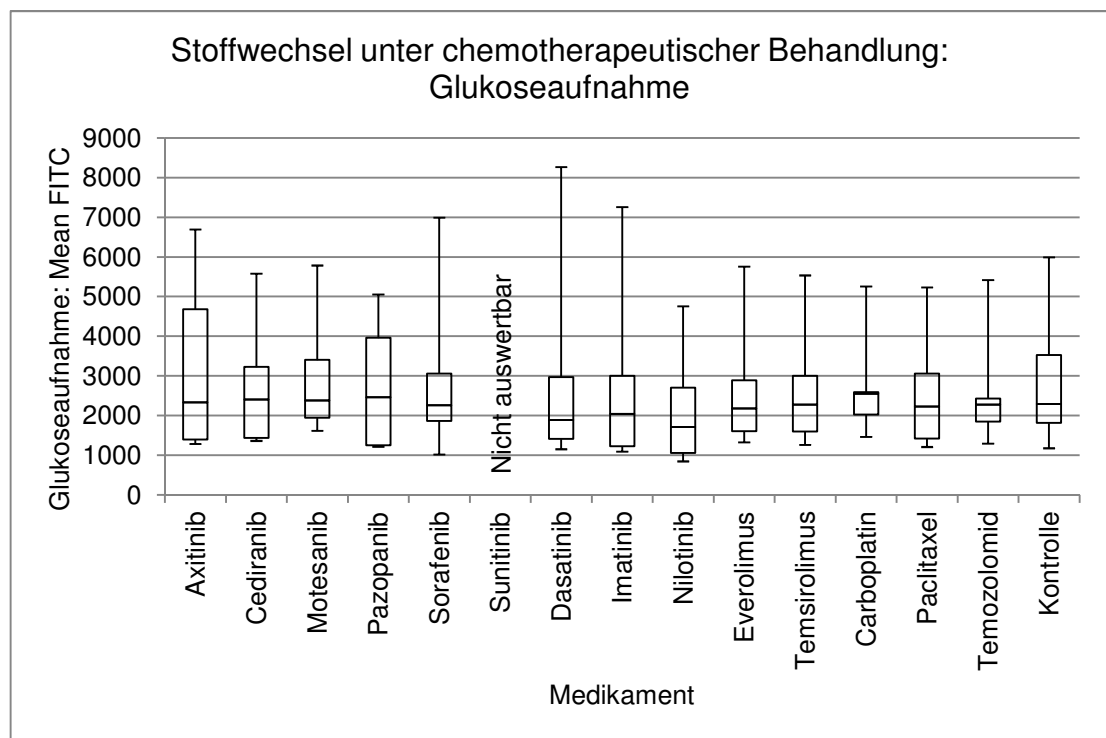


BoxPlot IV.2 Proliferation

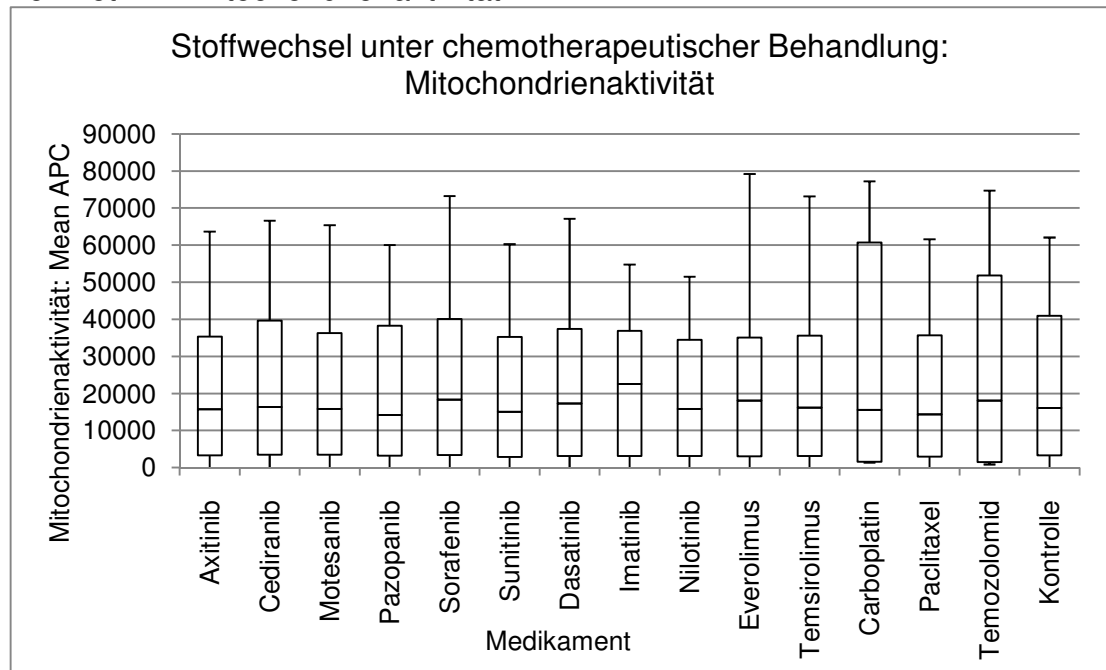




## BoxPlot IV.3 Glukoseaufnahme



## BoxPlot IV.4 Mitochondrienaktivität



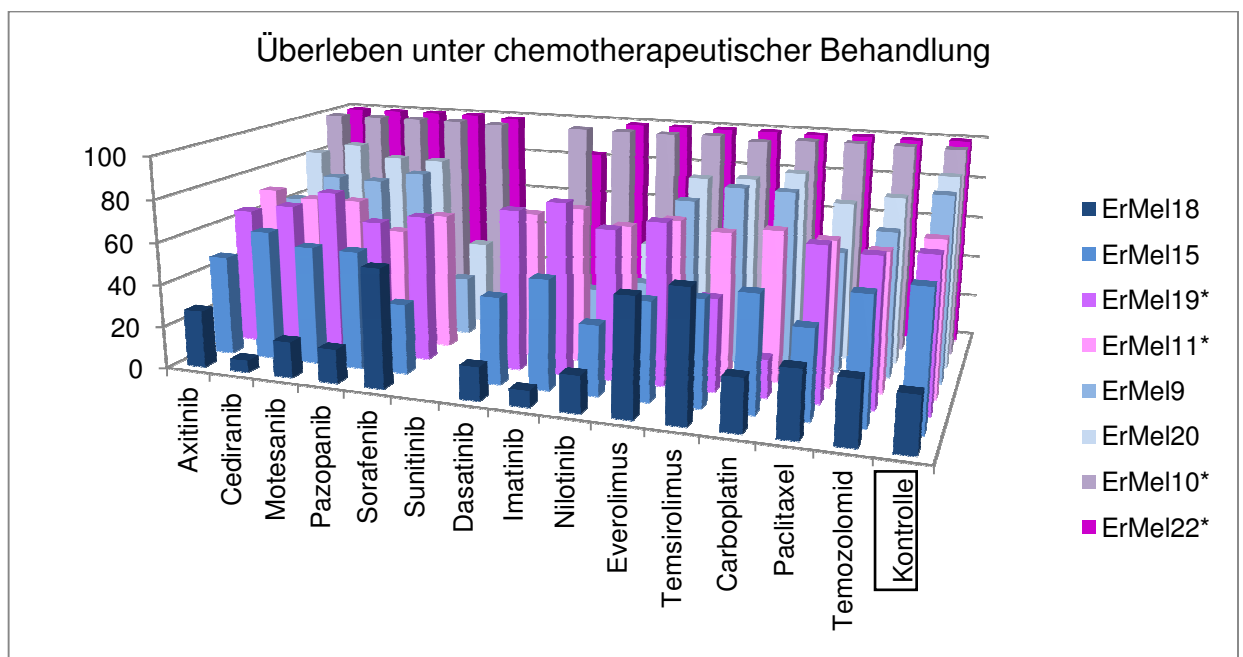
Die BoxPlots zeigen wiederum die Heterogenität des malignen Melanoms auf. Die Spannweite der Wirksamkeit ist zwischen den Zelllinien sehr groß. Bis auf die Ausnahme Sunitinib zeigt dies, dass die im Assay verwendeten Konzentrationen der therapeutischen Dosis im Patienten nahe kommen, denn auch im Patienten ist die Spannweite der Wirksamkeit sehr groß.

Einzig Sunitinib zeigt im BoxPlot Überleben deutlicher als die anderen Chemotherapeutika einen toxischen Effekt auf alle Zellen, was für eine zu hohe im Assay gewählte Konzentration spricht.

### 3.1. Überleben

Das Überleben der Zellen wurde in beiden Assays getestet. Im Folgenden (Abb. IV.52) werden die Ergebnisse aus dem Langzeitassay (Linien 9,15,18,20) und dem Kurzzeitassay (Linien 10,11,19,22, mit \* gekennzeichnet) dargestellt. Die im Assay verwendete Sunitinib-Konzentration wirkt auf alle getesteten Zellen stark toxisch und wurde deswegen hier von der Auswertung ausgeschlossen.

Abb. IV.52 Zusammenfassung Überleben



In den im Langzeitassay verwendeten Linien ErMel9, 15 und 20 haben alle angewendeten Chemotherapeutika einen negativen Effekt auf das Überleben der MM-Zellen. In der Linie ErMel18 haben einige der Medikamente sogar eine positive Wirkung auf das Überleben der Zellen. Die Wirksamkeit der anderen Chemotherapeutika in dieser Linie ist sehr unterschiedlich.

**ErMel9:** Dasatinib, Sorafenib sowie Imatinib zeigen eine gute Wirksamkeit. Auch Nilotinib zeigt noch recht gute Effekte. Es folgen mit immer schlechter werdenden Effekten Paclitaxel, Axitinib, Temozolomid, Motesanib, Cediranib, Everolimus, Pazopanib, Carboplatin und Temsirolimus. Diese Linie ist also

am ehesten sensitiv gegenüber TKI-Inhibitoren wie Dasatinib und Imatinib. Eine Kombination mit z.B. Paclitaxel wäre zu überlegen, da auch dieses einen Effekt auf das Überleben zeigt.

**ErMel15:** Die Wirksamkeit ist am höchsten bei Sorafenib, Nilotinib, Dasatinib und Paclitaxel. Auch Everolimus, Axitinib, Temsirolimus, Imatinib, Carboplatin, Pazopanib und Motesanib zeigen Effekte. Noch etwas weniger wirksam sind Temozolomid sowie Cediranib.

**ErMel18:** Wirksame Medikamente sind Cediranib, Imatinib, Dasatinib, Pazopanib, Motesanib und Nilotinib. Auch Carboplatin zeigt einen Effekt. Nicht wirksam dagegen sind Axitinib, Temozolomid, Paclitaxel, Everlimus, Sorafenib sowie Temsirolimus.

**ErMel20:** Eine Wirkung haben Dasatinib, Imatinib, Sorafenib und Nilotinib. Die restlichen getesteten Chemotherapeutika zeigen weniger Effekte (in absteigender Reihenfolge): Paclitaxel, Temozolomid, Pazopanib, Everolimus, Motesanib, Axitinib, Temsirolimus, Carboplatin sowie Cediranib.

Es wird klar ersichtlich, wie unterschiedlich die Zellen auf die einzelnen Medikamente reagieren. So ist z.B. Cediranib in den Linien 15 und 20 kaum wirksam, in Linie 9 ist es von der Wirksamkeit her mittelmäßig, in der Linie 18 dagegen ist es das wirkungsstärkste Medikament.

Die heterogenen Ergebnisse der Medikamentenwirksamkeit auf das Überleben in den verschiedenen Zelllinien bestätigen sich auch im Kurzzeitassay.

**ErMel10:** Temsirolimus zeigt einen geringen Effekt, bei allen anderen Medikamenten ist der Effekt kaum erwähnenswert (Nilotinib, Imatinib, Sorafenib, Dasatinib, Axitinib). Einige scheinen überhaupt keine Wirkung auf die Überlebensfähigkeit zu haben (Temozolomid, Cediranib, Carboplatin, Paclitaxel, Motesanib, Pazopanib, Everolimus).

**ErMel11:** Außer Imatinib zeigen alle Chemotherapeutika einen Effekt. In abnehmender Wirkstärke beeinträchtigen Pazopanib, Sorafenib, Temozolomid, Nilotinib, Temsirolimus, und Paclitaxel das Überleben. Weniger stark wirken Cediranib, Motesanib, Dasatinib, Carboplatin, Axitinib, Everolimus.



**ErMel9:** Mit absteigender Wirksamkeit haben Axitinib, Nilotinib, Paclitaxel, Dasatinib, Sorafenib, Imatinib, Pazopanib und Everolimus negative Auswirkungen auf die Proliferationsfähigkeit.

**ErMel15:** Eine deutliche Proliferationshemmung kann festgestellt werden bei Behandlung mit Dasatinib, Nilotinib sowie Paclitaxel. Weniger wirksam sind Sorafenib, Axitinib, Pazopanib, Everolimus, Temsirolimus und Imatinib.

**ErMel18:** In dieser Linie zeigen die mTor-Inhibitoren Temsirolimus und Everolimus keinen Effekt auf die Proliferation. Mit absteigender Wirksamkeit haben die folgenden Medikamente einen Effekt: Paclitaxel, Sorafenib, Dasatinib, Imatinib, Nilotinib, Axitinib, Cediranib, Motesanib, Pazopanib, sowie Carboplatin und Temozolomid. Diese Linie scheint gegenüber den Alkylantien unempfindlich zu sein. Erfolgsversprechend wäre laut den Ergebnissen dieses Tests am ehesten eine Therapie mit Multikinase-Inhibitoren wie Sorafenib, auch die BCR-ABL-Inhibitoren zeigen gute Effekte. Eine Kombination mit Paclitaxel wäre ebenfalls denkbar.

**ErMel20:** Gute Effekte werden erzielt von Sorafenib, Axitinib und Paclitaxel. Es folgen mit abnehmender Effektivität Pazopanib, Everolimus, Dasatinib, Temsirolimus, Cediranib, Motesanib, Imatinib, Nilotinib sowie Temozolomid. Carboplatin zeigt keinen Effekt.

### 3.3. Mitochondrienaktivität

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Linien ErMel 10, 11, 19 und 22 aus dem Kurzzeitassay hinsichtlich der Stoffwechselaktivität der Melanomzellen unter chemotherapeutischem Einfluss präsentiert. Die Mitochondrienaktivität gibt Aufschluss über den momentanen Energieumsatz der Zelle. Dargestellt bzw. gegatet sind nur die lebenden Zellen. Aufgrund der großen Spannbreite des Mean-APC (y-Achse) wurden die 4 Linien in zwei unterschiedlichen Diagrammen dargestellt.

**ErMel11:** Die Effekte auf den Stoffwechsel hinsichtlich der Aktivität der Mitochondrien hat in dieser Zelllinie gemischte Effekte: Im Vergleich zur Kontrolle hemmen v.a. Nilotinib und Imatinib die Mitochondrienaktivität. Geringere Effekte zeigen Paclitaxel, Sunitinib und Pazopanib. Eine höhere Aktivität als die Kontrolle zeigen Axitinib, Dasatinib, Motesanib, Cediranib,

Temozolomid und Carboplatin. Ganz deutlich mehr Aktivität ist bei Temsirolimus, Sorafenib und Everolimus detektierbar.

**ErMel19:** In dieser Linie zeigen nur die mit Everolimus behandelten Zellen eine erhöhte Mitochondrienaktivität im Vergleich zur Kontrolle. Deutlich erniedrigt ist die Aktivität bei Nilotinib, ebenso bei Sunitinib, Pazopanib und Cediranib. Etwas geringere Effekte werden bei Imatinib, Temsirolimus, Axitinib, Paclitaxel, Sorafenib, Motesanib und Temozolomid deutlich. Immerhin noch einen geringgradigen Effekt zeigt auch die Behandlung mit Dasatinib und Carboplatin.

Abb. IV.54 und 55 Mitochondrienaktivität einzelner Zelllinien

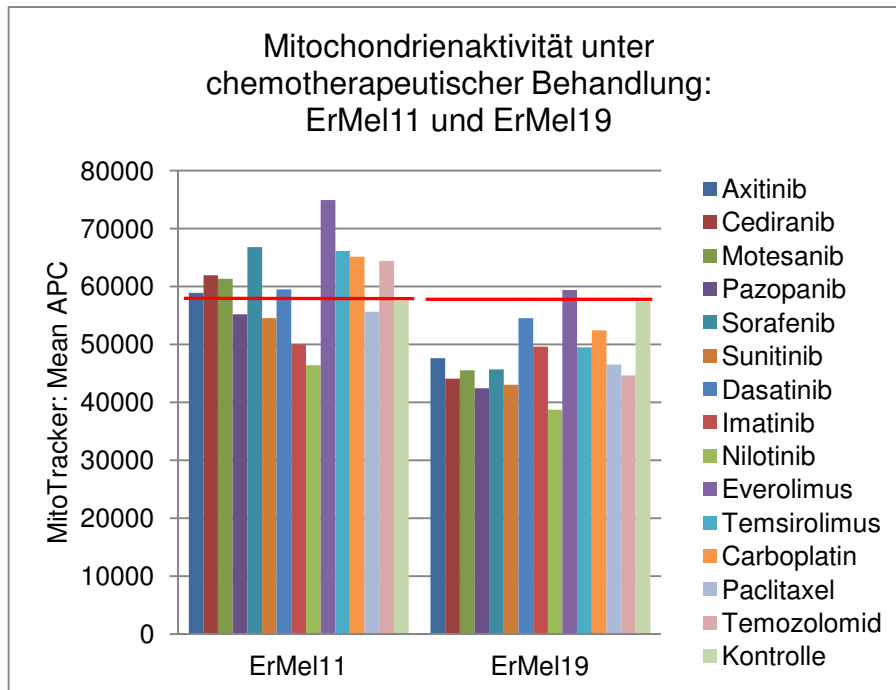
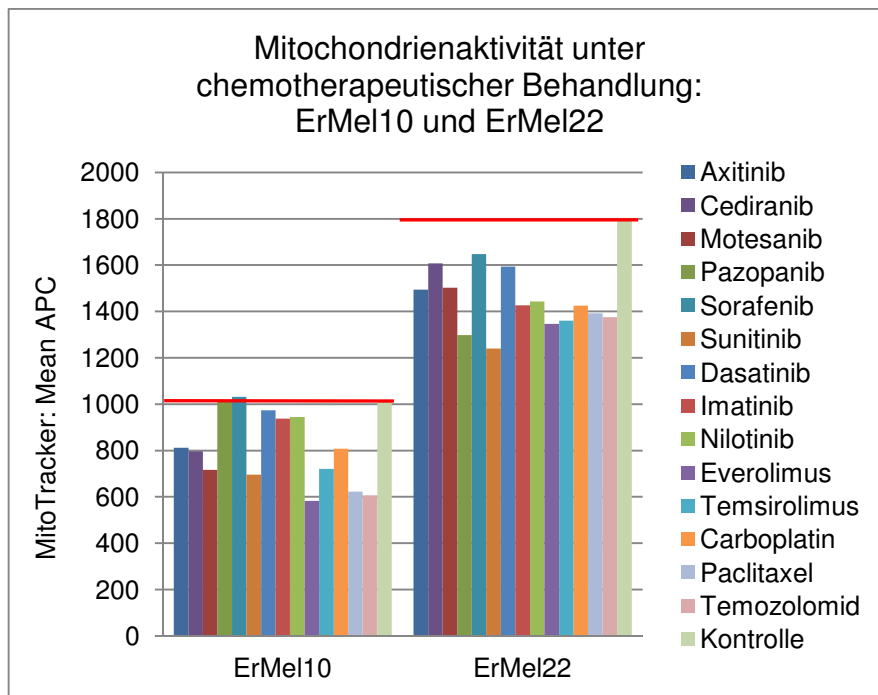


Abb. IV.55



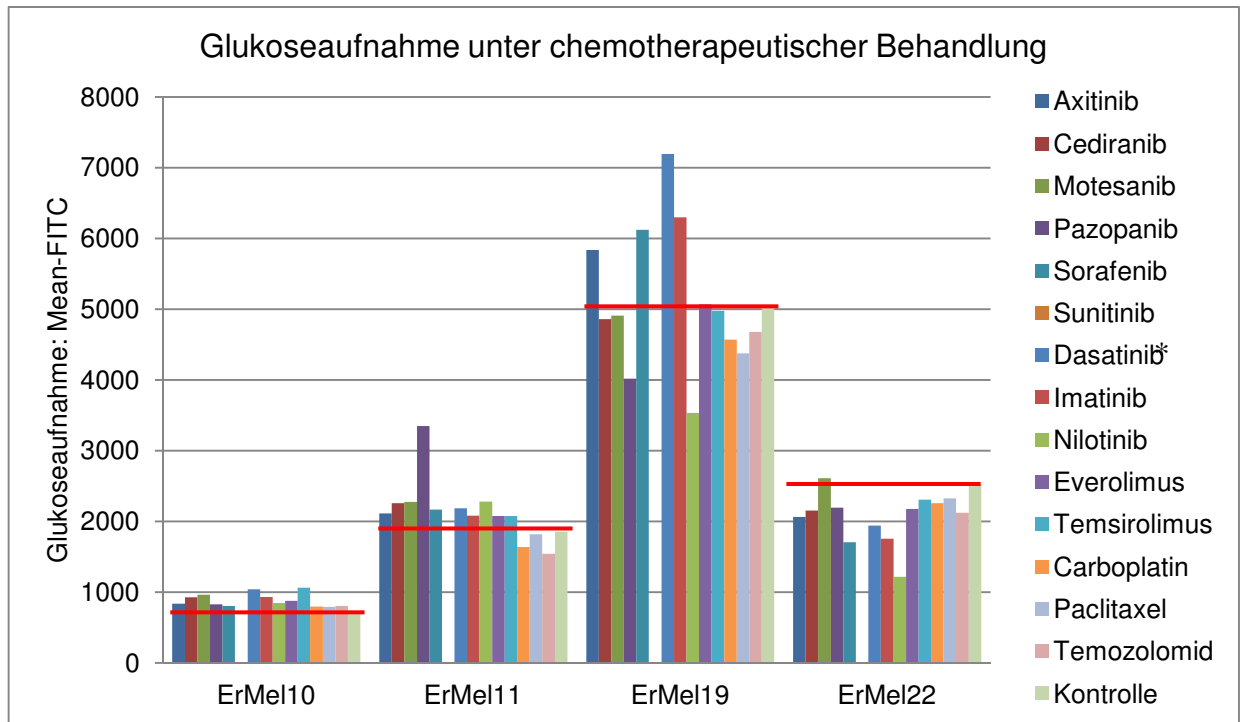
**ErMel10:** Keinen Effekt auf die Aktivitätsrate bei Mitochondrien haben die Chemotherapeutika Sorafenib und Pazopanib. Geringe Effekte zeigen sich bei Dasatinib, Nilotinib und Imatinib. Schon deutlich erniedrigte Aktivität wird erkennbar bei Axitinib, Carboplatin und Cediranib. Die stärksten Effekte sind erkennbar bei Temsirolimus, Motesanib, Sunitinib, Paclitaxel, Temozolomid und Everolimus.

**ErMel 22:** In dieser Zelllinie zeigen alle Medikamente einen guten Effekt. Am deutlichsten Sunitinib und Pazopanib. Darauf folgen mit etwas weniger Wirksamkeit Everolimus, Temsirolimus, Temozolomid und Paclitaxel. Geringere Effekte erzielen Carboplatin, Imatinib und Nilotinib, gefolgt von Dasatinib, Cediranib und Sorafenib.

### 3.4. Glukoseaufnahmefähigkeit

Ebenfalls als Parameter zur Beurteilung des momentanen Stoffwechsels dient die Aufnahmefähigkeit für Glukose. Dargestellt sind nur die lebenden Zellen.

Abb. IV.56 Glukoseaufnahme einzelner Zelllinien (\*Sunitinib ist aus der Auswertung aufgrund seiner hohen Autofluoreszenz ausgeschlossen).



Die Aufnahmefähigkeit für Glukose unter der chemotherapeutischen Behandlung in den Zelllinien zeigt eine große Variabilität.

**ErMel10:** Die Glukoseaufnahme ist in allen Fällen höher als die der unbehandelten Zellen. Am höchsten ist die Glukoseaufnahme bei Temsirolimus, Dasatinib und Motesanib. Es folgen mit geringer werdender Aktivität Imatinib, Cediranib, Everolimus, Nilotinib, Axitinib, Pazopanib, Sorafenib, Temozolomid, Carboplatin, und Paclitaxel.

**ErMel11:** Auch in dieser Linie scheint der Stoffwechsel unter Behandlung höher zu sein. Ausnahmen hiervon bilden Carboplatin und Temozolomid: hier ist die Glukoseaufnahmefähigkeit im Vergleich zur Kontrolle erniedrigt. Höher als die Kontrolle liegen Nilotinib, Motesanib, Cediranib, Dasatinib, Sorafenib, Axitinib, Imatinib. Auch Temsirolimus und Everolimus sind höher als die Kontrolle. Eine der Kontrolle nahezu gleichwertige Aufnahmefähigkeit zeigt Paclitaxel.

**ErMel19:** Hier sind die Effekte gemischt. Höher als die Kontrolle liegen, in aufsteigender Reihenfolge: Everolimus, Axitinib, Sorafenib, Imatinib, Dasatinib. Geringer als die Kontrolle liegen Temsirolimus, Motesanib, Cediranib, Temozolomid, Carboplatin und Paclitaxel. Die deutlichsten Effekte



zeigen Pazopanib und Nilotinib.

**ErMel22:** In dieser Linie sind am deutlichsten die Effekte einer Stoffwechselbeeinträchtigung erkennbar. Nur die mit Motesanib behandelten Zellen liegen über der Stoffwechseltätigkeit der Kontrolle. Erniedrigt sind Paclitaxel, Temsirolimus, Carboplatin. Noch niedriger ist die Aufnahmefähigkeit bei Pazopanib, Everolimus, Cediranib, Temozolomid und Axitinib. Die deutlichsten Effekte sind bei Dasatinib, Imatinib, Sorafenib und Nilotinib erkennbar.

Zusammenfassend ist beim malignen Melanom wirklich jeder Tumor einzigartig und reagiert völlig unterschiedlich auf Therapien. Die Chemosensitivitätstestung kann helfen, individuelle Behandlungsstrategien zu entwickeln.

## V. DISKUSSION

### 1. Komparative Onkologie

In der vorliegenden Arbeit wurden Zellen des humanen malignen Melanoms charakterisiert und untersucht, ob sie Eigenschaften aufweisen, die sie zu potentiellen Tumorstammzellen machen. Außerdem wurde gezeigt, dass eine Identifizierung und Isolierung aus dem Blut von Melanompatienten möglich ist. Ebenso wurden einige Medikamente hinsichtlich ihrer Wirksamkeit auf Melanomzellen in Kultur untersucht. Was bringt dies alles für die Tiermedizin? In den USA hat sich in der jüngeren Vergangenheit die komparative Onkologie entwickelt, die es sich zum Ziel gemacht hat, die Vorteile tier- und humanmedizinischer Forschungsstrategien zu verknüpfen und eine Parallelforschung an beiden Arten voranzutreiben. Als Vorreiter in Europa befürworten und fördern die Veterinärmedizinische Universität Wien sowie der Verein Rote Pfote die komparative Medizin und die universitäre Krebsforschung zugunsten von Mensch und Tier. Dies ist möglich, weil sowohl Tiere als auch Menschen an denselben Tumorformen erkranken. Auch Tierbesitzer wollen alle Möglichkeiten einer Therapie ausschöpfen, auch experimentelle Therapien. Von Vorteil ist, dass das Hundegenom entschlüsselt ist und somit Vergleiche zwischen beiden „Arten“, also Mensch und Hund, möglich sind<sup>151</sup>. Auch beim Pferd gibt es bereits mehrere Studien zum MM, die sich mit der Suche nach Tumormarkern und Genomanalysen befassen<sup>7</sup>. Oftmals sind sich die Tumore genetisch sowie in ihrem molekularbiologischen Verhalten sehr ähnlich. Aufgrund der Ähnlichkeit der Tumoren bei Mensch und Hund sind die Therapieansätze leichter übertragbar. Von Vorteil ist auch, dass Tumore im Hund ebenso spontan entstehen wie im Menschen. Dies ist ein bedeutender Unterschied im Gegensatz zur Tumorforschung an Ratten und Mäusen, da bei diesen Tieren die Tumore künstlich erzeugt werden. Und oftmals sind Therapien, die bei den Labornagern anschlagen, beim Menschen nicht von Nutzen. Ein weiterer Vorteil beim Hund ist, dass die genetische Variabilität des Tumors durch die Zucht eingeschränkt ist<sup>152</sup>, dies lässt einheitlichere Untersuchungen als im Menschen zu. Im humanen Melanom herrscht im Gegensatz zum caninen eine sehr hohe phänotypische Variabilität, was einheitliche Analysen

erschwert. Durch die kürzere Lebenserwartung der Tiere laufen die Zyklen schneller ab und es liegen schneller Forschungsergebnisse vor. Ist beim Hund eine Therapie wirksam und verlängert sie sein Leben um ein Jahr, kann man davon ausgehen, dass dieselbe Therapie, sofern sie beim Menschen auch wirksam ist, ein Menschenleben um 5 Jahre verlängern kann. Hunde sind denselben Umweltfaktoren wie Menschen ausgeliefert, auch die klinischen Krankheitssymptome ähneln sich sehr<sup>152</sup>. In mehreren Fällen konnte bereits nachgewiesen werden, dass krankheitsauslösende Punktmutationen beim Hund und beim Mensch auf orthologen Genloci liegen<sup>152</sup>. Klinische Studien sind in der Tiermedizin häufig leichter durchführbar als in der Humanmedizin; die Humanmedizin dagegen hat oftmals die höheren Forschungsgelder zur Verfügung. Eine Zusammenarbeit von Tier- und Humanmedizin bietet für beide Richtungen Vorteile: die Erarbeitung neuer Therapiestrategien sowie deren Testung kann durch parallele Forschung beschleunigt werden. So können Erkenntnisse der vorliegenden Forschungsarbeit auch der Tiermedizin von Nutzen sein. Es kann ebenso daraufhin gearbeitet werden, Melanomzellen mit entsprechenden Markern, beim Hund oder beim Pferd, aus dem Blut zu isolieren und hinsichtlich ihrer Chemosensitivität zu testen. Dem Patienten, egal ob Mensch oder Tier, können so unwirksame Therapien erspart werden. Zudem kann man, wenn von Anfang gezielt und wirksam behandelt wird, die zum Teil sehr hohen Medikamentenkosten einsparen.

## 2. Charakterisierung von Melanomzellen

Mit der Charakterisierung wurden zwei Ziele verfolgt. Zum einen sollte ein Marker oder eine Markerkombination gefunden werden, welche die Melanomzellen zuverlässig kennzeichnen kann. Zum anderen soll die Charakterisierung aufzeigen, wie groß die Heterogenität des malignen Melanoms (MM) sein kann und ob es innerhalb der Tumorzellen eine Untergruppe gibt, die stammzellähnliche Eigenschaften aufweist.

Die Marker wurden an zuvor etablierten Melanomzelllinien getestet. In der Zellkultur sind die Wachstumsbedingungen anders als im Patienten, was langfristig zu einer Änderung des Phänotyps der Zellen führen könnte. Um das Risiko solcher Zellkulturartefakte möglichst gering zu halten, wurden für

die Charakterisierung nur Zelllinien aus Kurzzeitkulturen verwendet, dh sie wurden baldmöglichst nach ihrer Anzucht aus dem chirurgisch entfernten Tumor untersucht. Da nicht bekannt ist welche Marker kontinuierlich von zirkulierenden Melanomzellen im Vergleich zu Zellen aus einem soliden Tumor exprimiert werden, ist es sinnvoll einen „Multi-Marker-Ansatz“ zu verfolgen, um möglichst viele dieser besonderen Zellen zu identifizieren. Die getesteten Marker wurden aufgrund ihrer aus der Literatur bekannten Eigenschaften in Verbindung mit dem MM ausgewählt. Die Charakterisierung wurde mit dem besonderen Augenmerk darauf durchgeführt, inwiefern die getesteten Marker eine differenzielle Expression auf Melanomzellen gegenüber PBMCs zeigen. Für die Isolierung von Tumorzellen aus Vollblut ist die Separierung dieser beiden Zellarten eine essentielle Voraussetzung. Die Gesamtbetrachtung der Ergebnisse der Charakterisierung bestätigt die Angaben aus der Literatur<sup>74</sup>, wonach das MM ein sehr heterogener Tumor ist. Jede der analysierten Melanomlinien hatte ein individuelles Expressionsprofil (s. Ergebnisse Kapitel 1). Das erste Ziel dieser Arbeit wurde erreicht: Mit MCSP, MCAM und CD45 wurde eine Markerkombination etabliert, die es erlaubt, Melanomzellen im Blut zu markieren und von anderen im Blut zirkulierenden Zellen zu unterscheiden.

### 2.1. Charakterisierung mit melanomspezifischen Markern, Adhäsionsmolekülen und T-Zell-Erkennungsmolekülen

Der melanomspezifische Marker MCSP war auf 28 der 29 getesteten Linien positiv (entsprechend 96,6%). Auch ErSo16, eine Zelllinie die aus zirkulierenden Melanomzellen nach einer erfolgreichen Zellsortierung angewachsen ist, zeigte eine hohe MCSP Expression. Linie ErMel24b exprimierte MCSP nicht über einer MFI von 100. Zelllinie 24a dagegen, die nach kürzerer Zeit der Etablierung dieser Zelllinie aus einer Leukapherese analysiert wurde, exprimierte MCSP höher. Die Expression sank also in Kultur erst, bevor sie später wieder anstieg (ErMel 24c). Auf PBMCs war MCSP nur auf sehr niedrigem Level detektierbar. Dies machte MCSP zu einem idealen Bestandteil der Markerkombination zur späteren Isolierung zirkulierender Melanomzellen. Die durchweg hohe MCSP-Expression lässt Rückschlüsse auf die Funktion dieses Moleküls zu: es ist wichtig für die

Zellen, z.B. durch die Aktivierung bestimmter Signalwege, und es ist wenig bis kaum immunogen. Die Zellen würden sonst angreifbar für die Immunabwehr werden.

MCAM wurde auf 93,1% der getesteten Melanomzelllinien auf hohem Niveau nachgewiesen. Nur zwei Linien zeigten keine bzw. geringe MCAM-Expression. Auf Zelllinie ErMel10 war MCAM nicht nachweisbar, Linie ErMel 24a exprimierte MCAM nicht über den MFI-Grenzwert von 100. Diese Zelllinie wurde aus einer Leukapherese angezüchtet. Somit handelt es sich um zirkulierende Melanomzellen. Wie auf den Linien ErMel 24b und 24c zu erkennen ist, steigt die MCAM Expression mit der Kultivierungsdauer an. Auch wenn ErMel24a MCAM nicht durchgängig exprimiert, so kann es dennoch auf zirkulierenden Melanomzellen anderer Patienten exprimiert werden. Linie 25a, ebenfalls aus einer Leukapherese angewachsen, exprimiert MCAM hoch. Falls zirkulierende Melanomzellen in einzelnen Fällen kein MCAM aufweisen sollten, können die Zellen über MCSP identifiziert werden und auch ohne die MCAM-Expression als Melanomzelle klassifiziert und sortiert werden. MCAM wurde, wie MCSP, in die Markerkombination für die Zellsortierung aufgenommen, da sich sein Expressionslevel auf Melanomzellen deutlich von dem auf PBMCs unterscheidet.

CD45 zeigte auf Melanomzellen keine Expression (14 Linien), auf 15 Linien (entsprechend 51,7%) war eine minimale Anfärbung sichtbar, die aber um den Faktor 1000 geringer war als die Färbung auf PBMCs. Auf PBMCs ist CD45 sehr hoch exprimiert. Deshalb kann es zur Unterscheidung dieser beiden Zellarten herangezogen werden. Zusammen mit MCSP und MCAM wurde es als Marker zur Identifizierung von zirkulierenden Melanomzellen verwendet. Folgende Phänotypen wurden für die Zellsortierungen als Melanomzellen definiert: CD45-MCSP+, CD45-MCAM+ und CD45-MCSP+MCAM+. Dies bedeutet, auch Zellen, die nur für einen der beiden verwendeten Melanommarker positiv waren, wurden sortiert. Eine Ausweitung des Markerpanels würde die Zuverlässigkeit, alle zirkulierenden Melanomzellen zu finden, weiter erhöhen. Die Markerkombination CD45/MCSP/MCAM zur Detektion zirkulierender Melanomzellen aus dem Blut von Melanom-patienten wurde bei allen in dieser Arbeit durchgeführten

Zellsortierungen verwendet. Bestätigt wurde sie durch die Zelllinie ErSo16. Diese Linie ist aus einer Zellsortierung aus dem Blut eines Melanompatienten ausgewachsen. Nach Expansion der Zellen in Tumorstammsmedium konnte eine hohe Expression von MCSP, MCAM sowie ICAM nachgewiesen werden.

Die anderen in der Charakterisierung getesteten Marker wurden aus verschiedenen Gründen nicht für die Isolierung zirkulierender Tumorzellen verwendet. Allgemein zeigten die Marker sehr unterschiedliche Expressionsstärken; sehr hohe (wie z.B. bei MCSP und MCAM), mittlere (z.B. bei ABCG2 und HLA-DR) oder sehr geringe bzw. keine Expression (z.B. CD133, Tyrosinase).

So konnte das Adhäsionsmolekül ICAM zwar auf allen getesteten Melanomzelllinien (n=24), auch solchen, die aus Patientenblut generiert wurden (ErMel24a und 25c sowie ErSo16) nachgewiesen werden, aber aufgrund der deutlichen Expression auch auf PBMCs eignete es sich nicht für Abgrenzung der Melanomzellen von Zellen aus dem Blut.

N-Cadherin konnte nur auf sehr wenigen Zellen nachgewiesen werden. In der Auswertung über die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) zeigt sich gegenüber der ungefärbten Kontrolle keine Färbung der Melanomzellen. Aufgrund seiner geringen und sehr uneinheitlichen Expression wurde N-Cadherin nicht für die Zellsortierungen verwendet. Die Expression auf einer kleinen Untergruppe von Zellen könnte es allerdings interessant für die Analyse der Heterogenität der Melanomzellen innerhalb einer Kurzzeitkultur bzw. innerhalb eines Patienten machen. N-Cadherin wird im Rahmen des Cadherin-Switch hochreguliert. Mit der Hochregulierung bekommen die Zellen einen Phänotyp, der dem von Stammzellen ähnlich ist<sup>35</sup>. Möglicherweise hat der Cadherin-Switch bei den untersuchten Zelllinien noch nicht stattgefunden. Da N-Cadherin auch heterotypische Adhäsion vermittelt, könnte es bei der Verankerung einer Tumorstammzelle in einer Nische eine Rolle spielen.

Das Adhäsionsmolekül CD166 konnte in variablen Expressionshöhen auf 10 von 24 (41,7%) getesteten Linien nachgewiesen werden. CD166 wurde bereits im Jahr 2000 als Marker für den Tumorprogress nachgewiesen<sup>59</sup>;

seine Expression steigt mit der Invasivität und Aggressivität des wachsenden Melanoms. Drei der getesteten Linien (ErMel 2a, 9 und 14a und 14c) entstammen von Patienten, die bereits Hirnmetastasen aufwiesen. Drei weitere Linien (ErMel11, 24b und ErSo16) stammen aus Patienten, in denen das MM bereits metastasierte. Über die Linie ErMel18 lagen keine weiteren Informationen vor. ErMel1 stellt eine kommerzielle Melanom-zelllinie dar, auch sie war positiv für CD166.

HLA-DR und HLA-ABC, welche die Erkennung durch T-Zellen vermitteln, konnten auf allen Melanomzelllinien nachgewiesen werden, jedoch ist bei beiden Markern kein Unterschied in der Expressionshöhe im Vergleich zu den PBMCs erkennbar. Daher können beide Marker auch nicht bei der Zellsortierung eingesetzt werden. Interessant ist die Expression dieser beiden Marker hinsichtlich der Immunogenität der Zellen: beide Moleküle gehören zum MHC-System, welches körperfremde Peptide präsentieren kann. Das Immunsystem kann darauf reagieren. Bei einer hohen Expression von HLA-DR und/oder HLA-ABC sind müssten die Melanomzellen empfänglich für die körpereigene Abwehr bzw eine Immuntherapie sein.

Zusätzlich wurden zwei Marker getestet, MelanA und Tyrosinase, welche sich nicht für die vitale Isolierung von Zellen eignen, da sie intrazellulär gefärbt werden müssen und nur nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen sichtbar werden können.

MelanA ist ein auch in der histologischen Diagnostik verwendeter Marker der Melanozyten-Differenzierung. MelanA wurde auf 13 von 14 getesteten Zelllinien nachgewiesen. Auch die aus Leukaphereseprodukten ausgewachsenen Linien ErMel 24a und 25c waren MelanA-positiv, was deren Identität als Melanomzellen bestätigt. Dies zeigt, dass MelanA also auch auf disseminierten, zirkulierenden Tumorzellen nachweisbar ist. MelanA kann so, nach erfolgter Expansion, als Verifizierung für sortierte Zellen aus Patientenblut dienen. Auffällig ist jedoch, dass in 10 der 14 getesteten Linien (entsprechend 71%) eine Subpopulation von Zellen erkennbar ist, die weniger oder kein MelanA exprimiert (s. Histogramme der Linien ErMel3, 8, 14a und 17 im Ergebnisteil Kapitel 1.1, Abb.IV.4). Dies kann zwei Gründe haben: entweder MelanA übt keine notwendige Funktion mehr aus und wird daher herunter reguliert oder aber diese Subpopulation stellt eine Immune-

Escape-Variante dar. MelanA ist sehr immunogen, die Zellen könnten sich vor der körpereigenen Immunabwehr schützen, indem MelanA nicht mehr exprimiert wird.

Tyrosinase ist ein an der Melaninproduktion beteiligtes Protein und damit ein Melanozyten- und Melanom-spezifischer Marker. Die Expression von Tyrosinase wurde im Rahmen dieser Arbeit analysiert, da andere Gruppen die Expression von Tyrosinase auf RNA-Ebene schon zur Detektion zirkulierender Tumorzellen verwendet haben<sup>48-50</sup>. Allerdings konnte bei den hier durchgeführten Analysen Tyrosinase auf zwei Zelllinien nicht (ErMel3 und 4), auf den anderen vier getesteten Linien nur sehr gering exprimiert nachgewiesen werden. Zu Beachten ist hierbei, dass sich viele der Melanomzellen amelanotisch darstellen, also ohne die sonst vorhandene Braunfärbung der Zellen. Produzieren die Zellen kein Melanin, wird auch die Tyrosinase nicht benötigt. Auch in der Literatur gibt es Hinweise, dass Tyrosinase in Melanommetastasen nicht immer nachweisbar ist und sich deshalb als einzelner Marker nicht zum Nachweis zirkulierender Melanomzellen eignet. Reinke et al geben an, in 63% der untersuchten Melanommetastasen Tyrosinase detektiert zu haben, Farthmann et al konnten in nur 44% Tyrosinase nachweisen<sup>51,52</sup>. Dies zeigt wiederum deutlich auf, dass ein einziger Marker nicht zuverlässig alle Melanomzellen identifizieren kann und ein Ansatz aus mehreren Markern sinnvoll ist.

## 2.2. Charakterisierung mit Stammzellmarkern

Viele Melanompatienten erleiden Rezidive oder sterben letztendlich an den Metastasen. Oft treten Jahre nach einem erfolgreichen therapierten Melanom neue Tumore auf. Dabei gibt es für die Entstehung der neuen Tumore zwei mögliche Erklärungsansätze: entweder es handelt sich um eine neue Neoplasie, die sich unabhängig von der vorherigen Melanomerkrankung entwickelt, oder aber es handelt sich um eine Metastase des vorher behandelten Melanoms. Im letzteren Fall hätte sich bei der Primärerkrankung eine Melanomzelle vom Tumor gelöst, wurde mittels Blut oder Lymphe in eine andere Region des Körpers transportiert, um dann dort in einer Art Ruhezustand („Dormancy“) zu überdauern. Nach einer bestimmten Zeit oder auf bestimmte Reize oder Signale hin beginnt diese Zelle, von manchen als



Tumorstammzelle bezeichnet, sich zu teilen. Dabei entstehen neue, mit der Tumorstammzelle identische Stammzellen, sowie mehr differenzierte Zellen, die später die große Masse des Tumors bilden. So beschreibt es die Theorie der Tumorstammzellen<sup>71</sup>. Nur wenn bei einer Therapie beide Gruppen, die Tumorstammzellen sowie die ausdifferenzierten Tumorzellen, vernichtet werden, ist eine Heilung möglich. In der Charakterisierung wurden deshalb für das Melanom beschriebene Stammzellmarker untersucht, um eine Subpopulation von Zellen mit Stammzeleigenschaften zu detektieren. In der Literatur sind CD20, CD133 und CD271 als Marker für Zellen mit erhöhtem tumorigenen Potential beschrieben<sup>66,73,89,90,110</sup>. ABCG2 kann als Transporter zur Chemoresistenz beitragen und so stammzellähnliche Charakteristika vermitteln. cKit und Notch1 sind ebenfalls als wichtige Mechanismen in der Tumorentstehung beschrieben<sup>91-94,111-114</sup>.

In der vorliegenden Arbeit zeigte cKit eine variable Expression. Es wird von 17 der 29 getesteten Linien exprimiert, dies entspricht 58,6%. In einigen Linien grenzen sich deutlich cKit+ Subpopulationen ab. Innerhalb der cKit-Subpopulationen lässt sich aber kein Anstieg der anderen Stammzellmarker nachweisen. Bemerkenswert ist in dieser Hinsicht, dass die Linie ErMel25c kein cKit aufweist. Diese Linie ist aus der Leukapherese eines Melanompatienten entstanden. Im Gegensatz dazu steht die Linie 24a, ebenfalls aus einer Leukapherese ausgewachsen, mit einer deutlichen cKit-Expression. Huang et al konnten zeigen, dass cKit im Verlauf der Melanomentwicklung abnimmt und nicht in Metastasen vorhanden ist<sup>95</sup>. SCF, der cKit-Ligand, kann bei der Bindung an cKit das Apoptoseprogramm der Zelle auslösen. SCF wird u.a. auch von Keratinozyten gebildet. Daher stammt die Annahme, dass Melanomzellen durch den Verlust von cKit der SCF-vermittelten Apoptose entkommen können und somit Tumorstammzellen und auch Metastasierung gefördert werden<sup>95</sup>. cKit dient also im Anfangsstadium vermutlich als Proto-Onkogen, während es im Verlauf der Tumorstammzellenprogression durch die Apoptosevermittlung aber hinderlich ist und daher herunter reguliert wird. Dies kann erklären, warum cKit in Melanommetastasen und auch in Melanomzelllinien nicht nachweisbar ist<sup>97-99</sup>. Die vorliegenden Ergebnisse könnten also Melanome in unterschiedlichen Entwicklungsphasen widerspiegeln. Da die meisten Zelllinien aus Patienten

im Stadium IV generiert wurden, liegt in diesen Fällen ein fortgeschrittenes Entwicklungsstadium vor. Demnach sollte die cKit-Expression also gering sein. Allerdings kommen in der Zellkultur keine SCF-bildenden Keratinozyten vor. Dies könnte im Umkehrschluss dazu führen, dass cKit wieder hochreguliert wird, da die Gefahr der Apoptose ohne den Ligand nicht besteht.

Neben cKit ist auch das in dieser Arbeit getestete ABCG2 ein für Tumorzellen funktionell wichtiges Protein. Die ABC-Transporter sind ein wesentlicher Mechanismus der Chemoresistenz<sup>64,67</sup>. Daher kann erwartet werden, dass eine hohe ABCG2-Expression mit Therapieresistenzen einher geht. In der Literatur wird eine stammzellähnliche Population durch die Expression von ACBB5, ebenfalls ein ABC-Transporter wie auch ABCG2, beschrieben<sup>88</sup>. ABCB5 wird auf Primärmelanomen und Melanom-metastasen wesentlich höher als in melanozytären Nevi exprimiert. ABCB5 ist damit ein Marker für den Tumorprogress. Ob der hier getestete ABCG2-Transporter ebenfalls mit dem Tumorprogress korreliert wurde bisher noch nicht gezeigt. Die Expression von ABCG2 auf den getesteten Melanomlinien war uneinheitlich, aber auf allen getesteten Linien detektierbar. In drei Linien zeichnete sich eine positiv gefärbte Subpopulation ab. Allerdings wurde innerhalb der ABCG2+ Zellen keine vermehrte Expression der anderen Stammzellmarker gemessen. Eine Selektion der stammzellähnlichen Population lässt sich in der vorliegenden Arbeit weder durch cKit noch durch ABCG2 durchführen.

Notch1 wurde auf 24 von 26 (entsprechend 92,3%) getesteten Linien detektiert. Dies unterstreicht die Relevanz des evolutionär konservierten Moleküls. Notch1 aktiviert wichtige Signalwege in der Entstehung und Progression des malignen Melanoms<sup>111-114</sup>. Die Höhe der MCAM-Korrelation konnte nicht, wie beschrieben<sup>112</sup>, mit der Höhe der Notch1-Expression korreliert werden.

In den charakterisierten Linien konnte eine Expression der Oberflächenmarker CD20, CD133 und CD271 nicht bzw. nur in sehr geringem Ausmaß detektiert werden. CD20 wurde nur auf einer von 21 getesteten Linien (4,8%) auf sehr geringem Expressionsniveau nachgewiesen. Nach Fang et al kann es als Stammzellmarker genutzt

werden<sup>89</sup>. In den Melanomzelllinien, die eine Expression von CD133 aufwiesen, blieb die Höhe der Expression weit unter der auf PBMCs. Es konnte auf 10,3% (3 von 29) der getesteten Linien detektiert werden. CD271 konnte auf 9 von 13, entsprechend 69,2%, der getesteten Linien nachgewiesen werden, aber ebenfalls auf sehr geringem Niveau. 2010 zeigten Boiko et al, dass CD271 auf Melanomstammzellen nachgewiesen werden kann<sup>110</sup>. Bei den hier beschriebenen Markern gibt es verschiedene Faktoren, die bei der Interpretation der Ergebnisse beachtet werden müssen: Die Funktionen dieser Moleküle sind nicht ausreichend geklärt. Zudem wird ein solider Tumor nur einen kleinen Anteil an Zellen mit Stammzeleigenschaften aufweisen, was den Nachweis erschwert. Inwiefern die Expression dieser Marker auf Melanomzellen (MZ) in Kultur identisch ist mit MZ im Patienten ist nicht geklärt. Die schlafenden MZ im Patienten sind in Nischen verhaftet, umgeben von Signalen und äußeren Einflüssen. Diese besondere Mikroumgebung kann man in der Zellkultur kaum nachbilden. Die Isolierung solcher Zellen aus dem Patienten direkt wäre von großem Vorteil, ist aber technisch kaum durchführbar. Auch von zirkulierenden MZ wird die Expression von Stammzellmarkern erwartet, da es eben diese Zellen sind, die für eine Metastasierung verantwortlich sind. Die Stammzellmarker können aber nicht zur Isolierung genutzt werden, da sich ihre Expression den vorliegenden Ergebnissen zufolge häufig mit der auf PBMCs überschneidet. Für die Isolierung können nur Marker verwendet werden, die MZ einwandfrei identifizieren können. Eine Analyse mit Stammzellmarkern könnte nach erfolgter Isolierung durchgeführt werden.

Zusammenfassend lässt sich durch keinen der untersuchten Stammzellmarker alleine eine klar definierte Population von Melanomstammzellen darstellen. Es konnten aber Zellen detektiert werden, die sowohl für Stammzellmarker als auch für melanomtypische Marker positiv waren. Dies ist ein Hinweis darauf, dass einige Zellen innerhalb der Melanomzellpopulation Eigenschaften und Aufgaben von Stammzellen erwerben können. Im Färbepanel 1 sind dies Zellen, die neben MCSP auch noch MCAM, ABCG2 und N-Cadherin exprimieren. Die mit Panel 2 gefärbten stammzell-ähnlichen Melanomzellen zeigen die Expression von cKit, CD133, Notch1 sowie ICAM. Die unterschiedlichen Expressionsprofile zeigen die

Heterogenität des Tumors auf. Nicht nur untereinander sind Melanome sehr unterschiedlich, die Zellen zeigen auch innerhalb eines Tumors eine große Heterogenität. In der Charakterisierung ließen sich innerhalb einer Melanomzelllinie verschiedene Zellpopulationen darstellen, die sich durch die Expression unterschiedlicher Marker voneinander unterscheiden. Auch in der Literatur ist die große Heterogenität der Zellen innerhalb desselben Tumors beschrieben<sup>73</sup>. Bislang ist unklar, ob die Heterogenität durch genetisch unterschiedliche Klone zustande kommt, oder ob es sich um unterschiedliche Zustände in und derselben Zelle handelt.

### 2.3. Funktionelle Assays zur Detektion einer stammzellähnlichen Subpopulation

Neben der Analyse verschiedener für Stammzellen beschriebener Marker wurden auch funktionelle Assays zur Detektion einer stammzellähnlichen Population in den Melanomzelllinien durchgeführt. Bei der Detektion einer Side Population (SP), die in der Lage ist den Farbstoff Hoechst 33342 aktiv aus der Zelle heraus zu schleusen, ergaben sich keine eindeutigen Hinweise auf eine Subpopulation von Tumorstammzellen. Lediglich 2 Linien zeigen eine leichte Tendenz zu dieser Fähigkeit, ErMel15 und ErMel20. Jedoch muss man hier berücksichtigen, dass der Assay keine Positivkontrolle enthält, und es so sein kann, dass die Rahmenbedingungen nicht optimal waren, eine SP zuverlässig darzustellen. Das Protokoll wurde von Goodell et al<sup>65</sup> übernommen.

Die Analyse mit dem Enzym ALDH zeigte, dass in 14 von 17 getesteten Linien (entsprechend 82,4%) eine erhöhte ALDH-Aktivität vorliegt. 7 Linien (ErMel 1, 3, 5, 10, 12, 14b und 23) zeigen dabei eine deutliche Subpopulation mit ALDH+ Zellen, während sich in den anderen Linien insgesamt eine Verlagerung der Gesamtaktivität hin zu einer höheren ALDH-Aktivität darstellt. Da ALDH zur Entgiftung der Zelle beiträgt, wird dieses Ergebnis mit der hohen Chemoresistenz im MM in Verbindung gebracht. Oft sind Chemotherapeutika nur kurzzeitig, schlecht oder nicht wirksam. Dies wiederum spricht für eine stammzellähnliche Population, die Multi-Drug-Resistance-Mechanismen besitzt. Die Zelllinien ErMel15 und ErMel20, die in der Hoechst-Färbung eine SP andeuten, gehören allerdings bei der ALDH-

Analyse nicht zu den Zellen mit deutlich erhöhter Aktivität: bei ErMel15 ist eine mäßige ALDH-Aktivitätserhöhung feststellbar, bei ErMel20 ist keine ALDH-Aktivität nachgewiesen. Die Expression von ABCG2 wurde nur bei ErMel20 getestet: ABCG2 wird – im Vergleich mit den anderen Melanomzelllinien – in mittlerem Umfang exprimiert.

Mit den funktionellen Assays (Hoechst- und ALDH-Färbungen) kann keine eindeutige Stammzellpopulation innerhalb der Melanomzellen charakterisiert werden. Aber es gelang in 7 Zelllinien die Darstellung einer Subpopulation von Zellen, die eindeutig erhöhte ALDH-Aktivität im Vergleich zur restlichen Zellpopulation aufweist. In weiteren 7 Fällen zeigte die gesamte Zellpopulation eine Erhöhung der ALDH-Enzymaktivität. In 3 Fällen wurde keine Erhöhung nachgewiesen. Die gemessene Erhöhung der ALDH-Enzymaktivität sowie die Expression des ABC-Transporters ABCG2 auf allen 24 getesteten Melanomzelllinien weisen darauf hin, dass der Großteil der Zelllinien ein erhöhtes Potential zur Entgiftung der Zellen hat und sich damit der Wirkung chemotherapeutischer Behandlungen entziehen kann.

Zusammenfassend lässt sich innerhalb einer Melanomzelllinie keine klar definierte stammzellähnliche Population charakterisieren, weder durch Stammzellmarker noch durch funktionelle Assays. Es scheint eher so, dass es heterogene Subpopulationen gibt, die in unterschiedlichem Ausmaß stammzellähnliche Eigenschaften aufweisen. In den Linien ErMel12 und 14a werden die Stammzellmarker vergleichsweise hoch exprimiert, in beiden ist auch ein deutlich positives ALDH-Subset zu detektieren.

Tab. V.1 % positiver Zellen der Melanomzelllinien ErMel12 und 14a

	ErMel12	ErMel14a
ALDH	2,33	15,9
ABCG2	7,53	84,2
cKit	2,35	8,83
Notch1	1,67	0,121
CD271	3,82	4,69
CD133	0,024	0,027

Beide Zelllinien entstammen Patienten mit bereits metastasiertem Melanom

und beide hatten schon mehrere Formen der Chemotherapie durchlaufen. Nicht beurteilbar war hier allerdings, ob es sich dabei um feste Subpopulationen handelt, oder die Expression der Stammzellmarker nur zeitweise nachweisbar ist. In Bezug auf die von Weissman et al aufgestellte Theorie der Tumorstammzellen<sup>71</sup>, lässt sich aus den hier gewonnenen Erkenntnissen eher auf das dynamische Modell schließen. Die malignen Zellen wären demnach in der Lage, temporär stammzellähnliche Eigenschaften zu erwerben.

### 3. Zirkulierende Melanomzellen

#### 3.1. Identifizierung und Isolierung

Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Durchflusszytometrie als Methode zur Identifizierung und Sortierung von zirkulierenden Melanomzellen (ZMZ) zu etablieren. Besonders im Fall des Uvea-Melanoms müssten ZMZ nachweisbar sein – da kein Anschluss an das lymphatische Gefäßsystem besteht, muss die Metastasierung auf hämatogenem Weg erfolgen. Zur Analyse dieser besonderen Zellen muss man sie aus dem Blutstrom von Melanompatienten isolieren. Dazu wurde die aus der vorliegenden Charakterisierung erarbeitete Markerkombination CD45-MCSP+MCAM+ verwendet. MCSP und MCAM wurden als Marker für Melanomzellen verwendet, da sie in hohem Maß und kontinuierlich durch alle Melanomzelllinien exprimiert werden, aber nicht bzw nur geringgradig auf PBMCs. Im Gegensatz dazu wird CD45 auf PBMCs exprimiert, aber nicht auf Melanomzellen. Dadurch wurde eine zuverlässige Auftrennung beider Zellarten möglich. Über die „intravaskuläre“ Stufe des Melanoms ist nicht bekannt, ob und wann welche Marker exprimiert werden. Eine Erweiterung des Markerpanels zur Identifizierung der zirkulierenden Melanomzellen wäre ein weiterer Fortschritt.

In der vorliegenden Arbeit wurden die ZMZ vor der Sortierung mit dem RosetteSep-Verfahren angereichert. Da nur sehr kleine Zellzahlen erwartet wurden, stellte die Anreicherung dieser Zellen eine besondere Herausforderung dar. Die Methode wurde durch verschiedene Vortests optimiert und validiert und bietet eine einfache sowie schnelle Durchführung.

Getestet wurden ein magnetisches Anreicherungs- sowie ein magnetisches Depletionsverfahren (MCSP-MACS und CD45-MACS) und das RosetteSep-Verfahren. RosetteSep stellt ebenfalls ein Depletionsverfahren dar: CD45+ Zellen werden durch die Bindung an Antikörper mit mehreren Bindungsstellen mittels Dichtegradientenzentrifugation depletiert, genauso wie Erythrozyten und Thrombozyten. Zurück bleiben die ZMZ. Mittels der Färbung mit fluoreszierenden Antikörpern werden die angereicherten Melanomzellen markiert und im Zellsorter sortiert. Im Vorfeld wurden aus Leukaphereseprodukten (Elutrafraktionen) von zwei Melanompatienten Zelllinien etabliert (ErMel24a und 25c), womit gezeigt werden konnte, dass eine Kultivierung von zirkulierenden Melanomzellen tatsächlich durchführbar ist. Bei der Kultivierung aus einer Leukapherese dauert es allerdings sehr lang, bis deutlich wird, ob Melanomzellen enthalten waren oder nicht. Bei der Durchflusszytometrie hat man sofort die Information, ob ZMZ nachweisbar sind oder nicht. Nach gelungener Kultivierung der sortierten Zellen stehen diese dann auch für weitere Analysen zur Verfügung. Zudem entspricht eine Leukapherese einer größeren Menge an Blut (ca. 500 ml oder mehr). Eine Zellsortierung kommt mit weniger Blut aus, da die Zellen vor der Sortierung auch angereichert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden zwischen 25 und 60ml Blut pro Sortierung verwendet, im Durchschnitt 48ml. Ein anderer großer Vorteil der hier etablierten Methode ist, dass die Zellen für weitere Untersuchungen verfügbar sind. Bei der Detektion zirkulierender Melanomzellen mittels PCR, wie sie in der Literatur beschrieben ist<sup>48</sup>, ist dies nicht möglich. Der Nachteil der PCR ist, dass die Zellen im Zuge der Analyse „verbraucht“ werden und danach nicht mehr zur Verfügung stehen. Ein weiterer Vorteil der hier verwendeten Methode ist außerdem der Multi-Marker-Ansatz, der das Risiko, dass ZMZ einer Identifizierung entgehen, minimiert. Bei einer PCR, die nur auf einen Marker testet, ist die Gefahr groß, dass Zellen übersehen werden. Tyrosinase wurde schon für die Detektion von ZMZ verwendet<sup>48-50</sup>. Wie in der vorliegenden Arbeit deutlich wird, produzieren nicht alle Melanomzellen Melanin, somit ist in diesen Zellen das an der Melaninsynthese beteiligte Enzym Tyrosinase nicht unbedingt detektierbar. In der Literatur finden sich Angaben von nachgewiesener Tyrosinase in 63% bzw 44% des untersuchten Materials<sup>51,52</sup>. Andere Marker könnten sehr wohl nachweisbar sein, z.B. MCSP oder MCAM. MCSP hat,

wie in der vorliegenden Arbeit präsentiert wurde, eine durchgehend hohe Expression auf allen getesteten Melanomzellen. Ein weiterer Vorteil der durchflusszytometrischen Identifizierung von zirkulierenden Tumorzellen ist, dass die Zellen nach der Sortierung kultiviert und weiter untersucht werden können.

Es konnte in der vorliegenden Arbeit erfolgreich gezeigt werden, dass es mittels Durchflusszytometrie möglich ist, aus dem Blut von Melanompatienten zirkulierende Melanomzellen zu identifizieren und zu isolieren. Damit stehen nun Mechanismen zur Verfügung, die Zellen sowohl zu untersuchen als auch nach bestimmten Parametern aufzutrennen. So können bestimmte Populationen gezielt vermehrt werden, und die Zellen stehen dann für weitere Analysen zur Verfügung.

### 3.2. Kultivierung

Ein wichtiges Anliegen dieser Arbeit war es zu zeigen, dass man aus einer kleinen Menge an Zellen, wie sie die ZMZ bilden, tatsächlich Zellkulturen etablieren kann. Es wurden aus zwei Leukaphereseprodukten von Melanompatienten erfolgreich Zelllinien generiert. Mit der Etablierung der Zelllinie ErSo16 gelang in einem Fall die Anzucht von Zellen aus einer mit Patientenblut durchgeführten Zellsortierung. ErSo16 wurde im Rahmen der Optimierung der Kulturbedingungen als einzige Linie mit konditioniertem Tumorstadiumsmedium inkubiert. Dies lässt die Vermutung zu, dass in konditioniertem Medium die Faktoren vorliegen, die den Zellen den nötigen Stimulus zur Expansion vermitteln. In den anderen sortierten Kulturen gelang die Expansion der Zellen nicht. Allerdings starben die Zellen auch über Monate nicht, sondern blieben intakt. Dies kann zum einen am Wachstumsmedium liegen, oder aber an den Zellen selbst. Trifft die Theorie der „schlafenden Tumorzelle“ (s. Literaturübersicht Kapitel 7.3) zu<sup>85</sup>, so beginnen diese langlebigen Zellen erst auf einen bestimmten Stimulus hin zu expandieren. Welches Agens als solch ein Stimulus dienen könnte, bleibt zu erforschen. Für die Analyse sortierter Zellen aus Patientenblut bedeutet dies, dass Untersuchungen zunächst auf Einzelzellebene stattfinden müssen. Erste Schritte dazu wurden in der Kooperation mit Advalytix unternommen (siehe Kapitel 5. Ausblick). Dies ist auch insofern vorteilhaft, da Zellen nach



längerer Zeit in Kultur Veränderungen zeigen (z.B. aufgrund der optimalen Wachstumsbedingungen). Um dem vorzubeugen, wurden zur Charakterisierung und zur Testung der Chemosensitivität in der vorliegenden Arbeit Zellen aus Kurzzeitkulturen verwendet.

### 3.3. Zirkulierende Tumorzellen in anderen Krebsarten

In den USA gibt es ein seit 2004 von der FDA zugelassenes Verfahren zur Isolierung zirkulierender Tumorzellen. Der CellSearch<sup>®</sup> Test bietet ein vollautomatisiertes Verfahren zur Isolierung und Enumeration zirkulierender Tumorzellen aus Vollblut. CellSearch kann Zellen mit dem Phänotyp CD45-EpCam+CK8+, CK18+ und CK19+ isolieren. Es wird für metastasierende Tumoren epithelialen Ursprungs (Brustkrebs, Prostatakrebs und kolorektale Tumoren) verwendet. Es sind zur Analyse nur 7,5 ml Blut nötig, die in einer Kartusche durch ein magnetisches Verfahren isoliert und fluoreszenzmikroskopisch dargestellt werden. Durch die Ermittlung der Zahl an ZTZ kann eine prognostische Aussage für den Krankheitsverlauf (progressionsfreies Überleben, Gesamt-Überleben) getroffen werden<sup>153</sup>. Durch wiederholtes Testen kann außerdem die Wirksamkeit angewandter Therapien überprüft werden. CellSearch<sup>®</sup> isoliert also aus dem Blut von Tumorkranken Zellen, die dort aufgrund ihres epithelialen Ursprungs nicht erwartet werden.

### 3.4. Prognostische Relevanz zirkulierender Tumorzellen

Neben der Isolierung von ZTZ zu wissenschaftlichen Zwecken besteht natürlich die Frage ob das Verfahren auch prognostische Relevanz hat. Zieht man die Ergebnisse aus anderen Krebsformen, v.a. des Brustkrebses heran, scheint dies als sehr wahrscheinlich. Nach Alison et al korreliert beim Brustkrebs die Anzahl zirkulierender Tumorzellen mit einer schlechten Prognose hinsichtlich des Krankheitsverlaufes<sup>154</sup>. Ma et al erklären im Zuge ihrer Versuche mit ABCB5 zur Isolierung von Melanomzellen mit tumorigenen Eigenschaften außerdem, dass eine deutlich positive Tendenz besteht, dass die Charakterisierung von Expressionsprofilen die Wahrscheinlichkeit von Metastasen zuverlässig vorhersagen kann<sup>155</sup>. Durch die Charakterisierung von ZTZ könnten also klinisch und therapeutisch

relevante Rückschlüsse auf das Verhalten des Tumors gezogen werden. Auch das Risiko von Rezidiven könnte somit vorhersagbar sein, je nach Aggressivität der isolierten ZMZ. Da Tumorstammzellen in der Lage sind, eine Anti-Tumor-Therapie in ihrer Nische als schlafende Zelle unbeschadet zu überstehen können sie in der Folge zu einer erneuten Tumorerkrankung führen. Die Isolierung von ZMZ könnte möglicherweise aufzeigen, wenn ein makroskopisch tumorfreier Patient subklinisch noch oder wieder erkrankt ist. Dies kann z.B. bei Mikrometastasen der Fall sein, die durch die Bildgebung nicht erfasst werden können. Mittels der ZMZ-Isolierung könnte ein Teil der Erkrankungen entdeckt werden. Klinisch kann man dann ein besseres, weil individuell abgestimmtes und für den Patienten wenig belastendes, Monitoring durchführen. Auch bei Tieren ist eine Blutentnahme in der Regel problemlos durchführbar. Wenn man hier entsprechende Marker findet (wie z.B. CEA (= carcinoembryonic antigen) beim caninen Mammatumor), ist die Methode auch in die Tiermedizin übertragbar. Es laufen derzeit weltweit verschiedene Studien, die zirkulierende Tumorzellen (ZTZ) weiter erforschen. Derzeit laufen z.B. zwei Studien, am Centre Hospitalier Universitaire de Nice mit dem Titel "Study of Circulating Tumor Cells Before and After Treatment in Patients With Metastatic Melanoma" (NCT-Nr. 01573494), die das CellSearch® System nutzen wird (s.o.) sowie am Comprehensive Cancer Centers of Nevada der University of Pittsburgh "Culture and Characterization of Circulating Tumor Cells in Melanoma and Other Cancers" (NCT-Nr. 01528774). In dieser Studie werden die ZTZ mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert und mit immunfluoreszenten Markern gefärbt. Eine Langzeitkultivierung der ZTZ wird angestrebt, um RNA- und DNA-Analysen durchführen zu können.

Von derselben Grundidee wird in der vorliegenden Arbeit ausgegangen: die Isolierung von zirkulierenden Melanomzellen aus Blut muss aufgrund ihres Phänotyps, dem melanozytären Ursprung, möglich sein. Mit den Markern CD45, MCSP und MCAM ist dieses auch gelungen. Was die Menge der isolierten Melanomzellen für den Patienten im Einzelfall bedeutet, muss noch untersucht werden. Ob eine prognostische Aussagekraft besteht, kann aufgrund der geringen Fallzahl in der vorliegenden Arbeit nicht belegt werden. Insgesamt wurden 21 Zellsortierungen aus Patienten durchgeführt. Im Fall von

ErSo16 war der Patient zum Zeitpunkt der Blutentnahme für die Zellsortierung makroskopisch tumorfrei. Nichtsdestotrotz konnten 72 ZMZ isoliert werden (12 ZMZ/ml Blut). Der Patient verstarb an Metastasen, etwa zu dem Zeitpunkt, an dem auch die ZMZ in Kultur begannen zu profilieren. Legt man die Erfahrungen anderer Krebsformen zugrunde<sup>153</sup> wird auch im Fall des malignen Melanoms erwartet, dass die Menge der zirkulierenden Melanomzellen prädiktiven Wert besitzt. Es kommt den ZMZ also auch eine große klinische Relevanz, besonders hinsichtlich der Vorhersage von Rezidiv- und Metastasierungsrisiko, zu.

#### 4. Chemosensitivität

Das maligne Melanom ist ein schwer behandelbarer Tumor. In groß angelegten Studien wurden Medikamente, die als Monochemotherapie angewendet wurden, häufig als nicht oder wenig wirksam beurteilt<sup>123,131</sup>. Dennoch können einzelne Patienten mit großem Erfolg behandelt werden. Neben der bewährten Chemotherapie mit Dacarbazin kann man mit neuen Erkenntnissen über die molekularen Ursachen der Krebsentstehung mittlerweile zielgerichtete Therapien entwickeln. Dabei werden gezielt Moleküle inhibiert oder modifiziert, die tumorspezifische Mutationen aufweisen (wie z.B. die Braf-Mutation im MM) und damit ursächlich für Entstehung und das Fortschreiten einer Tumorerkrankung sind. Ansätze im MM sind die konstitutiv erhöhten Ras/Raf/Mek/Erk und PI3K/AKT Signalwege, die sich mittels Tyrosinkinaseinhibitoren hemmen lassen. Eine Vielzahl neuer Substanzen wird hierbei eingesetzt, die ihre Wirkung z.T. in mehreren Bereichen entfalten: Hemmung des Tumorwachstums, antiangiogenetische Wirkung sowie Herabsetzung der Apoptoseresistenz. Es ist aufgrund der hohen phänotypischen Variabilität des Melanoms an sich schwierig, eine pauschale Behandlung zu finden, die allen Patienten gleichermaßen hilft. Außerdem entwickeln sich häufig Chemoresistenzen, auch wenn erst ein gutes Ansprechen auf die Therapie vorlag. Eine personalisierte Therapie stellt beim MM die einzig sinnvolle Behandlungsstrategie dar. Daher wäre es von großem Nutzen, Tests an Zellen aus dem Patienten vorzunehmen, um ihre Sensitivität oder auch Resistenz zu erkennen. Auch während einer Anti-Tumor-Therapie könnte mit solchen Untersuchungen gezeigt werden, ob die aktuelle Therapie noch

greift oder ob sich bereits Resistenzen entwickeln. Neben angezüchteten Zellen aus soliden Tumoren stellen ZMZ eine Möglichkeit dar, schon in einem frühen Stadium der Tumorerkrankung Zellen isolieren zu können. Zudem eignen sich ZMZ auch für das Monitoring während einer Therapie, zur Überprüfung der Wirksamkeit. Für Chemosensitivitätstestungen sind aber hohe Zellzahlen erforderlich. In der vorliegenden Arbeit konnte diesbezüglich ein Problem noch nicht vollständig behoben werden: die Expansion der sortierten Zellen. Noch ist unklar, ob dieses Problem an den Zellen an sich liegt – Stammzellen teilen sich sehr selten – oder ob es an den noch nicht optimalen Zellkulturbedingungen liegt. Für eine zeitnahe Expansion der Zellen nach der Sortierung wäre ein wachstumsanregender Stimulus nötig. Im Hinblick auf eine personalisierte Therapie muss also ein Verfahren entwickelt werden, das eine schnelle Expansion der aus dem Patientenblut gewonnen Zellen gewährleistet.

In der vorliegenden Arbeit wurden Wirkstoffe aus verschiedenen Gruppen getestet. Tyrosinkinaseinhibitoren (TKIs) blockieren gezielt an molekularen Strukturen bestimmte Signalwege. Die hier untersuchten TKIs lassen sich in drei Gruppen unterteilen: die Multikinaseinhibitoren Axitinib, Cediranib, Motesanib, Pazopanib, Sorafenib und Sunitinib, die Bcr-Abl-Inhibitoren Dasatinib, Imatinib und Nilotinib, sowie die m-Tor-Inhibitoren Everolimus und Temsirolimus. Außerdem wurden die Alkylantien Carboplatin und Temozolomid und der Mitosehemmer Paclitaxel untersucht. Damit die Tumorzellen noch möglichst unverändert vorliegen wurden auch hier Melanomzellen aus Kurzzeitkulturen chirurgisch entfernter Melanome verwendet. Das Ziel ist es, vorherzusagen, auf welches Chemotherapeutikum der Tumor in vivo reagiert, was bei einem so heterogen auftretenden Tumor wie dem MM große Vorteile bietet. Dem Patienten werden unwirksame Therapien erspart, auch die Nebenwirkungen sollen durch Kombinationstherapien so gering wie möglich und damit der Lebensstandard so hoch wie möglich gehalten werden. Außerdem können die oft immensen Kosten einer Krebstherapie so gering wie möglich gehalten werden, indem man gleich gezielt und wirksam therapiert. In den durchgeführten Tests wurden das Überleben, die Proliferationsfähigkeit, die Mitochondrienaktivität sowie die Fähigkeit zur Glukoseaufnahme unter der

jeweiligen chemotherapeutischen Behandlung untersucht.

#### 4.1. Langzeitassay: Überleben und Proliferation

Im Langzeitassay wurden das Überleben sowie die Proliferationsrate untersucht. In allen Linien zeigten Sorafenib, Paclitaxel sowie die Bcr-Abl-Inhibitoren Imatinib, Nilotinib und Dasatinib gute Wirksamkeit auf beide getesteten Parameter. Andere TKIs wie Cediranib, Motesanib und Pazopanib dagegen waren nur in einzelnen Fällen wirksam. Auch die mTor-Inhibitoren waren nur vereinzelt wirksam, Everolimus zeigte sich insgesamt wirkstärker als Temsirolimus. In den meisten Fällen wäre nach dem Langzeitassay eine Kombination aus einem TKI wie Sorafenib oder/und einem Bcr-Abl-Inhibitor mit Paclitaxel empfehlenswert. Paclitaxel wirkt zusätzlich radiosensibilisierend und könnte so die Zellen für eine Strahlentherapie empfänglicher machen. Somit könnte man zwei verschiedene Wirkstoffklassen sowie Bestrahlung einsetzen. Auffällig ist, dass in keiner der hier vorgestellten Linien eines der beiden getesteten Alkylantien (Carboplatin und Temozolomid) wirksam erschien. Dies könnte ein Hinweis sein, dass die Zelllinien DNA-Reparaturenzyme wie MGMT einsetzen, um die schädliche Wirkung der Alkylantien zu umgehen. Zu beachten ist auch, dass in dem hier verwendeten Assay nur die Tumorzellen untersucht wurden und keine anderen einflussnehmenden Faktoren. So wird mittlerweile vermutet, dass Dacarbazin sowie Platinderivate (wie Carboplatin oder auch Cisplatin) nicht nur direkt auf die Tumorzellen wirken. Vielmehr beeinflussen sie auch das Gleichgewicht zwischen Tumor und Immunsystem. Platinderivate z.B. reduzieren die Expression von PDL-1 (PDL-1 inhibiert die Proliferation von Immunzellen)<sup>156</sup>. DTIC kann sehr immunogene Mutationen auslösen<sup>157</sup>. In beiden Fällen kann das Immunsystem den Tumor dann besser bekämpfen.

Durch den Chemosensitivitätstest und die unterschiedlichen Reaktionen wird ein weiteres Mal klar, wie unterschiedlich jeder Tumor auf die einzelnen Medikamente reagiert (s. BoxPlots in Kapitel IV.3). Sicherlich besteht auch hier ein Zusammenhang zu der großen Heterogenität im malignen Melanom.

#### 4.2. Kurzzeitassay: Überleben, Mitochondrienaktivität, Glukoseaufnahmefähigkeit

Im Kurzzeitassay wurden ebenfalls das Überleben unter chemotherapeutischem Einfluss sowie die Mitochondrienaktivität und die Fähigkeit zur Glukoseaufnahme untersucht. Die beiden letztgenannten Parameter geben Aufschluss über den momentanen Energieumsatz der Zelle. Eine Erklärung für die z.T. erhöhte Mitochondrienaktivität sowie die z.T. gesteigerte Glukoseaufnahmefähigkeit der Melanomzellen gegenüber der unbehandelten Kontrolle stellt die Behandlung mit Chemotherapeutikum selbst dar. Einer der effektivsten Chemoresistenzmechanismen der Zelle ist es, die toxische Noxe wieder aus dem Zellinnern zu entfernen. Dies geschieht über Transportsysteme, v.a. ABC-Transporter, zu deren Betrieb wiederum Energie in Form von ATP benötigt wird<sup>64,67</sup>. Je aktiver die Zelle diese Pumpen betreibt, desto mehr Energieaufwand wird betrieben und desto mehr Glukose wird benötigt. Der Energiestoffwechsel läuft also auf Hochtouren, um die Zelle vor den Effekten des Chemotherapeutikums zu schützen.

Der Effekt der Energieumsatzsteigerung ließ sich bei allen Melanomzelllinien feststellen, jedoch bei unterschiedlichen Medikamen. In Linie ErMel10 z.B. bewirkten alle getesteten Medikamente einen erhöhten Energieumsatz im Glukosestoffwechsel, bei den anderen Linien hatten v.a. die TKIs sowie die Bcr-Abl-Inhibitoren diesen Effekt. Die Alkylantien sowie Paclitaxel konnten den Energieumsatz der Zellen am wirkungsvollsten heruntersetzen. Das Überleben der Zellen sowie die Mitochondrienaktivität wurden je nach Zelllinie unterschiedlich stark beeinflusst. Im Kurzzeitassay zeigten sich die Alkylantien und auch die mTor-Inhibitoren wirkungsvoller als im Langzeitassay. Die Effekte der Kinaseinhibitoren sowie von Paclitaxel waren unterschiedlich. Auch hier wird wieder die große Heterogenität der einzelnen Melanome deutlich. Umso wichtiger erscheint eine Chemosensitivitätstestung im Vorfeld des Therapiebeginns, um den Patienten die jeweils vielversprechendste Therapie zukommen zu lassen. Auch die Notwendigkeit von Kombinationen von Chemotherapeutika mit unterschiedlichen Wirkmechanismen wird im Kurzzeitassay aufgezeigt.

#### 4.3. Zusammenfassung der Chemosensitivitätstest-Resultate

Zusammenfassend ist beim malignen Melanom wirklich jeder Tumor einzigartig und reagiert völlig unterschiedlich auf Therapien. Als Anhaltspunkt für die zu testende Konzentration der Medikamente in der Zellkultur dienten die in der Literatur beschriebenen im Patientenserum nachgewiesenen Konzentrationen sowie selbst durchgeführte Tests mit unterschiedlichen Konzentrationen. Die Resultate dieser Arbeit decken sich mit den Ergebnissen anderer, dass bei einem Einsatz eines einzelnen Chemotherapeutikums eher mäßige Effektivität messbar ist und die Schwankungen zwischen den Zelllinien groß sind<sup>158,159</sup>. Tumorzellen können durch die Aktivierung alternativer Signalwege Chemoresistenzen entwickeln<sup>117</sup>. Andere Resistenzmechanismen sind der Einsatz von Transportern und Reparaturenzymen. Trotz vieler Studien konnte noch kein TKI gefunden werden, der als alleinige Therapie bestehen kann. Kombinationen verschiedener TKIs, die unterschiedliche Signalwege blockieren, werden nötig sein um erfolgreich therapieren zu können. Die Schwierigkeit liegt darin, herauszufinden, welche Wege man simultan blockieren muss, um eine zytotoxische Wirkung zu erzielen. Auch in der Literatur sind solche Kombinationsansätze bereits beschrieben<sup>117,120,158</sup>. Dabei ist auch noch zu bedenken ob es sinnvoll ist, die Zielmoleküle gleichzeitig anzugreifen oder ob eine sequenzielle Behandlung eine bessere Wirkung erzielt. Die Chemosensitivitätstestung kann helfen, individuelle Behandlungsstrategien zu entwickeln. Sicherlich sind die hier vorgestellten Assays nur ein Anfang – sowohl die Versuchsbedingungen sowie die Dosierungen der Medikamente müssen optimiert werden. Auch über die Nebenwirkungen kann ein Chemosensitivitätstest keine Auskunft geben. Außerdem sind klinische Studien notwendig, um Parameter wie progressionsfreies Überleben und Gesamtüberleben zu beurteilen. Unter der Leitung von Frau Prof. Selma Ugurel von der Universität Würzburg läuft derzeit eine Studie mit dem Titel „Prospectively randomized phase III study of an individualized sensitivity-directed combination chemotherapy versus DTIC as first-line treatment in stage IV metastatic melanoma“. Hier wird untersucht, ob eine individuelle Therapie nach Chemosensitivitätstestung gegenüber Chemotherapie mit DTIC vorteilhaft für die Patienten ist (NCT-Nr.

NCT00779714 (ClinicalTrials.gov) EudraCT-Nr. 2008-001686-28 (EU Clinical Trials Register). Zur Auswertung wird das Gesamtüberleben in einem Zeitraum von 4 Jahren herangezogen, sowie das objektive Ansprechen auf die Medikation.

## 5. Ausblick

### 5.1. Zirkulierende Melanomzellen

In anderen Krebsformen kann mittlerweile mithilfe der Anzahl an zirkulierenden Tumorzellen eine Prognose gestellt werden<sup>153</sup>. Im MM ist das noch nicht der Fall. In der vorliegenden Arbeit war mit 21 Zellsortierungen die Fallzahl zu gering, um statistisch zuverlässige Angaben zu erhalten. Die prognostische Aussagekraft der zirkulierenden Melanomzellen (ZMZ) hinsichtlich Rezidiv- und Metastasierungsrisiko sowie zur Überprüfung der Therapie nutzen zu können, würde sowohl Ärzten als auch Patienten helfen. Um statistisch auswertbare Daten zu generieren müssen weitere Zellsortierungen durchgeführt werden. Sinnvoll ist es, die ZMZ-Zahlen zu Beginn, während und nach einer Therapie zu ermitteln, und zu beobachten, wie sich die Melanomerkkrankung langfristig gesehen entwickelt. So könnte man eine Korrelation zwischen dem klinischen Stadium der Erkrankung sowie dem Ansprechen oder nicht-Ansprechen auf eine Therapie und den ZMZ-Zahlen herstellen. Zusätzlich wäre es von Vorteil neben MCSP und MCAM weitere Marker zu etablieren, die die ZMZ identifizieren und so eine möglichst vollständige Isolierung aller ZMZ zuverlässig gewährleisten zu können. Hinsichtlich der Kultivierung der sortierten Zellen müssen die Kulturbedingungen noch verbessert werden. Ein erster Ansatz in der vorliegenden Arbeit war die Kultivierung mit konditioniertem Tumorstromungsmedium, welches die Zellen aus Sort ErSo16 zur Proliferation anregte. Welche Stoffe/Stimulantien im Medium dieses Verhalten auslösten, ist unklar. Könnte man die anregenden Faktoren isolieren, könnte man aus den wenigen ZMZ schneller eine Vielzahl an Zellen für weitere Analysen generieren.

### 5.2. Therapie des malignen Melanoms

Eine in der Humanmedizin noch weiter zu untersuchende therapeutische



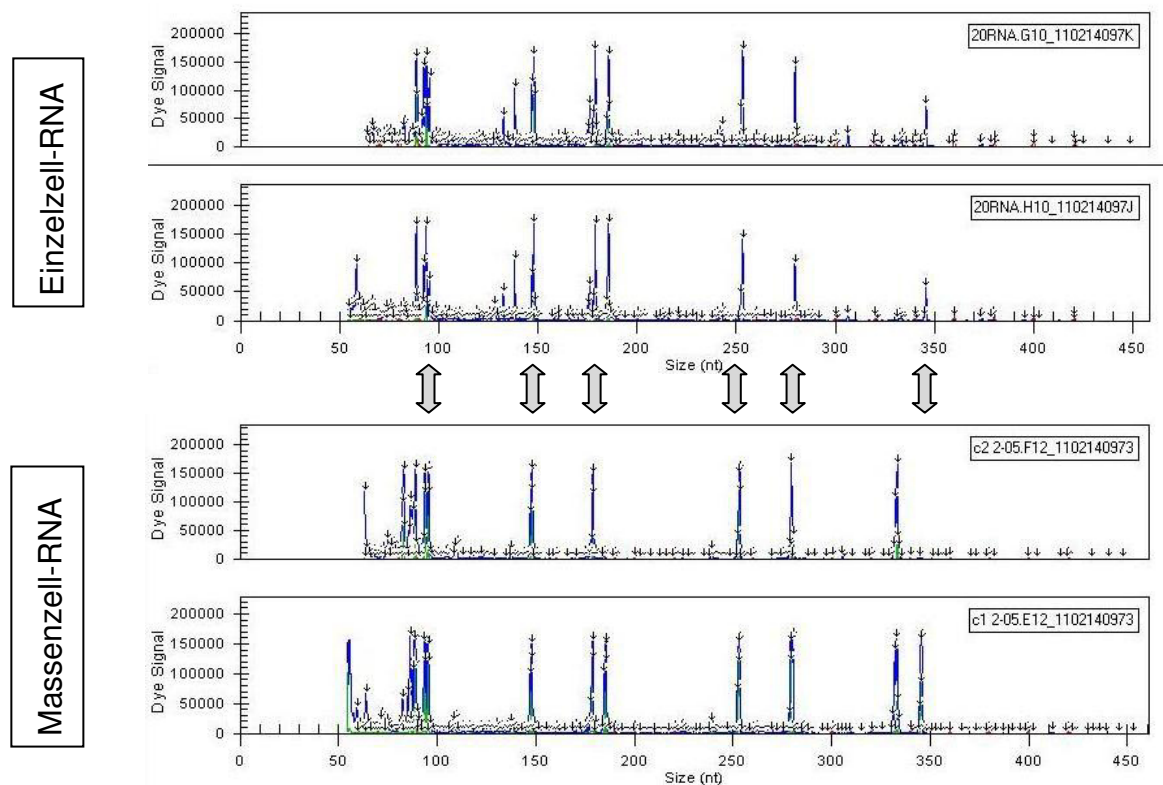
Möglichkeit ist die einer Tumorstabilisierung. Die in den USA zugelassene Vakzine zur Behandlung des caninen oralen Melanoms (Canine Melanoma Vaccine, DNA (ONCEPT<sup>TM</sup>)) beweist, dass eine Vakzinierung grundsätzlich funktioniert. Diese Vakzine wird therapeutisch eingesetzt, nicht prophylaktisch und zeigt bislang gute Erfolge<sup>23,28,29</sup>. Es handelt sich dabei um eine xenogene Impfung des Hundes mit humanem Tyrosinase-Antigen, welches zu einer Immunreaktion und Bekämpfung des Tumors führt. Tyrosinase stellt auch im humanen malignen Melanom ein Ziel für immuntherapeutische Verfahren dar<sup>46,47</sup>. Da Tyrosinase jedoch nicht in allen Melanomen exprimiert wird, wie die vorliegende Arbeit sowie Angaben aus der Literatur zeigen<sup>51,52</sup>, bleibt zu prüfen, wie effektiv dieser Ansatz ist. Auch MCSP wäre ein vielversprechender Ansatz, da seine Expression durchgängig auf allen untersuchten Zelllinien nachgewiesen wurde. Es wurden im Menschen bereits unterschiedliche Tumorstabilisierungen eingesetzt – bislang ohne durchschlagenden Erfolg. Anders als in der Tiermedizin wurde allerdings immer humanes Material eingesetzt. Ein Ansatz mit einem xenogenen Antigen wurde noch nicht untersucht. Zusätzlich könnte man eine Kombination mit monoklonalen Antikörpern wie z.B. Ipilimumab, welches CTLA-4 auf regulatorischen T-Zellen blockiert und damit die Immunantwort aufrecht erhält, versuchen. In Hinblick auf gemeinsame Forschung von Tier- und Humanmedizin könnte auch der selektive TKI Pazopanib von Interesse sein. Wie Kumar et al beschreiben, inhibiert Pazopanib VEGF-Aktivität mit vergleichbarem Potential nicht nur im Menschen, in der Maus sowie in der Ratte, sondern ebenfalls im Hund<sup>160</sup>.

### 5.3. Kooperation mit Advalytix: Einzelzellsortierung und Charakterisierung auf Einzelzelebene

Die schwierige und langwierige Kultivierung sortierter Zellen aus Patientenblut hebt die Bedeutung der Analyse von Zellen auf Einzelzelebene hervor. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit wurden in einer Kooperation mit der Firma Advalytix Einzelzellsortierungen zum Zweck der Einzelzellcharakterisierung durchgeführt. Die Kooperation wurde jedoch aufgrund der Firmenübernahme und eines Personalwechsels leider nicht zu Ende geführt, dennoch soll hier kurz darauf eingegangen werden. Die

Ergebnisse präsentieren auf beeindruckende Weise, was die Einzelzellsortierung an Möglichkeiten bietet. Ziel war es, zu zeigen dass die Einzelzellsortierung sowie -charakterisierung funktioniert und im Vergleich mit der Charakterisierung der Melanomzelllinien, für die große Mengen an Zellen verwendet wurden (Massenzellcharakterisierung), zusätzliche Daten liefert. Die Marker wurden wie auch die für die vorliegende durchflusszytometrische Charakterisierung aus verschiedenen Gruppen ausgewählt: Melanomspezifische Marker (Tyrosinase, MelanA, MAGE, gp100); Marker für Chemoresistenz (MDR1, ABCB5, ABCG2); MITF als Marker für die Melanozyten-Entwicklung; CD271 als Marker für Neutrophin-Rezeptoren; Notch1, CD166, Telomerase und PTEN als Marker für invasives, malignes Wachstum; HIF1 $\alpha$ , Oct3/4, Nanog und Sox2 als Stammzellmarker sowie CD133 und Nestin als Marker für Dedifferenzierung. Untersucht wurden die Zellen der kommerziellen Melanomzelllinie SKMel28. Es lassen sich mit dieser Einzelzell-PCR eine Vielzahl von Markern untersuchen, auch Marker, für die momentan keine Antikörper verfügbar sind. Nachteil gegenüber der durchflusszytometrischen Charakterisierung ist, dass die Zellen nach der PCR nicht mehr für weitere Analysen verwendet werden können. Mit dem ARIA Zellsorter wurden auf vorgefertigte Objektträger (Ampli Grid Slide) einzelne Zellen platziert. Die nächsten Schritte wurden von Advalytix durchgeführt. Die einzeln sortierten Zellen wurden im Vergleich mit einer größeren Menge der gleichen Zellen untersucht. Es wurde sowohl aus den Einzelzellen als auch aus der Zellmasse RNA extrahiert, mittels PCR amplifiziert und mittels kapillarer Elektrophorese untersucht. Insgesamt wurde die Expression von 20 ausgewählten Markern (s.o.) analysiert. Es konnten mit diesem Verfahren die Marker Tyrosinase, MelanA und MITF validiert werden. Sie können zirkulierende Melanomzellen zweifelsfrei identifizieren. Auch die Marker CD133 und HIF1 $\alpha$  wurden validiert. Beide weisen auf Stammzeleigenschaften hin. Dieses Verfahren zeigt, dass die Durchflusszytometrie zuverlässig einzelne Zellen isolieren und auf einem Objektträger platzieren kann. Die Einzelzell-PCR konnte beweisen, dass die Melanomzellen, die in diesem Fall sogar aus einer kommerziellen Linie stammten, untereinander sehr heterogen sind.

Abb. V.1 Ergebnisse der Einzelzellsortierung und Charakterisierung im Vergleich mit Massen-RNA



Die Ergebnisse verdeutlichen, wie wichtig die Analyse auf Einzelzelebene ist. Die Analyse einer größeren Menge an Zellen aus einem Tumor wie sie die Massenzellcharakterisierung darstellt ist immer ungenau. Eine Einzelzellcharakterisierung, ob mittels Durchflusszytometrie oder PCR, ist immer exakter als die Charakterisierung vieler Zellen, die phänotypisch eine so große Heterogenität wie das maligne Melanom aufweisen. Dieses Verfahren ermöglicht es, einzelne zirkulierende Zellen direkt aus Patientenblut ohne vorherige Kultivierung zu charakterisieren. Können die hier validierten Marker ebenfalls auf zirkulierenden Melanomzellen aus Patienten nachgewiesen werden, so wären diese Zellen mit Stammzeleigenschaften ausgestattet. Verfolgt man diese Methode weiter, wäre es möglich, mit der Sortierung einiger weniger Zellen zahlreiche Marker zu untersuchen, auch solche, für die noch keine Antikörper zur Verfügung stehen. Weiterhin kann diese Methode dazu dienen, die Heterogenität der einzelnen Tumorzellen zu bestätigen sowie genetische Besonderheiten zu entdecken. Die Etablierung der Einzelzell-Analyse kann so sicher viele Einblicke in die genetischen Besonderheiten der zirkulierenden Tumorzellen gewähren.

## VI. ZUSAMMENFASSUNG

Das maligne Melanom (MM) ist aufgrund seiner frühzeitigen Metastasierung ein schwer behandelbarer Tumor. Patienten erkranken auch Jahre nach erfolgreicher Therapie häufig an Metastasen. Tumorzellen, die sich vom Primärtumor lösen und mit Blut oder Lymphe in andere Körperregionen transportiert werden, können in speziellen Nischen Monate oder Jahre in einem Zustand der Keimruhe verbringen, bevor sie anfangen, Metastasen zu bilden. In der vorliegenden Arbeit wurden Melanomzelllinien, die aus chirurgisch entfernten Melanomen generiert wurden, charakterisiert. Dazu wurden Marker aus unterschiedlichen Bereichen (u.a. melanomspezifische Marker, Adhäsionsmoleküle, Stammzellenmarker) verwendet. Ziel war die Etablierung eines Markers oder einer Markerkombination, mit der man Melanomzellen zuverlässig gegenüber anderen Zellen abgrenzen kann. Die Expression der einzelnen Marker war sehr variabel, was die bereits in der Literatur beschriebene große Heterogenität des MM bestätigt. Mit der Markerkombination CD45/MCSP/MCAM wurde eine Markerkombination gefunden, die Melanomzellen identifizieren und von PBMCs unterscheiden kann. So wurde die Isolierung aus Patientenblut ermöglicht. Nach einer Anreicherung der zirkulierenden Melanomzellen mit dem CD45 Depletion Kit von RosetteSep aus Vollblut von Melanompatienten wurden am Aria Cell Sorter insgesamt 21 Zellsortierungen aus Patientenblut durchgeführt und die sortierten Zellen wurden in Kultur genommen. In einem Fall gelang mit konditioniertem Tumorstromungsmedium auch die Expansion isolierter zirkulierender Melanomzellen und deren Charakterisierung. Mithilfe der Durchflusszytometrie wurde in der vorliegenden Arbeit eine schnelle und benutzerfreundliche Methode zur Identifizierung und Isolierung zirkulierender Melanomzellen etabliert. Die Charakterisierung mit Stammzellmarkern, die in der Literatur als Marker für Melanomstammzellen mit erhöhtem tumorigenem Potential beschrieben wurden, zeigte in allen Melanomzelllinien eine kleine Subpopulation positiver Zellen und deutet daher auf das dynamische Modell der Stammzellentheorie hin. Desweiteren wurden an den Melanomzelllinien

---

Chemosensitivitätstestungen durchgeführt. Medikamente unterschiedlicher Wirkstoffklassen (Kinaseinhibitoren, Alkylantien, Mitosehemmer) wurden untersucht. Auch hier zeigten die Ergebnisse eine große Variabilität. Aufgrund der Heterogenität im MM sowie seiner hohen Chemoresistenz könnten diese Tests sowohl Ärzten als auch Patienten bei der Auswahl der richtigen Therapie helfen.

## VII. SUMMARY

Malignant Melanoma (MM) is a tumor which is very difficult to treat because of the early dissemination of tumor cells. Even years after a successful treatment many patients suffer of metastasis. Disseminated tumor cells travel via the blood stream or the lymphatic system through the body. They are able to find niches, in which they can rest for a long time in a dormant state. At some time, they wake up and begin to form new metastases. In the work presented here melanoma cell lines were generated from surgically removed tumors and were characterized with different markers (melanoma specific markers, adhesion molecules, stem cell markers) with the aim to establish a marker or a combination of markers to reliably identify melanoma cells. The expression profiles of the melanoma cell lines showed, as previously described, a great heterogeneity. Nevertheless, the combination of the markers CD45/MCSP/MCAM was found to be able to not only identify melanoma cells, but also to differentiate between melanoma cells and PBMCs. Thus it is possible to separate melanoma cells and PBMCs out of patients blood. After an enrichment of the circulating melanoma cells with the CD45 Depletion Kit of RosetteSep out of whole blood from melanoma patients 21 cell sortings were performed with the Aria cell sorter. The isolated melanoma cells were taken into cell culture. In one case the expansion of sorted cells was successfully established with the aid of conditioned tumor proliferation medium. In conclusion, a fast and user friendly method for identification and isolation for circulating melanoma cells via FACS was established. As in literature markers defining melanoma stem cells are described, a characterization with these markers showed a small population of a positive subpopulation and thus hints to the dynamic model of the stem cell theory. Additionally, chemosensitivity assays were performed with melanoma cell lines. Chemotherapeutics with different mechanisms of action were tested (kinase inhibitors, alkylating agents, mitotic inhibitor). As previously, the results showed a great heterogeneity. Because of the high chemoresistance in MM these tests could provide useful support for the

choice of therapy. Therapies that are not effective can be excluded because of the in vitro results. As chemoresistant mechanisms often develop during a therapy the effectiveness of the current therapy can be checked by the chemosensitivity tests. Individualized therapy is necessary because of the great heterogeneity and the chemoresistance in this kind of cancer.

---

**VIII. LITERATURVERZEICHNIS**

- 1 Garbe C In: Garbe C, Hauschild A, Volkenandt M, Schadendorf D, Stolz W, Kortmann RD, Kettelhack C, Frerich B, Keilholz U, Dummer R, Sebastian G, Tilgen W, Schuler G, Mackensen A, Kaufmann R. Interdisziplinäre Leitlinien zur Diagnostik und Behandlung von Hauttumoren. Thieme 2005; 23–55
- 2 Eine gemeinsame Veröffentlichung des Robert Koch-Instituts und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. Krebs in Deutschland 2005/2006 Häufigkeiten und Trends. 2010, 7. Ausgabe
- 3 Greene MH, Clark WHJ, Tucker MA, Kraemer KH, Elder DE, Fraser MC. High risk of malignant melanoma in melanoma-prone families with dysplastic nevi. Ann Intern Med 1985; 102: 458-465
- 4 Coyle, V.J., Garret L.D. Finding and treating oral melanoma, squamous cell carcinoma, and fibrosarcoma in dogs. Veterinary Medicine 2009
- 5 Vissiennon & Team, Leipzig. Melanom des Tieres: Klinik und Dignität. Informationsblatt 2006
- 6 [www.natural-dog-health-remedies.com/melanoma-in-dogs.html](http://www.natural-dog-health-remedies.com/melanoma-in-dogs.html), Januar 2012
- 7 [www.vetmed.vt.edu/research/ceco/melanoma.asp](http://www.vetmed.vt.edu/research/ceco/melanoma.asp), Januar 2012
- 8 Johnson PJ. Dermatologic Tumors (excluding sarcoids). Vet Clin North Am Equine Pract 1998; 14:643-658
- 9 Garbe C In: Garbe C, Dummer R, Kaufmann R, Tilgen W (eds) Epidemiologie des Hautkrebses. Dermatologische Onkologie. Springer 1997; 40-56
- 10 Kurzleitlinie der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft (DDG) und der Deutschen Krebsgesellschaft; AWMF-Leitlinien-Register Nr. 032/024 Entwicklungsstufe: 1; Erstellungsdatum: 12/1997; Letzte Überarbeitung: 09/2007
- 11 Hengge UR, Dummer R In Kooperation mit dem dt Ärzteverlag. Malignes Melanom: Standards und Innovationen in Diagnostik und Therapie. 2006
- 12 Wiecker TS, Luther H, Buettner P, Bauer J, Garbe C. Moderate sun exposure and nevus counts in parents are associated with development of melanocytic nevi in childhood. Cancer 2003; 97: 628-638
- 13 Animal Cancer Center, Colorado State University Veterinary Teaching Hospital, Infoblatt, 2011
- 14 MacGillivray KC, Sweeney RW, del Piero F. Metastatic Melanoma in Horses. J Vet Intern Med 2002; 16:452-456



- 15 Garbe C, Büttner P, Bertz J, Burg G, d'Hoedt B, Drepper H, Guggenmoos H, Lechner W, Lippold A, Orfanos CE, et al. Primary cutaneous melanoma. Identification of prognostic groups and estimation of individual prognosis for 5093 patients. *Cancer* 1995a; 75: 2484-2491
- 16 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. Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. *J Clin Oncol* 2001b; 19: 3622-3634
- 17 Garbe C. A rational approach to the follow-up of melanoma patients. Recent Results. *Cancer Res* 2002; 160: 205-215
- 18 Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG, Fleming ID, Gershenwald JE, Houghton AJ, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MF, Morton DL, Reintgen DS, Ross MI, Sober A, Thompson JA, Thompson JF. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 2001a; 19: 3635-3648
- 19 Clark W.H. Jr., From, Bernardino E. A. et al. The Histogenesis and Biologic Behavior of Primary Human Malignant Melanomas of the Skin. *Cancer Research* 1969; 29: S. 705-727
- 20 Garbe C, Büttner P, Bertz J, Burg G, d'Hoedt B, Drepper H, Guggenmoos -Holzmann I, Lechner W, Lippold A, Orfanos CE, Peters A, Rassner G, Stadler R, Stroebel W. Primary cutaneous melanoma: Prognostic classification of anatomic location. *Cancer* 1995b; 75: 2492-2498
- 21 Vissiennon & Team, Leipzig. Ki-67 - Ein neuer Malignitätsfaktor bei Neoplasien der Tiere. Informationsblatt 2005
- 22 Berman P.J., Wolchok J.D. Of Mice and Men (and Dogs): development of a xenogeneic DNA vaccine for canine oral malignant melanoma. *Cancer Therapy* 2008; 6: 817-826
- 23 Bergman PF, Camps-Palau MA, McKnight JA et al. Development of a xenogeneic DNA vaccine program for canine malignant melanoma at the Animal Medical Center. *Vaccine* 2006; 24: 4582-5
- 24 Rassnick KM, Ruslander DM, Cotter SM et al. Use of Carboplatin for treatment of dogs with malignant melanoma: 27 cases (1989-2000). *J Am Vet Assoc* 2001; 218:1444-8
- 25 Murphey S., Hayes A.M., Blackwood L., Maglennon G., Pattinson H., Sparkes A.H. Oral malignant melanoma: the effect of coarse fractionation radiotherapy alone or with adjuvant carboplatin therapy. *Veterinary and Comparative Oncology* 2005; 3:222-9

- 26 Moore AS, Theilen GH, Newell AD et al. Preclinical Study of sequential tumor necrosis factor and Interleukin-2 in the treatment of spontaneous canine neoplasms. *Cancer Res.* 1991; 51:233-8
- 27 Modiano JF, Ritt MG, Wojcieszyn J. The molecular basis of canine melanoma: pathogenesis and trends in diagnosis and therapy. *J Vet Intern Med* 1999; 13:163-74
- 28 Alexander AN, Huelsmeyer MK, Mitzey A et al. Development of an allogeneic whole cell tumor vaccine expressing xenogeneic gp100 and its implementation in a phase II clinical trial in canine patients with malignant melanoma. *Cancer Immunol Immunother* 2006; 55:433-42
- 29 Bergman PJ, McKnight J, Novosad A. Long-term survival of dogs with advanced malignant melanoma after DNA vaccination with xenogeneic human tyrosinase: a phase I trial. *Clin Cancer Res* 2003; 9:1284-90
- 30 Campoli M.R., Chien-Chung C., Kageshita T., Wang X., McCarthy J.B., Ferrone S. Human High Molecular Weight-Melanoma-Associated Antigen (HMW-MAA): A Melanoma Cell Surface Chondroitin Sulfate Proteoglycan (MCSP) with Biological and Clinical Significance. *Crit Rev in Immunol* 2004; 24:267-96
- 31 Yang J, Price M.A., Neudauer C.L., Wilson C., Ferrone S., Xia H., Iida J., Simpson M.A., McCarthy J.B. Melanoma chondroitin sulfate proteoglycan enhances FAK and ERK activation by distinct mechanisms. *J Cell Biol* 2004; 165:881-91
- 32 Eisenmann K.M., McCarthy J.B., Simpson M.A., Keely P.J., Guan J.-L., Tachibana K., Lim L., Manser E., Furch L.T., Iida J. Melanoma chondroitin sulphate proteoglycan regulates cell spreading through Cdc42, Ack-1 and p130<sup>Cas</sup>. *Nature Cell Biology* 1999; 1:507-13
- 33 Iida J., Meijne, A.M., Knutson J.R., Furcht L.T., McCarthy J.B. Cell surface chondroitin sulfate proteoglycans in tumor cell adhesion, motility and invasion. *Cancer Biol* 1996; 7:155-62
- 34 Iida J, Pei D, Kang T, Simpson MA, Herlyn M, Furcht LT, and McCarthy JB. Melanoma Chondroitin Sulfate Proteoglycan Regulates Matrix Metallo-proteinase - Dependent Human Melanoma Invasion into Type I Collagen. *J Biol Chem* 2001; 276:18786-94
- 35 McGary E., Lev D.C., Bar-Eli M. Cellular Adhesion Pathways and Metastatic Potential of Human Melanoma. *Cancer Biol Ther* 2002; 1:459-65
- 36 Karlen S, Braathen LR. Regulation of the Melanoma Cell Adhesion Molecule Gene in Melanoma: Modulation of mRNA Synthesis by Cyclic Adenosine Monophosphate, Phorbol Ester, and Stem Cell Factor/c-Kit Signaling. *J Invest Dermatol.* 1999; 113:711-9
- 37 Lehmann JM, Holzmann B, Breitbart EW, Schmiegelow P, Riethmüller

- G, Johnson JP. Discrimination between benign and malignant cells of melanocytic lineage by two novel antigens, a glycoprotein with a molecular weight of 113,000 and a protein with a molecular weight of 76,000. *Cancer Res* 1987; 47:841-5
- 38 Pickl WF, Majdic O, Fischer GF, Petzelbauer P, Fae I, Waclavicek M, Stöckl JSC, Vidicki T, Aschauer H, Johnson JP, Knapp W. MUC18/MCAM: an activation associated surface molecule of human T lymphocytes. *J Immunol* 1997; 158:2107-15
- 39 Bardin N, Frances V, Lesaulle G, Horschowski N, George F, Sampol J. Identification of the S-Endo 1 endothelial associated antigen. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 218:210-6
- 40 Shih IM, Elder DE, Speicher D, Johnson JP, and Herlyn M, Isolation and Functional Characterization of the A32 Melanoma-associated Antigen. *Cancer Res* 1994; 54: 2514-2520
- 41 Xie S, Luca M, Huang S, Gutman M, Reich R, Johnson JP, and Bar-Eli M. Expression of MCAM/MUC18 by Human Melanoma Cells Leads to Increased Tumor Growth and Metastasis. *Cancer Res* 1997; 57:2295-2303
- 42 Coulie PG, Brichard V, Van Pel A, Wolfel T, Schneider J, Traversari C, Mattei S, De Plaen E, Lurquin C, Szikora JP, Renauld JC, Boon T. A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J Exp Med* 1994; 180(1):35-42.
- 43 Kawakami Y, Eliyahu S, Delgado CH, Robbins PF, Rivoltini L, Topalian SL, Miki T, Rosenberg SA. Cloning of the gene coding for a shared human melanoma antigen recognized by autologous T cells infiltrating into tumor. *Proc Natl Acad Sci* 1994, USA; 91(9):3515-9
- 44 Curry BJ, Myers K, Hersey P. MART-1 Is Expressed Less Frequently on Circulating Melanoma Cells in Patients Who Develop Distant Compared With Locoregional Metastases. *J Clin Oncol*, 1999, 17:2562-2571 by American Society of Clinical Oncology
- 45 Chen et al. Immunophenotyping of melanomas for tyrosinase: Implications for vaccine development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1995, USA; Vol. 92, pp. 8125-8129
- 46 Brichard, V.A., Van Pel A, Wolfel T, Wolfel C, De Plaen E, Lethe B, Coulie P, Boon T. The tyrosinase gene encodes for an antigen recognized by autologous cytotoxic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J. Exp. Med* 1993; 178:489-495.
- 47 Robbins PF, El-Gamil M, Kawakami Y, Rosenberg SA. Recognition of Tyrosinase by Tumor-infiltrating Lymphocytes from a Patient Responding to Immunotherapy. *Cancer Research* 1994; 54(12):3124-6

- 
- 48 Palmieri G, Ascierto PA, Satriano SM, Daponte A, Castello G. Polymerase Chain Reaction-Based Detection of Circulating Melanoma Cells as an Effective Marker of Tumor progression. *Journal of Clinical Oncology* 1999; 17(1):304-11
- 49 Osella-Abate S, Savoia P, Quaglino P, Fierro MT, Leporati C, Ortoncelli M, and Bernengo MG Tyrosinase expression in the peripheral blood of stage III melanoma patients is associated with a poor prognosis: a clinical follow-up study of 110 patients. *British Journal of Cancer* 2003; 89:1457– 462
- 50 Wascher RA, Morton DL, Kuo C, Elashoff RM, Wang H-J, Gerami M, and Hoon DSB. Molecular Tumor Markers in the Blood: Early Prediction of Disease Outcome in Melanoma Patients Treated With a Melanoma Vaccine. *Journal of Clinical Oncology* 2003; 21(13):2558-63
- 51 Reinke S, Königer P, Herberth G, Audring H, Wang H, Ma J, Guo Y, Sterry W, Trefzer U. Differential expression of MART-1, tyrosinase, and SM5-1 in primary and metastatic melanoma. *Am J Dermatopathol.* 2005 Oct;27(5):401-6.
- 52 Farthmann B, Eberle J, Krasagakis K, Gstöttner M, Wang N, Bisson S, Orfanos CE. RT-PCR for Tyrosinase-mRNA-positive Cells in Peripheral Blood: Evaluation Strategy and Correlation with Known Prognostic Markers in 123 Melanoma Patients. *Journal of Investigative Dermatology* 1998; 110(3):263-7
- 53 Johnson JP, Stade BG, Holzmann B, Schwäble W, Riethmüller G. De novo expression of intercellular-adhesion molecule 1 in melanoma correlates with increased risk of metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1989 USA; Vol. 86, pp. 641-644
- 54 Johnson JP. Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma. *Cancer and Metastasis Reviews* 1999; 18: 345–357
- 55 Holzmann, B., Brocker, E. B., Lehmann, J. M., Ruiter, D. J., Sorg, C., Riethmuller, G. & Johnson, J. P. Tumor progression in human malignant melanoma: Five stages defined by their antigenic phenotypes. *Int. J. Cancer* 1987; 39:466-471.
- 56 Aeed PA, Nakajima M, Welch DR. The role of polymorphonuclear leukocytes (PMN) on the growth and metastatic potential of 13762NF mammary adenocarcinoma cells. *Int J Cancer* 1988; 42: 748–759
- 57 Lehmann JM, Riethmuller G, Johnson JP. MUC18, a marker of tumor progression in human melanoma, shows sequence similarity to the neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily.

---

Proc Natl Acad Sci ,1989, USA 86:9891–9895

- 58 Degen WG, Van Kempen LC, Gijzen EG, Van Groningen JJ, Van Kooyk Y, Bloemers HP, Swart GW. MEMD, a new cell adhesion molecule in metastasizing human melanoma cell lines, is identical to ALCAM (activated leukocyte cell adhesion molecule). *Am J Pathol* 1998;152:805–813
- 59 Van Kempen LCLT, Van den Oord JJ, Van Muijen GNP, Weidle UH, Bloemers HPJ, Swart GWM. Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule/CD166, a Marker of Tumor Progression in Primary Malignant Melanoma of the Skin. *American Journal of Pathology* 2000; 156(3):769-74
- 60 Lunter PC, Van Kilsdonk JWJ, Van Beek H, Cornelissen IMHA, Bergers M, Willems PHGM, Van Muijen GNP, Swart GWM. Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule (ALCAM/CD166/MEMD), a Novel Actor in Invasive Growth, Controls Matrix Metalloproteinase Activity. *Cancer Res* 2005; 65(19):8801-8
- 61 Cavallaro U. N-cadherin as an invasion promoter: a novel target for antitumor therapy? *Curr Opin Investig Drugs*. 2004; (12):1274-8
- 62 Hsu MY, Wheelock MJ, Johnson KR, Herlyn M. Shifts in cadherin profiles between human normal melanocytes and melanomas. *Journal of Investigative Dermatology* 1996; 1(2):188-94
- 63 Li G, Satyamoorthy K, Herlyn M. N-Cadherin-mediated Intercellular Interactions Promote Survival and Migration of Melanoma Cells. *Cancer Res*. 2001; 61(9):3819-25
- 64 Robey RW, Polgar O, Deeken J, To KW, Bates SE. ABCG2: determining its relevance in clinical drug resistance. *Cancer Metastasis Rev*. 2007; 26(1):39-57
- 65 Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC. Isolation and Functional Properties of Murine Hematopoietic Stem Cells that are replicating In Vivo. *J. Exp. Med*. 1996; 183(4):1797-806
- 66 Monzania E, Facchetti F, Galmozzi E, Corsini E, Benetti A, Cavazzini C, Gritti A, Piccinini A, Porro D, Santinami M, Invernici G, Parati E, Alessandri G, La Porta CAM. Melanoma contains CD133 and ABCG2 positive cells with enhanced tumorigenic potential. *European Journal of Cancer* 2007; 43:935–946
- 67 Gottesman MM, Pastan I. Biochemistry of Multidrug Resistance Mediated by the Multidrug Transporter. *Annual Review of Biochemistry* 1993; 62:385-427
- 68 Bröcker EB, Suter L, Sorg C. HLA-DR Antigen Expression in Primary

- Melanomas of the Skin. *Journal of Investigative Dermatology* 1984; 82(3):244-7
- 69 Donovan AJ and Koretzky GA. CD45 and the Immune Response. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1993; 4:976-985)
- 70 Jones DL, Wagers AJ. No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nature reviews Molecular cell biology* 2008; 9(1):11-21
- 71 Reya T., Morrison S.J., Clarke M.F., Weissmann I.L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001; 414(6859):105-11
- 72 Fabian A, Barok M, Vereb G, Szöllosi J. Die Hard: Are Cancer Stem Cells the Bruce Willises of Tumor Biology? *ISAC: Cytometry Part A*, 2009; 75(1):67-74
- 73 Zabierowski S.E., Herlyn M. Melanoma Stem Cells: The Dark Seed of Melanoma. *Journal of Clinical Oncology* 2008; 26(17):2890-4
- 74 Quintana E, Shackleton M, Foster HR, Fullen DR, Sabel MS, Johnson TM, Morrison SJ. Phenotypic Heterogeneity among Tumorigenic Melanoma Cells from Patients that Is Reversible and Not Hierarchically Organized. *Cancer Cell* 2010; 18: 510-523
- 75 Roesch A, Fukunaga-Kalabis M, Schmidt EC, Zabierowski SE, Brafford PA, Vultur A, Basu D, Gimotty P, Vogt T, Herlyn M. A Temporarily Distinct Subpopulation of Slow-Cycling Melanoma Cells Is Required for Continuous Tumor Growth. *Cell* 2010; 141(4):583-94
- 76 Steeg PS. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nat. Med* 2006; 12(8):895-904
- 77 Luzzi KJ, MacDonald IC, Schmidt EE, Kerkvliet N, Morris VL, Chambers AF, Groom AC. Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am. J. Pathol.* 1998; 153:865–873
- 78 Bossolasco P, Ricci C, Farina G, Soligo D, Pedretti D, Scanni A, Deliliers GL. Detection of micrometastatic cells in breast cancer by RT-PCR for the mammaglobin gene. *Cancer Detection and Prevention* 2002, 26(1):60–63
- 79 Iakovlev VV, Goswami RS, Vecchiarelli J, Arneson NCR, Done S J. Quantitative detection of circulating epithelial cells by Q-RT-PCR. *Breast Cancer Research and Treatment* 2008; 107(1):145–154
- 80 Xenidis N, Perraki M, Kafousi M, et al. Predictive and prognostic value of peripheral blood cytokeratin-19 mRNApositive cells detected by real-time polymerase chain reaction in node-negative breast cancer patients. *Journal of Clinical Oncology* 2006; 24(23):3756–3762

- 
- 81 Van Kempen LCLT, Meier F, Egeblad M, Kersten-Niessen MJF, Garbe C, Weidle UH, Van Muijen GNP, Herlyn M, Bloemers HPJ, Swart GWM. Truncation of Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule: A Gateway to Melanoma Metastasis. *J Invest Dermatol* 2004; 122:1293–1301
- 82 Albelda SM, Mette SA, Elder DE, Stewart R, Damjanovich L, Herlyn M, Buck CA. Integrin distribution in malignant melanoma: association of the beta 3 subunit with tumor progression. *Cancer Res.* 1990; 50, 6757-6764.
- 83 Hsu MY, Shih DT, Meier FE, Van Belle P, Hsu JY, Elder DE, Buck CA, Herlyn M. Adenoviral gene transfer of beta3 integrin subunit induces conversion from radial to vertical growth phase in primary human melanoma. *Am. J. Pathol.* 1998; 153:1435-1442
- 84 Hsu MY, Meier F, Herlyn M. Melanoma development and progression: a conspiracy between tumor and host. *Differentiation* 2002; 70:522-536
- 85 Trumpp A, Essers M, Wilson A. Awakening dormant haematopoietic stem cells. *Nat Rev Immunol* 2001; 10(3):201-9
- 86 Alison MR, Islam S, Wright NA. Stem cells in cancer: instigators and propagators? *J Cell Sci* 2010; 123(Pt 14):2357-68
- 87 Quintana E, Shackleton M, Sabel MS, Fullen DR, Johnson TM, Morrison SJ. Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature* 2008; 456(7222):593-8
- 88 Schatton T, Murphy GF, Frank NY, Kazuhiro Y, Waaga-Gasser AM, Gasser M, Zhan Q, Jordan S, Duncan LM, Weishaupt C, et al. Identification of cells initiating human melanomas. *Nature* 2008; 451(7176):345-9
- 89 Fang D, Nguyen TK, Leishear K, Finko R, Kulp AN, Hotz S, Van Belle PA, Xu X, Elder DE, Herlyn M. A Tumorigenic Subpopulation with Stem Cell Properties in Melanomas. *Cancer Res* 2005; 65(20):9328-37
- 90 Klein WM, Wu Bp, Zhao S, Wu H, Klein-Szanto AJP, Tahan SR. Increased expression of stem cell markers in malignant melanoma. *Modern Pathology* 2007; 20: 102–107
- 91 Qiu FH, Ray P, Brown K, Barker PE, Jhanwar S, Ruddle FH, Besmer P. Primary structure of c-kit: relationship with the CSF-1/PDGF receptor kinase family--oncogenic activation of v-kit involves deletion of extracellular domain and C terminus. *EMBO J.* 1988; 7:1003-1011
- 92 Yarden Y, Kuang WJ, Yang-Feng T, Coussens L, Munemitsu S, Dull

- TJ, Chen E, Schlessinger J, Francke U, Ullrich A. Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *EMBO J.* 1987; 6:3341-3351.
- 93 Curtin JA, Busam K, Pinkel D, Bastian BC. Somatic Activation of KIT in Distinct Subtypes of Melanoma. *Journal of Clinical Oncology* 2006; 24(26):4340-6
- 94 Grichnik JM. Kit and Melanocyte Migration. *Journal of Investigative Dermatology* 2006; 126(5):945-7
- 95 Huang S, Luca M, Gutman M, McConkey DJ, Langley KE, Lyman SD, Bar-Eli M. Enforced c-KIT expression renders highly metastatic human melanoma cells susceptible to stem cell factor-induced apoptosis and inhibits their tumorigenic and metastatic potential. *Oncogene* 1996; 13(11):2339-47
- 96 Ohashi A, Funasaka Y, Ueda M, Ichihashi M. c-KIT receptor expression in cutaneous malignant melanoma and benign melanotic naevi. *Melanoma Res.* 1996a; 6:25-30
- 97 Lassam N. and Bickford S. Loss of c-kit expression in cultured melanoma cells. *Oncogene* 1992; 7: 51-56.
- 98 Natali PG, Nicotra MR, Winkler AB, Cavaliere R, Bigotti A, Ullrich A. Progression of human cutaneous melanoma is associated with loss of expression of c-kit proto-oncogene receptor. *Int. J. Cancer* 1992; 52:197-201.
- 99 Zakut R, Perlis R, Eliyahu S, Yarden Y, Givol D, Lyman SD, Halaban R. KIT ligand (mast cell growth factor) inhibits the growth of KIT-expressing melanoma cells. *Oncogene* 1993a; 8:2221-2229.
- 100 Hodi FS, Friedlander P, Corless CL, Heinrich MC, MacRae S, Kruse A, Jagannathan J, Van den Abbeele AD, Velazquez EF, Demetri G, Fischer DE. Major Response to Imatinib Mesylate in KIT-Mutated Melanoma. *Journal of Clinical Oncology* 2008; 26(12):2046-51
- 101 Horn PA, Tesch H, Staib P, Kube D, Diehl V, Voliotis D. Expression of AC133, a novel hematopoietic precursor antigen, on acute myeloid leukemia cells. *Blood* 1999; 93(4):1435-37
- 102 Corbeil D, Röper K, Hellwig A, Tavian M, Miraglia S, Watt S, Simmons P, Peault B, Buck D, Huttner W. The human AC133 hematopoietic stem cell antigen is also expressed in epithelial cells and targeted to plasma membrane protrusions. *J Biol Chem* 2000; 275(8):5512-20
- 103 Mizrak D, Brittan M, Alison MR. CD133: Molecule of the moment. *J Pathol* 2008; 214(1):3-9
- 104 Shmelkov S, St Clair R, Lyden D, Rafii S. AC133/CD133/Prominin-1. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37(4):715-9



- 
- 105 Sanai N, Alvarez-Buylla A, Berger MS. Neural stem cells and the origin of gliomas. *N Engl J Med* 2005; 353(8):811–822
  - 106 Hemmati HD, Nakano I, Lazareff JA, Masterman-Smith M, Geschwind DH, Bronner-Fraser M, Kornblum HI. Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc Natl Acad Sci* 2003, USA 100(25):15178–15183.
  - 107 Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, De Vitis S, Fiocco R, Foroni C, Dimeco F, Vescovi A. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res* 2004; 64(19):7011–7021
  - 108 Chesa PG, Rettig WJ, Thomson TM, Old LJ, Melamed MR. Immunohistochemical analysis of nerve growth factor receptor expression in normal and malignant human tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 1988; 36:383–389
  - 109 Pietra G, Manzani C, Vitale M, Balsamo M, Ognio E, Boitano M, Queirolo P, Moretta L, Mingari MC. Natural killer cells kill human melanoma cells with characteristics of cancer stem cells *Int. Immunol.* 2009; 21:793–801
  - 110 Boiko AD, Razorenova OV, Van de Rijn M, Swetter SM, Johnson DL, Ly DP, Butler PD, Yang GP, Joshua B, Kaplan MJ, Longaker MT, Weissman IL. Human melanoma-initiating cells express neural crest nerve growth factor receptor CD271. *Nature* 2010; 466(7302):133-7
  - 111 Liu Z-J, Xiao M, Balint K, Smalley KSM, Brafford P, Qiu R, Pinnix CC, Li X, Herlyn M. Notch 1 Signaling Promotes Primary Melanoma Progression by Activating Mitogen-Aktivated Protein Kinase/Phosphatidylinositol 3-Kinase-Akt Pathways and Up-regulating N-Cadherin Expression *Cancer Res.* 2006; 66(8):4182-90
  - 112 Chelsea Camille Pinnix. Notch1 activation confers transforming properties to primary human melanocytes and promotes human melanoma progression. Dissertation, University of Pennsylvania, 2006
  - 113 Bedogni B, Warneke JA, Nickoloff BJ, Giaccia AJ, and Powell MB. Notch1 is an effector of Akt and hypoxia in melanoma development. *Journal of Clinical Investigation* 2008; 118(11): 3660–3670
  - 114 Hoek K, Rimm DL, Williams KR, et al. Expression profiling reveals novel pathways in the transformation of melanocytes to melanomas. *Cancer Res* 2004; 64:5270–82.
  - 115 Alison MR, Guppy NJ, Lim SML, Nicholson LJ. Finding cancer stem cells: are aldehyde dehydrogenases fit for purpose? *Journal of Pathology* 2010; 222(4):335-44
  - 116 Ginestier C, Hur M.H., Charafe-Jauffret E, Monvielle F, Dutcher J, et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary

- stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell* 2007; 1(5):555-67
- 117 Smalley KSM, Flaherty KT. Integrating BRAF/MEK inhibitors into combination therapy for melanoma. *British Journal of Cancer* 2009; 100(3):431-5
- 118 Röckmann H, Schadendorf D. Drug Resistance in Human Melanoma: Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *Onkologie* 2003; 26(6):581-7
- 119 Seger R, Krebs EC. The MAPK Signaling Cascade. *Faseb J* 1995; 9(9):726-35
- 120 Smalley KSM, Haass NK, Brafford PA, Lioni M, Flaherty KT, Herlyn M. Multiple signaling pathways must be targeted to overcome drug resistance in cell lines derived from melanoma metastasis. *Mol Cancer Ther* 2006; 5(5):1136-44
- 121 Bjornsti MA, Houghton PJ. The mTor Pathway: a Target for Cancer Therapy. *Nat Rev Cancer* 2004; 4:335-348
- 122 Samuels Y, Ericson K. Oncogenic PI3K and its Role in Cancer. *Curr Opin Oncol.* 2006; 18(1):77-82
- 123 Greil R, Micksche M. Arzneimittelprofil Sorafenib. Medizin Medien Austria GmbH, 2006
- 124 Wilhelm SM, Carter C, Tang L. BAY 43-9006 Exhibits Broad Spectrum Oral Antitumor Activity and Targets the RAF/MEK/ERK Pathway and Receptor Tyrosine Kinases Involved in Tumor Progression and Angiogenesis. *Cancer Res.* 2004; 64, 7099–7109
- 125 Egberts F, Kähler KC, Livingstone E, Hauschild A. Metastatic Melanoma: Scientific Rationale for Sorafenib Treatment and Clinical Results. *Onkologie* 2008; 31:398–403
- 126 Schmidinger M, Loidl W. Arzneimittelprofil Sunitinib. Medizin Medien Austria GmbH, 2007
- 127 Zündorf I, Dingermann T. Angiogenese-Inhibitoren der Zukunft. *Pharm. Unserer Zeit* 2007; 36(6):452-61
- 128 Pleyer L, Greil R. Arzneimittelprofil Dasatinib. Medizin Medien Austria GmbH, 2007
- 129 Redondo P, Lloret P, Andreu EJ, And Inoges S. Imatinib Mesylate in Cutaneous Melanoma. *Journal of Investigative Dermatology* 2004; 123:1208–1209
- 130 McGary EC, Onn A, Mills L et al. Imatinib mesylate inhibits platelet-

- derived growth factor receptor phosphorylation of melanoma cells but does not affect tumorigenicity in vivo. *J Invest Dermatol* 2004; 122:400–405
- 131 Ugurel S, Hildenbrand R, Zimpfer A, La Rosée P, Paschka P, Sucker A, Keikavoussi P, Becker JC, Rittgen W, Hochhaus A, Schadendorf D. Lack of clinical efficacy of imatinib in metastatic melanoma. *British Journal of Cancer* 2005; 92(8):1398-405
- 132 European public assessment report (EPAR) for Glivec. EMEA, 2009
- 133 Le Coutre P, Petereit C, Peters HD. Arzneistoffprofil: Nilotinib. *Onkologe* 2008, 14:940–950
- 134 Rumpold H, Gastl G, Wolf D. Arzneimittelprofil Nilotinib. Medizin Medien Austria GmbH, 2011
- 135 O'Hare T, Walters DK, Stoffregen EP et al. In vitro activity of Bcr/Abl inhibitors AMN107 and BMS-354825 against clinically relevant imatinib-resistant Abl kinase domain mutants. *Cancer Res* 2005; 65:4500–4505
- 136 Tokarski JS, Newitt JA, Chang CY et al. The structure of Dasatinib (BMS-354825) bound to activated ABL kinase domain elucidates its inhibitory activity against imatinib-resistant ABL mutants. *Cancer Res* 2006; 66:5790–5797
- 137 Johnson FM, Saigal B, Talpaz M et al. Dasatinib (BMS-354825) tyrosine kinase inhibitor suppresses invasion and induces cell cycle arrest and apoptosis of head and neck squamous cell carcinoma and non-small cell lung cancer cells. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 6924–6932
- 138 Antonescu CR, Busam KJ, Francone TD et al. L576P KIT mutation in anal melanomas correlates with KIT protein expression and is sensitive to specific kinase inhibition. *Int J Cancer* 2007; 121:257-264
- 139 Perez M, Migliaccio S, Taranta A et al. Melanoma cells stimulate osteoclastogenesis, c-Src expression and osteoblast cytokines. *Eur J Cancer* 2001; 37:629–640
- 140 Atkins MB, Yasothan U & Kirkpatrick P. Everolimus. *Nature Reviews Drug Discovery* 2009; 8:535-536
- 141 Rini B, Kar S & Peter Kirkpatrick P. Temsirolimus. *Nature Reviews Drug Discovery* 2007; 6:599-600
- 142 European Assessment Report (EPAR) for Masivet, EMEA, 2009
- 143 Tierklinik Hofheim, Informationsblatt 2010

- 
- 144 European Assessment Report (Europäischer Öffentlicher Beurteilungsbericht) für Apoquel, EMEA, 2013
- 145 Cosgrove et al. Efficacy and safety of oclacitinib for the control of pruritus and associated skin lesions in dogs with canine allergic dermatitis. *Veterinary Dermatology* 2013; 24:479–e114
- 146 Jacinto FV, Esteller M. MGMT hypermethylation: a prognostic foe, a predictive friend. *DNA Repair (Amst)*. 2007; 6(8):1155-60
- 147 Middleton MR, Grob JJ, Aaronson N, Fierlbeck G, Tilgen W, Seiter S, Gore M, Aamdal S, Cebon J, Coates A, Dreno B, Henz M, Schadendorf D, Kapp A, Weiss J, Fraass U, Statkevich P, Muller M, and Thatcher N. Randomized Phase III Study of Temozolomide Versus Dacarbazine in the Treatment of Patients With Advanced Metastatic Malignant Melanoma. *Journal of Clinical Oncology* 2000; 18(1):158-166
- 148 Garbe C, Schadendorf D, Stolz W, Volkenandt M, Reinhold U, Kortmann RD, Kettelhack C, Frerich B, Keilholz U, Dummer R, Sebastian G, Tilgen W, Schuler G, Mackensen A, Kaufmann R, Hauschild A. Short German guidelines: Malignant melanoma. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2008; Suppl 1:S9-S14
- 149 Ulmer A, Beutel J, Süsskind D, et al. Visualization of Circulating Melanoma Cells in Peripheral Blood of Patients with Primary Uveal Melanoma. *Clin Cancer Res* 2008; 14:4469-4474
- 150 Budd, Thomas G. Let Me Do More Than Count the Ways: What Circulating Tumor Cells Can Tell Us about the Biology of Cancer. *Molecular Pharmaceutics*, 2009; 6(5):1307-1310
- 151 Kirkness EF, Bafna V, Halpern AL, Levy S, Remington K, Rusch DB, Delcher AL, Pop M, Wang W, Fraser CM, Venter JC. The Dog Genome: Survey Sequencing and Comparative Analysis. *Science* 2003; 301(5641):1898-903
- 152 Starkey MP, Scase TJ, Mellersh CS, Murphy S. Dogs really are man's best friend —Canine genomics has applications in veterinary and human medicine! *Brief Funct Genomic Proteomic*. 2005; 4(2):112-28
- 153 Miller CM, Doyle GC, Terstappen L. Significance of Circulating Tumor Cells Detected by the CellSearch System in Cancer Patients with Metastatic Breast Colorectal and Prostate Cancer. *Journal of Oncology* 2010; 2010:617421
- 154 Alison MR, Lim SM, Nicholson LJ. Cancer Stem Cells. Problems for Therapy? *J Pathol*. 2011; 223: 147-161
- 155 Ma J., Lin J., Alloo A., Wilson B., Schatton T et al. Isolation of

- tumorigenic circulating melanoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; 402(4): 711–717
- 156 Lesterhuis et al. Platinum-based drugs disrupt STAT6-mediated suppression of immune responses against cancer in humans and mice. *J Clin Invest.* 2011; 121(8):3100-3108
- 157 Dempsey et al. Increased Mutation Frequency following Treatment with Cancer Chemotherapy. *Cancer Res* 1985;45:2873-2877.
- 158 Meier F, Busch S, Lasithiotakis K, Kulms D, Garbe C, Maczey E, Herlyn M, Schitteck B. Combined targeting of MAPK and AKT signaling pathways is a promising strategy for melanoma treatment. *British Journal of Dermatology* 2007; 156(6):1204-13
- 159 Ugurel S, Schadendorf D, Pföhler C, Neuber K, Thoelke A, Ulrich J, Hauschild A, Spieth K, Kaatz M, Rittgen W, Delorme S, Tilgen W, Reinhold U. In vitro Drug Sensitivity Predicts Response and Survival after Individualized Sensitivity-Directed Chemotherapy in Metastatic Melanoma: A Multicenter Phase II Trial of the Dermatologic Cooperative Oncology Group. *Clinical Cancer Research*, 2008; 12(18):5454-63
- 160 Kumar R, Knick VB, Rudolph SK, Johnson JH, Crosby RM, Crouthamel MC, Hopper TM, Miller CG, Harrington LE, et al. Pharmacokinetic-pharmacodynamic correlation from mouse to human with pazopanib, a multikinase angiogenesis inhibitor with potent antitumor and antiangiogenic activity. *Mol. Cancer Therapy* 2007; 6(7):2012-21
- 161 Ugurel S., Schadendorf D. Systemic Treatment in Advanced Melanoma: Innovative Perspectives. *Onkologie* 2003; 26:234-238
- 162 Alberts et al. *Lehrbuch der molekularen Zellbiologie*. 3. Auflage 2005, Wiley-VCH-Verlag. ISBN 3-527-31160-2
- 163 Brakke M. Density gradient centrifugation: A new separation technique. *J. Am. Chem. Soc.* 1951; 73 1847-1848
- 164 Sharpe P.T. *Methods of Cell Separation*. 1998, Elsevier, ISBN 9780080858876
- 165 Benez A. et al, Detecion of circulating melanoma cells by immunomagnetic cell sorting. *J. Clin. Lab. Anal.* 1999; 13:229-33
- 166 <http://www.bdbiosciences.com/instruments/facscanto/>; Januar 2015
- 167 <http://www.bdbiosciences.com/instruments/facsaria/>; Januar 2015
- 168 Patent DE1815352: Flow-Through chamber for photometers to

- measure and count particles in a dispersion medium. Angemeldet am 18. Dezember 1968, Erfinder: Wolfgang Dittrich, Wolfgang Göhde
- 169 Hulett H.R., Bonner W.A., Barrett J., Herzenberg L.A. Cell sorting: automated separation of mammalian cells as a function of intracellular fluorescence. *Science* 1969; 166(3906), S. 747-9
- 170 Miltenyi S., Müller W., Weichel W., Radbruch A. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* 1990 11(2):231-238
- 171 <http://www.stemcell.com/en/Products/Popular-Product-Lines/RosetteSep.aspx>
- 172 <http://www.stemcell.com/en/Products/All-Products/ALDEFLUOR-Kit.aspx>; Technical Bulletin: Identification of viable stem and progenitor cells with Aldefluor; Technical Bulletin: Identification of ALDH-expressing Cancer Stem Cells; Technical Bulletin: The Basic FACS on Aldefluor<sup>TM</sup>
- 173 Tukey J.W. *Exploratory data analysis*. Addison-Wesley 1977, ISBN 0-201-07616-0
- 174 Falk et al. *Foundations of statistical analysis and applications with SAS*. Birkhäuser, 2002

## IX. ANHANG

### 1. Abbildungsverzeichnis

Abb. II.1 Altersstandardisierte Neuerkrankungs- und Sterberaten in Deutschland.....	2
Abb. II.2 Orales MM beim Hund.....	3
Abb. II.3 Beispiele für maligne Melanome des Menschen .....	7
Abb. II.4 Schematische Darstellung eines Zelloberflächen-Chondroitin-Sulfat-Proteoglycans.....	16
Abb. II.5 Modelle der Stammzelltheorie .....	26
Abb. II.6: Hierarchische Gliederung eines Tumors mit einer Tumorstammzelle als Ausgangspunkt .....	26
Abb. II.7 Die Metastatische Kaskade .....	28
Abb. II.8 Stammzellspezifische Therapie gegenüber konventioneller Therapie.....	30
Abb. II.9 Übersicht über die Chemoresistenzmechanismen maligner Zellen .....	35
Abb. III.1 schematische Zeichnung einer Messküvette .....	56
Abb. III.2 Messküvette des BD Canto II .....	56
Abb. III.3 Emissionsspektren der geläufigsten BD Fluorochrome .....	57
Abb. III.4 Optisches System der Durchflusszytometrie .....	58
Abb. III.5 Prinzip der Zellsortierung.....	59
Abb. III.6 MACS-Prinzip .....	60
Abb. III.7 RosetteSep Schema aus <a href="http://www.stemcell.com">www.stemcell.com</a> .....	61
Abb. III.8 Funktionsweise ALDH .....	68
Abb. III.9: Phasentrennung nach Dichtegradientenzentrifugation.....	72
Abb. III.10: 96Well-Platte mit Zielwell.....	73
Abb. III.11 BoxPlot Darstellung .....	77
Abb. IV.1 Histogramm-Darstellung.....	79
Abb. IV.2 Logarithmische Darstellung der MCSP-Expression. ....	80
Abb. IV.3 MCSP-Histogramme .....	80
Abb. IV.4 Logarithmische Darstellung der MelanA-Expression.....	82
Abb. IV.5 MelanA-Histogramme.....	82
Abb. IV.6 Logarithmische Darstellung der Tyrosinase-Expression. ....	83
Abb. IV.7 Tyrosinase-Histogramme .....	83
Abb. IV.8 Logarithmische Darstellung der MCAM-Expression.....	84
Abb. IV.9 MCAM-Histogramme .....	84
Abb. IV.9 MCAM-Histogramme.....	85
Abb. IV.10 Logarithmische Darstellung der ICAM-Expression.....	86
Abb. IV.11 ICAM-Histogramme.....	86
Abb. IV.12 Logarithmische Darstellung der N-Cadherin-Expression.....	87
Abb. IV.13 N-Cadherin-Histogramme .....	87
Abb. IV.14 Logarithmische Darstellung der CD166-Expression.....	88
Abb. IV.15 CD166-Histogramme.....	88
Abb. IV.16 Logarithmische Darstellung der HLA-DR-Expression.....	89
Abb. IV.17 HLA-DR-Histogramme .....	89
Abb. IV.18 Logarithmische Darstellung der HLA-ABC-Expression. ....	90
Abb. IV.19 HLA-ABC-Histogramme .....	90

Abb. IV.20 Logarithmische Darstellung der CD45-Expression.....	91
Abb. IV.21 CD45-Histogramme.....	91
Abb. IV.22 Logarithmische Darstellung der cKit-Expression.....	94
Abb. IV.23 cKit-Histogramme.....	94
Abb. IV.24 Logarithmische Darstellung der CD20-Expression.....	95
Abb. IV.25 CD20-Histogramme.....	95
Abb. IV.26 Logarithmische Darstellung der CD133-Expression.....	96
Abb. IV.27 CD133-Histogramme.....	96
Abb. IV.28 Logarithmische Darstellung der CD271-Expression.....	97
Abb. IV.29 CD271-Histogramme.....	97
Abb. IV.30 Logarithmische Darstellung der ABCG2-Expression.....	98
Abb. IV.31 ABCG2-Histogramme.....	99
Abb. IV.32 Histogramme der Linie ErMel3.....	99
Abb. IV.33 Logarithmische Darstellung der Notch-Expression. ....	100
Abb. IV.34 Notch1-Histogramme .....	100
Abb. VI.35 Zusammenfassung der Expression der in der Charakterisierung verwendeten Stammzellmarker .....	101
Abb. IV.36 Darstellung Melanomzellen mit stammzellähnlicher Marker- Expression Panel1 .....	102
Abb. IV.37 Darstellung Melanomzellen mit stammzellähnlicher Marker- Expression Panel2 .....	103
Abb. IV. 38 ALDH-Expression in Melanomzelllinien.....	106
Abb. IV.39 ALDH-Histogramme .....	107
Abb. IV.40 Darstellung der Hoechst-SP in verschiedenen Melanomzelllinien .....	109
Abb. 41 Zusammenfassung der Stammzellmarker-Expression der ALDH- gemessenen Linien in Prozent.....	110
Abb. 42 Zusammenfassung Stammzellenmarker aller charakterisierten Linien sowie die ALDH-Expression mittels der MFI .....	112
Abb. IV.43 DotPlots Detektion.....	114
Abb. IV.44 Detektion ohne Anreicherung: Wiederfindungsraten.....	116
Abb. IV.45 DotPlots der Anreicherungsverfahren .....	117
Abb. IV.46 Übersicht über die Effektivität der getesteten Anreicherungsverfahren.....	117
Abb. IV.47 Übersicht Wiederfindungsrate nach Anreicherung mit RosetteSep .....	118
Abb IV.48 Anreicherung mit RosetteSep nach Tumorzellsort .....	119
Abb. IV.49 Sort-Darstellungen .....	120
Abb. IV.50 Melanomzellen aus Leukapherese angezüchtet .....	124
Abb. IV.51 Melanomzellen, die aus dem Patientenblut von Sort ErSo16 ausgewachsen sind .....	125
BoxPlot IV.1 Überleben.....	126
BoxPlot IV.2 Proliferation .....	126
BoxPlot IV.3 Glukoseaufnahme .....	127
BoxPlot IV.4 Mitochondrienaktivität.....	127
Abb. IV.52 Zusammenfassung Überleben .....	128
Abb. IV.53 Proliferation einzelner Zelllinien. ....	130
Abb. IV.54 und 55 Mitochondrienaktivität einzelner Zelllinien .....	132
Abb. IV.56 Glukoseaufnahme einzelner Zelllinien.....	134



## 2. Tabellenverzeichnis

Tab.III.1 Übersicht Patientenmaterial.....	49
Tab. III.2 Übersicht Melanomzellkultur.....	50
Tab. III.3 Übersicht welche Zelllinien mit welchen Markern charakterisiert wurden.....	64
Tab. IV.1 Zur Charakterisierung verwendete Marker .....	78
Tab. IV.2 Vergleich der Melanomzellen-Stammzellencharakterisierung mittels der MFI mit der ALDH-Expression.....	108
Tab. IV.3 Spiking Detektionsrate.....	115
Tab. IV.4 Anzahl detektierter zirkulierender Melanomzellen/10 ml Blut .	121
Tab. IV.5 Patienteninformation zu den Sorts ( nb = nicht bekannt) .....	122
Tab. V.1 % positiver Zellen der Melanomzelllinien ErMel12 und 14a ....	147
Tab. IX.1 Staging des MM mit dem TNM-System.....	183
Tab. IX.2 Stadieneinteilung des MM .....	184

Tab. IX.1 Staging des MM mit dem TNM-System

T – Klassifikation des Primärtumors		
T-Klassifikation	Tumordicke	Weitere prognostische Parameter
Tis	Keine Angabe	Melanoma in situ, keine Tumorinvasion
Tx	Keine Angabe	Stadium nicht bestimmbar <sup>a</sup>
T1	≤ 1,0 mm	a: ohne Ulzeration; Level II-III bzw < 1 Mitose/mm <sup>2</sup> b: mit Ulzeration; Level IV oder V bzw ≥ 1 Mitose/mm <sup>2</sup>
T2	1,01 – 2,0 mm	a: ohne Ulzeration b: mit Ulzeration
T3	2,01 – 4,0 mm	a: ohne Ulzeration b: mit Ulzeration
T4	> 4,0 mm	a: ohne Ulzeration b: mit Ulzeration
N – Klassifikation der regionären Lymphknoten		
N-Klassifikation	Zahl metastatisch befallener LK	Ausmaß der LK-Metastasierung
N1	1 LK	a: Mikrometastasierung b: Makrometastasierung
N2	2-3 LK	a: Mikrometastasierung b: Makrometastasierung c: Satelliten oder in-transit-Metastasen
N3	≥ 4 LK, Satelliten oder in-transit-Metastasen plus LK-Beteiligung	
M – Klassifikation der Fernmetastasen		
M-Klassifikation	Art der Fernmetastasierung	LDH
M1a	Haut, subkutan oder LK	Normal
M1b	Lunge	Normal

M1c	Alle anderen Organmetastasen	Normal
	Jede Art von Fernmetastaseirung	Erhöht

Tab. IX.2 Stadieneinteilung des MM

Stadium	Primärtumor (pT)	Regionäre LK- Metastasen (N)	Fernmetastasen (M)
0	Tis	N0	M0
I A	T1a	N0	M0
I B	T1b	N0	M0
	T2a	N0	M0
II A	T2b	N0	M0
	T3a	N0	M0
II B	T3b	N0	M0
	T4a	N0	M0
II C	T4b	N0	M0
III A	T1-T4a	N1a	M0
	T1-T4a	N2a	M0
III B	T1-T4b	N1a	M0
	T1-T4b	N2a	M0
	T1-T4a	N1b	M0
	T1-T4a	N2b	M0
	T1-T4a	N2c	M0
III C	T1-T4b	N1b	M0
	T1-T4b	N2b	M0
	T1-T4b	N2c	M0
	alle pT	N3	M0
IV	alle pT	alle N	M1a-M1c

## **X. DANKSAGUNG**

Ein großes und herzliches Dankeschön geht an meine Betreuerin Frau Dr. Stefanie Groß. Sie hat mich über Jahre mit Rat und Tat unterstützt, mir Mut zu gesprochen und mich immer wieder motiviert. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen. Auch Prof. Eckhart Kämpgen hat mich mit seinem Enthusiasmus und seinem Tatendrang immer wieder motiviert. Bei Prof. Fred Sinowatz bedanke ich mich herzlich, dass er als mein Doktorvater der Tiermedizinischen Fakultät München meine Arbeit betreut hat. Ein besonderer Dank gilt auch dem Immunomonitoring Team der Hautklinik Erlangen, insbesondere Dagmar Schönhöfer und Annett Hamann, die mir bei vielen Versuchen geholfen haben und mich in die Welt der Laborarbeit eingewiesen haben. Auch bei Prof. Martin Hermann bedanke ich mich herzlich, dem Leiter des Graduiertenkollegs des SFB 643. Das Graduiertenkolleg hat durch die Finanzierung des ersten RosetteSep-Kits einen wesentlichen Beitrag zur vorliegenden Arbeit beigetragen. Desweiteren gilt mein Dank meinem lieben Ehemann Marco, der mich in jeder Hinsicht unterstützt hat und mich oft aufgemuntert hat. Meinen großartigen Eltern möchte ich danken, dass sie mir das Studium ermöglicht haben, und mich schon immer auf jede erdenkliche Weise unterstützt und gefördert haben. Ebenso danke ich meinen Geschwistern Andrea und Hans, die mir immer beigestanden haben, mit Ratschlägen, und Lebensweisheiten und lustigen Familienabenden, und besonders meinem Bruder Thomas, der immer dann da war, wenn ich an die Grenzen meines technischen Verstandes meines Laptops geraten bin.