

Technische Universität München

Klinik und Poliklinik für Dermatologie
und Allergologie am Biederstein
Klinikum rechts der Isar

Immunhistochemische Untersuchungen von Melanompräparaten mit MTAP, TFPI-2 und SOCS-3 als neue prognostische Marker oder Risikofaktoren

Florian Felix Pfaller

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ. - Prof. Dr. D. Neumeier
Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. R. Hein
2. Univ. - Prof. Dr. J. Schlegel

Die Dissertation wurde am 07. 04. 2011 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 26. 10. 2011 angenommen.

meinen Eltern gewidmet

| Inhaltsverzeichnis | Seite |
|---|--------------|
| Verzeichnis der Abbildungen | V |
| Verzeichnis der Tabellen | VII |
| Verzeichnis der Abkürzungen | VIII |
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1. Malignes Melanom | 1 |
| 1.1.1. Definition | 1 |
| 1.1.2. Epidemiologie | 1 |
| 1.1.3. Klinische Subtypen und histopathologische Progressionsformen | 2 |
| 1.1.4. Klinische Diagnose des malignen Melanoms | 5 |
| 1.2. Embryonaler Ursprung der Melanozyten | 6 |
| 1.3. Immunhistochemische Untersuchungen von Melanompräparaten | 7 |
| 1.3.1. Molekulare Grundlagen zur Entstehung von Melanomen | 7 |
| 1.3.2. MTAP | 10 |
| 1.3.3. Der SOCS–3 Zytokinsuppressor | 10 |
| 1.3.4. TFPI–2 | 11 |
| 2. Material und Methoden | 14 |
| 2.1. Untersuchungsmaterial | 14 |
| 2.2. Benötigte Materialien | 14 |
| 2.2.1. Geräte | 14 |
| 2.2.2. Reagenzien | 15 |
| 2.3. Immunhistochemie | 17 |
| 2.3.1. Labelled StreptAvidin Biotin (LSAB) – Methode | 17 |
| 2.3.2. Aufbereitung der Gewebeprouen | 18 |
| 2.3.3. Färbeverfahren SOCS–3, MTAP, TFPI–2 | 18 |
| 2.3.4. Färbeverfahren HMB–45 | 21 |
| 2.4. Auswertung der Färbeergebnisse | 23 |
| 3. Ergebnisse | 24 |
| 3.1. Immunhistochemische Untersuchungsergebnisse | 24 |
| 3.1.1. Definition des Untersuchungsmaterials | 24 |
| 3.1.2. Breslow – Index in Abhängigkeit des Tumors | 26 |

| | |
|---|-----------|
| 3.1.3. Übereinstimmung der Marker | 29 |
| 3.1.4. Expression von TFPI-2, SOCS-3 und MTAP in Melanomzelllinien | 30 |
| 3.2. Auswertung der Kontrollfärbung | 37 |
| 3.3. Qualitätsparameter für MTAP, SOCS-3 und TFPI-2 | 46 |
| 4. Diskussion | 47 |
| 5. Zusammenfassung | 56 |
| 6. Literaturverzeichnis | 58 |
| Danksagung | 67 |
| Curriculum Vitae | 68 |

Verzeichnis der Abbildungen

Seite

| | | |
|---------|---|----|
| Abb. 1 | Infiltration der Melanomzellen in verschiedene Gewebeschichten zu unterschiedlichen Wachstumsphasen | 4 |
| Abb. 2 | Histopathologische Kriterien zur Diagnose des malignen Melanoms | 6 |
| Abb. 3 | Veränderung der DNS durch Methylierung | 13 |
| Abb. 4 | Graphische Darstellung der Messwerte für Primärtumore (Tumordicke/HMB-45) | 26 |
| Abb. 5 | Graphische Darstellung der Messwerte für Primärtumore (Tumordicke/TFPI-2) | 26 |
| Abb. 6 | Graphische Darstellung der Messwerte für Primärtumore (Tumordicke/SOCS-3) | 26 |
| Abb. 7 | Graphische Darstellung der Messwerte für Primärtumore (Tumordicke/MTAP) | 26 |
| Abb. 8 | Graphische Darstellung der Messwerte für alle Gewebeproben (Tumordicke/MTAP, SOCS-3) | 27 |
| Abb. 9 | Graphische Darstellung der Messwerte für alle Gewebeproben (Tumordicke/TFPI-2, HMB-45) | 28 |
| Abb. 10 | Noduläres Melanom, pos. Reaktion MTAP | 30 |
| Abb. 11 | Superfiziell spreit. Melanom, pos. Reaktion MTAP | 31 |
| Abb. 12 | Superfiziell spreit. Melanom, pos. Reaktion MTAP | 31 |
| Abb. 13 | Noduläres Melanom, pos. Reaktion TFPI-2 | 32 |
| Abb. 14 | Noduläres Melanom, pos. Reaktion SOCS-3 | 32 |
| Abb. 15 | Noduläres Melanom kutane Metastase, pos. Reaktion SOCS-3 | 33 |
| Abb. 16 | Noduläres Melanom kutane Metastase, pos. Reaktion MTAP | 33 |
| Abb. 17 | Noduläres Melanom kutane Metastase, pos. Reaktion TFPI-2 | 34 |
| Abb. 18 | Noduläres Melanom kutane Metastase, pos. Reaktion MTAP | 34 |
| Abb. 19 | Noduläres Melanom kutane Metastase, pos. Reaktion SOCS-3 | 35 |
| Abb. 20 | Lymphknoten superfiziell spreit. Melanom, pos. Reaktion MTAP | 35 |
| Abb. 21 | Lymphknoten noduläres Melanom, pos. Reaktion TFPI-2 | 36 |
| Abb. 22 | Basalzellkarzinom, pos. Reaktion SOCS-3 | 38 |
| Abb. 23 | Basalzellkarzinom, pos. Reaktion SOCS-3 | 38 |
| Abb. 24 | Nävuszellgewebe, pos. Reaktion SOCS-3 | 39 |

| | | |
|---------|--|----|
| Abb. 25 | Nävuszellgewebe, pos. Reaktion SOCS-3 | 39 |
| Abb. 26 | Nävuszellgewebe, neg. Reaktion TFPI-2 | 40 |
| Abb. 27 | Nävuszellgewebe, pos. Reaktion TFPI-2 | 40 |
| Abb. 28 | Spinalzellkarzinom, pos. Reaktion SOCS-3 | 41 |
| Abb. 29 | Spinalzellkarzinom, pos. Reaktion TFPI-2 | 41 |
| Abb. 30 | Spinalzellkarzinom, pos. Reaktion SOCS-3 | 42 |
| Abb. 31 | Spinalzellkarzinom, pos. Reaktion TFPI-2 | 42 |
| Abb. 32 | Spinalzellkarzinom, pos. Reaktion SOCS-3 | 43 |
| Abb. 33 | Nävuszellgewebe, pos. Reaktion HMB-45 | 43 |
| Abb. 34 | Nävuszellgewebe, pos. Reaktion HMB-45 | 44 |
| Abb. 35 | Nävuszellgewebe, neg. Reaktion HMB-45 | 44 |

| Verzeichnis der Tabellen | | Seite |
|---------------------------------|---|--------------|
| Tab. 1 | Klinische Subtypen des malignen Melanoms | 3 |
| Tab. 2 | Übersicht der verwendeten Primärantikörper | 15 |
| Tab. 3 | Altersverteilung nach Geschlechtern getrennt und im Gesamtkollektiv | 23 |
| Tab. 4 | Altersverteilung in Abhängigkeit der untersuchten Gewebeproben | 24 |
| Tab. 5 | Invasionstiefe in Abhängigkeit zum Patientenalter | 24 |
| Tab. 6 | Breslow–Index in Abhängigkeit des Tumors | 25 |
| Tab. 7 | Ausprägung des Färbegrades für Primärtumore und Breslow–Index getrennt nach Antikörper | 25 |
| Tab. 8 | Absolute und prozentuale Übereinstimmung für die untersuchten Gewebetypen | 29 |
| Tab. 9 | Intensität der Markerfärbung in den untersuchten Gewebeproben | 29 |
| Tab. 10 | Absolute und prozentuale Übereinstimmung für die Gruppe der Kontrollgewebe | 37 |
| Tab. 11 | Ausprägung der niedrigsten Markerfärbung in den untersuchten Gewebeproben | 50 |

Verzeichnis der Abkürzungen

| | |
|------------|---|
| Abb. | Abbildung |
| ABCD–Regel | Asymmetrie, Begrenzung, Farbabweichungen, Durchmesser |
| AK | Antikörper |
| ALM | akrolentiginöses Melanom |
| AP | alkalische Phosphatase |
| bFGF | basic fibroblast growth factor |
| bez. | bezüglich |
| ca. | circa |
| CIMP | CpG island methylator phenotype |
| CIS | cytokine inducible SH2 containing protein |
| CpG | cytosine phosphodiester guanine |
| CT | Computertomographie |
| DNS | Desoxyribonucleinsäure |
| ECM | extrazelluläre Matrix |
| EGF | epidermal growth factor |
| FAK | focal adhesion kinase |
| g | Gramm |
| GK | Gesamtkollektiv N = 40 |
| HEM | human epidermal melanocyte |
| IL | Interleukin |
| JAK | Janus kinase |
| lat. | lateinisch |
| LMM | Lentigo Maligna Melanom |
| max. | maximal |
| MGSA/GRO | melanoma growth stimulatory activity/growth regulated protein |
| MIA | Melanoma Inhibitory Activity |
| min. | Minute |
| mm | Millimeter |
| MM | Malignes Melanom |
| MMP | Matrix–Metalloproteinasen |
| MRT | Magnetresonanztomographie |

| | |
|--------|--|
| MSPI | matrix-associated serine protease inhibitor |
| MTAP | methythioadenosin phosphorylase |
| MZ | Manifestationszeit |
| NCC | neural crest cells |
| nm | Nanometer |
| NM | noduläres Melanom |
| NZN | Nävus-Zell-Nävus |
| PBS | phosphat buffered salin |
| PDGF | platelet derived growth factor |
| PET | Positronen-Emissions Tomographie |
| PP5 | placental protein 5 |
| RGP | radial growth phase |
| s. | siehe |
| S. | Seite |
| SCC | squamous cell carcinoma |
| SCP | schwann cell precursor |
| sog. | so genannt |
| SOCS | suppressor of cytokine signaling |
| SSM | superfiziell spreitendes Melanom |
| STAT | signal transducer and activator of transcription |
| Tab. | Tabelle |
| TFPI-2 | tissue factor pathway inhibitor 2 |
| TGF | transforming growth factor |
| u.a. | unter anderem |
| VEGF | vascular endothelial growth factor |
| VGP | vertical growth phase |
| z. B. | zum Beispiel |

1. Einleitung

1.1. Malignes Melanom

1.1.1. Definition

Das Maligne Melanom (MM), auch schwarzer Hautkrebs genannt, geht von den pigmentbildenden Zellen, den sogenannten Melanozyten aus und manifestiert sich vornehmlich an der Haut. Daneben existieren andere, nicht melanozytäre Hautkrebsformen. Es gibt verschiedene Arten des Melanoms, z.B. das Aderhaut Melanom oder das Melanom an Schleimhäuten unterschiedlicher Lokalisation, die gewebespezifische Besonderheiten aufweisen. Neben zumeist stark pigmentierten Formen finden sich seltener auch amelanotische Ausprägungen. Verantwortlich für die hohe Mortalität ist die Tatsache, dass das MM bereits in frühem Stadium dazu neigt, Metastasen über Blut- und Lymphbahnen zu streuen. Diese Gegebenheit beschreibt eine ungünstige Prognose im weiteren Krankheitsverlauf und macht es zu einem besonders gefährlichen Vertreter im Kreise der malignen Tumorarten (Garbe, 2007).

1.1.2. Epidemiologie

Der schwarze Hautkrebs hat in seiner Gesamtheit seit einigen Jahrzehnten im Vergleich von beispielsweise bösartigen Erkrankungen des lymphatischen Systems stark zugenommen und tritt etwa doppelt so häufig auf wie die Gruppe der B – Zell Neoplasien (Lymphome). In der hellhäutigen Bevölkerung verzeichnete man während der letzten 30–40 Jahre einen starken Anstieg der Melanominzidenz. Australien und Neuseeland führen mit 40–60 Fällen pro 100.000 Einwohner die Liste der Neuerkrankungen an, gefolgt von den USA und Europa. Während in Mitteleuropa im letzten Jahrzehnt zwischen 14 und 16 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner gemessen wurden, waren es in Bayern an die 20 bis 24 auf 100.000 gerechnet (Garbe, Peris et al., 2009), (Umwelt und Gesundheit aktuell, 2010).

Im Geburtsjahrgang 2000 wurde das Erkrankungsrisiko in Deutschland noch mit 1:75 angegeben mit einem Verhältnis von Frauen zu Männern von 6:4. Mit einem jährlichen Zuwachs an Erkrankungen zwischen 3 % und 7% bei der hellhäutigen Bevölkerung ist zu

rechnen. Ungefähr die Hälfte der Patienten ist jünger als 50 Jahre. Es erkrankten etwa 15.000 Menschen an dieser Krebsform mit ca. 2.000 Todesfällen in Deutschland pro Jahr. Betrachtet man die Entstehung des MM, so beschreibt die Anzahl kongenitaler, multipler und/oder atypischer (dysplastischer) Nävi (lat. naevus = Muttermal) den wichtigsten, unabhängigen Risikofaktor mit einem fast linearen Kurvenverlauf von steigender Nävizahl zu höherem Erkrankungsrisiko (Bauer and Garbe, 2003). Ein grundlegender Umweltfaktor, der die Entwicklung von melanozytären Nävi (NZN) und anschließend die Entstehung kutaner Melanome entscheidend begünstigt, ist im Sonnenlicht zu suchen (Tsao, Atkins et al., 2004). Seit den 20`er Jahren nahm weltweit der Trend sich bewußt zu Bräunungszwecken der Sonne auszusetzen, stetig zu, u.a. durch die französische Designerin Coco Chanel, die durch einen freizügigeren Bekleidungsstil eine neue Art von Freizeitkultur begründete (Gilchrest, 1999).

Hinsichtlich der intermittierenden und hohen UV-Exposition und der Entwicklung von NZN spielen vor allem der Hauttyp, Haar- und Augenfarbe und wiederholte Sonnenbrände in jungen Jahren abhängig von der individuellen Sonnenempfindlichkeit, die Hauptrolle (Bliss, Ford et al., 1995). Nicht nur UV-B Strahlen im Spektralbereich 290–320 nm, sondern auch die vor allem unter künstlichem Sonnenlicht vorkommenden UV-A Strahlen (320–400 nm) können das Auftreten von Melanomen begünstigen (Jhappan, Noonan et al., 2003). Desweiteren wird als Risiko für die Entstehung des MM eine positive Familienanamnese angenommen mit einer Wahrscheinlichkeit von 5–10% und multifaktoriellem Vererbungsmuster (de Snoo, Kroon et al. 2007). Neben chemischen Noxen und immunologischen Defekten werden auch das Alter der Patienten, die genotypische Zugehörigkeit und eventuelle maligne Vorerkrankungen als prädispositionelle Faktoren diskutiert (Sober, Kang et al., 1992).

1.1.3. Klinische Subtypen und histopathologische Progressionsformen

Die WHO unterscheidet in ihrer Einteilung von Hauttumoren vier verschiedene Subtypen des Melanoms (s. Tab. 1) hinsichtlich der Art des Wachstums und der Lokalisation am menschlichen Körper (LeBoit PE, 2006). Basierend auf der Sydney Klassifikation von 1986 werden hierbei das superfiziell spreitende Melanom (SSM), das noduläre Melanom (NM), ein Lentigo Maligna Melanom (LMM) und das akrolentiginöse Melanom (ALM) beschrieben (McGovern, Mihm et al., 1973).

Diese Einteilung mag die Lokalisation am menschlichen Körper berücksichtigen, die Geschwindigkeit des Tumorwachstums oder das Patientenalter, jedoch stößt sie klinisch schnell an ihre Grenzen in der Betrachtung von allgemeiner Überlebenszeit und dem Ansprechen auf bestimmte Therapieansätze, wenn gleiche Infiltrationstiefe oder Tumordicke vorliegen oder bereits Metastasen gesetzt wurden (Balch, Buzaid et al., 2000).

Tab. 1: Klinische Subtypen des Malignen Melanoms, (Garbe, Peris et al., 2009 – mit Modifikationen)

| Subtyp | Lokalisation | Häufigkeit (%) | Beschreibung |
|------------|---------------------|----------------|---|
| SSM | Rumpf, Beine | 70 | intraepidermal, horizontale oder radiäre Wachstumsphase; maligne Melanozyten in der gesamten Epidermis ca. 1–6 Jahre Manifestationszeit (MZ) |
| NM | Rumpf, Beine | 25 | nodulär exophytisch, blutet leicht, aggressives, vertikales Wachstum, intraepidermal, im frühen Stadium nicht diagnostizierbar ca. 5–19 Monate MZ |
| LMM | Gesicht, Nacken | 15 | „in situ“ Melanom durch chronische Sonnenexposition. Solare Elastose; atypische Melanozyten an der Übergangszone Epidermis–Dermis ältere Patienten, radiäres Wachstum ca. 3–16 Jahre MZ |
| ALM | palmoplantar, Nägel | 5 | anfangs schwach pigmentiert, dann noduläres, invasives Wachstumsmuster ca. 1–6 Jahre MZ |

Diese Klassifikation wurde nun erweitert, um Wachstumstendenzen abhängig von histomorphologischen Faktoren und genetischen Veränderungen berücksichtigen zu können und um den Ort des Primärtumors besser zu beschreiben, als es durch die bisherige Charakteristik der Melanomtypen möglich war (Curtin, Fridlyand et al., 2005). Chromosomale Aberrationen und Mutationen in bestimmten für den schwarzen Hautkrebs bekannten Onkogenen wie beispielsweise BRAF (V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1), KIT (CD117 = C-kit receptor) oder NRAS (Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog) ermöglichen eine feinere Differenzierung klinischer Subtypen von Melanomen, die spontan entstanden sind ohne Nachweis eines vorangegangenen

Hautschadens durch chronische Sonnenexposition, und von Melanomen mit durch Sonnenlicht induzierter Malignität (Viros, Fridlyand et al., 2008).

Histopathologische Faktoren umfassen die Verteilung intraepidermaler Melanozyten über der Basalmembran, deren Gruppierung in Nestformation, den Pigmentierungsgrad, die Kontur der Epidermis bzgl. einer radiären Wachstumsphase der Pigmentzellen, laterale Umschreibung der Tumorperipherie, solare Elastose und die Größe und Gestalt von Zellen und Zellkernen. Daneben spielen noch der Grad der Ulzeration als z.B. reaktive Hyperplasie der den Tumor umgebenden Epidermis und die Tumordicke nach Breslow eine entscheidende Rolle (Spatz, Cook et al., 2003), (Breslow, 1970).

Versucht man nun die Entstehung eines Melanoms zu analysieren, so kann man sich den Ablauf am besten anhand eines Stufenmodells (s. Abb. 1) erklären, wobei an erster Stelle sich Melanozyten mit Kern- und Zellatypien entlang der Basalzellschicht vermehren. Mit der Transformation und Ausbreitung der Pigmentzellen horizontal (radial growth phase = RGP) und in höhere Schichten der Epidermis folgen dann auf klinisch unauffälliger Haut oder innerhalb eines bereits vorhandenen Nävus, unregelmäßiges Wachstum und weitere zelluläre Atypien. Diese Phase wird noch nicht mit progressivem Wachstum assoziiert (Guerry, Synnestvedt et al., 1993), allerdings wird gerade in diesem Anfangsstadium der vorher erwähnten Mutation von BRAF und Onkogenen erhöhte Wichtigkeit zugeschrieben (Viros, Fridlyand et al., 2008).

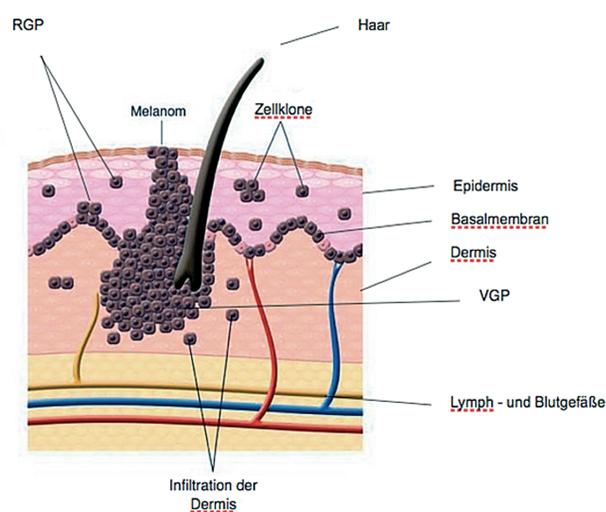


Abb. 1: Infiltration der Melanomzellen in verschiedene Gewebeschichten zu unterschiedlichen Wachstumsphasen (Chudnovsky, Khavari et al., 2005 – mit Modifikationen).

Sollten in einem weiteren Schritt die atypischen Zellen in der Epidermis proliferieren und mit mehreren Einzelzellklonen, unterschiedlicher Pigmentierung und Wachstumsgeschwindigkeit imponieren, kann klinisch ein sogenannter dysplastischer Nävus nach der ABCD–Regel diagnostiziert werden.

Der Zusammenhang zwischen dysplastischem Nävus als Vorläufer und MM wird nach wie vor kontrovers diskutiert, da immerhin mehr als 50% der Melanome wahrscheinlich de novo entstehen (Chin, Merlino et al., 1998). Bezüglich des Wachstums der Tumorzellen in der horizontalen Phase wird der Übergang in die vertikale Phase (vertical growth phase = VGP) als besonders ungünstig mit dramatisch sinkender Überlebenszeit und abnehmender Möglichkeit zur effektiven Behandlung während dieses Stadiums angesehen (Clark, Elder et al., 1984). Innerhalb dieses vertikalen Verlaufs wird zusehends die Dermis infiltriert. Die zunehmende Vaskularisation innerhalb der Läsionen und die Infiltration der Tumorzellen über die Basalmembran hinaus werden für die Entstehung von Tumormetastasen im Organsystem verantwortlich gemacht (Gaggioli and Sahai, 2007).

1.1.4. Klinische Diagnose des Malignen Melanoms

Die Diagnose des MM erfolgt klinisch über die typischen Merkmale wie Asymmetrie, unscharfe Randbegrenzung, Farbunterschiede, Größe von 5 mm Durchmesser und mehr oder nodulärem Wachstum, mit einer Sensitivität von über 70% durch erfahrene Dermatologen (Garbe, Peris et al., 2009). Auflichtmikroskopie oder digitale Auflichtmikroskopie sollte zusätzlich zur Differenzierung der Läsionen oder als follow-up verwendet werden. Damit steigt die Sensitivität auf 89% und die Spezifität auf 79% (Kittler, Pehamberger et al., 2002). Zu differenzieren ist zwischen MM und anderen melanozytären Erscheinungsbildern, atypischen, kongenitalen oder aktinischer Lentigo. Daneben stehen die nicht melanozytären Formen wie seborrhoische Keratose, Hämangiom, Basalzellkarzinom oder SCC (squamous cell carcinoma), einzuteilen in pigmentiert und nicht pigmentiert. Die regelmäßige und in bestimmten Intervallen durchgeführte körperliche Untersuchung bei Patienten mit manifester Diagnose eines MM ist zum Ausschluß weiterer Herde oder Metastasen unerlässlich (Garbe, Paul et al., 2003), da die mittlere Überlebenszeit von Patienten mit Metastasen im Schnitt weniger als ein Jahr beträgt (Rubin and Lawrence, 2009). Nützliche Staging Untersuchungen

beinhalten die Sonographie regionaler Lymphknoten, Röntgen–Thorax, eine abdominale Sonographie mit Becken und Retroperitoneum, sowie weiterführende CT, MRT und/oder PET Diagnostik. Histopathologisch ist nachstehende Checkliste zur weiteren Diagnostik vorgegeben (s. Abb. 2).

Tumordicke in mm (Breslow Index) // **Ulzeration** ja – nein // **Invasionstiefe** (Clark Level) ersetzt durch Mitoseindex bei T1b Melanomen, für kleine MM < 1mm // **Mikrosatelliten** // **seitliche und tiefe Exzisionsränder**;
zusätzlich: Mitoseindex in mm² // **VGP, RGP** // **vaskuläre oder perineurale Beteiligung** // **lymphatische Emboli** // **Dichte des Lymphozyteninfiltrats**;
Patienten mit lokalisiertem Melanom: Tumordicke, Mitoserate und Ulzeration als wichtigste Faktoren;

Abb. 2: Histopathologische Kriterien zur Diagnose des Malignen Melanoms, (Ruiter, Spatz et al., 2002), (Balch, Gershenwald et al., 2009 – mit Modifikationen).

1.2. Embryonaler Ursprung der Melanozyten

Mit ungefähr 800 Zellen/mm³ halten die Melanozyten einen signifikanten Anteil an den Zellen in der Epidermis des erwachsenen Menschen. Melanosomen transportieren den Pigmentstoff Melanin der Melanozyten zu den Keratinozyten. Über die Produktion von Melanin reguliert die Haut den Wärmehaushalt und den Schutz vor Sonnenstrahlung für den menschlichen Körper. Seit längerem ist bekannt, daß die Vorläuferzellen der Melanozyten, die Melanoblasten, aus spät abwandernden Zellen der Neuralleiste (NCC) entstehen. Diese gilt auch als Ursprungsort von Neuronen des enterischen Nervensystems, von Spinalganglienzellen oder Zellen des Nebennierenmarks (Hong and Saint–Jeannet, 2005). Zwei unterschiedliche Entwicklungswege werden in einem neuen Modell beschrieben, das die Differenzierung von Zellen der Neuralleiste zu Melanozyten erklärt: auf dorso–lateralem Weg wandern NCC unter die Epidermis und differenzieren sich zu Melanozyten, während über eine ventro–mediale Abwanderung NCC in die Entwicklung von Neuronen und Glia des peripheren Nervensystems münden. Zusätzlich konnte eine zweite Melanoblastenpopulation in Hühner– und Mäuseembryos identifiziert

werden, die auf Vorläufer Schwann'scher Zellen (SCP) zurückzuführen und eng mit der Entstehung von deren Spinalnerven assoziiert ist (Adameyko, Lallemand et al., 2009). Dies warf die Frage auf, ob diese zweite identifizierte Melanoblastenpopulation auch für Melanozyten in der Haut verantwortlich sein kann und ist insofern entscheidend, als Unterschiede im Malignitätsgrad je nach Herkunft der Melanozyten diskutiert werden. Damit ergeben sich auch neue Therapieansätze, die dem Ursprung der Melanozyten Rechnung tragen sollen.

In früheren Arbeiten und Untersuchungen an einer speziellen Schildkrötenart wurde bereits darauf verwiesen, daß Melanozyten nicht nur in der Haut vorkommen, sondern auch in anderen Organen zu finden sind, wie beispielsweise der Lunge, im Skelettmuskel, im Knochenmark, in Blutgefäßen oder im Fettgewebe. Diese extrakutane Lokalisation der Pigmentzellen nimmt ihren Ursprung in Vorläuferzellen über den ventro–medialen Weg der Neuralleiste (Hou and Takeuchi, 1991).

Es wird angenommen, daß die Verteilung der Melanozyten, insbesondere der Population, die in die Haut einwandert, von Art zu Art unterschiedlich ist. Eine gewisse Multipotenz wird den NCC zugeschrieben, die auf dem ventralen Weg abwandern. Je nach Gewebeart und favorisierenden oder inhibierenden genetischen Faktoren werden Melanoblastenpopulationen stimuliert, die die Bildung von Melanozyten bestimmen (Buac, Xu et al., 2009).

1.3. Immunhistochemische Untersuchungen von Melanompräparaten

1.3.1. Molekulare Grundlagen zur Entstehung von Melanomen

Eine Reihe genetischer Veränderungen ist verantwortlich für die Entstehung maligner Melanome und ihrer histologischen Besonderheiten (Alonso, Ortiz et al., 2004). Betrachtet man die einzelnen Stufen der Tumorentwicklung, so spielen für vermehrte Proliferation und Überleben der Tumorzellen Stimuli eine große Rolle, die durch veränderte Wachstumsfaktoren oder Zytokine beeinflusst sind. Die Zellen werden dadurch z.B. bestimmten Apoptosevorgängen entzogen. Fehlerhafte Genprodukte, die in der Summe bestimmend für geänderte Signaltransduktionen oder auch veränderte Transkriptionsfaktoren wirken, können zusätzlich Tumorzellen ungehemmt proliferieren und überleben lassen. Man unterscheidet Genmutationen, die die Expression von

Onkogenen (gain of function mutations: Wachstumsstimulation der Tumorzellen) bedingen von solchen, die Tumorsuppressorgene inaktivieren (loss of function mutations: bei regelrechter Funktion Unterdrückung des Tumorwachstums), (Ramon y Cajal, Suster et al., 1991).

Um Tumorzellen aus einem Zellverband zu lösen und eine Metastasierung zu bewirken, bedarf es weiterer Faktoren zur Veränderung einer Zelle in ihrem Migrations-, Adhäsions- und Invasionsverhalten (Bogenrieder and Herlyn, 2003).

Hinzu kommen in der Tumorentwicklung zur Unterscheidung von einer nicht betroffenen Zelle im menschlichen Körper noch das Potential zur Neoangiogenese, um ab einer bestimmten Tumorgröße die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen zu sichern (Carmeliet and Jain, 2000), unlimitedes replikatives Potential (Maser and DePinho, 2002) und eine gewisse genomische und epigenetische Instabilität, um die Veränderungen im Zellzyklus und Produktionsverhalten tolerieren zu können und dennoch die Zellteilungsfähigkeit zu erhalten (Sieber, Heinemann et al., 2003).

Zur Aktivierung von Signalwegen in Melanozyten bedarf es der Expression von Rezeptoren auf der Zelloberfläche, die auf Zytokine, Wachstumsfaktoren, andere äußere Einflüsse und auf Faktoren reagieren, die von Nachbarzellen sezerniert werden (Giehl, Nagele et al., 2007). Die Familie der autokrinen Wachstumsfaktoren umfasst beim Melanom unter anderem bFGF, die Interleukine IL-6, IL-8, IL-10, PDGF A und B, sowie MGSA/GRO. PDGF, VEGF, TGF, IL-1 und EGF zählt man beispielsweise zu den parakrinen Wachstumsfaktoren und Zytokinen (Herlyn, 1990). Diese beeinflussen u.a. die Immunantwort und Angiogenese oder aktivieren proteolytische Enzyme.

Im Rahmen veränderter Signaltransduktion, Resistenz gegenüber Apoptose und immunologischen Vorgängen zur zelleigenen Tumorabwehr spielt noch die Gruppe der Chemokine eine große Rolle (Murakami, Cardones et al., 2004). Ihnen und speziell IL-8, einem wichtigen Vertreter dieser Familie, wird über die Beteiligung am Übergang der radiären in die vertikale Wachstumsphase, eine Zunahme des metastatischen Potentials beim Melanom zugeschrieben (Singh, Gutman et al., 1994). Unterliegen Zellen ihrem physiologischen Umbau oder einem pathologischen Prozess, so wirken Proteasen an der Degradation der extrazellulären Matrix (ECM). Beim Melanom findet sich häufig die Expression von Matrix-Metalloproteinasen (MMP) der Formen MMP-1, -2, -9, -13 und MT1-MMP (Vaisanen, Kallioinen et al., 2008). Hierbei wird ihrer erhöhten Sekretion

eine schlechtere Prognose bzw. vermehrtes Metastasierungspotential zugeschrieben (Hofmann, Westphal et al., 2000).

Im Prozess der malignen Transformation verändern Melanozyten ihre Interaktion mit der ECM und benachbarten Zellen über Adhäsionsmoleküle, zu deren Gruppe Genfamilien der Integrine, verschiedene Immunglobuline und einzelne Vertreter der Cadherine gehören. Die vermehrte Expression von beispielsweise N-Cadherin der transformierten Melanozyten begünstigt deren Invasion in die Dermis im Übergang der radiären zur vertikalen Wachstumsphase. Unter normalen homeostatischen Bedingungen kontrollieren Keratinozyten Wachstum und Verhalten von Melanozyten über ein komplexes System von parakrinen Wachstumsfaktoren und Adhäsionsmolekülen der Zellen. Wird dieses empfindliche Gleichgewicht gestört, verändert sich die Kommunikation der Zellen untereinander. Über Downregulation von Rezeptoren, die die Interaktion von Melanozyten mit Keratinozyten steuern, und vermehrter Expression von Signalmolekülen, die eine Verbindung von Melanomzellen und Melanomzellen mit Fibroblasten bestimmen, verschieben sich normale Zellabläufe hin zur Entwicklung maligner Transformation. Den Kontakt zur Basalmembran verlieren Melanozyten durch veränderte Expression der ECM-Integrin Familie, einer Gruppe von Membranproteinen, die eine Anbindung zwischen den Zellen und der ECM über Matrixkomponenten wie Kollagen, Laminin oder Fibronectin ermöglichen. Beeinflussung bestimmter Signalwege und Umbauprozesse des Zytoskelettes als Migrationsvoraussetzung für Zellen, gehören ebenfalls zum Funktionsumfang von Integrinen (Haass, Smalley et al., 2005).

Immunhistochemische Untersuchungen an Melanompräparaten werden an Gewebeproben durchgeführt, die mit Formalin fixiert wurden und in Paraffin eingebettet sind. Einzelne Zellstadien melanozytärer Läsionen werden so zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Tumorentwicklung festgehalten. Melanozytäre Läsionen exprimieren Antigene, gegen die mono- bzw. polyklonale Antikörper in der Diagnostik eingesetzt werden können. Als wichtige Vertreter seien hier kurz das S-100 Protein und HMB-45 genannt. Über spezifische Färbemethoden und Marker können Aussagen über Prognose und vermeintlichen Metastasierungsgrad getroffen werden. MTAP, SOCS-3 und TFPI-2 sollen im Folgenden näher beleuchtet werden auf der in dieser Arbeit durchgeführten experimentellen Suche nach aussagekräftigen Proliferationsmarkern des Malignen Melanoms.

1.3.2. MTAP

MTAP katalysiert die Phosphorylierung von Methylthioadenosin, einem Nebenprodukt in der Synthese von Polyaminen, das als Inhibitor der Polyamin–Aminopropyl– und Methyltransferase fungiert. MTAP findet sich vielfach in normalen Zellen und Gewebetypen (Olopade, Pomykala et al., 1995). Es ist lokalisiert auf Chromosom 9p21 in einem Bereich, der als Tumorsuppressorregion ausgewiesen und speziell beim Malignen Melanom häufigen Deletionen unterworfen ist. Bösartigen Zellen fehlt es oftmals an MTAP Aktivität, wobei diesbezüglich Gen Deletionen auch beim Endometriumkarzinom, Osteosarkom oder in hämatologischen Krebsformen nachgewiesen werden konnten (Garcia–Castellano, Villanueva et al., 2002). Seinen prädiktiven Wert in der Immunhistochemie erhält MTAP durch die Darstellung einer Studie, in der gezeigt wurde, daß die Intensität der Färbung für MTAP vom gutartigen Nävus zu Melanommetastasen hin abnimmt (Behrmann, Wallner et al., 2003). Die Expression von Methylthioadenosin Phosphorylase nimmt zudem direkten Einfluß auf Interferonsignalwege über STAT1, eine Tatsache, die in der Behandlung des Malignen Melanoms seit frühen Therapieansätzen eine große Rolle spielt (Mowen, Tang et al., 2001).

1.3.3. Der SOCS–3 Zytokinsuppressor

Wachstum von Melanozyten und vielen Melanomzellen im frühen Stadium kann durch Zytokine unterbunden werden, wohingegen bei Melanomen in bösartigem und spätem Zustand eine gewisse „Multi–Zytokin–Resistenz“ beobachtet wird (Komyod, Bohm et al., 2007). Die SOCS Familie (suppressors of cytokine signaling) mit ihren Vertretern SOCS–1–7 und CIS inhibiert neben der auf Janus kinase (JAK) basierten Signalvermittlung und den STAT (signal transducer and activator of transcription) Transkriptionsaktivatoren auch FAK (focal adhesion kinase) Signalwege in Zellen und besitzt Tumorsuppressor Qualität (Larsen and Ropke, 2002). Hypermethylierung und damit Veränderung in der Promotorregion des SOCS–3 Gens tritt in zahlreichen bösartigen Neubildungen beim Menschen auf. Die Stilllegung von SOCS–3 via Transkriptionsfaktoren wird mit erhöhter Tumorprogression assoziiert (Tokita, Maesawa et al., 2007). Wird beispielsweise für FAK die Aktivität in der Signalkaskade erhöht über fehlende Suppression, so konnte in Studien bereits in vitro wie in vivo belegt werden,

daß dies zu aggressiverem Zellwachstum und Migrationsverhalten der Melanomzellen beiträgt (Hess, Postovit et al., 2005).

Über die JAK/STAT und FAK basierten Signalwege nehmen vornehmlich SOCS–1 und SOCS–3 Einfluß auf vermehrt malignes Verhalten diverser Tumorentitäten beim Menschen, beispielsweise bei hepatozellulären Karzinomen oder Tumoren des gastroenteralen– oder urogenitalen Traktes (Oshimo, Kuraoka et al., 2004). Dafür ist der veränderte Methylierungsstatus sogenannter CpG Inselgruppen und ihrem CIMP Muster (CpG island methylator phenotype) innerhalb der SOCS–1 und SOCS–3 Promotorregion auf Chromosom 17q25 verantwortlich. In der Pathophysiologie der Melanomentstehung scheint genau dieser Methylierungsprozess der CpG Inseln und ihrer Promotorregionen für TRGs (tumor–related genes) eine große Rolle zu spielen. Dabei sind derzeit u.a. WIF1, CDKN2A, TFPI2, RASSF1A, RARbeta2, SOCS–1, GATA4 und eine Reihe von MINT Gen Loci (methylated in tumor) dem malignen Melanom zugeordnet (Tanemura, Terando et al., 2009). Da für SOCS–1 Expressions– und Methylierungsstatus bereits untersucht sind (Li, Metzke et al., 2004), konzentriert sich diese Arbeit immunhistochemisch auf das Färbeverhalten und damit den Expressionsgrad von SOCS–3.

1.3.4. TFPI-2

Tissue factor pathway inhibitor 2, auch unter dem Namen MSPI (matrix–associated serine protease inhibitor) oder PP5 (placental protein) zu finden, ist ein Serin–Proteinase Inhibitor des sog. Kunitz–Typs, sezerniert von Endothelzellen, Fibroblasten und Muskelzellen des Gefäßsystems in die extrazelluläre Matrix. Er hat die Eigenschaften Plasmin, Trypsin, Chymotrypsin, Cathepsin G und Plasma Kallikrein zu hemmen (Petersen, Sprecher et al., 1996). Da vornehmlich Plasmin an der Aktivierung von Metalloproteinasen beteiligt ist, kann TFPI–2 MMPs hemmen und damit vermehrte Tumorprogression verhindern. MMPs werden mit aggressiverem, malignem Wachstum in Verbindung gebracht (Zucker and Vacirca, 2004), (s. S. 8).

Für verschiedene bösartige Krebsformen, wie Lungenkrebs, Prostata– oder Colonkarzinom, duktales Pankreaskarzinom und Gliome konnte die Tumorsuppressor–Qualität hinsichtlich TFPI–2 bestätigt werden (Konduri, Rao et al. 2001). Auch hier ist es die Inaktivierung in der Promotorregion der CpG Inseln für TFPI–2 auf Chromosom 7q22

über Methylierung, die für oben genannte Tumorformen mit vermehrtem Wachstum in Zusammenhang gebracht wird.

Beschrieben ist TFPI-2 bereits als Tumorsuppressor in der Entstehung und Progression amelanotischer Melanome (Konduri, Tasiou et al., 2000). Zudem konnte man nachweisen, daß die TFPI-2 Expression in Zusammenhang mit UVB Strahlung auf die menschliche Haut steht (Jhappan, Noonan et al., 2003). Da erhöhte Sonnenexposition als Hauptursache für die Entstehung von Hautkrebs gilt, wird angenommen, daß TFPI-2 als Tumorsuppressor und Induktor für Apoptose bei „zellulärem Streß“ und erhöhter UVB Strahlung in HEMs (human epidermal melanocytes) fungiert (Tasiou, Konduri et al., 2001). Für Maligne Melanome steht somit die Inaktivierung der TFPI-2 Gensequenz in engem Zusammenhang mit vermehrtem Migrationsverhalten der Zellen und einem invasiverem Stadium mit hohem Risiko Metastasen zu bilden (Nobeyama, Okochi-Takada et al., 2007). Immunhistochemisch würde von TFPI-2 in der untersuchten Zellreihe je nach Stadium in der Melanomdiagnostik eine deutlichere oder schwächere Färbung zu erwarten sein, bezieht man sich auf Material, das zu unterschiedlichen Zeiten der Tumorprogression entnommen wurde. Um Aussagen zu bestimmten Tendenzen im Malignitätsgrad für TFPI-2 als Biomarker vornehmen zu können, wurden in Paraffin eingebettete, melanozytäre Gewebeproben und Tumormaterial nicht melanozytären Ursprungs von Spinaliomen und Basalzellkarzinomen als Kontrolle zum Vergleich in dieser Arbeit getestet. In Abb. 3 sind die Veränderungen der Methylierung dargestellt, die zur Stilllegung von Gensequenzen führen können.

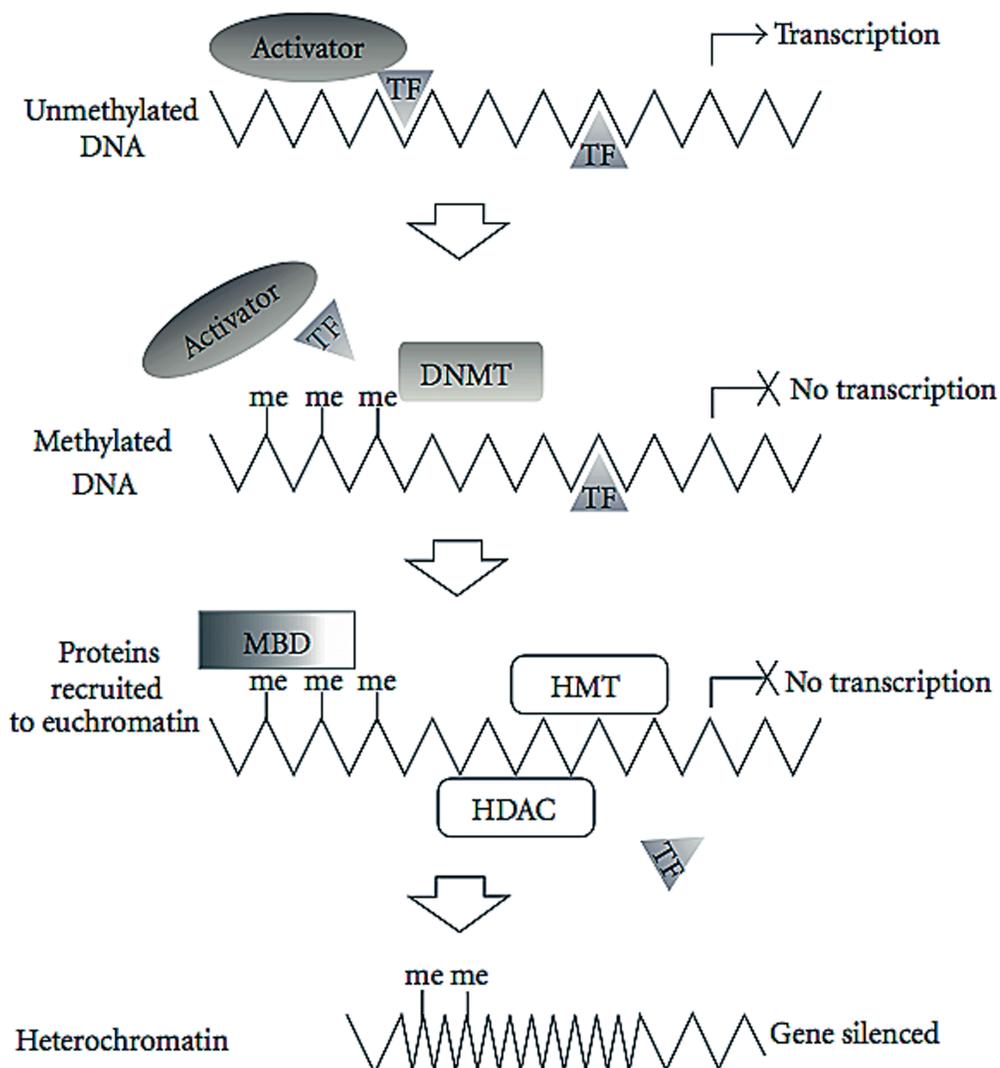


Abb. 3: In unmethyliertem Zustand ist die DNS Aktivatorproteinen und Transkriptionsfaktoren (TF) zugänglich. DNS Methyl-Transferasen (DNMT) verursachen eine sg. sterische Inhibition von Transkriptionskomplexen, die den Vorgang der Transkription als solchen blockieren. MBD (methyl binding domain proteins), HDAC (histone deacetylases) und HMT (histone methyltransferases) erkennen die DNS in methyliertem Zustand (me) und stimulieren eine Neugruppierung von Chromatin. In kondensiertes Chromatin (Heterochromatin) verpackt, resultiert DNS, die nicht mehr übersetzt werden kann, (Gibb, Enfield et al. – mit Modifikationen).

2. Material und Methoden

2.1. Untersuchungsmaterial

Von insgesamt 31 Patienten wurden Gewebepräparate immunhistochemisch untersucht, die aus dem Archiv des dermato–histologischen Labors unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Rüdiger Hein, der Klinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein, der Technischen Universität München stammten. Die Archivpräparate waren jeweils in gepufferter Formaldehydlösung (3,7%) fixiert und in Paraffin eingebettet worden. Es handelte sich um 30 Primärmelanome, sechs infiltrierte Lymphknoten und vier kutane Metastasen aus den Jahren 1998 bis 2007, die im Rahmen der Routinediagnostik begutachtet und befundet worden waren.

2.2. Benötigte Materialien

2.2.1. Geräte

| | |
|------------------------|--|
| Päzisionsmikrotom | Microm HM 355S |
| Brutschrank | Medite TDO50 |
| Kühlschrank | Bosch Standard |
| Mikrowelle | max. 900 Watt |
| Infiltrationsprozessor | Tissue–Tek VIP |
| Färbeautomat | Techmate Horizon Dako |
| Eindeckautomat | Shandon Hyperclean |
| Tauchbecken | Wasserbad 50°C |
| Lichtmikroskop | Zeiss Standard 25, Olympus AX70 |
| Ausgießstation | Leica EG 1150 C |
| Diverse Kleingeräte | Objektträger Menzel SuperFrost® 76x26 mm, Eppendorf Pipettenspitzen, PapPen Stift, Reagenzglasständer, Reaktionsgefäße mit Deckel, Plastikkuvetten, Sahli–Pipetten, Labortücher, Deckgläser, Färbetroge, Messzylinder, Glaspipetten, Labor–Stoppuhr, Kochherd; |

2.2.2. Reagenzien

Citratpuffer; pH 6,0

2,1 g Zitronensäuremonohydrat (Sigma, C7129) in 1.000 ml aqua dest. gelöst, mit NaOH pH-Wert eingestellt. Lösung wird anschließend im Kühlschrank aufbewahrt.

Levamisol – Lösung

Levamisol (Sigma, L9756) hemmt die endogene Aktivität der alkalischen Phosphatase (AP).

Verwendete Antikörper

Die immunhistochemische Anfärbung der Gewebeschnitte erfolgte mit drei monoklonalen und einem polyklonalen Antikörper (s. Tab. 2).

Tab. 2: Übersicht der verwendeten Primärantikörper

| Antikörper | Bezeichnung / Klon | Spezifität | Hersteller |
|-------------------|--------------------------------|---|------------------------------------|
| HMB-45 | Monoklonal / MSG007 | aktive Melanozyten und Melanomzellen | Zytomed Systems GmbH, Berlin |
| SOCS-3 | Monoklonal / C204 | Erythropoetin Rezeptor positive Zellen | IBL Co. Ltd., Japan |
| TFPI-2 | Monoklonal / Clone 243220 | Human TFPI-2 ECM Turnover | R&D Systems, Minneapolis |
| MTAP | Polyklonal / chicken anti-MTAP | exprimiert in normalen Zellreihen und Gewebetypen | Jackson Imm. Research Laboratories |

1. HMB-45 (Mouse anti-Melanosome)

Monospezifischer IgG 1 Maus-Antikörper, vorverdünnt (Zytomed, MSG007, 6 ml)

2. SOCS-3 (Anti-Human CIS3 / SOCS-3 C 204 Rabbit IgG Affinity Purify)

Der Antikörper wurde in 1 ml Lyophilisat gelöst und im Verdünnungsschema 1:10 vorverdünnt mit Dako-Diluent auf 5 µg/ml für die immunhistochemische Färbung verwendet (IBL Co., Ltd Japan).

3. TFPI-2 (Anti-Human TFPI-2 Antibody)

Der Antikörper wurde in 1 ml Lyophilisat (PBS-Puffer) gelöst bei einer Gesamtkonzentration von 500 µg/ml und im Verhältnis 1:10 vorverdünnt mit Dako-Diluent (R&D Systems Minneapolis).

4. MTAP chicken anti-MTAP und biotin-labeled antichickchen

Die Verdünnungsstufe betrug 1:1500 Dako-Diluent für chicken anti-MTAP und 1:1000 für biotin-labeled antichickchen (Jackson ImmunoResearch Laboratories Ltd, West Grove, Pa);

Detektionssysteme (Kits)

LSAB® Methode:

- Link Reagenz: biotinylierter Sekundärantikörper
- Label-Reagenz: an AP gekoppeltes Streptavidin
- Substrat: Tris-HCL-Pufferkonzentrat, Substratkonzentrat
- Aktivierungsagens
- Neufuchsin Chromogen

Dako REAL™ Buffer Kit (K5006)

4 fertige Waschpuffer für Färbeautomat Dako TechMate Horizon

- BUF1 Carrier Protein, Detergent, Preservative
- BUF2 Detergent, Preservative
- BUF3 Detergent, Preservative
- H2O Water Wash, Detergent, Preservative

Zytochem Plus AP–Polymerkit: Zytomed POLAP–006

Waschpuffer 1–4 (Dako), Primärantikörper (AK), (6 Tropfen Diluent + 3 Tropfen AK, Post–Block/Reagenz 2 (gebrauchsfertig) µl 700, AP–Polymer/Reagenz 3 (gebrauchsfertig) µl 700, Chromogen µl 750, Hämalan µl 700.

Bei den ZytoChem–Plus AP Polymer–Kits handelt es sich um sensitive Nachweiskits für die Immunhisto– und Zytochemie. Dabei wird ein Enzym–Polymer eingesetzt, in dem mehrere Moleküle Sekundärantikörper mit mehreren Molekülen alkalischer Phosphatase kovalent verbunden sind. Die Visualisierung erfolgt über eine Enzym–Substrat Reaktion in Gegenwart einer farbgebenden Komponente, die schließlich eine mikroskopische Auswertung ermöglicht.

Permanent AP Red Kit: Zytomed ZUC001–125

Permanent AP Red Buffer, Permanent AP Red Substrate, Permanent AP Red Chromogen, Levamisole;

Das Permanent AP Red System ist für immunhistochemische und für in situ Hybridisierungs–Färbeverfahren mit alkalischer Phosphatase bestimmt. Es bildet am Ort des Zielantigens oder der Ziel–Nukleinsäure ein permanentes, mit einem Lichtmikroskop darstellbares rot–pinkes Reaktionsprodukt.

2.3. Immunhistochemie

Wir färbten HMB–45, SOCS–3 und TFPI–2 nach den Anweisungen des Herstellers mit der LSAB 2–Alkalische–Phosphatase–Technik. Für MTAP wurde in Regensburg ein spezielles Färbeverfahren entwickelt, das u.a. den Grad der Antikörperbindung mittels einer AEC Lösung (3–amino–9–ethylcarbazole) (Dako Cytomation GmbH) sichtbar macht. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämalan.

2.3.1. Labelled StreptAvidin Biotin (LSAB) – Methode

Die Labelled StreptAvidin Biotin Methode basiert auf einer immunhistochemischen 3–Schritt Technik zur indirekten Färbung und Visualisierung von Antigen determinanten in verschiedenen Gewebetypen.

Zum Einsatz kommen Streptavidin und Biotin im Komplex. Die Methode bietet erhöhte Sensitivität zum ABC Komplex (Avidin Biotin Complex) und ermöglicht auch eine Lokalisierung von kleineren Antigenmengen. Ein Primärantikörper bindet mit dem spezifischen Antigen und formt einen Antigen–Antikörperkomplex im Gewebeschnitt. Ein biotinylierter sekundärer Antikörper, gegen das FC Fragment (Globulin) des ersten Antikörper gerichtet, dient zum Nachweis der Antigen–Antikörper Bindung im Gewebe. Inkubiert wird zusätzlich mit Streptavidin. Alkalische Phosphatase oder Peroxidase dienen als Enzyme. Die Färbung liefert entweder DAB (di–amino–benzidin), AEC (3–amino–9–ethylcarbazole) oder Neufuchsin.

2.3.2. Aufbereitung der Gewebeproben

Das Präzisionsmikrotom Typ Microm HM 355S lieferte uns 4 µm dicke Schnitte pro Block. Die Schnitte wurden auf einen SuperFrost Objektträger aufgezogen, mit jeweils einem Gewebeschnitt als Negativkontrolle. Über 24 Stunden wurden anschließend die Proben bei 37°C im Brutschrank getrocknet. Mittels eines PapPen Stiftes konnte die Nummer der Gewebeproben auf dem Objektträger vermerkt werden.

Eine Antigendemaskierung mit 600 Watt in der Mikrowelle wurde vorgenommen, um verlorengegangene Immunreaktivität des in Paraffin eingebetteten Gewebes wiederherzustellen (Hewitson, Wigg et al.).

Inkubationszeit ist je Antikörper 25 min. mit Citratpuffer. Durch die Fixierung von Gewebe und Zellen werden die Proteine miteinander quervernetzt. Einige Epitope verlieren dadurch ihre Eigenschaft, so dass sie von dem zugehörigen Antikörper nicht mehr erkannt werden. Die "Antigenität" des Proteins wird durch den Fixierungsprozess also geschädigt oder ganz zerstört. Die Quervernetzungen (Maskierungen) können durch die Antigendemaskierung zum Teil wieder rückgängig gemacht werden.

Im Färbeprozess von HMB–45 ist keine Demaskierung notwendig.

2.3.3. Färbeverfahren SOCS–3, MTAP, TFPI–2

1. Schritt:

Entparaffinieren der Gewebeproben: Xylol 2 X 10 min.

Zur Rehydratisierung: absteigende Alkoholreihe

100% Alkohol für 2 min. 1 Wiederholung

96% Alkohol für 2 min. 1 Wiederholung

70% Alkohol für 2 min. 1 Wiederholung

Wechseln der Xylol– und Alkoholbäder nach ca. 20 Objektträgern.

2. Schritt:

Entparaffinierte und rehydrierte Gewebeproben in einem Plastik Copelinhalter platzieren, auffüllen mit Citratpuffer ph 6,0 (2,1 g Citrat in 1000 ml aqua dest. lösen, ph auf 6,0 einstellen mit Salzsäure HCL = 2mol/l von Merck Art.nr: 1.09063.1000 11). Kochen der Küvetten in der Mikrowelle für 20 min., abkühlen bei Raumtemperatur 15–20 min.

3. Schritt:

Spülen in aqua dest.

4. Schritt:

Dako TechMate Horizon Färbeautomat

Dako REAL™ Buffer Kit (K5006)

4 fertige Waschpuffer für Färbeautomat Dako TechMate Horizon

- BUF1 Carrier Protein, Detergent, Preservative
- BUF2 Detergent, Preservative
- BUF3 Detergent, Preservative
- H2O Water Wash, Detergent, Preservative

5. Schritt:

SOCS–3 Antikörper in 1 ml Lyophilisat lösen und im Verdünnungsschema 1:10 vorverdünnt mit Dako–Diluent auf 5 µg/ml verwenden. TFPI–2 Antikörper in 1 ml Lyophilisat lösen bei einer Gesamtkonzentration von 500 µg/ml und im Verhältnis 1:10 vorverdünnt mit Dako–Diluent verwenden. Für anti–MTAP und biotin–labeled

antichicken betrug die Verdünnungsstufe 1:1500 Dako–Diluent für chicken anti–MTAP und 1:1000 für biotin–labeled antichicken.

250–300 µl pro Antikörper pipettieren. Inkubation im Kühlschrank bei 4°C über Nacht für den Primärantikörper polyklonal chicken anti–MTAP und 30 min. bei Raumtemperatur für den Sekundär–Antikörper biotin–labeled antichicken.

6. Schritt:

Dako Puffer gebrauchsfertig, 250 ml, Dako S2022

7. Schritt:

Zytochem Plus AP–Polymerkit

Waschpuffer 1–4 (Dako), Primärantikörper (AK) (6 Tropfen Diluent + 3 Tropfen AK = 250–300 µl), biotinylierter sekundärer AK = 250–300 µl, Post–Block/Reagenz 2 (gebrauchsfertig) µl 700, AP–Polymer/Reagenz 3 (gebrauchsfertig) µl 700, Chromogen µl 750, Hämalalaun µl 700.

8. Schritt:

Dako Puffer gebrauchsfertig, 250 ml, Dako S2022

9. Schritt:

30 min. Inkubation Streptavidin Peroxidase Zytochem. 2–3 Tropfen pro Schnitt

10. Schritt:

Dako Puffer gebrauchsfertig, 250 ml, Dako S2022

11. Schritt:

Permanent AP Red Kit: Chromogen Zytomed

15 min. Inkubation mit Chromogen Zytomed, je nach Stärke der Farbentwicklung etwas länger. Da die Lösung etwa 20–30 min. stabil ist, wird sie 15 min. vor dem Auftragen angesetzt. 2,5 ml AP Red Buffer + 1 Tropfen AP Red–Substrat + 1 Tropfen AP–Red Chromogen. Gut mischen.

12. Schritt:

Dako Puffer gebrauchsfertig, 250 ml, Dako S2022

13. Schritt:

Objektträgertauchbad ca. 3 min. in Hämalau 750–1000 µl

14. Schritt:

Spülen mit Leitungswasser

15. Schritt:

aufsteigende Alkoholreihe Xylol

70% Alkohol für 2 min. 1 Wiederholung

96% Alkohol für 2 min. 1 Wiederholung

100% Alkohol für 2 min. 1 Wiederholung

16. Schritt:

Eindecken der Objektträger mit Histofluid (PSI Grünwald, Laudenbach, Germany)

2.3.4. Färbeverfahren HMB–45

HMB–45 (Mouse anti–Melanosome)

Monospezifischer IgG 1 Maus–Antikörper, vorverdünnt (Zytomed, MSG007, 6ml)

Der Antikörper dient der Lokalisierung des melanozytären Differenzierungsantigens gp100 in Gewebeschnitten von Formalin fixiertem, Paraffin eingebettetem Gewebe. Gp100 wird von fetalen und neonatalen Melanozyten und verschiedenen Nävuszellen exprimiert, nicht aber von adulten Melanozyten oder intradermalen Nävi.

1. Schritt:

Entparaffinieren der Gewebeproben: Xylol 2 X 10 min.

Zur Rehydratisierung: absteigende Alkoholreihe

100% Alkohol für 2 min. 1 Wiederholung

96% Alkohol für 2 min. 1 Wiederholung

70% Alkohol für 2 min. 1 Wiederholung

Wechseln der Xylol– und Alkoholbäder nach ca. 20 Objektträgern.

2. Schritt:

spülen dreimal mit Phosphat Buffered Salin (PBS)

3. Schritt:

Inkubation Primärantikörper HMB-45 für 1 Stunde

4. Schritt:

spülen dreimal mit PBS

5. Schritt:

Inkubation mit biotyniliertem Sekundärantikörper für 30 min.

6. Schritt:

spülen dreimal mit PBS

7. Schritt:

Inkubation mit Straptavidin – alkalischer Phosphatase Komplex für 30 min.

8. Schritt:

spülen dreimal mit PBS

9. Schritt:

Substrat–Neufuchsin Chromogenlösung Inkubation. Trispuffer (0,5M pH 10,0: 60,57 g Tris in 800 ml aqua dest. lösen, pH 10 einstellen, mit Salzsäure 2N auf 1L mit aqua dest. auffüllen). 2 Tropfen Trispuffer in Röhrchen mit 2 ml aqua dest auffüllen.

1 Tropfen Substrat zufügen und mischen. 1 Tropfen Neufuchsin–Chromogen + 1 Tropfen Aktivierungssubstanz in Substratbehälter mischen. Inhalt des Röhrchens nach kurzer Wartezeit in Substratbehälter geben. 2 Tropfen Levamisol stoppt die alkalische Phosphataseaktivität. Auf das Probengewebe aufpipettieren.

10. Schritt:

spülen dreimal mit PBS

11. Schritt:

Hämalaun Färbung

12. Schritt:

Spülen mit H₂O

13. Schritt:

Eindecken der Objektträger mit Histofluid (PSI Grünewald, Laudenbach, Germany)

2.4. Auswertung der Färbeergebnisse

Die Auswertung der Objektträger erfolgte mit einem Standard Lichtmikroskop Typ Zeiss 25 und Olympus AX 70.

Eingeteilt wurde die Färbeintensität semiquantitativ in drei Stufen im Bereich 0–2, wobei man 0 als negativ wertete, 1 als schwach positiv und 2 als stark positiv (Bataille, Rogler et al., 2005).

3. Ergebnisse

3.1. Immunhistochemische Untersuchungsergebnisse

3.1.1. Definition des Untersuchungsmaterials

Zur Untersuchung lagen Paraffinblöcke von 30 Primärmelanomen, sechs infiltrierten Lymphknoten und vier kutanen Metastasen aus den Jahren 1998 bis 2007 vor. Die Präparate stammten aus dem Archiv der Poliklinik für Allergologie und Dermatologie am Biederstein der Technischen Universität München und waren operativ entfernt, begutachtet und befundet worden.

Das untersuchte Patientenkollektiv unterteilte sich in 20 weibliche und 20 männliche Patienten, die eine fast identische Altersverteilung aufwiesen. Die männlichen Patienten waren durchschnittlich $60,0 \pm 14,2$ Jahre alt, bei den Patientinnen lag das mittlere Alter bei $59,3 \pm 11,2$ Jahre. Tab. 3 zeigt die Altersverteilung im untersuchten Kollektiv auch in Abhängigkeit des Geschlechts.

Tab. 3: Altersverteilung nach Geschlechtern getrennt und im Gesamtkollektiv

| Geschlecht | N | Mittelwert | Standard- abweichung | Min. | Max. | Perzentile | | |
|------------|----|------------|-------------------------|------|------|------------|-----------------|------|
| | | | | | | 25. | 50. (Median) | 75. |
| weiblich | 20 | 60,0 | 14,2 | 36 | 92 | 53,3 | 61,0 | 67,3 |
| männlich | 20 | 59,3 | 11,2 | 36 | 77 | 52,3 | 62,0 | 67,0 |
| Gesamt | 40 | 59,7 | 12,6 | 36 | 92 | 53,0 | 61,0 | 67,0 |

Die Betrachtung des Alters in Abhängigkeit der untersuchten Gewebetypen zeigt, dass die Patienten mit kutanen Metastasen mit $66,0 \pm 22,6$ Jahren den höchsten Altersdurchschnitt aufwiesen, die Patienten in der Gruppe der Primärtumorgewebebeobachten waren durchschnittlich $59,8 \pm 10,4$ Jahre alt und die Patienten in der Gruppe des Lymphknotengewebes hatten ein Durchschnittsalter von $54,5 \pm 15,6$ Jahren. Tab. 4 zeigt die Altersverteilung in Abhängigkeit der Gewebeproben.

Tab. 4: Altersverteilung in Abhängigkeit der untersuchten Gewebeprobe

| Tumor/Tissue | N | Mittelwert | Standard- abweichung | Min. | Max. | Perzentile | | |
|----------------------|----|------------|-------------------------|------|------|------------|-----------------|------|
| | | | | | | 25. | 50. (Median) | 75. |
| Primärtumor | 30 | 59,8 | 10,4 | 39 | 80 | 53,0 | 60,0 | 67,0 |
| Lymphknoten | 6 | 54,5 | 15,6 | 36 | 75 | 36,0 | 59,0 | 65,3 |
| Kutane Metastasen | 4 | 66,0 | 22,6 | 37 | 92 | 44,3 | 67,5 | 86,3 |

Die Invasionstiefe (Clark Level), im Vergleich mit dem Alter der untersuchten Patienten, beschreibt Tab. 5. Es zeigte sich bereits mit 37 Jahren bei einem Patienten ein primäres Melanom pT4b, wohingegen die niedrigste Invasionsfront mit pT1a nur bei einem Patienten mit 62 Jahren nachvollzogen werden konnte.

Tab. 5: Invasionstiefe in Abhängigkeit zum Patientenalter

| Clark Level | N | Mittelwert | Standard- abweichung | Min. | Max. | Perzentile | | |
|-------------|----|------------|-------------------------|------|------|------------|-----------------|------|
| | | | | | | 25. | 50. (Median) | 75. |
| pT 1a | 1 | 62,0 | | 62 | 62 | | | |
| pT 2a | 9 | 60,6 | 18,2 | 36 | 92 | 42,0 | 65,0 | 72,0 |
| pT 2b | 3 | 57,7 | 4,5 | 53 | 62 | 53,0 | 58,0 | 62,0 |
| pT 3a | 14 | 58,1 | 11,3 | 36 | 75 | 51,8 | 57,5 | 67,5 |
| pT 3b | 2 | 62,5 | 6,4 | 58 | 67 | 43,5 | 62,5 | 63,0 |
| pT 4a | 4 | 62,0 | 2,3 | 60 | 64 | 60,0 | 62,0 | 64,0 |
| pT 4b | 5 | 59,0 | 20,4 | 37 | 80 | 38,0 | 62,0 | 78,5 |

Die Einteilung in die verschiedenen histologischen Subtypen ergab für die Gesamtzahl der Patienten 19 noduläre Melanome, vier maligne Melanome z.T. sekundär knotig und nicht eindeutig als nodulär einzustufen, zwölf superfiziell spreitende Melanome, ein desmoplastisches Melanom, drei akrolentiginöse Melanome und ein amelanotisches Melanom.

Die Lokalisation der Läsionen umfasste unterschiedliche Exzisionsstellen am menschlichen Körper, von den Extremitäten, rechter und linker Unter- und Oberschenkel, über das Abdomen und Hüfte beidseits zu rechtem und linkem Unter- und Oberarm, an der Rücken Mitte bis zu rechter und linker Schulter und Scapula.

Es fand sich kein Tumor im Bereich der Kopfhaut oder an den Geschlechtsteilen. Viele der Patienten hatten z.T. erhebliche Begleiterkrankungen, die allerdings nicht in Zusammenhang mit der Diagnose Malignes Melanom gebracht werden konnten und auf die in dieser Beschreibung verzichtet wird.

3.1.2. Breslow-Index in Abhängigkeit des Tumors

Die vertikale Infiltration nach Breslow in Millimeter als wichtiges Malignitätskriterium zeigt Tab. 6. Dabei reichte die Tiefe bei den Primärtumoren von 0,1 bis 8 mm, bei den Lymphknoten von 1 bis 4 mm und bei den kutanen Metastasen reichte der Breslow-Index von 0,1 bis 5 mm.

Tab. 6: Breslow-Index in Abhängigkeit des Tumors

| Tumor/Tissue | N | Mittelwert | Standard- abweichung | Min. | Max. | Perzentile | | |
|----------------------|----|------------|-------------------------|------|------|------------|-----------------|-----|
| | | | | | | 25. | 50. (Median) | 75. |
| Primärtumor | 30 | 2,6 | 1,8 | 0,1 | 8,0 | 1,8 | 2,0 | 3,1 |
| Lymphknoten | 6 | 2,0 | 1,2 | 1,0 | 4,0 | 1,2 | 1,7 | 2,9 |
| Kutane Metastasen | 4 | 2,1 | 1,9 | 0,1 | 5,0 | 0,5 | 2,0 | 3,9 |

Tab. 7 zeigt die Abhängigkeiten für den Gewebetyp „Primärtumor“ getrennt nach Markerfärbung. Die Abb. 4–7 beschreiben diese Verteilung der Messwerte und die Unterschiede zwischen den Färbestufen hinsichtlich des Breslow-Index graphisch (Boxplots). Wir versuchten also einen Zusammenhang nachzuweisen für unterschiedliche Tumordicken und Ausprägung des Färbegrades der einzelnen Marker und testeten mittels Varianzanalyse auf Signifikanz.

Tab. 7: Ausprägung des Färbegrades für Primärtumore und Breslow-Index getrennt nach Antikörper

| Markerfärbung | | N | Mittelwert | Standardabweichung | Min. | Max. | Perzentile | | |
|---------------|---|----|------------|--------------------|------|------|------------|--------------|-----|
| | | | | | | | 25. | 50. (Median) | 75. |
| MTAP | 0 | 8 | 2,8 | 1,7 | 2 | 6 | 1,8 | 2,1 | 4,3 |
| | 1 | 14 | 2,7 | 2,3 | 0,1 | 8 | 1,5 | 1,9 | 5,0 |
| | 2 | 8 | 2,2 | 0,9 | 1 | 4 | 1,6 | 2,4 | 2,9 |
| SOCS-3 | 0 | 1 | 1,8 | | 2 | 2 | | | |
| | 1 | 10 | 2,9 | 1,5 | 1 | 5 | 1,8 | 2,3 | 5,0 |
| | 2 | 19 | 2,5 | 2,0 | 0,1 | 8 | 1,6 | 2,0 | 2,6 |
| TFPI-2 | 0 | 8 | 2,6 | 1,2 | 1 | 5 | 1,8 | 2,3 | 3,4 |
| | 1 | 11 | 2,9 | 2,2 | 0 | 8 | 1,8 | 1,8 | 5,0 |
| | 2 | 11 | 2,4 | 1,9 | 0 | 6 | 1,5 | 2,0 | 2,3 |
| HMB-45 | 0 | 7 | 2,6 | 1,7 | 1 | 5 | 1,8 | 1,8 | 5,0 |
| | 1 | 8 | 2,1 | 1,5 | 0,1 | 5 | 1,3 | 1,9 | 2,8 |
| | 2 | 15 | 3,0 | 2,1 | 0,1 | 8 | 1,8 | 2,2 | 3,5 |

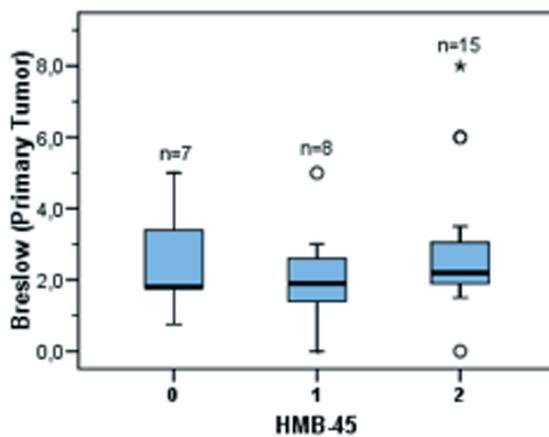


Abb. 4: Graphische Darstellung der Messwerte für Primärtumore.
X-Achse: Antikörperausprägung HMB-45
Y-Achse: Tumordicke in mm

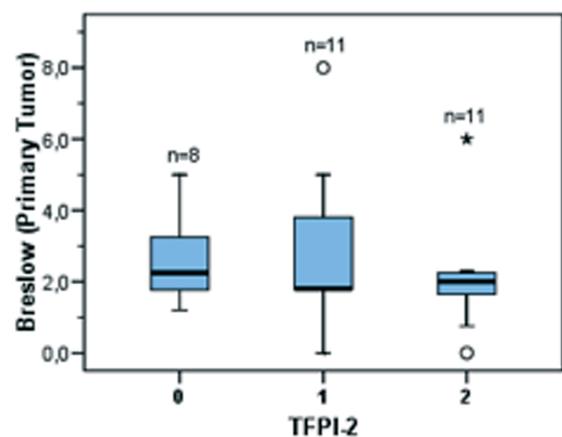


Abb. 5: Graphische Darstellung der Messwerte für Primärtumore.
X-Achse: Antikörperausprägung TFPI-2
Y-Achse: Tumordicke in mm

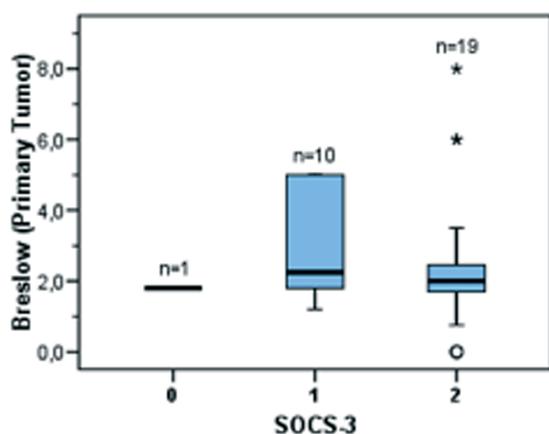


Abb. 6: Graphische Darstellung der Messwerte für Primärtumore.
X-Achse: Antikörperausprägung SOCS-3
Y-Achse: Tumordicke in mm

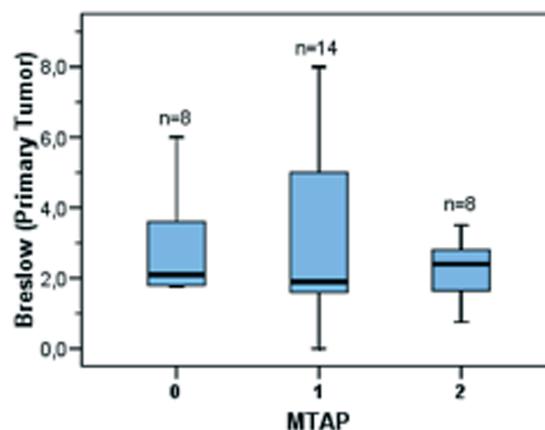


Abb. 7: Graphische Darstellung der Messwerte für Primärtumore.
X-Achse: Antikörperausprägung MTAP
Y-Achse: Tumordicke in mm

Es konnte kein signifikanter Unterschied im Breslow-Index zwischen den Färbestufen nachgewiesen werden (ANOVA, $p > 0,05$). Es zeigte sich für MTAP, SOCS-3 und TFPI-2 jeweils eine relativ hohe Variabilität und damit Streuung der Messwerte für die Färbeintensität der Stufe 1 (schwach positiv). Für HMB-45 beschreiben wir die höchste Variabilität für die Färbeintensität 0. Die Mittelwerte der Tumordicke orientierten sich bei annähernd 2 mm für alle Marker, ausgenommen SOCS-3 der Antikörperreaktion der Stufe 1 für zehn Gewebeproben mit einem Median bei 2,9 mm, der gleichen mittleren Tumordicke für TFPI-2 des Färbescores 1 und elf Proben, und einem Mittelwert von 3,0 mm bei Färbescore der Stufe 2 für HMB-45 und 15 Primärtumoren. Von prinzipiellem Interesse in dieser Arbeit waren die Färbescores der Stufen 0-1 der Marker MTAP, SOCS-3 und TFPI-2.

Eine Färbung der Stufe 2 kennzeichnete einen hohen Aktivitätsindex der Zellen bei der mit HMB-45 hervorgerufenen Antikörperreaktion.

Abb. 8 und 9 zeigen die graphische Verteilung der Messwerte für die zusätzlichen Gewebetypen Lymphknoten und kutane Metastasen. Dabei erlebten wir die höchste Streuung bei den Lymphknotenproben mit dem Antikörper MTAP und der Färbeintensität auf Stufe 1 bei einem Mittelwert von 2,0 mm Breslow-Index. Die Ausprägung bei den

kutanen Metastasen bei geringer Stichprobengröße von $N = 4$ lieferte eine mittlere Tumordicke von 2,1 mm mit annähernd gleicher Variabilität für SOCS-3 und TFPI-2 bei stark positiver Färbung.

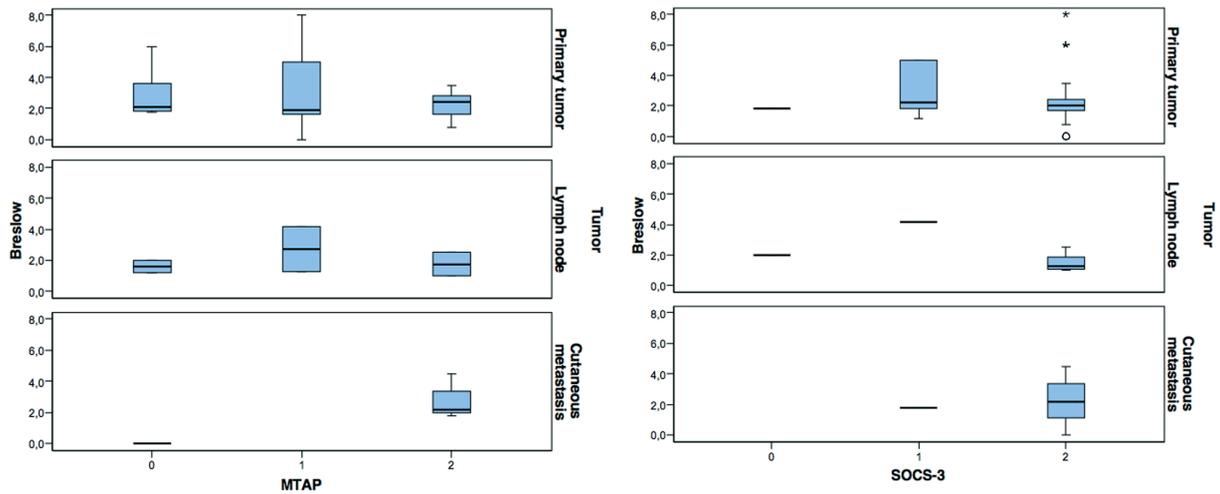


Abb. 8: Graphische Darstellung der Messwerte für alle Gewebeproben.
 X-Achse: Antikörperausprägung MTAP, SOCS-3
 Y-Achse: Tumordicke in mm

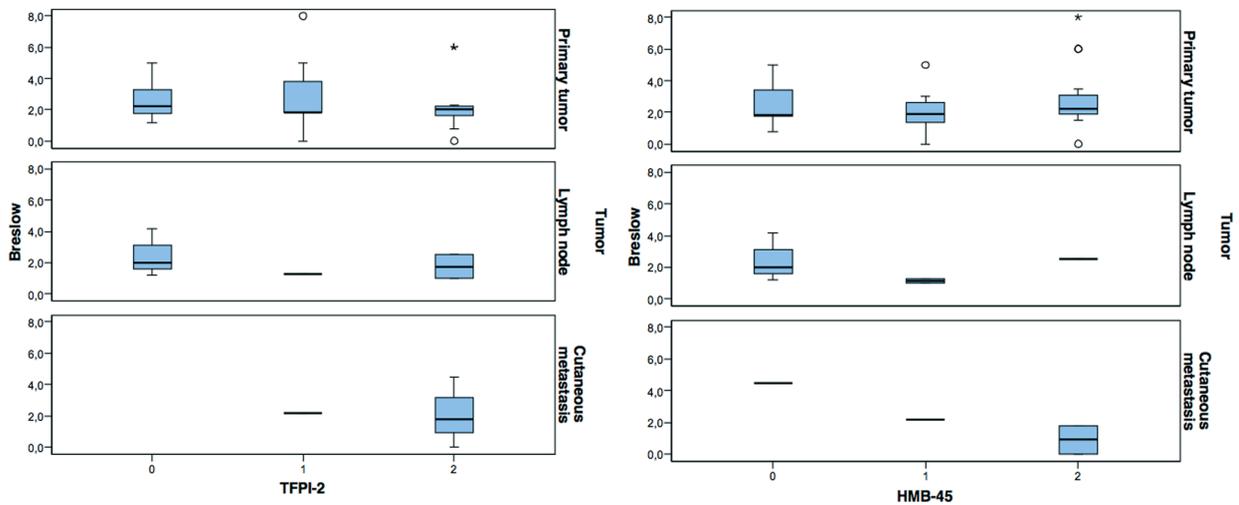


Abb. 9: Graphische Darstellung der Messwerte für alle Gewebeproben.
 X-Achse: Antikörperausprägung TFPI-2, HMB-45
 Y-Achse: Tumordicke in mm

3.1.3. Übereinstimmung der Marker

Tab. 8 zeigt für Primärtumor, Lymphknotengewebe und kutane Metastasen die jeweilige absolute und prozentuale Übereinstimmung der Antikörperfärbung. Lymphgewebe hatte eine gute Übereinstimmung für MTAP und SOCS-3 (66,7%), MTAP und TFPI-2 (83,3%), MTAP und HMB-45 (80,0%) und TFPI-2 und HMB-45 (83,3%); Die Proben der Primärmelanome zeigten eine weniger gute Übereinstimmung für MTAP und SOCS-3 (36,7%), MTAP und TFPI-2 (36,7%) oder TFPI-2 und HMB-45 (56,7%). Für kutane Metastasen ergab sich die beste Übereinstimmung bei TFPI-2 und HMB-45. Als Maß für die Stärke der Übereinstimmung der Markerfärbung wurde der Kappa-Koeffizient (κ) berechnet. Dabei definiert $\kappa < 0,1$ keine Übereinstimmung, $\kappa = 0,1-0,4$ eine schwache Übereinstimmung, $\kappa = 0,41-0,6$ deutliche Übereinstimmung, $\kappa = 0,61-0,8$ starke Übereinstimmung, $\kappa = 0,81-1,0$ (fast) vollständige Übereinstimmung. So lieferte $\kappa = 0,34$ bei den Primärmelanomen für TFPI-2 und HMB-45 eine schwache Übereinstimmung, Lymphknotengewebe imponierte mit der besten Ausprägung $\kappa = 0,75$ bei MTAP und TFPI-2 und TFPI-2 mit HMB-45. Für die kutanen Metastasen konnte der Kappa-Koeffizient nicht berechnet werden.

Tab. 8: Absolute und prozentuale Übereinstimmung für die untersuchten Gewebetypen

| Absolute und prozentuale Übereinstimmung / Cohen's Kappa Koeffizient (κ) | | | SOCS-3 | TFPI-2 | HMB-45 |
|---|------|--------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Primärtumor | n=30 | MTAP | 11/30 [36,7%] $\kappa=0,05$ | 11/30 [36,7%] $\kappa=0,04$ | 12/30 [40,0%] $\kappa=0,12$ |
| | n=30 | SOCS-3 | | 13/30 [43,3%] $\kappa=0,11$ | 16/30 [53,3%] $\kappa=0,21$ |
| | n=30 | TFPI-2 | | | 17/30 [56,7%] $\kappa=0,34$ |
| Lymphknoten | n=6 | MTAP | 4/6 [66,7%] $\kappa=0,50$ | 5/6 [83,3%] $\kappa=0,75$ | 4/6 [80,0%] $\kappa=0,50$ |
| | n=6 | SOCS-3 | | 3/6 [50%] $\kappa=0,25$ | 2/6 [33,3%] $\kappa=0,11$ |
| | n=6 | TFPI-2 | | | 5/6 [83,3%] $\kappa=0,74$ |
| Kutane Metastasen | n=4 | MTAP | 2/4 [50,0%] | 2/4 [50,0%] | 1/4 [25,0%] |
| | n=4 | SOCS-3 | | 2/4 [50,0%] | 1/4 [25,0%] |
| | n=4 | TFPI-2 | | | 3/4 [75,0%] |

3.1.4. Expression von TFPI-2, SOCS-3 und MTAP in Melanomzelllinien

Die Darstellung der Antikörperfärbungen in den einzelnen Melanomzelllinien erfolgte lichtmikroskopisch zunächst zur Übersicht mit einer Vergrößerung (Objektiv 10–40) und anschließend in einer 100 bis 200 fachen Vergrößerung, um Aussagen zum Charakter der Immunreaktion treffen zu können. HMB-45 als Standardgegenfärbung diente als Vergleich bei einer positiven Antikörperreaktion für das Gewebe. Tab. 9 verdeutlicht den Grad der Markerfärbung angewandt auf die Anzahl der untersuchten Gewebeproben mit dem Intensitätsindex 0 für keine Färbung, 1 für schwach positive Ausprägung und 2 für stark positive Färbung.

Tab. 9: Intensität der Markerfärbung in den untersuchten Gewebeproben

| Färbeindex | | Primär-tumor | Lymph-knoten | Kutane Metastase | Färbeindex | | Primär-tumor | Lymph-knoten | Kutane Metastase |
|------------|---|--------------|--------------|------------------|------------|---|--------------|--------------|------------------|
| MTAP | 0 | 8 | 2 | 1 | TFP-2 | 0 | 8 | 3 | 0 |
| | 1 | 14 | 2 | 0 | | 1 | 11 | 1 | 1 |
| | 2 | 8 | 2 | 3 | | 2 | 11 | 2 | 3 |
| SOCS-3 | 0 | 1 | 1 | 0 | HMB-45 | 0 | 7 | 3 | 1 |
| | 1 | 10 | 1 | 1 | | 1 | 8 | 2 | 1 |
| | 2 | 19 | 4 | 3 | | 2 | 15 | 1 | 2 |

MTAP färbte stark positiv mit der Färbeintensität der Stufe 2 bei acht Primärmelanomen, zwei Lymphknoten und drei kutanen Metastasen (32,5% vom Gesamtkollektiv GK: N = 40). TFPI-2 zeigte eine intensive Färbung in elf Primärmelanomen, zwei Lymphknoten und drei kutanen Metastasen (40% vom GK). SOCS-3 konnte in 19 Fällen eines Primärtumors, bei vier Lymphknoten und in drei kutanen Metastasen als stark positiv interpretiert werden (65% vom GK). In 15 Primärmelanomen, einem Lymphknoten und bei zwei kutanen Metastasen lieferte die Standardgegenfärbung mit HMB-45 ein stark positives Ergebnis (45% vom GK). Die Farbe der experimentellen Immunreaktion wurde von stark rötlich über schwach rotbraun interpretiert, ließ sich aber in aller Regel gut von Melaninpigmenten, Bindegewebe und sonstigen Zellbestandteilen unterscheiden.

Für MTAP, SOCS-3, TFPI-2 und HMB-45 wurde die Färbung positiv gewertet bei deutlicher Antigenmarkierung im Zytoplasma. Reine Hintergrundfärbungen wurden negativ bewertet. In klar definierbarem Tumorgewebe zeigten sich für die experimentellen Marker Bereiche mit schwächerem und deutlichem Färbeverhalten unregelmäßig verteilt, wie die folgenden Abb. 10–21 verdeutlichen.

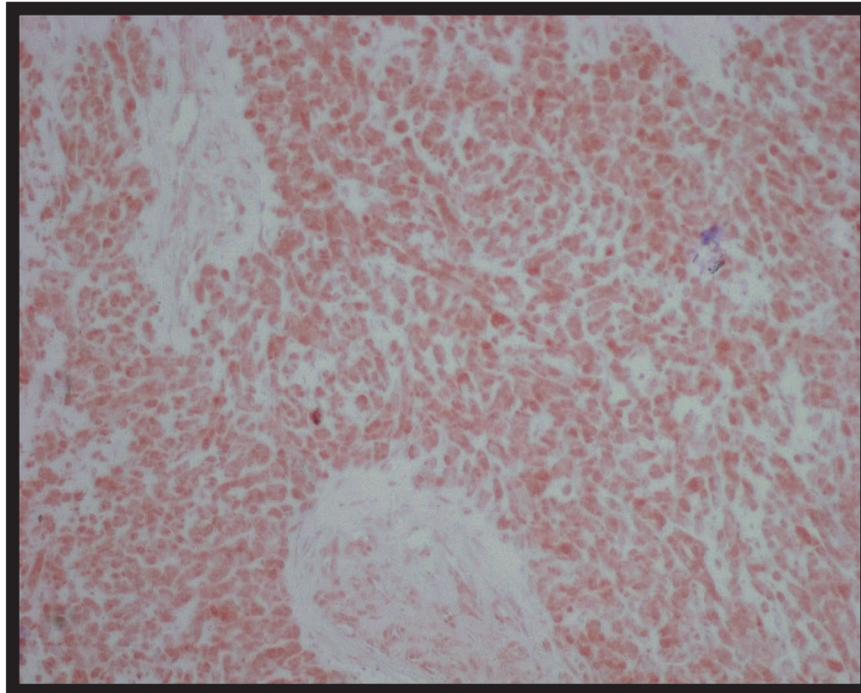


Abb. 10: Präparat Nr.: 5191/05, Vergr. 100x, Noduläres Melanom, pos. Reaktion MTAP, Score 2, Breslow 4,5 mm, pT 4b

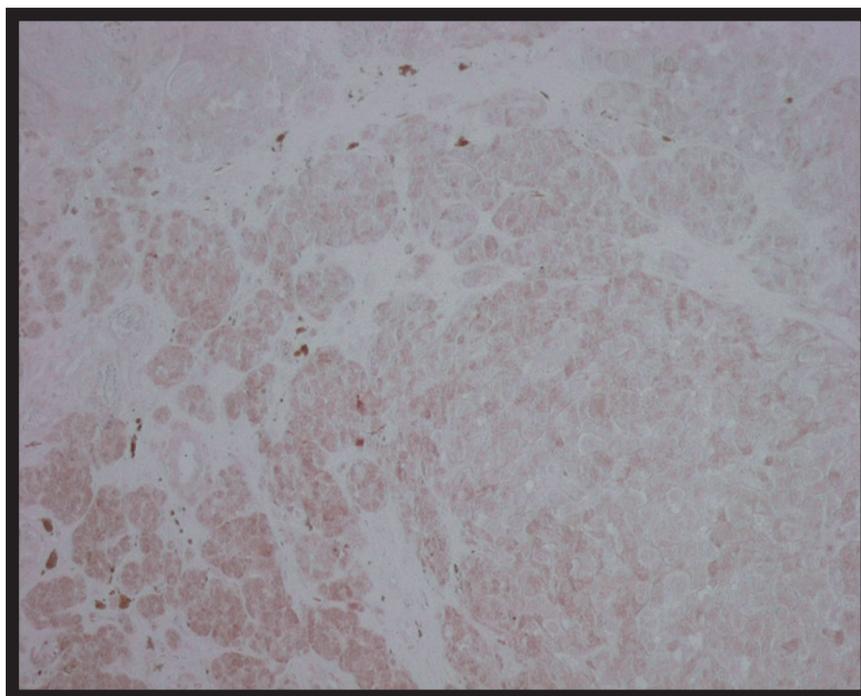


Abb. 11: Präparat Nr.: 1317/01, Vergr. 52x, superfiziell spreit. Melanom, pos. Reaktion MTAP, Score 1, Breslow 1,5 mm, pT 2b

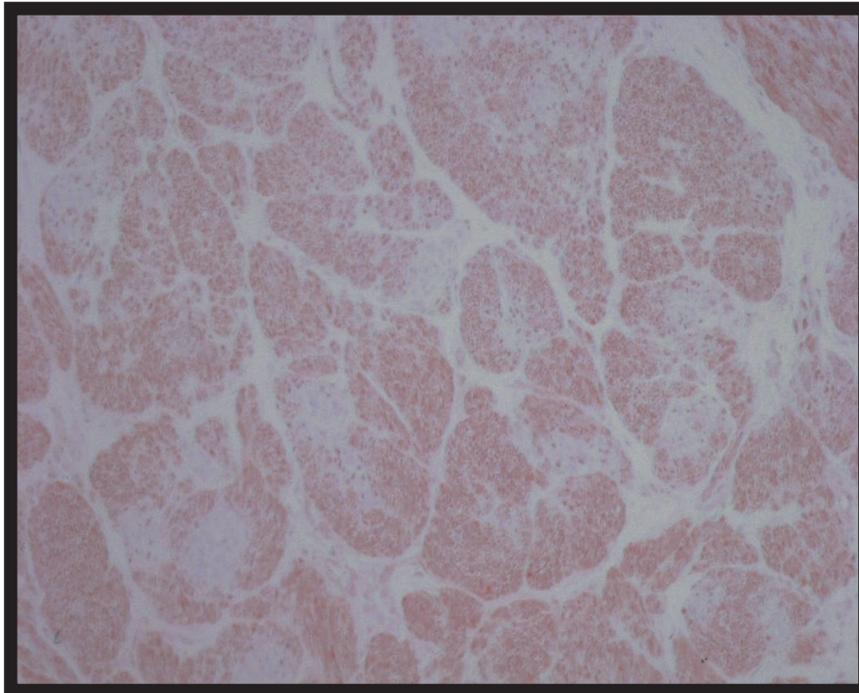


Abb. 12: Präparat Nr.; 3331/05, Vergr. 100x, superfiziell spreit. Melanom, pos. Reaktion MTAP, Score 1, Breslow 2,2 mm, pT 3a

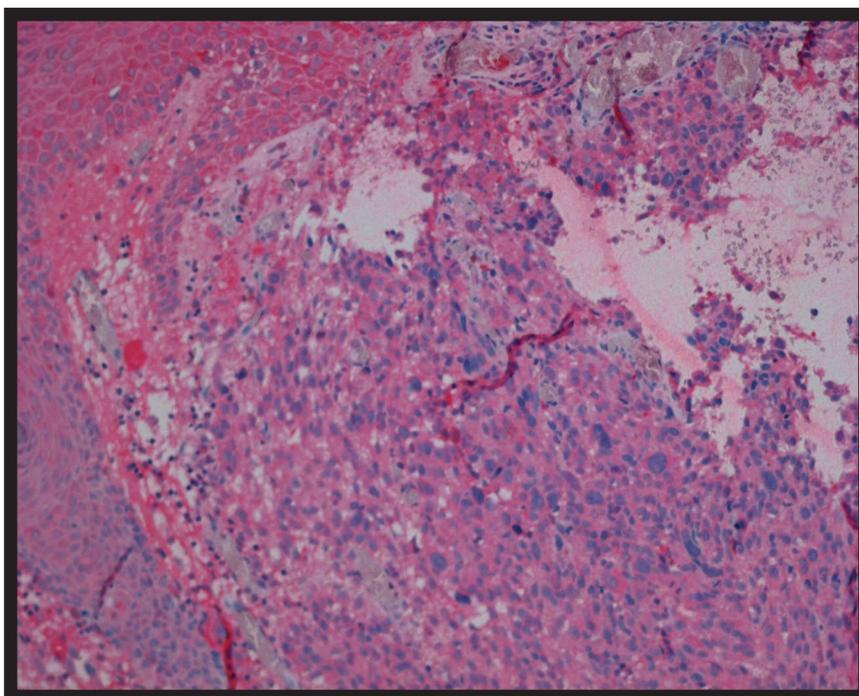


Abb. 13: Präparat Nr.: 3563/98, Vergr. 100x, Noduläres Melanom, pos. Reaktion TFPI-2, Score 2, Breslow 6 mm, pT 4b

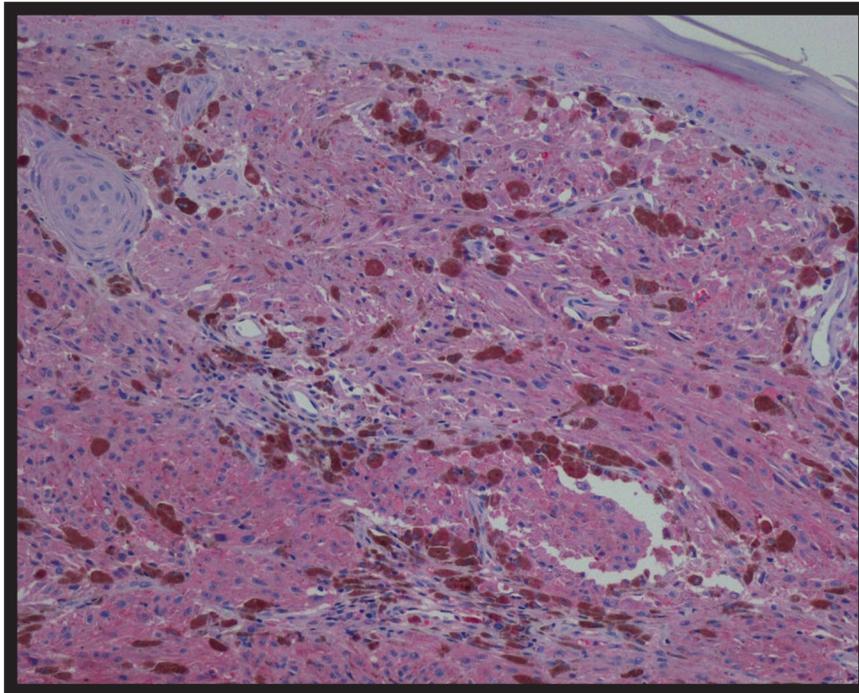


Abb. 14: Präparat Nr.: 4758/01, Vergr. 100x, Noduläres Melanom, pos. Reaktion SOCS-3, Score 2, Breslow 6 mm, pT 4b

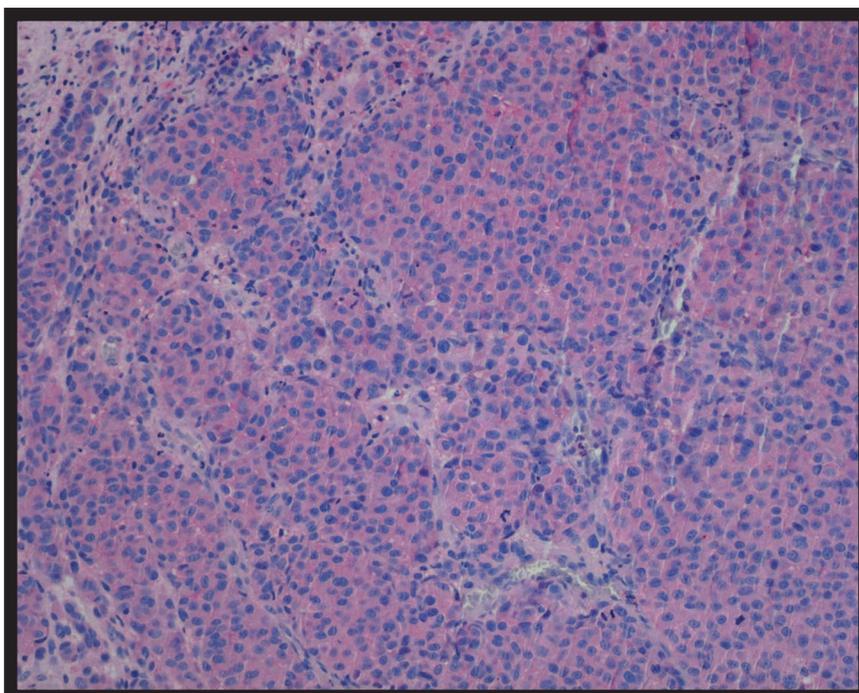


Abb. 15: Präparat Nr.: 0947/02, Vergr. 100x, Noduläres Melanom Kutane Metastase, pos. Reaktion SOCS-3, Score 1, Breslow 1,8 mm, pT 2a

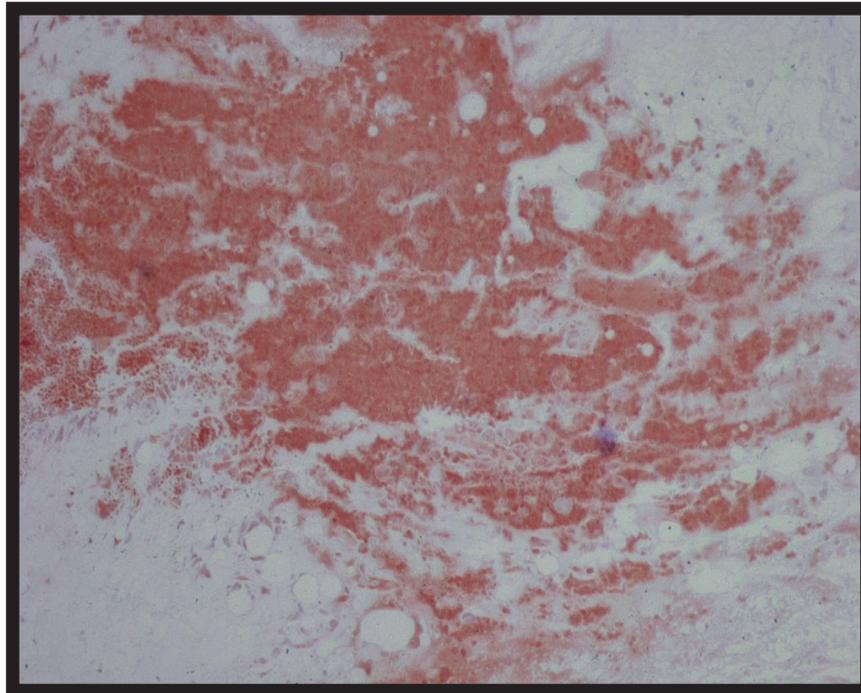


Abb. 16: Präparat Nr.: 1610/05, Vergr. 100x, Noduläres Melanom kutane Metastase, pos. Reaktion MTAP, Score 2, Breslow 2,2 mm, pT 3a

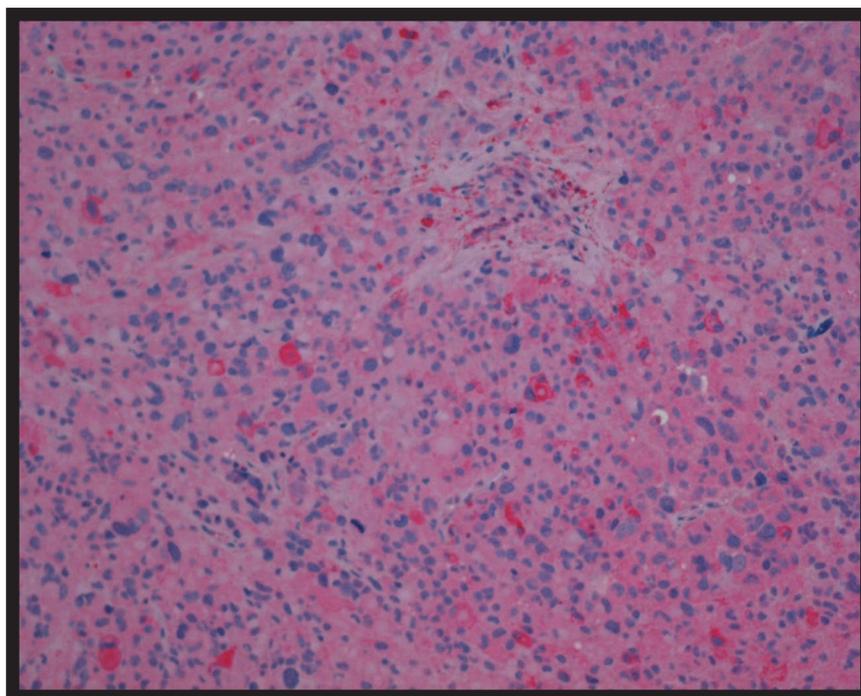


Abb. 17: Präparat Nr.: 1610/05, Vergr. 100x, Noduläres Melanom kutane Metastase, pos. Reaktion TFPI-2, Score 1, Breslow 2,2 mm, pT 3a

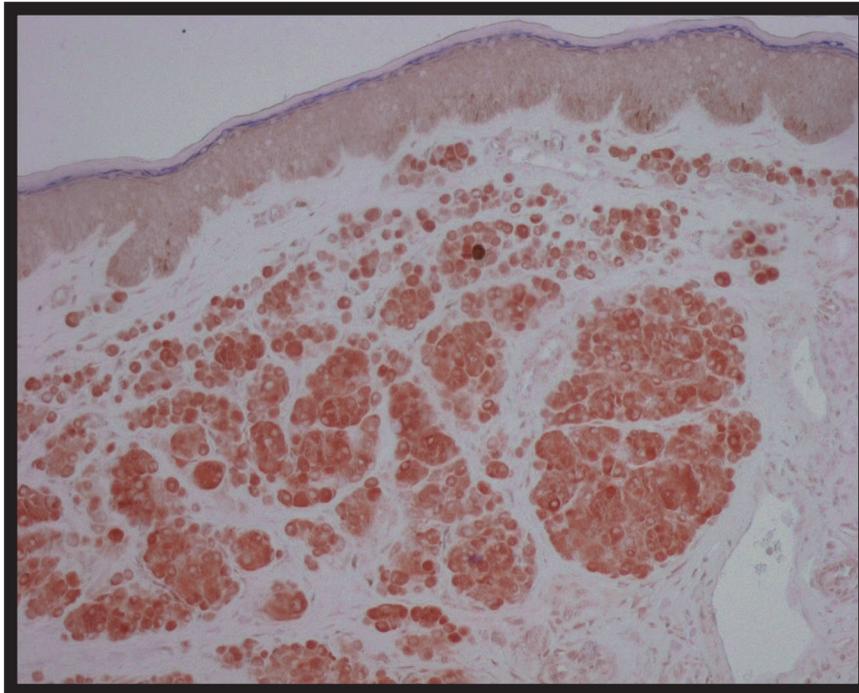


Abb. 18: Präparat Nr.: 0398/06, Vergr. 100x, Noduläres Melanom kutane Metastase, pos. Reaktion MTAP, Score 2, Breslow 4,5 mm, pT 4b

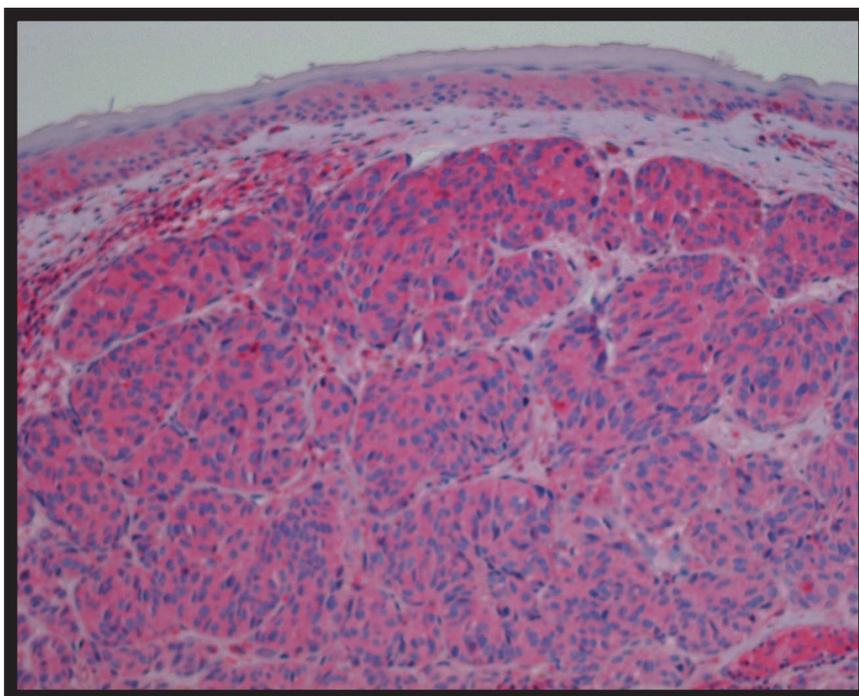


Abb. 19: Präparat Nr.: 1895/04, Vergr. 100x, Noduläres Melanom kutane Metastase, pos. Reaktion SOCS-3, Score 2, Breslow 2,5 mm, pT 3a

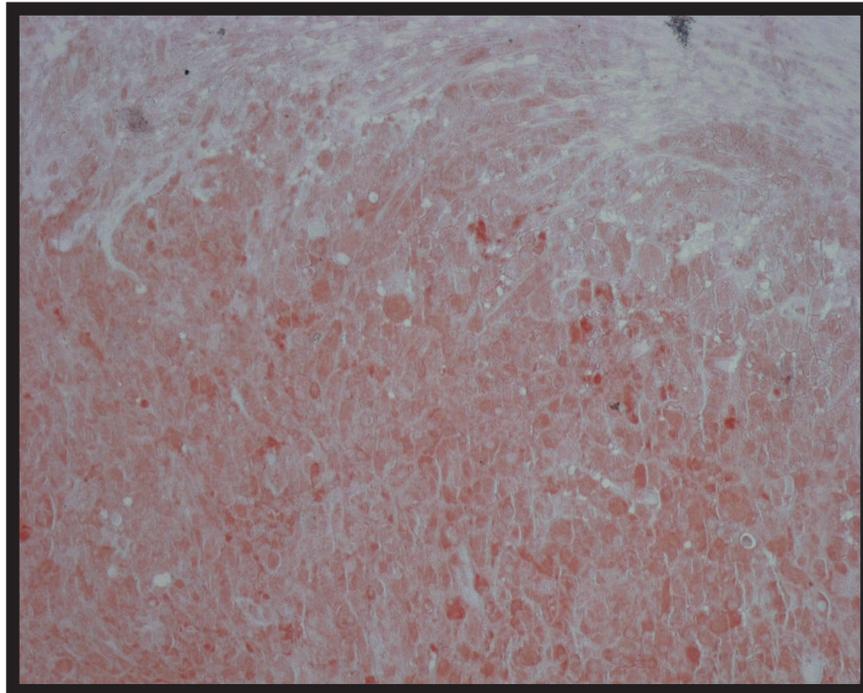


Abb. 20: Präparat Nr.: 0928/05, Vergr. 100x, Lymphknoten superfiziell spreit. Melanom, pos. Reaktion MTAP, Score 1

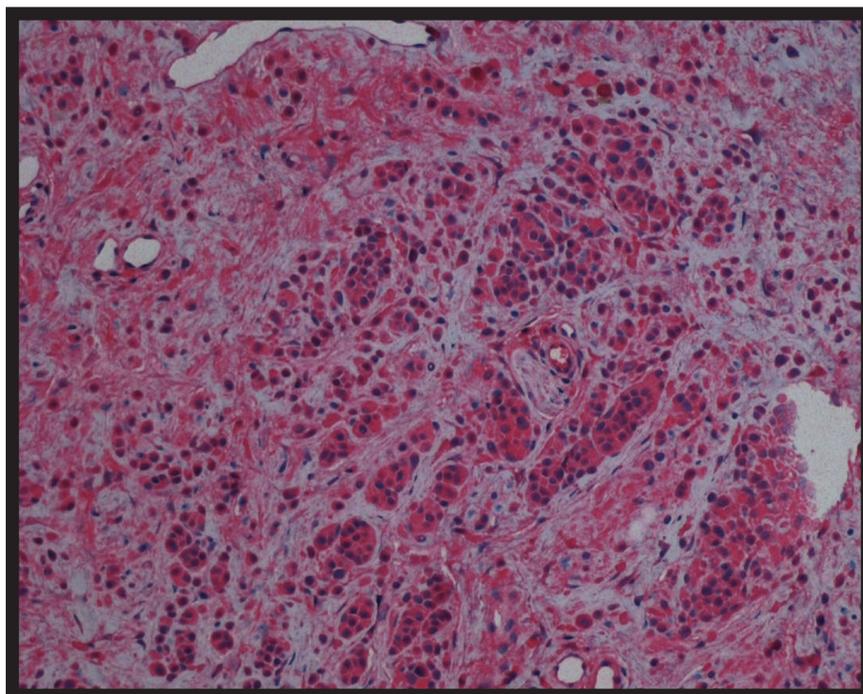


Abb. 21: Präparat Nr.: 4777/02, Vergr. 100x, Lymphknoten noduläres Melanom, pos. Reaktion TFPI-2, Score 2

3.2. Auswertung der Kontrollfärbung

Tab. 10 beschreibt die absolute und prozentuale Übereinstimmung der Tumorentitäten, die als Kontrolle mitgefärbt wurden. Dabei wurden jeweils zehn Proben von spinozellulären Karzinomen, Nävi und Basaliomen untersucht. Es zeigte sich eine relativ geringe Übereinstimmung in der Antikörperreaktion für die einzelnen Marker. Hinsichtlich MTAP und der Anfärbbarkeit von Nävuszellgewebe ist auf die einschlägigen Publikationen zu verweisen (Behrmann, et al., 2003). Eine Kontrollfärbung fand daher nicht statt. Desweiteren bestand kein Anlass zur Untersuchung der Antikörperreaktion für MTAP bei Basaliomen und Spinalzellkarzinome, Tumorformen nicht melanozytären Ursprungs.

Tab. 10: Absolute und prozentuale Übereinstimmung für die Gruppe der Kontrollgewebe

| Absolute und prozentuale Übereinstimmung | | SOCS-3 | HMB-45 |
|--|--------|------------|------------|
| Basaliom | SOCS-3 | 0/2 [0%] | 1/10 [10%] |
| | TFPI-2 | | 0/2 [0%] |
| Spinozelluläres Gewebe | SOCS-3 | 3/10 [30%] | 4/10 [40%] |
| | TFPI-2 | | 6/10 [60%] |
| Nävus | SOCS-3 | 3/10 [30%] | 0/0 |
| | TFPI-2 | | 0/0 |

In der Basaliomgruppe wurde für SOCS-3 eine viermal stark positive Färbung für das Gewebe verzeichnet, zweimal zeigte der Marker keine und viermal eine schwach positive Reaktion. TFPI-2 zeigte in zwei Fällen eine schwach positive Antikörperreaktion.

Das Nävusmaterial präsentierte sich für SOCS-3 sechsmal schwach positiv und zeigte in vier Fällen kein Ergebnis. TFPI-2 färbte dreimal schwach positiv und zeigte in sieben Fällen keine Reaktion.

HMB-45 wies in fünf Fällen keine Färbung auf und präsentierte lediglich drei schwach und nur zwei stark positive Präparate.

Für das spinozelluläre Kontrollgewebe konnte bei SOCS-3 in fünf Fällen eine stark positive Färbung verzeichnet werden, viermal wurde schwach positiv vergeben und einmal wurde die Färbung mit keiner Reaktion bewertet. Ähnlich verhielt es sich mit TFPI-2, wobei fünfmal eine stark positive und fünfmal eine schwache Reaktion gefunden wurde. Damit verwies insgesamt das spinozelluläre Karzinomgewebe in unserer Versuchsreihe auf eine vermehrte Anfärbbarkeit mit SOCS-3 und TFPI-2 (Abb. 22-35).

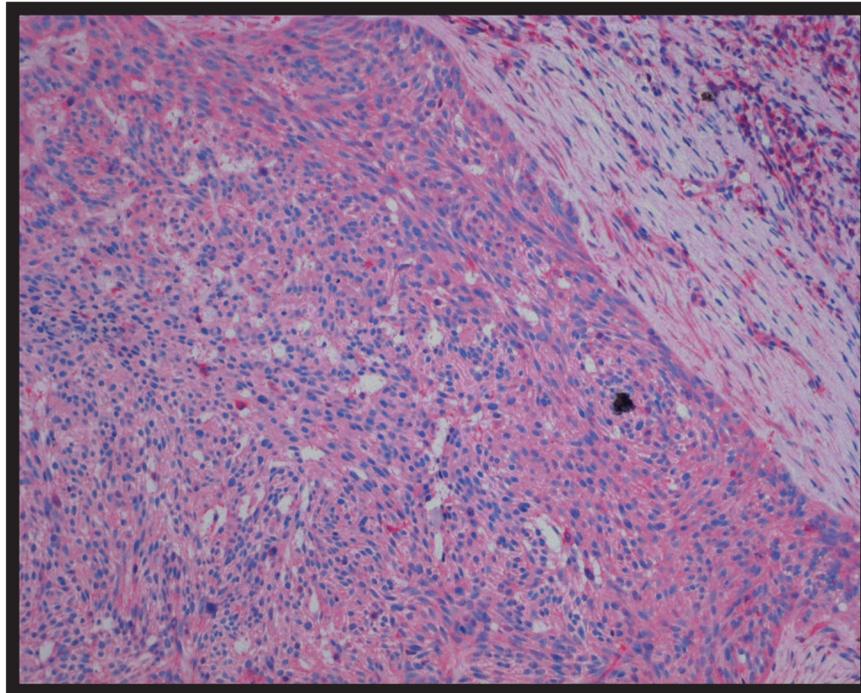


Abb. 22: Präparat Nr.: 3174/05, Vergr. 200x, Basalzellkarzinom, pos.
Reaktion SOCS-3, Score 2

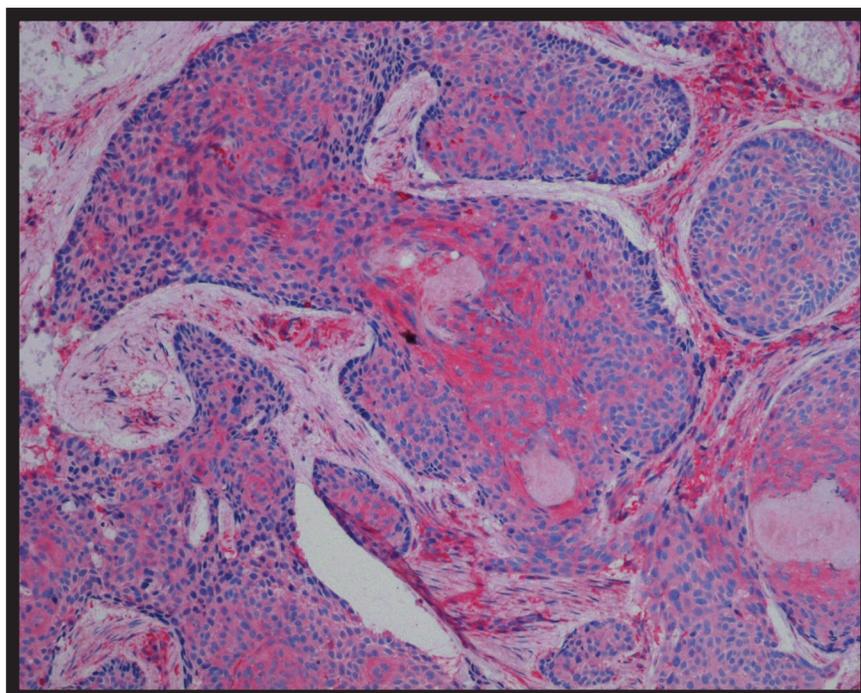


Abb. 23: Präparat Nr.: 3239/05, Vergr. 200x, Basalzellkarzinom, pos.
Reaktion SOCS-3, Score 2

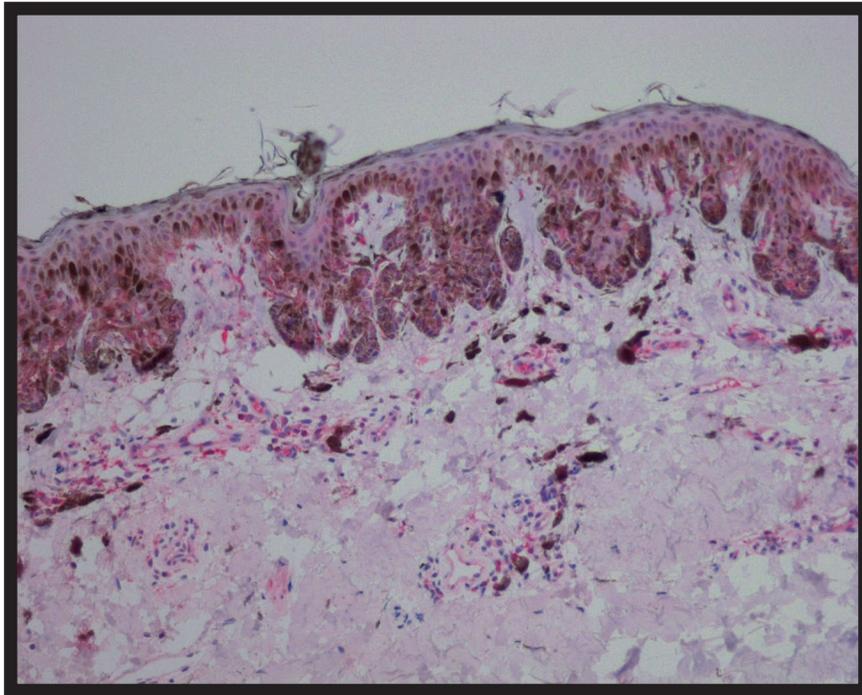


Abb. 24: Präparat Nr.: 3116/06, Vergr. 100x, Nävuszellgewebe, pos.
Reaktion SOCS-3, Score 1

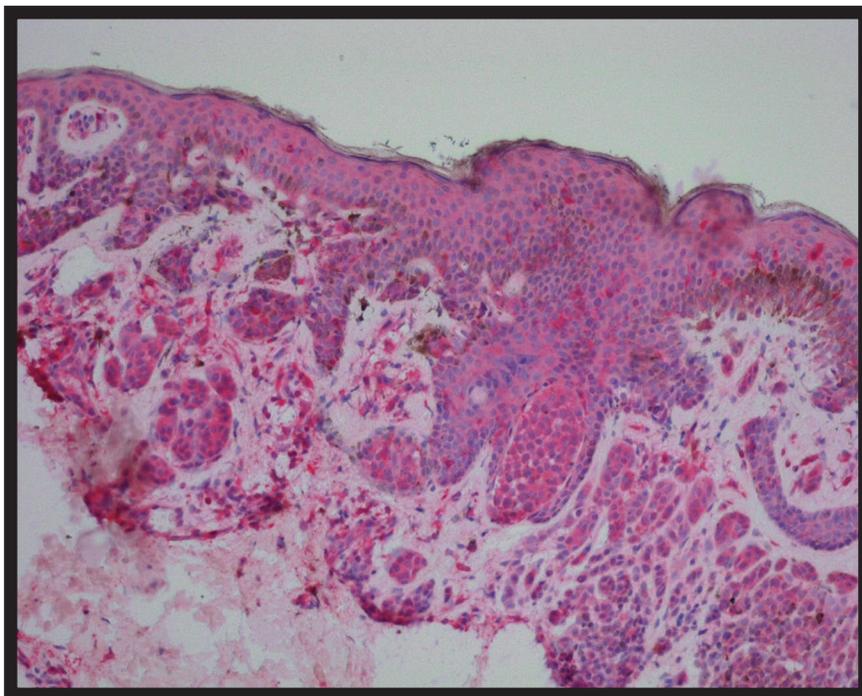


Abb. 25: Präparat Nr.: 3188/06, Vergr. 100x, Nävuszellgewebe, pos.
Reaktion SOCS-3, Score 2

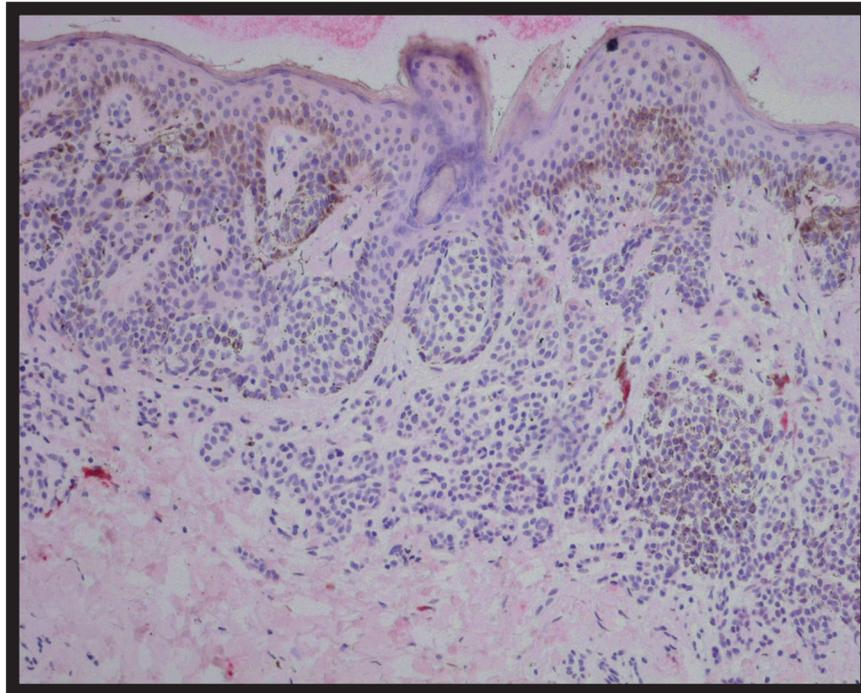


Abb. 26: Präparat Nr.: 3188/06, Vergr. 100x, Nävuszellgewebe, neg.
Reaktion TFPI-2, Score 0

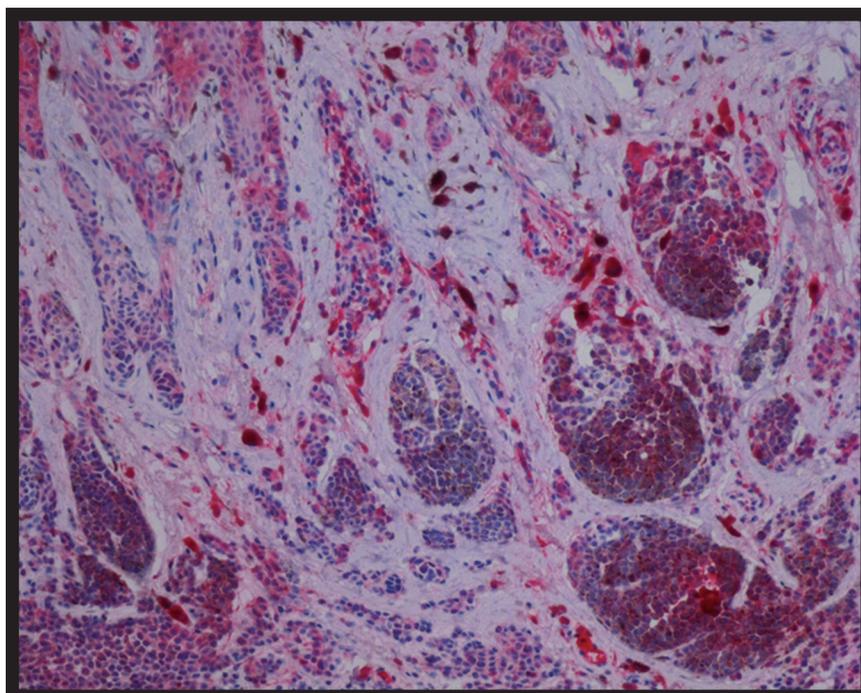


Abb. 27: Präparat Nr.: 3273/04, Vergr. 100x, Nävuszellgewebe, pos.
Reaktion TFPI-2, Score 2

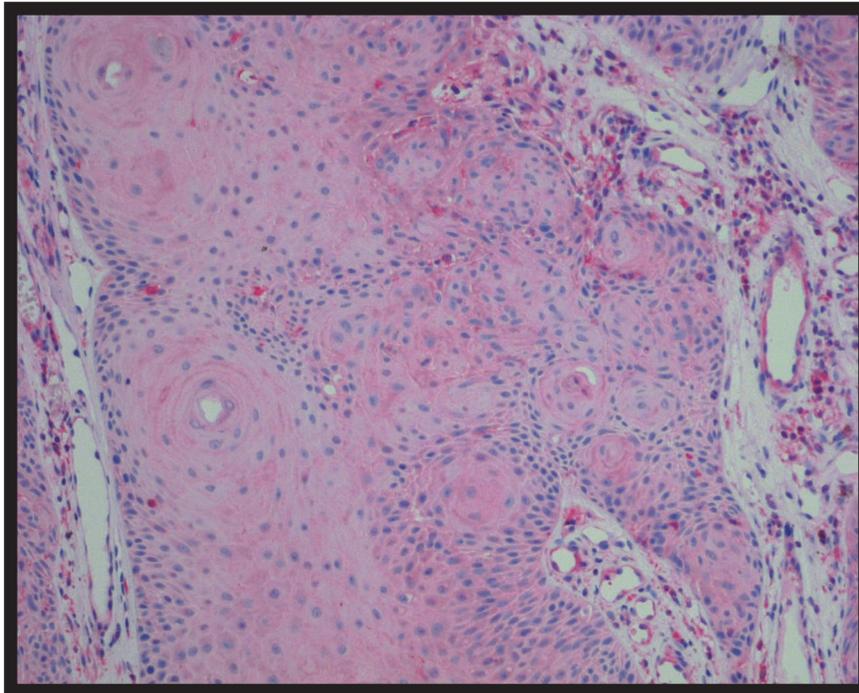


Abb. 28: Präparat Nr.: 2973/07, Vergr. 100x, Spinalzellkarzinom, pos.
Reaktion SOCS-3, Score 2

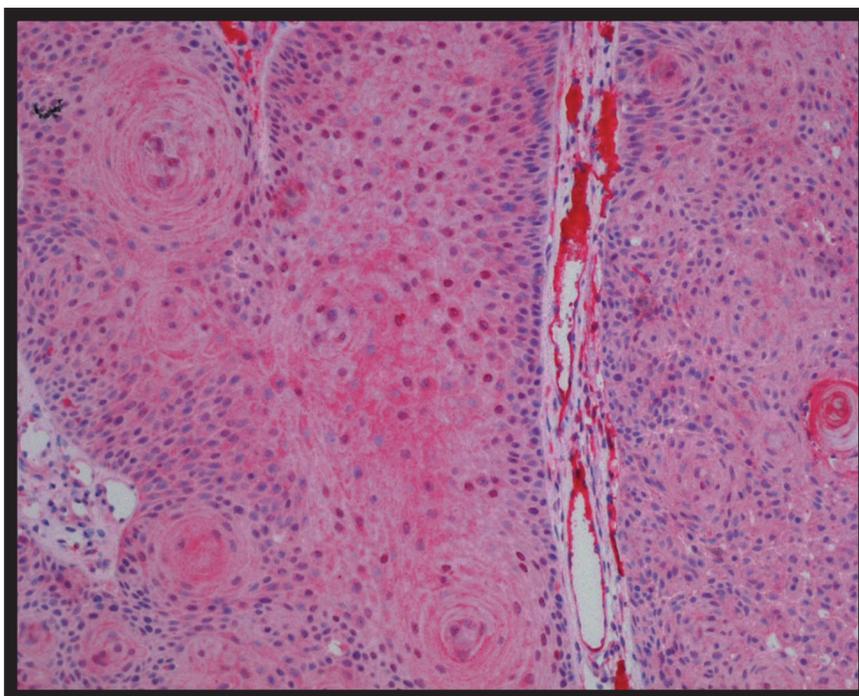


Abb. 29: Präparat Nr.: 2973/07, Vergr. 100x, Spinalzellkarzinom, pos.
Reaktion TFPI-2, Score 2

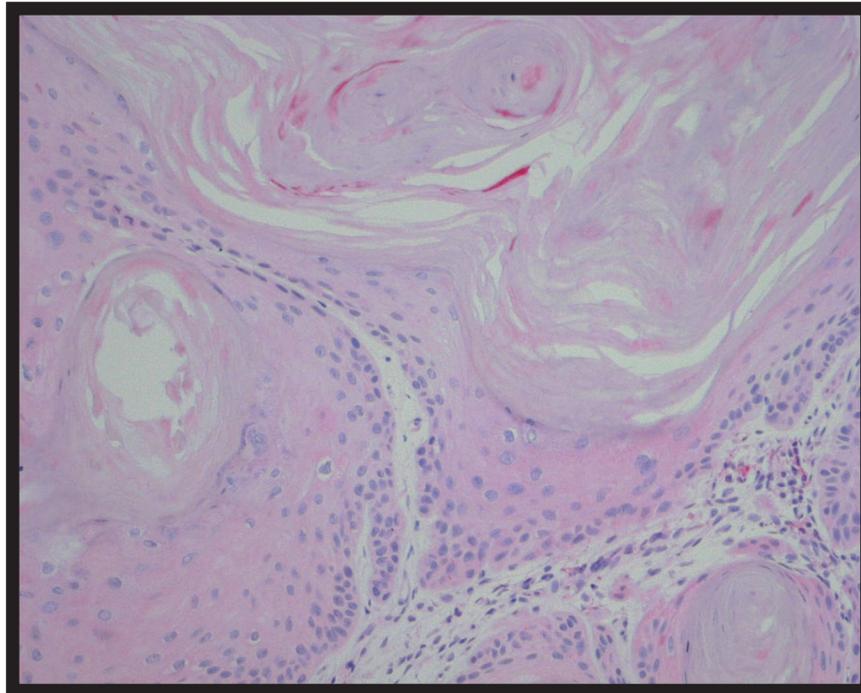


Abb. 30: Präparat Nr.: 2999/05, Vergr. 200x, Spinalzellkarzinom, pos.
Reaktion SOCS-3, Score 1



Abb. 31: Präparat Nr.: 2999/05, Vergr. 200x, Spinalzellkarzinom, pos.
Reaktion TFPI-2, Score 2

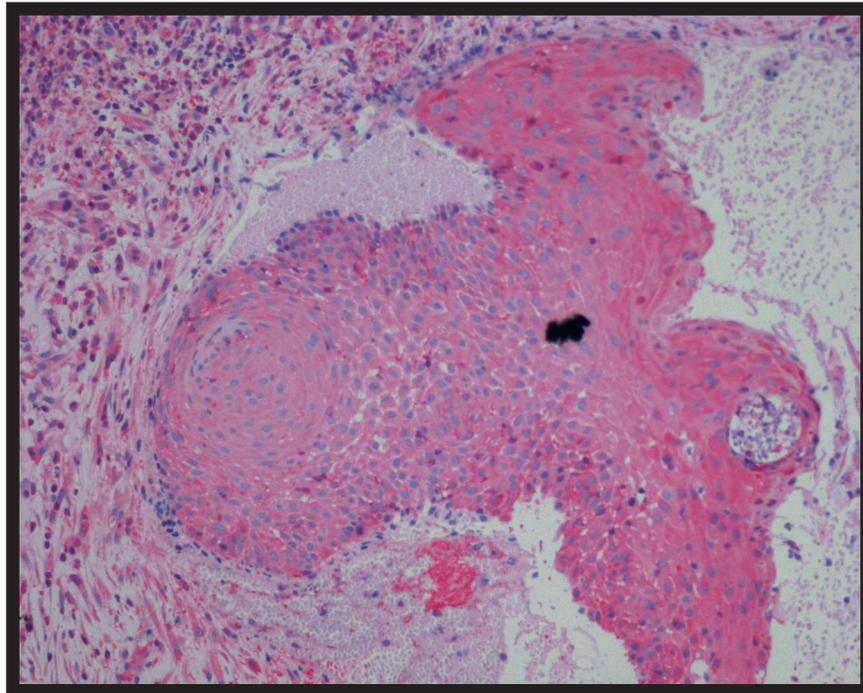


Abb. 32: Präparat Nr.: 3003/06, Vergr. 200x, Spinalzellkarzinom, pos.
Reaktion SOCS-3, Score 2

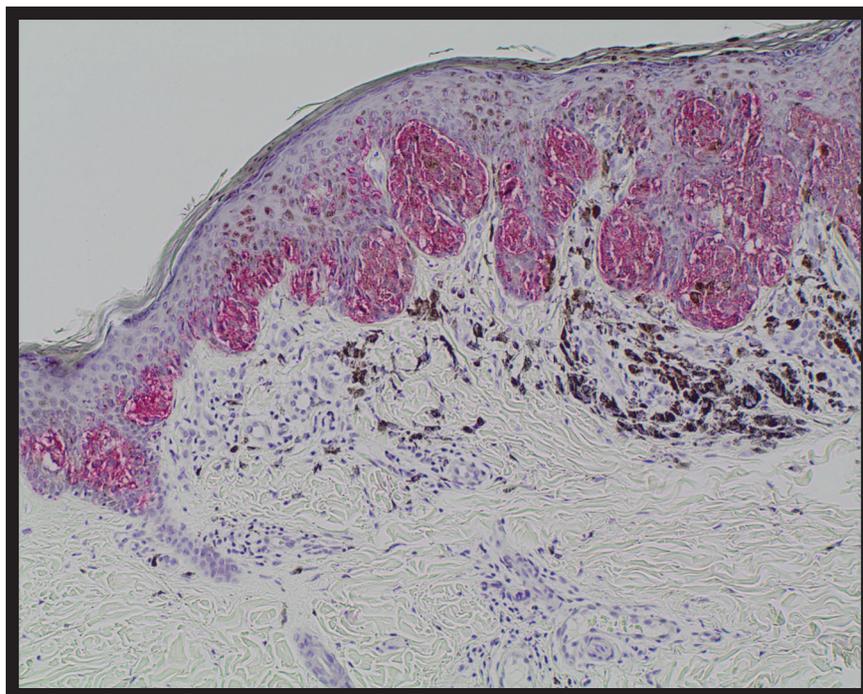


Abb. 33: Präparat Nr.: 3116/06, Vergr. 100x, Nävuszellgewebe, pos.
Reaktion HMB-45, Score 2

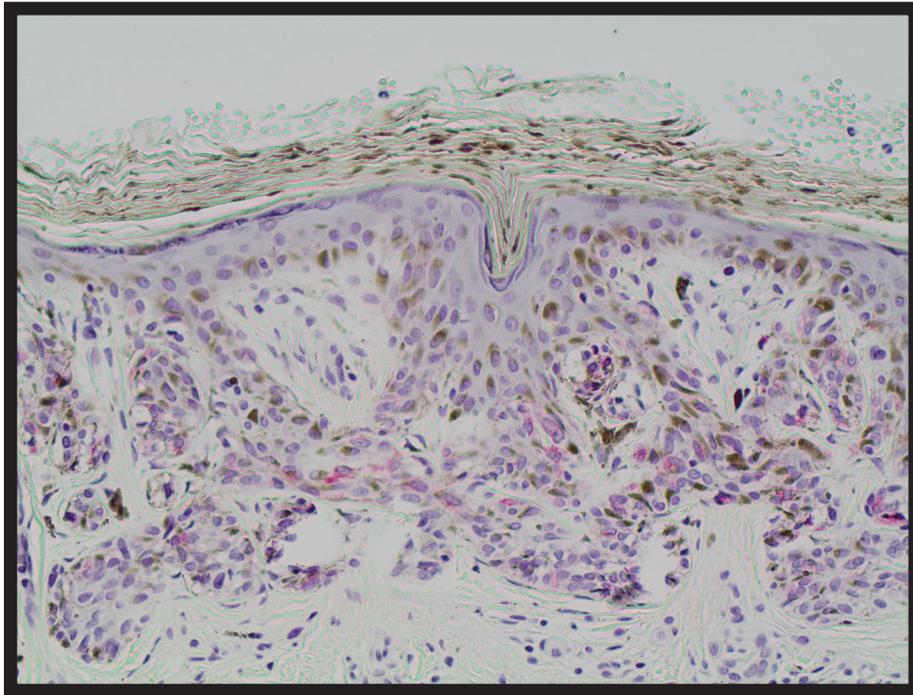


Abb. 34: Präparat Nr.: 3707/05, Vergr. 200x, Nävuszellgewebe, pos. Reaktion HMB-45, Score 1

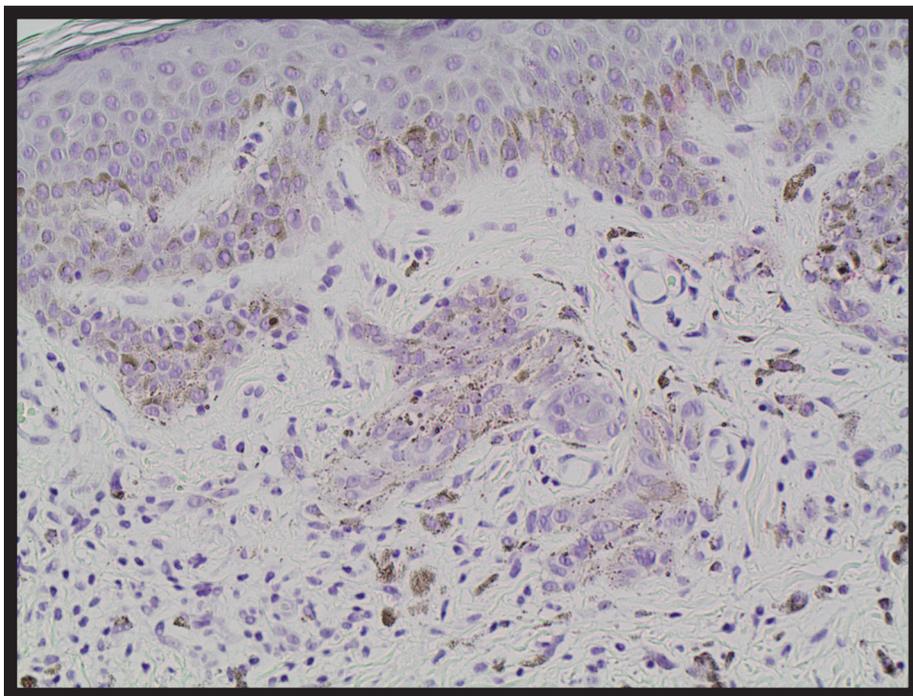


Abb. 35: Präparat Nr.: 4055/04, Vergr. 200x, Nävuszellgewebe, neg. Reaktion HMB-45, Score 0

3.3. Qualitätsparameter für MTAP, SOCS-3 und TFPI-2

Betrachtet man Sensitivität und Spezifität der Marker für das verwendete Gewebe, so untersucht man für den Parameter Sensitivität, wie viele an Hautkrebs erkrankte Patienten tatsächlich positiv auf das Vorliegen der Erkrankung getestet wurden. Für den Parameter der Spezifität soll eine Antikörperreaktion der Marker speziell für diese eine Krankheit, z.B. das MM, hervorgerufen werden können. Würde also von gesundem Gewebe dennoch eine positive Reaktion produziert, so wäre der Marker nicht mehr spezifisch.

In unserem Fall ergibt sich für das Gesamtkollektiv aus Primärtumoren, Lymphknoten und kutanen Metastasen lediglich für HMB-45 eine Berechnung der Sensitivität von nur 45% für die Färbestufe 2 als Beleg der tatsächlich positiv getesteten Gewebeproben auf das Vorliegen der Erkrankung mit vermehrter Zellaktivität.

Für die Sensitivität des Markers MTAP müssen wir umdenken entsprechend der möglichen Hypothese eines erhöhten Tumorprogress` bei geringerer Ausprägung des Markers im Gewebe.

Somit ergäbe sich eine Sensitivität von 67,5% für das Gesamtkollektiv, wenn wir die Färbestufen 0-1 zusammennehmen.

Betrachten wir die Sensitivität für SOCS-3 mit der gleichen Hypothese, wäre der Marker mit 35% wenig sensibel auf das Vorliegen der Erkrankung getestet.

Anders verhält es sich für TFPI-2 und seiner Inaktivierung mit verminderter Expression im Gewebe. Die Sensitivität, angelegt auf den Charakter der Malignität, ergibt hier 60%. Da wir auch mit dem Kontrollgewebe, abgesehen vom Nävusmaterial, keine „gesunden“ Patienten hatten, fällt eine Berechnung der Spezifität als Anteil der korrekt negativ Getesteten unter den nicht Erkrankten aus. Eine Berechnung wäre theoretisch möglich, falls SOCS-3 und TFPI-2 im Nävusmaterial eine Färbung der Intensitätsstufe 2 präsentieren würden als Hinweis auf eine nicht stattgefundenen Methylierung der DNS.

4. Diskussion

In den Niederschriften des berühmtesten Arztes der Antike „Hippokrates“, findet sich bereits um 400 vor Christus der erste Hinweis auf Melanome, als „tödliche schwarze Hautveränderungen mit Metastasen“ (Urteaga and Pack., 1966).

Im Jahre 1806 wurde die Erkrankung in der medizinischen Fakultät in Paris beschrieben und benannt. William Norris, ein englischer praktischer Arzt, machte 1820 erstmals in einem Manuskript darauf aufmerksam, daß Hautkrebs vererbbar sein könnte.

Die letzten 20 Jahre medizinischer Forschung bestätigten die frühe Theorie von W. Norris, daß genetische Veränderungen in bedeutender Weise die Ätiologie des Malignen Melanoms zu beeinflussen scheinen (Norris, 1820).

Für das Maligne Melanom wie für viele andere Krebsformen gelten sowohl genetische Prädisposition als auch Exposition gegenüber bestimmten Umwelteinflüssen als Risikofaktoren (MacKie, Freudenberger et al., 1989).

Da die Inzidenzrate für schwarzen Hautkrebs stetig zunimmt (Hemminki, Zhang et al., 2003), wollte man mit der in dieser Arbeit diskutierten Versuchsreihe an formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitten zu Prognosekriterien beitragen und im Rahmen molekulargenetischer Veränderungen nach Diagnose „Malignes Melanom“ immunhistochemisch neue biologische Marker testen, die ein eventuelles Fortschreiten der Erkrankung früh erkennen lassen und ein Metastasierungsrisiko besser greifbar machen sollten. Dabei stützten wir uns auf bereits in der Wissenschaft etablierte Vorhersagemodelle hinsichtlich der Einschätzung des Malignitätsgrades und verschiedener Wachstumsmuster von Hautkrebs. Dazu zählen Clark–Level, der Breslow–Index für die Tumordicke, hohe Tumorzellmitoserate, Kriterien der Ulzeration, vaskuläre Beteiligung, steigendes Alter, männliches Geschlecht, hämatogene oder lymphatische Streuung und die Lokalisation des Tumors am Körperstamm, Kopf oder Nacken (Balch, Gershenwald et al., 2009). Histologische Diagnosekriterien des Melanoms basieren auf bestimmten architektonischen Zellmustern und zellulären Atypien. Dabei finden verschiedene histologische Marker, die speziell auf Melanozyten oder melanozytäre Tumorzellen reagieren, Eingang in die nähere Untersuchung von Gewebeproben. S100B, MART–1 (melanoma antigen recognized by T cells 1), auch bekannt als MELAN A, und HMB–45 (= PMEL17/gp 100 silver homologSILV) gelten als „Goldstandard“ in der Routinediagnostik, allerdings mit teils geringer Spezifität, da auch

benigne melanozytäre Nävi gefärbt werden (Ohsie, Sarantopoulos et al., 2008).

MIA (Melanoma Inhibitory Activity) findet sich beispielsweise als ein Indikator speziell für progressive Melanome und wird seit Jahren auch für Therapiemodelle diskutiert (Schmidt and Bosserhoff, 2009).

Multiple Genmutationen, in der Summe maßgebend für veränderte Zellproliferation, Differenzierungsgrad und Zelltod, werden für verschiedene Krebsformen beschrieben (Hanahan and Weinberg, 2000). Beim Melanom wird die kritische Wachstumsphase und der Übergang in die vertikale Form (VGP) mit dieser Akkumulation genetischer Veränderungen in Verbindung gebracht (Clark, Elder et al., 1984). Da chromosomale Instabilität als einer der wesentlichen Faktoren für genomische Instabilität in bösartigen Tumorentitäten gilt, werden drei unterschiedliche, für genetische Veränderungen beim malignen Melanom erkannte chromosomale Lokalisationen mit den drei in dieser Arbeit untersuchten Markern diskutiert. Auf Chromosom 9p21 wird die Genfolge mit p15, p16, MTAP, Interferon α und Interferon β definiert (Olopade, Pomykala et al., 1995). Für MTAP, wie für SOCS-3 und TFPI-2 ist es die Inaktivierung der entsprechenden Gensequenz durch Hypermethylierung in der Promotorregion der eingangs erwähnten CpG-Inselgruppen, die zur Stilllegung der spezifischen Genexpression führt (Behrmann, Wallner et al., 2003). Der CDKN2A Locus (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A) / p16 auf 9p21 ist speziell involviert in Signalwege der Tumorsuppression und kontrolliert die G1 Phase des Zellzyklus (Sharpless and Chin, 2003). Homozygote Deletionen an diesem Ort werden für eine Reihe von Krebsarten mit erhöhter Malignität in Verbindung gebracht, so auch für das Maligne Melanom (Jonsson, Dahl et al., 2007). Ähnlich verhält es sich für TFPI-2 und der chromosomalen Lokalisation 7q22. Die Hypermethylierung in der Promotorregion verursacht eine Stilllegung der TFPI-2 Gensequenz. Da TFPI-2 an der Inhibition von Metalloproteinasen beteiligt scheint, wird vermehrtes Tumorwachstum der Melanomzellen erhöhter Aktivität der MMPs zugeschrieben. Kontrovers wird in neuesten Studien allerdings eine eventuelle protektive Funktion der MMPs, deren Familie beim Menschen 23 Gene umfasst, hinsichtlich der Tumorprogression beim malignen Melanom diskutiert. Im Speziellen erwähnt werden hier MMP8 und MMP27 (Palavalli, Prickett et al., 2009).

Hypermethylierung der Promotorregion von SOCS-3 auf Chromosom 17q25 und damit Stilllegung des Genproduktes verändert dessen Tumorsuppressorqualität.

Wir folgten in dieser Arbeit einer Studie von Tokita et al. (Tokita, Maesawa et al., 2007), worin der Expressionsgrad von SOCS-3 hinsichtlich gewisser Cytokin-Resistenz diskutiert wird. Im Rahmen der Tumorgenese werden hierbei regulatorische Faktoren für maligne Transformationen der Melanomzellen angesprochen, die u.a. den JAK/STAT Signalweg einschließen oder die Annahme beschreiben, daß die Stilllegung von SOCS-3 in Anti-Apoptose oder vermehrte Zellproliferation mündet und die Behandlung von Melanopatienten mit Interferon beeinflusst (Reu, Leaman et al., 2006).

Ziel unserer immunhistochemischen Untersuchungen war es, alle drei Marker auf ihre Eignung zu testen, eine Aussage hinsichtlich Prognose und Entwicklung des Tumorstadiums beim MM zuzulassen. Während des Prozesses der malignen Transformation erlangen die wachsenden Melanomzellen die Fähigkeit den normalen Zellverband und ihre „Mikroumgebung“ zu verlassen. Dabei spielen Zell-Zell- und Zell-Matrix Proteine eine große Rolle. Im Mittelpunkt der gegenwärtigen Forschung werden momentan neue biologische Marker gesucht, die sich entweder mit vermehrtem Wachstum der Tumorzellen oder dem Kriterium der vermehrten Invasion und Ausbruch aus ihrem Mikrozellverband in Verbindung bringen lassen (Villanueva and Herlyn, 2008). Um die Schwierigkeit zu verdeutlichen, welche Hürden zu nehmen sind auf dem Weg der klaren Diagnose und Prognose von Hautkrebs, sei eine erst jüngst veröffentlichte Studie erwähnt, die erstmals den Weg beschreitet zur Trennung von benignen melanozytären Läsionen und Melanomen auf molekularer Ebene. Dabei wurden fünf Marker, WNT2 (developmental WNT pathway member-2), FN1 (fibronectin), ARPC2 (actin-related protein 2/3 complex subunit 2), SPP1 (secreted phosphoprotein-1) und RGS1 (regulator of G-protein signaling 1) mit 95% Spezifität und 91% Sensitivität klassifiziert, die eine Differenzierung von gutartigen melanozytären Zellverbänden und malignen Melanomen zulassen (Kashani-Sabet, Rangel et al., 2009).

Diese Arbeit verdeutlicht auch, welche hohe Fallzahlen nötig sind, um aussagekräftige Formulierungen treffen zu können bez. molekularer Veränderungen oder prognostischer Vorhersagen. Hier waren es 693 Gewebeproben, bestehend aus Spitzzellnävi, Melanomen, Nävi und Melanomen, die als solche fehlinterpretiert waren.

Damit konnte die Publikation von Orchard et al. (Orchard, 2000) um entscheidende differentialdiagnostische Details auf molekularer Ebene erweitert werden.

Unser Kollektiv aus Gewebeproben bestand aus 30 Primärtumoren, sechs Lymphknoten-

und vier kutanen Metastasen. Wie bereits erwähnt konzentrierten wir uns in der Analyse der Färbestufen auf die Bereiche des Scores 0–1 als Zeichen einer verminderten Expression der Antigen–Antikörperreaktion. Entsprechend der Hypothese, daß eine geringe Ausprägung oder gar keine Färbung für einen untersuchten Marker eine besondere Schwere der Tumorform fordert, bzw. einen erhöhten Progress der Erkrankung bedeuten könnte, untersuchten wir eingangs den Zusammenhang zwischen Breslow–Index und Markerfärbung als Teil des geltenden Standard–Modells für eine höhere Tumordicke in Millimeter in direktem Zusammenhang zur Metastasierung in Lymphknoten und zum Übergang in ein gefährlicheres Tumorstadium (Lens, Dawes et al., 2002). Dabei konnte von uns kein Zusammenhang zwischen Breslow–Index und Ausprägung der Färbung für MTAP, SOCS–3 und TFPI–2 nachgewiesen werden. Immerhin zu bemerken ist, daß für eine schwach positive Färbung der Stufe 1 für SOCS–3 der Median der Tumordicke bei 2,9 mm lag und für TFPI–2 bei 3,0 mm. Daraus eine prognostische Tendenz der Tumorprogression abzuleiten, scheint uns verfrüht. Tab. 11 zeigt grün unterlegt die Färbescores der schwächsten Stufe.

Tab. 11: Ausprägung der niedrigsten Markerfärbung in den untersuchten Gewebeproben

| Färbeindex | | Primär-tumor | Lymph-knoten | Kutane Metastase | Färbeindex | | Primär-tumor | Lymph-knoten | Kutane Metastase |
|------------|---|--------------|--------------|------------------|------------|---|--------------|--------------|------------------|
| MTAP | 0 | 8 | 2 | 1 | TFP-2 | 0 | 8 | 3 | 0 |
| | 1 | 14 | 2 | 0 | | 1 | 11 | 1 | 1 |
| | 2 | 8 | 2 | 3 | | 2 | 11 | 2 | 3 |
| SOCS-3 | 0 | 1 | 1 | 0 | HMB-45 | 0 | 7 | 3 | 1 |
| | 1 | 10 | 1 | 1 | | 1 | 8 | 2 | 1 |
| | 2 | 19 | 4 | 3 | | 2 | 15 | 1 | 2 |

Für MTAP der Stufen 0–1 verzeichneten wir 22 Primärmelanome (73%) als negativ oder schwach positiv. Seit den von Mowen et al. (Mowen, Tang et al., 2001) und Behrman et al. (Behrman, Wallner et al., 2003) publizierten Studien zu dem Färbeverhalten von MTAP in benignen und malignen melanozytären Läsionen, war davon auszugehen, daß wir eine Verbindung finden würden zwischen abnehmendem Färbescore und vermehrter Malignität der Erkrankung in unseren Gewebeproben. Für unser Patientenkollektiv kann hierbei festgehalten werden, daß die Antigen–Antikörperreaktion für MTAP in den untersuchten Gewebeproben erfolgreich durchgeführt wurde und die chromosomale Lokalisation auf 9p21 als kritisch zu bewerten ist, was die Malignität für Melanome

anbelangt (Wild, Meyer et al., 2006). An dieser Stelle sei darauf verwiesen, daß zum gegenwärtigen Zeitpunkt drei chromosomale Lokalisationen eindeutig einem hohen Melanom-Risiko zugeschrieben werden. Darunter fallen 9p21 mit MTAP/CDKN2A, 16q24 mit MC1R (Melanocortin-1-Rezeptor) und 11q14-q21 mit TYR (Tyrosinase). Dabei werden MC1R und TYR mit vermehrtem Pigmentierungsgrad und erhöhter Sonnenempfindlichkeit der Haut in Verbindung gebracht (Bishop, Demenais et al., 2009). Für die Verteilung der Färbestufe 0–1 von TFPI-2 auf 19 Primärtumore (63%) ist zu erwähnen, daß deutlich mehr als die Hälfte der Primärmelanome einen Rückgang der Genexpression oder gar keine Expression für TFPI-2 zeigte. Damit unterstreicht diese Arbeit die These von Nobeyama et al. (Nobeyama, Okochi-Takada et al., 2007) in der die Hypermethylierung der Promotorregion auf Chromosom 7q22 als eine der Ursachen zur Steigerung der Invasivität von malignen Melanomen ausgewiesen wird. Wir können somit die frühe Publikation von Konduri et al. (Konduri, Tasiou et al., 2000) für amelanotische Melanome dahingehend erweitern, daß für in unserer Untersuchung verwandte Subtypen von Primärmelanomen, ein Rückgang der Genexpression verzeichnet werden konnte. Da beschrieben ist, daß TFPI-2 Expression u.a. durch UVB-Strahlung induziert wird und Apoptose Vorgänge in Gang setzen kann (Liu, Biddle et al., 2006), wird diesem Marker in zukünftiger Forschungsarbeit für das maligne Melanom noch weiter Gewicht verliehen werden. Jüngst publiziert für Lungenkrebs, wurde TFPI-2 beispielsweise eine entscheidende Rolle für vermehrte Expression der beschriebenen Matrix-Metalloproteinasen und ihrer Rolle für gesteigerte Invasion von Krebszellen in umgebendes Stromazellgewebe zugeschrieben (Gaud, Lochmann et al., 2009). Damit könnte verminderte TFPI-2 Genaktivität in direktem Zusammenhang mit einem höheren Metastasierungsgrad auch beim Malignen Melanom stehen. Prognosen dieses Typs lassen sich allerdings schwer für die Gewebeproben unseres Patientenkollektivs ableiten, da es sehr viel höherer Fallzahlen bedarf, um konkrete Aussagen treffen zu können. SOCS-3 präsentierte sich im Ganzen zehnmal schwach positiv und einmal negativ aus der Gruppe der 30 Primärtumoren. Es sei darauf hingewiesen, daß vornehmlich Gewicht auf den Grad der Färbung in Primärtumoren in dieser Arbeit gelegt wird, da sich Prognosen nur über die ursächliche Tumorentität ableiten lassen und Lymphknotenmetastasen zwar eine Absiedelung von Tumorzellen bedeuten, die vorliegenden Fallzahlen allerdings zusammen mit den kutanen Metastasen hierbei zu

gering erscheinen. Da weniger als die Hälfte der Patientenproben des Gewebetyps „Primärtumor“ für SOCS-3 negativ oder schwach positiv waren, läßt sich hieraus keinerlei Tendenz für gewisse proliferative Effekte der Stilllegung des Genproduktes dieses biologischen Markers auf den Krankheitsprogress des malignen Melanoms ableiten. Die Publikationen von Komyod et al. (Komyod, Bohm et al., 2007) und Tokita et al. (Tokita, Maesawa et al., 2007) gaben Anlass zu unserer Überlegung, diesen Marker in die Untersuchungen mitaufzunehmen, da Promotorhypermethylierung auf 17q25 in verschiedenen Krebsformen mit aggressivem Phänotyp bereits beschrieben ist (Niwa, Kanda et al., 2005). Da für SOCS-1 Expressionsstatus und Hypermethylierung in Malignen Melanomen nachvollzogen ist (Marini et al., 2006), wollte man die Antigen-Antikörperreaktion in unseren Gewebeproben experimentell testen und belegte eine Färbung mit diesem Marker, wie für MTAP und TFPI-2 auch, entsprechend einer positiven Färbung im Zytoplasma. Bestätigt werden kann hierbei die Qualität des Antikörpers als durchaus verwendbar für in Paraffin eingebettete Gewebeschnitte.

Weitergehende Forschung allerdings wird ans Licht bringen, inwieweit Suppression oder Stimulation von SOCS-3 die Immunantwort einzelner Patienten auf Interferon β und γ oder beispielsweise IL-6 beeinflussen kann. Würden wir der Hypothese von Tokita et al. (Tokita, Maesawa et al., 2007) folgen, so ergäbe sich für elf Primärtumorproben (36%) mit schwacher oder keiner Expression von SOCS-3, eine verminderte Responserate auf die Behandlung dieser Patienten mit Interferon. Dieser Ansatz ist mit Abschluß dieser Dissertation bis zum heutigen Tage als kontrovers zu diskutieren und wird weiterer Forschung bedürfen, um dezidiert entscheiden zu können, welchen Therapieansätze zu folgen ist für Patienten, bei denen eine Hypermethylierung der Promotorregion auf 17q25 nachgewiesen werden kann.

HMB-45 als Aktivitätsindex für Melanozyten färbte die Hälfte unseres Primärtumor-Kollektivs mit der Färbestufe 2 stark positiv. Damit wiesen wir, dem Goldstandard in der Diagnostik des malignen Melanoms folgend, 15 Primärläsionen (50%) als zellaktive Melanome aus. Die andere Hälfte der Gewebeproben zeigte nur eine geringe oder gar keine HMB-45 Färbung, ein Indiz dafür, daß diese Proben nicht zur Expression des nötigen Antigens fähig zu sein schienen. Setzte man die einzelnen Färbestufen und die Marker in Relation zueinander, so lieferten lediglich TFPI-2 und HMB-45 einen schwachen Zusammenhang mit $\kappa = 0,34$, ein eventuelles Anzeichen

TFPI-2 zusammen mit HMB-45 für die Bewertung von Primärmelanomen kombiniert werden sollte, würde man TFPI-2 als Marker verwenden wollen und dessen niedrigen Expressionsgrad invers mit einem hohen HMB-45 Index diskutieren.

Betrachten wir die Kontrollfärbung für die Gruppe der Basalzellkarzinome, so war auffallend, daß auch hier unsere Gewebeproben eine Antikörperreaktion mit SOCS-3 zeigten. Das Färbemuster erwies sich als durchwegs homogen im Zytoplasma.

Basaliome finden sich vornehmlich an lichtexponierten Stellen der menschlichen Haut. Ihre Entwicklung geht auf nichtverhornende Zellen in der Basalzellschicht der Epidermis zurück. Als „semi-maligner“ Tumor wird meist umliegendes Gewebe geschädigt und kann auch Knochen infiltriert werden, allerdings treten nur in den seltensten Fällen Metastasen auf (Nakayama, Tabuchi et al., 2011). In der Literatur ist ein Zusammenhang zwischen der Entstehung von Basaliomen und SOCS-3 Genexpression bisher nicht beschrieben worden. Daher fällt eine Interpretation der Ergebnisse schwer. Zu erwähnen ist an dieser Stelle, daß die Epidermis sich in Abhängigkeit des Transkriptionsfaktors p63 entwickelt, einem Mitglied der Familie der p53 Transkriptionsfaktoren (Lena, Shalom-Feuerstein et al., 2008). Es wird in weiterer Forschungsarbeit untersucht werden müssen, inwieweit sich die Stilllegung des Genproduktes für SOCS-3 via Transkriptionsfaktoren auf die Genese des Basalzellkarzinoms auswirkt.

In zwei Fällen zeigte TFPI-2 eine schwach positive Färbung im Gewebetyp der Basaliome. Diese Färbung ist zu konstatieren, allerdings finden sich in der Literatur keinerlei Hinweise auf eine Anfärbbarkeit von Gewebeproben aus Basalzellkarzinomen mit dem genannten Antikörper. Daher ist unserer Meinung nach der Marker nicht verwertbar für die Diagnostik dieses Tumortyps.

Innerhalb der Untersuchungsgruppe „Nävus“ präsentierte sich SOCS-3 sechsmal schwach positiv und vier Fälle lieferten keine Reaktion. TFPI-2 zeigte drei schwach positive und sieben Fälle ohne Reaktion. Mit diesem Ergebnis konnte für beide Marker eine Anfärbbarkeit in benignem melanozytärem Gewebe nachgewiesen werden. Auch hier zeigt sich kein Hinweis auf frühere Untersuchungen dieser Art. HMB-45 wies zwei Nävus-Proben als stark positiv und zellaktiv nach.

Die Färbereaktion in der Gruppe der Spinalzellkarzinome erwies sich durchaus als interessant. Formen des verhornenden Plattenepithelkrebs` treten in einer Reihe unterschiedlicher Gewebetypen auf. Darunter fallen die Haut, Lunge und

Mundschleimhaut. Obwohl alle Spinaliome epithelialen Ursprungs sind und sich eine gemeinsame Nomenklatur teilen, gibt es doch große Unterschiede der einzelnen Subtypen bzgl. Auftreten, Prognose und Behandlung (Gibb, Enfield et al., 2011).

Die Rolle von SOCS-3 als Mediator des JAK/STAT Signalweges ist bereits untersucht. In der Behandlung von Spinalzellkarzinomen wird SOCS-3 eine wichtige Rolle zugeschrieben, da gezeigt werden konnte, daß in verschiedenen Zelllinien aus Spinaliomen der Regionen Kopf und Hals (squamous cell carcinoma of the head and neck-SCCHN), Hypermethylierung in der Promotorregion von SOCS-3 dessen Protein-Expression stark unterdrückte (Weber, Hengge et al., 2005). Künstlich erhöhte Expression von SOCS-3 führte in dieser Studie zur direkten Induktion von Apoptose und einer Unterdrückung des Wachstums von Tumorzellen. Bekannt ist weiterhin, daß beschriebene SCCHN Zellen durch veränderte Signalwege von STAT-1 und STAT-3 der immunologischen Erkennung von speziellen T-Lymphozyten (tumor antigen-specific cytotoxic T lymphocytes-CTL) entkommen (Leibowitz, Andrade Filho et al.). Eine Summe von genetischen Veränderungen, ähnlich derer beim malignen Melanom, ist ursächlich für Entstehung und Entwicklung von Spinalzellkarzinomen. In dieser Arbeit konnten wir für SOCS-3 fünfmal eine stark positive Färbung verzeichnen, immerhin der Hälfte des untersuchten Probenmaterials. Eine positive Prognose für diese Patienten abzuleiten scheint verfrüht und es wird weiterer Forschungsarbeit bedürfen, den genauen Hypermethylierungsprozess dieser Gensequenz zu untersuchen und eine Korrelation mit dem weiteren Krankheitsverlauf und Metastasierungsgrad abzuleiten (Costello, Hong et al., 2009).

In allen Tumorstadien von Spinalzellkarzinomen treten signifikante chromosomale Aberrationen auf (Carless and Griffiths, 2008). Darüberhinaus wiesen jüngste Publikationen zehn Gensequenzen nach, die in dieser Tumorform dem Prozess der Methylierung unterliegen, darunter TFPI-2 (Tsunoda, Smith et al., 2009).

Mit der Verteilung auf fünf stark positive Antikörperreaktionen und fünf schwach reaktive Gewebeproben, ließ sich die Gruppe der Spinalzellkarzinome im Ganzen anfärben und eine Verwendung dieses Markers für unsere Versuchsreihe bestätigen. An dieser Stelle eine Bewertung für TFPI-2 vorzunehmen, scheint uns nicht einfach. Festzuhalten ist, daß zum gegenwärtigen Zeitpunkt 7q22 in die Forschung einzubeziehen ist und sich auch für zukünftige zielgerichtete Therapieansätze eignet. Für das

Plattenepithelkarzinom des Larynx wurde beispielsweise die Invasivität und Fähigkeit zur Formation des Tumors erfolgreich abgesenkt durch eine TFPI-2 Gensequenz, die mit einem Adenovirus verändert war (Ad-TFPI-2). Die Forschergruppe wurde hierbei von einem ektopen Mausmodell unterstützt. Ad-TFPI-2 konnte die TFPI-2 Expression in Larynxkarzinomzellen entscheidend erhöhen (Sun, Liu et al., 2008).

In diese Arbeit wurden experimentell drei unterschiedliche biologische Marker aufgenommen, um sie auf ihre Antigen-Antikörperreaktion in Paraffin eingebetteten Gewebeproben immunhistochemisch zu untersuchen.

Mit den gefundenen Ergebnissen unterstützen wir die laufende Forschungsarbeit hinsichtlich genetischer Alterationen, die immer entscheidender werden in Diagnostik, Prognose und gezielter Therapie für Patienten mit Hautkrebserkrankungen, speziell des Malignen Melanoms, von dessen weiterer Verbreitung in den nächsten Jahren auszugehen ist, zumal bereits allein für die Gruppe der nicht melanozytären Tumorformen weltweit zwischen drei und vier Millionen Erkrankungen verzeichnet werden (Erb, Ji et al., 2008).

5. Zusammenfassung

Das Maligne Melanom gilt als die aggressivste und lebensbedrohlichste Form von Hautkrebs. Neben der Diagnostik nach bekanntem Standard spielen die Immunhistochemie und, vornehmlich während der letzten zehn Jahre, molekulargenetische Methoden hinsichtlich onkogenetischer Mutationsrate und Genexpression in der Differenzierung der unterschiedlichen Melanomtypen für Bewertung und Prognose der Erkrankung eine große Rolle. Dabei gilt es, eine mögliche frühe Fernmetastasierung von Primärtumoren bereits in einem Stadium von Mikroläsionen zielgerichteter Therapie zugänglich zu machen. Der Mangel an Spezifität und Sensitivität der bis heute untersuchten biologischen Marker bedingt die noch unzureichende Zuverlässigkeit und Qualität. In vorliegender Studie wurden die chromosomalen Lokalisationen 9p21, 7q22 und 17q25 auf ihre mögliche Verbindung zur Ursächlichkeit und zukünftigen Prognose bei Patienten mit malignem Melanom mit den Markern MTAP, TFPI-2 und SOCS-3 immunhistochemisch überprüft. Auf der Basis epigenetischer Stilllegung durch Hypermethylierung der Promotorsequenzen untersuchten wir Genorte, die als Tumorsuppressorregionen ausgewiesen sind. Eine resultierende Verminderung der entsprechenden Proteinexpression in den Gewebeschnitten von 30 Primärtumoren, sechs Lymphknoten- und vier kutanen Metastasen wurde semiquantitativ mit den Färbescores 0-2 bewertet. Kontrollgewebe in Form von Proben aus Spinaliomen, Basalzellkarzinomen und benignem Nävusmaterial diente zur Differenzierung der Antigen-Antikörperreaktion mit den drei Markern. Unsere Ergebnisse weisen MTAP, TFPI-2 und SOCS-3 als wichtige Schnittstellen in den Signalwegen der Tumorsuppression für das Maligne Melanom nach. Eine geringe Stichprobengröße und mangelnde Spezifität der Antikörper lassen weitere Forschungsarbeit auf diesem Gebiet sinnvoll erscheinen. Für die Kontrollfärbung der Spinalzellkarzinome interpretieren wir SOCS-3 und TFPI-2 im Speziellen als mögliche Kandidaten eines maßgeschneiderten Therapiekonzeptes. Keiner der Antikörper eignet sich im Zusammenhang mit unserer Studie als „standalone“ Faktor im Vorhersagemodell von Tumorprogression und möglichem Metastasierungsgrad einer Primärläsion von schwarzem Hautkrebs. In der Kombination der drei Marker eine sichere Bewertung eines vermehrten Invasionscharakters für das Maligne Melanom zu sehen, scheint verfrüht.

Eine tatsächliche Unterscheidung zwischen Malignem Melanom und dem untersuchten Kontrollgewebe mit Hilfe der Antikörper zu führen, war nicht Gegenstand unserer Studie, allerdings haben die in dieser Form noch nicht in der Literatur beschriebenen Ergebnisse Auswirkung auf das Verständnis des Malignen Melanoms, seiner genetischen Besonderheiten und den Unterschieden zu nicht melanozytären Hautkrebsformen. Unser Anliegen war, die heute gängige Diagnostik und Therapie zu unterstützen. Ziel zukünftiger Forschung wird sein, mit korrekativer Gentherapie die Funktion von mutierten Genen wiederherzustellen oder den Verlust von Genen auszugleichen.

6. Literaturverzeichnis

- Adameyko, I., F. Lallemand, Aquino, J. B., Pereira, J. A., Topilko, P., Muller, T., Fritz, N., Beljajeva, A., Mochii, M., Liste, I., Usoskin, D., Suter, U., Birchmeier, C., Ernfors, P. (2009). "Schwann cell precursors from nerve innervation are a cellular origin of melanocytes in skin." *Cell* 139(2): 366-379.
- Alonso, S. R., P. Ortiz, Pollan, M., Perez-Gomez, B., Sanchez, L., Acuna, M. J., Pajares, R., Martinez-Tello, F. J., Hortelano, C. M., Piris, M. A., Rodriguez-Peralto, J. L. (2004). "Progression in cutaneous malignant melanoma is associated with distinct expression profiles: a tissue microarray-based study." *Am J Pathol* 164(1): 193-203.
- Balch, C. M., A. C. Buzaid, Atkins, M. B., Cascinelli, N., Coit, D. G., Fleming, I. D., Houghton, A., Jr., Kirkwood, J. M., Mihm, M. F., Morton, D. L., Reintgen, D., Ross, M. I., Sober, A., Soong, S. J., Thompson, J. A., Thompson, J. F., Gershenwald, J. E., McMasters, K. M. (2000). "A new American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma." *Cancer* 88(6): 1484-1491.
- Balch, C. M., J. E. Gershenwald, Soong, S. J., Thompson, J. F., Atkins, M. B., Byrd, D. R., Buzaid, A. C., Cochran, A. J., Coit, D. G., Ding, S., Eggermont, A. M., Flaherty, K. T., Gimotty, P. A., Kirkwood, J. M., McMasters, K. M., Mihm, M. C., Jr., Morton, D. L., Ross, M. I., Sober, A. J., Sondak, V. K. (2009). "Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification." *J Clin Oncol* 27(36): 6199-6206.
- Bataille, F., G. Rogler, Modes, K., Poser, I., Schuierer, M., Dietmaier, W., Ruemmele, P., Muhlbauer, M., Wallner, S., Hellerbrand, C., Bosserhoff, A. K. (2005). "Strong expression of methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) in human colon carcinoma cells is regulated by TCF1/[beta]-catenin." *Lab Invest* 85(1): 124-136.
- Bauer, J. and C. Garbe (2003). "Acquired melanocytic nevi as risk factor for melanoma development. A comprehensive review of epidemiological data." *Pigment Cell Res* 16(3): 297-306.
- Behrmann, I., Wallner, S., Komyod, W., Heinrich, P. C., Schuierer, M., Buettner, R., Bosserhoff, A. K. (2003). "Characterization of methylthioadenosin phosphorylase (MTAP) expression in malignant melanoma." *Am J Pathol* 163(2): 683-690.
- Bishop, D. T., F. Demenais, les, M. M., Harland, M., Taylor, J. C., Corda, E., Randerson-Moor, J., Aitken, J. F., Avril, M. F., Azizi, E., Bakker, B., Bianchi-Scarra, G., Bressac-de Pailleters, B., Calista, D., Cannon-Albright, L.A., Chin, A. Woeng T., Debniak, T., Galore-Haskel, G., Ghiorzo, P., Gut, I., Hansson, J., Hocevar, M., Hoiom, V., Hopper, J. L.,

- Ingvar, C., Kanetsky, P.A., Kefford, R. F., Landi, M. T., Lang, J., Lubinski, J., Mackie, R., Malvehy, J., Mann, G. J., Martin, N. G., Montgomery, G. W., van Nieuwpoort, F. A., Novakovic, S., Olsson, H., Puig, S., Weiss, M., van Workum, W., Zelenika, D., Brown, K. M., Goldstein, A. M., Gillanders, E. M., Boland, A., Galan, P., Elder, D. E., Gruis, N. A., Hayward, N. K., Lathrop, G. M., Barrett, J. H., Bishop, J. A. (2009). "Genome-wide association study identifies three loci associated with melanoma risk." *Nat Genet* 41(8): 920-925.
- Bliss, J. M., D. Ford, Swerdlow, A. J., Armstrong, B. K., Cristofolini, M., Elwood, J. M., Green, A., Holly, E. A., Mack, T., MacKie, R. M.. (1995). "Risk of cutaneous melanoma associated with pigmentation characteristics and freckling: systematic overview of 10 case-control studies. The International Melanoma Analysis Group (IMAGE)." *Int J Cancer* 62(4): 367-376.
- Bogenrieder, T. and M. Herlyn (2003). "Axis of evil: molecular mechanisms of cancer metastasis." *Oncogene* 22(42): 6524-6536.
- Breslow, A. (1970). "Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma." *Ann Surg* 172(5): 902-908.
- Buac, K., M. Xu, Cronin, J., Weeraratna, A. T., Hewitt, S. M., Pavan, W. J. (2009). "NRG1 / ERBB3 signaling in melanocyte development and melanoma: inhibition of differentiation and promotion of proliferation." *Pigment Cell Melanoma Res* 22(6): 773-784.
- Carless, M. A. and L. R. Griffiths (2008). „Cytogenetics of melanoma and nonmelanoma skin cancer.“ *Adv Exp Med Biol* 624: 227-240.
- Carmeliet, P. and R. K. Jain (2000). „Angiogenesis in cancer and other diseases.“ *Nature* 407(6801): 249-257.
- Chin, L., G. Merlino, DePinho, R. A. (1998). „Malignant melanoma: modern black plague and genetic black box.“ *Genes Dev* 12(22): 3467-3481.
- Chudnovsky, Y., P. A. Khavari, Adams, A. E. (2005). „Melanoma genetics and the development of rational therapeutics.“ *J Clin Invest* 115(4): 813-824.
- Clark, W. H., Jr., D. E. Elder, Guerry, D. th., Epstein, M. N., Greene, M. H., Van Horn, M. (1984). „A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma.“ *Hum Pathol* 15(12): 1147-1165.
- Costello, J. F., C. Hong, Plass, C., Smiraglia, D. J. (2009). „Restriction landmark genomic scanning: analysis of CpG islands in genomes by 2D gel electrophoresis.“ *Methods Mol Biol* 507: 131-148.

- Curtin, J. A., J. Fridlyand, Kageshita, T., Patel, H. N., Busam, K. J., Kutzner, H. Cho, K. H., Aiba, S., Brocker, E. B., LeBoit, P. E., Pinkel, D., Bastian, B. C. (2005). „Distinct sets of genetic alterations in melanoma.“ *N Engl J Med* 353(20): 2135-2147.
- de Snoo, F. A., M. W. Kroon, Bergman, W., Huurne, J. A., Houwing-Duistermaat, J. J., van Mourik, L., Snels, D. G., Breuning, M. H., Willemze, R., Frants, R. R., Gruis, N. A. (2007). „From sporadic atypical nevi to familial melanoma: risk analysis for melanoma in sporadic atypical nevus patients.“ *J Am Acad Dermatol* 56(5): 748-752.
- Erb, P., J. Ji, Kump, E., Mielgo, A., Wernli, M. (2008). „Apoptosis and pathogenesis of melanoma and nonmelanoma skin cancer.“ *Adv Exp Med Biol* 624: 283-295.
- Gaggioli, C. and E. Sahai (2007). "Melanoma invasion - current knowledge and future directions," *Melanoma invasion - current knowledge and future directions.* " *Pigment Cell Res* 20(3): 161-172.
- Garbe, C. (2007). „Deutsche Kurzleitlinie: Malignes Melanom /<http://www.adohomepage.de/index.php?ID=71>) Stand: 12.07.2007.“ *Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Onkologie.*
- Garbe, C., A. Paul, Kohler-Spath, H., Ellwanger, U., Stroebel, W., Schwarz, M., Schlagenhauff, B., Meier, F., Schitteck, B., Blaheta, H. J., Blum, A., Rassner, G. (2003). „Prospective evaluation of a follow-up schedule in cutaneous melanoma patients: recommendations for an effective follow-up strategy.“ *J Clin Oncol* 21(3): 520-529.
- Garbe, C., K. Peris, Hauschild, A., Saiag, P., Middleton, M., Spatz, A., Grob, J. J., Malvehy, J., Newton-Bishop, J., Stratigos, A., Pehamberger, H., Eggermont, A. (2009). „Diagnosis and treatment of melanoma: European consensus-based interdisciplinary guideline.“ *Eur J Cancer.*
- Garcia-Castellano, J. M., A. Villanueva, Healey, J. H., Sowers, R., Cordon-Cardo, C., Huvos, A., Bertino, J. R., Meyers, P., Gorlick, R. (2002). „Methylthioadenosine phosphorylase gene deletions are common in osteosarcoma.“ *Clin Cancer Res* 8(3): 782-787.
- Gaud, G., S. Iochmann, Guillon-Munos, A., Brillet, B., Petiot, S., Seigneuret, F., Touze, A., Heuze-Vourc'h, N., Courty, Y., Lerondel, S., Gruel, Y. Reverdiau, P. (2009). „TFPI-2 silencing increases tumour progression and promotes metalloproteinase 1 and 3 induction through tumour-stromal cell interactions.“ *J Cell Mol Med.*
- Gibb, E. A., K. S. Enfield, Tsui, I. F., Chari, R., Lam, S., Alvarez, C. E., Lam, W. L. „Deciphering squamous cell carcinoma using multidimensional genomic approaches.“ *J Skin Cancer* 2011: 541405.

- Giehl, K. A., U. Nagele, Volkenandt, M., Berking, C. (2007). „Protein expression of melanocyte growth factors (bFGF, SCF) and their receptors (FGFR-1, c-kit) in nevi and melanoma.“ *J Cutan Pathol* 34(1): 7-14.
- Gilchrest, B. (1999). „Anti-sunshine vitamin A.“ *Nat Med* 5(4): 376-377.
- Guerry, D. t., M. Synnestvedt, Elder, D. E., Schultz, D. (1993). „Lessons from tumor progression: the invasive radial growth phase of melanoma is common, incapable of metastasis, and indolent.“ *J Invest Dermatol* 100(3): 342S-345S.
- Haass, N. K., K. S. Smalley, Li, L., Herlyn, M. (2005). „Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma.“ *Pigment Cell Res* 18(3): 150-159.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). „The hallmarks of cancer.“ *Cell* 100(1): 57-70.
- Hemminki, K., H. Zhang, Czene, K. (2003). „Incidence trends and familial risks in invasive and in situ cutaneous melanoma by sun-exposed body sites.“ *Int J Cancer* 104(6): 764-771.
- Herlyn, M. (1990). „Human melanoma: development and progression.“ *Cancer Metastasis Rev* 9(2): 101-112.
- Hess, A. R., L. M. Postovit, Margaryan, N. V., Seftor, E. A., Schneider, G. B., Seftor, R. E., Nickoloff, B. J., Hendrix, M. J. (2005). „Focal adhesion kinase promotes the aggressive melanoma phenotype.“ *Cancer Res* 65(21): 9851-9860.
- Hewitson, T. D., B. Wigg, Becker, G. J. „Tissue preparation for histochemistry: fixation, embedding, and antigen retrieval for light microscopy.“ *Methods Mol Biol* 611: 3-18.
- Hofmann, U. B., J. R. Westphal, Van Muijen, G. N., Ruiter, D. J. (2000). „Matrix metalloproteinases in human melanoma.“ *J Invest Dermatol* 115(3): 337-344.
- Hong, C. S. and J. P. Saint-Jeannet (2005). „Sox proteins and neural crest development.“ *Semin Cell Dev Biol* 16(6): 694-703.
- Hou, L. and T. Takeuchi (1991). „Differentiation of extracutaneous melanocytes in embryos of the turtle, *Trionyx sinensis japonicus*.“ *Pigment Cell Res* 4(4): 158-162.
- Jhappan, C., F. P. Noonan, Merlino, G. (2003). „Ultraviolet radiation and cutaneous malignant melanoma.“ *Oncogene* 22(20): 3099-3112.
- Jonsson, G., C. Dahl, Staaf, J., Sandberg, T., Bendahl, P. O., Ringner, M., Guldborg, P., Borg, A. (2007). „Genomic profiling of malignant melanoma using tiling-resolution arrayCGH.“ *Oncogene* 26(32): 4738-4748.

- Kashani-Sabet, M., J. Rangel, Torabian, S., Nosrati, M., Simko, J., Jablons, D. M., Moore, D. H., Haqq, C., Miller, J. R., 3rd Sagebiel, R. W. (2009). „A multi-marker assay to distinguish malignant melanomas from benign nevi.“ *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(15): 6268-6272.
- Kittler, H., H. Pehamberger, Wolff, K., Binder, M. (2002). „Diagnostic accuracy of dermoscopy.“ *Lancet Oncol* 3(3): 159-165.
- Komyod, W., M. Bohm, Metze, D., Heinrich, P. C., Behrmann, I. (2007). „Constitutive suppressor of cytokine signaling 3 expression confers a growth advantage to a human melanoma cell line.“ *Mol Cancer Res* 5(3): 271-281.
- Konduri, S. D., C. N. Rao, Chandrasekar, N., Tasiou, A., Mohanam, S., Kin, Y., Lakka, S. S., Dinh, D., Olivero, W. C., Gujrati, M., Foster, D. C., Kisiel, W., Rao, J. S. (2001). „A novel function of tissue factor pathway inhibitor-2 (TFPI-2) in human glioma invasion.“ *Oncogene* 20(47): 6938-6945.
- Konduri, S. D., A. Tasiou, Chandrasekar, N., Nicolson, G. L., Rao, J. S. (2000). „Role of tissue factor pathway inhibitor-2 (TFPI-2) in amelanotic melanoma (C-32) invasion.“ *Clin Exp Metastasis* 18(4): 303-308.
- Larsen, L. and C. Ropke (2002). „Suppressors of cytokine signalling: SOCS.“ *APMIS* 110(12): 833-844.
- LeBoit PE, B. G., Weedon D, Sarasin A. Lyon (France): IARC Press; (2006). „Skin tumours. Pathology and genetics.“
- Leibowitz, M. S., P. A. Andrade Filho, Ferrone, S., Ferris, R. L. „Deficiency of activated STAT1 in head and neck cancer cells mediates TAP1-dependent escape from cytotoxic T lymphocytes.“ *Cancer Immunol Immunother*.
- Lena, A. M., R. Shalom-Feuerstein, Rivetti di Val Cervo, P., Aberdam, D., Knight, R. A., Melino, G., Candi, E. (2008). „miR-203 represses ‚stemness‘ by repressing DeltaNp63.“ *Cell Death Differ* 15(7): 1187-1195.
- Lens, M. B., M. Dawes, Newton-Bishop, J. A., Goodacre, T. (2002). „Tumour thickness as a predictor of occult lymph node metastases in patients with stage I and II melanoma undergoing sentinel lymph node biopsy.“ *Br J Surg* 89(10): 1223-1227.
- Li, Z., D. Metze, Nashan, D., Muller-Tidow, C., Serve, H. L., Poremba, C., Luger, T. A., Bohm, M. (2004). „Expression of SOCS-1, suppressor of cytokine signalling-1, in human melanoma.“ *J Invest Dermatol* 123(4): 737-745.
- Liu, T., D. Biddle, Hanks, A. N., Brouha, B., Yan, H., Lee, R. M., Leachman, S. A., Grossman, D. (2006). „Activation of dual apoptotic pathways in human melanocytes and protection by survivin.“ *J Invest Dermatol* 126(10): 2247-2256.

- Mackie, R. M., T. Freudenberger, Aitchison, T. C. (1989). „Personal risk-factor chart for cutaneous melanoma.“ *Lancet* 2(8661): 487-490.
- Marini, A., A. Mirmohammadsadegh, Nambiar, S., Gustrau, A., Ruzicka, T., Hengge, U. R. (2006). „Epigenetic inactivation of tumor suppressor genes in serum of patients with cutaneous melanoma.“ *J Invest Dermatol* 126(2): 422-431.
- Maser, R. S. and R. A. DePinho (2002). „Connecting chromosomes, crisis, and cancer.“ *Science* 297(5581): 565-569.
- McGovern, V. J., M. C. Mihm, Jr., Bailly, C., Booth, J. C., Clark, W. H., Jr., Cochran, A. J., Hardy, E. G., Hicks, J. D., Levene, A., Lewis, M. G., Little, J. H., Milton, G. W. (1973). „The classification of malignant melanoma and its histologic reporting.“ *Cancer* 32(6): 1446-1457.
- Mowen, K. A., J. Tang, Zhu, W., Schurter, B. T., Shuai, K., Herschman, H. R., David, M. (2001). „Arginine methylation of STAT1 modulates IFNalpha/beta-induced transcription.“ *Cell* 104(5): 731-741.
- Murakami, T., A. R. Cardones, Hwang, S. T. (2004). „Chemokine receptors and melanoma metastasis.“ *J Dermatol Sci* 36(2): 71-78.
- Nakayama, M., K. Tabuchi, Nakamura, Y., Hara, A., „Basal cell carcinoma of the head and neck.“ *J Skin Cancer* 2011: 496910.
- Niwa, Y., H. Kanda, Shikauchi, Y., Saiura, A., Matsubara, K., Kitagawa, T., Yamamoto, J., Kubo, T., Yoshikawa, H. (2005), „Methylation silencing of SOCS-3 promotes cell growth and migration by enhancing JAK/STAT and FAK signalings in human hepatocellular carcinoma.“ *Oncogene* 24(42): 6406-6417.
- Nobeyama, Y., E. Okochi-Takada, Furuta, J., Miyagi, Y., Kikuchi, K., Yamamoto, A., Nakanishi, Y., Nakagawa, H., Ushijima, T. (2007). „Silencing of tissue factor pathway inhibitor-2 gene in malignant melanomas.“ *Int J Cancer* 121(2): 301-307.
- Norris, W. (1820). „A case of fungoid disease.“ *Edinb. Med. Surg. J.* 16: 562-565.
- Ohsie, S. J., G. P. Sarantopoulos, Cochran, A. J., Binder, S. W. (2008). „Immunohistochemical characteristics of melanoma.“ *J Cutan Pathol* 35(5): 433-444.
- Olopade, O. I., H. M. Pomykala, Hagos, F., Sveen, L. W., Espinosa, R., 3rd, Dreyling, M. H., Gursky, S., Stadler, W. M., Le Beau, M. M., Bohlander, S. K. (1995). „Construction of a 2.8-megabase yeast artificial chromosome contig and cloning of the human methylthioadenosine phosphorylase gene from the tumor suppressor region on 9p21.“ *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(14): 6489-6493.

- Orchard, G. E. (2000). „Comparison of immunohistochemical labelling of melanocyte differentiation antibodies melan-A, tyrosinase and HMB 45 with NKIC3 and S100 protein in the evaluation of benign naevi and malignant melanoma.“ *Histochem J* 32(8): 475-481.
- Oshimo, Y., K. Kuraoka, Nakayama, H., Kitadai, Y., Yoshida, K., Chayama, K., Yasui, W. (2004). „Epigenetic inactivation of SOCS-1 by CpG island hypermethylation in human gastric carcinoma.“ *Int J Cancer* 112(6): 1003-1009.
- Palavalli, L. H., T. D. Prickett, Wunderlich, J. R., Wei, X., Burrell, A. S., Porter-Gill, P., Davis, S., Wang, C., Cronin, J. C., Agrawal, N. S., Lin, J. C., Westbroek, W., Hoogstraten-Miller, S., Molinolo, A. A., Fetsch, P., Filie, A. C., O'Connell, M. P., Banister, C. E., Howard, J. D., Buckhaults, P., Weeraratna, A. T., Brody, L. C., Rosenberg, S. A., Samuels, Y. (2009). „Analysis of the matrix metalloproteinase family reveals that MMP8 is often mutated in melanoma.“ *Nat Genet* 41(5): 518-520.
- Petersen, L. C., C. A. Sprecher, Foster, D. C., Blumberg, H., Hamamoto, T., Kisiel, W. (1996). „Inhibitory properties of a novel human Kunitz-type protease inhibitor homologous to tissue factor pathway inhibitor.“ *Biochemistry* 35(1): 266-272.
- Ramon y Cajal, S., S. Suster, Halaban, R., Filvaroff, E., Dotto, G. P. (1991). „Induction of different morphologic features of malignant melanoma and pigmented lesions after transformation of murine melanocytes with bFGF-cDNA and H-ras, myc, neu, and E1a oncogenes.“ *Am J Pathol* 138(2): 349-358.
- Reu, F. J., D. W. Leaman, Maitra, R. R., Bae, S. I., Cherkassky, L., Fox, M. W., Rempinski, D. R., Beaulieu, N., MacLeod, A. R., Borden, E. C. (2006). „Expression of RASSF1A, an epigenetically silenced tumor suppressor, overcomes resistance to apoptosis induction by interferons.“ *Cancer Res* 66(5): 2785-2793.
- Rubin, K. M. and D. P. Lawrence (2009). „Your patient with melanoma: staging, prognosis, and treatment.“ *Oncology (Williston Park)* 23(8 Suppl): 13-21.
- Ruiter, D. J., A. Spatz, van den Oord, J. J., Cook, M. G. (2002). „Pathologic staging of melanoma.“ *Semin Oncol* 29(4): 370-381.
- Schmidt, J. and A. K. Bosserhoff (2009). „Processing of MIA protein during melanoma cell migration.“ *Int J Cancer* 125(7): 1587-1594.
- Sharpless, E. and L. Chin (2003). „The INK4a/ARF locus and melanoma.“ *Oncogene* 22(20): 3092-2098.
- Sieber, O. M., K. Heinimann, Tomlinson, I. P. (2003). „Genomic instability--the engine of tumorigenesis?“ *Nat Rev Cancer* 3(9): 701-708.

- Singh, R. K., M. Gutman, Radinsky, R., Bucana, C. D., Fidler, I. J. (1994). „Expression of interleukin 8 correlates with the metastatic potential of human melanoma cells in nude mice.“ *Cancer Res* 54(12): 3242-3247.
- Sober, A. J., S. Kang, Barnhill, R. L. (1992). „Discerning individuals at elevated risk for cutaneous melanoma.“ *Clin Dermatol* 10(1): 15-20.
- Spatz, A., M. G. Cook, Elder, D. E., Piepkorn, M., Ruiter, D. J., Barnhill, R. L. (2003). „Interobserver reproducibility of ulceration assessment in primary cutaneous melanomas.“ *Eur J Cancer* 39(13): 1861-1865.
- Sun, Y., M. Liu, Xiao, Y., Tian, L. (2008). „[Inhibiting effects of TFPI-2 recombinant adenovirus on invasion of laryngeal squamous carcinoma].“ *Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi* 22(7): 315-317.
- Tanemura, A., A. M. Terando, Sim, M. S., van Hoesel, A. Q., de Maat, M. F., Morton, D. L., Hoon, D. S. (2009). „CpG island methylator phenotype predicts progression of malignant melanoma.“ *Clin Cancer Res* 15(5): 1801-1807.
- Tasiou, A., S. D. Konduri, Yanamandra, N., Dinh, D. H., Olivero, W. C., Gujrati, M., Obeyesekere, M., Rao, J. S. (2001). „A novel role of tissue factor pathway inhibitor-2 in apoptosis of malignant human gliomas.“ *Int J Oncol* 19(3): 591-597.
- Tokita, T., C. Maesawa, Kimura, T., Kotani, K., Takahashi, K., Akasaka, T., Masuda, T. (2007). „Methylation status of the SOCS3 gene in human malignant melanomas.“ *Int J Oncol* 30(3): 689-694.
- Tsao, H., M. B. Atkins, Sober, A. J. (2004). „Management of cutaneous melanoma.“ *N Engl J Med* 351(10): 998-1012.
- Tsunoda, S., E. Smith, De Young, N. J., Wang, X., Tian, Z. Q., Liu, J. F., Jamieson, G. G., Drew, P. A. (2009). „Methylation of CLDN6, FBN2, RBP1, RBP4, TFPI2, and TMEFF2 in esophageal squamous cell carcinoma.“ *Oncol Rep* 21(4): 1067-1073.
- Umwelt und Gesundheit aktuell, (2010). „Hautkrebs und UV-Strahlung“. Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit 1/2010: 1-4
- Urteaga, O. and G. T. Pack (1966). “On the antiquity of melanoma.” *Cancer* 19(5): 607-610.
- Vaisanen, A. H., M. Kallioinen, Turpeenniemi-Hujanen, T. (2008). “Comparison of the prognostic value of matrix metalloproteinases 2 and 9 in cutaneous melanoma.” *Hum Pathol* 39(3): 377-385.
- Villanueva, J. and M. Herlyn (2008). “Melanoma and the tumor microenvironment.” *Curr Oncol Rep* 10(5): 439-446.

- Viros, A., J. Fridlyand, Bauer, J., Lasithiotakis, K., Garbe, C., Pinkel, D., Bastian, B. C. (2008). "Improving melanoma classification by integrating genetic and morphologic features." *PLoS Med* 5(6): e120.
- Weber, A., U. R. Hengge, Bardenheuer, W., Tischoff, I., Sommerer, F., Markwarth, A., Dietz, A., Wittekind, C., Tannapfel, A. (2005). "SOCS-3 is frequently methylated in head and neck squamous cell carcinoma and its precursor lesions and causes growth inhibition." *Oncogene* 24(44): 6699-6708.
- Wild, P. J., S. Meyer, Bataille, F., Woenckhaus, M., Ameres, M., Vogt, T., Landthaler, M., Pauer, A., Klinkhammer-Schalke, M., Hofstaedter, F., Bosserhoff, A. K. (2006). "Tissue microarray analysis of methylthioadenosine phosphorylase protein expression in melanocytic skin tumors." *Arch Dermatol* 142(4): 471-476.
- Zucker, S. and J. Vacirca (2004). "Role of matrix metalloproteinases (MMPs) in colorectal cancer." *Cancer Metastasis Rev* 23(1-2): 101-117.

Danksagung

Ich bedanke mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Rüdiger Hein der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein des Klinikums rechts der Isar für die Wahl des Themas und die außerordentliche Betreuung während der Forschungszeit. Vielen Dank auch für die Unterstützung auf den Kongressreisen und für die Ermöglichung der Posterpräsentationen.

Mein großer Dank gilt in diesem Zusammenhang auch dem dermato–histologischen Labor der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein des Klinikums rechts der Isar und im Speziellen Frau Petra Carolin Müller für die Hilfestellung bei den immunhistochemischen Färbemethoden.

Ein herzliches Dankeschön möchte ich auch Frau Prof. Dr. A. Bosserhoff des pathologischen Instituts der Universität Regensburg aussprechen für die Bereitstellung der von ihr entwickelten Färbemethodik für MTAP.

Bedanken möchte ich mich darüber hinaus bei meinen Eltern, die mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

Curriculum Vitae

Angaben zur Person

Name: Florian Felix Pfaller
Geburtsdatum: 14. Dezember 1977
Geburtsort: Rosenheim
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung

- 1982 – 1987 Grundschule Frasdorf
- 1987 – 1997 Ignaz-Günther-Gymnasium Rosenheim
- 27.06.1997 Erwerb allgemeiner Hochschulreife

Zivildienst

August 1997 – August 1998

Studium

- WS 1998/99 Studium der Rechtswissenschaften, Universität Passau
- Nov. 1999 Exmatrikulation Universität Passau
- SS 2000 Studium der Humanmedizin, Universität München, LMU
- Sept. 2004 Ärztliche Vorprüfung, abgelegt (alte ÄAppO) Ludwig Maximilians Universität München
- Okt. 2009 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (neue ÄAppO), Technische Universität München
- Nov. 2009 Erlangen der Approbation und Anerkennung als Arzt durch die Regierung von Oberbayern in München
- seit Feb. 2010 Assistenzarzt in der Abteilung für Neurochirurgie, Klinikum Bogenhausen in München

Famulaturen

- Neurologie und Angiographie, University School of Medicine, Miami
- Chirurgie und Traumatologie, Azienda Sanitaria di Bolzano
- Plastische Chirurgie, Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein, München
- Praxisfamulatur Allgemeinmedizin

Praktisches Jahr

- Abteilung für Hämatologie und Infektiologie, Klinikum München Schwabing
- Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie, Klinikum München Schwabing
- Neuroradiologie, Neuro–Kopf–Zentrum MRI, Technische Universität München

Wissenschaftliche Arbeit

Facharbeit

„Das Wiskott–Aldrich Syndrom“
(Haunersches Kinderspital München, PD Dr. Michael Weiss)

Dissertation, 08/2007

Klinisch–experimentelle Arbeit zur Erfassung neuer, biochemischer Marker bei Patienten mit malignem Melanom unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. R. Hein, Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie, TU München.

Titel: Immunhistochemische Untersuchungen von Melanompräparaten mit MTAP, TFPI–2 und SOCS–3 als neue prognostische Marker oder Risikofaktoren

Posterpräsentationen:

- Oktober 2007, Canadian Melanoma Conference, Banff, Alberta, Vorstellung der Doktorarbeit, Vortrag und Posterpräsentation. Titel: Silenced Genes tune up the Volume: immunohistochemical Studies for new prognostic Markers (MTAP, SOCS-3, TFPI-2) as relevant to metastatic Progression in Patients with malignant Melanoma.
Pfaller FA, *Bosserhoff A, Ring J, Hein R
Department of Dermatology and Allergology, Technical University, Munich;
*Institute of Pathology, University of Regensburg, Germany
- Oktober 2008, The Hague, The Netherlands, Perspectives in Melanoma XII, Posterpräsentation.