

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie

Klinik der Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Lars E. French



**Experimentelle Untersuchung zur Tumorzellheterogenität im
Melanom anhand der BRAF-V600-Mutationsfrequenz**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Charlotte Donhauser

aus München

2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Michael Flaig

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Nikolaus Plesnila
Prof. Dr. med. Peter Bartenstein

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 28.04.2022

In Liebe und Dankbarkeit
meinen Eltern und meiner Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	3
1.1. Melanom	3
1.2. BRAF-Mutation	15
1.3. Homogenität und Heterogenität der Tumorzellen	19
1.4. Zielsetzung: Experimentelle Untersuchung zur Tumorzellheterogenität anhand der BRAF-V600-Mutationsfrequenz	22
2. MATERIAL UND METHODEN	23
2.1. Probenkollektiv	23
2.1.1. Voruntersuchungen	23
2.1.2. Hauptversuch	23
2.2. Material und Aufbereitung	24
2.3. Lasermikrodissektion	25
2.4. DNA-Aufbereitung	27
2.5. PCR	30
2.6. Bioanalyzer (Kapillar-Gel-Elektrophorese)	34
2.7. Pyrosequenzierung	39
2.8. Manuelle Mikrodissektion	49
3. ERGEBNISSE	51
3.1. Optimierung der Versuchsparameter	51
3.2. Dicke des histologischen Schnittes	52
3.3. Verdünnungsreihe	53
3.4. Auswahl einzelner Zellen	54
3.5. Intratumoraler Vergleich	60
3.6. NRAS positives Melanom und Basalzellkarzinom	62
3.6.1. BRAF-Mutationsanalyse	62
3.6.2. NRAS-Exon-3-Mutationsanalyse	64
3.7. Versuche mit absteigender Zellzahl	65
3.8. Versuche mit absteigender Menge Proteinase K	68
3.9. Versuch mit absteigender Proteinase K bei unterschiedlichen Zellzahlen	72
3.10. Reproduzierbarkeit	76

3.11. Hauptversuch - Primärtumore	79
3.12. Molekularbiologischer Mutationsstatus in Relation zur HMB-45 Expression	101
4. DISKUSSION	104
4.1. Zusammenfassung der Ergebnisse	104
4.2. Diskussion der Methodik	106
4.2.1. Anzahl der untersuchten Präparate	106
4.2.2. PCR und Pyrosequenzierung	107
4.3. Diskussion der Ergebnisse	108
4.3.1. Anzahl der verwertbaren Amplifikate	108
4.3.2. Auswertung der Mutationsanalysen	112
4.3.3. NRAS-Befunde	120
4.4. Vergleich mit der Literatur	120
4.4.1. Intra- und intertumorale Homogenität	120
4.4.2. Intra- und intertumorale Heterogenität	121
4.4.3. Diskussion diskordanter Ergebnisse	124
5. ZUSAMMENFASSUNG	128
6. VERZEICHNIS	130
6.1. Literaturverzeichnis	130
6.2. Tabellenverzeichnis	134
6.3. Abbildungsverzeichnis	136
6.4. Abkürzungsverzeichnis	138
7. ANHANG	141
7.1. Danksagung	141
7.2. Eidesstattliche Versicherung	142

1. Einleitung

1.1. Melanom

Definition

Das Melanom ist ein von entarteten Melanozyten ausgehender [1], höchst aggressiver [2] und bösartiger Tumor [1]. Es manifestiert sich größtenteils „auf der Haut, aber auch an Schleimhäuten der Mundhöhle, des Respirationstrakts und der Anogenitalregion, im Nervensystem und in der Ader- oder Bindehaut“ [1]. Von großer Bedeutung ist es, ein Melanom baldmöglichst zu identifizieren und zu behandeln [3], da es früh metastasiert [2], unter den Hauttumoren die höchste Metastasierungsrate hat [3] sowie die Verantwortung „für mehr als 90% aller Sterbefälle an Hauttumoren“ trägt [3] und zu den am häufigsten zum Tode führenden Krebsentitäten zählt [2].

Epidemiologie

In Deutschland sind im Jahr 2008 2.500 Todesfälle und 17.800 neu aufgetretene Melanome registriert worden [4]. 2014 stieg die Zahl der Todesfälle auf 3.074 und die der Neuerkrankungen auf 21.220 [5]. 2016 betrug die Zahl der Todesfälle 2.926 und die der Neuerkrankungen 23.240 [6]. Für 2020 werden 25.100 Neuerkrankungen prognostiziert [6]. Weltweit wird von mehr als 48.000 Todesfällen und über 160.000 [1] Neuerkrankungen pro Jahr bei wahrscheinlich hoher Dunkelziffer ausgegangen.

Die exakte Inzidenz des Melanoms in Deutschland kann „nach wie vor nur unter Einbeziehung der Krebsregisterdaten aus den Bundesländern (noch unvollständig) geschätzt werden, da eine flächendeckende Krebsregistrierung in Deutschland noch nicht erreicht wurde“ [3]. Insgesamt scheint sich in den letzten Jahren ein stetiger Anstieg der Inzidenzrate abgezeichnet zu haben. Zu den bedeutendsten Ursachen zählen eine zunehmende Lebenserwartung [3] und eine Veränderung des Freizeitverhaltens, die implizieren, dass die Haut durch einen verlängerten Aufenthalt unter freiem Himmel einer höheren UV-Strahlung ausgesetzt ist [3]. Auch die „Einführung der ärztlichen Früherkennungsuntersuchung zum Hautkrebs“ [7] als Leistung der gesetzlichen Krankenversicherung hat anfänglich zu einem deutlichen Anstieg der diagnostizierten Melanome geführt (ca. um 15-20%) [4].

Im Jahr 2014 zählte das Melanom laut einer Schätzung des Robert-Koch Instituts bei den Frauen mit 10.310 und bei den Männern mit 10.910 Neuerkrankungen bei beiden

Geschlechtern zur fünfthäufigst diagnostizierten Krebsneuerkrankung [5]. Zwei Jahre später, im Jahr 2016, zählte das Melanom bei Frauen mit 11.150 Neuerkrankungen bereits zur vierthäufigst diagnostizierten Krebsneuerkrankung, bei den Männern blieb es mit 12.090 die fünfthäufigste [6]. Das mittlere Erkrankungsalter betrug 2014 bei Frauen 60 und bei den Männern 67 Jahre [5], 2016 stagnierte es bei den Frauen, wohingegen es bei den Männern auf 68 Jahre anstieg [6].

Auch geografische Unterschiede wirken sich signifikant auf die Inzidenz aus. Die höchste ist europaweit in den skandinavischen Ländern (Schweden, Norwegen und Dänemark) zu verzeichnen, während „die niedrigsten Inzidenzraten in den mediterranen Ländern“ zu finden sind [3]. Dies ist wahrscheinlich auf die unterschiedliche Pigmentierung der Haut und die Häufigkeit und Dauer der Sonnenexposition zurückzuführen [3].

Hinsichtlich der jährlichen Inzidenz führen weltweit Australien und Neuseeland mit 50-60/100.000 Einwohner [3]. Im Vergleich dazu betragen in Deutschland die diagnostizierten Melanome ca. 21/ 100.000 Einwohner [3]. In Afrika und Asien treten Melanome extrem selten auf, was auf den (UV-)Schutz der Haut durch die starke Pigmentierung zurückzuführen ist [3]. Gelegentlich kommen sie in diesen Populationen auf Schleimhäuten oder den Palmae oder Plantae vor, die eine weniger starke oder keine Pigmentierung aufweisen [3].

Für die Mortalität des Melanoms stehen „exakte Zahlen zur Verfügung“ [3], die in den letzten Jahren ebenfalls eine erkennbare Zunahme verzeichnet, die „deutlich geringer ausfällt als die der Inzidenzraten. Insofern kann von einer relativen Stabilisierung der Mortalitätsraten ausgegangen werden“ [3]. Durch das eingeführte Hautkrebscreening erhoffte man sich in Deutschland zudem einen Rückgang der Mortalität [8], da eine Früherkennung die Prognose deutlich verbessert. Ein diesbezüglicher Erfolg ist nicht nachweisbar [8].

Ätiologie

Die Entstehung der Melanome ist, wie bei anderen maligne entarteten Tumoren, multifaktoriell bedingt [9]. Häufig entwickeln sie sich aus Vorläuferläsionen (melanozytäre Naevi, Zwischenstufenläsionen, in-situ-Melanome) [10]. Die Entwicklung der genetischen Alterationen, die letztendlich zur Entstehung eines Melanoms führt, ist teilweise bekannt [10]. Mutationen in Onkogenen und Tumorsuppressorgenen werden größtenteils durch UV-Strahlung [3], aber auch durch andere Faktoren induziert. Neben dem wahrscheinlich höchsten endogenen Risikofaktor, einer hohen Anzahl an Naevi [3],

1. Einleitung

spielen ein heller Hauttyp [3], viele Sonnenbrände im Kindes- und Jugendalter [9], eine hohe UV-Exposition (v.a. zeitlich intermittierend) [3], der Wohnort in Äquatornähe (höhere UV-Einstrahlung) [3], ein Melanom in der Vorgeschichte [3] sowie eine familiäre Prädisposition [9] ebenfalls eine bedeutende Rolle für das Erkrankungsrisiko. Auch eine Immunsuppression kann die Entstehung eines Melanoms [11] begünstigen und hat zusätzlich einen negativen Einfluss auf den Krankheitsverlauf [11, 12].

Tumorklassifikation

Die aktuelle Tumorklassifikation bei Melanomen erfolgt nach der TNM-Klassifikation der AJCC (American Joint Committee on Cancer) aus dem Jahr 2016 [13]. Tabelle 1 zeigt die T-Klassifikation, Tabelle 2 die N-Klassifikation und Tabelle 3 die M-Klassifikation. In Tabelle 4 und Tabelle 5 sind entsprechend die klinische und pathologische Stadieneinteilung dargestellt. Die Tabellen wurden aus der aktuellen AWMF Leitlinie übernommen [13]. Diese teilt die Erkrankung entsprechend der histopathologischen Befundung in verschiedene Stadien und dient als Grundlage für die entsprechenden Leitlinien zur Behandlung [13]. Zu den entscheidenden Kriterien, die auch prognosebestimmend sind [2], zählen dabei Tumordicke (nach Breslow, wichtigster Faktor), Ulzeration und Mitoserate des Primärmelanoms [13]. Ebenfalls erwähnenswert und zu berücksichtigen sind in diesem Zusammenhang eine perineurale Invasion (Pn-Klassifikation) sowie Venen- (V-Klassifikation) und Lymphgefäßeinbrüche (Lymphangiosis melanomatosa, L-Klassifikation) [13].

T-Klassifikation	Tumordicke	Ulzeration
Tx (Primäre Tumordicke kann nicht bestimmt werden, z.B. bei kürretiertem Primärtumor)	keine Angabe	keine Angabe
T0 (kein Anhalt für einen Primärtumor, z.B. bei okkultem Melanom oder komplett regressivem Primärtumor)	keine Angabe	keine Angabe
Tis (Melanoma in situ)	keine Angabe	keine Angabe
T1	≤ 1,0 mm	unbekannt oder nicht spezifiziert
T1a	< 0.8 mm	ohne Ulzeration
T1b	< 0.8 mm	mit Ulzeration
	0.8 mm – 1.0 mm	mit/ ohne Ulzeration
T2	> 1.0 - 2.0 mm	unbekannt oder nicht spezifiziert
T2a	> 1.0 - 2.0 mm	ohne Ulzeration
T2b	> 1.0 - 2.0 mm	mit Ulzeration
T3	> 2.0 - 4.0 mm	unbekannt oder nicht spezifiziert
T3a	> 2.0 - 4.0 mm	ohne Ulzeration
T3b	> 2.0 - 4.0 mm	mit Ulzeration
T4	> 4.0 mm	unbekannt oder nicht spezifiziert
T4a	> 4.0 mm	ohne Ulzeration
T4b	> 4.0 mm	mit Ulzeration

Tabelle 1 „T-Klassifikation des Primärtumors beim malignen Melanom (AJCC 2016/UICC 2016)“, Tabelle 8 übernommen aus AWMF 2019 [13]

1. Einleitung

N-Klassifikation	Anzahl der metastatisch befallenen Lymphknoten	Vorhandensein von Intransit-, Satelliten-, und/oder Mikrosatelliten-Metastasen
Nx	Regionale Lymphknoten wurden nicht beurteilt (z.B. keine Wächterlymphknotenbiopsie durchgeführt, regionale Lymphknoten bereits anderswertig entfernt). Für T1-klassifizierte Melanome ist die pathologische Klassifizierung (pN) nicht obligat; es soll die klinische Klassifizierung (cN) angewandt werden	Nein
N0	Keine regionalen Lymphknotenmetastasen nachweisbar	Nein
N1	Ein metastatisch befallener Lymphknoten ODER Intransit-, Satelliten-, und/oder Mikrosatelliten-Metastasen OHNE einen metastatisch befallenen Lymphknoten	
N1a	Ein klinisch „okkult“ metastatisch befallener Lymphknoten (z.B. diagnostiziert mittels Wächterlymphknotenbiopsie)	Nein
N1b	Ein klinisch metastatisch befallener Lymphknoten	Nein
N1c	Kein regionärer metastatisch befallener Lymphknoten	Ja
N2	Zwei oder drei metastatisch befallene Lymphknoten ODER Intransit-, Satelliten-, und/oder Mikrosatelliten-Metastasen mit einem metastatisch befallenen Lymphknoten	
N2a	Zwei oder drei klinisch „okkulte“ metastatisch befallene Lymphknoten (z.B. diagnostiziert mittels Wächterlymphknotenbiopsie)	Nein
N2b	Zwei oder drei metastatisch befallene Lymphknoten, bei denen mind. ein Lymphknoten klinisch diagnostiziert wurde	Nein

N-Klassifikation	Anzahl der metastatisch befallenen Lymphknoten	Vorhandensein von Intransit-, Satelliten-, und/oder Mikrosatelliten-Metastasen
N2c	Ein metastatisch befallener Lymphknoten („okkult“ oder klinisch diagnostiziert)	Ja
N3	vier oder mehr metastatisch befallene Lymphknoten ODER Intransit-, Satelliten-, und/oder Mikrosatelliten-Metastasen mit zwei oder mehr metastatisch befallenen Lymphknoten ODER „verbackener“ Lymphknotenkonglomerat OHNE Intransit-, Satelliten-, und/oder Mikrosatelliten-Metastasen	
N3a	vier oder mehr klinisch „okkulte“ metastatisch befallene Lymphknoten (z.B. diagnostiziert mittels Wächterlymphknotenbiopsie)	Nein
N3b	Vier oder mehr metastatisch befallene Lymphknoten, bei denen mind. ein Lymphknoten klinisch diagnostiziert wurde	Nein
N3c	Zwei oder mehr „okkulte“ oder klinisch metastatisch befallene Lymphknoten und/ oder „verbackenes“ Lymphknotenkonglomerat	Ja

Tabelle 2 „N-Klassifikation des Primärtumors beim malignen Melanom (AJCC 2016/UICC 2016)“, Tabelle 9 übernommen aus AWMF 2019 [13]

1. Einleitung

M-Klassifikation	Anatomische Lokalisation	LDH-Wert
M0	Kein Hinweis auf Fernmetastasen	
M1	Vorhandensein von Fernmetastasen	
M1a	Fernmetastasen i.B. der Haut, Weichteile, inkl. Muskel und / oder nicht regionale Lymphknoten	Nicht bestimmt oder nicht dokumentiert
M1a(0)		normal
M1a(1)		erhöht
M1b	Fernmetastasen i.B. der Lunge; mit oder ohne Beteiligung der unter M1a codierten Lokalisation	Nicht bestimmt oder nicht dokumentiert
M1b(0)		normal
M1b(1)		erhöht
M1c	Fernmetastasen i.B. anderer viszeraler Lokalisationen OHNE ZNS-Beteiligung; mit oder ohne Beteiligung der unter M1a oder M1b codierten Lokalisation	Nicht bestimmt oder nicht dokumentiert
M1c(0)		normal
M1c(1)		erhöht
M1d	Fernmetastasen i.B. des ZNS; mit oder ohne Beteiligung der unter M1a, M1b oder M1c codierten Lokalisation	Nicht bestimmt oder nicht dokumentiert
M1d(0)		normal
M1d(1)		erhöht

Tabelle 3 „M-Klassifikation des Primärtumors beim malignen Melanom (AJCC 2016/UICC 2016)“, Tabelle 10 übernommen aus AWMF 2019 [13]

T-Klassifikation	N-Klassifikation	M--Klassifikation	Stadium
Tis	N0	M0	0
T1a	N0	M0	IA
T1b	N0	M0	
T2a	N0	M0	IB
T2b	N0	M0	
T3a	N0	M0	
T3b	N0	M0	IIA
T4a	N0	M0	
T4b	N0	M0	IIB
T0	N1b, N1c	M0	
Jedes T, Tis	≥N1	M0	IIC
Jedes T	Jedes N	M1	IIIB
			III
			IV

Tabelle 4 „Stadieneinteilung des malignen Melanoms – klinisch (AJCC 2016/UICC 2016)“, Tabelle 11 übernommen aus AWMF 2019 [13]

T-Klassifikation	N-Klassifikation	M-Klassifikation	Stadium
Tis	N0	M0	0
T1a	N0	M0	IA
T1b	N0	M0	
T2a	N0	M0	IB
T2b	N0	M0	IIA
T3a	N0	M0	
T3b	N0	M0	
T4a	N0	M0	IIB
T4b	N0	M0	
T0	N1b, N1c	M0	IIC
T0	N2b, N2c, N3b oder N3c	M0	IIIB
T1a/b-T2a	N1a oder N2a	M0	IIIC
T1a/b-T2a	N1b/c oder N2b	M0	IIIA
			IIIB

1. Einleitung

T-Klassifikation	N-Klassifikation	M-Klassifikation	Stadium
T2b/T3a	N1a - N2b	M0	
T1a-T3a	N2c oder N3a/b/c	M0	IIIC
T3b/T4a	Jedes N \geq N1	M0	
T4b	N1a-N2c	M0	
T4b	N3a/b/c	M0	IIID
Jedes T, Tis	Jedes N	M1	IV

Tabelle 5 „Stadieneinteilung des malignen Melanoms - pathologisch (AJCC 2016/UICC 2016)“, Tabelle 12 übernommen aus AWMF 2019 [13]

Prävention

Präventiv sollten regelmäßige Inspektionen des gesamten Integuments durch einen (Haut-)Arzt durchgeführt werden, um suspekte Hautveränderungen frühzeitig zu identifizieren. Zur Verlaufskontrolle eignet sich zusätzlich die fotografische Dokumentation.

Diagnostik

Die Verdachtsdiagnose erfolgt primär mittels Inspektion, insbesondere durch einen geschulten (Haut-)Arzt. Richtungsweisend können optische Hilfsmittel sein (z.B. Dermatoskop, Scannergerät). Entscheidungsfindend sind dabei Auffälligkeiten bezüglich der ABCD(E)-Regel (**A**=Asymmetry (*engl.*) = Asymmetrie (*dtsh.*): nicht rund oder oval, **B** = Border irregularity (*engl.*) = Begrenzung (*dtsh.*): unregelmäßig oder unscharf, **C** = Color variegation (*engl.*) = Farbe (*dtsh.*): unterschiedlich starke Pigmentierung, Mehrfarbigkeit, Geflecktheit, **D** = Diameter (*engl.*) = Durchmesser (*dtsh.*): größer als fünf oder sechs Millimeter, je nach Literaturangabe, **E** = Evolving (*engl.*) = Entwicklung (*dtsh.*) oder Erhabenheit: neu entstanden auf sonst flachem Grund [14, 15]. Die Sicherung der Verdachtsdiagnose und die Stadieneinteilung erfolgen ausschließlich durch eine histopathologische Begutachtung. Ab einem Tumorstadium IIIB wird zusätzlich die Durchführung einer Mutationsanalyse (BRAF, NRAS bei BRAF Wildtyp, c-kit bei ALM und Schleimhautmelanom) [13] und in Abhängigkeit der genauen histopathologischen Klassifizierung eine Biopsie und histopathologische Untersuchung des Wächterlymphknotens [13] empfohlen. Zu einer Lymphknotenbiopsie wird in den Leitlinien ab einer Tumordicke von $\geq 1,0$ mm und ohne „Hinweis auf lokoregionale oder

Fernmetastasierung oder bei zusätzlichen Risikofaktoren wie Ulzeration, erhöhte Mitoserate und jüngeres Lebensalter (<40 Jahre) bereits bei 0,75-1,0 mm geraten [13]. Der korrespondierende Lymphknoten kann präoperativ radioaktiv markiert werden, um eine intraoperative Detektion mit Hilfe einer Gamma-Sonde oder Gammakamera [13] zu ermöglichen. Um die Detektion zu erleichtern sollten auch die Lymphdrainagewege präoperativ durch eine Lymphszintigraphie lokalisiert und dokumentiert werden [13].

Weitere diagnostische Maßnahmen wie die klinische Ganzkörperinspektion, körperliche, Blut- (Routinediagnostik, S100), Röntgen-, Sonographie-(einschließlich Lymphknoten), CT- und MRT-Untersuchungen mit und ohne Kontrastmittel oder eine Skelettszintigraphie, die nach Diagnosestellung zum „Tumor-Staging“ durchgeführt werden können, müssen individuell für jeden Patienten entschieden werden [13].

Ab einem Tumorstadium IB wird in den Leitlinien eine Ultraschalluntersuchung der Lymphknoten empfohlen [13]. Die Bestimmung des Tumormarkers S100B ist in der initialen Ausbreitungsdiagnostik fakultativ möglich [13]. Ab dem Stadium IIC/ III werden zusätzlich eine MRT des Kopfes, eine Schnittbildgebung des restlichen Körpers (PET-CT, CT, MRT) sowie eine Bestimmung der Tumormarker S100B und LDH empfohlen [13].

Der Tumormarker LDH kann hier auch als prognostischer Marker herangezogen werden [13]. Ab Tumorstadium IV können außerdem eine Skelettszintigraphie und eine Sonographie des Abdomens durchgeführt werden. Dabei ist jedoch zu beachten, dass die Sonographie anderen Methoden bei der Detektion von Metastasen unterlegen ist [13].

Einen verlässlichen immunhistochemischen Marker für die Diagnosestellung des Melanoms, der sowohl eine hohe Sensitivität als auch Spezifität aufweist [2], gibt es derzeit nicht. Die vorhandenen Marker, wie das S100-Calzium bindende Protein P, das HMB45-Antigen, das MART-1 und der „microphthalmica-associated transcription factor“ (MITF) können bestimmt werden, sind bei hoher Sensitivität aber nicht ausreichend spezifisch [2].

Bei der Diagnosestellung ist ein ausreichendes Aufklärungsgespräch sowie eine gute Kommunikation mit dem Patienten und dessen Angehörigen von großer Bedeutung [13].

Metastasen

Metastasen, die in fast jedem Tumorstadium vorkommen können, treten lokal („in loco“, intransit), lymphogen oder hämatogen auf. Sogar bei dünnen, bereits exzidierten Primärmelanomen können sie entstehen [2]. Bei einer lymphogenen Metastasierung sind in der Regel die abfließenden Lymphknotenstationen betroffen, hämatogen werden

1. Einleitung

vorwiegend Haut, Lungen, Viszera (Nebenniere, Dünndarm, Leber) und Gehirn befallen [13]. „Bei ca.13-19% aller Patienten mit einem Melanom sind 5 Jahre nach Diagnosestellung Lungenmetastasen nachweisbar“ [13]. Bei 28% der Patienten im Stadium IV finden sich viszerale Metastasen [13].

Formen

Klinisch und histologisch unterscheidet man nach der WHO-Klassifikation entsprechend „dem Aussehen und der Wuchsart“ [16] zwischen einem superfiziell spreitendem Melanom (SSM), nodulärem/ knotigem Melanom (NM), Lentigo-maligna-Melanom (LMM) und akrolentiginösem Melanom (ALM) [3, 16, 17].

Histologisch wird zusätzlich zwischen spitzoidem Melanom, nävoidem Melanom und desmoplastischem beziehungsweise neurotropem Melanom differenziert [3].

Mutationen

Unter Mutation versteht man eine Veränderung auf genetischer Ebene. Eine kürzlich durchgeführte Studie zeigt, dass es sich beim Melanom um einen der am meisten Mutationen tragenden Tumortyp handelt [18]. Die beim Melanom am häufigsten nachgewiesene Mutation ist die BRAF-Mutation (im Exon 15), die bei 40-60% [1] zu finden ist. Weniger häufig kommen NRAS-Mutationen (15%) [13], cKit-Mutationen (5% der akralen und mukosalen Melanome) [13], GNAQ und GNA11 [19] vor.

Der Mutationsnachweis ist von großer klinischer Relevanz, da er weitere bedeutende Therapieoptionen eröffnet. Zum Einsatz kommen sogenannte „Inhibitoren“ [13], die gezielt in den mutierten intrazellulären Signalweg eingreifen und dadurch das unregulierte beziehungsweise ungestoppte Wachstum und Überleben der Zelle beeinflussen [20]. Da die BRAF-, NRAS-, GNAQ- und GNA11-Mutationen auch in gutartigen Naevi nachzuweisen sind [10, 21], handelt es sich bei einem positiven Mutationsstatus nicht automatisch um eine maligne behandlungsbedürftige Entartung.

Therapie

Therapie der Wahl des Melanoms ist, soweit möglich, die vollständige chirurgische Exzision des Primärtumors [13]. Nach histologischer Diagnosesicherung und in Abhängigkeit der TNM-Klassifikation und der Operabilität wird das weitere klinische Vorgehen festgelegt. Dies impliziert Nachresektion (mit Sicherheitsabstand), Exstirpation des oder der Sentinellymphknoten und in seltensten Fällen zusätzlich eine Radiotherapie [13].

Ist eine R0-Resektion nicht möglich, sollte eine lokale Tumorkontrolle beispielsweise durch eine hypertherme Extremitätenperfusion, Strahlentherapie oder Kryochirurgie in Erwägung gezogen werden [13].

Für eine optimale Therapie sollte bei metastasierten Melanomen eine interdisziplinäre (Haut-)Tumorkonferenz stattfinden [13]. Des Weiteren ist die Teilnahme an einer klinischen Studie zu erwägen. In den Leitlinien wird bei der Frage nach einer adjuvanten Therapie das Gesamtüberleben als „relevanter Endpunkt“ bezeichnet, jedoch sollte bei der Nutzen-Risiko-Abwägung vor allem die Lebensqualität nicht außer Acht gelassen werden [13]. Zum Einsatz kommen in Abhängigkeit des Stadiums und des Mutationsstatus verschiedene Medikamente. Eine adjuvante Interferontherapie sollte mit dem Patienten ab Tumorstadium IIB/C beziehungsweise niedrigdosiert bereits im Stadium IIA besprochen werden [13]. Angeboten werden sollte nach den neuen Leitlinien von 2019 im AJCC 2017 Tumorstadium III A-D eine adjuvante Therapie mit einem anti-PD1-Antikörper, im AJCC 2017 Tumorstadium III A-D mit nachgewiesener BRAF-V600E- oder V600K-Mutation ein BRAF- und MEK-Inhibitor, beziehungsweise im AJCC 2017 Tumorstadium IV ein anti-PD1-Antikörper [13]. Von einer adjuvanten Misteltherapie wird abgeraten [13].

Die Indikation für eine operative Therapie bei Fernmetastasen ist ebenfalls für jeden Patienten individuell zu stellen und von mehreren Faktoren, wie eine mögliche R0-Resektabilität, Anzahl der Metastasen und weiteren abhängig [13]. Für die adjuvante medikamentöse Therapie nach Metastektomie liegt derzeit jedoch aufgrund der fehlenden Datenlage noch keine allgemeine Empfehlung in den Leitlinien vor [13].

Eine zunehmende Rolle in der Behandlung von Melanomen spielen neue Medikamente. Hierzu zählen immunmodulierende Medikamente (z.B. Antikörper) und sogenannte „targeted therapies“ (zielgerichtete Therapien), die durch Blockade in den Zellzyklus eingreifen [20]. Sie kommen entweder als Monotherapie oder auch in Kombination zum Einsatz. Für jeden Patienten muss die Therapie individuell entschieden werden. So soll zum Beispiel bei positivem BRAF-V600-Mutationsstatus eine Kombinationstherapie aus einem BRAF-Inhibitor mit einem MEK- Inhibitor oder alternativ mit einem Checkpoint-Inhibitor (PD-1 Monotherapie oder PD-1+ CTLA-4 Antikörpertherapie) durchgeführt werden [13]. Diese Checkpoint-Inhibitoren können ebenfalls bei positivem c-Kit-Mutationsstatus oder nicht resezierbaren Metastasen, hier eventuell in Kombination mit Ipilimumab (= „humaner IgG1 monoklonaler Antikörper, der das zytotoxische T-Lymphozyten-assoziierte Antigen (CTLA-4) auf der T-Zelle blockiert“ [3, 13, 20]), eingesetzt werden [13]. Bei erfolgloser Therapie bei positivem c-Kit-Mutationsstatus ist

1. Einleitung

eine Therapie mit c-Kit-Inhibitoren eine weitere Behandlungsmöglichkeit, wird jedoch aufgrund der „Seltenheit therapierelevanter c-KIT-Mutationen“ „in Zukunft wahrscheinlich eine untergeordnete Rolle spielen“ [13]. Hierbei handelt es sich allerdings aktuell noch um einen „Off-Label-Use“ [13].

Für Patienten mit nicht resezierbaren Metastasen bieten eine Monotherapie mit Dacarbazin [13] sowie eine Polychemotherapie [13] eine Alternative, die aber den oben genannten Therapieschemata unterlegen sind. Für eine Biochemotherapie (Kombinationstherapie bestehend aus einer Polychemotherapie mit Interferon-alpha und Interleukin 2) besteht derzeit keine Therapieempfehlung [13].

Prognose

Die Prognose ist von mehreren Faktoren abhängig. Den wichtigsten stellt die Tumordicke nach Breslow [13] dar, zu den weiteren ausschlaggebendsten Faktoren zählen das initiale Tumorstadium [13], die Mitoserate (besonders entscheidend bei einer Tumordicke kleiner 1 mm, wobei für eine Messung eine generelle Empfehlung besteht)[13], der Lymphknotenstatus [13] sowie Lokalisation und Anzahl der Metastasen [13] (metastasiertes Melanom 1-Jahres-Überleben 25%; 10-Jahres-Überleben unter 10% [22]). Die TNM-Klassifikation ist als alleiniger prognostischer Faktor nicht ausreichend [13]. Histologische Eigenschaften wie die Ulzeration [13] haben einen negativen Einfluss, wohingegen viele therapeutische Möglichkeiten, wie die vollständige Resektabilität [13] und der Einsatz einer medikamentösen Therapie sich durchaus positiv auf die Prognose auswirken können. Daher gewinnt eine genaue Untersuchung des Primärtumors, die Mutationsanalysen inkludiert, und so als Indikation für eine medikamentöse Therapie ausschlaggebend ist, immer mehr an Bedeutung.

1.2. BRAF-Mutation

Definition

BRAF steht für „v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B“ [22]. Dessen höchste Frequenz an Mutationen ist in Melanomen zu finden [23]. Es handelt sich um ein bestimmtes Onkogen, das auf Chromosom 7q34 lokalisiert ist [24] und das BRAF-Protein codiert [1]. Dieses Protein gehört zur Familie der RAF-Kinasen [1], genauer handelt es sich dabei um eine Serin/ Threonin-Kinase [23], die Teil des MEK/ MAPK Signaltransduktionswegs [25] (entsprechend dem RAS/ RAF/ MEK/ ERK [24] - „RAS-RAF-mitogen-activated-protein-(MAP)-kinase kinase (MEK)-extracellular signal-

regulated kinase- (ERK) - MAP kinase“ Signaltransduktionswegs [23]) ist. Dieser Signalweg spielt eine wichtige Rolle in der Regulation intrazellulärer Abläufe wie Proliferation, Wachstum und Überleben [20, 26]. In einer intakten Zelle kommt von außerhalb ein Signal durch eine Bindung an einen EGF-Rezeptor (Epidermal-Growth-Factor). Dieses Signal aktiviert den RAS → RAF → MEK → ERK Signaltransduktionsweg wie in Abbildung 1 dargestellt. Es handelt sich um eine Autophosphorylierung [22]. Eine negative Rückkopplung tritt in der gesunden Zelle automatisch ein, das heißt der Signaltransduktionsweg wird blockiert.

Bei einer BRAF-Mutation ist dieser Signalweg entkoppelt, so dass sich der Signaltransduktionsweg in einem daueraktivierten Zustand befindet, in dem er unabhängig von einer Aktivierung des RAS-Gens und resistent gegenüber einem negativen Rückkopplungssignal ist. Dies hat schnelles Zellwachstum, erhöhtes Überleben der Zelle und Resistenz gegenüber Apoptose zur Folge [26]. Außerdem imponieren Melanome mit positivem BRAF-Mutationsstatus zu klinisch stärker ausgeprägten Eigenschaften (wie häufigere Hirnmetastasierung, kürzere Überlebenszeit im Tumorstadium IV) und sind durch ein aggressiveres biologisches Verhalten charakterisiert (wie u.a. bei jüngerem Patientenalter, an nicht sonnenexponierten Lokalisationen) [27].

Subtypen

Die BRAF-Mutationen sind auf verschiedenen Exons (Exon 11 und 15) zu finden [23, 28]. Die häufigste, die 80-90% [1] betrifft, ist auf Codon 600 im Exon 15 lokalisiert. Dabei handelt es sich um einen Aminosäureaustausch von Valin (V) durch Glutamat (E) (Nukleotid 1799, [27]) mit der Bezeichnung V600E [3]. Seltener tritt die BRAF-Mutation V600K (je nach Literaturangabe variiert die Frequenz: 10-20% [1], 8-20% [27], 7,7% [29]) auf, bei der es zu einem Ersatz der Aminosäure Valin durch Lysin (K) kommt [27]. In noch selteneren Fällen kann der Ersatz auch durch Arginin (R) (1%, V600R), Leucin (M) (0,3%, V600M) oder Aspartatsäure (D) (0,1%, V600D) erfolgen [27, 29]. Bei etwa 7% der BRAF-Mutationen ist die auf Exon 11 lokalisierte BRAF-G469A-Mutation nachzuweisen, bei der es sich um eine „Missense Mutation“ handelt, und auf Codon 469 das Nukleotid Glycin (G) durch Alanin (A) ersetzt wird [30]. Eine genaue Häufigkeitsverteilung ist in Abbildung 2 dargestellt.

1. Einleitung

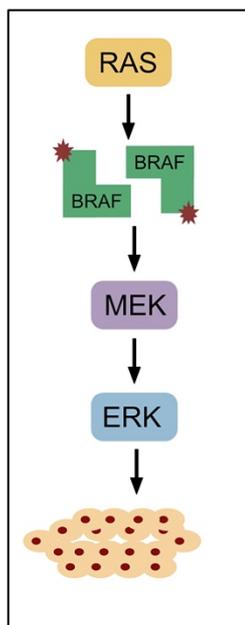


Abbildung 1 „Mitogen activated proteinkinase pathway“ Abbildung übernommen aus [20]

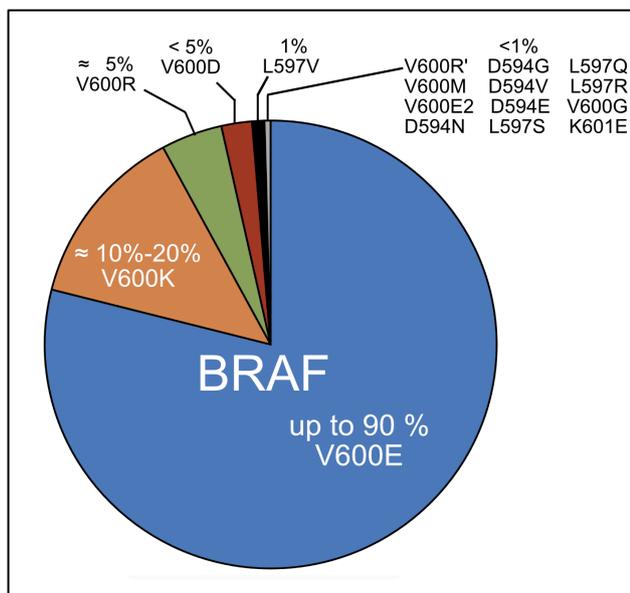


Abbildung 2 Häufigkeitsverteilung der BRAF-Mutationstypen im Melanom, Abbildung übernommen aus [27]

Vorkommen

Die BRAF-Mutation spielt eine Rolle in der Pathogenese verschiedenster maligner Tumoren, die aber signifikante Unterschiede sowohl in Inzidenz, Epidemiologie, Therapie als auch im Therapieerfolg aufweisen [22]. Zu den betroffenen Tumoren zählen vor allem Melanome, bei denen die Mutation am häufigsten zu finden ist, Kolorektalkarzinome, Nicht-kleinzellige-Lungen-Karzinome, Schilddrüsenkarzinome, Haarzelleukämien, Multiple Myelome, Ovarialkarzinome, Mammakarzinome sowie Cholangiokarzinome, hepatozelluläre Karzinome und weitere [22, 23, 26, 29]. Aber nicht nur in maligne entarteten Neoplasien, sondern auch in gutartigen, wie beispielsweise Nävuszellnävi, können BRAF-Mutationen vorkommen [10, 21].

Mutationsnachweis

Für den Nachweis einer BRAF-Mutation gibt es verschiedene diagnostische Möglichkeiten, die in molekularbiologische DNA-Analysen und immunhistologische Methoden unterteilt werden. Für DNA-Analysen können eine Sanger-Sequenzierung, Pyrosequenzierung, eine allelspezifische PCR, die „High-resolution-melting-analysis“, „Next-Generation-Sequenzierung“ und „mass-spectrometry-base-sequencing“ (Sequenom)

durchgeführt werden [29, 31]. Immunhistologisch steht ein vor kurzem entwickelter spezifischer monoklonaler BRAF-Antikörper für die Detektion der BRAF-V600E-Mutation zur Verfügung [29, 32]. Die einzelnen Methoden unterscheiden sich in Bezug auf Kosten, zeitlichem Aufwand, Sensitivität und Spezifität [29, 32, 33].

Therapie

Die Therapie mit BRAF-Inhibitoren, die gezielt in den daueraktivierten Signaltransduktionsweg eingreifen können, wie in Abbildung 3 dargestellt, bietet eine neue und effiziente Möglichkeit für die Behandlung metastasierter Melanome und anderer maligner Tumore. Diese Entwicklung wird in der Literatur sogar als „neue Ära“ [22] tituliert. Der erste BRAF-Inhibitor war Vemurafenib [34], mit seinen Nachfolgern Dabrafenib und Trametinib. Ein Vorteil dieser Medikamente ist das sehr schnelle Ansprechen innerhalb 1-2 Wochen [35]. Nachteilig sind die vielfältigen Nebenwirkungen wie Übelkeit, Erbrechen, Arthralgien, Fatigue-Symptomatik, eine Erhöhung der Aminotransferasen, Alopezie, Photosensitivität, Pruritus, Plattenepithelkarzinome und weitere [3, 20]. Außerdem besteht aufgrund von Resistenzbildungen, die bereits nach 6-7 Monaten auftreten können [27], eine eingeschränkte Behandlungsmöglichkeit [22].

Interessanterweise unterscheidet sich das Ansprechen auf BRAF-Inhibitoren bei den BRAF mutierten Tumor-Entitäten. Beim Melanom haben sie sich als Behandlungsoption etabliert, wohingegen beim Kolorektalkarzinom kein Benefit zu verzeichnen ist [22].

Eine erfolgsversprechende Therapieoption, die das „Overall-Survival“ und „Progression-Free-Survival“ bei Patienten mit BRAF-V600 mutiertem fortgeschrittenem Melanom deutlich verbessert, scheint die Kombinationstherapie von BRAF- und MEK-Inhibitoren darzustellen [27]. Zum Einsatz kommen beispielsweise Dabrafenib und Trametinib oder Vemurafenib und Combimetinib [27].

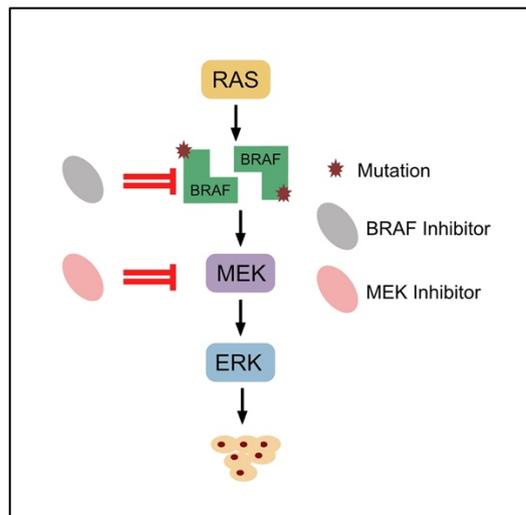


Abbildung 3 BRAF- und MEK-Inhibitorthherapie, Abbildung übernommen aus [20]

Prognose

Die Prognose hat sich durch den Einsatz der BRAF-Inhibitoren signifikant verbessert, da sie den bisherigen Therapieoptionen, inklusive anderen Chemotherapeutika, überlegen sind. So verbessert Vemurafenib im Vergleich zu Dacarbazine die „Overall-response-rate“(ORR), das progressionsfreie Überleben (PFS) und das „Overall-survival (Überleben, OS)“ deutlich [20, 34, 36].

1.3. Homogenität und Heterogenität der Tumorzellen

Intratumorale Homogenität und Heterogenität

Klassischerweise geht man davon aus, dass die Entwicklung von maligne entarteten Tumoren von einer einzelnen, sich dann vermehrenden, genetisch mutierten Zelle ausgeht [36]. Sofern diese sich vermehrt und identisch repliziert, würde man von einer intratumoralen Homogenität, wie in Abbildung 4 links dargestellt, ausgehen. Sollte sich die Tochterzelle vermehren und sich die Zellen unterschiedlich entwickeln beziehungsweise mutieren, kommt es zu verschiedenen Krebszell-Klonen in einer Tumormasse [36] und es entsteht eine intratumorale Heterogenität, wie Abbildung 4 rechts zeigt.

Sehr wichtig und von höchster Aktualität ist die Frage, ob man beim Melanom von einer intratumoralen Homogenität oder Heterogenität ausgeht, da diese Eigenschaften eine entscheidende Rolle für die neusten Therapieoptionen, wie beispielsweise die „targeted therapies“, spielen. In der Literatur wird dies kontrovers diskutiert.

So sind Chiappetta et al. [28], Heinzerling et al. [34], Yancovitz et al. [36], Colombino et

al. [37], Lin et al. [38] und Saint-Jean et al. [39] der Ansicht, dass beim Melanom eine intratumorale Tumorerheterogenität vorliegt. Riveiro-Falkenbach et al. [40], Boursault et al. [32] und Menzies et al. [41] hingegen distanzieren sich von dieser Meinung und sprechen sich für eine Tumorerhomogenität aus. Bedeutend wäre dieses Erkenntnis nicht nur für die Forschung, sondern besonders für die Therapie im klinischen Alltag, die eventuell auch auf andere Tumorerentitäten zu übertragen ist.

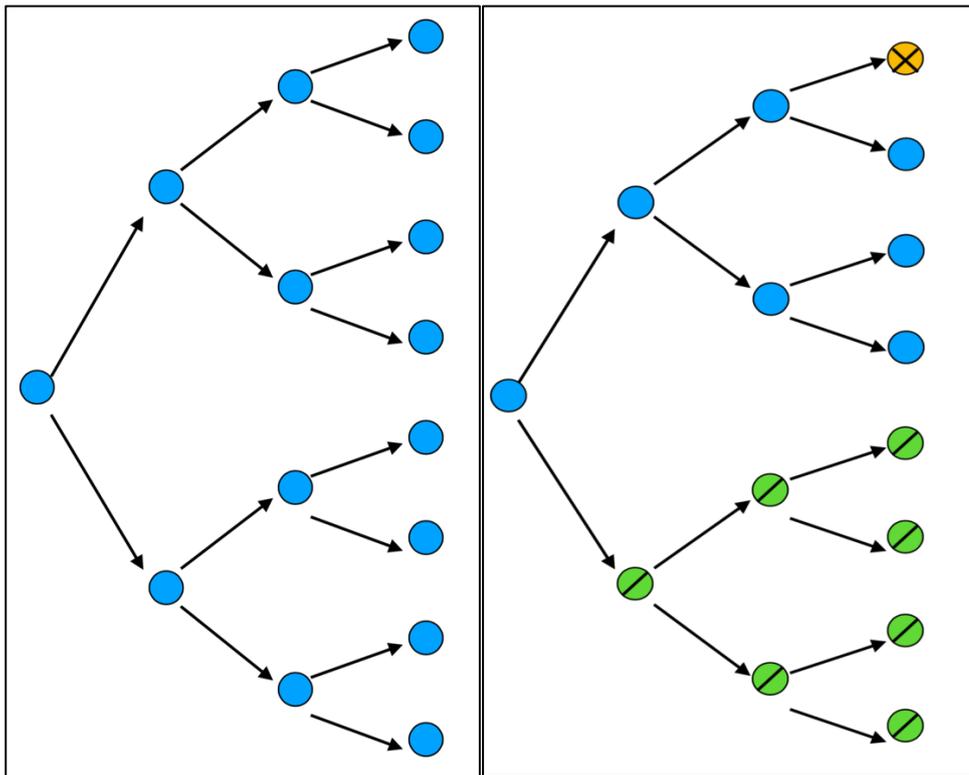


Abbildung 4 Schema der intratumoralen Homogenität (links) und Heterogenität (rechts)

Intertumorale Homogenität und Heterogenität

Neben der intratumoralen Homogenität und Heterogenität wird auch der intertumorale Zusammenhang diskutiert. „Intertumoral“ bezieht sich auf den Vergleich zwischen einem Primärtumor und seinen Metastasen beziehungsweise mehreren Metastasen bei einem Patienten. So handelt es sich um intertumorale Homogenität, wenn die jeweiligen Tumore den gleichen Mutationsstatus aufweisen. Man würde bei einem BRAF-V600E positiven Primärtumor davon ausgehen, dass alle Metastasen ebenfalls diese Mutation tragen [32, 40, 41]. Diese Vorstellung korreliert mit den meisten klinischen Ergebnissen.

Im Gegensatz dazu wird in der Literatur auch eine sogenannte intertumorale Heterogenität [34, 36, 37, 39] demonstriert, bei der im Primärtumor und in den

1. Einleitung

Metastasen verschiedene Mutationen nachweisbar sind. Diese Koexistenz wird auch als Diskordanz bezeichnet.

Die intra- und intertumoralen genetischen Eigenschaften korrelieren miteinander: sollte es eine intratumorale Heterogenität geben, kann diese durch intertumorale Heterogenität belegt werden, wenn die Metastasen einen unterschiedlichen Mutationsstatus aufweisen. Die Erkenntnis über intra- und intertumorale Homo-, beziehungsweise Heterogenität ist nicht nur für das Verständnis der Pathogenese von Melanomen [36] relevant, sondern wäre auch im klinischen Alltag für die Diagnostik und die Optimierung der bestmöglichen Therapie bedeutsam, da eine zielgerichtete Therapie nur bei mutierten Tumoren eine Wirkung zeigt.

Chiappetta et al. [28], Heinzerling et al. [34], Yancovitz et al. [36], Colombino et al. [37], Lin et al. [38] und Saint-Jean et al. [39] finden in ihren Arbeiten intra- und intertumorale Tumorerheterogenität. Mit dem Nachweis von Wildtyp-Zellen und Zellen mit dem Nachweis einer Mutation beziehungsweise verschiedener Mutationen in einem Tumor und somit einer Koexistenz multipler Tumorsubklone in einem Tumor [28, 36, 37] mittels Sequenzierung [28, 38] oder Sequenzierung und „BRAF-V600E Spezifische SNaPshot Analyse“ von durch Lasermikrodissektion gewonnene Zellen und immunhistochemischer Färbung mit einem speziellen BRAF-V600E-Antikörper [34], legen sie die intratumorale Heterogenität dar. Für die intertumorale Heterogenität werden durch unterschiedliche Methoden mehrere Tumore (je nach Verfügbarkeit Primärtumor und Metastasen oder mehrere Metastasen) von einem Patienten analysiert und miteinander verglichen.

Riveiro-Falkenbach et al. [40], Boursault et al. [32] und Menzies et al. [41] belegen in ihren Arbeiten intra- und intertumorale Tumorphomogenität, wobei für die intratumorale Homogenität ausschließlich eine immunhistochemische Färbung mit einem BRAF-V600-Antikörper genutzt wird. Sie dokumentieren zwar diskordante Ergebnisse, begründen diese Heterogenität jedoch, indem sie einen zweiten Primärtumor (4.4.3.1.), Tumorprogression (4.4.2.), die Nachweismethode (4.4.3.2.) oder weiteres verantwortlich machen (4.4.3.3.). Für Differenzen in der immunhistochemischen Analyse, die sich durch eine unterschiedliche Färbungsintensität äußert, werden (Fixierungs-)Artefakte [32, 40, 41], morphologische Unterschiede [32], nekrotische Areale [32, 40, 41] und weitere aufgezählt.

**1.4. Zielsetzung: Experimentelle Untersuchung zur Tumorzellheterogenität
anhand der BRAF-V600-Mutationsfrequenz**

Durch die vorliegende Arbeit soll ein besseres Verständnis für intratumorale Eigenschaften auf genetischer Ebene beim Melanom gewonnen werden. Im Vordergrund steht die Frage, ob es sich um eine intratumoral homogene oder heterogene Neoplasie handelt. Dazu werden bei Primärmelanomen jeweils zahlreiche Regionen in mehreren Gebieten auf Mutationen untersucht und miteinander verglichen. Für eine präzise Auswahl und Dokumentation der zu analysierenden Zellen werden diese mittels Lasermikrodissektion gewonnen. Die Zellpopulation beschränkt sich auf eine kleinstmögliche, um eine repräsentative Aussage treffen zu können und der Detektionsgrenze und dem Grenzbereich der PCR-Möglichkeiten möglichst nahe zu kommen.

2. Material und Methoden

2.1. Probenkollektiv

Die Auswahl der Primärtumore erfolgte nach Verfügbarkeit und Mutationsstatus. Der vorbekannte Mutationsstatus wurde anhand einer DNA-Analyse mittels manueller Mikrodissektion (siehe 2.8.) gewonnenen Tumormaterials bestimmt. Kriterien, wie Alter und Geschlecht der Patienten, Pigmentierung, beziehungsweise Melaningehalt des Melanoms, Sonnenexposition sowie die Tumorlokalisierung und weitere wurden nicht berücksichtigt. Ein Einfluss einiger dieser Kriterien auf die Tumorheterogenität ist laut Shain et al. [10] möglich. In dieser Arbeit steht die Frage nach der intratumoralen Heterogenität im Vordergrund, daher wird der Zusammenhang nicht weiter erörtert.

2.1.1. Voruntersuchungen

Zunächst werden Voruntersuchungen zur Anpassung der Methodik und zur Entwicklung eines optimierten Protokolls für den Hauptversuch der Primärtumore durchgeführt. Es werden vier Tumore verwendet: zwei Melanome - beides Primärtumore - mit positivem BRAF-V600E-Mutationsstatus und einer Mindestgröße von 4 mm, um ausreichend Material für die Untersuchungen zur Verfügung zu haben, sowie ein Melanom mit positivem NRAS- und negativem BRAF-Mutationsstatus und ein Basalzellkarzinom. Patientenspezifische Eigenschaften wie Alter, Geschlecht, Vorerkrankungen, Tumorlokalisierung, TNM-Stadium und das Alter des Präparates werden bei der Auswahl nicht berücksichtigt.

2.1.2. Hauptversuch

Bei den ausgewählten Melanomen handelt es sich ausschließlich um Primärtumore mit bekanntem BRAF-Mutationsstatus. 10 der 12 Melanome weisen eine BRAF-Mutation auf, darunter 9 der 10 eine BRAF-V600E-Mutation und eines der 10 eine BRAF-V600K-Mutation. Die beiden Melanome mit negativem BRAF-Mutationsstatus charakterisieren sich durch eine NRAS-Mutation (eine NRAS-Q61K- in Exon 3 und eine NRAS-Q61L-Mutation in Exon 3). Patientenspezifische Eigenschaften werden auch hier nicht berücksichtigt.

2.2. Material und Aufbereitung

Bei den untersuchten Tumoren handelt es sich ausschließlich um archivierte, im Anschluss an die chirurgische Exzision in Formalin fixierte und in Paraffin eingebettete Melanome (dieser Ablauf ist essentiell für die Haltbarkeit und Strukturhaltung der Präparate, die als „Formalin-fixiert und in Paraffin eingebettete“ Präparate, kurz FFPE, bezeichnet werden) aus dem histologischen Labor der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig-Maximilians-Universität München. Die Patientendaten und Tumore sind vollständig anonymisiert.

Von diesen Melanomen werden 6 µm dünne Schnitte angefertigt, auf Objektträger fixiert und entparaffiniert. Auf eine Färbung wird verzichtet, um die Arbeit des Lasermikrodissektionsgerätes, die DNA-Qualität und die Replikation der DNA möglichst nicht zu beeinflussen. HE gefärbte Schnitte können parallel für eine sichere Identifizierung der Tumorareale und Vermeidung einer Vermischung der zu untersuchenden Tumorzellen mit Lymphozyten oder anderen Zellen [36] mikroskopiert werden. Für die Untersuchung von Tumoren wurde in mehreren Publikationen [28, 36] eine Färbung mit Hämatoxylin-Eosin (HE) dokumentiert, wohingegen bei Ihle et al. [29] und bei den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit auf eine Färbung verzichtet wurde. Aus den angefertigten Schnitten werden mittels Lasermikrodissektion Zellen gewonnen, deren DNA durch Verdau mit einer Proteinase freigelegt und in der PCR (Polymerase-Kettenreaktion) amplifiziert wird. Nach quantitativer Auswertung des Amplifikats mittels Bioanalyser wird die DNA für den Nachweis des Mutationsstatus pyrosequenziert.

2.3. Lasermikrodissektion

Für eine präzise Selektion der Zellen werden diese aus den angefertigten histologischen Schnitten mittels Lasermikrodissektion unter mikroskopischer Sicht mikrodisseziert. Eine Vermischung mit Gewebe, das nicht mit in die Untersuchung inkludiert werden soll, kann so minimiert werden. Die Arbeiten werden an einem Lasermikrodissektionsgerät der Firma Zeiss mit dem Programm Palm@Robo V2.2 im Pathologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt. Der Arbeitsplatz ist in Abbildung 5 dargestellt. Während des gesamten Arbeitsablaufes werden Handschuhe getragen, um eine Kontamination der Präparate zu vermeiden. In Tabelle 6 sind die Geräte, Gefäße und Reagenzien für die Lasermikrodissektion gelistet.

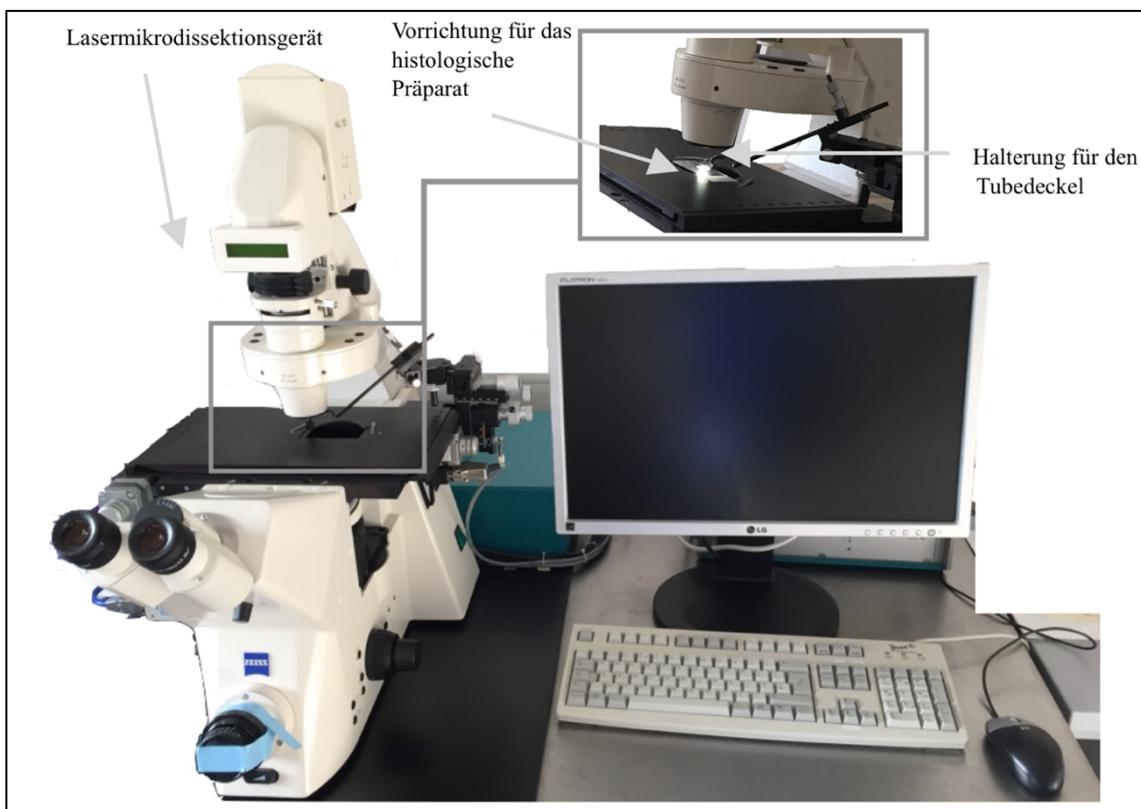


Abbildung 5 Arbeitsplatz mit Lasermikrodissektionsgerät und Computer

Arbeitsablauf:

1. Der Objektträger wird mit dem Schnitt nach oben auf das Gerät gelegt und fixiert. Ein Tubedeckel, der vom restlichen Tube mit einer Schere getrennt und dessen Innenseite dünn mit Hilfe einer Pipettenspitze mit PCR-Öl bestrichen worden ist, wird in die dafür vorgesehene Vorrichtung am Lasermikrodissektionsgerät gelegt. Das Tube und der dazugehörige Deckel werden entsprechend beschriftet, um die Zusammengehörigkeit zu dokumentieren und zu gewährleisten. Im Tubedeckel wird das aus dem histologischen

Präparat herauskatapultierte Material „gesammelt“, das PCR-Öl unterstützt das Haften des Materials im Deckel.

2. Mithilfe einer speziellen Software (Palm@Robo V2.2) werden über den Computer die Einstellungen für das Lasermikrodissektionsgerät festgelegt. Dabei kann der histologische Schnitt wie bei einem Mikroskop vergrößert begutachtet und das gewünschte Tumorgebiet fokussiert werden. Bei einer 40fachen Vergrößerung kann die Laserfunktion genutzt werden. Dabei besteht die Möglichkeit, verschieden große Areale auszuwählen und diese mittels UV-Energie in den Deckel zu katapultieren.

Bei der Auswahl eines größeren Gebiets wird nicht bei jedem „Schuss“ automatisch eine Zelle katapultiert, sondern es kann auch umliegendes Gewebe getroffen werden. Daher lohnt es sich für eine präzise Arbeit, die Zellen eines zu mikrodissezierenden Areals einzeln auszuwählen und zu zählen.

3. Nach Abschluss der Dissektion wird der Deckel vorsichtig zurück auf das dazugehörige Röhrchen gesetzt und der Objektträger zum Schutz des Präparates vor Staub und Kontamination zurück in den Tubehalter gestellt.

Geräte und Gefäße	
Objektträger	Superfrost Thermo Scientific, Thermo Fisher, Braunschweig
Lasermikrodissektionsgerät m200 mit Palm@RoboV2.2 Computerprogramm	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Tube 0,2 ml	Peqlab a VWR Company, Erlangen
Pipette XL 3000 TM 0,5 – 10 µl	Denville Scientific Thomas Scientidic, LLC company, Holliston, Massachusetts, USA
Pipettenspitzen 1-20 µl	Sorenson BIOSCIENCE, Inc., Salt Lake City, USA
Pinzette	
Schere	
Reagenzien	
PCR Mineralöl	Sigma ALDRICH MERCK, St.Louis, Missouri, USA

Tabelle 6 Geräte, Gefäße und Reagenzien bei der Lasermikrodissektion

2.4. DNA-Aufbereitung

Um die lasermikrodissezierten Proben analysieren zu können, muss zunächst die DNA mit Hilfe einer Proteinase „freigelegt“ werden. In Tabelle 7 sind die Geräte, Gefäße und Reagenzien und in Tabelle 8 die Zusammensetzung des Reagenzes für die DNA-Aufbereitung aufgeführt.

Arbeitsablauf:

1. In den Tubedeckel werden 9 µl TE Puffer (*A) pipettiert, das Tube wird verschlossen und anschließend auf dem Deckel stehend für 20 Minuten auf eine 90°C vorgeheizte Wärmeplatte gestellt. Durch diesen Arbeitsschritt sollen sich die extrahierten Proben von der Innenseite des Deckels lösen, um durch das anschließende Zentrifugieren die Proben auf den Grund des Tubes befördern zu können.
2. Im Anschluss werden 5 µl Proteinase K, ein Enzym zur „Freilegung“ der DNA, in die Tubes pipettiert, diese gevortext und erneut zentrifugiert, um die Proteinase K gleichmäßig in den Proben zu verteilen.
3. Im „Thermocycler Applied Biosystem Veriti“ ermöglicht die Programmfunktion „ProtK - Verdau over night“ bei optimalen Bedingungen die enzymatische Arbeit der Proteinase K, die für zwölf Stunden sämtliche Eiweiße, Enzyme, Proteine, Organellen „verdaut“ und somit die gewünschte DNA „freilegt“.

Schritte des Thermocyclers, siehe Abbildung 6:

- I. bei 55°C für 12x 59 Minuten als perfekte Arbeitstemperatur für die Proteinase K
 - II. bei 95°C für 5 Minuten zur Inaktivierung und Zerstörung der Proteinase K
 - III. bei 10°C unendliche Kühlung bis zur Entnahme der Tubes aus dem Gerät
4. Es resultieren 14 µl DNA-Ansatz.

Im Verlauf der Experimente wird die Menge der Proteinase K und des Puffers reduziert. Eine Übersicht über die eingesetzte Proteinase K und des TE Puffers sowie der daraus resultierenden und in die PCR eingesetzte Menge für die durchgeführten Experimente bietet Tabelle 9.

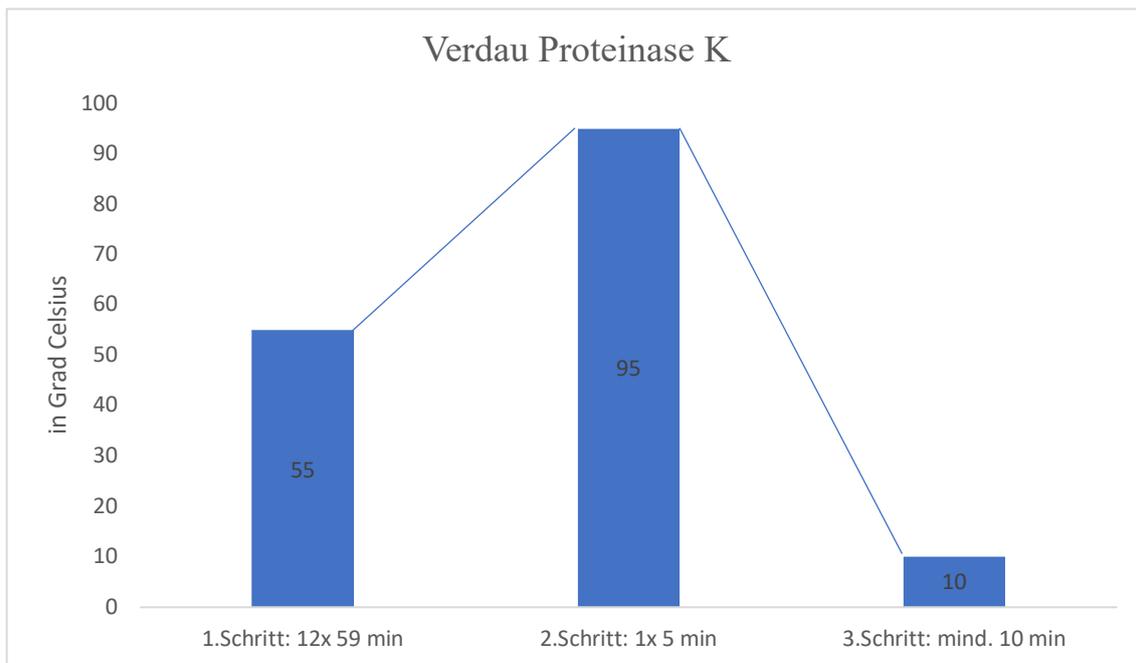


Abbildung 6 Verdau der Proteinase K (Diagramm erstellt in Anlehnung an das Diagramm der Arbeitsschritte des Thermocycler Applied Biosystem Veriti 96 Well Thermal Cycler)

Geräte und Gefäße	
Vortexer	Bender & Hobein AG, Zurich, Switzerland
Zentrifuge	Labnet International, Inc., Edison, New Jersey, USA
Wärmeplatte	Störk-Tronic Medax Nagel GmbH, Kiel
Applied Biosystem Veriti Thermocycler	Applied Biosystem (Thermo Fisher Scientific), Waltham, Massachusetts, USA
Pipette 1-10 µl Eppendorf Research	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen 10 µl ClearLine	Dutscher Group, Kisker Biotech GmbH & CoKG, Steinfurt
Reagenzien	
Tris EDTA Puffer Solution	Sigma ALDRICH MERCK, St.Louis, Missouri, USA
Tween 20 for synthesis	MERCK, Darmstadt Sigma ALDRICH MERCK, St.Louis, Missouri, USA
Proteinase K Solution	Qiagen, Hilden

Tabelle 7 Geräte, Gefäße und Reagenzien bei der DNA Aufbereitung

Zusammensetzung der Reagenzien für die DNA-Aufbereitung (*A)		
*A	TE Puffer	796 µl Tris EDTA Puffer Solution : 4 µl Tween 20

Tabelle 8 Zusammensetzung des Reagenzes für die DNA-Aufbereitung

Experiment	TE Puffer	Proteinase K	Gesamtmenge	Ansatz in PCR
3.1.	9 µl	5 µl	14 µl	1 µl
3.4.	9 µl	5 µl	14 µl	1; 2; 2,5; 4; 5 µl
3.5.	9 µl	5 µl	14 µl	1; 2,5; 4; 5 µl
3.6.1.	9 µl	5 µl	14 µl	1; 2,5; 4; 5 µl
	18 µl	10 µl	28 µl	
3.6.2.	9 µl	5 µl	14 µl	1; 2,5; 4; 5 µl
	18 µl	10 µl	28 µl	
3.7.	9 µl	5 µl	14 µl	4 µl
3.8.	9 µl	5 µl	14 µl	4 µl
		4 µl	13 µl	
		3 µl	12 µl	
		2 µl	11 µl	
		1 µl	10 µl	
3.9.	9 µl	5 µl	14 µl	4 µl
		4 µl	13 µl	
		3 µl	12 µl	
		2 µl	11 µl	
		1 µl	10 µl	
3.10.	5 µl	1 µl	6 µl	6 µl
		2 µl	7 µl	7 µl
3.11. Hauptversuch	5 µl	2 µl	7 µl	7 µl

Tabelle 9 Übersicht der eingesetzten Proteinase K und des TE Puffers sowie der daraus resultierenden Gesamtmenge und Ansatz für die PCR

2.5. PCR

„PCR“ steht für „Polymerase-Chain-Reaction“, zu deutsch Polymerase-Kettenreaktion. Dabei wird die gewonnene DNA vervielfältigt, um ausreichend Material für die Analyse der Sequenzabfolge und somit für den Mutationsnachweis beziehungsweise -status zu erhalten.

Wichtig ist es, bei allen Arbeitsschritten sehr sorgfältig und stets mit Handschuhen zu arbeiten, um eine Kontamination zu vermeiden. Die folgenden Arbeitsschritte werden im Labor für Molekulare Dermatopathologie der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt. In Tabelle 10 sind die Geräte, Gefäße und Reagenzien und in Tabelle 11 die Zusammensetzung des Reagenzes für die PCR gelistet.

Arbeitsablauf:

1. Zunächst muss eine sogenannte „Master Mix Mischung“ (*PCR) erstellt werden, die die nötigen Reagenzien, wie z.B. Enzym, dNTPs usw. für die Replikationen der DNA enthält. Die Tubes mit den Reagenzien und dem erstellten Master Mix müssen während des gesamten Arbeitsablaufs in Kühlblöcken gelagert werden.
2. Der Master Mix wird für alle Proben in der entsprechenden Menge für den jeweiligen PCR-Lauf protokollkonform in einem 1,5 ml Tube erstellt und anschließend je 23 µl in 0,2 ml Tubes verteilt, entsprechend ein Tube für jede Probe. Dies impliziert pro Lauf auch eine Positiv- (Master Mix mit Kontroll DNA) und eine Negativkontrolle (reiner Master Mix).
3. Im nächsten Schritt werden die aufgearbeiteten Proben gevortext, zentrifugiert und in die vorbereiteten Tubes pipettiert. Für jede Probe wird jeweils eine neue Spitze verwendet. Die Menge der eingesetzten Probe wird je nach Vorgabe des entsprechenden Versuchs festgesetzt.
4. Die Vorbereitung der Positivkontrolle soll als letztes erfolgen, um eine Kontamination und somit eine Verfälschung der anderen Proben zu vermeiden. Hierfür wird 1 µl Kontroll-DNA in ein eigens dafür mit Master Mix vorbereitetes Tube pipettiert. Bei der Positivkontrolle handelt es sich um eine spezielle „Wildtyp Kontroll-DNA“ der Firma Qiagen (EpiTect Control DNA, Verdünnung 1:5). Diese wird zusätzlich durchgeführt, um die PCR-Reaktion zu bestätigen und falsch negative Ergebnisse zu entdecken.
5. Die Negativkontrolle besteht ausschließlich aus dem Master Mix. Sie wird durchgeführt, um falsch positive Ergebnisse und somit eine Kontamination der

2. Material und Methoden

Reagenzien auszuschließen, die die Ergebnisse der Proben bei der PCR verfälschen würde.

6. Anschließend werden die Proben in den vorgeheizten Thermo Cycler „Biometra TGradient“ (Deckel: 99°C, Gerät: 50°C) gesammelt eingesetzt und das Programm zur Replikation der DNA gestartet.

7. Arbeitsschritte des Thermocyclers (insgesamt 120 min):

I. 15 Minuten bei 95°C Präaktivierung der TAQ-Polymerase

= der Antikörper an der TAQ-Polymerase wird bei 70°C abgespalten, um das Enzym freizusetzen und dessen Arbeiten zu ermöglichen

II. je 30 Sekunden für jeden Temperaturschritt der 45 Zyklen

95°C = Denaturierung der DNA

↓

55°C = Anlagerung des Primers an die Ziel-DNA (Annealing-Temperatur)

↓

72°C = Einbauen der Nukleotide durch die TAQ-Polymerase an die Ziel-DNA (=Extension)

III. 10 Minuten bei 72°C zur Abschluss-Extension

= angefangene Stränge werden komplettiert, um möglichst wenig unvollständige Stränge und somit ein bestmögliches Ergebnis zu erhalten

IV. unendliche Kühlung bei 15°C zum Stoppen der Arbeitsabläufe und Kühlung

8. Zur Verstärkung des Amplifikates beziehungsweise um eine höhere Ausbeute des Amplifikats zu generieren, wird eine Re-PCR erstellt. Hierfür wird für jede Probe, wie in 1.-3. beschrieben, ein weiteres Tube mit 23 µl Master Mix erstellt und 3 µl des Produktes aus der 1. PCR für die 2.Runde (also die Re-PCR) eingesetzt. Die Tubes werden für eine erneute Amplifikation der bereits generierten DNA-Stränge in den vorgeheizten Thermocycler positioniert und das entsprechende Programm nochmals gestartet (siehe Schritt 6. und 7.).

Geräte und Gefäße	
wasserfester Stift	
Micro-Centrifuge II	LabTech, DAIHAN LABTECH Co.LTD., Heathfield, England
Biofuge 13 Zentrifuge	Heraeus Instruments GmbH, Sepatech, Hanau
Vortexgerät Vortex Genie 2	Bender & Hobein AG, Zurich, Switzerland
Thermocycler TGradient	Biometra GmbH, Göttingen
Pipetten Sartorius BioHit mLine M 10: 0,5 – 10 µl M100: 10 – 100 µl M200: 20 – 200 µl M1000: 100 – 1000 µl	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Quali-Maximum Recovery TipsPipettenspitzen 0,1 – 10 µl (A300SX-MR) 1,0 - 100 µl (A100S-MR) 1,0 - 200 µl (A200S-MR) 100 - 1000 µl (A1000S-MR)	Kisker Biotech GmbH & CoKG, Steinfurt
Kühlblöcke	Eppendorf, Hamburg
0,2 ml PCR-Tubes	Kisker Biotech GmbH & CoKG, Steinfurt
1,5 ml Mikro-Tubes	Sarstedt, Nümbrecht, Germany
Reagenzien	
BRAF15-PS-for: (unmodified DNA Oligo) 5'→ 3' TGA AGA CCT CAC AGT AAA AAT AGG (24)	Eurofins Genomics, Ebersberg
BRAF15-PS-BIO-rev.: (modified DNA Oligo)[BIO] 5'→ 3' TCC AGA CAA CTG TTC AAA CTG AT (23)	Eurofins Genomics, Ebersberg *am 5'-Ende Bio = Biotin/ biotiniliert, damit Streptavidin hier bindet
PyroMark PCR Kit 200 x 25 µl (enthält: M.Mix, C.Color, H.O)	Qiagen, Hilden
Kontroll DNA, EpiTect unmethylated control DNA 50 ng/ µl	Qiagen, Hilden

Tabelle 10 Geräte, Gefäße und Reagenzien bei der PCR

2.6. Bioanalyser (Kapillar-Gel-Elektrophorese)

Die quantitative Bestimmung des PCR-Produktes erfolgt mit dem Bioanalyser Agilent 2100 mit der „2100 Agilent Expert“ Software B.02.08, um die entsprechende Größe und Qualität des PCR-Produktes zu definieren und somit zu erkennen, ob ausreichend Material für eine weitere Auswertung vorhanden ist. Über den Computer wird das Programm gesteuert und die Proben können so für die Dokumentation und Zuordnung genauer bezeichnet werden. Pro Lauf werden bis zu 12 Proben analysiert. Die Genauigkeit der Ergebnisse der Analyse trifft auf ca 8 bis 10 Basenpaare zu. Zur Veranschaulichung des Bioanalyzers und der Arbeitsschritte dienen die Abbildung 7 und Abbildung 8. In Tabelle 12 sind die Geräte, Gefäße und Reagenzien und in Tabelle 13 die Zusammensetzung für die Reagenzien für den Bioanalyser aufgeführt.

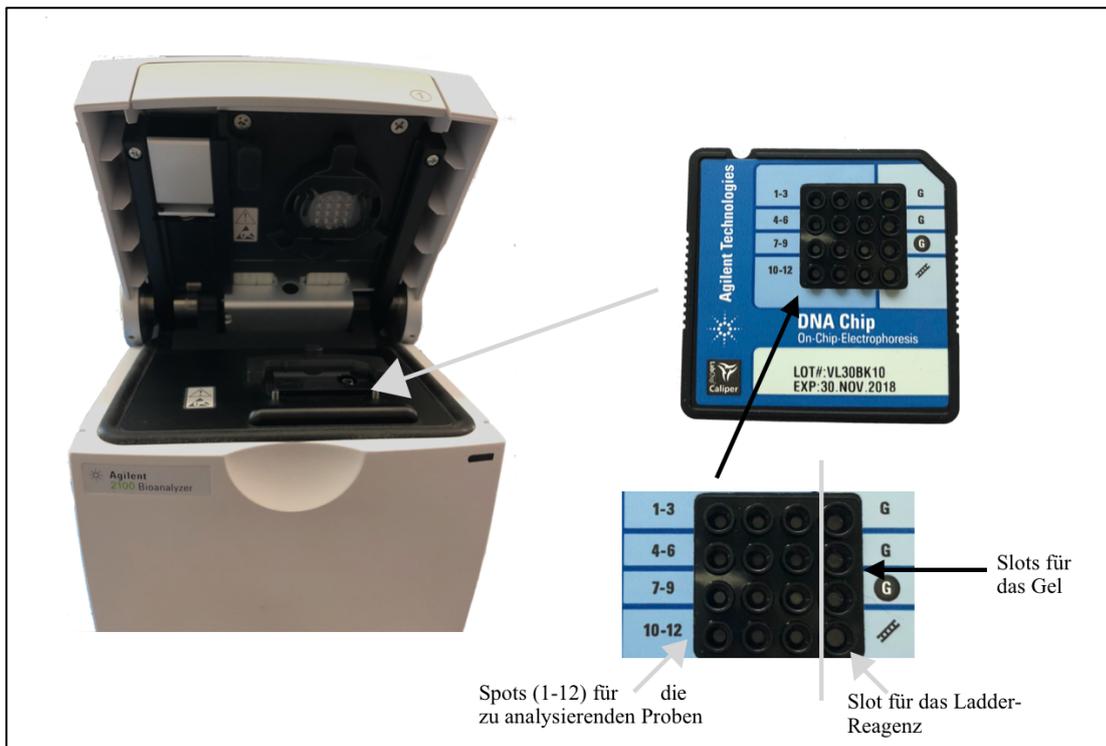


Abbildung 7 Bioanalyser mit speziellem Einsatz für den DNA-Chip und DNA-Chip

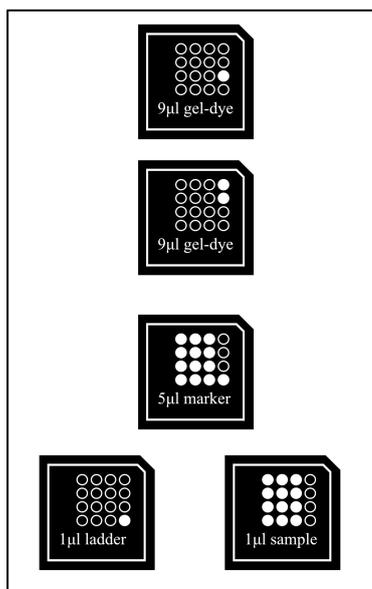


Abbildung 8 Bioanalyser Chip, aus der Anleitung Agilent DNA 1000 it Quick Start Guide, ISBN: G2938-90015

Arbeitsablauf:

1. Ein spezieller DNA-Chip (Agilent 1000 Kit) mit 16 Slots wird in die Chip-Priming-Station positioniert. Die nötigen Reagenzien müssen vor Gebrauch für 30 Minuten bei Raumtemperatur lichtgeschützt gelagert werden.
2. In das dafür vorgesehene Slot werden 9 µl Gel pipettiert, die Priming-Station verschlossen und der Druckstempel für eine Minute von der Markierung „1 ml“ bis zum Einrasten an einem speziellen Clip gedrückt.
3. Nach Öffnen der Priming-Station werden in zwei weitere Slots je 9 µl Gel pipettiert sowie für jede zu analysierende Probe und das Ladder-Reagenz 5 µl eines speziellen „low and high Markers“ und je 1 µl der gewünschten Probe beziehungsweise 1 µl Ladder-Reagenz. Dieses ist für die Auswertung der Ergebnisse zur Orientierung und genaueren Berechnung der Höhe der Peaks und der Fragmentgröße nötig, siehe Abbildung 9. Genügend Material für eine weitere Auswertung steht bei einem Amplifikat von ca 97-100 bp zur Verfügung (siehe Abbildung 10). Sollte dies nicht der Fall sein entsteht entweder kein Peak oder dieser ist etwa 66-69 bp hoch. Hierbei handelt es sich um einen sogenannten Primer Dimer (siehe Abbildung 11, Erklärung siehe Tabelle 19).
4. Bei 2.000 Umdrehungen werden die pipettierten Reagenzien im DNA-Chip auf dem Schüttler für eine Minute gevortext.
5. Dann wird der Chip in das Gerät eingesetzt und die Analyse gestartet. Die Auswertung kann über den Computer gesichtet werden.
6. Nach jedem Lauf muss zur Reinigung der 16 Elektroden, die den Kontakt zu den Proben und Reagenzien im Gel herstellen und den Gel-Lauf ermöglichen, in einen Chip 350 µl Aqua dest pipettiert und in das Gerät eingesetzt werden.

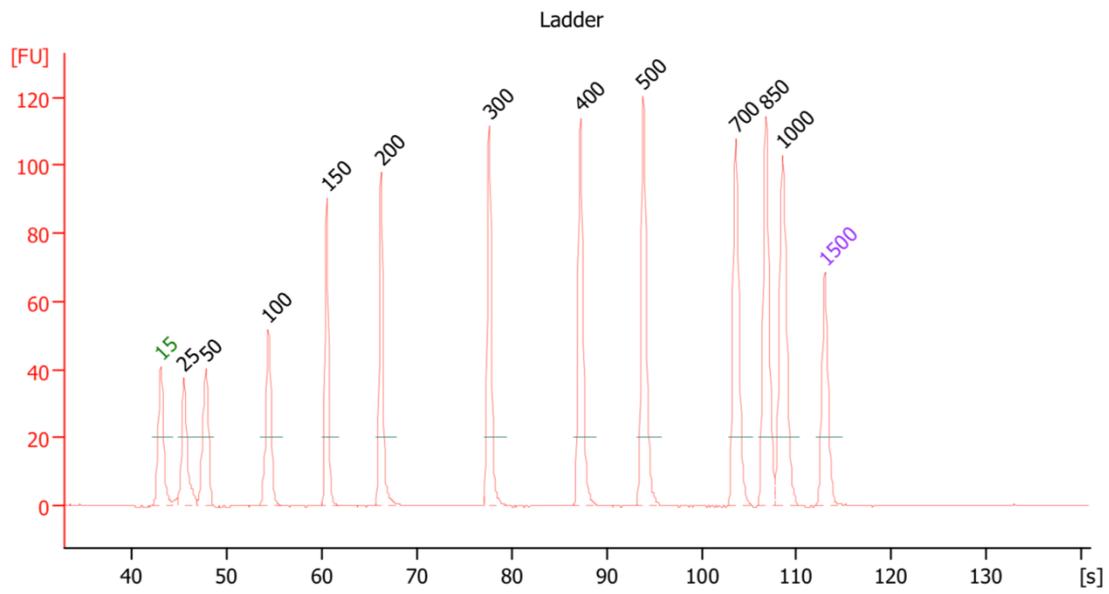


Abbildung 9 Analyse des Bioanalyzers: Ladder

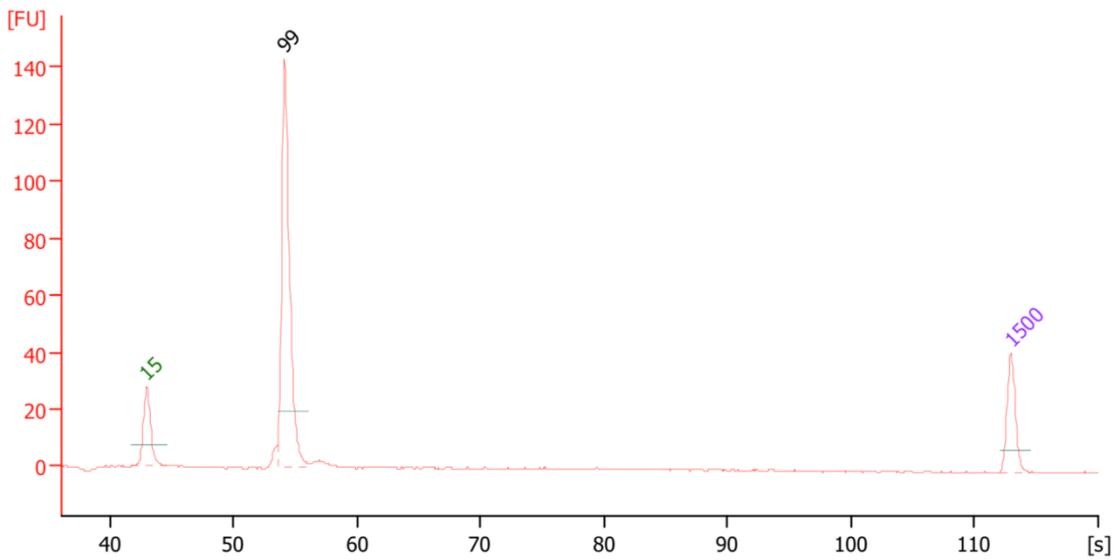


Abbildung 10 Analyse des Bioanalyzers: auswertbares Amplifikat

2. Material und Methoden

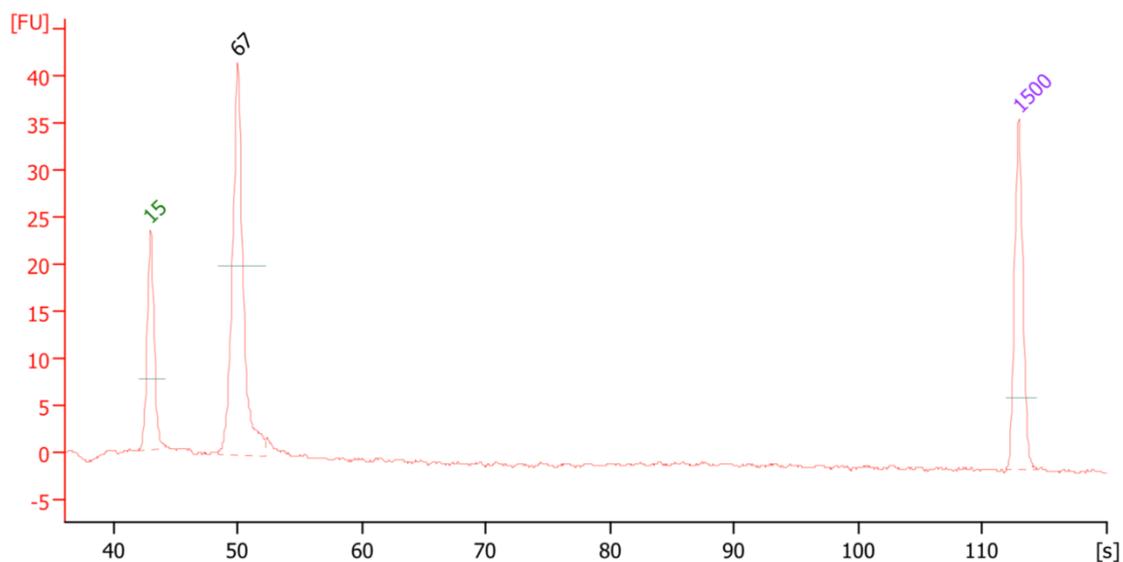


Abbildung 11 Analyse des Bioanalyzers: Primer Dimer

Geräte und Gefäße	
Agilent 2100 Bioanalyzer mit Agilent Expert 2100 Computersoftware B.02.08	Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA
Chip Priming Station (Stempel)	Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA
Chip-Vortexer, Vortexer , MS2 S8 Minishaker	Janke und Kunkel ,IKA Works, Inc., Staufen
DNA Chip	Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA
Pipetten Sartorius BioHit mLine M10: 0,5 – 10 µl M100: 10 – 100 µl M200: 20 – 200 µl M1000: 100 – 1000µl	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Quali-Maxymum Recovery TipsPipettenspitzen (Rnase-DNase-u- Pyrogen frei) 0,1 – 10 µl (A300SX-MR) 0,1 – 10 µl (A300S-MR) 1,0 – 100 µl (A100S-MR) 1,0 – 200 µl (A200S-MR) 100 – 1000 µl (A1000S-MR)	Kisker Biotech GmbH & CoKG, Steinfurt
Wecker	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe

2.6. Bioanalyser (Kapillar-Gel-Elektrophorese)

Reagenzien	
PCR Wasser „Aqua“	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Reagent Kit Agilent DNA 1000 (enthält: Gel, Ladder, DNA Chip)	Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA

Tabelle 12 Geräte, Gefäße und Reagenzien für den Bioanalyser

Zusammensetzung der Reagenzien für den Bioanalyser	
Gel	Für die Herstellung des Gels werden die nötigen Reagenzien „gebrauchsfertig“ geliefert. Hierzu zählen eine Filter-Einheit sowie ein Tube mit DNA-Farbkonzentrat (vom Verbraucher blau markiert) und eines mit DNA-Gel-Matrix (vom Verbraucher rot markiert), die vor der Verwendung 30 Minuten bei Raumtemperatur gelagert werden müssen. Nach kurzem Vortexen und Anzentrifugieren beider Tubes werden 25 µl von dem DNA-Farbkonzentrat in die DNA-Gel-Matrix pipettiert. Anschließend wird die Mischung gevortext, zentrifugiert, in die Filter-Einheit pipettiert und danach bei 6.000 rpm für 15 Minuten erneut zentrifugiert. Nach Entfernung des Filters aus der Filter-Einheit ist das Gel gebrauchsfertig.
Marker	Der Marker begrenzt den Bereich (15-1500bp, low and high marker), in dem die Analyse stattfinden soll.
Ladder	Die Ladder ist als Orientierung und Vorgabe eines Standards für die Software des Geräts nötig, damit dieses anhand der definierten Größen die Amplifikate in den Proben berechnen kann.

Tabelle 13 Zusammensetzung der Reagenzien für den Bioanalyser

2.7. Pyrosequenzierung

Mithilfe der Pyrosequenzierung wird die genaue Basen-Sequenzabfolge und somit auch der Mutationsstatus bestimmt. Das Pyrosequenzierungsgerät und die dazugehörige Arbeitsstation sind in Abbildung 12 und Abbildung 13 dargestellt. In Tabelle 14 sind die Geräte, Gefäße und Reagenzien und in Tabelle 15 die Zusammensetzung für die Reagenzien für die Pyrosequenzierung zusammengefasst.

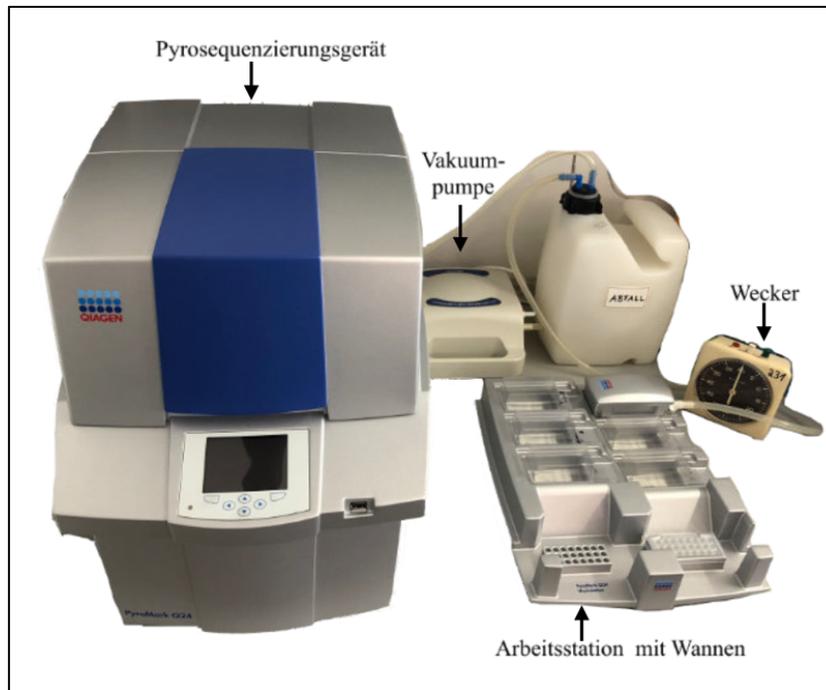


Abbildung 12 Pyrosequenzierungsgerät und Arbeitsstation



Abbildung 13 Arbeitsstation mit Wannen

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	BRAF Exon15, 13 Mutationen	BRAF Exon15, 13 Mutationen	BRAF Exon15, 13 Mutationen	BRAF Exon15, 13 Mutationen	BRAF Exon15, 13 Mutationen	BRAF Exon15, 13 Mutationen	BRAF Exon15, 13 Mutationen	BRAF Exon15, 13 Mutationen
	#1 1.PT Histonummer (Nr.1) 25	#2 1.PT Histonummer (Nr.2) 26	#3 2.PT Histonummer (Nr.1) 27	#4 2.PT Histonummer (Nr.2) 28	#5 3.PT Histonummer (Nr.1) 29	#6 3.PT Histonummer (Nr.2) 30	#7 4.PT Histonummer (Nr.1) 31	#8 4.PT Histonummer (Nr.2) 32
	2.PCR vom 20.07.2017	2.PCR vom 20.07.2017	2.PCR vom 20.07.2017	2.PCR vom 20.07.2017	2.PCR vom 20.07.2017	2.PCR vom 20.07.2017	2.PCR vom 20.07.2017	2.PCR vom 20.07.2017
B	BRAF Exon15, 13 Mutationen	BRAF Exon15, 13 Mutationen	BRAF Exon15, 13 Mutationen	BRAF Exon15, 13 Mutationen	BRAF Exon15, 13 Mutationen	BRAF Exon15, 13 Mutationen	BRAF Exon15, 13 Mutationen	BRAF Exon15, 13 Mutationen
	#9 5.PT Histonummer (Nr.1) 33	#10 5.PT Histonummer (Nr.2) 34	#11 6.PT Histonummer (Nr.1) 35	#12 6.PT Histonummer (Nr.2) 36	#13 7.PT Histonummer (Nr.1) 37	#14 7.PT Histonummer (Nr.2) 38	#15 8.PT Histonummer (Nr.1) 39	#16 8.PT Histonummer (Nr.2) 40
	2.PCR vom 20.07.2017	2.PCR vom 20.07.2017	2.PCR vom 20.07.2017	2.PCR vom 20.07.2017	2.PCR vom 20.07.2017	2.PCR vom 20.07.2017	2.PCR vom 20.07.2017	2.PCR vom 20.07.2017
C	BRAF Exon15, 13 Mutationen	BRAF Exon15, 13 Mutationen	BRAF Exon15, 13 Mutationen	BRAF Exon15, 13 Mutationen	BRAF Exon15, 13 Mutationen	BRAF Exon15, 13 Mutationen	BRAF Exon15, 13 Mutationen	BRAF Exon15, 13 Mutationen
	#17 9.PT Histonummer (Nr.1) 41	#18 9.PT Histonummer (Nr.2) 42	#19 10.PT Histonummer (Nr.1) 43	#20 10.PT Histonummer (Nr.2) 44	#21 11.PT Histonummer (Nr.1) 45	#22 12.PT Histonummer (Nr.1) 46	#23 Positiv Kontrolle 47	#24 Negativ Kontrolle 48
	2.PCR vom 20.07.2017	2.PCR vom 20.07.2017	2.PCR vom 20.07.2017	2.PCR vom 20.07.2017	2.PCR vom 20.07.2017	2.PCR vom 20.07.2017	2.PCR vom 20.07.2017	2.PCR vom 20.07.2017

Abbildung 14 Maske, fotografiert aus dem Computerprogramm für die Pyrosequenzierung

Arbeitsablauf:

1. Zunächst wird am Computer über das Programm „PyroMark24“ eine Maske vorbereitet, die eine genaue Dokumentation der zu untersuchenden Proben ermöglicht, siehe Abbildung 14. Pro Lauf können insgesamt bis zu 24 Proben analysiert werden.

Außerdem liefert die Maske eine gute Übersicht der zu analysierenden Proben. Das Programm berechnet die für den Lauf nötige Menge der Nukleotidlösungen, des Enzym- und des Substratgemisches.

2. In eine spezielle PCR-Platte mit 24 Kammern werden in jede Kammer 70 µl Master Mix (*P1) und 10 µl der zu analysierenden Probe pipettiert. Anschließend wird die Platte für 15 Minuten bei 1.400 rpm geschüttelt, damit sich Streptavidin an die biotinylierten PCR-Produkte lagern kann. Über die Küvette wird ein Parafilm gezogen, um eine Kontamination während des Vortexens zu verhindern.

- I. Das Master-Mix und seine Bestandteile (*P1) sollen sich an das Biotin der PCR-Produkte, das sich an den BRAF-Reverse-Primern befindet, binden (ein Streptavidin kann 4 Biotin binden). Zusätzlich ist das Streptavidin an Sepharose gebunden, um ein größeres Molekül darzustellen. Dies ist für die spätere Arbeit an der Workstation nötig, damit die PCR-Produkte von den Filtern des Filterhalters nicht aufgesogen werden, sondern daran hängen bleiben.
- II. Der Binding Buffer stärkt die Bindung zwischen dem Streptavidin und Biotin zusätzlich.
- III. Das Wasser dient zum Auffüllen des Volumens, damit die Master Mix Mischung die erwünschte Konzentration erhält.

2. Material und Methoden

3. In eine spezielle Sondenplatte, die wie die PCR-Platte aus 24 Kammern besteht, wird in jede dieser Kammern 25 µl eines BRAF-Sonden-Mixes (*P2) pipettiert.

4. Für die nächsten Arbeitsschritte wird die spezielle Arbeitsstation (siehe Abbildung 12 und Abbildung 13) benötigt, die aus 5 Wannen à 40 ml, einem Filterhalter mit 24 Kanülen, die mit Filtern bestückt sind, und einem Anschluss an eine Vakuumpumpe mit Abfallkanister sowie je einer Vorrichtung für einen Küvettenhalter (Parkstation) und eine Sondenplatte besteht.

Nach Spülung des Filterhalters mit den 24 Filtern in der Aqua dest Wanne, wird er für 15 Sekunden in die PCR-Platte mit den Proben und den Streptavidin-Sepharose Beads gehalten, so dass je ein Filter in eine Kammer getaucht wird und durch die Vakuumpumpe aus der Kammer die jeweilige Probe anziehen kann. Im Anschluss wird der Filterhalter für die vorgegebene Zeit in die jeweilige Wanne gelegt:

- | | | | |
|-------|--|--|-------------------------|
| I. | 5 sek | 1.Wanne: 70% Ethanol | gebrauchsfertige Lösung |
| II. | 5 sek | 2.Wanne: Denaturierungslösung | gebrauchsfertige Lösung |
| III. | 10 sek | 3.Wanne: Washing Buffer | (*P3) |
| IV. | Verschluss des Ventils des Filterhalters, der mit einem Schlauch an die Vakuumpumpe verbunden ist. | | |
| | <i>Das Ventil der Vakuumpumpe muss geschlossen werden, damit sich die Proben von den Filtern ablösen und im Sonden-Mix verbleiben.</i> | | |
| V. | 15 sek | Sonden-Platte (mit BRAF-Sonden-Mix (*P2) gefüllte Kammern) | |
| VI. | 5 sek | 4.Wanne: Wasser zur Reinigung | |
| VII. | Öffnen des Filters | | |
| VIII. | | 5.Wanne: Wasser zum Spülen | |
| IX. | Zurück in die Parkstation | | |

Die Sondenplatte, auf der sich nun die Proben befinden, wird für 7 Minuten auf eine 80°C vorgeheizte Wärmeplatte gestellt, um eine Denaturierung der DNA in Einzelstränge beizubehalten und das Anlagern der Sonden an die einzelnen DNA-Stränge zu ermöglichen.

5. Dann wird die Sondenplatte in den kurz zuvor eingeschalteten Pyrosequencer gestellt, um die Proben 15 Minuten abkühlen zu lassen.

6. Im letzten Schritt muss eine Kartusche mit Nukleotidlösungen, Enzym- und Substratgemisch gefüllt werden, siehe Abbildung 15. Die nötige Menge ergibt sich aus der Anzahl der zu analysierenden Proben und wird über das Computerprogramm berechnet. Bei den Nukleotidlösungen handelt es sich um gebrauchsfertige Lösungen. Das lyophilisierte Enzym- und Substratgemisch müssen vor Gebrauch entsprechend dem Protokoll gelöst werden (*P4).

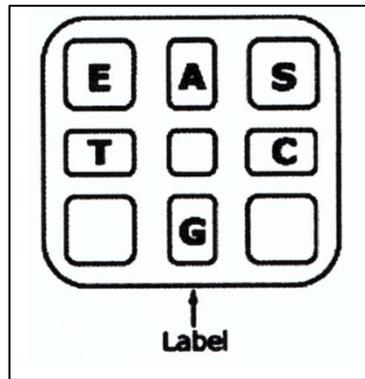


Abbildung 15 abfotografiert aus dem Computerprogramm für die Pyrosequenzierung, es stellt die Beschriftung der Kartusche dar und dient der genauen Anordnung der Reagenzien in die jeweilige Kammer. Die Buchstaben stehen für das zu pipettierende Reagenz (E = Enzymgemisch, S = Substratgemisch; Nukleotidlösungen: A = Adenosin = dATPalphaS, T = Thymidin = dTTP, C = Cytidin = dCTP, G = Guanosen = dGTP).

Die Kartusche und die Platte mit den Proben werden in die dafür vorgesehenen Vorrichtungen im Pyrosequenzierungsgerät positioniert und das Programm gestartet.

7. Nach einem selbst erstellten Schema pipettiert das Gerät die Nukleotidlösungen, das Enzym- und Substratgemisch und ermittelt so die genaue Sequenzabfolge der DNA. Die Ergebnisse werden auf einem USB-Stick gespeichert und können auf dem Computer ausgewertet werden.

Erstellung der Pyrogramme:

Bei einer ordnungsgemäßen Verwendung der Reagenzien entsprechend der Anleitung wird im Pyrosequenzierungsgerät Pyrophosphat freigesetzt und dadurch ein Lichtsignal erzeugt (siehe Abbildung 16). Dieses Lichtsignal ist direkt proportional der Zahl der eingebauten Nukleotiden und das Gerät identifiziert das entsprechende Nukleotid. (aus dem Handbuch „PyroMark Gold 24 Reagents“, REF: 971802, HB: 1057419DE)

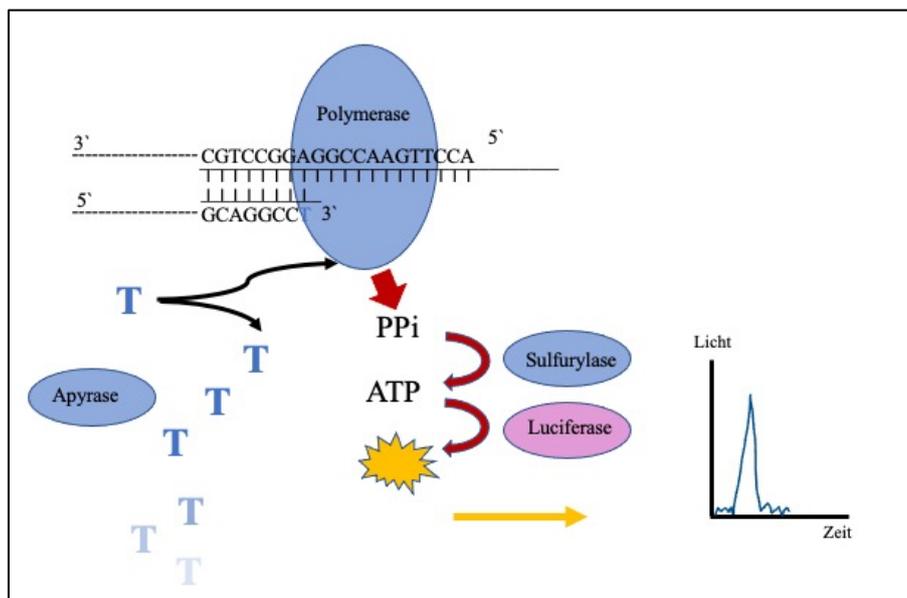


Abbildung 16 Schematische Darstellung der Pyrosequenzierungskaskade, (aus dem Handbuch „PyroMark Gold 24 Reagents“, REF: 971802, HB: 1057419DE)

Interpretation der Pyrogramme:

In den folgenden Abbildungen sind beispielhaft mögliche Pyrogramme für ein besseres Verständnis der Ergebnisse dargestellt. Die Abbildung 17 zeigt den sogenannten Wildtyp (an Position 15: A=0), das heißt: keine Mutation nachweisbar.

In Abbildung 18 „BRAF-V600E-Mutation, A=20, 20%“ ist sowohl der Wildtyp als auch die BRAF-V600E-Mutation nachweisbar. Entsprechend der Peakhöhe des Nukleotids „A“ an Position 15 im Verhältnis zur Peakhöhe des Nukleotids „T“ an Position 14 lässt sich der Anteil der DNA mit Mutation erkennen, in diesem Fall 20% (zu 80% Wildtyp DNA).

In Abbildung 19 mit A=50, 50%, entspricht die Hälfte der Mutation V600E und die andere dem Wildtyp.

In Abbildung 20 ist der Anteil der mutationstragenden DNA 80% und somit der Wildtyp 20%.

In Abbildung 21 ist ausschließlich die BRAF-V600E-Mutation nachweisbar, entsprechend 100% Mutation, da die Peakhöhe des Nukleotids „T“ an Position 14 „0“ entspricht.

Weitere relevante Pyrogramme sind die BRAF-V600K-Mutation (in Abbildung 22 dargestellt, entsprechend 100% Mutation ohne Wildtyp DNA) und das „Stop Codon mit der Stillen Mutation“ (siehe Abbildung 23).

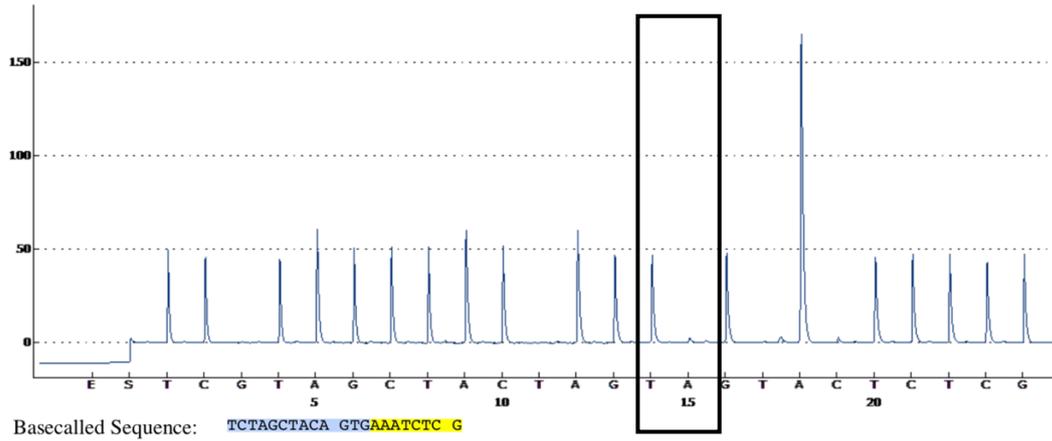


Abbildung 17 Pyrogramm eines Wildtyps, $A = 0$, 0% mutierte Allele

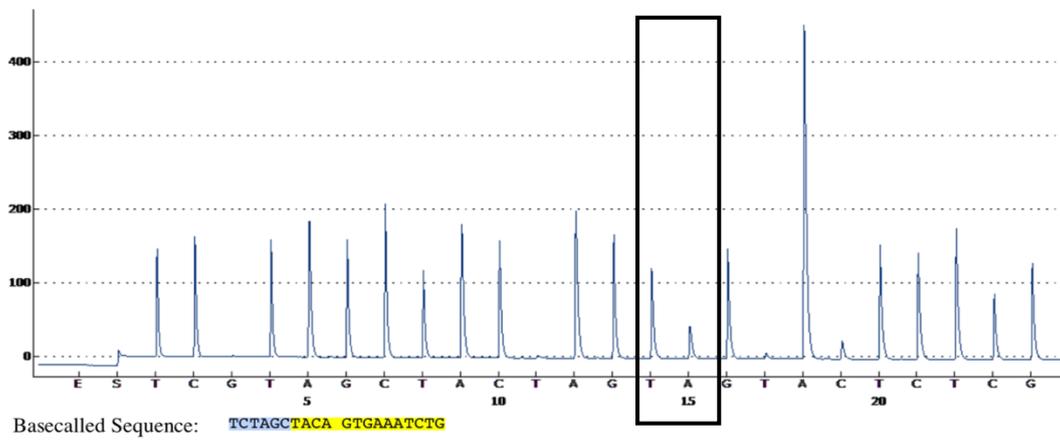


Abbildung 18 Pyrogramm einer BRAF-V600E-Mutation, $A = 20$, 20% mutierte Allele

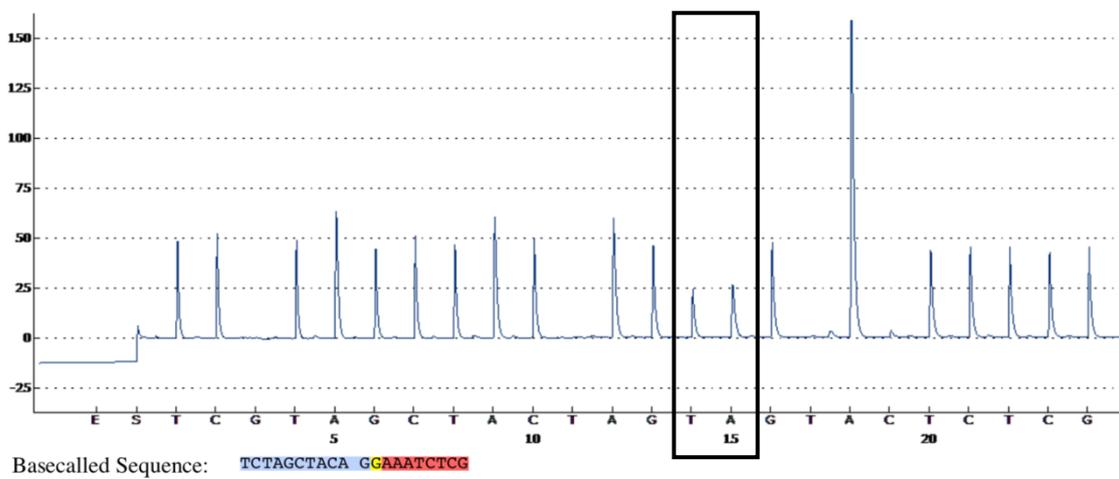


Abbildung 19 Pyrogramm einer BRAF-V600E-Mutation, $A = 50$, 50% mutierte Allele

2. Material und Methoden

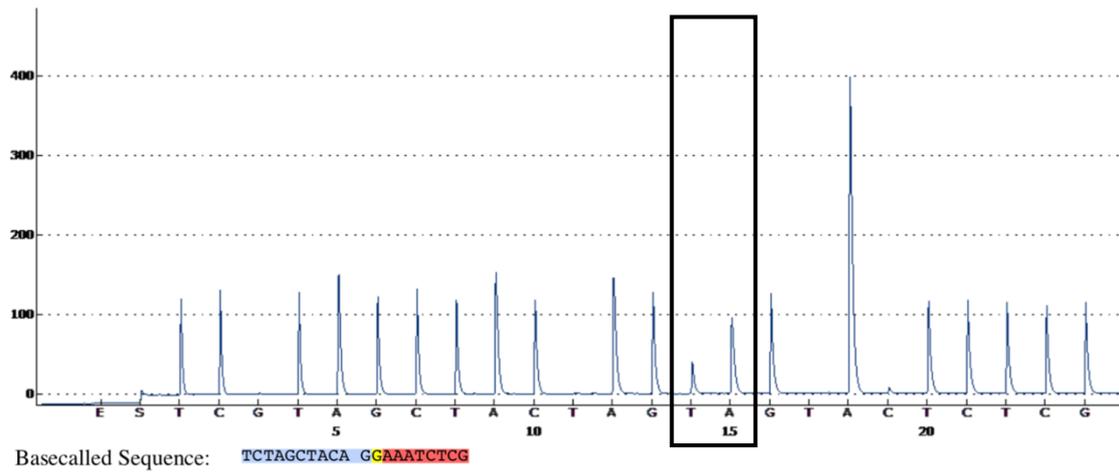


Abbildung 20 Pyrogramm einer BRAF-V600E-Mutation, A = 80, 80% mutierte Allele

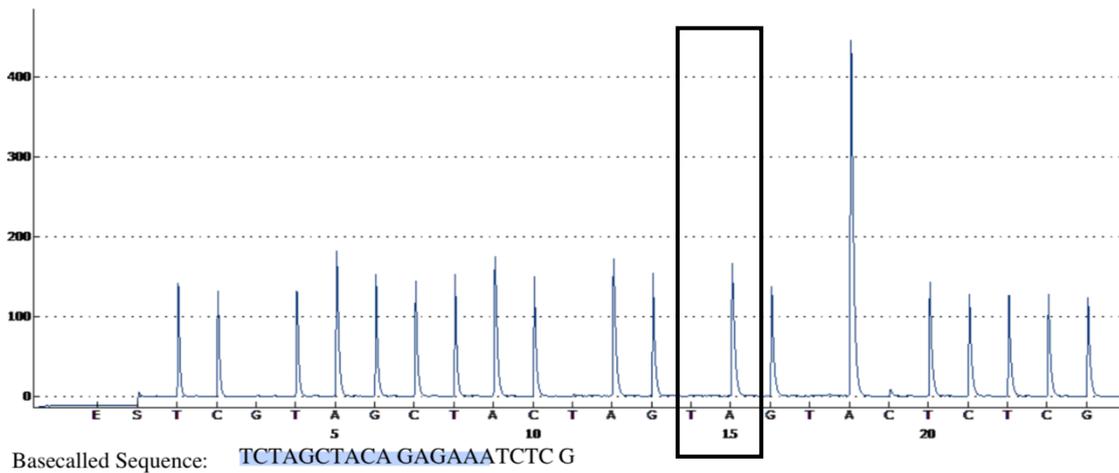


Abbildung 21 Pyrogramm einer BRAF-V600E-Mutation, A = 100, 100% mutierte Allele

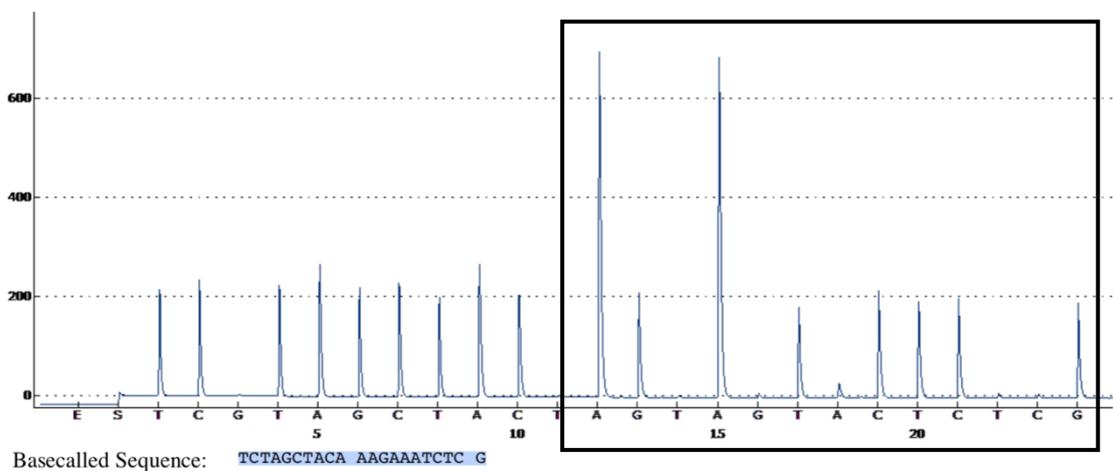


Abbildung 22 Pyrogramm einer BRAF-V600K-Mutation, 100 % mutierte Allele

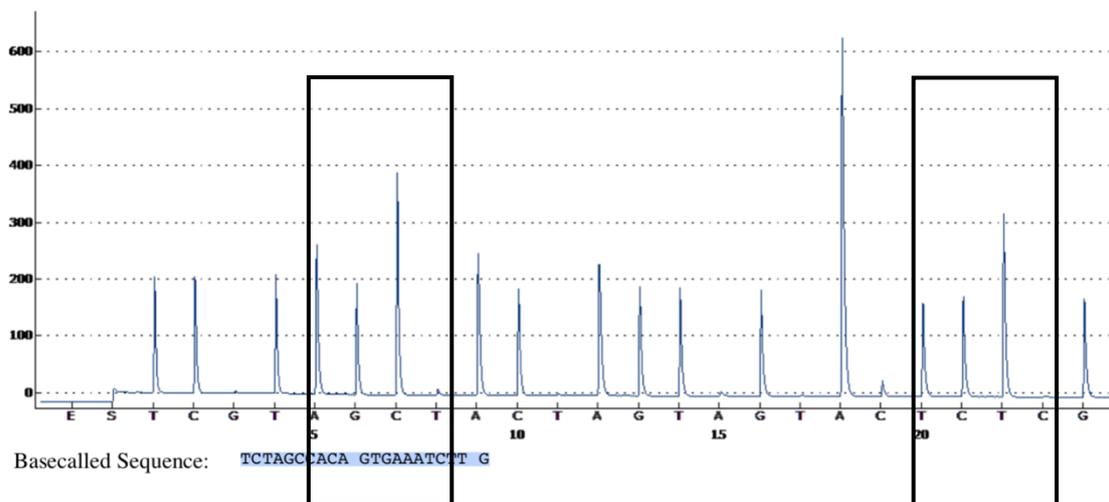


Abbildung 23 Pyrogramm eines Stop Codon und stille Mutation

Geräte und Gefäße	
Pyrosequenzierungsgerät mit Computersoftware „PyroMark24“	Qiagen, Hilden
Schüttler	Thermo-Shaker, Kisker Biotech GmbH & CoKG, Karlsruhe
Vortexer	Janke & Kunkel IKA Labortechnik VF2, Staufen
Wärmeplatte	Digitale Heizplatte SD 160, Stuart, Biocote, Bibby Scientific, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
PyroMark Q24 Workstation	Qiagen, Hilden
Zentrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg
Küvette 3x8	Qiagen, Hilden
Sondenplatte, PCR Plate	BRAND GmbH + CoKG, Wertheim
Kartusche	Qiagen, Hilden
Parafilm Dura Seal Laboratory Stretch Film	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
Pipetten Sartorius BioHit mLine M10: 0,5 – 10 µl M100: 10 - 100 µl M200: 20 – 200 µl M1000: 100 – 1000 µl	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf

2. Material und Methoden

Geräte und Gefäße	
Quali-Maximum Recovery TipsPipettenspitzen (Rnase-DNase-u- Pyrogen frei) 0,1 – 10 µl (A300S-MR) 1,0 - 100 µl (A100S-MR) 1,0 - 200 µl (A200S-MR) 100 - 1000 µl (A1000S-MR)	Kisker Biotech GmbH & CoKG, Steinfurt
1,5 ml Mikro-Tubes	Sarstedt, Nümbrecht, Germany
Messzylinder	
USB Stick	
Reagenzien	
Aqua yad iniectabilia 1000 ml	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Streptavidin Sepharose High Performance	GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden
PyroMark Binding Buffer	Qiagen, Hilden
BRAF Sonde, BRAF15-P-S1 GTA AAA ATA GGT GAT TTT GG (20)	Eurofins Genomics, Ebersberg
Pyro Mark Annealing Buffer	Qiagen, Hilden
Ethanol 70%	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
PyroMark Denaturation Solution	Qiagen, Hilden
Pyromark Wash Buffer	Qiagen, Hilden
PyroMark Gold Q24 Reagents (10x) *Enzyme Mixture *Substrate Mixture *Nukleotide	Qiagen, Hilden

Tabelle 14 Geräte, Gefäße und Reagenzien für die Pyrosequenzierung

Zusammensetzung der Reagenzien für die Pyrosequenzierung(*P)		
*P1	Master Mixes	(1) Streptavidin Sepharose 2 µl (2) Binding Buffer 40 µl (3) H ₂ O <u>28 µl</u> 70 µl
*P2	BRAF-Sonden-Mix:	BRAF-Sonde 3 µl Annealing Buffer <u>997 µl</u> 1000 µl
*P3	Washing Buffer	5 ml Pyromark Washbuffer + 45 ml H ₂ O (1:10 Verdünnung)
*P4	Enzym und Substrat	Herstellung Enzym und Substrat Bei den Nukleotiden (Nukleotidlösungen) handelt es sich um gebrauchsfertige Reagenzien. In die lichtempfindlichen, gefriergetrockneten Enzym- und Substratgemische, die sich je in einem Glasfläschchen befinden, werden je 620 µl Aqua dest pipettiert. Danach müssen die Glasfläschchen behutsam gedreht und 5-10 Minuten bei Raumtemperatur gelagert werden, um ein Lösen des Gemisches im Wasser zu garantieren. <i>(aus dem Handbuch „PyroMark Gold 24 Reagents“, REF: 971802, HB: 1057419DE)</i>

Tabelle 15 Zusammensetzung der Reagenzien für die Pyrosequenzierung

2.8. Manuelle Mikrodisektion

Bei dem zu untersuchenden Tumorgewebe handelt es sich um histologische Schnitte, die aus formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Präparaten (FFPE) angefertigt und auf Objektträgern positioniert werden. In Tabelle 16 sind die Geräte, Gefäße und Reagenzien und in Tabelle 17 die Zusammensetzung für die Reagenzien für die manuelle Mikrodisektion aufgeführt.

Arbeitsablauf:

Unter mikroskopischer Sicht wird ein Areal mit einer homogenen Population vitaler Tumorzellen möglichst ohne Infiltration von Makrophagen, Lymphozyten und Melanin markiert. Aus diesem Areal wird mit einer Einmalkanüle das Tumorgewebe manuell extrahiert und in einem 0,5 ml Tube mit 20 µl Extraktionspuffer-Proteinase K-Gemisch (*M1) für 16 Stunden bei 56-57°C in einem Thermocycler inkubiert, um dabei die DNA freizulegen. Bei dem markierten Bereich handelt es sich bei einem Sichtfeld von 5mm Durchmesser um eine Fläche von 19,6 mm².

Das gewonnene Produkt wird entsprechend 2.5.-2.7. bearbeitet und analysiert.

Geräte und Gefäße	
Einmalkanüle BD Microlance 3, 20G	Becton Dickinson S.A., Fraga Spanien/ Firmensitz: Franklin Lakes, USA
DNA Thermal Cycler 480	Perkin Elmer, Norwalk, USA
Pipetten Sartorius BioHit mLine M10: 0,5 – 10 µl M100: 10 - 100 µl M200: 20 – 200 µl M1000: 100 – 1000 µl	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Quali-Maximum Recovery TipsPipettenspitzen (RNase-DNase-u- Pyrogen frei) 0,1 – 10 µl 1,0 - 100 µl 1,0 – 200 µl	Kisker Biotech GmbH & CoKG, Steinfurt
PCR Tube 0,5 ml	Peqlab, Biotechnologie GmbH, Erlangen

Reagenzien	
Tris-HCL	Firma AppliChem GmbH, Darmstadt
EDTA-Lösung pH 8,0	Firma AppliChem GmbH, Darmstadt
Tween20	Firma AppliChem GmbH, Darmstadt
PCR-Wasser, reinst	Firma AppliChem GmbH, Darmstadt
Proteinase K	Firma Invitrogen (jetzt Thermo Fisher Scientific, Darmstadt)

Tabelle 16 Geräte, Gefäße und Reagenzien für manuelle Mikrodisektion

Zusammensetzung der Reagenzien für die manuelle Mikrodisektion (*M)				
*M1	Extraktions-Puffer- Proteinase K-Gemisch	Proteinase K	100 µl	0,1 ml
		Extraktionspuffer (*M2)	1000 µl	1,0 ml
			1100 µl	1,1 ml
*M2	Extraktions-Puffer	Tris-HCL (1 M, pH 8,0)	1,000 ml	
		EDTA (0,5 M, pH 8,0)	0,010 ml	
		Tween20	0,050 ml	
		PCR-Wasser, reinst	8,940 ml	
		Gesamt	10,000 ml	

Tabelle 17 Zusammensetzung der Reagenzien für die manuelle Mikrodisektion

3. Ergebnisse

3.1. Optimierung der Versuchsparameter

Ablauf:

1. In den ersten Versuchen wird die Methodik erarbeitet und ein optimiertes Protokoll entwickelt, mit dem Ziel, Mutationen in einer möglichst kleinen, aber ausreichenden Zellzahl nachzuweisen.

Zunächst wird aus einem Melanom (mmI) je ein 2 µm und 6 µm dicker histologischer Schnitt angefertigt. Bei dem 2 µm dicken histologischen Präparat werden 17 Areale (A) sowie bei dem 6 µm dicken Präparat 56 (B) und 20 Areale (C) lasermikrodisseziert und anschließend, wie im Methodenteil beschrieben, die Aufbereitung der DNA mit 9 µl TRIS EDTA Puffer und 5 µl Proteinase K durchgeführt. In die PCR wird 1 µl des Lysats eingesetzt, das Ergebnis analysiert, sowie eine Re-PCR erstellt und diese ebenfalls analysiert. Dabei entspricht ein Areal dem vom Mikroskop auf den Computer übertragenem Blickfeld mit möglichst vielen vitalen Tumorzellen. Die Grenzen dieses Areals werden vom Untersucher zur Orientierung für den Laser markiert. Die exakte Zellzahl eines Areals kann nicht angegeben werden, da sie abhängig von dem ausgewählten Blickfeld ist und das Gerät die zu lasermikrodissezierenden Stellen im ausgewählten Areal, auf die der Laser trifft, automatisch auswählt. Das bedeutet, er beginnt oben links im gewünschten Areal und vervollständigt die Reihe horizontal unter Berücksichtigung der vertikalen Grenzen des gewünschten Areals, danach folgen darunter parallel verlaufende Reihen bis die untere Grenze des gewünschten Areals erreicht ist. Der Laser orientiert sich dabei an der von ihm zuvor lasermikrodissezierten Stelle im vorgegebenen Abstand und nicht an bestimmten Strukturen in dem Präparat, wie beispielsweise Tumorzellen. Es werden also auch andere Strukturen wie Blut- oder Fettzellen lasermikrodisseziert. Einzelne Tumorzellen können übergangen werden.

In Tabelle 18 sind die Ergebnisse mit den Variablen aufgeführt, die entstandenen Amplifikate werden in Tabelle 19 erklärt.

Ergebnis:

Schnittdicke	Anzahl der Areale	Areal	Ergebnis der	
			1.PCR	Re-PCR
2 µm	17	A	-	Primer Dimer
6 µm	56	B	+	+
6 µm	20	C	-	Primer Dimer

Tabelle 18 Übersicht zum Versuch 3.1. mit den Ergebnissen der BRAF-Mutationsanalyse

Die Ergebnisse zeigen, dass die Methodik zum DNA-Nachweis im Melanom geeignet ist, jedoch abhängig von der untersuchten Zellmenge, die proportional zur Schnittdicke und Anzahl der ausgewählten Areale variiert, ist.

+	verwertbares Amplifikat eine DNA-Sequenzanalyse kann durchgeführt werden
PD/ Primer Dimer	nicht ausreichend auswertbares Amplifikat vorhanden <i>Ursache:</i> bei PD ist die Menge des bei der Lasermikrodissektion gewonnenen, aufbereiteten und in die PCR eingesetzten DNA zu wenig <i>Folge:</i> es ist nicht genügend DNA zum Anlagern für die Primer während der PCR vorhanden, so dass sie sich stattdessen aneinander lagern und Dimere bilden
-	kein verwertbares Amplifikat vorhanden

Tabelle 19 Erklärung für die bei der (Re-) PCR entstandenen Amplifikate

3.2. Dicke des histologischen Schnittes

Ablauf:

Um die optimale Dicke des zu untersuchenden histologischen Schnittes herauszufinden, werden die Versuche bei Präparaten mit unterschiedlicher Schnittdicke (2, 6, 7 und 8 µm) durchgeführt.

Ergebnis:

Die Lasermikrodissektion ist bei dem 2 µm dicken Präparat zwar problemlos möglich, für die anschließend durchgeführte PCR und Pyrosequenzierung reicht die DNA im entstandenen Eluat für eine Amplifikation nicht aus. Dies lässt darauf schließen, dass es sich hierbei um einen zu dünnen Schnitt handelt.

Bei den 7 und 8 µm dicken Schnitten zeigen sich erste Einschränkungen bei der Lasermikrodissektion. Die nötige Mindestenergie für ein verlässliches Katapultieren des Materials vom Präparat in den Tubedeckel führt hierbei häufig zu Mikrosplittern im Objektträger.

Beim 6 µm dicken Schnitt ist eine qualitativ hochwertige, präzise und verlässliche Lasermikrodissektion durch das Gerät gegeben, so dass alle Versuche mit 6 µm dicken Schnitten fortgeführt werden.

3.3. Verdünnungsreihe

Ablauf:

Um ein Ziel dieser Arbeit, die kleinstmögliche Zellpopulation zur Durchführung der Experimente zu definieren, wird aus der Probe B von 3.1. eine Verdünnungsreihe erstellt. Hierfür wird jeweils 1 µl Probe mit Aqua dest verdünnt und in die PCR eingesetzt. Die Menge Aqua dest wird kontinuierlich gesteigert, wie in Tabelle 20 dargestellt. Für die Erklärung der entstandenen Amplifikate wird auf Tabelle 19 verwiesen.

Ergebnis:

Aqua dest	1.PCR	Re-PCR
-	+	+
1 µl	-	Primer Dimer
2 µl	-	-
3 µl	-	-
4 µl	-	Primer Dimer
5 µl	-	Primer Dimer

Tabelle 20 Versuchsaufbau der Verdünnungsreihe zu 3.3.

Eine Verdünnung der Proben zur Minimierung der Zellpopulation scheint nicht geeignet, da keine auswertbaren Ergebnisse erzielt werden.

3.4. Auswahl einzelner Zellen

Ablauf:

In diesem Versuch werden zwei Melanome (mmI, mmII) untersucht, die bereits positiv auf die BRAF-V600E-Mutation getestet sind. Um eine genauere Dokumentation der Zellzahl zu ermöglichen, werden für die Lasermikrodissektion einzelne Zellen und nicht, wie in den vorherigen Versuchen, Areale ausgewählt. Eine entsprechende Fotodokumentation, die während der Arbeit durchgeführt wird, findet sich in Abbildung 24 (Auswahl einzelner Zellen) und Abbildung 25 (Auswahl eines Areals).

Für jedes Melanom werden Proben mit 2x 300, 1x 600 und 1x 1200 Zellen lasermikrodisseziert. Der „Verdau über Nacht“ wird mit 9 µl TRIS EDTA Puffer und 5 µl Proteinase K angesetzt, woraus eine Gesamtmenge von 14 µl (inklusive PCR-Öl) resultiert.

Von jeder Probe wird eine Versuchsreihe mit mehreren PCR-Ansätzen durchgeführt, bei der die Menge des Eluats variiert. Anhand der Menge der eingesetzten Probe kann das Äquivalent der analysierten Zellen des jeweiligen Versuches abgeschätzt werden. Die jeweils eingesetzte Probenmenge mit entsprechender Zellzahl ist in Tabelle 21 dargestellt. Zur Interpretation der nachfolgenden Ergebnisse findet sich in Tabelle 22 eine schematische Darstellung. Die Ergebnisse von mmI sind in Tabelle 23 sowie die von mmII in Tabelle 24 aufgeführt. Eine Erklärung der Amplifikate der Re-PCR ist in Tabelle 19 dargestellt.

14µl \cong 300 Zellen (Re-PCR)		14µl \cong 600 Zellen (Re-PCR)		14µl \cong 1200 Zellen (Re-PCR)	
1µl	\cong 21 Zellen	1µl	\cong 21 Zellen	1µl	\cong 86 Zellen
2,5µl	\cong 54 Zellen	2µl	\cong 86 Zellen	2µl	\cong 171 Zellen
4µl	\cong 86 Zellen	2,5µl	\cong 107 Zellen	2,5µl	\cong 214 Zellen
5µl	\cong 107 Zellen	5µl	\cong 1214 Zellen	5µl	\cong 429 Zellen

Tabelle 21 eingesetzte Probenmenge mit entsprechender Zellzahl (zu Versuch 3.4.)

3. Ergebnisse

Erklärung				
Tube 1 6µm 14µl \cong 300 Zellen			Nummer des Tubes, Schnittdicke Gesamtmenge \cong Gesamtzellzahl	
Nr	eM	ZZ	E	Nr = Nummer der Probe eM = in die PCR eingesetzte Menge in µl ZZ = berechnete Zellzahl E = Ergebnis für ein quantitativ auswertbares Amplifikat (Ergebnis der Gelelektrophorese)
1	1µl	21	(+)	
2	2,5µl	54	+	
3	4µl	86	+	
4	5µl	107	+	
Nr	A	EP	Nr = Nummer der Probe A = Höhe des mutierten Nukleotids „A“ EP = Ergebnis der Pyrosequenzierung SC = Stop Codon und Stille Mutation	
1	A = 20	100%		
2	A = 0	SC		
3	A = 0	0 %		
4	A = 0	0 %		

Tabelle 22 schematische Darstellung für die Interpretation der nachfolgenden Tabellen (zu 3.4.)

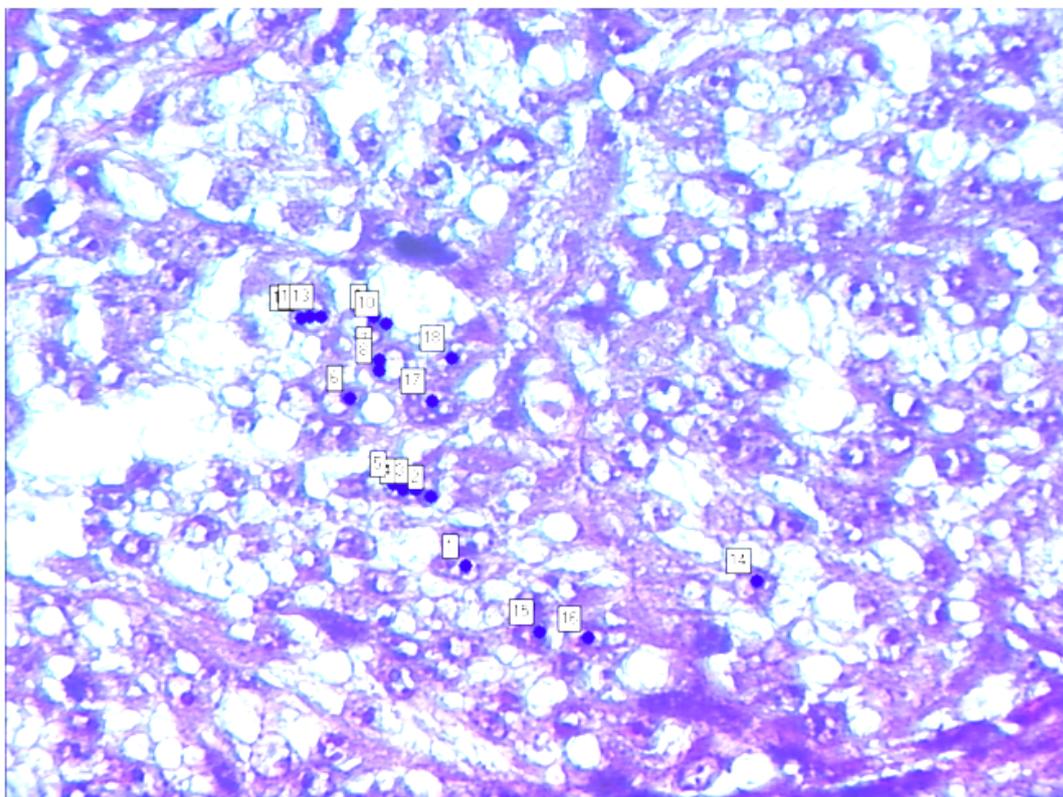


Abbildung 24 mikroskopische Ansicht einzeln ausgewählter Zellen, fotodokumentiert während der Arbeit am Lasermikrodissektionsgerät

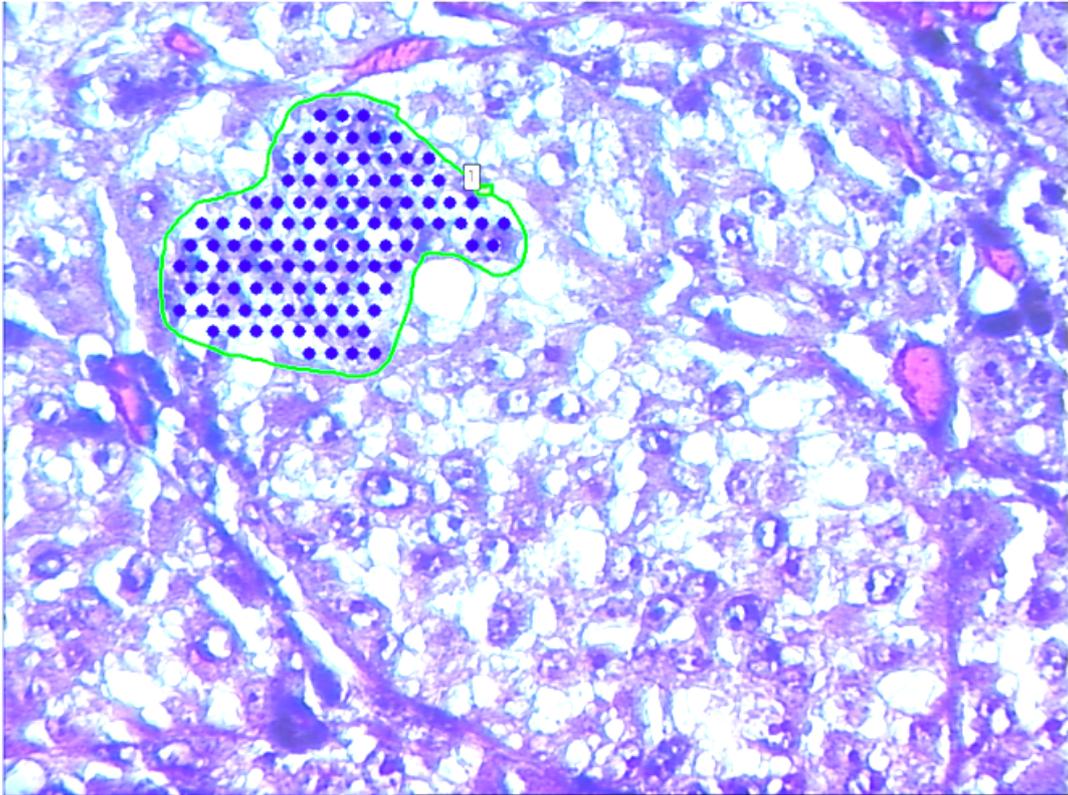


Abbildung 25 mikroskopische Ansicht eines ausgewählten Areals, fotodokumentiert während der Arbeit am Lasermikrodissektionsgerät

Ergebnis:

mml						
Tube 1 6µm						
14µl \approx 300 Zellen						
Nr	eM	ZZ	E	Nr	A	EP
1	1µl	21	(+)	1	A=20	100 %
2	2,5µl	54	+	2	A=0	SC
3	4µl	86	+	3	A=0	0 %
4	5µl	107	+	4	A=0	0 %

3. Ergebnisse

Tube 3 7 μ m						
14 μ l \cong 300 Zellen						
Nr	eM	ZZ	E	Nr	A	EP
5	1 μ l	21	+	5	A=50	95 %
6	2,5 μ l	54	+	6	A=0	0 %
7	4 μ l	86	+	7	A=50	70 %
8	5 μ l	107	+	8	A=0	SC
Tube 2 6 μ m						
14 μ l \cong 600 Zellen						
Nr	eM	ZZ	E	Nr	A	EP
9	1 μ l	43	+	9	A=70	100 %
10	2 μ l	86	+	10	A=20	10 %
11	2,5 μ l	107	+	11	A=180	95 %
12	5 μ l	214	+	12	A=20	20 %
Tube 7 6 μ m						
14 μ l \cong 1200 Zellen						
Nr	eM	ZZ	E	Nr	A	EP
13	1 μ l	86	++	13	A=0	0 %
14	2 μ l	107	++	14	A=0	0 %
15	2,5 μ l	214	PD	15	PD	PD
16	5 μ l	429	++	16	A=60	100 %

Tabelle 23 Ergebnisse für *mmI* (Versuch 3.4.)

3.4. Auswahl einzelner Zellen

mmII							
Tube 4 6µm							
14µl ≅ 300 Zellen							
Nr	eM	ZZ	E		Nr	A	EP
17	1µl	21	++		17	A=0	0 %
18	2,5µl	54	++		18	A=40	50 %
19	4µl	86	++		19	A=50	70 %
20	5µl	107	++		20	A=25	50 %
Tube 5 6µm							
14µl ≅ 300 Zellen							
Nr	eM	ZZ	E		Nr	A	EP
21	1µl	21	++		21	A=50	75 %
22	2,5µl	54	++		22	A=20	10 %
23	4µl	86	++		23	A=20	25%
24	5µl	107	++		24	A=25	50 %
Tube 6 6µm							
14µl ≅ 600 Zellen							
Nr	eM	ZZ	E		Nr	A	EP
25	1µl	43	++		25	A=0	0 %
26	2µl	86	++		26	A=55	80 %
27	2,5µl	107	++		27	A=20	30 %
28	5µl	214	++		28	A=30	65 %
Tube 8 6µm							
14µl ≅ 1200 Zellen							
Nr	eM	ZZ	E		Nr	A	EP
29	1µl	86	++		29	A=25	45 %
30	2µl	107	++		30	A=40	65 %
31	2,5µl	214	++		31	A=48	65 %
32	5µl	429	++		32	A=35	55 %

Tabelle 24 Ergebnisse für mmII (Versuch 3.4.)

3. Ergebnisse

Bei den analysierten PCR-Produkten handelt es sich ausschließlich um Re-PCR.

Die Ergebnisse der Gelelektrophorese zeigen, dass - mit Ausnahme bei Probe 15 - ein quantitativ ausreichendes PCR-Amplifikat vorhanden ist, so dass von allen Proben eine Pyrosequenzierung durchgeführt werden kann.

Der Vorversuch zeigt, dass die BRAF-V600E-Mutation unabhängig von der eingesetzten Menge der Probe und damit verbundenen variierenden Zellzahl nachgewiesen werden kann. Die Methode ist mit guter Verlässlichkeit anwendbar, da insgesamt nur in einer der insgesamt 32 Proben nicht ausreichend Material für eine Auswertung zur Verfügung steht.

Es zeigt sich keine direkte Relation zwischen untersuchter Zellzahl und nachweisbarer Mutation. Interessanterweise variieren die Ergebnisse der unterschiedlichen Probenmengen, obwohl die untersuchten Zellen jeweils aus dem gleichen Tube stammen. So lassen sich beispielsweise aus „Tube 3“ Wildtyp und die BRAF-V600E-Mutation nachweisen.

Diese Ergebnisse geben bereits einen Hinweis auf intratumorale Tumorerogenität.

Betrachtet man die beiden Melanome im Vergleich, wie in Tabelle 25 dargestellt, so sind Unterschiede zu verzeichnen: während bei mmII ein Mutationsnachweis bei 87,5 % der Proben gelingt, beschränkt er sich bei mmI nur auf die Hälfte der Proben.

Des Weiteren ist die Variabilität der Ergebnisse der Pyrosequenzierungsanalyse bei mmI größer: hier wird neben dem Wildtyp und der BRAF-V600E-Mutation zusätzlich noch das Stop Codon mit stiller Mutation detektiert.

Ein wichtiger Aspekt bei der Auswertung der Ergebnisse, der nicht außer Acht gelassen werden soll, ist das Verhältnis Mutationsnachweis zu Wildtyp in Prozent (Höhe der Allelfrequenz). Auch hier zeigt sich ein Unterschied zwischen den beiden Tumoren. Bei mmI ist eine große Streuung sichtbar, entweder ist die Anzahl der mutierten Allele sehr klein oder sehr hoch, wohingegen bei mmII der Mutationsnachweis variabler zwischen 20 – 80 % der Allele liegt, 100 % Mutation tritt nicht auf.

Tumor	Mutation	Wildtyp	Stop Codon	Durchschnitt der Höhe Allelfrequenz
mmI:	8	5	2	590:8 =73,75%
	8/16 = 50 %			
mmII:	14	2	0	735:14 =52,5 %
	14/16 = 87,5 %			

Tabelle 25 mmI und mmII: Vergleich der Pyrogramm-Ergebnisse (Versuch 3.4.)

3.5. Intratumoraler Vergleich

Ablauf:

Bei einem BRAF-V600E positiven Melanom (mmI) werden in einem Präparat in zwei unterschiedlichen Gebieten je 300 Zellen lasermikrodisseziert und anschließend - wie in 2.4. beschrieben - mit 9 µl TRIS EDTA Puffer und 5 µl Proteinase K der „Verdau über Nacht“ angesetzt. Von den 14 µl Material, die nun von jeder Probe zur Verfügung stehen, werden in aufsteigender Menge Material vier PCR-Ansätze mit je 1 µl, 2,5 µl, 4 µl und 5 µl erstellt und von diesen die Re-PCR analysiert.

In diesem Versuch sollen zwei Gebiete eines Tumors unter gleichen Bedingungen analysiert und direkt miteinander verglichen werden, um herauszufinden, ob und wie sich die Ergebnisse hierbei unterscheiden. Untersucht wird, ob die Methodik in beiden Fällen gut anwendbar, die Anzahl der auszuwertenden Mutationsanalysen identisch ist und ob sich Hinweise auf eine intratumorale Heterogenität finden.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 26 dargestellt, Tabelle 27 erklärt die verwendeten Abkürzungen und in Tabelle 19 finden sich die Erklärungen für die Re-PCR.

3. Ergebnisse

Ergebnis:

Tube 1 6µm 300 Zellen 14µl ≅ 300 Zellen (Re-PCR)						Tube 2 6µm 300 Zellen 14µl ≅ 300 Zellen (Re-PCR)					
Nr.	eM	ZZ	E	EP	A	Nr.	eM	ZZ	E	EP	A
1	1µl	≅ 21 Z	++	0 %	A=0	5	1µl	≅ 21 Z	-	-	-
2	2,5µl	≅ 54 Z	++	0 %	A=0	6	2,5µl	≅ 54 Z	++	0 %	A=0
3	4µl	≅ 86 Z	++	10 %	A=10	7	4µl	≅ 86 Z	++	0 %	A=0
4	5µl	≅ 107Z	++	85 %	A=80	8	5µl	≅ 107Z	+	0 %	A=0

Tabelle 26 Übersicht der Ergebnisse (Versuch 3.5.)

Nr	Nummer der Probe
eM	in die PCR eingesetzte Menge in µl
ZZ	berechnete Zellzahl
E	Ergebnis für ein quantitativ auswertbares Amplifikat
EP	Ergebnis der Pyrosequenzierung
A	Höhe des mutierten Nukleotids „A“

Tabelle 27 Erklärung der verwendeten Abkürzungen (Versuch 3.5.)

Trotz der identischen Versuchsbedingungen ergeben sich unterschiedliche Ergebnisse. Nur bei einem PCR-Ansatz ist kein ausreichend großes Amplifikat zur Auswertung vorhanden. Hierbei handelt es sich um einen Ansatz von Tube 2, bei dem am wenigsten Ausgangsmaterial, nämlich 1 µl, in die PCR eingesetzt wird. Im Vergleich zur Probe von Tube 1, bei der die gleiche Menge in die PCR eingesetzt wird, ist interessanterweise ein auswertbares Amplifikat vorhanden. Daraus lässt sich schließen, dass eine geringere Anzahl untersuchter Zellen die Verlässlichkeit der Methodik reduziert und dieser Versuch vermutlich im Grenzbereich der Methodik durchgeführt wird.

Konzentriert man sich auf die Ergebnisse der Pyrosequenzierung, fällt auf, dass bei Tube 2 die Mutation nicht nachgewiesen werden kann. Im Vergleich dazu gelingt der Nachweis

bei Tube 1: je mehr Material ursprünglich in die PCR eingesetzt wird, desto wahrscheinlicher ist ein Mutationsnachweis.

Die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der beiden Tubes spricht für intratumorale Heterogenität.

3.6. NRAS positives Melanom und Basalzellkarzinom

Ablauf:

In diesem Versuch wird eine BRAF-Mutationsanalyse bei einem Basalzellkarzinom (bcc) und einem NRAS positiven Melanom (mmN) sowie eine NRAS-Mutationsanalyse bei den besagten Tumoren und einem BRAF positiven Melanom (mmI) durchgeführt, um die Robustheit der Methodik und intratumorale Heterogenität in Bezug auf NRAS-Mutation zu testen.

Analog zum vorherigen Versuch werden zunächst jeweils 300 oder 600 Zellen pro Probe lasermikrodisseziert. Wie im Methodenteil beschrieben, wird der „Verdau über Nacht“ mit 9 µl beziehungsweise 18 µl TRIS EDTA Puffer und 5 µl beziehungsweise 10 µl Proteinase K angesetzt. Von dem 14 µl beziehungsweise 28 µl Material wird eine Versuchsreihe erstellt, bei der die in die PCR eingesetzte Menge zwischen 1-5 µl variiert.

3.6.1. BRAF-Mutationsanalyse

Ergebnis:

mmN											
1.Tube 6 µm 600 Zellen 28 µl ≅ 600 Zellen (Re-PCR) mmN BRAF						2.Tube 6 µm 300 Zellen 14 µl ≅ 300 Zellen (Re-PCR) mmN BRAF					
Nr	eM	ZZ	E	EP	A	Nr	eM	ZZ	E	EP	A
1	1µl	≅ 21	-	-	-	4	1µl	≅ 21	+	0 %	A=0
2	2,5µl	≅ 54	PD	PD	-	5	2,5µl	≅ 54	+	0 %	A=0
3	4µl	≅ 86	+	0 %	A=0	6	4µl	≅ 86	+	0 %	A=0
						7	5µl	≅ 107	+	0 %	A=0

3. Ergebnisse

bcc											
3.Tube 6 µm 300 Zellen 14 µl \cong 300 Zellen (Re-PCR) bcc BRAF						4.Tube 6 µm 300 Zellen 14 µl \cong 300 Zellen (Re-PCR) bcc BRAF					
Nr	eM	ZZ	E	EP	A	Nr	eM	ZZ	E	EP	A
8	1µl	\cong 21	-	-	-	12	1µl	\cong 21	PD	PD	-
9	2,5µl	\cong 54	-	-	-	13	2,5µl	\cong 54	PD	PD	-
10	4µl	\cong 86	PD	-	-	14	4µl	\cong 86	+	0 %	A=0
11	5µl	\cong 107	+	0 %	A=0	15	5µl	\cong 107	-	-	-
5.Tube 6 µm 600 Zellen 14 µl \cong 600 Zellen (Re-PCR) bcc BRAF						Tubennummer, Schnittdicke, gesamte Zellzahl, Gesamtmenge \cong gesamte Zellzahl Tumor, BRAF-Analyse					
Nr	eM	ZZ	E	EP	A	Nr = Nummer der Probe eM = in die PCR eingesetzte Menge in µl ZZ = berechnete Zellzahl E = Ergebnis der Re-PCR EP = Ergebnis der Pyrosequenzierung A = Höhe des mutierten Nukleotids „A“					
16	1µl	\cong 43	+	SC	A=0						
17	2,5µl	\cong 107	-	-	-						
18	4µl	\cong 171	PD	PD	-						

Tabelle 28 Übersicht der Ergebnisse (Versuch 3.6.)

Die Ergebnisse sind einschließlich der Erklärung in Tabelle 28 zusammengefasst, sowie die für die Re-PCR in Tabelle 19.

Bei der BRAF-Mutationsanalyse des Basalzellkarzinoms sind in 3 von 11 Proben und bei dem NRAS positiven Melanom in 5 von 7 Proben ein ausreichende Amplifikate nach der Re-PCR für eine Pyrosequenzierung vorhanden.

In keiner der Proben wurde eine BRAF-Mutation nachgewiesen, so dass hiermit falsch positive Ergebnisse für diese Studie weitgehend ausgeschlossen werden können.

Auffällig sind die nicht auswertbaren Ergebnisse des Basalzellkarzinoms mit 21 (1 µl) und 54 (2,5 µl) Zellen, wohingegen sowohl bei den BRAF (mmI, siehe 3.4. und 3.5.) und NRAS positiven (mmN) Melanomen mit dieser Zellzahl ein verwertbares Amplifikat

3.6. NRAS positives Melanom und Basalzellkarzinom

entstanden ist. Daraus könnte man schließen, dass die DNA-Qualität im Basalzellkarzinom unzureichend oder das BRAF-Gen mutiert oder deletiert ist.

Vergleicht man die Ergebnisse dieses Versuchs mit denen der beiden BRAF positiven Melanome (mmI und mmII) aus Versuch 3.4. mit entsprechend gleicher untersuchter Zellzahl (300), zeigt sich ein deutlicher Unterschied. In Versuch 3.4. ist in allen 16 Proben ein ausreichendes PCR-Produkt, also genügend DNA, vorhanden, so dass dementsprechend für alle Proben eine Mutationsanalyse durchgeführt werden kann, bei der in 10 von 16 Proben die BRAF-V600E-Mutation nachgewiesen wird.

Auch in Versuch 3.5. wird ein entsprechender Versuchsaufbau bei mmI durchgeführt. Von 8 Proben kann bei 7 ein ausreichendes Amplifikat und in zwei Proben die BRAF-V600E-Mutation nachgewiesen werden.

3.6.2. NRAS-Exon-3-Mutationsanalyse

<p>1.Tube 6 µm 300 Zellen 28 µl ≙ 600 Zellen (Re-PCR) mmN NRAS</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Nr</th> <th>eM</th> <th>ZZ</th> <th>EP</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>19</td> <td>1µl</td> <td>≙ 21</td> <td>PD</td> </tr> <tr> <td>20</td> <td>2,5µl</td> <td>≙ 54</td> <td>PD</td> </tr> <tr> <td>21</td> <td>4µl</td> <td>≙ 86</td> <td>PD</td> </tr> </tbody> </table>				Nr	eM	ZZ	EP	19	1µl	≙ 21	PD	20	2,5µl	≙ 54	PD	21	4µl	≙ 86	PD	<p>7.Tube 15 6 µm 600 Zellen 14 µl ≙ 300 Zellen (Re-PCR) mmI NRAS</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Nr</th> <th>eM</th> <th>ZZ</th> <th>EP</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>26</td> <td>1µl</td> <td>≙ 21</td> <td>PD</td> </tr> <tr> <td>27</td> <td>2,5µl</td> <td>≙ 54</td> <td>PD</td> </tr> <tr> <td>28</td> <td>4µl</td> <td>≙ 86</td> <td>PD</td> </tr> </tbody> </table>				Nr	eM	ZZ	EP	26	1µl	≙ 21	PD	27	2,5µl	≙ 54	PD	28	4µl	≙ 86	PD								
Nr	eM	ZZ	EP																																												
19	1µl	≙ 21	PD																																												
20	2,5µl	≙ 54	PD																																												
21	4µl	≙ 86	PD																																												
Nr	eM	ZZ	EP																																												
26	1µl	≙ 21	PD																																												
27	2,5µl	≙ 54	PD																																												
28	4µl	≙ 86	PD																																												
<p>6.Tube 16 6 µm 300 Zellen 14 µl ≙ 300 Zellen (Re-PCR) mmN NRAS</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Nr</th> <th>eM</th> <th>ZZ</th> <th>EP</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>22</td> <td>1µl</td> <td>≙ 21</td> <td>PD</td> </tr> <tr> <td>23</td> <td>2,5µl</td> <td>≙ 54</td> <td>PD</td> </tr> <tr> <td>24</td> <td>4µl</td> <td>≙ 86</td> <td>PD</td> </tr> <tr> <td>25</td> <td>5µl</td> <td>≙ 107</td> <td>+ Wildtyp</td> </tr> </tbody> </table>				Nr	eM	ZZ	EP	22	1µl	≙ 21	PD	23	2,5µl	≙ 54	PD	24	4µl	≙ 86	PD	25	5µl	≙ 107	+ Wildtyp	<p>8.Tube 13 6 µm 300 Zellen 14 µl ≙ 300 Zellen (Re-PCR) bcc NRAS</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Nr</th> <th>eM</th> <th>ZZ</th> <th>EP</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>29</td> <td>1µl</td> <td>≙ 21</td> <td>PD</td> </tr> <tr> <td>30</td> <td>2,5µl</td> <td>≙ 54</td> <td>PD</td> </tr> <tr> <td>31</td> <td>4µl</td> <td>≙ 86</td> <td>PD</td> </tr> <tr> <td>31</td> <td>5µl</td> <td>≙ 107</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>				Nr	eM	ZZ	EP	29	1µl	≙ 21	PD	30	2,5µl	≙ 54	PD	31	4µl	≙ 86	PD	31	5µl	≙ 107	
Nr	eM	ZZ	EP																																												
22	1µl	≙ 21	PD																																												
23	2,5µl	≙ 54	PD																																												
24	4µl	≙ 86	PD																																												
25	5µl	≙ 107	+ Wildtyp																																												
Nr	eM	ZZ	EP																																												
29	1µl	≙ 21	PD																																												
30	2,5µl	≙ 54	PD																																												
31	4µl	≙ 86	PD																																												
31	5µl	≙ 107																																													

Tabelle 29 Übersicht der Ergebnisse (Versuch 3.6.2.)

3. Ergebnisse

Ergebnis:

Die Ergebnisse sind in Tabelle 29 dargestellt, die Erklärung entspricht Tabelle 19.

Bei der NRAS-Mutationsanalyse der Proben der NRAS- und BRAF mutierten Melanome sowie des Basazellkarzinoms ergeben 13 von 14 zu wenig PCR-Produkt, also nicht ausreichend DNA, so dass lediglich bei einer Probe eine Pyrosequenzierung durchgeführt werden kann. Bei der Analyse wird der Wildtyp nachgewiesen. Es findet sich keine NRAS-Mutation.

Da der Versuchsaufbau den der davor durchgeführten Versuchen entspricht, jedoch hier nur bei einer Probe eine Pyrosequenzierung durchgeführt werden kann, könnte es sein, dass für einen NRAS-Mutationsnachweis mehr DNA und dementsprechend mehr Zellen nötig sind. Es könnte auch an der Amplifikationseffizienz oder an dem für die Detektion benötigten Primern, der sich von dem für die BRAF-Mutationsanalyse unterscheidet, liegen.

3.7. Versuche mit absteigender Zellzahl

Ablauf:

Bei den nächsten Versuchen werden in einem Melanom (mmI) in verschiedenen Regionen eine unterschiedliche Anzahl an Zellen pro Tube lasermikrodisseziert. Die Anzahl variiert zwischen 100, 50 und 20 Zellen pro Tube. Für jede Zellzahl wird der Versuch 5mal beziehungsweise 6mal wiederholt, mit dem Ziel, sich einer möglichst niedrigen Zellzahl zu nähern, bei der immer noch von einer Verlässlichkeit der Analyse ausgegangen und unterschiedliche Regionen miteinander vergleichen zu können.

Der „Verdau über Nacht“ wird mit je 9 µl TRIS EDTA Puffer und 5 µl Proteinase K angesetzt, entsprechend einer Gesamtmenge von 14 µl. Anschließend werden 4 µl in die PCR eingesetzt und die Re-PCR erstellt.

In Tabelle 31 sind die Ergebnisse dargestellt (Erklärung siehe Abbildung 26 und Tabelle 30), in Tabelle 32 ist für die jeweilige Probenmenge die entsprechende Zellzahl berechnet und Tabelle 33 fasst die wichtigsten Ergebnisse zusammen.

Ergebnis:

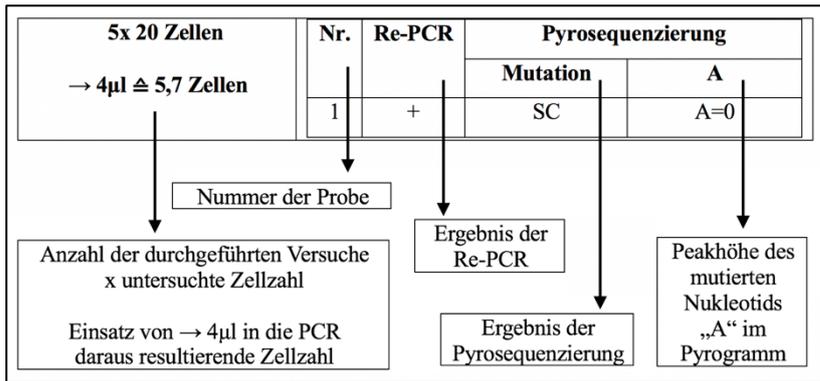


Abbildung 26 Erklärung der nachfolgenden Tabelle zu Versuch 3.7.

Gerät	Mögliche Ergebnisse	Erklärung
Re-PCR Siehe Tabelle 19	+	verwertbares Amplifikat
	PD	nicht ausreichend verwertbares Amplifikat vorhanden
	-	kein verwertbares Amplifikat vorhanden
Pyrosequenzierung	Wildtyp	
	BRAF-V600E	
	BRAF-V600K	
	Stop Codon	Stop Codon und stille Mutation
	-	keine Auswertung möglich

Tabelle 30 Erklärung der Ergebnisse der nachfolgenden Tabelle (Versuch 3.7.)

5x 20 Zellen → 4µl ≅ 5,7 Zellen	Nr.	Re-PCR	Pyrosequenzierung	
	1	+	Mutation	A
			Stop Codon	A=0
	2	+	BRAF-V600E	A=110
	3	-	-	-
	4	PD	-	-
5	PD	-	-	

3. Ergebnisse

	Nr.	Re-PCR	EP	
			Mutation	A
	5x 100 Zellen → 4µl ≅ 28,6 Zellen	6	+	BRAF-V600E
7		+	BRAF-V600K	-
8		+	Wildtyp	A=0
9		+	Stop Codon	A=0
10		PD	-	-
6x 50 Zellen → 4µl ≅ 14,3 Zellen		Nr.	Re-PCR	EP
			Mutation	A
	11	PD	-	-
	12	PD	-	-
	13	+	Stop Codon	A=0
	14	+	BRAF-V600E	100% A=100
	15	PD	-	-
	16	+	Wildtyp	A=0

Table 31 Übersicht der Ergebnisse (Versuch 3.7.)

Menge in µl	Entsprechende Zellzahl	Menge in µl	Entsprechende Zellzahl	Menge in µl	Entsprechende Zellzahl
14µl	≅ 20 Z	14µl	≅ 50 Z	14µl	≅ 100 Z
1µl	≅ 1,43 Z	1µl	≅ 3,57 Z	1µl	≅ 7,14 Z
4µl	≅ 5,7 Z	4µl	≅ 14,3 Z	4µl	≅ 28,6Z

Table 32 eingesetzte Probenmenge mit entsprechender Zellzahl (Versuch 3.7.)

	verwertbares Amplifikat	Nachweis der BRAF-Mutation in allen Proben	Nachweis der BRAF-Mutation bei verwertbaren Amplifikaten
5x 100 Zellen	4/5 = 80%	1/5 = 20%	1/4 = 25%
6x 50 Zellen	3/6 = 50 %	1/6 = 16,7 %	1/3 = 33,3 %
5x 20 Zellen	2/5 = 40%	1/5 = 20%	1/2 = 50%

Tabelle 33 Zusammenfassung der Ergebnisse (Versuch 3.7.)

Je höher die Anzahl der lasermikrodissezierten Zellen, desto höher ist die Erfolgchance für ein verwertbares Amplifikat. Das entwickelte Protokoll lässt sich somit auch bei einer niedrigen Zellzahl anwenden, da weiterhin ausreichend DNA für eine Pyrosequenzierung amplifiziert werden kann. Unabhängig von der Zellzahl konnte die Mutation detektiert werden. Unter alleiniger Berücksichtigung der verwertbaren Proben ist ein Mutationsnachweis bei einer geringeren Zellzahl wahrscheinlicher. Zudem ist hier die Anzahl der mutierten Allele höher.

Neben der gesuchten BRAF-V600E-Mutation kann zweimal das „Stop Codon und die Stille Mutation“ und einmal eine BRAF-V600K-Mutation nachgewiesen werden. Dies scheinen weitere Hinweise auf intratumorale Heterogenität zu sein.

3.8. Versuche mit absteigender Menge Proteinase K

Ablauf:

Um einerseits eine Überaktivität der Proteinase K und somit einen Verdau der DNA auszuschließen und andererseits die Konzentration der zu untersuchenden Gesamtmenge zu erhöhen, wird die eingesetzte Menge der Proteinase im folgenden Versuch bei gleicher Zellzahl kontinuierlich reduziert. Neben zwei BRAF mutierten Melanomen (mmI, mmII) werden ein NRAS positives Melanom (mmN) und ein Basalzellkarzinom (bcc) ebenfalls in die Versuchsreihe inkludiert. Für jeden Tumor werden 5 Proben mit jeweils 20 lasermikrodissezierten Zellen angefertigt. Bei dem BRAF positiven Melanom, mmI, wird der Versuch parallel mit 50 Zellen pro Tube durchgeführt, siehe Tabelle 34. Der „Verdau über Nacht“ wird mit je 9 µl TRIS EDTA Puffer und absteigender Proteinase K Menge

3. Ergebnisse

(5 µl – 4 µl – 3 µl – 2 µl – 1 µl) angesetzt. Hierbei muss beachtet werden, dass zwar die in die PCR eingesetzte Menge immer 4 µl beträgt, dementsprechend das eingesetzte Zell-Genom-Äquivalent aufgrund der unterschiedlichen Gesamtvolumina aber variiert.

In Tabelle 35 ist das Auswertungsschema der Ergebnisse von Tabelle 36 erklärt.

Ergebnis:

Nummer	Abkürzung	Bezeichnung	Zellzahl
1-5	mmI	BRAF mutiertes Melanom	20 Zellen
6-10	mmII	BRAF mutiertes Melanom	20 Zellen
11-15	mmN	NRAS mutiertes Melanom	20 Zellen
16-20	bcc	Basalzell-Ca	20 Zellen
21-25	mmI	BRAF mutiertes Melanom	50 Zellen

Tabelle 34 Übersicht der untersuchten Tumore (Versuch 3.8.)

Tumorbezeichnung						
5 x X Zellen						
≅ Anzahl der durchgeführten Proben x Zahl der lasermikrodissezierten Zellen pro Tube						
Num-mer	Prot K	20 Z	4 µl	Re-PCR	Mutation	A
Nr.21	eingesetzte Proteinase K	Gesamtmenge der Probe bei ≅ Zell-Genom-Äquivalente	≅ Zellzahl für 4 µl Probe	Ergebnis der Re-PCR	Ergebnis der Pyrosequenzierung	Peakhöhe des mutierten Nukleotids „A“ im Pyrogramm

Tabelle 35 Erklärung für die nachfolgende Tabelle (Versuch 3.8.)

3.8. Versuche mit absteigender Menge Proteinase K

mmI BRAF mutiertes Melanom: 5 x 20 Zellen						
Num-mer	Prot K	20 Z	4 µl	Re-PCR	Mutation	A
Nr. 1	5 µl	≅ 14 µl	≅ 5,7 Z	+	100 %	A = 100
Nr. 2	4 µl	≅ 13 µl	≅ 6,15 Z	-	-	-
Nr. 3	3 µl	≅ 12 µl	≅ 6,7 Z	+	0 %	A = 0
Nr. 4	2 µl	≅ 11 µl	≅ 7,3 Z	++	0 %	A = 0
Nr. 5	1 µl	≅ 10 µl	≅ 8 Z	++	0 %	A = 0
mmII BRAF mutiertes Melanom: 5 x 20 Zellen						
Num-mer	Prot K	20 Z	4 µl	Re-PCR	Mutation	A
Nr. 6	5 µl	≅ 14 µl	≅ 5,7 Z	+	100 %	A = 100
Nr. 7	4 µl	≅ 13 µl	≅ 6,15 Z	+	StopCo	A = 0
Nr. 8	3 µl	≅ 12 µl	≅ 6,7 Z	+	0 %	A = 0
Nr. 9	2 µl	≅ 11 µl	≅ 7,3 Z	PD	-	-
Nr. 10	1 µl	≅ 10 µl	≅ 8 Z	+	60 % +StopCo	A = 60
mmN NRAS mutiertes Melanom: 5 x 20 Zellen						
Num-mer	Prot K	20 Z	4 µl	Re-PCR	Mutation	A
Nr. 11	5 µl	≅ 14 µl	≅ 5,7 Z	PD	-	-
Nr. 12	4 µl	≅ 13 µl	≅ 6,15 Z	PD	-	-
Nr. 13	3 µl	≅ 12 µl	≅ 6,7 Z	+	40 %	A = 40
Nr. 14	2 µl	≅ 11 µl	≅ 7,3 Z	+	10 %	A = 10
Nr. 15	1 µl	≅ 10 µl	≅ 8 Z	+	0 %	A = 0

3. Ergebnisse

bcc Basalzellkarzinom: 5 x 20 Zellen						
Num-mer	Prot K	20 Z	4 µl	Re-PCR	Mutation	A
Nr. 16	5 µl	≅ 14 µl	≅ 5,7 Z	-	-	-
Nr. 17	4 µl	≅ 13 µl	≅ 6,15 Z	-	-	-
Nr. 18	3 µl	≅ 12 µl	≅ 6,7 Z	++	0 %	A = 0
Nr. 19	2 µl	≅ 11 µl	≅ 7,3 Z	++	0 %	A = 0
Nr. 20	1 µl	≅ 10 µl	≅ 8 Z	+	0 %	A = 0
mmI BRAF mutiertes Melanom: 5 x 50 Zellen						
Num-mer	Prot K	50 Z	4 µl	Re-PCR	Mutation	A
Nr. 21	5 µl	≅ 14 µl	≅ 14,3 Z	++	20 %	A = 20
Nr. 22	4 µl	≅ 13 µl	≅ 15,4 Z	PD	-	-
Nr. 23	3 µl	≅ 12 µl	≅ 16,7 Z	+	100 %	A = 50
Nr. 24	2 µl	≅ 11 µl	≅ 18,2 Z	++	100 %	A = 40
Nr. 25	1 µl	≅ 10 µl	≅ 20 Z	PD	-	-

Tabelle 36 Ergebnisse (Versuch 3.8.)

Aus den Versuchen lässt sich kein Zusammenhang zwischen eingesetzter Menge der Proteinase und Zell-Genom-Äquivalent ableiten: bei jedem Tumor variieren die Anzahl der verwertbaren Proben, in denen ausreichend Amplifikat zur Verfügung steht, die ausgewerteten Ergebnisse der Mutationsanalyse und somit die Anzahl der nachgewiesenen Mutationen.

Die Ergebnisse zeigen, dass auch mit wenig Proteinase K ein quantitativ ausreichendes DNA-Amplifikat entsteht und die Mutation detektiert werden kann.

Bei dem NRAS positivem Tumor (mmN) und dem Basalzellkarzinom (bcc) lassen sich nur bei 1-3 µl Proteinase K DNA-Amplifikate nachweisen, die anschließend pyrosequenziert werden können.

3.9. Versuch mit absteigender Proteinase K bei unterschiedlichen Zellzahlen

Ein interessanter Aspekt ergibt sich beim Vergleich der Ergebnisse des Melanoms mmI mit 20 und 50 Zellen (siehe Tabelle 36): die Erfolgsquote, ein verwertbares Amplifikat zu erhalten, ist mit 20 Zellen höher (20 Zellen : 50 Zellen = 80% : 60%), wohingegen die Mutation bei 50 Zellen häufiger nachgewiesen werden kann. Es lässt sich ebenfalls daraus schließen, dass ein Nachweis für die Mutation bei einer höheren Zellzahl verlässlicher möglich ist, wohingegen eine Pyrosequenzierung häufiger bei einer geringeren zu untersuchenden Zellzahl gelingt.

Bei beiden BRAF positiven Melanomen (mmI und mmII) ist die BRAF-V600E-Mutation erwartungsgemäß nachweisbar. In mmII lässt sich zusätzlich das Stop Codon, einmal in Kombination mit dem Wildtyp und einmal mit der BRAF-V600E-Mutation finden.

Zusätzlich sind der Nachweis eines Stop Codons neben der BRAF-V600E-Mutation in einem BRAF-V600E positiven Melanom sowie die erstmalige Detektion einer BRAF-V600E-Mutation neben dem Wildtyp bei dem NRAS positiven Melanom (mmN) weitere Hinweise auf intratumorale Heterogenität.

So zeigt sich für jedes Melanom ein „individuelles“ Bild, das sich sowohl molekularbiologisch als auch mikro- und makroskopisch widerspiegelt (siehe 4.4.3.3.)

3.9. Versuch mit absteigender Proteinase K bei unterschiedlichen Zellzahlen

Ablauf:

Im folgenden Versuchsaufbau soll sich die zu untersuchende Zellzahl weiter an die untere Grenze für einen verlässlichen Nachweis einer BRAF-Mutation annähern. Um zusätzlich die Reproduzierbarkeit zu eruieren wird der Versuch für alle Tumore (zwei positive BRAF Melanome, mmI und mmII, und ein Basalzellkarzinom, bcc) 3mal wiederholt. Es werden unterschiedliche Zellzahlen (2x, 4x, 8x, 16x 20 Zellen) in Kombination mit einer absteigenden Menge Proteinase K, wie in Versuch 3.8., analysiert. Abbildung 27 und Tabelle 37. zeigen eine Erklärung und Übersicht für die verschiedenen Kombinationen sowie die daraus resultierenden untersuchten Zellzahlen.

Die Ergebnisse finden sich in Tabelle 38 und Tabelle 39.

3. Ergebnisse

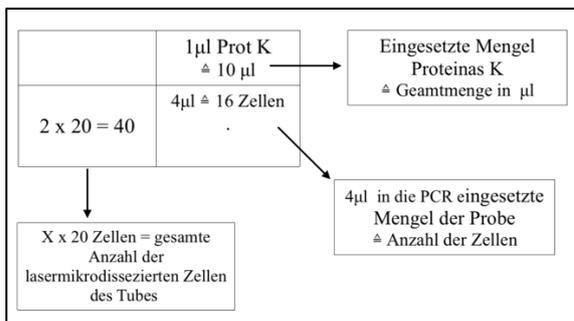


Abbildung 27 Erklärung der nachfolgenden Tabelle (Versuch 3.9.)

	1µl Prot K ≅ 10 µl	2µl Prot K ≅ 11 µl	3µl Prot K ≅ 12 µl	4µl Prot K ≅ 13 µl	5µl Prot K ≅ 14 µl
2 x 20 = 40	4µl ≅ 16 Zellen .	4µl ≅ 15 Zellen .	4µl ≅ 13 Zellen .	4µl ≅ 12 Zellen .	4µl ≅ 11 Zellen .
4 x 20 = 80	4µl ≅ 32 Zellen .	4µl ≅ 29 Zellen .	4µl ≅ 27 Zellen .	4µl ≅ 25 Zellen .	4µl ≅ 23 Zellen .
8 x 20 = 160	4µl ≅ 64 Zellen .	4µl ≅ 58 Zellen .	4µl ≅ 53 Zellen .	4µl ≅ 49 Zellen .	4µl ≅ 46 Zellen .
16x20 = 320	4µl ≅ 128 Zellen .	4µl ≅ 116 Zellen .	4µl ≅ 107 Zellen .	4µl ≅ 99 Zellen .	4µl ≅ 91 Zellen .

Tabelle 37 Übersicht des Versuchsaufbaus (Versuch 3.9.)

Ergebnis:

mmII	Verwert -bar	Primer Dimer	Wildtyp	BRAF- V600E- Mutation	Stop Codon	sonstige Mutation
1	18	2	4	8	5	1
2	16	4	4	11	1	0
3	17	3	8	6	3	0
alle	51	9	16	25	9	1

3.9. Versuch mit absteigender Proteinase K bei unterschiedlichen Zellzahlen

mmI	Verwert -bar	Primer Dimer	Wildtyp	BRAF- V600E- Mutation	Stop Codon	sonstige Mutation
1	12	8	3	3	5	1
2	13	7	5	6	1	1
3	12	8	6	6	0	0
alle	37	23	14	15	6	2
bcc	Verwert -bar	Primer Dimer	Wildtyp	BRAF- V600E- Mutation	Stop Codon	sonstige Mutation
1	17	3	12	1	4	0
2	19	1	12	1	6	0
3	20	0	17	0	2	1
alle	56	4	41	2	12	1

Tabelle 38 Ergebnisse (Versuch 3.9.)

	mmII	mmI	bcc	Gesamt
Primer Dimer	9	23	4	36
Verwertbar	51	37	56	144
Wildtyp	16	14	41	71
BRAF-V600E- Mutation	25	15	2	42
Stop Codon und stille Mutation	9	6	12	27
sonstige Mutation	1	2	1	4

Tabelle 39 Übersicht der Ergebnisse (Versuch 3.9.)

3. Ergebnisse

Tumor	Häufigkeit des Stopcodons nach Auswertung der Pyrogramme		
	Gesamt	Bezogen auf die verwertbaren Ergebnisse	In Prozent
mmI	6	6/37	16,2 %
mmII	9	9/51	17,6 %
bcc	12	12/56	21,4 %

Tabelle 40 Häufigkeit des Stop Codons und der stillen Mutation nach der Auswertung der Pyrogramme (Versuch 3.9.)

Von 180 Proben können 144 ausgewertet werden. Bei den jeweiligen Tumoren variiert die Anzahl der nicht verwertbaren Proben (Primer Dimer) zwischen 4 bis 23 von je 60 (bcc:4, mmII:9, mmI:23). Es zeigen sich also deutliche Unterschiede zwischen den Tumoren. Vergleicht man jeweils die drei Auswertungen eines Tumors, ergibt sich jedoch eine geringere Variabilität.

Das Stop Codon ist in allen 3 Tumoren nachweisbar, wie in Tabelle 40 aufgeführt.

In den beiden Melanomen scheint die Anzahl des Nachweises des Stop Codons unterschiedlich, in Bezug auf alle verwertbaren Proben aber ähnlich (16,2% : 17,6%).

In 4 der 180 Proben zeigen sich seltene Mutationen (siehe Tabelle 41), die aufgrund ihres sehr ungewöhnlichen Pyrogramms jedoch nur schwer zu interpretieren und einzuordnen sind. Artefakte könnten eine Rolle spielen. Vermutlich deuten sie aber darauf hin, dass die Analyse weniger Zellen ein verlässliches und repräsentatives Ergebnis für die Mutationslandschaft des Tumors liefert. Daher wird in den Hauptversuchen eine möglichst niedrige Zellzahl gewählt.

In Bezug auf die Ergebnisse der Wiederholungen bei den jeweiligen Tumoren unterscheiden sich diese in der Anzahl der verwertbaren Proben und der Anzahl der nachgewiesenen Wildtyp Zellen beziehungsweise Mutationen.

Die BRAF-V600E-Mutation kann in mmII (25 Proben) absolut und relativ häufiger nachgewiesen werden als in mmI (15 Proben). Unter welchen Bedingungen (Zellzahl und eingesetzte Proteinase K) die Mutation am zuverlässigsten nachzuweisen ist, lässt sich nicht erkennen.

Auch mit wenig lasermikrodissezierten Zellen und reduzierter Menge Proteinase K ist ausreichend Amplifikat und eine BRAF-V600E-Mutation nachweisbar.

Die Ergebnisse zeigen eine Variabilität zwischen den einzelnen Tumoren in Bezug auf die Anzahl der möglichen Auswertungen. Sie sprechen für die Individualität eines jeden Tumors und weisen auf die intratumorale Heterogenität hin.

Tumor	Probennummer	Auswertung
mmII:	P14	V600M
mmI:	P62	Eine Mutation in Codon 599
	P85	Eine Mutation in Codon 598 (Position 1794)
bcc:	P165	p.S602S, c.1806T>C

Tabelle 41 Übersicht der seltenen Mutationen (Versuch 3.9.)

3.10. Reproduzierbarkeit

Ablauf:

In 3.9. wird nachgewiesen, dass auch bei der Mikrodisektion weniger Zellen mit reduzierter Menge TRIS EDTA Puffer und reduzierter Proteinase K eine DNA Analyse und ein Nachweis der BRAF-V600E-Mutation möglich ist. Um die Anzahl der untersuchten Zellzahl möglichst genau definieren zu können, wird die gesamte Menge des nach dem „Verdau über Nacht“ erhaltenen Eluats in die PCR eingesetzt.

In diesem Versuch wird die Reproduzierbarkeit unter folgenden Bedingungen getestet: bei einem BRAF positiven Melanom (mmII) werden in 5 Gebieten je 4 Regionen á 20 Zellen lasermikrodiseziert und für den „Verdau über Nacht“ mit je 5 µl TRIS EDTA Puffer und viermal 1 µl und einmal 2 µl Proteinase K angesetzt. Anschließend wird die gesamte Menge der jeweiligen Probe (ca.6 beziehungsweise 7 µl) in die PCR eingesetzt, so dass die DNA aller lasermikrodisezierten Zellen untersucht werden kann. Der Versuch soll zeigen, ob trotz der reduzierten Menge des Tris EDTA Puffers und der Proteinase K eine DNA-Analyse und ein Nachweis der BRAF-Mutation weiterhin möglich sind.

3. Ergebnisse

Ergebnis:

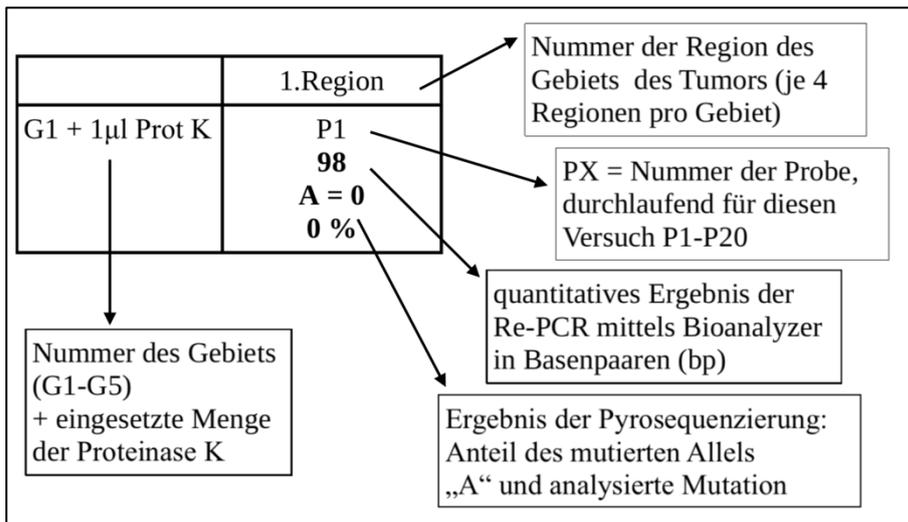


Abbildung 28 Erklärung der nachfolgenden Tabelle (Versuch 3.10.)

	1.Region	2.Region	3.Region	4.Region
G1 + 1µl Prot K	P1 98 A = 0 0 %	P2 PD	P3 98 A = 0 0 %	P4 98 A = 55 65 %
G2 + 1µl Prot K	P5 PD (66)	P6 98 A = 0 0 %, SC	P7 97 V600E2	P8 69, 97 A = 0 0 %
G3 + 1µl Prot K	P9 PD (68)	P10 PD (69)	P11 99 A = 80 60 %	P12 PD (69)
G4 + 2µl Prot K	P13 99, 105 A = 0 0 %, SC	P14 70, 99 A = 80 100 %	P15 99 A = 180 100 %	P16 99 A = 0 0 %, SC
G5 + 1µl Prot K	P17 69, 99 A = 0 0 %, SC	P18 99 A = 120 100 %	P19 100 A = 0 0 %	P20 99 A = 120 100 %

Tabelle 42 Ergebnisse (Versuch 3.10.)

Die Ergebnisse, erklärt und dargestellt in Abbildung 28 und Tabelle 42, zeigen, dass auch bei reduzierter Menge des Tris Puffers und der Proteinase K nicht nur eine ausreichende DNA-Amplifikation, sondern auch ein Nachweis der BRAF-Mutation möglich ist. Ein weiterer Vorteil dieser Versuchsreihe ist, dass alle lasermikrodissezierten Zellen in die PCR und Analyse miteinbezogen werden. In den vorherigen Versuchen konnte zwar eine theoretische Zellzahl berechnet, jedoch praktisch nicht belegt werden.

Die verlässlicheren Ergebnisse werden mit 2 μ l Proteinase K erzielt, so dass zusammenfassend für den Hauptversuch mit den Primärtumoren die folgenden Konditionen festgelegt werden:

20 Zellen werden pro Probe lasermikrodisseziert, **5 μ l TRIS EDTA Puffer** für den „Verdau über Nacht“ mit **2 μ l Proteinase K** angesetzt, um anschließend die gesamte Probe (ca. 7 μ l) in die PCR einzusetzen.

3.11. Hauptversuch - Primärtumore

Ablauf:

Lasermikrodissektion: 16-24 Regionen = 4-6 Gebiete mit je 4 Regionen

„Verdau über Nacht“: 5 µl TRIS EDTA Puffer + 2 µl Proteinase K

PCR: 7 µl (\cong gesamtes Produkt)

→ Re-PCR

→ Bioanalyser

→ Pyrosequenzierung

Bei den zwölf Melanomen MMI – MMXII handelt es sich um Primärtumore mit vorbekanntem Mutationsstatus (9x BRAF-V600E positiv, 1x BRAF-V600K positiv, 2x BRAF-V600E negativ und NRAS positiv, siehe Tabelle 43). Eine Übersicht der fotodokumentierten histologischen Schnitte findet sich in Abbildung 29. Diese dienen jeweils der topographischen Orientierung für die Darstellung der Ergebnisse.

In Abhängigkeit von der Gesamtgröße und des zur Verfügung stehenden Materials des jeweiligen Primärtumors werden in **4 - 6 Gebieten** jeweils in **4 Regionen 20 Zellen** lasermikrodisseziert. Ein „Gebiet“ setzt sich aus 4 nahe beieinanderliegenden „Regionen“ zusammen, siehe Abbildung 30. Die Auswahl der Gebiete richtet sich nach den unter dem Lasermikrodissektionsgerät identifizierten Tumoranteilen mit vitalen Tumorzellen.

Insgesamt werden 4x (4x4), 3x (5x4) und 5x (6x4) Regionen lasermikrodisseziert, also durchschnittlich 20,3 Regionen pro Tumor analysiert.

In Tabelle 44 ist die Einteilung der Ergebnisse des Bioanalyzers und in Tabelle 45 die der verwertbaren Ergebnisse der Pyrosequenzierung erklärt.

Bezeichnung für diese Arbeit	Vorversuche	bekannter Mutationsstatus
MM-I		BRAF-V600E
MM-II		BRAF-V600K
MM-III		BRAF-V600E
MM-IV		BRAF-V600E
MM-V		NRAS-Q61K
MM-VI	mmII	BRAF-V600E
MM-VII		NRAS-Q61L
MM-VIII	mmI	BRAF-V600E
MM-IX		BRAF-V600E
MM-X		BRAF-V600E
MM-XI		BRAF-V600E
MM-XII		BRAF-V600E

Tabelle 43 Übersicht der Primärtumore mit vorbekannten BRAF-Mutationsstatus und Bezeichnung aus den Vorversuchen

	Beschreibung	Erklärung
Verwertbar	Verwertbar	DNA-Analyse ist möglich, da nach der PCR ausreichend viel Amplifikat in der jeweiligen Probe zur Auswertung für die Pyrosequenzierung zur Verfügung steht (Einteilung der verwertbaren Ergebnisse siehe Tabelle 45)
PD	Primer Dimer	DNA-Analyse ist nicht möglich, da nach der PCR keine ausreichende Menge des Amplifikationsprodukts in der jeweiligen Probe zur Auswertung für die Pyrosequenzierung zur Verfügung steht

Tabelle 44 Einteilung der Ergebnisse des Bioanalyzers (Versuch 3.11.)

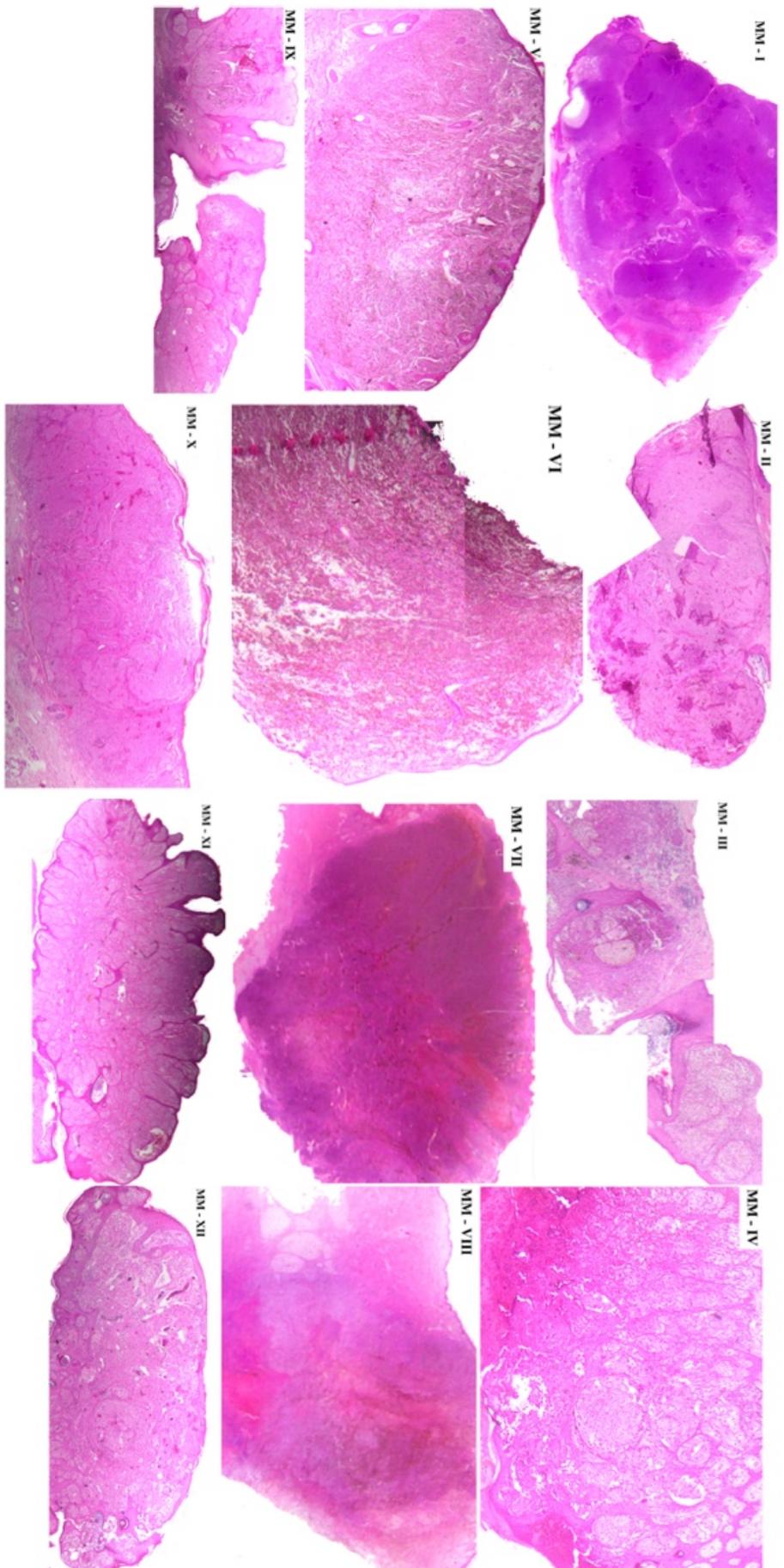


Abbildung 29 Übersicht der histologischen Schnitte MM-I bis MM-XVII

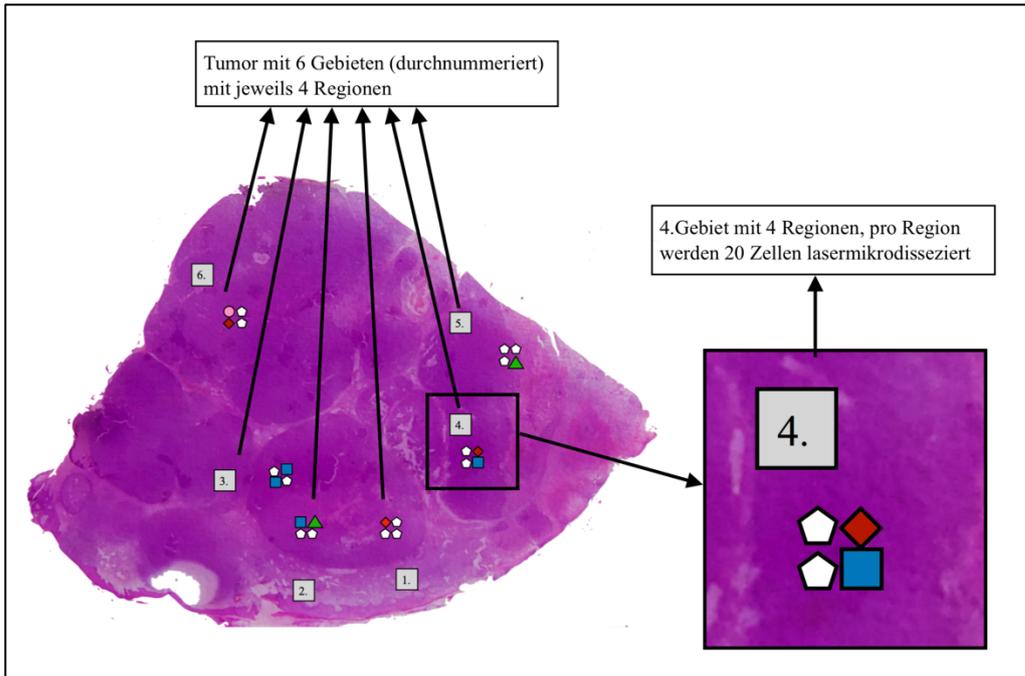


Abbildung 30 Erklärung der Einteilung in Gebiete und Regionen im Primärtumor MM-I (Versuch 3.11.)

	Beschreibung	Erklärung
A = 0	Wildtyp	Pyrogramm ohne Nachweis einer Mutation
A = +	BRAF-V600E positiv	Pyrogramm mit BRAF-V600E-Mutation
Stop Codon	Stop Codon und Stille Mutation	Pyrogramm zeigt Stop Codon und Stille Mutation
V600K	BRAF-V600K positiv	Pyrogramm mit BRAF-V600K- Mutation In der Dokumentation berücksichtigt, da 2.häufigst nachgewiesene BRAF-Mutation dieser Arbeit
Sonstige	Mutationsnachweis	Pyrogramm zeigt eine Mutation , bei der es sich aber nicht um die BRAF-V600E-Mutation handelt

Tabelle 45 Einteilung der verwertbaren Ergebnisse der Pyrosequenzierung (Versuch 3.11.)

Ergebnis

Für jeden Primärtumor werden individuell zunächst die Ergebnisse der Mutationsanalysen tabellarisch - „kein verwertbares Ergebnis“ inkludiert - nach Gebiet

3. Ergebnisse

und Region mit Legende (siehe Abbildung 31) zusammengefasst. Topographisch werden sie entsprechend in der Abbildung des histologischen Schnittes dargestellt. Dies ermöglicht die genaue Dokumentation während der Lasermikrodissektion. Die jeweils anschließende Tabelle fasst die Ergebnisse zusammen (Erklärung siehe Abbildung 32, Ergebnisse siehe Abbildung 33 bis Abbildung 44, Tabelle 46 bis Tabelle 57).

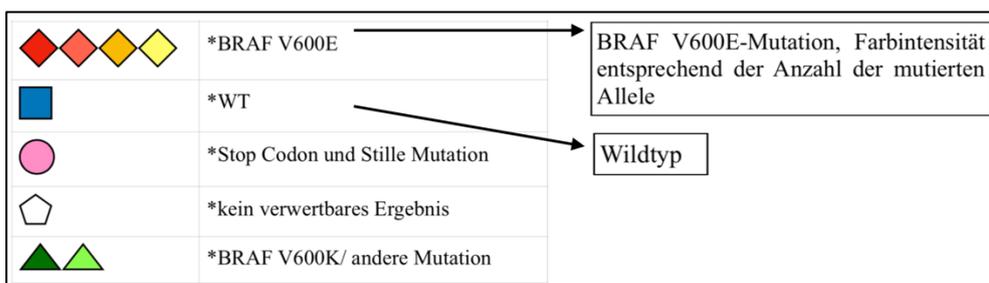


Abbildung 31 Legende für die Auswertung der Primärtumore (Versuch 3.11.)

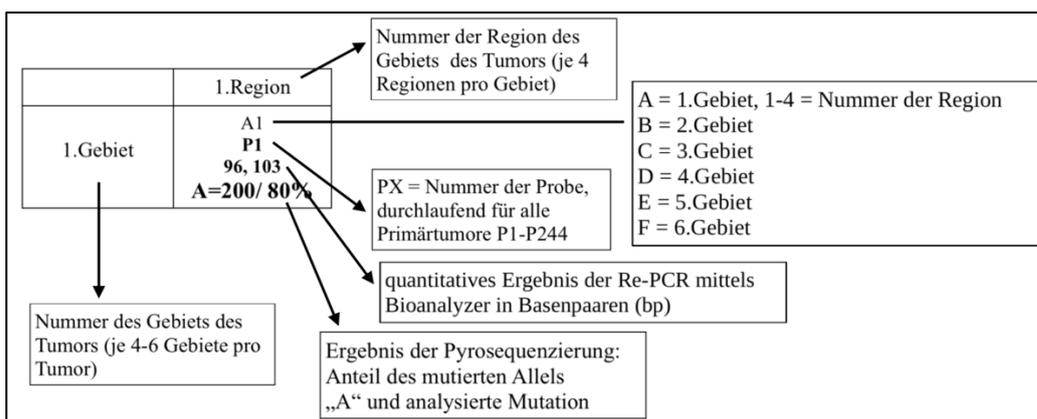


Abbildung 32 Erklärung der nachfolgenden Tabellen für den Hauptversuch (Versuch 3.11.)

In Abbildung 45 findet sich eine Übersicht aller histologischen Schnitte mit topographischer Anordnung der Ergebnisse. Tabellarisch sind die Ergebnisse in Tabelle 58, Tabelle 59, Tabelle 60, Tabelle 61 (Mutationen mit entsprechender Häufigkeit) und Tabelle 62 (seltene Mutationen) zusammengefasst.

1.)MM-I

	1.Region	2.Region	3.Region	4.Region											
1.Gebiet	A1 P1 (96, 103) A=200 / 80 %				<table border="1"> <tr> <td>◆◆◆◆</td> <td>*BRAF V600E</td> </tr> <tr> <td>■</td> <td>*WT</td> </tr> <tr> <td>●</td> <td>*Stop Codon und Stille Mutation</td> </tr> <tr> <td>◻</td> <td>*kein verwertbares Ergebnis</td> </tr> <tr> <td>▲▲</td> <td>*BRAF V600K/ andere Mutation</td> </tr> </table>	◆◆◆◆	*BRAF V600E	■	*WT	●	*Stop Codon und Stille Mutation	◻	*kein verwertbares Ergebnis	▲▲	*BRAF V600K/ andere Mutation
◆◆◆◆	*BRAF V600E														
■	*WT														
●	*Stop Codon und Stille Mutation														
◻	*kein verwertbares Ergebnis														
▲▲	*BRAF V600K/ andere Mutation														
2.Gebiet	B1 P5 (63, 69, 99) A=0	B2 P6 (64, 92) V 600K/ 99%													
3.Gebiet		C2 P10 (98) A=0		C4 P12 (66, 68, 99) A=0											
4.Gebiet		D2 P14 (97) A=380 / 100%	D3 P15 (98) A=0												
5.Gebiet			E3 P19 (97) V600K/ 100%												
6.Gebiet	F1 P21 (98) StopCo + St.Mu.			F4 P24 (98) A=250 / 100%											

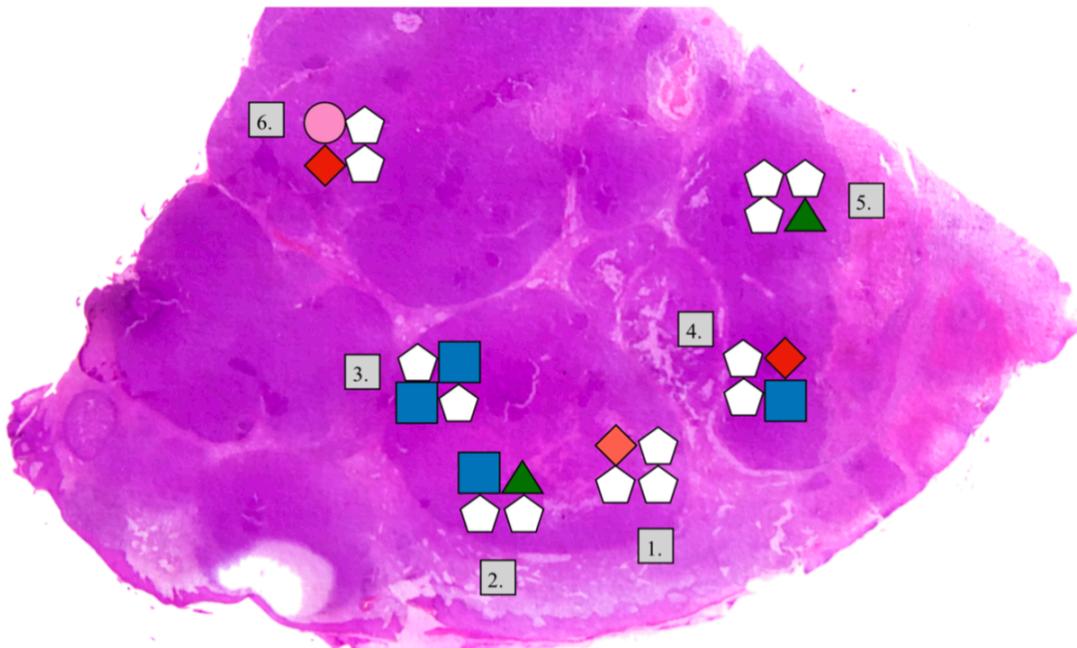


Abbildung 33 MM-I: tabellarische Ergebnisse und Topographie im korrespondierenden histologischen Schnitt, Legende (Versuch 3.11.)

Histo	Proben	Verwertbar	PD	Wildtyp (A = 0)	BRAF- V600E	Stop Codon	Sonstige (V600K)
MM-I	24	10	14	4	3	1	2 (2)
		10/24 =	14/24	4/10 =	3/ 10 =	1/ 10 =	2/ 10 =
		41,7 %	58,3 %	40 %	30 %	10 %	20 %

Tabelle 46 Ergebnisse von MM-I (Versuch 3.11.)

3. Ergebnisse

2.)MM-II

	1.Region	2.Region	3.Region	4.Region		
1.Gebiet						*BRAF V600E
2.Gebiet						*WT
3.Gebiet						*Stop Codon und Stille Mutation
4.Gebiet						*kein verwertbares Ergebnis
5.Gebiet						*BRAF V600K/ andere Mutation

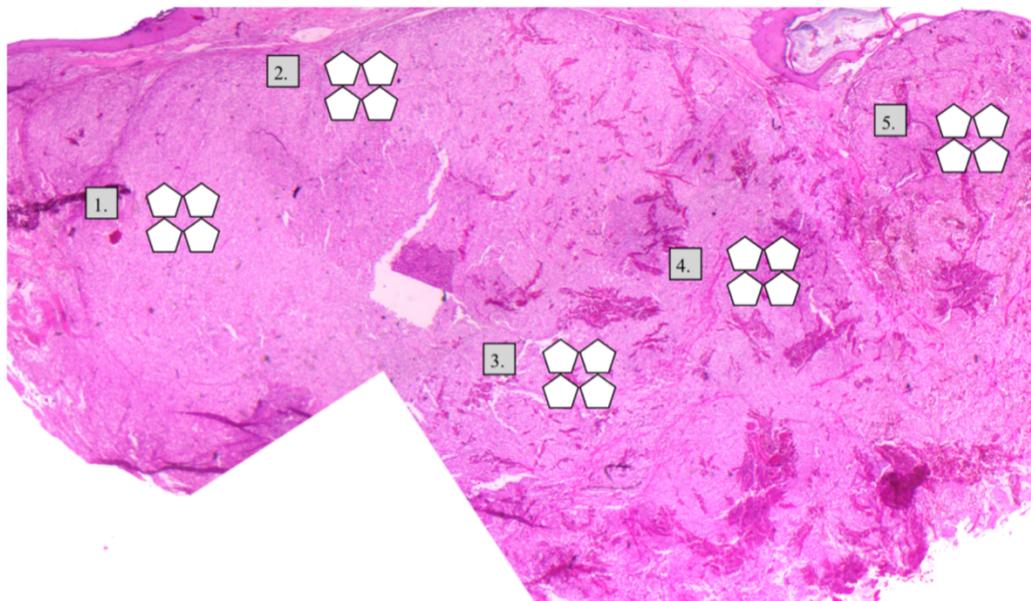


Abbildung 34 MM-II: tabellarische Ergebnisse und Topographie im korrespondierenden histologischen Schnitt, Legende (Versuch 3.II.)

Histo	Proben	Verwertbar	PD	Wildtyp (A = 0)	BRAF- V600E	Stop Codon	Sonstige (V600K)
MM-II	20	0	20	0	0	0	0
	0	0	100 %	0	0	0	0

Tabelle 47 Ergebnisse von MM-II (Versuch 3.II.)

3.)MM-III

	1.Region	2.Region	3.Region	4.Region
1.Gebiet	A1 P45 (69, 99) A = 0		A3 P47 (100) A = 0	A4 P48 (101) A = 0
2.Gebiet		B2 P50 (101) A = 0		
3.Gebiet		C2 P54 PD (70, 89) V 600K/ 100%	C3 P55 102) A = 0	
4.Gebiet		D2 P58 (101) A = 0		D4 P60 (67, 90) V 600K/ 100%

	*BRAF V600E
	*WT
	*Stop Codon und Stille Mutation
	*kein verwertbares Ergebnis
	*BRAF V600K/ andere Mutation

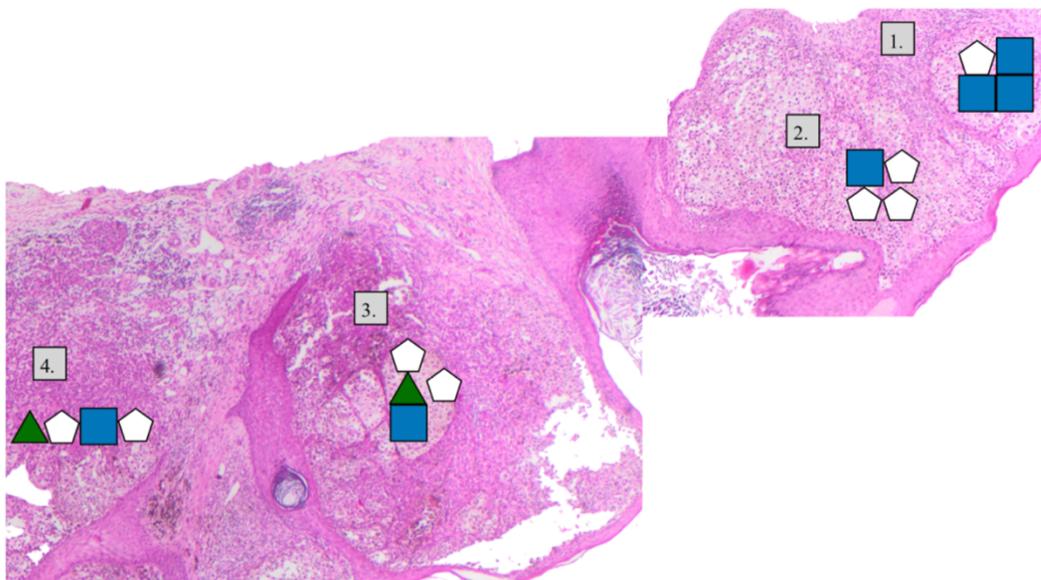


Abbildung 35 MM-III: tabellarische Ergebnisse und Topographie im korrespondierenden histologischen Schnitt, Legende (Versuch 3.11.)

Histo	Proben	Verwertbar	PD	Wildtyp (A = 0)	BRAF- V600E	Stop Codon	Sonstige (V600K)
MM-III	16	8	8	6	0	0	2 (2)
		8/16 = 50 %	8/16 = 50 %	6/ 8 = 75%	0 %	0 %	2/8 = 25 %

Tabelle 48 Ergebnisse von MM-III (Versuch 3.11.)

3. Ergebnisse

4.)MM-IV

	1.Region	2.Region	3.Region	4.Region
1.Gebiet			A3 P63 - V 600K/ 100%	
2.Gebiet	B1 P65 (101) A = 0		B3 P67 (102) StopCo+St.M u.	
3.Gebiet			C3 P71 (99) ungewöhnliche Mutation	C4 P72 (100) A = 100 100%
4.Gebiet		D2 P74 (68, 100) ungewöhnliche Mutation	D3 P75 (68, 93) V 600K/ 100%	D4 P76 (100) A = 0

	*BRAFF V600E
	*WT
	*Stop Codon und Stille Mutation
	*kein verwertbares Ergebnis
	*BRAFF V600K/ andere Mutation

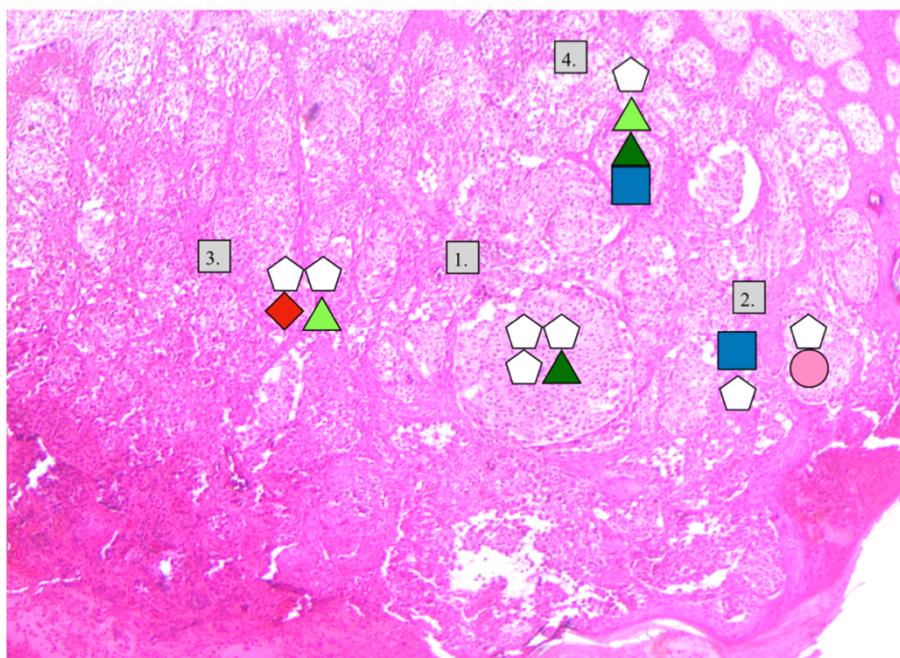


Abbildung 36 MM-IV: tabellarische Ergebnisse und Topographie im korrespondierenden histologischen Schnitt, Legende (Versuch 3.11.)

Histo	Proben	Verwertbar	PD	Wildtyp (A = 0)	BRAF- V600E	Stop Codon	Sonstige (V600K)
MM-IV	16	8	8	2	1	1	4 (2)
		8/16 =	8/16 =	2/ 8 =	1/8 =	1/ 8 =	4/8 =
		50 %	50 %	25%	12,5 %	12,5%	50 %

Tabelle 49 Ergebnisse von MM-IV (Versuch 3.11.)

5.)MM-V

	1.Region	2.Region	3.Region	4.Region
1.Gebiet	A1 P77 PD (68) ungewöhnliche Mutation	A2 P78 (100) A = 0	A3 P79 (100) A = 0	A4 P80 (100) A = 0
2.Gebiet		B2 P82 (99) A = 0		B4 P84 (99) A = 0
3.Gebiet			C3 P87 (100, 106) A = 50 20%	
4.Gebiet	D1 P89 (100) A = 0	D2 P90 (100) A = 0	D3 P91 (100) A = 0	D4 P92 (69, 99, 105) StopCo+St.M u.

				*BRAF V600E
				*WT
				*Stop Codon und Stille Mutation
				*kein verwertbares Ergebnis
				*BRAF V600K/ andere Mutation

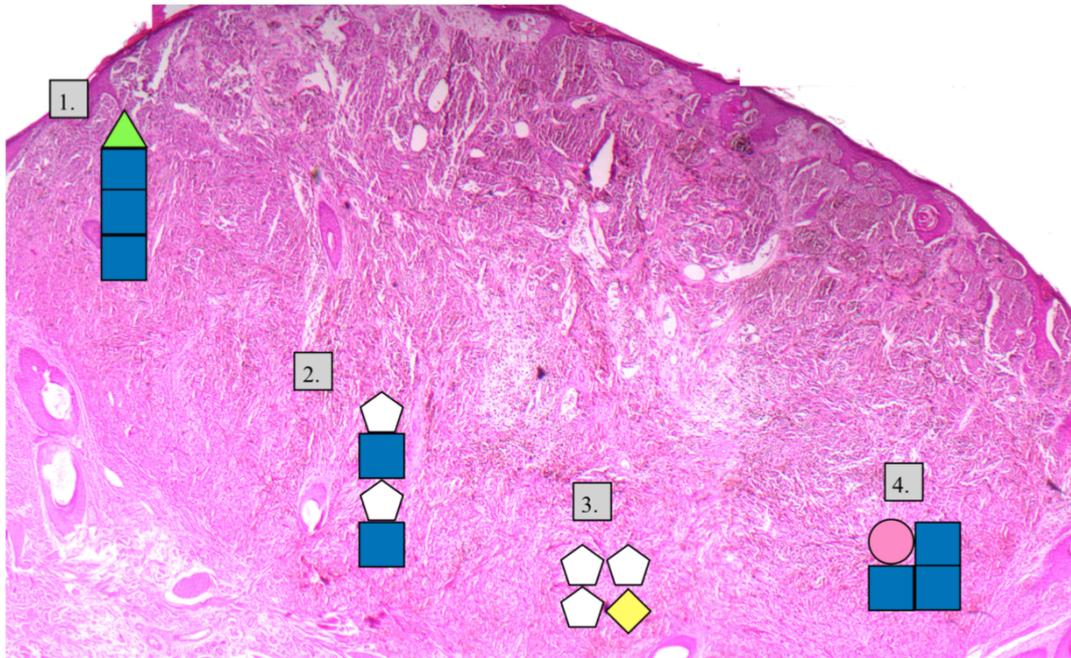


Abbildung 37 MM-V: tabellarische Ergebnisse und Topographie im korrespondierenden histologischen Schnitt, Legende (Versuch 3.11.)

Histo	Proben	Verwertbar	PD	Wildtyp (A = 0)	BRAF- V600E	Stop Codon	Sonstige (V600K)
MM-V	16	11	5	8	1	1	1 (0)
		11/ 16 =	5/16 =	8/11 =	1/11 =	1/11 =	1/11 =
		68,75 %	31,25 %	72,7 %	9,1 %	9,1 %	9,1 %

Tabelle 50 Ergebnisse von MM-V (Versuch 3.11.)

3. Ergebnisse

6.)MM-VI

	1.Region	2.Region	3.Region	4.Region	
1.Gebiet	A1 P93 (100, 108) A = 80 80%	A2 P94 (101) A = 50 45%	A3 P95 (101) A = 0	A4 P96 (101, 106) A = 0	
2.Gebiet	B1 P97 (101) A = 50 15%	B2 P98 (69, 102) A = 25 50%	B3 P99 (101) A = 0	B4 P100 (101) A = 100 85%	
3.Gebiet	C1 P101 (101) A = 0	C2 P102 (101) StopCo+St.M u.	C3 P103 (101) A = 0		
4.Gebiet	D1 P105 (100) A = 10 10%	D2 P106 (100) A = 100 85%	D3 P107 (99) A = 180 100%		

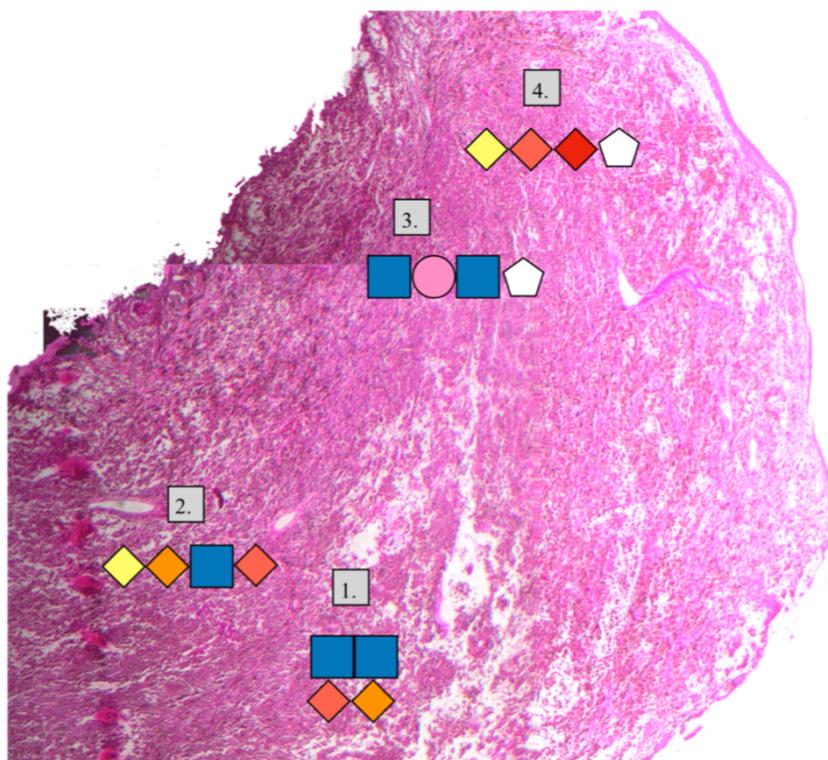


Abbildung 38 MM-VI: tabellarische Ergebnisse und Topographie im korrespondierenden histologischen Schnitt, Legende (Versuch 3.11.)

Histo	Proben	Verwertbar	PD	Wildtyp (A = 0)	BRAF- V600E	Stop Codon	Sonstige (V600K)
MM-VI	16	14	2	5	8	1	0
		14/16 =	2/16 =	5/14	8/14 =	1/14 =	/
		87,5%	12,5 %	35,7 %	57,1 %	7,1 %	

Tabelle 51 Ergebnisse von MM-VI (Versuch 3.11.)

7.)MM-VII

	1.Region	2.Region	3.Region	4.Region
1.Gebiet		A2 P110 (98) A = 0	A3 P111 (98) A = 0	
2.Gebiet		B2 P114 (99) StopCo+St.M u.		
3.Gebiet			C3 P119 (99) A = 0	C4 P120 (99) A = 0
4.Gebiet				D4 P124 (99) StopCo+St.M u.
5.Gebiet				
6.Gebiet				P132 (100) A = 0

				*BRAF V600E
				*WT
				*Stop Codon und Stille Mutation
				*kein verwertbares Ergebnis
				*BRAF V600K/ andere Mutation

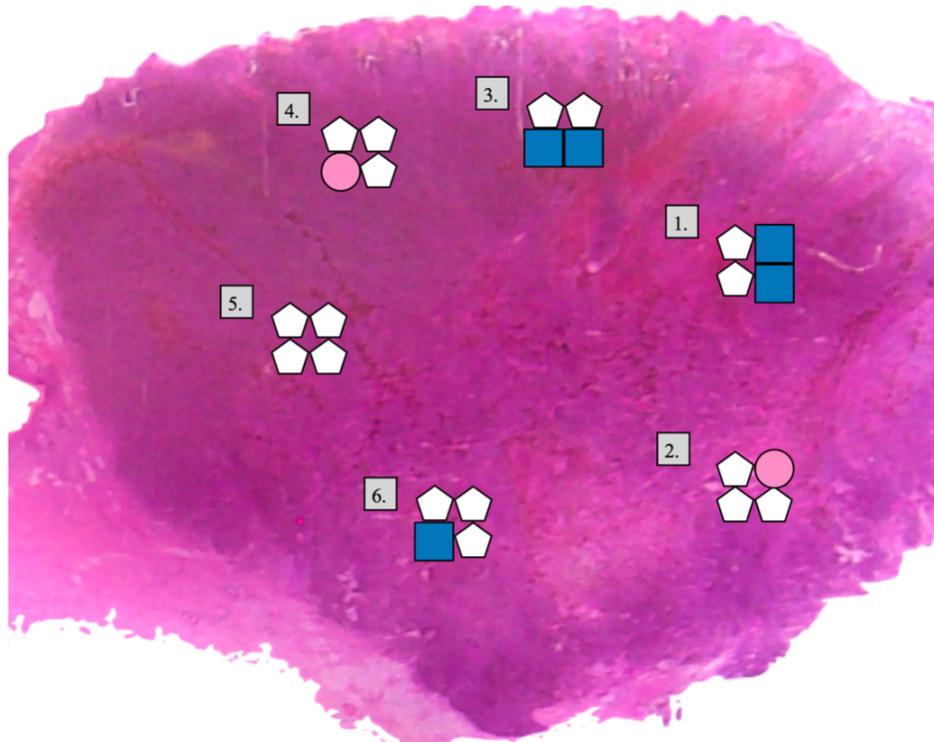


Abbildung 39 MM-VII: tabellarische Ergebnisse und Topographie im korrespondierenden histologischen Schnitt, Legende (Versuch 3.11.)

Histo	Proben	Verwertbar	PD	Wildtyp (A = 0)	BRAF- V600E	Stop Codon	Sonstige (V600K)
MM-VII	24	7	17	5	0	2	0
		7/24 = 29,2 %	17/24 =	5/7 =	0 %	2/7 =	0 %
			70,8 %	71,4 %		28,6 %	

Tabelle 52 Ergebnisse von MM-VII (Versuch 3.11.)

3. Ergebnisse

8.)MM-VIII

	1.Region	2.Region	3.Region	4.Region
1.Gebiet		A2 P134 (64,[98]) A = 0		
2.Gebiet			B3 P139 (64, 99) A = 0	
3.Gebiet		C2 P142 (69, [99]) V600K/ 40%		
4.Gebiet	D1 P145 (63, 99) A = 0			
5.Gebiet			E3 P151 (99) A = 0	E4 P152 (67, 83, 99) V 600K/ 90%
6.Gebiet				

	*BRAF V600E
	*WT
	*Stop Codon und Stille Mutation
	*kein verwertbares Ergebnis
	*BRAF V600K/ andere Mutation

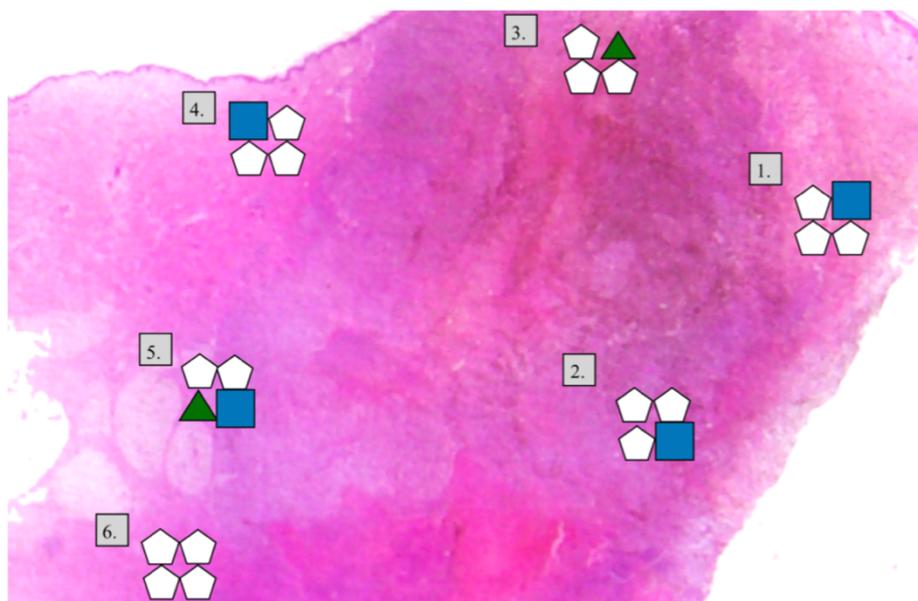


Abbildung 40 MM-VIII: tabellarische Ergebnisse und Topographie im korrespondierenden histologischen Schnitt, Legende (Versuch 3.11.)

Histo	Proben	Verwertbar	PD	Wildtyp (A = 0)	BRAF- V600E	Stop Codon	Sonstige (V600K)
MM-VIII	24	6	18	4	0	0	2 (2)
		6/24 = 25%	18/24 =	4/6 =	0 %	0 %	2/6 =
			75%	66,7 %			33,3 %

Tabelle 53 Ergebnisse von MM-VIII (Versuch 3.11.)

9.)MM-IX

	1.Region	2.Region	3.Region	4.Region		
1.Gebiet						
2.Gebiet				B4 P164 (68, 98) A = 5 5%		*BRAF V600E
3.Gebiet			C3 P167 (97) A = 0			*WT
4.Gebiet						*Stop Codon und Stille Mutation
5.Gebiet	E1 P173 (98) A = 0					*kein verwertbares Ergebnis
						*BRAF V600K/ andere Mutation

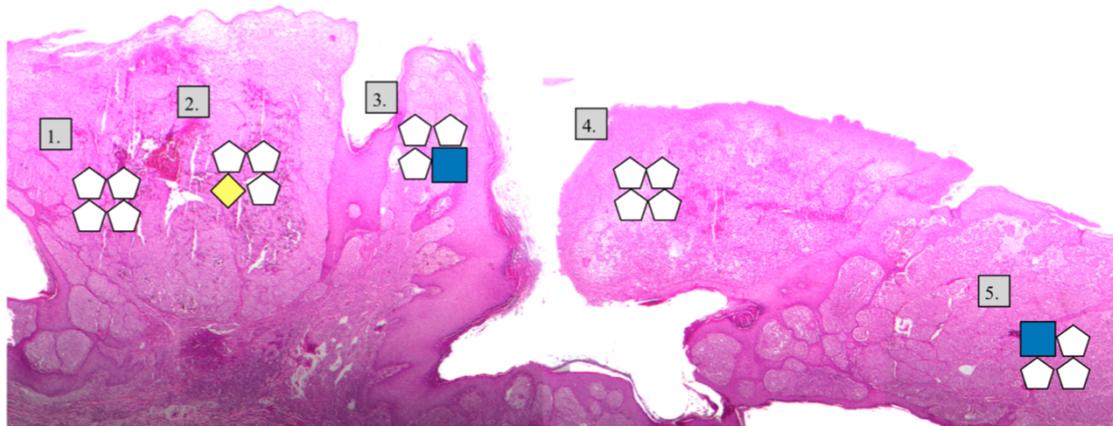


Abbildung 41 MM-IX: tabellarische Ergebnisse und Topographie im korrespondierenden histologischen Schnitt, Legende (Versuch 3.11.)

Histo	Proben	Verwertbar	PD	Wildtyp (A = 0)	BRAF- V600E	Stop Codon	Sonstige (V600K)
MM-IX	20	3	17	2	1	0	0
		3/ 20 =	17/ 20 =	2/3 =	1/3 =	0	0
		15 %	85 %	66,7 %	33,3 %		

Tabelle 54 Ergebnisse von MM-IX (Versuch 3.11.)

3. Ergebnisse

10.)MM-X

	1.Region	2.Region	3.Region	4.Region	
1.Gebiet		A2 P178 (99) StopCo+St.M u.	A3 P179 (98) A=390/100%		*BRAF V600E *WT *Stop Codon und Stille Mutation *kein verwertbares Ergebnis *BRAF V600K/ andere Mutation
2.Gebiet					
3.Gebiet	C1 P185 PD (65, 100) A = 0		C3 P187 (99) A=200/100%		
4.Gebiet	D1 P189 (97) A = 0	D2 P190 (97) StopCo+St.M u.			
5.Gebiet	E1 P193 (98) A = 0		E3 P195 (98) A = 0		

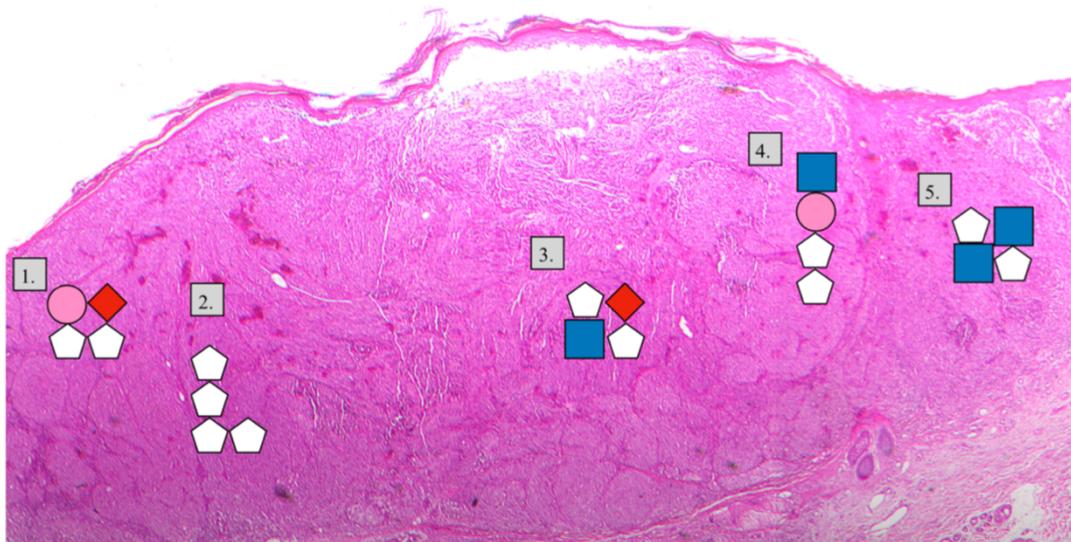


Abbildung 42 MM-X: tabellarische Ergebnisse und Topographie im korrespondierenden histologischen Schnitt, Legende (Versuch 3.11.)

Histo	Proben	Verwertbar	PD	Wildtyp (A = 0)	BRAF- V600E	Stop Codon	Sonstige (V600K)
MM-X	20	8	12	4	2	2	0
		8/20 =	12/20 =	4/8 =	2/8 =	2/8 =	0
		40 %	60%	50 %	25 %	25 %	

Tabelle 55 Ergebnisse von MM-X (Versuch 3.11.)

11.)MM-XI

	1.Region	2.Region	3.Region	4.Region		
1.Gebiet				A4 P200 PD (68, 87) fragl. V600K		*BRAF V600E
2.Gebiet		B2 P202 (99) A = 0				*WT
3.Gebiet						*Stop Codon und Stille Mutation
4.Gebiet				D4 P212 (69, 98) A = 0		*kein verwertbares Ergebnis
5.Gebiet		E2 P214 (68, 92) V 600K/ 100%				*BRAF V600K/ andere Mutation
6.Gebiet						

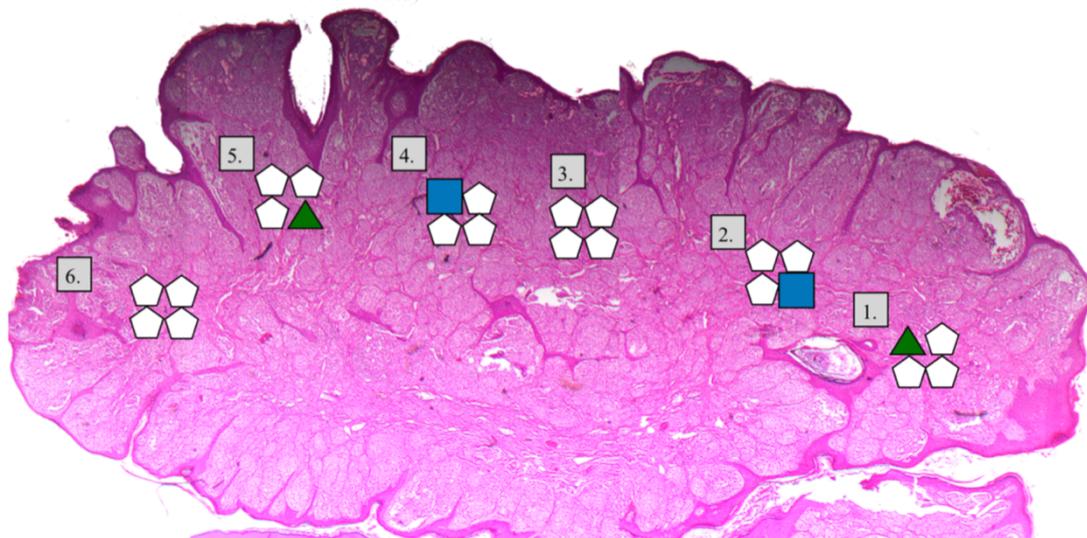


Abbildung 43 MM-XI: tabellarische Ergebnisse und Topographie im korrespondierenden histologischen Schnitt, Legende (Versuch 3.11.)

Histo	Proben	Verwertbar	PD	Wildtyp (A = 0)	BRAF- V600E	Stop Codon	Sonstige (V600K)
MM-XI	24	4	20	2	0	0	2 (1, 1?)
		4/24 = 16,7 %	20/ 24 = 83,3 %	2/4 = 50 %	0 %	0 %	2/4 = 50 %

Tabelle 56 Ergebnisse von MM-XI (Versuch 3.11.)

3. Ergebnisse

12.)MM-XII

	1.Region	2.Region	3.Region	4.Region											
1.Gebiet	A1 P221 98 A=250/ 100%	A2 P222 64,[99] A = 0			<table border="1"> <tr> <td>◆◆◆◆</td> <td>*BRAF V600E</td> </tr> <tr> <td>■</td> <td>*WT</td> </tr> <tr> <td>●</td> <td>*Stop Codon und Stille Mutation</td> </tr> <tr> <td>◻</td> <td>*kein verwertbares Ergebnis</td> </tr> <tr> <td>▲▲</td> <td>*BRAF V600K/ andere Mutation</td> </tr> </table>	◆◆◆◆	*BRAF V600E	■	*WT	●	*Stop Codon und Stille Mutation	◻	*kein verwertbares Ergebnis	▲▲	*BRAF V600K/ andere Mutation
◆◆◆◆	*BRAF V600E														
■	*WT														
●	*Stop Codon und Stille Mutation														
◻	*kein verwertbares Ergebnis														
▲▲	*BRAF V600K/ andere Mutation														
2.Gebiet				B4 P228 PD (69, 88) V 600K/ 100%											
3.Gebiet															
4.Gebiet															
5.Gebiet		E2 P238 (99) StopCo+St.M u.													
6.Gebiet															

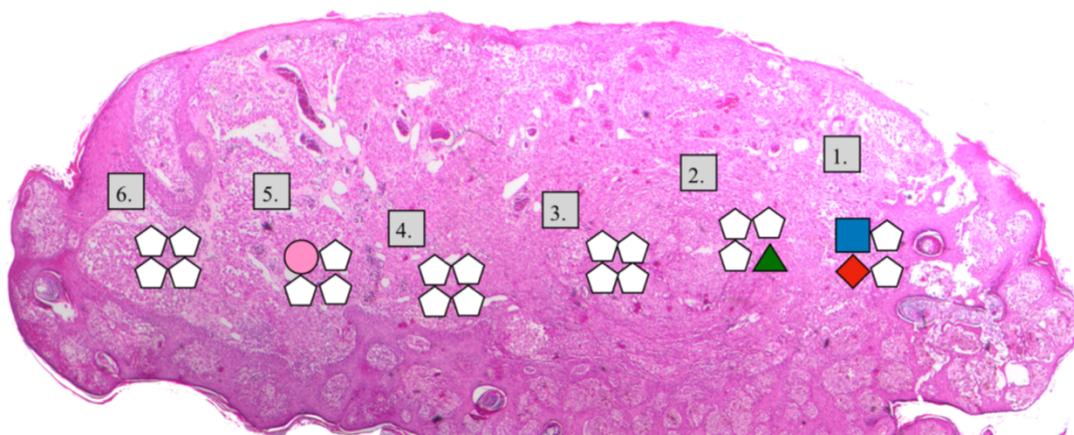


Abbildung 44 MM-XII: tabellarische Ergebnisse und Topographie im korrespondierenden histologischen Schnitt, Legende (Versuch 3.11.)

Histo	Proben	Verwertbar	PD	Wildtyp (A = 0)	BRAF- V600E	Stop Codon	Sonstige (V600K)
MM-XII	24	4	20	1	1	1	1 (1)
		4/24 = 16,7 %	20/ 24 =	1/4 =	1/4 =	1/4 =	1/4 =
		83,3 %		25 %	25 %	25 %	25 %

Tabelle 57 Ergebnisse von MM-XII (Versuch 3.11.)

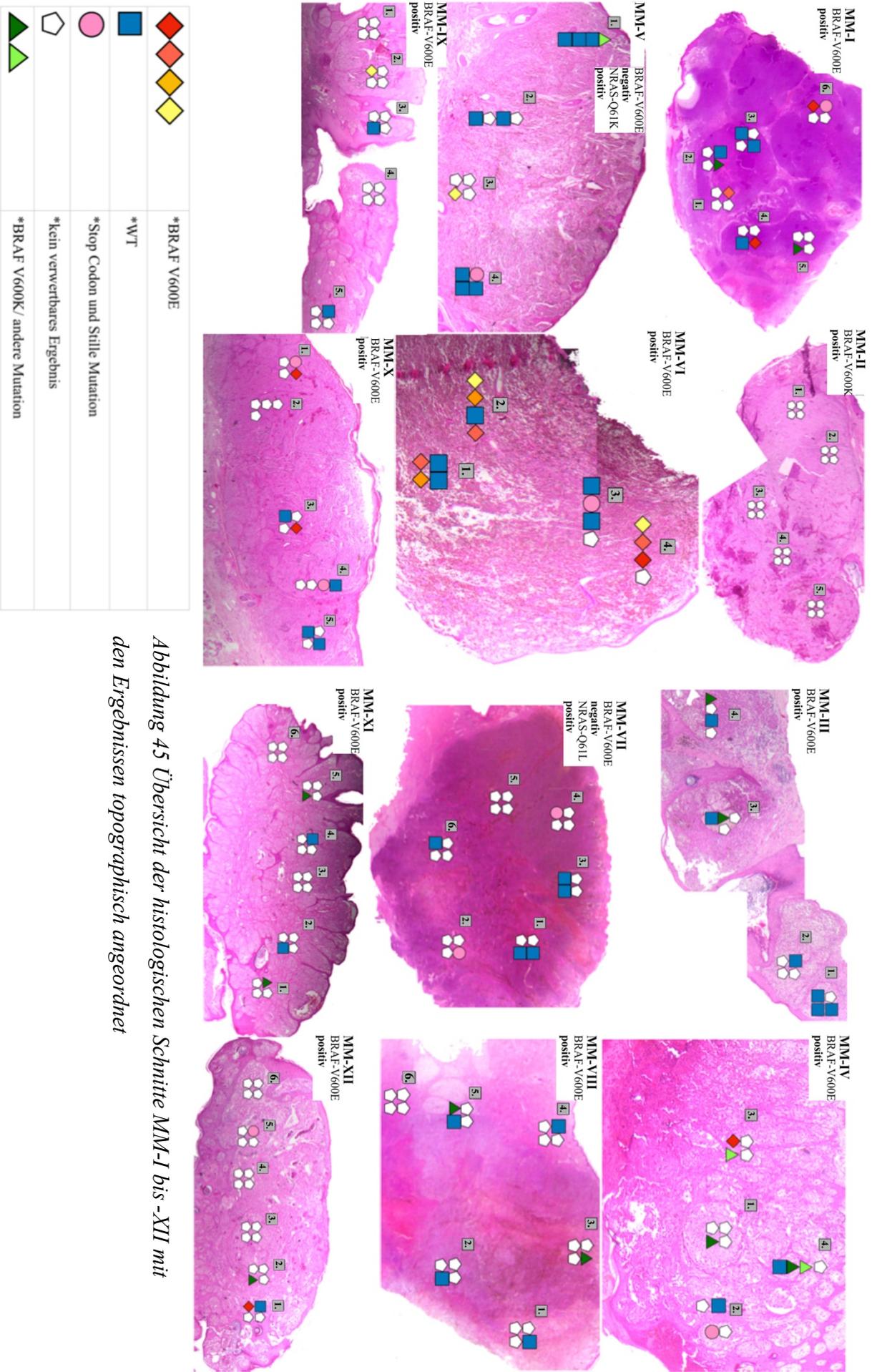


Abbildung 45 Übersicht der histologischen Schnitte MM-I bis -XII mit den Ergebnissen topographisch angeordnet

3. Ergebnisse

	Proben	Verwertbar	PD	Wildtyp (A = 0)	BRAF- V600E	Stop Codon	Sonstige (V600K)
MM-I	24	10	14	4	3	1	2 (2)
		10/24 = 41,7 %	14/24 58,3 %	4/10 = 40 %	3/ 10 = 30 %	1/ 10 = 10 %	2/ 10 = 20 %
MM-II	20	0	20	0	0	0	0
		0 %	20/20 100 %	0 %	0 %	0 %	0 %
MM-III	16	8	8	6	0	0	2 (2)
		8/16 = 50 %	8/16 = 50 %	6/ 8 = 75%	0 %	0 %	2/8 = 25 %
MM-IV	16	8	8	2	1	1	4 (2)
		8/16 = 50 %	8/16 = 50 %	2/ 8 = 25%	1/8 = 12,5 %	1/ 8 = 12,5%	4/8 = 50 %
MM-V	16	11	5	8	1	1	1 (0)
		11/ 16 = 68,75 %	5/16 = 31,25 %	8/11= 72,7 %	1/11= 9,1 %	1/11= 9,1 %	1/11= 9,1 %
MM-VI	16	14	2	5	8	1	0
		14/16 = 87,5%	2/16 = 12,5 %	5/14 =35,7 %	8/14 = 57,1 %	1/14 = 7,1 %	0 %
MM-VII	24	7	17	5	0	2	0
		7/24 = 29,2 %	17/24 = 70,8 %	5/7 = 71,4 %	0 %	2/7 = 28,6 %	0 %
MM-VIII	24	6	18	4	0	0	2 (2)
		6/24 = 25%	18/24 = 75%	4/6 = 66,7 %	0 %	0 %	2/6 = 33,3 %

3.11. Hauptversuch - Primärtumore

	Proben	Verwertbar	PD	Wildtyp (A = 0)	BRAF-V600E	Stop Codon	Sonstige (V600K)
MM-IX	20	3	17	2	1	0	0
		3/20 = 15 %	17/20 = 85 %	2/3 = 66,7 %	1/3 = 33,3 %	0 %	0 %
MM-X	20	8	12	4	2	2	0
		8/20 = 40 %	12/20 = 60 %	4/8 = 50 %	2/8 = 25 %	2/8 = 25 %	0 %
MM-XI	24	4	20	2	0	0	2 (1, 1?)
		4/24 = 16,7 %	20/24 = 83,3 %	2/4 = 50 %	0 %	0 %	2/4 = 50 %
MM-XII	24	4	20	1	1	1	1 (1)
		4/24 = 16,7 %	20/24 = 83,3 %	1/4 = 25 %	1/4 = 25 %	1/4 = 25 %	1/4 = 25 %
Zusammenfassung	244	83	161	43	17	9	14
	Ø20,3 / MM	Ø6,9	Ø13,4	Ø3,6	Ø1,4	Ø0,75	Ø1,2
		83/244 = 34 %	161/244 = 66 %	43/83 = 51,8 %	17/83 = 20,5 %	9/83 = 10,8 %	14/83 = 16,9 %

Tabelle 58 Übersicht der Ergebnisse (Versuch 3.11.)

Primär- tumor	vorbekannter Mutationsstatus (manuelle Mikrodissektion)	Ergebnisse der Mutationsanalyse (Lasermikrodissektion)		
		Wildtyp	BRAF-V600E	Sonstige
MM-I	BRAF-V600E positiv	40 %	30 %	20 % BRAF-V600K
MM-II	BRAF-V600K positiv	0 %	0 %	0 %
MM-III	BRAF-V600E positiv	75 %	0 %	25 % BRAF-V600K
MM-IV	BRAF-V600E positiv	25 %	12,5 %	50 % (25% BRAF-V600K)
MM-V	BRAF-V600E negativ NRAS-Q61K positiv	73 %	9 %	9 %
MM-VI	BRAF-V600E positiv	36 %	57 %	0 %
MM-VII	BRAF-V600E negativ NRAS-Q61L positiv	71 %	0 %	0 %
MM-VIII	BRAF-V600E positiv	67 %	0 %	33 % BRAF-V600K
MM-IX	BRAF-V600E positiv	67 %	33 %	0 %
MM-X	BRAF-V600E positiv	50 %	25 %	0 %
MM-XI	BRAF-V600E positiv	50 %	0 %	50 % (25% BRAF-V600K)
MM-XII	BRAF-V600E positiv	25 %	25 %	25% BRAF-V600K

Tabelle 59 Vergleich der Mutationsanalysen der Primärtumore zwischen vorbekanntem Mutationsstatus und den Ergebnissen der Pyrosequenzierung der Hauptveruche (Probengewinnung durch Lasermikrodissektion), eingeteilt in Wildtyp, BRAF-V600E-Mutation und sonstige Mutationen (insbesondere BRAF-V600K-Mutation)

MM-	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII		x/12
Wild- typ	4	-	6	2	8	5	5	4	2	4	2	1		11/ 11
BRAF- V600E -M	3	-	-	1	1	8	-	-	1	2	-	1	17	7/11
SC	1	-	-	1	1	1	2	-	-	2	-	1	9	7/11
BRAF- V600K -M	2	-	2	2	-	-	-	2	-	-	1 1?	1	10+ (?)	6/11
uM	-	-	-	2	1	-	-	-	-	-	-	-	3	2/11
	4/5	0/5	2/5	5/5	4/5	3/5	2/5	2/5	2/5	3/5	2/5	4/5		

Tabelle 60 Zusammenfassung der Mutationsanalysen (M= Mutation, SC = Stop Codon, uM = ungewöhnliche Mutation) (Versuch 3.11.)

	Vorbekannter Mutations- status	Wildtyp	∅ mutierte Allele in %	Mutationen insgesamt (ohne SC)	BRAF- Mutation
MM-I	BRAF-V600E	3	93,3 %	5	3x V600E, 2x V600K
MM-II	BRAF-V600K	0	0	0	/
MM-III	BRAF-V600E	0	0	2	2x V600K
MM-IV	BRAF-V600E	1	100 %	5	1x V600E, 2x V600K, 2x uM.
MM-V	NRAS-Q61K	1	20 %	2	1x V600E, 1x uM.
MM-VI	BRAF-V600E	8	58,75 %	8	8x V600E
MM-VII	NRAS-Q61L	0	0	0	/
MM-VIII	BRAF-V600E	0	0	2	2xV600K
MM-IX	BRAF-V600E	1	5 %	1	1x V600E
MM-X	BRAF-V600E	2	100 %	2	2x V600E
MM-XI	BRAF-V600E	0	0	2	1x V600K, fragliche V600K
MM-XII	BRAF-V600E	1	100 %	2	1x V600E, 1x V600K

Tabelle 61 Mutationen mit entsprechender Häufigkeit (Versuch 3.11.)

MM-I	2x V600K	
MM-II		
MM-III	2x V600K	
MM-IV	2x V600K	P71: Mutation A598T, A598A, R603* P74: p.S602S, c.1806T>C (Peak 68 bp u. 100 bp), stille Mutation, S602S
MM-V		P77: fragliche V600L + K601N
MM-VI		
MM-VII		
MM-VIII	P142: V600K/ 25% P152: V600K/ 90%	
MM-IX		
MM-X		
MM-XI	1x V600K	fragliche V600K
MM-XII	1x V600K	

Tabelle 62 seltene Mutationen (Versuch 3.11.)

3.12. Molekularbiologischer Mutationsstatus in Relation zur HMB-45 Expression

Ablauf:

Der folgende Versuch wurde durchgeführt, um den Zusammenhang zwischen molekularbiologischem Mutationsstatus und HMB45-Expression zu erfassen. Da der HMB45-Antikörper unter anderem maligne Melanozyten färben kann [43], in gutartigen nävöiden Melanozyten häufig aber negativ bleibt, sind Melanome und deren Metastasen durch ihn leichter zu identifizieren. Außerdem erhöht er die Detektionsrate von Mikrometastasen [44]. Daher hat dieser immunhistochemische Marker beziehungsweise monoklonale Antikörper Relevanz in der Routinediagnostik für Melanome, deren histologische Diagnose zytomorphologisch gelegentlich schwierig sein kann [42, 43].

3.12. Molekularbiologischer Mutationsstatus in Relation zur HMB-45 Expression

Das Diffizile ist, dass sie anderen Tumoren, wie beispielsweise Sarkomen, schlecht differenzierten Karzinomen, großzelligen Lymphomen, neuroendokrinen Tumoren, Spindelzell-Karzinomen und weiteren ähneln können [42, 43] und mitunter schwer von diesen zu unterscheiden sind [43].

Bei diesem Versuch wird für jeden der 12 Primärtumore ein histologischer Schnitt immunhistochemisch mit HMB-45 gefärbt und diejenigen mit einer heterogenen Färbung im eindeutig malignen Tumoranteil (MM-I, MM-XI und MM-XII) ausgewählt. Für diese Tumore wird ein Zusammenhang zwischen der Stärke der Färbung, eingeteilt in „stark positiv“, „schwach positiv“ und „negativ“, und dem molekularbiologischen Mutationsstatus untersucht.

Hierfür wird unter mikroskopischer Sicht in den ausgewählten Arealen durch manuelle Mikrodissektion Material gewonnen und für jedes Areal separat wie in 2.8. beschrieben verarbeitet. Im Anschluss werden eine PCR, eine Re-PCR, eine Analyse mit dem Bioanalyzer und eine Pyrosequenzierung erstellt. Bei allen Proben ist nach der Re-PCR ein verwertbares Amplifikat vorhanden und der nachfolgende Mutationsnachweis erfolgreich.

	HMB45-stark Positiv	HMB45-schwach Positiv	HMB45- Negativ
MM-I	1.Region + A = 150 60 %		2.Region + A = 110 65 %
	4.Region + A = 120 70 %		3.Region + A = 180 85 %
MM-XI	5.Region + A = 100 65 %	6.Region + A = 80 40 %	
		1.Region + A = 90 50 %	2.Region + A = 110 60 %
MM-XII	1.Region + A = 100 60 %		2.Region + A = 100 55%

Tabelle 63 Ergebnisse unter Einbeziehung der Färbungsintensität der HMB45-Färbung (Versuch 3.12.)

3. Ergebnisse

Ergebnis:

Die Ergebnisse, dargestellt in Tabelle 63, zeigen keine Relation zwischen dem BRAF-V600E-Mutationsnachweis und der HMB-45 Expression. Nach der vorliegenden Untersuchung besteht also kein Zusammenhang.

4. Diskussion

4.1. Zusammenfassung der Ergebnisse

Bei der für die Untersuchung ausgewählten Melanome (Primärtumore MM-I bis -XII) war der Mutationsstatus vorbekannt: 9/12 mit BRAF-V600E-, 1/12 mit BRAF-V600K-Mutation und 2/12 mit negativem BRAF-V600-Mutationsstatus, aber dem Nachweis einer NRAS-Mutation (Q61K beziehungsweise Q61L im Exon 3). Bei der Auswertung zeigten sich in den Tumoren unterschiedliche Ergebnisse in der Anzahl der Proben, in denen ausreichend PCR-Amplifikat gewonnen und die DNA analysiert, beziehungsweise auf die BRAF-V600E-Mutation untersucht werden konnte, und in Bezug auf die Häufigkeit des Mutationsnachweises. Insgesamt konnte bei 11 von 12 Tumoren in 83 von 244 Proben genügend PCR-Amplifikat für eine DNA-Analyse generiert werden, dies entspricht 34 %. Bei einem Tumor (MM-II) befand sich in keiner der 20 untersuchten Proben ausreichend amplifizierte DNA für eine Mutationsanalyse, bei den anderen, bei denen je 16, 20 oder 24 Proben gewonnen wurden, lag die Anzahl der verwertbaren Proben zwischen 3 und 14.

Der Wildtyp wurde bei 51,8 % der verwertbaren Proben und in 11 von 12 Tumoren nachgewiesen, bei 20,5 % der verwertbaren Proben und in 7 von 12 Tumoren die BRAF-V600E-Mutation, bei 10,8 % der verwertbaren Proben und in 7 von 12 Tumoren das Stop Codon und eine Stille Mutation. Bei 16,9 % der verwertbaren Proben in 7 von 12 der Tumore gelang ein BRAF-Mutationsnachweis, bei dem es sich aber nicht um die BRAF-V600E-Mutation handelte. Den größten Teil dieser Mutationen machte die BRAF-V600K-Mutation aus, die in den besagten Tumoren je in einem oder zwei Gebieten nachgewiesen wurde (in vier Tumoren konnte sie zweimal nachgewiesen werden, in zwei einmal). In vier Fällen traten die BRAF-V600E-Mutation und mindestens eine weitere seltene simultan auf (MM-I, -IV, -V, -XII) und zwar zweimal mit der BRAF-V600K-Mutation (MM-I, -XII), einmal mit der BRAF-V600K-Mutation und einer weiteren seltenen Mutation (MM-IV, siehe Tabelle 64) und einmal nur mit einer weiteren seltenen Mutation (MM-V, siehe Tabelle 64).

Bei 7 der 12 Tumore mit seltener BRAF-Mutation (siehe Tabelle 62) findet man bei 4 von 7 ausschließlich die BRAF-V600K-Mutation (MM-I, -III, -VIII, -XII), bei einem eine BRAF-V600K- und eine fragliche BRAF-V600K-Mutation (MM-XI, P200), bei einem sowohl die BRAF-V600K als auch zwei weitere seltene ungewöhnliche Mutationen (MM-IV, P71 und P74, siehe Tabelle 64) und bei einem nur eine andere seltene

4. Diskussion

ungewöhnliche Mutation (MM-V, P77, siehe Tabelle 64). In einem Tumor ist die BRAF-V600K-Mutation einmal mit 25% und einmal mit 90% mutierter Allele vorhanden (MM-VIII). Insgesamt wurden also zusätzlich eine fragliche BRAF-V600K-Mutation (MM-XI) und drei seltene ungewöhnliche, schwer interpretierbare und somit auch nicht sicher einzuordnende Mutationen detektiert. Eine Übersicht dieser ungewöhnlichen Mutationen ist in Tabelle 64 dargestellt. Die fragliche BRAF-V600K-Mutation ähnelt dem Pyrogramm einer BRAF-V600K-Mutation, ist jedoch nicht komplett deckungsgleich. Es könnte auch sein, dass bei diesen vier DNA-Analysen verschiedene Mutationen aufeinandertreffen.

Primär-tumor	Proben-nummer	Mutation
MM-IV	P71	Mutation A598T und gleichzeitig A598A und gleichzeitig R603*
MM-IV	P74	p.S602S, c.1806T>C (Peak 68 bp u. 100 bp), Stille Mutation, S602S
MM-V	P77	fragliche V600L + K601N

Tabelle 64 seltene Mutationen

Betrachtet man die Ergebnisse der Mutationsanalysen in BRAF-V600E-, -V600K-, andere BRAF-Mutation, Wildtyp und Stop Codon und Stille Mutation im Überblick, erkennt man, wie viele und welche parallel in einem Tumor zu finden sind und welche Kombinationen am häufigsten auftreten. Dabei fallen große Variationen auf, siehe Tabelle 60. In 7 der 12 Tumore werden zwei oder mehr Mutationen detektiert.

Bei einem Tumor (MM-VI) konnte in 8 Regionen eine BRAF-V600E-Mutation nachgewiesen werden, bei den anderen 6 von 11 in 1, 2 und 3 Regionen.

In Tumor MM-VI wurde die BRAF-V600E-Mutation häufiger nachgewiesen als der Wildtyp (8:5), in den anderen Tumoren, in denen eine Mutation nachgewiesen werden konnte, dominierte der Wildtyp (MM-I: 4:3, MM-III: 6:0, MM-IV: 2:1, MM-V: 8:1, MM-VII: 5:0, MM-VIII: 4:0, MM-IX: 2:1, MM-X: 4:2, MM-XI: 2:0) beziehungsweise kam gleich häufig vor (MM-XII: 1:1).

Betrachtet man die BRAF-V600E mutierten Regionen genauer und berechnet für die jeweiligen Tumore den Durchschnitt der mutierten Allele, die anhand der Peakhöhe definiert wurden, um die Ausprägung der Mutation darzustellen, so fällt auf, dass sich dieser bei zwei Tumoren in einem niedrigen (MM-IX: nur 5%, MM-V: 20%), bei einem im mittleren (MM-VI: 58,75%) und bei den anderen vier in einem hohen Bereich (MM-I: 93,3%, MM-IV, X, XII: je 100%) zeigt.

Wenn die BRAF-V600K-Mutation und das Stop Codon simultan in einem Tumor nachgewiesen wurden, so wurde stets auch eine BRAF-V600E-Mutation gefunden. Das Stop Codon wurde in 7 von 12 Tumoren jeweils in 1 oder 2 Regionen detektiert (MM-I, -IV, -V, -VI, -VII, -X, -XII).

In Bezug auf den vorbekannten Mutationsstatus gelang der Nachweis dieses bei 8/11 Tumoren (sechsmal BRAF-V600E-Mutation, zweimal Wildtyp). Bei 3 Tumoren, die primär als BRAF-V600E mutiert bekannt waren, konnte die Mutation nicht nachgewiesen werden, dafür aber die BRAF-V600K- (MM-III: 2 von 8, MM-VIII: 2 von 6) beziehungsweise in einem Tumor die BRAF-V600K- simultan mit einer möglichen weiteren BRAF-V600K-Mutation (MM-XI: 2 von 4). In den Vorversuchen gelang bei MM-VIII (als „mmI“ analysiert) der Nachweis der BRAF-V600E-Mutation.

Bei den neun Tumoren mit vorbekanntem BRAF-V600E-Mutationsstatus fand sich die BRAF-V600K-Mutation in 6/9 und der Wildtyp in 9/9 Tumoren.

Bei dem Tumor, in dem keine der 20 untersuchten Proben analysiert werden konnte, handelte es sich um den mit vorbekanntem BRAF-V600K-Mutationsstatus.

Bei der Auswertung der zwei ursprünglich als BRAF-V600E-Mutation negativ deklarierten Tumore wurde bei beiden das Stop Codon und der Wildtyp detektiert (MM-V, -VII). Bei MM-VII, handelt es sich um den einzigen, bei dem keine andere Mutation nachgewiesen wurde, wohingegen bei MM-V zusätzlich der Nachweis einer BRAF-V600E-Mutation sowie einer weiteren schwer zu interpretierbaren und nicht bekannten Mutation gelang.

4.2. Diskussion der Methodik

4.2.1. Anzahl der untersuchten Präparate

In der vorliegenden Arbeit liegt die Anzahl der untersuchten Präparate für den Hauptversuch bei 12 Primärtumoren. Im Vergleich zu anderen Publikationen, die sich

4. Diskussion

ebenfalls mit intratumoraler Homogenität und Heterogenität beschäftigen, ist die Anzahl vergleichbar: Chiappetta et al. [28]: 15 Noduläre Primärtumore und 6 Lymphknotenmetastasen; Lin et al. [38], drei Versuche mit je einem anderen Versuchsaufbau: 5 Primärtumore, 10 Primärtumore und 3 Primärtumore mit insgesamt 11 Rezidiven und Metastasen. In den meisten der in dieser Arbeit zitierten Publikationen werden zwar deutlich mehr Präparate untersucht, dafür wird aber die weniger aufwendige Immunhistochemie verwendet.

4.2.2. PCR und Pyrosequenzierung

Wie in 1.2. beschrieben existieren verschiedene Methoden zum Nachweis der BRAF-Mutationen: „High-Resolution-Melting-analysis“, „Pyrosequenzierung“, „Allel spezifische PCR“, „Next-Generation-Sequenzierung“, „Sanger-Sequenzierung“ und die „Immunhistochemie“ (hier dienen Antikörper zur Erkennung des mutierten BRAF-Proteins) [29]. Jede Methode hat ihre eigenen Stärken, Schwächen und Herausforderungen, die bei der Testung von Tumoren berücksichtigt werden sollten [27]. Bei der hier vorliegenden Untersuchung wurden die DNA-Analysen mittels Pyrosequenzierung durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine „Echt-Zeit-Sequenzierung“ [29], bei der das Ergebnis ein Pyrogramm, das die Sequenzabfolge der DNA reflektiert [33], darstellt. Das Pyrogramm besteht aus mehreren Peaks, die sich in ihrer Höhe unterscheiden und die vorhandene Menge der einzelnen Nukleotide semiquantitativ widerspiegeln. So erlaubt diese Methode ebenfalls eine semiquantitative Aussage über die mutierten Allele [29]. Bereits ab 5% mutierter Allele ist mit der Pyrosequenzierung ein Mutationsnachweis möglich [25, 29, 33]. Dies entspricht einer sehr hohen Sensitivität (höher als bei der Sanger-Sequenzierung), wie auch die Arbeit von Ihle et al. [29], die mehrere Methoden miteinander vergleicht, belegt. Die Spezifität liegt bei 90-100 % [27].

Weitere Vorteile der Pyrosequenzierung liegen im Nachweis seltener Mutationen [29] und der Option für den Untersucher, den Teil des zu analysierenden Genoms selbst auszuwählen. Die Detektion seltener Mutationen ist nicht bei jeder Methode gegeben, so stößt hier beispielsweise die Immunhistochemie an ihre Grenzen.

Ein weiterer Vorteil ist, dass die Pyrosequenzierung als alleinige Methode wie auch die Sanger-Sequenzierung und das „Next Generation Sequenzierung“ zur vollständigen Mutationsanalyse aussagekräftig und zuverlässig genug ist. Im Gegensatz dazu ist bei der Immunhistochemie zusätzlich eine DNA-basierte Methode zur genaueren Analyse

notwendig [27], denn außer der BRAF-V600E-Mutation werden keine (BRAF-)Mutationen detektiert. Es ist jedoch wichtig, bereits mit der Diagnosestellung Mutationen aufzudecken, da diese einen entscheidenden Einfluss auf die Behandlung haben [27]. So hat sich die Pyrosequenzierung als sinnvolle und verlässliche Nachweismethode im klinischen Alltag etabliert [45]. Mit ihr können nur kleine Sequenzen des Genoms analysiert werden. Dies ist von Vorteil, denn bei einer bestimmten Fragestellung, wie nach dem BRAF-Mutationsstatus, ist eine Analyse des gesamten Genoms nicht notwendig, sondern eher unnötig [27].

4.3. Diskussion der Ergebnisse

4.3.1. Anzahl der verwertbaren Amplifikate

Die Ergebnisse zeigen sowohl in Bezug auf die Mutationsanalysen als auch auf die Anzahl der verwertbaren Resultate Differenzen. Insgesamt lieferten 34% (83/244) der Proben, die alle unter identischen Bedingungen untersucht wurden, ein verwertbares Amplifikat. Bei 11 der 12 Primärtumore, bei denen je 16, 20 oder 24 Proben erstellt wurden, konnten zwischen 3 bis 14 Proben ausgewertet werden. Nur bei einem Tumor (MM-II) befand sich in keiner der 20 untersuchten Proben ausreichend amplifizierte DNA für eine Mutationsanalyse.

In Abbildung 46 sind alle Primärtumore mit den untersuchten Regionen verbildlicht. In jedem Tumor wird aufgezeigt, in welcher Region eine Mutationsanalyse mit entsprechendem Ergebnis vorgenommen wurde.

Die oben genannte unterschiedliche Anzahl an verwertbaren Amplifikaten ist auf mehrere Ursachen zurückzuführen, die von Präparat zu Präparat variieren. Erwähnenswert sind insbesondere die Einflussfaktoren in Bezug auf die DNA-Qualität, die zur Degradierung der DNA führen. Hierzu zählt die Behandlung mit Formalin [46], eingeteilt von Gilbert et al. [47] in Pre-Fixierungs- (Art und Menge des Gewebes, sowie der Grad der Autolyse), fixierungsabhängige (pH, Temperatur, Dauer der Fixierung, die Fixierungsmethode) und Post-Fixierungs- (Temperatur und Lagerdauer) Faktoren. Ergänzend sind die Einflüsse zu nennen, die von Wong et al. [48] in einer der größten Studien, die sich mit dem Einfluss von FFPE auf die DNA beschäftigt hat, zusammengefasst wurden. Hierzu zählen die Abhängigkeit von umgebungsbedingten Faktoren wie die Exposition von Hitze, Licht,

4. Diskussion

Alter und Konzentration des für die Fixierung genutzten Formalins sowie die Lagerung der FFPE. Da die Präparate der vorliegenden Arbeit aus den Jahren 2009-2016 stammen, lässt sich naturgemäß nicht klären, ob stets eine optimale Bedingung für die Lagerung der Präparate gegeben war und inwieweit diese Einfluss auf die Ergebnisse der DNA-Analysen genommen haben. Die Auswertungen von Wong et al. [48] deuten auf eine Schädigung der DNA, die sich in Fragmentations- und Sequenzartefakten, die eventuell nicht reproduzierbar sind, äußern, und bereits in frischen Präparaten vorkommen können, hin. Diese haben Einfluss auf molekulare Testverfahren und Konsequenzen auf die Interpretation der Ergebnisse. Interessanterweise variiert der Grad der DNA-Schädigung zwischen Laboren [48]. Daraus lässt sich schließen, dass die Qualität der verwendeten Materialien nicht identisch ist.

Auch das Entparaffinieren, von dem Gilbert et al. [47] abraten, sollte berücksichtigt werden. In der vorliegenden Arbeit ist es für ein sorgfältiges Arbeiten des Lasermikrodissektionsgerätes jedoch essentiell. Für die dokumentierte Hemmung der PCR in nicht entparaffinierten Proben machen P. Gilbert et al. [47] den damaligen mangelnden Stand der Entwicklung verantwortlich.

Durch den Verzicht auf eine Färbung bei den zu untersuchenden histologischen Schnitten wird eine mögliche weitere Degradierung der DNA oder Einfluss auf deren Qualität oder die Arbeit des Lasermikrodissektionerätes im Gegensatz zu den Arbeiten von Chiappetta et al. [28] und Yancovitz et al. [36], die die zu untersuchenden histologischen Schnitte färbten, minimiert.

Auch die Effizienz des Lasermikrodissektionsgerätes, die genutzte UV-Energie (diese wird zum Katapultieren der Zellen aus dem Präparat genutzt und könnte die zu untersuchende DNA schädigen, wobei das genaue Ausmaß der Schädigung jedoch nicht erfasst werden kann), die Dicke der histologischen Schnitte sowie die Individualität eines jeden Tumors, die bereits beim Mikroskopieren auffällt (siehe 4.4.3.3.) und seine DNA-Qualität sind ausschlaggebend für die Ergebnisse und spielen eine entscheidende Rolle bei Proben, für die zu wenig amplifizierte DNA für eine Mutationsanalyse zur Verfügung steht.

Für einen kausalen Zusammenhang zwischen der Beschaffenheit des Tumors und der Anzahl der verwertbaren Sequenzanalysen spricht, dass in der vorliegenden Arbeit die Methoden, die Materialien und der Ablauf der Versuche immer identisch, protokollkonform und ausschließlich von einer Person durchgeführt wurden. Wären technische Artefakte ursächlich, müssten die Ergebnisse der zwei Tumoren, die parallel untersucht und analysiert wurden, sich ähneln. Dies trifft jedoch nicht zu (MM-I: in 10

von 24 Proben und MM-II in keiner Probe ausreichend Amplifikat).

Als weitere nennenswerte Einflussgröße auf die Anzahl der verwertbaren Amplifikate könnte die Proteinase K-Behandlung (ein spezielles Enzym, das zur Proteolyse, und somit zum Freilegen der DNA zum Einsatz kommt) identifiziert werden. Es wurden Versuche mit einer absteigenden Menge an Proteinase K durchgeführt (3.8., 3.9. und 3.10.). Da die tatsächliche Effizienz des Enzyms nicht kontrollierbar ist, könnte es sein, dass zu wenig DNA freigelegt wird und eine DNA-Analyse und ein Mutationsnachweis somit unmöglich wären.

Der wohl relevanteste Einflussfaktor auf die Anzahl der verwertbaren Proben (34%) ist die absolute Menge an amplifizierbarer zellulärer DNA, die aus 20 lasermikrodissezierten Zellen gewonnen wird und in jeder Probe untersucht wurde. Dass diese einen ausschlaggebenden Einfluss hat, zeigen die Vorversuche, bei denen höhere Zellzahlen lasermikrodisseziert und damit häufiger verwertbare Ergebnisse verzeichnet wurden. Für den Hauptversuch wurde die Zellzahl bewusst niedrig gewählt, um der unteren Detektionsgrenze und dem Grenzbereich der PCR-Möglichkeiten möglichst nahe zu kommen. Das Ergebnis drückt die Annäherung an diese aus und somit wurde das Ziel der Arbeit mit einem zufriedenstellenden Ergebnis erreicht.

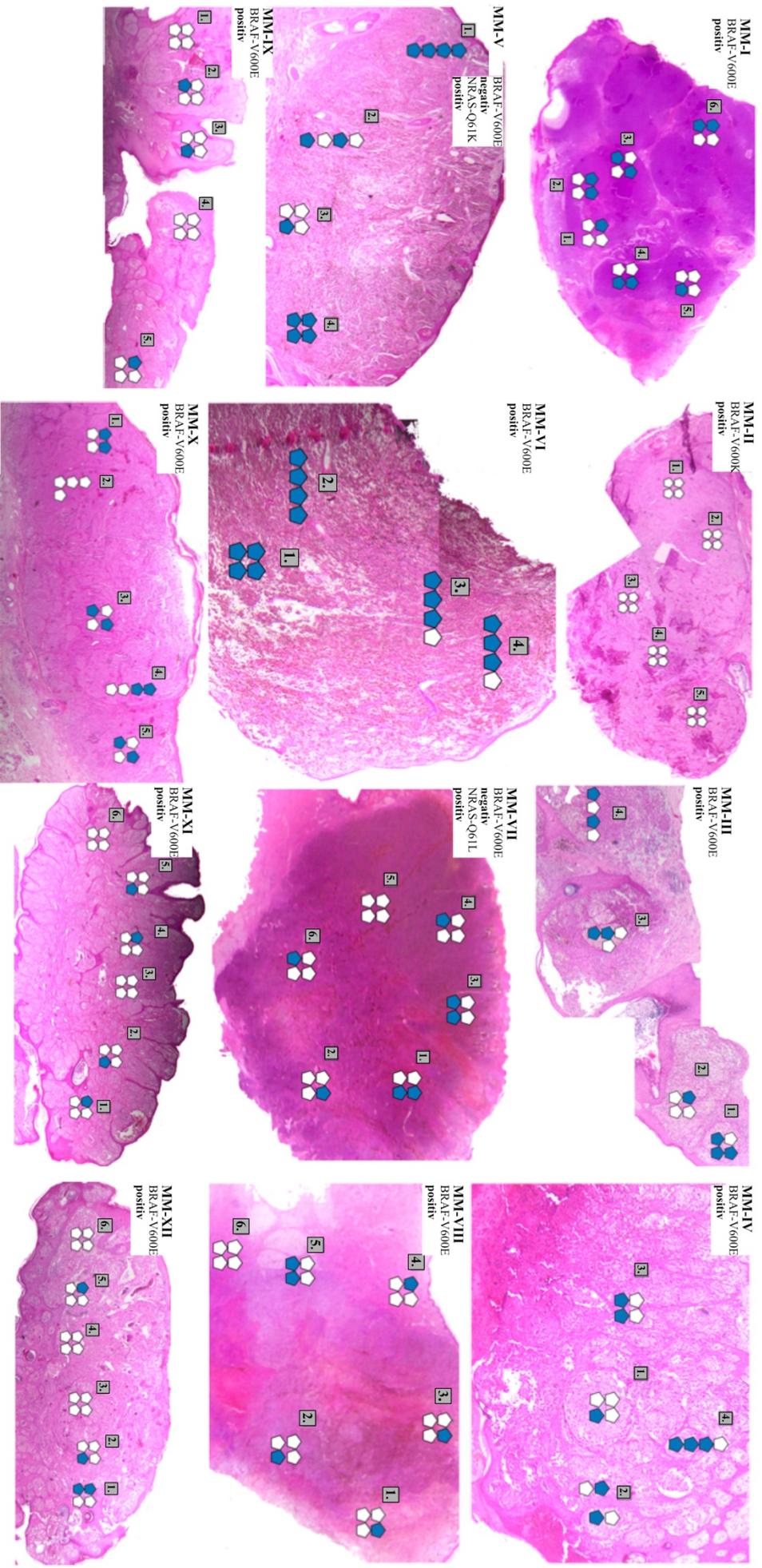


Abbildung 46 Übersicht der histologischen Schnitte MM-I bis MM-XII mit den Ergebnissen, eingeteilt in „verwertbar“ (ausreichend Amplifikat für eine DNA-Analyse vorhanden) und „nicht verwertbar“ (nicht ausreichend Amplifikat für eine DNA-Analyse vorhanden), topographisch angeordnet

4.3.2. Auswertung der Mutationsanalysen

Die Ergebnisse der Mutationsanalysen wurden bereits für jeden Tumor einzeln in Abbildung 33 bis Abbildung 44 und in Abbildung 45 zusammengefasst dargestellt. Identisch sind sie in Abbildung 47, hier jedoch ohne die nicht verwertbaren Regionen übernommen.

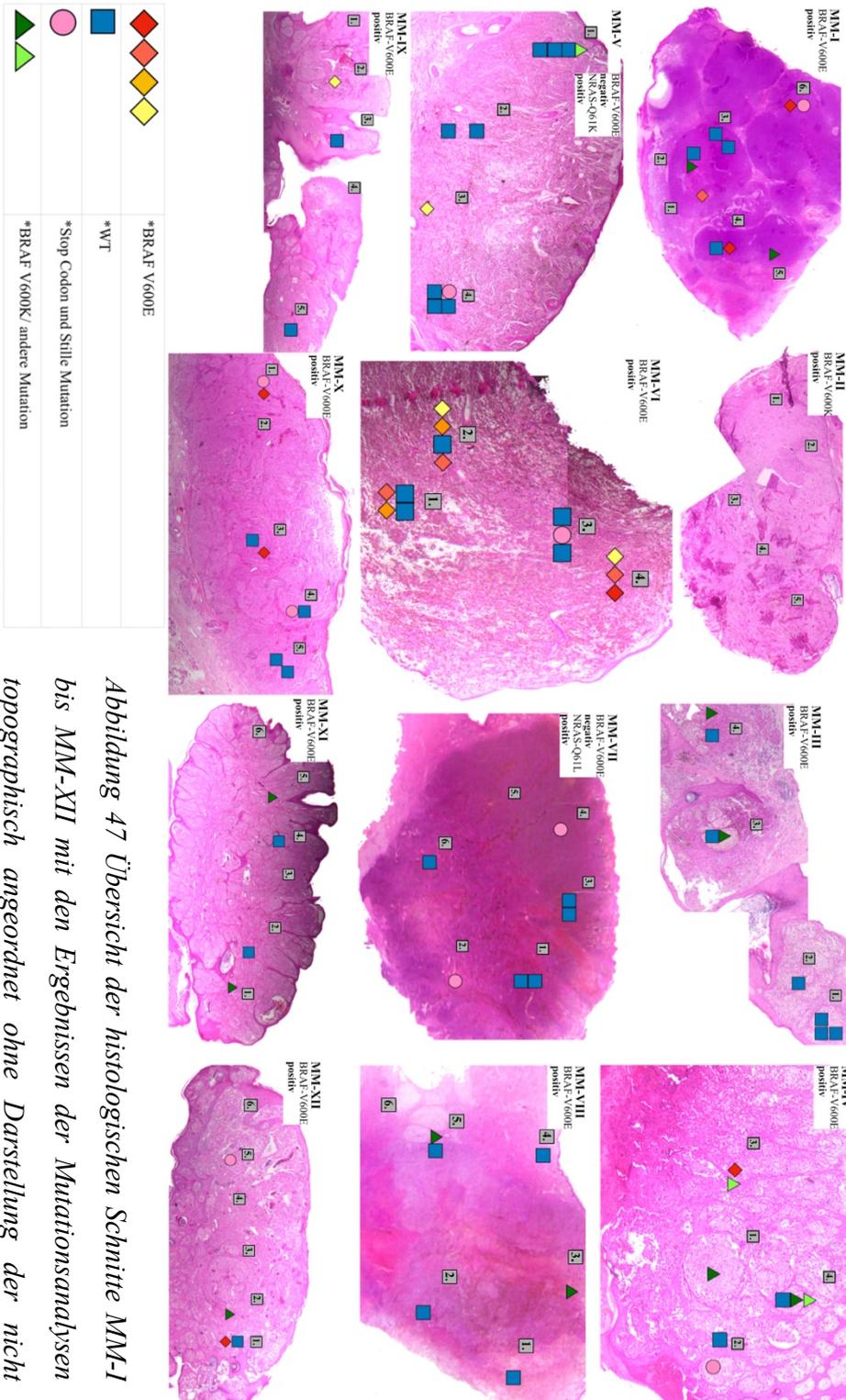


Abbildung 47 Übersicht der histologischen Schnitte MM-I bis MM-XII mit den Ergebnissen der Mutationsanalysen topographisch angeordnet ohne Darstellung der nicht verwertbaren Ergebnisse

4. Diskussion

Die Ergebnisse der Mutationsanalysen können räumlich aufgrund der Dokumentation während der Lasermikrodissektion zugeordnet werden. Zur Veranschaulichung sind die histologischen Präparate von drei Primärtumoren fotodokumentarisch in Abbildung 48 (MM-I), Abbildung 49 (MM-III) und Abbildung 50 (MM-IV) dargestellt. Sie zeigen zur Übersicht eine Großaufnahme des gesamten Schnittes des Primärtumors, mit Pfeilen wird entsprechend der Lokalisation auf die jeweiligen untersuchten Gebiete hingewiesen. In einem mikroskopisch vergrößerten Bild sind diese Gebiete eingeteilt in die vier Regionen (durchnummeriert und jeweils schwarz umrandet) mit den dazugehörigen Ergebnissen der Mutationsanalysen aufgeführt. In den Regionen, in denen keine Mutationsanalyse möglich war, ist lediglich die Nummer der Region eingefügt. Die Ergebnisse bieten jedoch kein fassbares morphologisches Korrelat, weder in Bezug auf die Tumorzellmorphologie, Architektur, noch auf die HMB-45 Anfärbbarkeit (siehe 3.12.).

Bei 7 von 12 Tumoren finden sich im Sinne intratumoraler Heterogenität zwei bis mehrere Mutationen nebeneinander. Auffällig sind die ursprünglich als BRAF-V600E positiv getesteten Melanomen, in denen BRAF-Wildtyp Zellen und andere seltene BRAF-Mutationen, zum Teil sogar ohne eine erneute Detektion der BRAF-V600E-Mutation, nachgewiesen wurden. Auch der Nachweis einer BRAF-V600E- und einer weiteren sehr ungewöhnlichen Mutation in einem NRAS positiven Melanom (MM-V) sind auffällig.

Bereits in Vorversuchen (3.7.) konnte eine BRAF-V600K-Mutation in einem BRAF-V600E mutierten (mmI = MM-VIII) und eine BRAF-V600E-Mutation in einem NRAS mutierten (mmN, Versuch 3.8.) Melanom detektiert werden. Außerdem wurden weitere seltene ungewöhnliche Mutationen nachgewiesen, die zum Teil aufgrund ihres komplexen und ungewöhnlichen Pyrogramms sehr schwer zu interpretieren sind.

Bei der ersten Mutationsanalyse, die nicht der erwarteten (Wildtyp oder der BRAF-V600E-) Mutation entsprach und in den Vor- (3.7. in mmI = MM-VIII) und Hauptversuchen in BRAF-V600E mutierten Tumoren detektiert wurde, handelt es sich um die BRAF-V600K-Mutation. Sie kann aufgrund ihrer Bekanntheit und ihres häufigen Vorkommens leicht als solche identifiziert werden. Außerdem wird sie in der vorliegenden Arbeit deckungsgleich mit den Ergebnissen zahlreicher anderer Autoren [27, 37, 49] als zweithäufigste Mutation und als häufigste der seltenen Mutationen nachgewiesen.

Für den Ausschluss von Artefakten spricht, dass Mutationen eher übersehen (wie beispielsweise bei Shen and Qin [33] eine BRAF-V600K-Mutation) als falsch positiv für

eine seltene Mutation diagnostiziert werden. Zur Veranschaulichung finden sich Pyrogramme in Abbildung 17 bis Abbildung 23.

Eine Verunreinigung der Proben wurde durch das zusätzliche obligate Mitführen einer Positiv- und Negativkontrolle ausgeschlossen.

Einen weiteren Hinweis auf intratumorale Heterogenität und Ausschluss von Artefakten oder Fehlinterpretationen bietet der Nachweis weiterer seltener Mutationen in den Vorversuchen (3.7.) und anderen Publikationen. Hierzu zählen eine BRAF-V600M- (3.9, mmII = MM-VI, P14) und eine V600E2-Mutation (3.10., mmII = MM-VI, P7) sowie weitere, die aufgrund ihres komplexen und ungewöhnlichen Pyrogramms sehr schwer zu interpretieren sind, siehe Tabelle 65. Analog zu unseren Ergebnissen zeigten Chiappetta et al. [28] das Vorkommen einer zweiten Mutation in einem Tumor und intratumorale Variationen. Genauso gelang Lin et al. [38] der Nachweis mehrerer Mutationen in einem Tumor sowie der seltener Mutationen anhand zwei verschiedener Versuche. In 4 Primärtumoren, in denen primär größtenteils der Wildtyp nachgewiesen wurde, konnte mittels „Single Cell PCR and Sequenzing“ ein wesentlicher Anteil an BRAF-V600E-Mutation positiven Zellen und in zwei Melanomen zusätzlich andere seltenere BRAF-Mutationen (K601R, V600M, V600-K601E) nachgewiesen werden. Außerdem zeigten die Analysen von 10 Primärtumoren, die zunächst mittels konventionellem „Direct sequencing“, anschließend mit „Mutector Assay“ und Bakterien-Subklonen auf BRAF-Mutationen untersucht wurden, dass auch in als BRAF-Wildtyp deklarierten Primärmelanomen eine geringe Anzahl an BRAF mutierten Melanomzellen vorhanden sein kann (nicht nur BRAF-V600E, sondern auch seltenere). Ebenfalls gelang ihnen der Nachweis einer BRAF-V600E-Mutation in einem Tumor mit vorherrschender BRAF-V600K-Mutation.

Sie erklären den zusätzlichen Nachweis der Mutationen durch die geringere Sensitivität bei konventionellem „Direct sequencing“ [38] für heterogene Mutationen, die erst ab >20% mutierten Zellen verlässlich erkennbar [38, 50] seien. Die andere ausgewählte Methode hingegen bezeichnen sie als sensitiv genug, um auch wenige mutierte Zellen zu detektieren. Der Nachweis von Mutationen scheint also abhängig von der Sensitivität der Detektionsmethode zu sein. Einige molekulare Nachweismethoden sind nicht in der Lage, bei einer Anwesenheit der Tumorzellen unter 25% Mutationen aufzudecken [41].

Es ist ebenfalls möglich, dass unsere Ergebnisse durch die Analyse weniger Zellen von einem ähnlichen Problem, wie das ADO (Allel drop out, „Allelausfall“, Fehler der PCR die Wildtyp-DNA zu vervielfältigen), das als ein häufiges Problem bei Single-cell PCR gilt [51], betroffen sind. Lin et al. [38] machen es mit für homogene Ergebnisse

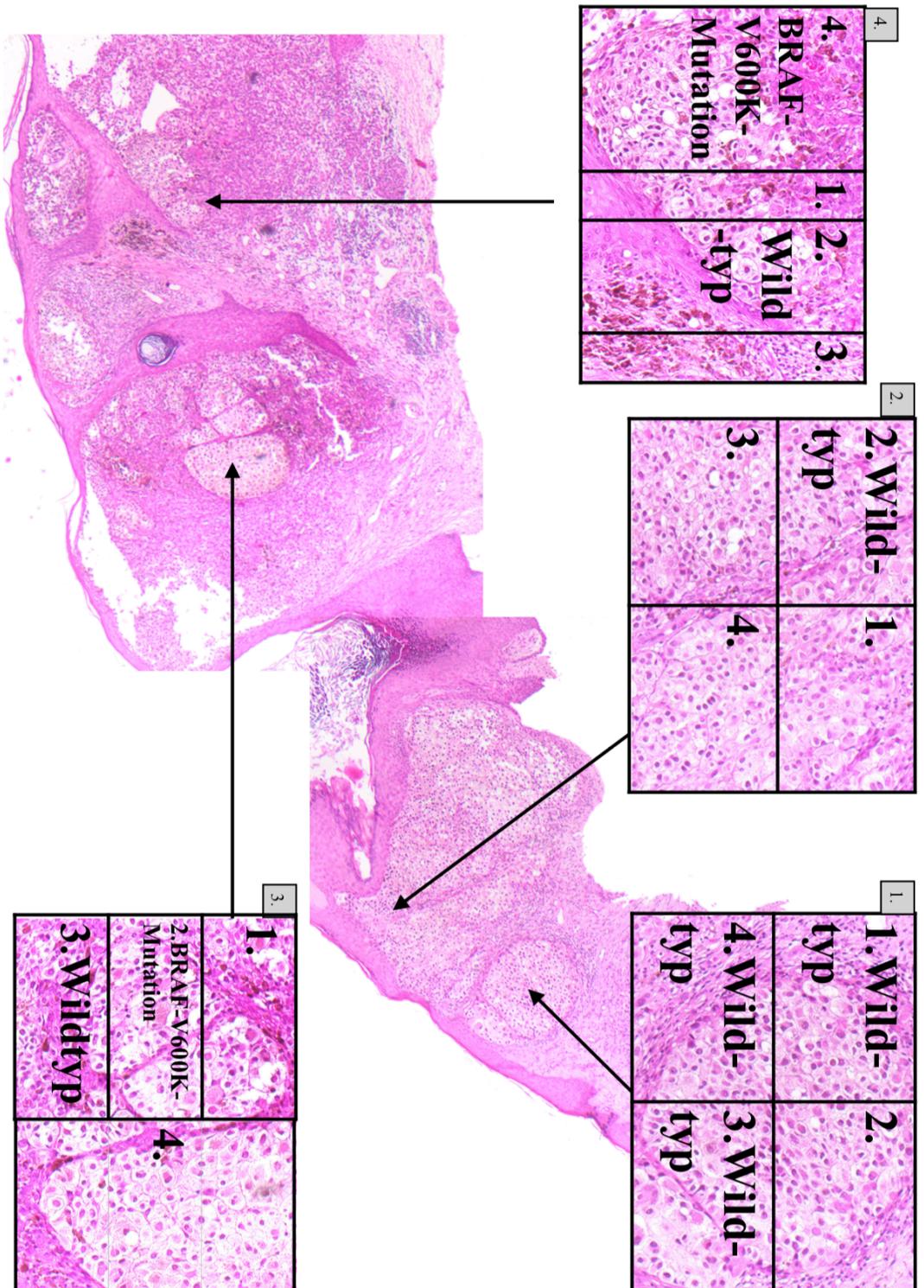


Abbildung 49 Primärtumor MM-III: untersuchte Gebiete und Regionen mikroskopisch vergrößert mit den Ergebnissen der Mutationsanalysen dargestellt

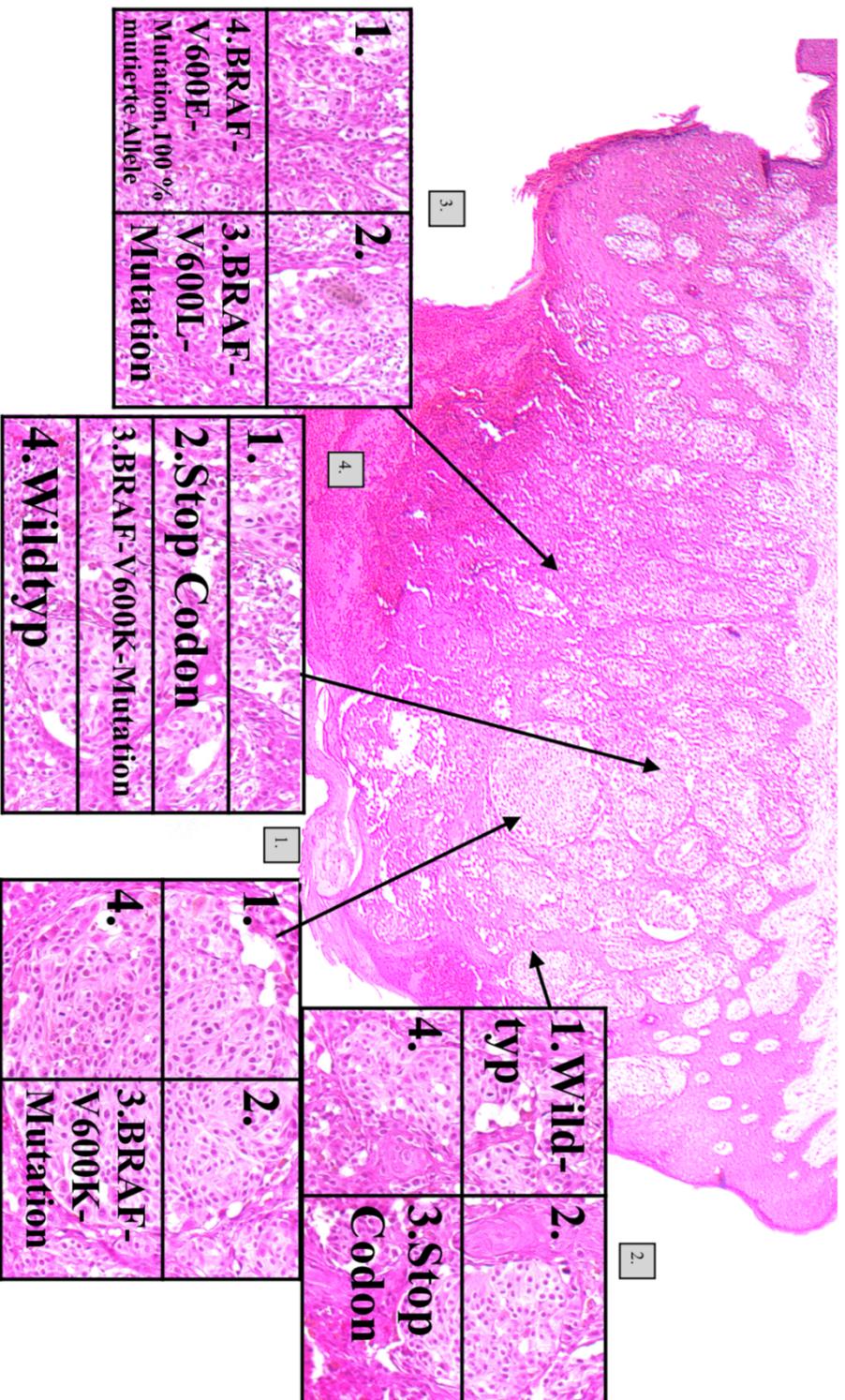


Abbildung 50 Primärtumor MM-IV: untersuchte Gebiete und Regionen mikroskopisch vergrößert mit den Ergebnissen der Mutationsanalysen dargestellt

Vorversuch		
mmI = MM-VIII	P62	Eine Mutation in Codon 599
	P85	Eine Mutation in Codon 598 (Position 1794)
bcc	P165	p.S602S, c.1806T>C
Hauptversuche		
MM-IV	P71	Mutation A598T und gleichzeitig A598A und gleichzeitig R603*
	P74	p.S602S, c.1806T>C (Peak 68 bp u. 100 bp), Stille Mutation, S602S
MM-V	P77	fragliche V600L + K601N

Tabelle 65 Übersicht in allen Versuchen vorkommenden seltenen und ungewöhnlichen Mutationen

Bei drei ursprünglich als BRAF-V600E deklarierten Primärtumoren wurden ausschließlich der Wildtyp, die BRAF-V600K- und seltene BRAF-Mutationen, aber nicht die BRAF-V600E-Mutation nachgewiesen (siehe Abbildung 51). Die Präsenz der vorbekannten BRAF-V600E-Mutation bestätigte eine daraufhin erneut durchgeführte Kontrollmutationsanalyse mit manueller Mikrodissektion. Außerdem wurde sie bereits bei diversen Vorversuchen in einem der besagten Primärtumore (in MM-VIII = mmI) mit unserer Methode detektiert. Eine Fehlanalyse ist somit unwahrscheinlich. Bei der Analyse des Hauptversuchs werden nur sehr wenige Zellen (und somit eine geringe absolute Menge an amplifizierbarer zellulärer DNA), in der manuellen Mikrodissektion (entscheidende Analyse für den BRAF-Mutationsstatus) und in den Vorversuchen aber wesentlich mehr Zellen (also viel DNA) untersucht. Es könnte sein, dass unter den sehr vielen Zellen zahlreiche eine Mutation (z.B. die BRAF-V600E-Mutation) und wenige eine weitere seltene Mutation tragen (in unserem Fall z.B. die BRAF-V600K). Bei der Amplifikation der DNA könnte es sein, dass die häufigere Mutation die seltenere maskiert, da DNA-Abschnitte unterschiedlich präferentiell durch die exponentielle Vervielfachung repliziert werden. Auch die Amplifikationseffizienz oder eine genetische Instabilität können eine Rolle spielen. Die Analyse weniger Zellen ermöglicht die Detektion im Tumor selten vorkommender Mutationen. Erklären lässt sich die ausbleibende Detektion ebenfalls durch asymmetrische DNA-Degradierung in räumlicher und zeitlicher Hinsicht oder weiteren Faktoren, siehe 4.3.1.. Eine weitere Ursache könnte sein, dass durch

4. Diskussion

unterschiedliche klonale Expansionen der Tumorzellen zufälligerweise in den für die Analyse ausgewählten Regionen keine BRAF-V600E mutierten Zellen vorhanden waren. Analog zu unseren Untersuchungen stimmen auch die Ergebnisse von Chiappetta et al. [28] bei der Pyrosequenzierung mit Lasermikrodissektion im Vergleich zu einer weiteren Methodik nicht immer überein und die Ergebnisse der Mutationsanalysen der jeweiligen Areale eines Tumors variieren.

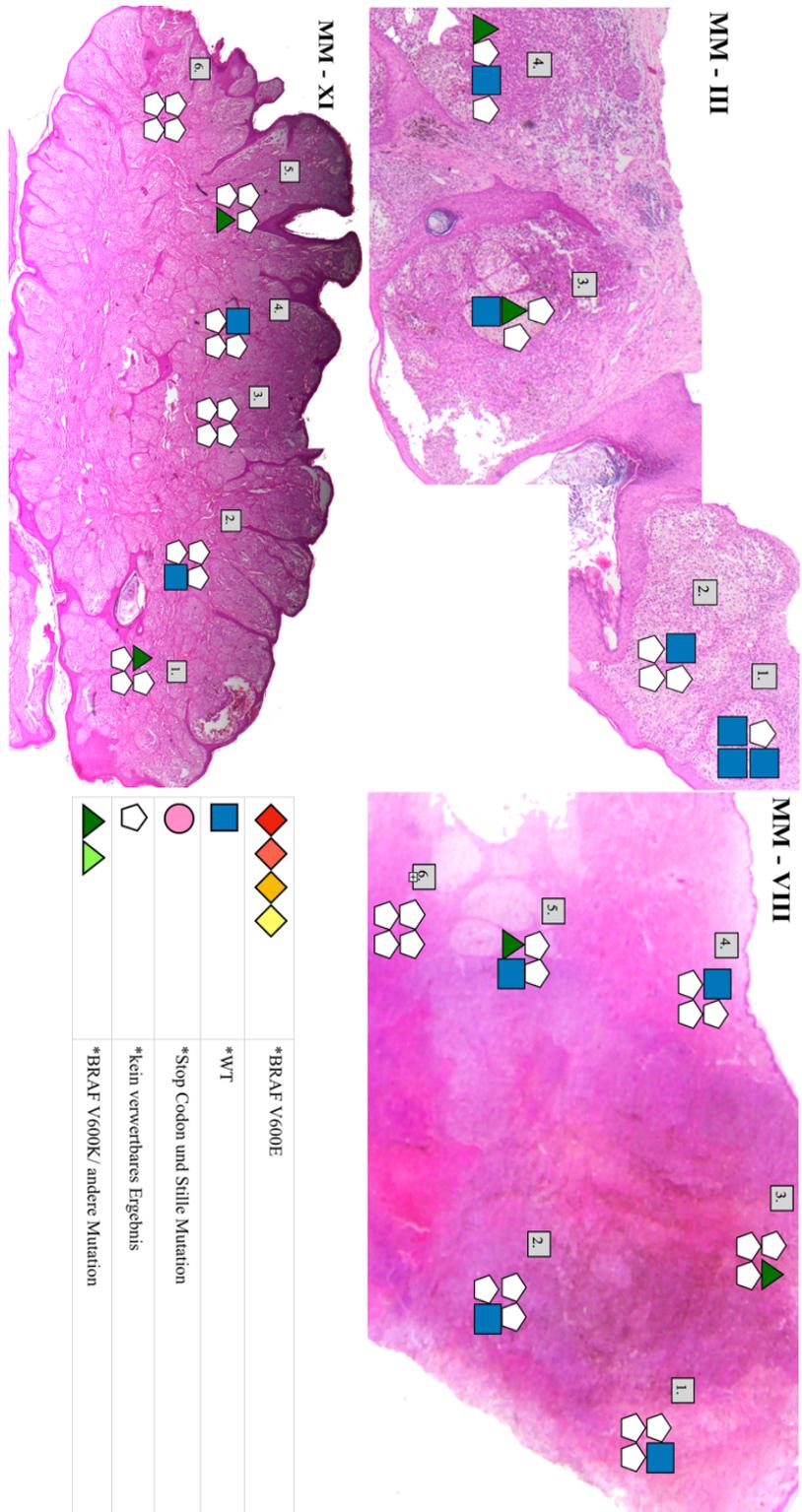


Abbildung 51 Übersicht der histologischen Schnitte der BRAF-V600E mutierten Primärtumore MM-III, MM-VIII und MM-XI mit den Ergebnissen der Mutationsanalysen, bei denen die BRAF-V600E-Mutation nicht nachgewiesen wurde, topographisch angeordnet

4.3.3. NRAS-Befunde

In dieser Arbeit wurden in den Vor- (mmN, Versuch 3.6.1., 3.8.) und Hauptversuchen (MM-V, MM-VII) NRAS positive Melanome auf die BRAF-Mutation hin untersucht. Neben dem Nachweis der BRAF-V600E-Mutation in mmN und MM-V gelang im Hauptversuch in MM-V zusätzlich der einer weiteren sehr ungewöhnlichen Mutation. Analog untersuchten Chiappetta et al. [28] und Colombino et al. [37] Präparate auf die BRAF- und NRAS-Mutation. Chiappetta et al. [28] bestätigen die Koexistenz in einem Präparat und belegen, dass Mutationen sich nicht gegenseitig ausschließen. Colombino et al. [37] weisen eine Koexistenz in Primärtumor und korrespondierender Metastase nach.

4.4. Vergleich mit der Literatur

4.4.1. Intra- und intertumorale Homogenität

Riveiro-Falkenbach et al. [40] untersuchten bei 140 Patienten Melanome (Primärtumore) und korrespondierende Metastasen auf die BRAF-V600E-Mutation, um die Homogenität zu beweisen. Mittels „Real time PCR Cobas 4800 BRAF-V600 Mutation Test“ wurden bei 23 von 140 (16,4 %) eine Diskordanz im Mutationsstatus festgestellt, das heißt, dass eine Mutation entweder nur im Primärtumor (12x) beziehungsweise nur in der Metastase (11x) nachgewiesen wurde. Nach einer daraufhin zusätzlich durchgeführten Immunhistochemie (Anti-BRAF-V600E VE1-Antikörper), bestand nur noch bei einem Patienten ein diskordantes Ergebnis, bei dem eine klinische Recherche ergab, dass gleichzeitig ein weiteres Melanom als Primärtumor diagnostiziert wurde. Dessen nachfolgend durchgeführte Mutationsanalyse konnte die Diskordanz erklären und widerlegen. Um die Ergebnisse der Immunhistochemie zu stützen wurde bei den 23 diskordanten Fällen zusätzlich eine Sanger-Sequenzierung durchgeführt, deren Ergebnisse fast ausnahmslos der Immunhistochemie entsprachen: 3 Fälle wurden durch die Immunhistochemie als BRAF-V600E positiv, aber durch die Sanger-Sequenzierung als negativ deklariert und 5 der bei der Immunhistochemie negativen Fälle zeigten bei der Sanger-Sequenzierung eine BRAF-V600K-Mutation.

Boursault et al. [32] belegten mittels Immunhistochemie mit einem BRAF-V600E-Antikörper und „High-Resolution-Melting-Analyse“ gefolgt von einer Sanger-Sequenzierung intra- und intertumorale Homogenität in Tumormaterial von 99 Patienten

4. Diskussion

(88 Primärtumore und 142 Metastasen, insgesamt 230 Präparate). Intertumorale Eigenschaften wurden nach Verfügbarkeit zwischen Primärtumor und Metastase beziehungsweise zwischen mehreren Metastasen untersucht. Bei 88 Patienten wurden die Primärtumore mit den Metastasen verglichen, woraufhin sich bei 4 von 88 (4,5%) eine Diskordanz zeigte. Dabei wurde bei einem eine BRAF-V600E-Mutation im Primärtumor, nicht aber in den beiden Metastasen und bei den drei weiteren eine BRAF-V600E-Mutation in der Metastase, nicht aber im Primärtumor nachgewiesen. Bei 37 Patienten, bei denen mehrere Metastasen miteinander verglichen wurden, fand sich eine Konkordanz im Mutationsstatus von 100%. Die intratumorale Homogenität wurde durch die immunhistochemische Färbung, die bei jedem der Präparate durchgeführt wurde und eine homogene Färbung der Tumorzellen nachwies, belegt.

Menzies et al. [41] untersuchten 171 Tumore (41 Primärmelanome) von 64 Patienten ausschließlich auf die BRAF-V600E-Mutation auf die intra- und intertumorale Homogenität. Zunächst wurden alle Tumore immunhistochemisch mit einem „BRAF-V600E mutant specific antibody VE1“ und zusätzlich für jeden Patienten ein Tumor mit einer „molekularen High-Resolution-Melt-analysis“ analysiert. Bei der Einteilung in BRAF-V600E „positiv“ und „negativ“ zeigten die Ergebnisse eine Übereinstimmung sowohl intra- als auch intertumoral, mit einer minimalen intertumoralen Intensitätsheterogenität (Heterogenität bezüglich der Färbeintensität) bei 9 Patienten.

4.4.2. Intra- und intertumorale Heterogenität

Chiappetta et al. [28] untersuchten 15 noduläre Melanome auf intratumorale Heterogenität, indem sie zum einen eine direkte Sequenzierung (das Tumormaterial wurde nicht mit Lasermikrodissektion gewonnen, sondern direkt aus angefertigten Schnitten) durchführten, und zum anderen mittels Lasermikrodissektion je 3 Areale mit 10.000 Tumorzellen und anschließender Sequenzierung auf die BRAF- und NRAS-Mutation testeten und miteinander verglichen. In 11 von 15 Fällen ergaben die Analysen einen positiven Mutationsstatus (7/11 BRAF- und 5/11 NRAS-Mutation). Eine intratumorale Heterogenität wurde durch den Nachweis verschiedener klonaler Zellpopulationen in einem Tumor bewiesen. Im Vergleich mit der Mutationsanalyse ohne Lasermikrodissektion wurde in 7 von 11 Fällen die gleiche Mutation in mindestens einem Areal (4x3 identisch, 2x2, 1x1 Mutation) nachgewiesen und in 4 von 11 Fällen zeigte sich in mindestens einem Areal eine unterschiedliche Mutation (1/4: 2xBRAF-V600E, 1xBRAF-V600R, 2/4: 3x NRAS-Q61R und -Q61K und 1x BRAF in Exon 15, 1/4: 2x

NRAS-Q61L, 1x BRAF Exon 11). Die Ergebnisse beweisen, dass eine zweite Mutation in einem Tumor eines Patienten präsent sein kann und kein Ausschluss für die Anwesenheit einer weiteren ist. Zusätzlich wurde die intertumorale Heterogenität durch die Analyse eines Primärtumors mit 6 Lymphknotenmetastasen eines Patienten dargestellt: 4 der 6 Metastasen unterschieden sich hinsichtlich der Mutationsanalyse untereinander und im Vergleich zum Primärmelanom.

Heinzerling et al. [34] untersuchten bei 53 Patienten je 2 bis 13 Tumore (falls verfügbar den Primärtumor, ansonsten Metastasen) mittels Pyrosequenzierung auf BRAF-Mutationen und bestätigten zweifelhafte Ergebnisse durch „capillary sequencing“. 44% zeigten eine Diskordanz zwischen Primärtumor und Metastase und 18,9 % (10/53) zwischen allen verfügbaren Tumoren des jeweiligen Patienten. Intratumorale Heterogenität wurde durch eine spezielle immunhistochemische Färbung mit einem speziellen BRAF-V600E-Antikörper beobachtet.

In die umfangreiche Analyse auf BRAF-Mutation von Yancovitz et al. [36] wurden 18 Primärtumore und 40 Metastasen von 19 Patienten eingeschlossen. Für die intratumorale Heterogenität wurde mittels Lasermikrodissektion und Mutationsdetektion mit Sequenzierung und „BRAF-V600E Spezifische Snapshot Analyse“ bei 9 Primärmelanomen je 3 bis 5 Regionen mit je 30 bis 300 Tumorzellen analysiert. Die Ergebnisse wurden anhand der Proportionen zwischen nachgewiesener BRAF-V600E-Mutation und BRAF-Wildtyp in intratumorale Heterogenität ist „unwahrscheinlich“ (3/9), „wahrscheinlich“ (2/9) und „deutlich“ (4/9) unterteilt. Für den Nachweis der intertumoralen Heterogenität wurden die Versuche mit konventioneller DNA Sequenzierung und mit MS-PCR durchgeführt und für die Auswertung die Ergebnisse der MS-PCR verwendet, da diese eine höhere Sensitivität zeigte. Eine Diskordanz fand sich bei dem Vergleich von Primärmelanom und korrespondierender Metastase bei 8 von 18 Fällen (44%) (positiver Mutationsstatus in 2 von 8 im Primärtumor und in 6 von 8 in der Metastase) und für die 40 untersuchten Metastasen bei 5 von 19 (26%) (13 von 19 mutiert, 1 von 19 ausschließlich Wildtyp Metastasen bei einem Patienten).

Colombino et al. [37] untersuchten Primärtumore und Metastasen bei 99 Patienten auf BRAF- und NRAS-Mutationen mittels Sequenzierung durch einem automatischen „fluorescent cycle sequencer“. Es zeigte sich eine Diskordanz bei 15/99 (15%). Unter anderem konnte auch bei einem NRAS positiven Primärtumor in der vom gleichen Patienten stammenden Metastase eine BRAF-Mutation nachgewiesen werden. Laut Colombino et al. [37] spricht diese Diskordanz für die Koexistenz molekularer heterogener Zelltypen in einem Tumor und belegt die intra- und intertumorale

4. Diskussion

Heterogenität.

Die Untersuchungen von Lin et al. [38] beinhalten 3 verschiedene Aspekte zur genaueren Klärung der intratumoralen Heterogenität beim Melanom mit besonderem Fokus auf die BRAF-Mutation. Bei 5 Primärmelanomen wurde eine sogenannte „Single Cell PCR and Sequenzierung“ durchgeführt, dies entspricht der Isolierung und Sequenzierung einzelner Melanomzellen. Bei 10 Primärmelanomen wurde die Analyse sowohl mittels konventioneller Sequenzierung, „sensitivity mutector assay“ als auch durch Klonen und Sequenzieren von separaten Allelen in Bakterien vollzogen. Bei 3 weiteren Patienten wurden Primärtumore und Rezidive oder Metastasen untersucht, um den Zusammenhang zwischen Progression der Erkrankung und BRAF-Mutationsstatus zu eruieren. Die Ergebnisse weisen eindeutig auf eine intratumorale Heterogenität hin, bei der ein zunehmender Anteil der BRAF mutierten Zellen in Zusammenhang mit fortschreitender Tumorprogression zu stehen scheint.

Mit der Frage, ob die BRAF-Mutation Folge der Tumorprogression und somit eine mögliche Erklärung für die intertumorale Heterogenität ist, haben sich einige Publikationen beschäftigt. Es finden sich unterschiedliche Erklärungen, unabhängig davon, ob sie eine Homo- oder Heterogenität belegen. Belegend für den Einfluss der Tumorprogression auf die tumorale Heterogenität sind ein gesteigener Anteil der BRAF-V600E mutierten Allele bei Rezidiven oder Metastasen [38]. Eine weitere Bestätigung für diese These sind Fälle, bei denen der Primärtumor ein Wildtyp ist, die Metastasen hingegen Mutationen tragen, eventuell sogar seltene [32, 38]. Colombino et al. [37], Yancovitz et al. [36] und Heinzerling et al. [34] widerlegen diesen Ansatz, indem sie die Mutation in einem Primärtumor, aber nicht in der Metastase nachweisen. Heinzerling et al. [34] sprechen sich daher gegen einen Zusammenhang zwischen Progression und Mutation aus. Einen Verlust der BRAF-Mutation während der Krankheitsprogression halten Menzies et al. [41] für unwahrscheinlich. Ähnliche Ansichten haben Colombino et al., die sich für eine Entwicklung während des Krankheitsverlaufes aussprechen und es nicht für ein Gründungsereignis halten [37].

Shain et al. [10] fanden heraus, dass es in melanozytäre Neoplasien häufig zu Tumorheterogenität kommt, weil diese in fortgeschrittenen Progressionsstadien von einer „gradlinigen“ zu einer „verzweigten“ Entwicklung übergehen. Eine weitere Erklärung für diskordante intertumorale Ergebnisse könnte die sekundäre Mutation sein, das heißt, dass ein zunächst „negativer“ Primärtumor metastasiert, und erst im Anschluss mutiert. Dies würde allerdings nicht nur für die intertumorale, sondern auch für eine intratumorale Heterogenität sprechen. Zusätzlich wäre nur durch Aussterben eines Klones der Verlust

einer Mutation erklärbar.

M.Saint-Jean et al. [39] testeten bei 74 Patienten je 2 bis 3 Tumore (die Kombination entweder bestehend aus einem Primärmelanom und einer Metastase oder aus mehreren Metastasen) auf die BRAF-Mutation und untersuchten jeweils individuell auf intertumorale Heterogenität. Die Tumore wurden mittels Allel spezifischer Amplifikation und Sanger-Sequenzierung sowie die diskordanten Ergebnisse zusätzlich mit „Therascreen BRAF RGQ assay Qiagen“ analysiert. Es zeigte sich eine durchschnittliche Diskordanz von 13,5% (10/74), die in Abhängigkeit der Zusammensetzung der Exemplare variierte (8% bei Primärmelanom und Metastase, 18% bei zwei Metastasen, 20% bei drei Metastasen).

Zhang et al. [52] demonstrieren intra- und intertumorale Heterogenität, indem sie akrale Melanome im Frühstadium untersuchten. Bei sieben Patienten wurden in mindestens einem Naevus und zwei benachbarten Tumoren insgesamt in 41 Areale mittels Lasermikrodissektion Zellen gewonnen und anschließend eine Amplifikation des gesamten Genoms durchgeführt. Die Genomvariationen wurden auf mehreren Ebenen beurteilt, um so die Heterogenität zu belegen: Zwischen Tumor und Naevi, zwischen Patienten, zwischen verschiedenen Phänotypen im selben Tumor und zwischen benachbarten Tumorzellclustern mit identischer phänotypischer Erscheinung. In allen Ebenen wurde eine Heterogenität nachgewiesen.

4.4.3. Diskussion diskordanter Ergebnisse

Im folgenden werden verschiedene Faktoren, die als Ursachen oder Einflussfaktoren für homogene und heterogene Ergebnisse angesehen werden, diskutiert.

4.4.3.1. Zweiter Primärtumor

Eine mögliche Erklärung für einen diskordanten Mutationsstatus zwischen Primärtumor und Metastase ist ein zweiter, eventuell noch nicht identifizierter [37] Primärtumor, der dem Mutationsstatus der Metastase entspricht und somit für diesen verantwortlich ist. Diese Konstellation würde eine Einordnung zu den konkordanten Ergebnissen ermöglichen. Ein entsprechender Nachweis gelang Riveiro-Falkenbach et al. [40] und Boursault et al. [32, 40]. 17 % der Patienten von Menzies et al. hatten multiple Melanome in der Krankengeschichte [41].

4. Diskussion

4.4.3.2. Molekulare Methodik

Als weitere Erklärung für intra- und intertumorale heterogene Ergebnisse kommt die molekulare Nachweismethode in Frage, da ihre Ergebnisse als Folge technischer Probleme angesehen werden [40]. Außerdem führt eine Auswertung von wenigen Tumorzellen [40] zu einer sinkenden Effizienz oder könnte durch die Testung von kleinen Primärtumoren oder Lymphknotenmetastasen, bei denen nicht-Melanom DNA untersucht wurde oder suffiziente Zellreinheit nicht gegeben war, verfälscht worden sein [41].

4.4.3.3. weitere Faktoren

Riveiro-Falkenbach et al. [40] machten für die diskordanten Ergebnisse eine Kontamination des untersuchten Materials mit Keratinozyten, Entzündungs- oder Stromazellen sowie Fehler während der Makrodissektion verantwortlich, finden jedoch nicht für alle diskordanten Ergebnisse eine Erklärung. Durch die Selektion der Zellen mittels Lasermikrodissektion konnte dieser Faktor in unserer Arbeit ausgeschlossen werden.

Die Tatsache, dass nicht für jedes Ergebnis, das intra- und intertumorale Heterogenität widerspiegelt, eine Erklärung gefunden wird, spricht ebenfalls für deren Existenz. Heinzerling et al. [34] erklären die intratumorale Heterogenität als Resultat der gewählten Stichproben oder der gewählten Nachweismethoden und biologische Unterschiede. Ein weiteres Argument für die intratumorale Heterogenität ist die Individualität eines jeden Tumors, die sich in Größe, Morphologie, Beschaffenheit und vielen weiteren Eigenschaften äußert, was bereits unter makro- und mikroskopischer Begutachtung deutlich wird. Laut Marusyk et al. [53] scheint die phänotypische Heterogenität ein Zusammenspiel aus genetischen und nicht genetischen Faktoren zu sein, wobei aber nicht jede genetische Differenz zwischen Zellen in einem Tumor zu Unterschieden im Phänotyp und nur ein Teil für klinisch wichtige Eigenschaften von Bedeutung ist. Die Testung eines Primärtumors, der eigentlich nicht für die nachfolgende Krankheit verantwortlich ist, könnte eine Rolle spielen [41]. Außerdem legen der Nachweis intratumoraler Heterogenität in anderen Tumorentitäten, wie beispielsweise gastrointestinale Stromatumoren oder Lungenkarzinome [36], deren Vorkommen in Melanomen nahe.

4.4.3.4. Heterogenität - Koexistenz multipler Tumorsubklone

Mehrere Publikationen und die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten durch den simultanen Nachweis von Zellen mit positivem und negativem BRAF-Mutationsstatus in einem Primärmelanom auf die Koexistenz multipler Tumorsubklone in einem Tumor hin [36, 37]. Da beide Zelltypen die Fähigkeit zur Metastasierung besitzen [36], erklärt der Nachweis auch deren Verantwortlichkeit für BRAF positiv und negativ getestete Metastasen, die bei einem Patienten sowohl zeitgleich als auch einzeln und diskordant zum Primärtumor auftreten können [34, 36, 39]. Somit spricht der Nachweis intertumoraler Heterogenität für die Existenz intratumoraler Heterogenität und umgekehrt. Viele Autoren [34, 36, 37, 39] belegen die intratumorale durch intertumorale Heterogenität. Welcher selektive Druck allerdings dazu führt, dass es eher zu einer Migration eines Wildtyp anstatt durch einen scheinbar aggressiveren BRAF mutierten Subklon kommt, ist nicht abschließend geklärt [37]. Eventuell führen bestimmte Ereignisse zum Stillstand der Proliferation von mutierten Zellen [37].

4.4.3.5. Therapieeinfluss und klinische Relevanz

Des Weiteren besteht auch ein möglicher Zusammenhang zwischen der Ausprägung des Mutationsstatus und dem Ansprechen und der Resistenzentwicklung auf zielgerichtete Therapien (targeted therapies) [36]. Etwa 60 - 80% der Patienten mit fortgeschrittenem metastasierten Melanom mit nachgewiesener BRAF-V600E-Mutation sprechen auf BRAF-Kinase-Inhibitoren an [36]. Diese variable Erfolgsquote könnte laut Xia et al. [19] und Yancovitz et al. [36] durchaus auf die Koexistenz verschiedener Mutationen zurückzuführen sein und somit auch als Beweis für intra- und intertumorale Heterogenität gelten. Zusätzlich könnte dies auch ein verantwortlicher Mechanismus für die Resistenzbildung auf BRAF-Inhibitoren [36, 40] sein. Auch Gerlinger et al. [54] und Zhang et al. [52] sind der Ansicht, dass intratumorale Heterogenität gefördert durch Tumoradaption [52, 53] geprägt durch darwinistische Selektion [54] zu Behandlungsfehlern und Medikamentenresistenz führen kann. Eine zeitnahe Krankheitsprogression bei BRAF-zielgerichtetem Therapiebeginn ist ebenfalls möglich. So erklären Heinzerling et al. [34] die simultane Anwesenheit von BRAF-V600E mutierten und BRAF-Wildtyp Zellen als Ursache. Laut Kemper et al. [55] ist die häufigste Ursache für eine Resistenzentwicklung eine Reaktivierung MAPK Signalwegs. In ihrer Arbeit belegen sie, dass multiple Resistenzmechanismen in einem Tumor präsent sein können und zur Resistenz führende Mutationen bereits vor der Behandlung nachweisbar sind. Dies belegen auch Marusyk et al. [53] und machen den Grad an

4. Diskussion

Heterogenität in einem Tumor zum entscheidenden Faktor für das therapeutische Outcome.

4.5. Beschränkungen dieser Arbeit

Wie in 1.2. (BRAF-Mutation, Mutationsnachweis) bereits aufgeführt, variieren Spezifität und Sensitivität zwischen den einzelnen Nachweismethoden. In dieser Arbeit wurden die Tumore nur mit einer Methode getestet, zur Bestätigung der Ergebnisse wäre ein Nachweis mit einer weiteren Methode, bei der Sensitivität und Spezifität bekannt sind, von Vorteil. Es wurde das „Next-Generation-Sequenzierung“, kurz NGS, als zweite Methode erwogen, jedoch wieder verworfen, da eine deutlich größere Menge DNA (also entsprechend mehr Zellen) benötigt wird. Dies widerspricht unserer Zielsetzung, eine möglichst kleine Zellpopulation zu analysieren. Eine andere Möglichkeit zur Stützung der Ergebnisse, die für eine intratumorale Heterogenität sprechen, wäre das Mituntersuchen der Metastasen, da diese als Hinweis für eine intratumorale Heterogenität gelten. Besonders interessant wäre dies beim Nachweis seltener Mutationen.

Ob ein Zusammenhang zwischen der Heterogenität oder dem Vorkommen seltener Mutationen und dem Alter, Geschlecht, Tumorlokalisierung, Sonnenexposition und weiteren besteht, wie es in diversen Publikationen propagiert wird, kann hier keine Stellung bezogen werden.

5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit über „experimentelle Untersuchung zur Tumorzellheterogenität im Melanom anhand der BRAF-V600-Mutationsfrequenz“ wurde durchgeführt, um die intratumorale Heterogenität mit besonderem Fokus auf den Anteil der Allele des Codon 600 im Exon 15 des BRAF-Gens bei Mutationsanalysen von Melanomen mittels Pyrosequenzierung zu untersuchen.

Umfangreiche Vorversuche waren nötig, um die optimalen experimentellen Bedingungen für die Untersuchung der Melanome (angefertigte entparaffinierte FFPE-Schnitte aus archivierten Präparaten) zu entwickeln. Die untere Detektionsgrenze und der Grenzbereich der PCR-Möglichkeiten konnten durch präzise Auswahl einer kleinst möglichen Zellpopulation (20 Zellen) mittels Lasermikrodissektion erreicht werden.

Im Hauptversuch wurden in 12 Primärtumoren mit vorbekanntem BRAF-V600E-Mutationsstatus (neun mit BRAF-V600E-Mutation, einer mit BRAF-V600K-Mutation, zwei mit BRAF-V600-Wildtyp und NRAS-Mutation, Q61K beziehungsweise Q61L im Exon 3) 244 Regionen in 61 Tumorgebieten untersucht. Bei einem der zwölf Tumore war keine molekularpathologische Auswertung möglich. In 34% (83/244, 4.3.1.) konnte eine Mutationsanalyse durchgeführt werden. Dies ist als Erfolg und Besonderheit dieser Arbeit zu verzeichnen.

Bei 8/11 Tumoren konnte der vorbekannte Mutationsstatus (sechsmal BRAF-V600E-Mutation, zweimal Wildtyp), sowie bei 7/11 eine andere seltene Mutation (V600K, K601N, A598T, A598A, R603, S602S) detektiert werden. Bei 10/11 gelang ein Nachweis der Koexistenz einer Mutation und dem Wildtyp oder sowie bei 7/11 der mehrerer Mutationen in einem Tumor (siehe 4.3.2.).

Durch die Analyse weniger Zellen scheinen seltene Mutationen häufiger gefunden zu werden (4.3.2.). Die Pyrosequenzierung (4.2.2.) ermöglicht eine hohe Sensitivität und Spezifität, Verlässlichkeit und Aussagekraft der Ergebnisse und detektiert neben der BRAF-V600E-Mutation weitere seltene Mutationen [29].

Zusammenfassend belegen die Ergebnisse dieser Arbeit im Einklang mit der Literatur beim Melanom ein komplexes und heterogenes intratumorales Mutationsmuster bei der es sich in der Regel nicht um eine autonome klonale Expansion einer solitären malignen Ausgangszelle handelt. Trotz der Individualität eines jeden Tumors wiederholen sich typische Mutationsmuster, wie die BRAF-V600E-Mutation. Die Ergebnisse dieser Arbeit werden durch die Publikationen von Chiappetta et al. [28], Heinzerling et al. [34], Yancovitz et al. [36], Colombino et al. [36], Lin et al. [38] und Saint-Jean et al. [39]

5. Zusammenfassung

bestätigt (siehe 4.3.2. und 4.4.2.) und widersprechen der These von Riveiro-Falkenbach et al. [40], Boursault et al. [32] und Menzies et al. [41].

6. Verzeichnis

6.1. Literaturverzeichnis

1. Tietze, J.K. and C. Berking, *Endlich neue Therapieoptionen beim malignen Melanom*. *TumorDiagn u Ther*, 2015. **36**(03): p. 150-156.
2. Abbas, O., D.D. Miller, and J. Bhawan, *Cutaneous malignant melanoma: update on diagnostic and prognostic biomarkers*. *Am J Dermatopathol*, 2014. **36**(5): p. 363-79.
3. „S3 Leitlinie zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms“ *Version 2.0 - Juli 2016*, AWMF-Register-Nummer: 032/024OL, Leitlinienprogramm Onkologie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (AWMF), Deutsche Krebsgesellschaft e.V. (DKG) und Deutschen Krebshilfe (DKH), https://leitlinienprogramm-onkologie.de/uploads/tx_sbdowloader/LL_Melanom_Langversion_2.0_OL_04_082016.pdf, (Zugriff am 07.08.2018).
4. *Krebs in Deutschland 2007/2008, Eine gemeinsame Veröffentlichung des Robert Koch-Instituts und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V., 8. Ausgabe, 2012*, https://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownloadsB/KID2012.pdf?__blob=publicationFile, (Zugriff am 27.03.2018)/ 07.08.2018.
5. *Krebs in Deutschland für 2013/2014, 11. Ausgabe. Gemeinsame Publikation des Zentrums für Krebsregisterdaten und der Gesellschaft der Epidemiologischen Krebsregister in Deutschland E.V., Robert Koch Institut, Berlin 2017*, https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2017/krebs_in_deutschland_2017.pdf;jsessionid=E9200BF64D80AEA_A297ED70E779D84BA.2_cid372?__blob=publicationFile (Zugriff am 07.08.2018).
6. *Krebs in Deutschland für 2015/2016, 12. Ausgabe. Gemeinsame Publikation des Zentrums für Krebsregisterdaten und der Gesellschaft der Epidemiologischen Krebsregister in Deutschland E.V., Robert Koch Institut, Berlin 2019*, https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2019/kid_2019_c43_melanom.pdf?__blob=publicationFile, (Zugriff am 29.07.2020).
7. *Krebs in Deutschland für 2009/2010, 9. Ausgabe. Gemeinsame Veröffentlichung des Robert-Koch-Instituts und der Gesellschaft der Epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., Robert Koch Institut, Berlin 2013*, http://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownloadsB/KID2013.pdf%3F__blob%3DpublicationFile (Zugriff am 01.04.2019).
8. Brenner, H., *Melanommortalität in Zeiten bundesweiten Hautkrebsscreenings*. *Dtsch Arztebl International*, 2015. **112**(38): p. 627-8.
9. Rastrelli, M., et al., *Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification*. *In Vivo*, 2014. **28**(6): p. 1005-11.
10. Shain, A.H., et al., *The Genetic Evolution of Melanoma from Precursor Lesions*. *N Engl J Med*, 2015. **373**(20): p. 1926-36.
11. Kubica, A.W. and J.D. Brewer, *Melanoma in immunosuppressed patients*. *Mayo Clin Proc*, 2012. **87**(10): p. 991-1003.
12. Donahue, T., et al., *Immunosuppression is an independent prognostic factor associated with aggressive tumor behavior in cutaneous melanoma*. *J Am Acad Dermatol*, 2015. **73**(3): p. 461-6.

6. Verzeichnis

13. „S3-Leitlinie zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms“ Version 3.2. - Oktober 2019, AWMF-Register-Nummer: 032/024OL, Leitlinienprogramm Onkologie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (AWMF), Deutsche Krebsgesellschaft e.V. (DKG) und Deutschen Krebshilfe (DKH),
https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/032-024OL_S3_Melanom-Diagnostik-Therapie-Nachsorge_2020-01.pdf, (Zugriff am 28.05.2020)
14. Rigel, D.S., J. Russak, and R. Friedman, *The evolution of melanoma diagnosis: 25 years beyond the ABCDs*. CA Cancer J Clin, 2010. **60**(5): p. 301-16.
15. Universitätsklinikum Freiburg, *Klinisches Krebsregister - Kodierhilfe - Stand Mai 2015*,
https://www.uniklinik-freiburg.de/fileadmin/mediapool/09_zentren/cccf/pdf/Neue_Kodierhilfen/cccf_kkr_kodierhilfe_melanom.pdf, Zugriff am 23.08.2018.
16. „Melanom-Ein Ratgeber für Patientinnen und Patienten (Juli 2014)“ Patientenleitlinie, „Leitlinienprogramm Onkologie“ der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V., der Deutsche Krebsgesellschaft e.V. und der Deutschen Krebshilfe e.V.,
https://www.krebshilfe.de/infomaterial/Patientenleitlinien/Melanom_Patientenleitlinie_DeutscheKrebshilfe.pdf, (Zugriff am 28.05.2020)
17. Rose, C., [Diagnosics of malignant melanoma of the skin : Recommendations of the current S3 guidelines on histology and molecular pathology]. Hautarzt, 2017. **68**(9): p. 749-761.
18. Lawrence, M.S., et al., *Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes*. Nature, 2013. **499**(7457): p. 214-218.
19. Xia, J., et al., *A meta-analysis of somatic mutations from next generation sequencing of 241 melanomas: a road map for the study of genes with potential clinical relevance*. Mol Cancer Ther, 2014. **13**(7): p. 1918-28.
20. K, A.S. and M.A. Postow, *Current options and future directions in the systemic treatment of metastatic melanoma*. J Community Support Oncol, 2014. **12**(1): p. 20-6.
21. Yazdi, A.S., et al., *Mutations of the BRAF gene in benign and malignant melanocytic lesions*. J Invest Dermatol, 2003. **121**(5): p. 1160-2.
22. Hall, R.D. and R.R. Kudchadkar, *BRAF mutations: signaling, epidemiology, and clinical experience in multiple malignancies*. Cancer Control, 2014. **21**(3): p. 221-30.
23. Davies, H., et al., *Mutations of the BRAF gene in human cancer*. Nature, 2002. **417**(6892): p. 949-54.
24. Langabeer, S.E., et al., *Correlation of the BRAF V600E mutation in hairy cell leukaemia with morphology, cytochemistry and immunophenotype*. Int J Lab Hematol, 2012. **34**(4): p. 417-21.
25. Olson, M.T., et al., *BRAF pyrosequencing analysis aided by a lookup table*. Am J Clin Pathol, 2014. **141**(5): p. 639-47.
26. Colombino, M., et al., *Discrepant alterations in main candidate genes among multiple primary melanomas*. J Transl Med, 2014. **12**: p. 117.
27. Cheng, L., et al., *Molecular testing for BRAF mutations to inform melanoma treatment decisions: a move toward precision medicine*. Mod Pathol, 2018. **31**(1): p. 24-38.
28. Chiappetta, C., et al., *BRAF and NRAS mutations are heterogeneous and not mutually exclusive in nodular melanoma*. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2015. **23**(3): p. 172-7.

29. Ihle, M.A., et al., *Comparison of high resolution melting analysis, pyrosequencing, next generation sequencing and immunohistochemistry to conventional Sanger sequencing for the detection of p.V600E and non-p.V600E BRAF mutations*. BMC Cancer, 2014. **14**: p. 13.
30. Porcelli, L., et al., *Metastatic melanoma cells with BRAF G469A mutation: nab-paclitaxel better than vemurafenib?* Cancer Chemother Pharmacol, 2015. **76**(2): p. 433-8.
31. Curry, J.L., et al., *Molecular platforms utilized to detect BRAF V600E mutation in melanoma*. Semin Cutan Med Surg, 2012. **31**(4): p. 267-73.
32. Boursault, L., et al., *Tumor homogeneity between primary and metastatic sites for BRAF status in metastatic melanoma determined by immunohistochemical and molecular testing*. PLoS One, 2013. **8**(8): p. e70826.
33. Shen, S. and D. Qin, *Pyrosequencing data analysis software: a useful tool for EGFR, KRAS, and BRAF mutation analysis*. Diagn Pathol, 2012. **7**: p. 56.
34. Heinzerling, L., et al., *Mutation landscape in melanoma patients clinical implications of heterogeneity of BRAF mutations*. Br J Cancer, 2013. **109**(11): p. 2833-41.
35. Chapman, P.B., A. Hauschild, and V.K. Sondak, *Frontline approach to metastatic BRAF-mutant melanoma diagnosis, molecular evaluation, and treatment choice*. Am Soc Clin Oncol Educ Book, 2014: p. e412-21.
36. Yancovitz, M., et al., *Intra- and inter-tumor heterogeneity of BRAF(V600E) mutations in primary and metastatic melanoma*. PLoS One, 2012. **7**(1): p. e29336.
37. Colombino, M., et al., *BRAF/NRAS mutation frequencies among primary tumors and metastases in patients with melanoma*. J Clin Oncol, 2012. **30**(20): p. 2522-9.
38. Lin, J., et al., *Polyclonality of BRAF mutations in primary melanoma and the selection of mutant alleles during progression*. Br J Cancer, 2011. **104**(3): p. 464-8.
39. Saint-Jean, M., et al., *Is a single BRAF wild-type test sufficient to exclude melanoma patients from vemurafenib therapy?* J Invest Dermatol, 2014. **134**(5): p. 1468-1470.
40. Riveiro-Falkenbach, E., et al., *Intra- and Inter-Tumoral Homogeneity of BRAF(V600E) Mutations in Melanoma Tumors*. J Invest Dermatol, 2015. **135**(12): p. 3078-3085.
41. Menzies, A.M., et al., *Intrapatient homogeneity of BRAFV600E expression in melanoma*. Am J Surg Pathol, 2014. **38**(3): p. 377-82.
42. Weinstein, D., et al., *Diagnostic and prognostic biomarkers in melanoma*. J Clin Aesthet Dermatol, 2014. **7**(6): p. 13-24.
43. „HMB-45- Zur Verwendung In Der In Vitro Diagnostik (IVD)“ Deutsch: Anwendungsvorschriften, Rev 3.0, EMERGO EUROPE, The Hague, NL http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:QCc3IEs4y_kJ:www.medic-diagnostika.de/index.php%3Fcontroller%3Dproduct%26id_product%3D915%26id_lang%3D2%26download%3D3183+&cd=9&hl=de&ct=clnk&gl=de&client=safari), (Zugriff am 26.07.2020).
44. Satzger, I., et al., *Prognostic significance of isolated HMB45 or Melan A positive cells in Melanoma sentinel lymph nodes*. Am J Surg Pathol, 2007. **31**(8): p. 1175-80.
45. Colomba, E., et al., *Detection of BRAF p.V600E mutations in melanomas: comparison of four methods argues for sequential use of immunohistochemistry and pyrosequencing*. J Mol Diagn, 2013. **15**(1): p. 94-100.

46. Carbonell, P., et al., *Comparison of allelic discrimination by dHPLC, HRM, and TaqMan in the detection of BRAF mutation V600E*. J Mol Diagn, 2011. **13**(5): p. 467-73.
47. Gilbert, M.T., et al., *The isolation of nucleic acids from fixed, paraffin-embedded tissues-which methods are useful when?* PLoS One, 2007. **2**(6): p. e537.
48. Wong, S.Q., et al., *Sequence artefacts in a prospective series of formalin-fixed tumours tested for mutations in hotspot regions by massively parallel sequencing*. BMC Med Genomics, 2014. **7**: p. 23.
49. Rutkowski, P., et al., *Molecular alterations in clinical stage III cutaneous melanoma: Correlation with clinicopathological features and patient outcome*. Oncol Lett, 2014. **8**(1): p. 47-54.
50. Ichii-Nakato, N., et al., *High frequency of BRAFV600E mutation in acquired nevi and small congenital nevi, but low frequency of mutation in medium-sized congenital nevi*. J Invest Dermatol, 2006. **126**(9): p. 2111-8.
51. Piyamongkol, W., et al., *Detailed investigation of factors influencing amplification efficiency and allele drop-out in single cell PCR: implications for preimplantation genetic diagnosis*. Mol Hum Reprod, 2003. **9**(7): p. 411-20.
52. Zhang, X., et al., *Genomic Heterogeneity and Branched Evolution of Early Stage Primary Acral Melanoma Shown by Multiregional Microdissection Sequencing*. J Invest Dermatol, 2019. **139**(7): p. 1526-1534.
53. Marusyk, A., V. Almendro, and K. Polyak, *Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer?* Nat Rev Cancer, 2012. **12**(5): p. 323-34.
54. Gerlinger, M., et al., *Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing*. N Engl J Med, 2012. **366**(10): p. 883-892.
55. Kemper, K., et al., *Intra- and inter-tumor heterogeneity in a vemurafenib-resistant melanoma patient and derived xenografts*. EMBO Mol Med, 2015. **7**(9): p. 1104-18.

6.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 „T-Klassifikation des Primärtumors beim malignen Melanom (AJCC 2016/UICC 2016)“, Tabelle 8 übernommen aus AWMF 2019 [13].....	6
Tabelle 2 „N-Klassifikation des Primärtumors beim malignen Melanom (AJCC 2016/UICC 2016)“, Tabelle 9 übernommen aus AWMF 2019 [13].....	8
Tabelle 3 „M-Klassifikation des Primärtumors beim malignen Melanom (AJCC 2016/UICC 2016)“, Tabelle 10 übernommen aus AWMF 2019 [13].....	9
Tabelle 4 „Stadieneinteilung des malignen Melanoms – klinisch (AJCC 2016/UICC 2016)“, Tabelle 11 übernommen aus AWMF 2019 [13]	10
Tabelle 5 „Stadieneinteilung des malignen Melanoms - pathologisch (AJCC 2016/UICC 2016)“, Tabelle 12 übernommen aus AWMF 2019 [13]	11
Tabelle 6 Geräte, Gefäße und Reagenzien bei der Lasermikrodissektion.....	26
Tabelle 7 Geräte, Gefäße und Reagenzien bei der DNA Aufbereitung.....	28
Tabelle 8 Zusammensetzung des Reagenzes für die DNA-Aufbereitung	29
Tabelle 9 Übersicht der eingesetzten Proteinase K und des TE Puffers sowie der daraus resultierenden Gesamtmenge und Ansatz für die PCR.....	29
Tabelle 10 Geräte, Gefäße und Reagenzien bei der PCR.....	32
Tabelle 11 Zusammensetzung des Reagenzes für die PCR	33
Tabelle 12 Geräte, Gefäße und Reagenzien für den Bioanalyzer.....	38
Tabelle 13 Zusammensetzung der Reagenzien für den Bioanalyzer.....	38
Tabelle 14 Geräte, Gefäße und Reagenzien für die Pyrosequenzierung	47
Tabelle 15 Zusammensetzung der Reagenzien für die Pyrosequenzierung	48
Tabelle 16 Geräte, Gefäße und Reagenzien für manuelle Mikrodissektion	50
Tabelle 17 Zusammensetzung der Reagenzien für die manuelle Mikrodissektion.....	50
Tabelle 18 Übersicht zum Versuch 3.1. mit den Ergebnissen der BRAF-Mutationsanalyse	52
Tabelle 19 Erklärung für die bei der (Re-) PCR entstandenen Amplifikate	52
Tabelle 20 Versuchsaufbau der Verdünnungsreihe zu 3.3.....	53
Tabelle 21 eingesetzte Probenmenge mit entsprechender Zellzahl (zu Versuch 3.4.).....	54
Tabelle 22 schematische Darstellung für die Interpretation der nachfolgenden Tabellen (zu 3.4.).....	55
Tabelle 23 Ergebnisse für mmI (Versuch 3.4.).....	57
Tabelle 24 Ergebnisse für mmII (Versuch 3.4.)	58
Tabelle 25 mmI und mmII: Vergleich der Pyrogramm-Ergebnisse (Versuch 3.4.)	60
Tabelle 26 Übersicht der Ergebnisse (Versuch 3.5.)	61
Tabelle 27 Erklärung der verwendeten Abkürzungen (Versuch 3.5.)	61
Tabelle 28 Übersicht der Ergebnisse (Versuch 3.6.)	63
Tabelle 29 Übersicht der Ergebnisse (Versuch 3.6.2.)	64
Tabelle 30 Erklärung der Ergebnisse der nachfolgenden Tabelle (Versuch 3.7.)	66
Tabelle 31 Übersicht der Ergebnisse (Versuch 3.7.)	67
Tabelle 32 eingesetzte Probenmenge mit entsprechender Zellzahl (Versuch 3.7.).....	67
Tabelle 33 Zusammenfassung der Ergebnisse (Versuch 3.7.).....	68
Tabelle 34 Übersicht der untersuchten Tumore (Versuch 3.8.)	69
Tabelle 35 Erklärung für die nachfolgende Tabelle (Versuch 3.8.)	69
Tabelle 36 Ergebnisse (Versuch 3.8.).....	71
Tabelle 37 Übersicht des Versuchsaufbaus (Versuch 3.9.)	73
Tabelle 38 Ergebnisse (Versuch 3.9.).....	74
Tabelle 39 Übersicht der Ergebnisse (Versuch 3.9.)	74
Tabelle 40 Häufigkeit des Stop Codons und der stillen Mutation nach der Auswertung der Pyrogramme (Versuch 3.9.).....	75
Tabelle 41 Übersicht der seltenen Mutationen (Versuch 3.9.).....	76
Tabelle 42 Ergebnisse (Versuch 3.10.).....	77
Tabelle 43 Übersicht der Primärtumore mit vorbekanntem BRAF-Mutationsstatus und Bezeichnung aus den Vorversuchen.....	80
Tabelle 44 Einteilung der Ergebnisse des Bioanalyzers (Versuch 3.11.).....	80
Tabelle 45 Einteilung der verwertbaren Ergebnisse der Pyrosequenzierung (Versuch 3.11.)	82
Tabelle 46 Ergebnisse von MM-I (Versuch 3.11.).....	84
Tabelle 47 Ergebnisse von MM-II (Versuch 3.11.)	85
Tabelle 48 Ergebnisse von MM-III (Versuch 3.11.).....	86
Tabelle 49 Ergebnisse von MM-IV (Versuch 3.11.).....	87
Tabelle 50 Ergebnisse von MM-V (Versuch 3.11.).....	88
Tabelle 51 Ergebnisse von MM-VI (Versuch 3.11.).....	89
Tabelle 52 Ergebnisse von MM-VII (Versuch 3.11.).....	90

6. Verzeichnis

<i>Tabelle 53 Ergebnisse von MM-VIII (Versuch 3.11.)</i>	91
<i>Tabelle 54 Ergebnisse von MM-IX (Versuch 3.11.)</i>	92
<i>Tabelle 55 Ergebnisse von MM-X (Versuch 3.11.)</i>	93
<i>Tabelle 56 Ergebnisse von MM-XI (Versuch 3.11.)</i>	94
<i>Tabelle 57 Ergebnisse von MM-XII (Versuch 3.11.)</i>	95
<i>Tabelle 58 Übersicht der Ergebnisse (Versuch 3.11.)</i>	98
<i>Tabelle 59 Vergleich der Mutationsanalysen der Primärtumore zwischen vorbekanntem Mutationsstatus und den Ergebnissen der Pyrosequenzierung der Hauptveruche (Probengewinnung durch Lasermikrodissektion), eingeteilt in Wildtyp, BRAF-V600E-Mutation und sonstige Mutationen (insbesondere BRAF-V600K-Mutation)</i>	99
<i>Tabelle 60 Zusammenfassung der Mutationsanalysen (M= Mutation, SC = Stop Codon, uM = ungewöhnliche Mutation) (Versuch 3.11.)</i>	100
<i>Tabelle 61 Mutationen mit entsprechender Häufigkeit (Versuch 3.11.)</i>	100
<i>Tabelle 62 seltene Mutationen (Versuch 3.11.)</i>	101
<i>Tabelle 63 Ergebnisse unter Einbeziehung der Färbungsintensität der HMB45-Färbung (Versuch 3.12.)</i>	102
<i>Tabelle 64 seltene Mutationen</i>	105
<i>Tabelle 65 Übersicht in allen Versuchen vorkommenden seltenen und ungewöhnlichen Mutationen</i>	118

6.3. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 „Mitogen activated proteinkinase pathway“ Abbildung übernommen aus [20].....	17
Abbildung 2 Häufigkeitsverteilung der BRAF-Mutationstypen im Melanom, Abbildung übernommen aus [27]	17
Abbildung 3 BRAF- und MEK-Inhibitorthherapie, Abbildung übernommen aus [20].....	19
Abbildung 4 Schema der intratumoralen Homogenität (links) und Heterogenität (rechts).....	20
Abbildung 5 Arbeitsplatz mit Lasermikrodissektionsgerät und Computer.....	25
Abbildung 6 Verdau der Proteinase K (Diagramm erstellt in Anlehnung an das Diagramm der Arbeitsschritte des Thermocycler Applied Biosystem Veriti 96 Well Thermal Cycler)	28
Abbildung 7 Bioanalyser mit speziellem Einsatz für den DNA-Chip und DNA-Chip.....	34
Abbildung 8 Bioanalyser Chip, aus der Anleitung Agilent DNA 1000 it Quick Start Guide, ISBN: G2938-90015 http://www.interchim.fr/ft/B/BZ9480.pdf aus der Anleitung Agilent DNA 1000 Kit Quick Start Guide, http://www.interchim.fr/ft/B/BZ9480.pdf	35
Abbildung 9 Analyse des Bioanalyzers: Ladder.....	36
Abbildung 10 Analyse des Bioanalyzers: auswertbares Amplifikat	36
Abbildung 11 Analyse des Bioanalyzers: Primer Dimer	37
Abbildung 12 Pyrosequenzierungsgerät und Arbeitsstation	39
Abbildung 13 Arbeitsstation mit Wannen	39
Abbildung 14 Maske, fotografiert aus dem Computerprogramm für die Pyrosequenzierung	40
Abbildung 15 abfotografiert aus dem Computerprogramm für die Pyrosequenzierung, es stellt die Beschriftung der Kartusche dar und dient der genauen Anordnung der Reagenzien in die jeweilige Kammer. Die Buchstaben stehen für das zu pipettierende Reagenz (E = Enzymgemisch, S = Substratgemisch; Nukleotidlösungen: A = Adenosin= dATPalphaS, T = Thymidin = dTTP, C = Cytidin = dCTP, G = Guanosin = dGTP).....	42
Abbildung 16 Schematische Darstellung der Pyrosequenzierungskaskade, (aus dem Handbuch „PyroMark Gold 24 Reagents“, REF: 971802, HB: 1057419DE).....	43
Abbildung 17 Pyrogramm eines Wildtyps, A = 0, 0% mutierte Allele.....	44
Abbildung 18 Pyrogramm einer BRAF-V600E-Mutation, A = 20, 20% mutierte Allele	44
Abbildung 19 Pyrogramm einer BRAF-V600E-Mutation, A = 50, 50% mutierte Allele	44
Abbildung 20 Pyrogramm einer BRAF-V600E-Mutation, A = 80, 80% mutierte Allele	45
Abbildung 21 Pyrogramm einer BRAF-V600E-Mutation, A = 100, 100% mutierte Allele	45
Abbildung 22 Pyrogramm einer BRAF-V600K-Mutation, 100 % mutierte Allele	45
Abbildung 23 Pyrogramm eines Stop Codon und stille Mutation	46
Abbildung 24 mikroskopische Ansicht einzeln ausgewählter Zellen, fotodokumentiert während der Arbeit am Lasermikrodissektionsgerät.....	55
Abbildung 25 mikroskopische Ansicht eines ausgewählten Areals, fotodokumentiert während der Arbeit am Lasermikrodissektionsgerät.....	56
Abbildung 26 Erklärung der nachfolgenden Tabelle zu Versuch 3.7.	66
Abbildung 27 Erklärung der nachfolgenden Tabelle (Versuch 3.9.)	73
Abbildung 28 Erklärung der nachfolgenden Tabelle (Versuch 3.10.)	77
Abbildung 29 Übersicht der histologischen Schnitte MM-I bis MM-XII	81
Abbildung 30 Erklärung der Einteilung in Gebiete und Regionen im Primärtumor MM-I (Versuch 3.11.)	82
Abbildung 31 Legende für die Auswertung der Primärtumore (Versuch 3.11.)	83
Abbildung 32 Erklärung der nachfolgenden Tabellen für den Hauptversuch (Versuch 3.11.).....	83
Abbildung 33 MM-I: tabellarische Ergebnisse und Topographie im korrespondierenden histologischen Schnitt, Legende (Versuch 3.11.)	84
Abbildung 34 MM-II: tabellarische Ergebnisse und Topographie im korrespondierenden histologischen Schnitt, Legende (Versuch 3.11.)	85
Abbildung 35 MM-III: tabellarische Ergebnisse und Topographie im korrespondierenden histologischen Schnitt, Legende (Versuch 3.11.)	86
Abbildung 36 MM-IV: tabellarische Ergebnisse und Topographie im korrespondierenden histologischen Schnitt, Legende (Versuch 3.11.)	87
Abbildung 37 MM-V: tabellarische Ergebnisse und Topographie im korrespondierenden histologischen Schnitt, Legende (Versuch 3.11.)	88
Abbildung 38 MM-VI: tabellarische Ergebnisse und Topographie im korrespondierenden histologischen Schnitt, Legende (Versuch 3.11.)	89
Abbildung 39 MM-VII: tabellarische Ergebnisse und Topographie im korrespondierenden histologischen Schnitt, Legende (Versuch 3.11.)	90
Abbildung 40 MM-VIII: tabellarische Ergebnisse und Topographie im korrespondierenden histologischen Schnitt, Legende (Versuch 3.11.)	91

6. Verzeichnis

<i>Abbildung 41 MM-LX: tabellarische Ergebnisse und Topographie im korrespondierenden histologischen Schnitt, Legende (Versuch 3.11.)</i>	92
<i>Abbildung 42 MM-X: tabellarische Ergebnisse und Topographie im korrespondierenden histologischen Schnitt, Legende (Versuch 3.11.)</i>	93
<i>Abbildung 43 MM-XI: tabellarische Ergebnisse und Topographie im korrespondierenden histologischen Schnitt, Legende (Versuch 3.11.)</i>	94
<i>Abbildung 44 MM-XII: tabellarische Ergebnisse und Topographie im korrespondierenden histologischen Schnitt, Legende (Versuch 3.11.)</i>	95
<i>Abbildung 45 Übersicht der histologischen Schnitte MM-I bis -XII mit den Ergebnissen topographisch angeordnet</i>	96
<i>Abbildung 46 Übersicht der histologischen Schnitte MM-I bis MM-XII mit den Ergebnissen, eingeteilt in „verwertbar“ (ausreichend Amplifikat für eine DNA-Analyse vorhanden) und „nicht verwertbar“ (nicht ausreichend Amplifikat für eine DNA-Analyse vorhanden), topographisch angeordnet</i>	111
<i>Abbildung 47 Übersicht der histologischen Schnitte MM-I bis MM-XII mit den Ergebnissen der Mutationsanalysen topographisch angeordnet ohne Darstellung der nicht verwertbaren Ergebnisse</i>	112
<i>Abbildung 48 Primärtumor MM-I: untersuchte Gebiete und Regionen mikroskopisch vergrößert mit den Ergebnissen der Mutationsanalysen dargestellt</i>	115
<i>Abbildung 49 Primärtumor MM-III: untersuchte Gebiete und Regionen mikroskopisch vergrößert mit den Ergebnissen der Mutationsanalysen dargestellt</i>	116
<i>Abbildung 50 Primärtumor MM-IV: untersuchte Gebiete und Regionen mikroskopisch vergrößert mit den Ergebnissen der Mutationsanalysen dargestellt</i>	117
<i>Abbildung 51 Übersicht der histologischen Schnitte der BRAF-V600E mutierten Primärtumore MM-III, MM-VIII und MM-XI mit den Ergebnissen der Mutationsanalysen, bei denen die BRAF-V600E-Mutation nicht nachgewiesen wurde, topographisch angeordnet</i>	119

6.4. Abkürzungsverzeichnis

<u>Abkürzung</u>	<u>Erklärung</u>
A	Adenosin
AJCC	American Joint Committee on Cancer)
ALM	Akrolentiginöses Melanom
Bcc	Basalzellkarzinom
bp	Basenpaare
BRAF	v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B
C	Cytidin
c.a.	circa
c-kit	Tyrosinaskinase Kit
CT	Computertomographie
CTLA-4	Zytotoxische T-Lymphozyten-assoziierte Antigen
°C	Grad Celsius
D	Aspartatsäure
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribunukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dtsch.	deutsch
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E	Glutamat
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid
EGF	epidermal growth factor
engl.	englisch
ERK	extracellular signal-regulated kinase
et al.	et alii
FFPE	Formalin-fixierte in Paraffin-eingebettete Präparate
G	Guanosin
GNA11	guanin nucleotide binding protein subnit alpha-11
GNAQ	guanin nucleotide-binding protein subnit alpha-Q
HCL	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
HMB45	Human Melanoma Black 45

6. Verzeichnis

H ₂ O	Wasser
Ig	Immunglobulin
K	Lysin
LDH	Laktatdehydrogenase
LMM	Lentigo-maligna-Melanom
L-Klassifikation	Lymphgefäßeinbrüche, Lymphangiosis melanomatosa
M	Leucin
MAP	mitogen activated protein
MART 1	melanoma antigen recognized by T cells 1
MEK	mitogen-activated protein kinase
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
µm	Mikrometer
min	Minute
mind.	mindestens
MITF	microphthalmia-associated transcription factor
MM	Malignes Melanom
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
MRT	Magnetresonanztomographie
ng	Nanogramm
NM	Noduläres/ Knotiges Melanom
Nr	Nummer
NRAS	neuroblastoma rat sarcoma
PD	Primer Dimer
PD-1	Programm Cell Death Protein 1
pH	potentia Hydrogenii
Pn-Klassifikation	perineurale Invasion
SSM	Superfiziell spreitendes Melanom
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PET/CT	Positronen-Emissions-Tomographie/ Computertomographie
R	Arginin

RAF	rapidly accelerated fibrosarcoma
RAS	rat sarcoma
rpm, bpm	Revolutions per minute, beats per minute
SC	Stop Codon und Stille Mutation
T	Thymidin
TAQ-Polymerase	thermus aquaticus polymerase
TNM	tumor – node – metastasis
UICC	Union internationale contre le cancer
usw.	und so weiter
UV	Ultraviolett
V	Valin
V-Klassifikation	Gefäß-Invasion
WHO	World Health Organisation
z.B.	zum Beispiel
ZZ	Zellzahl

7. Anhang

7.1. Danksagung

Mein ganz besonderer Dank richtet sich an meinen Doktorvater Herrn Professor Dr. med. Michael Flaig für die Übertragung der spannenden Fragestellung dieser Arbeit, die geduldige Betreuung und hilfreiche Unterstützung bei der Durchführung und Fertigstellung.

Meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. rer. nat. Andreas Jung danke ich, dass er mir die Arbeit am Pathologischen Institut der Ludwig-Maximilian-Universität München ermöglicht hat.

Insbesondere möchte ich Frau Ursula Puchta für die Einarbeitung, die Hilfestellung und das herzliche Engagement bei der Durchführung der experimentellen Arbeit im Labor danken.

Ich bedanke mich bei allen, die mich bei dieser Arbeit motiviert und unterstützt haben.

7.2. Eidesstattliche Versicherung

Eidesstattliche Versicherung

Donhauser, Charlotte Karin

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel
Experimentelle Untersuchung zur Tumorzellheterogenität im Melanom anhand der BRAF-V600-Mutationsfrequenz

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 14.05.2022

Ort, Datum

Charlotte Donhauser

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand