

2. Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

Die vorliegende Arbeit nimmt die Auswertung der Krankheitsverläufe und der RT-PCR-Analysen von 146 Patienten in den Tumorstadien I und II mit histologisch gesichertem, malignem Melanom vor, die in der Hautklinik des UKBF Berlin stationär oder –im Rahmen der Melanomnachsorge- ambulant betreut wurden. Die Stadieneinteilung erfolgte entsprechend den Empfehlungen der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Onkologie (ADO) und der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft (DDG) (Orfanos et al. 1994). Die Angabe über die Länge der Nachbeobachtungszeit bezieht sich jeweils auf das zuletzt durchgeführte Staging.

Das Vergleichskollektiv bildeten 9 Kontroll-Patienten (3 gesunde Probanden und 6 Patienten mit anderen dermatologischen Erkrankungen).

2.1.1 Stadieneinteilung bei der Erstdiagnose

Zum Zeitpunkt der Blutentnahme für die RT-PCR-Analysen befanden sich 100 Patienten aus dem vorliegenden Patientenkollektiv im Stadium I, davon 49 im Stadium Ia und 51 im Stadium Ib, und 46 Patienten im Stadium II der Erkrankung, davon 36 im Stadium IIa und 10 im Stadium IIb.

Stadium	Ia		Ib		IIa		IIb		Zusammen	
	abs.	%	abs.	%	abs.	%	abs.	%	abs.	%
Patientenzahl	49	33,56	51	34,93	36	24,66	10	6,85	146	100

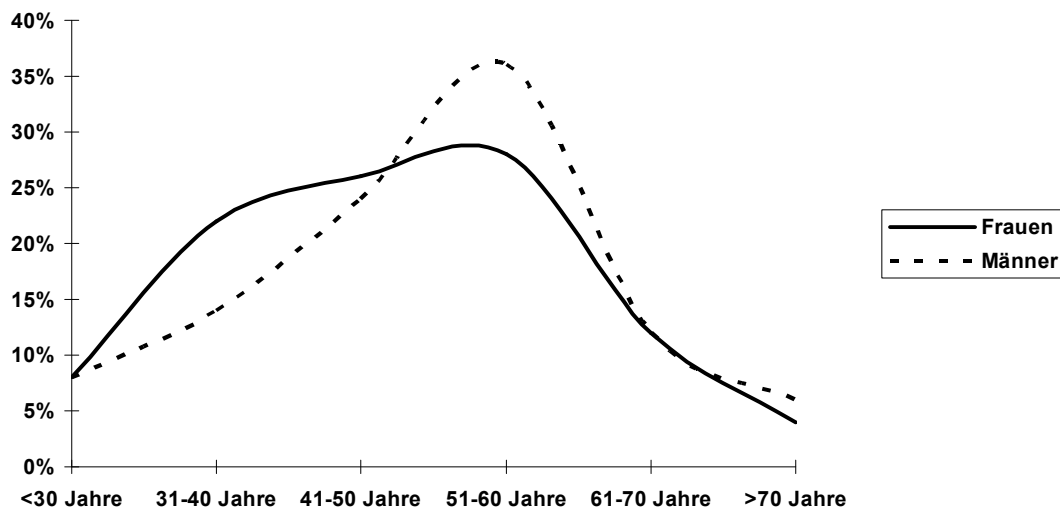
2.1.2 Geschlechtsverteilung

Im Stadium I waren von 100 Patienten 50 weiblich und 50 männlich. Hiermit war die Geschlechtsverteilung mit einem Verhältnis von 50% zu 50% ausgeglichen.

Im Stadium II waren von 46 Patienten 20 weiblichen und 26 männlichen Geschlechts. Das zeigte mit einem Verhältnis von 43,48% zu 56,52% ein Überwiegen des männlichen Geschlechts.

2.1.3 Altersverteilung

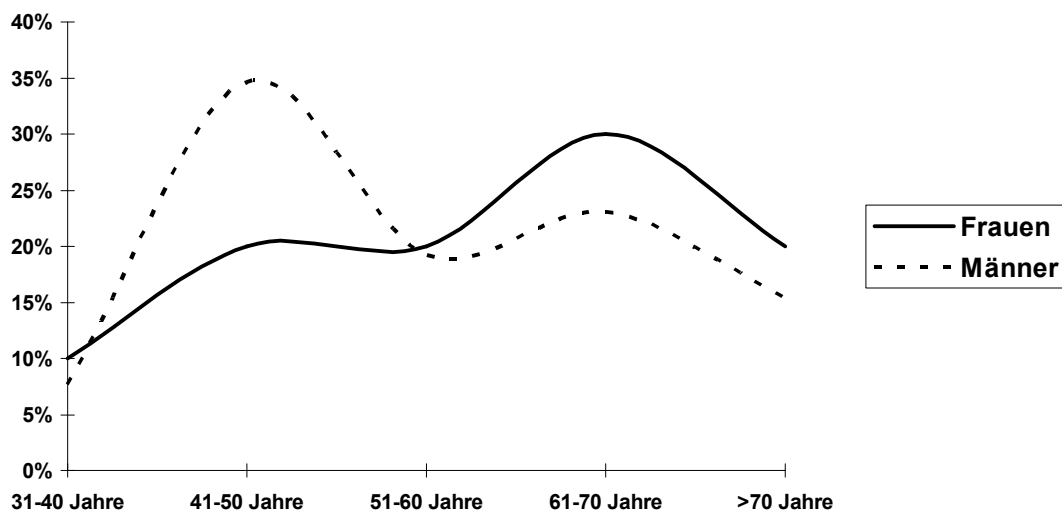
Im Stadium I betrug das durchschnittliche Alter bei der Diagnosestellung 49,67 Jahre. Der jüngste Patient war 22 und der älteste 86 Jahre alt. Bei den männlichen Patienten lag das Durchschnittsalter mit 51,2 Jahren bei Diagnosestellung um 3,06 Jahre höher als bei den weiblichen, bei denen im Durchschnitt mit 48,14 Jahren die erste Diagnose gestellt wurde. Bei beiden Geschlechtern zeigt die Altersverteilung jeweils einen Gipfel in der 5. Lebensdekade.



Alter der Patienten bei Diagnosestellung im Stadium I

Im Stadium II wurde das durchschnittliche Alter von 58 Jahren festgestellt. Der jüngste Patient war 33 und der älteste 86 Jahre alt. Mit 58,85 Jahren lag das Durchschnittsalter bei den weiblichen Patienten um 1,5 Jahre höher als bei den männlichen, die im Durchschnitt mit

57,35 Jahren zur ersten Diagnose kamen. Bei beiden Geschlechtern ist eine deutlich zweigipfelige Altersverteilung mit den Gipfeln in der 4. und 6. Lebensdekade zu sehen.

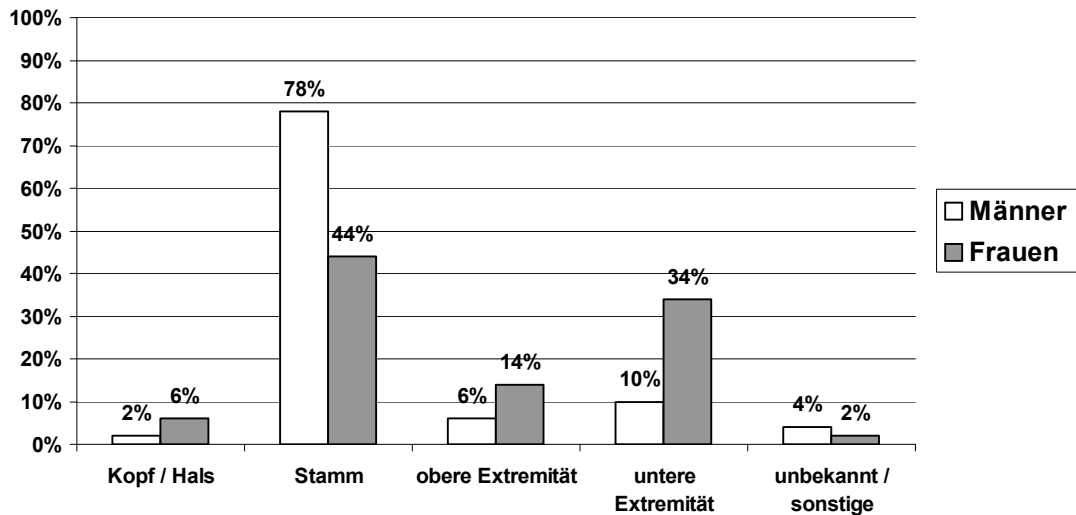


Alter der Patienten bei Diagnosestellung im Stadium II

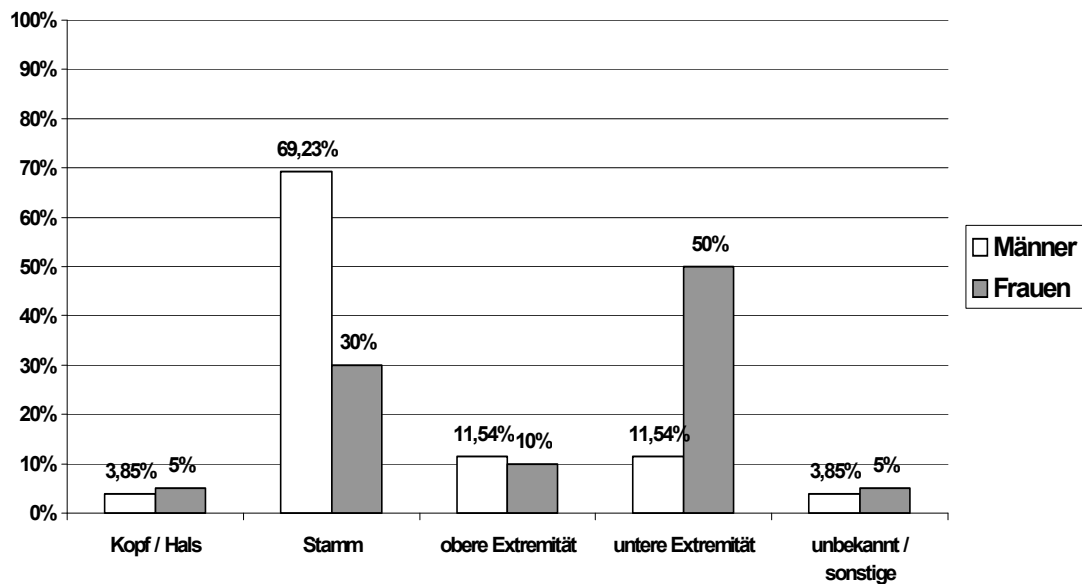
2.1.4 Differenzen der anatomischen Lokalisation des Primärtumors nach Geschlecht

Bei Betrachtung der Lokalisation des Primärtumors werden Geschlechtsunterschiede in der Melanomverteilung in unserem Patientenkollektiv deutlich. Während bei den Männern die Melanome mit 78% im Stadium I und 69,23% im Stadium II vor allem am Stamm diagnostiziert wurden, waren bei den Frauen anteilmäßig Stamm (44% im Stadium I und

30% im Stadium II) und untere Extremität (jeweils 34% und 50%) als Lokalisationsort des Primärtumors sehr häufig.



Lokalisation des Primärtumors im Stadium I



Lokalisation des Primärtumors im Stadium II

2.1.5 Tumordicke bei der Diagnosestellung

Bei der Untersuchung der Daten bezüglich der Tumordicke nach Breslow ergab sich folgendes Bild: die durchschnittliche Tumordicke betrug im vorliegenden

Patientenkollektiv zum Zeitpunkt der Diagnosestellung 0,76 mm im Stadium I und 3,54 mm im Stadium II. Der Median lag bei 0,77 mm im Stadium I und bei 2,44 mm im Stadium II.

Geschlechtsbezogen variierte die Tumordicke nur geringfügig. Im Stadium I betrug die durchschnittliche Tumordicke bei den Männern 0,81 mm (Median 0,76 mm) und bei den Frauen 0,71 mm (Median 0,78 mm). Im Stadium II wurde eine durchschnittliche Tumordicke von 3,27 mm (Median 2,44 mm) bei den Männern und 3,90 mm (Median 2,45 mm) bei den Frauen festgestellt.

Der Gipfel in der Altersverteilung der Melanompatienten mit der Tumordicke bis 4 mm lag zwischen dem 40. und 60. Lebensjahr. Bei der Tumordicke > 4 mm wurde ein deutlicher Gipfel in der 7. Lebensdekade festgestellt.

2.1.6 Histologischer Tumortyp

Im Stadium I war das superfiziell spreitende Melanom (SSM) in unserem Patientenkollektiv mit 57% am häufigsten vertreten, gefolgt vom nodulären Melanom (NM) mit 8%, dem Lentigo-maligna Melanom (LMM) mit 3% und dem akrolentiginösen Melanom (ALM) mit nur 1%. Unter der Angabe „sonstige Melanome“ wurden Schleimhautmelanome, Melanome auf großen kongenitalen Naevi, nicht genau klassifizierbare und nicht klassifizierte Melanome zusammengefasst. Der Anteil der Patienten, bei denen ein sonstiger histologischer Melanomsubtyp diagnostiziert wurde oder der Melanomtyp nicht bestimmt wurde, beträgt 31%.

Histologischer Tumortyp	Männer		Frauen		Zusammen	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
SSM	29	58	28	56	57	57
NM	4	8	4	8	8	8
LMM	2	4	1	2	3	3
ALM	0	0	1	2	1	1
Sonstige / unbekannt	15	30	16	32	31	31
Zusammen	50		50		100	

Im Stadium II war das noduläre Melanom (NM) mit einem Anteil von 41,30% der häufigste histologische Subtyp, gefolgt vom superfiziell spreitenden Melanom (SSM), dessen Anteil mit 23,91% recht hoch war. Auf das akrolentiginöse Melanom (ALM) entfielen 10,87% und auf das Lentigo-maligna Melanom (LMM) 2,17%. Der Anteil an sonstigen und unbekanntem Melanomtypen beträgt 21,74%.

Histologischer Tumortyp	Männer		Frauen		Zusammen	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
SSM	7	26,92	4	20	11	23,91
NM	13	50	6	30	19	41,30
LMM	1	3,85	0	0	1	2,17
ALM	2	7,69	3	15	5	10,87
Sonstige / unbekannt	3	11,54	7	35	10	21,74
Zusammen	26		10		46	

2.1.7 Staging

Die medizinische Betreuung der Melanompatienten erfolgte in der Klinik und Poliklinik für Dermatologie des Universitätsklinikums Benjamin Franklin der Freien Universität Berlin stationär oder –im Rahmen der Melanomnachsorge- ambulant. Die reguläre Nachsorge im

Rahmen der Staginguntersuchungen bei den Melanompatienten im Stadium des Primärtumors umfaßt im UKBF in der Regel einen Zeitraum von 10 Jahren. Die Nachsorgeuntersuchungen werden in den ersten 5 Jahren vierteljährlich und im 6. bis 10. Jahr halbjährlich durchgeführt. Zu den Basisuntersuchungen im Rahmen des Stagings zählen neben der klinischen Untersuchung (Inspektion, Palpation), Blutuntersuchung (Blutbild, Differentialblutbild, Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit, Transaminasen, GT, LDH, Kreatinin, Harnstoff), Lymphknoten-sonographie, Röntgen-Thorax, Oberbauchsonographie.

2.1.8 Therapie

Die Therapieplanung der Melanompatienten in dem von uns untersuchten Patientenkollektiv erfolgte individuell. Dadurch ergab sich neben der Exzision des Primärtumors eine Vielzahl von immuntherapeutischen und chemotherapeutischen Behandlungsformen.

Von den 3 Tyrosinase-positiven progredienten Patienten im Stadium I der Erkrankung erhielten 2 außer Exzision des Primärtumors keine weiteren immuntherapeutischen oder chemotherapeutischen Behandlungsformen. Der dritte Patient erhielt eine Chemotherapie.

Von den 2 Tyrosinase-negativen progredienten Patienten im Stadium I erhielt einer außer Exzision des Primärtumors keine weiteren immuntherapeutischen oder chemotherapeutischen Behandlungsformen. Der zweite Patient erhielt eine Immuntherapie mit Interferon- α .

Von den 5 Tyrosinase-positiven, progredienten Patienten im Stadium II der Erkrankung erhielt einer außer Exzision des Primärtumors keine weiteren immuntherapeutischen oder chemotherapeutischen Behandlungsformen. Drei Patienten erhielten eine Chemotherapie. Einer erhielt eine Immuntherapie.

Von den 8 Tyrosinase-negativen progredienten Patienten im Stadium II erhielten 2 außer Exzision des Primärtumors keine weiteren immuntherapeutischen oder chemotherapeutischen Behandlungsformen. Drei Patienten erhielten eine Chemotherapie.

Material und Methoden

Zwei Patienten erhielten eine kombinierte Therapie (Chemotherapie und Immuntherapie mit Interferon). Einer erhielt eine Immuntherapie mit Interferon.

Da der Einfluß der einzelnen Therapeutika auf die RT-PCR für Tyrosinase-mRNA noch nicht genügend untersucht und nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist, wird hierauf nicht näher eingegangen.

2.2 Übersicht des methodischen Vorgehens

Da die RT-PCR-Bestimmung nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist, wird die Methode in diesem Kapitel nur kurz beschrieben (Abbildung 3).

Blutentnahme 3x 5ml

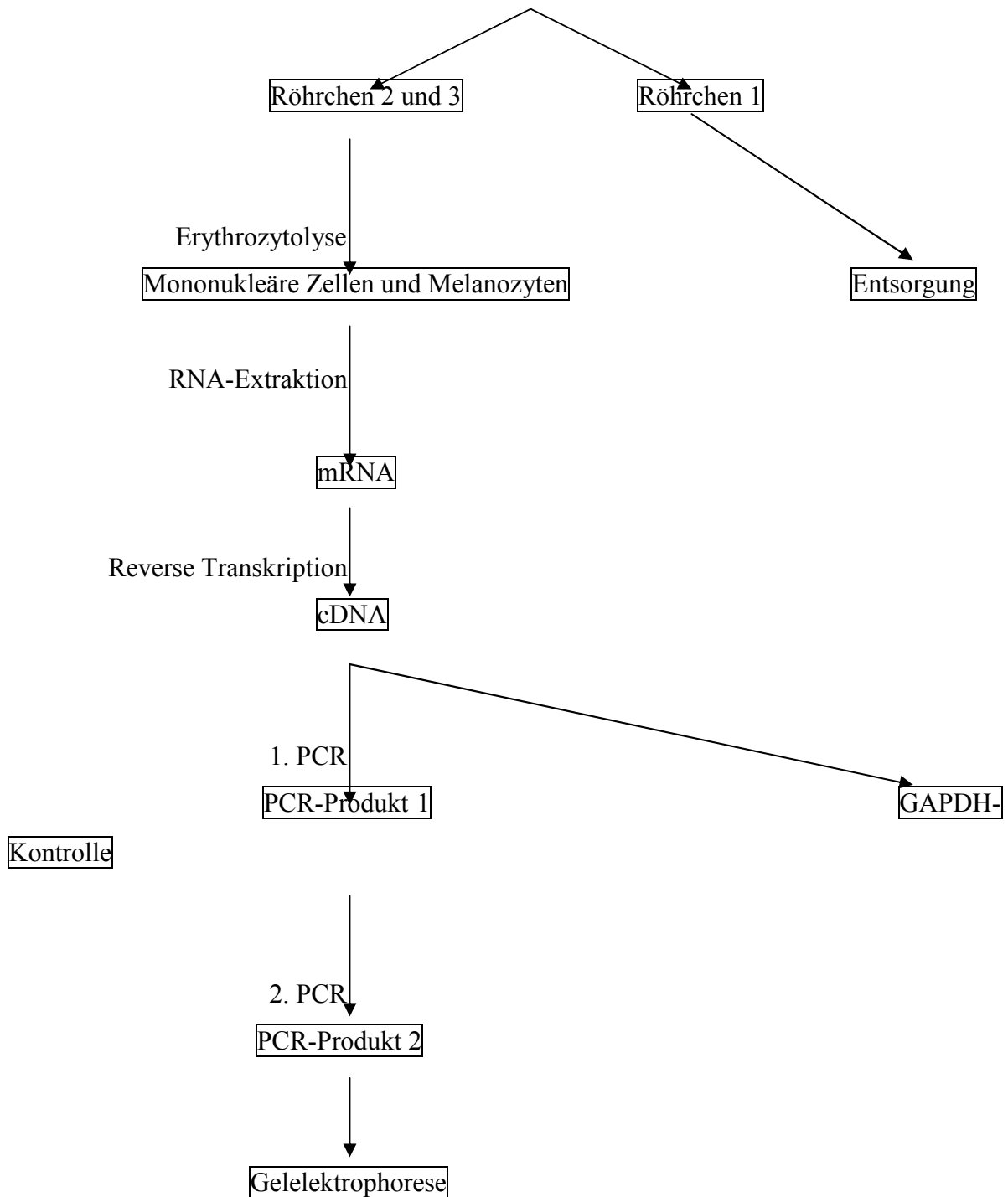


Abbildung 3: Einzelne Schritte bei der RT-PCR-Bestimmung.

Nach der Blutentnahme aus einer Armvene wurden die entnommenen Blutproben in Zentrifugenröhrchen überführt, in denen sich Erythrozytolyse-Puffer befanden. Das Gemisch wurde für 15 Minuten im Eisbad aufbewahrt und dabei wiederholt geschüttelt. Danach wurden die Proben 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Das Pellet aus den verbliebenen mononukleären Zellen wurde nach zweimaligem Waschen mit sterilem PBS-Puffer (phosphatgepufferte Salzlösung) und jeweiligem Zentrifugieren in Eppendorf-Röhrchen überführt und bis zur weiterer Aufbereitung tiefgefroren.

Die RNA-Isolierung erfolgte mittels eines handelsüblichen auf der Methode nach Chomczynski und Sacchi (Chomczynski und Sacchi 1987) basierenden RNA-Isolierungssets.

Ausgangsmaterial bildeten mononukleäre Zellen, die durch Erythrozytolyse gewonnen und danach bei 70°C aufbewahrt wurden.

Nach dem raschen Auftauen wurde das Zellpellet mit Denaturierungslösung suspendiert. Folgend wurde das Gemisch bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde nach der aufeinander folgenden Zugabe von Natriumacetat, wassergesättigtem Phenol und Chloroform-Isoamylalkohol kräftig geschüttelt und, um eine komplette Dissoziation des Nukleoproteinkomplexes zu ermöglichen, für 15 Minuten im Eisbad aufbewahrt. Die folgende 20 Minuten dauernde Zentrifugation führte zur Trennung des Gemisches in drei Phasen. In der unteren organischen und in der Interphase sammelten sich DNA und Proteine, während die obere wässrige Phase, die etwa 40-50% des Gesamtvolumens ausmachte, die RNA enthielt. Durch vorsichtiges Abpipettieren wurde die RNA separiert. Anschließend wurde der Inhalt der Eppendorf-Röhrchen mit der gleichen Menge von Isopropanol versetzt und für mindestens 1h bei -20°C zur Ausfällung belassen. Nach einer erneuten Zentrifugation und Abpipettieren des Überstandes wurde das RNA-haltige Pellet mit Denaturierungslösung und Isopropanol resuspendiert. Nach einer weiteren Ruhepause für mindestens 1h bei -20°C zur Präzipitation mit anschließender Zentrifugation und Abheben des Überstandes wurden die Präzipitate zwei Mal mit Ethanol gewaschen und erneut 10 Minuten zentrifugiert, um das Pellet von den Salzresten zu befreien. Nach einer Rotationsvakuumtrocknung wurden die Pellets in RNase-freiem Wasser aufgelöst. Der

RNA-Gehalt wurde spektrophotometrisch bestimmt. Bis zur Weiterverarbeitung wurden die Proben bei -20°C konserviert.

Für den Nachweis exprimierter Tyrosinase-mRNA mit Hilfe der PCR wurde die isolierte mRNA zunächst mittels reverser Transkriptase in ein doppelsträngiges Hybridmolekül aus RNA und cDNA umgeschrieben. Für die cDNA-Synthese wurde zelluläre Gesamt-RNA eingesetzt. Die Berechnung erfolgte mittels photometrischer RNA-Gehaltsbestimmung.

Dazu erfolgte eine Verdünnung der gelösten RNA mit RNase-freiem Wasser und Verteilung in Mikrozentrifugenröhrchen. Zur Denaturierung der RNA wurden die Proben in einem programmierbaren Thermocycler für 10 Minuten bei 70°C inkubiert, anschließend abgekühlt und zentrifugiert.

In der Zwischenzeit erfolgte die Präparation des Reaktionsansatzes für die reverse Transkription.

Jede Probe wurde im Reaktionsatz versetzt und bei 42°C für 2 Minuten inkubiert.

Danach wurde dem Gemisch reverse Transkriptase hinzugegeben. Es folgte eine Inkubation für 10 Minuten bei 25°C sowie für 50 Minuten bei 42°C.

Durch anschließendes Erhitzen auf 70°C für 15 Minuten wurde eine Inaktivierung des Enzyms erreicht.

Bis zur Amplifikation wurde die cDNA nach einer schnellen Abkühlung bei -20°C gelagert. Mittels des PCR-Verfahrens werden bei geeigneten Reaktionsbedingungen *in-vitro* bestimmte DNA-Sequenzen, die von der Primersequenz bzw. deren komplementärer Sequenz eingerahmt werden, vervielfältigt. Das Verfahren entspricht in seinem Ablauf der natürlichen DNA-Replikation in Zellen, die einzelnen Reaktionsschritte werden aber in kurzer Zeit sehr oft wiederholt, wodurch die spezifischen DNA-Sequenzen exponentiell amplifiziert werden.

Für die PCR wurden Aqua injectable mit dNTP-Mix, äußere Primer (outer primer) HTYR1 und HTYR2, thermostabile rekombinante DNA-Polymerase, MgCl₂ und PCR-Puffer auf Eis gemischt und in die einzelnen Eppendorf-Röhrchen pipettiert. Danach wurde cDNA zugesetzt, welche mittels der oben beschriebenen reversen Transkription synthetisiert wurde. Anschließend wurden die Ansätze mit Mineralöl bedeckt, um ein Verdunsten zu verhindern. Durch zweiminütiges Erhitzen des Gemisches in einem automatischen

Thermocycler auf 94°C wurde eine Denaturierung der DNA-Doppelstränge erreicht. Es entstanden einzelsträngige DNA-Matrizenmoleküle. Bei der anschließenden Senkung der Temperatur für 1 Minute auf 60°C wurde die Primer-Hybridisierung an komplementäre Sequenzen des DNA-Stranges erreicht. Im nächsten Schritt erfolgte durch Erhöhung der Temperatur auf 72°C für 2 Minuten eine Polymerisierung der Einzelstrang-DNA zu Doppelstrang-DNA durch komplementäre Anlagerung der einzelnen Oligonukleotide, die von der hitzestabilen Polymerase katalysiert wurde.

Der gesamte Zyklus (Trennung der DNA-Doppelstränge, Binden der Primer an die komplementäre DNA-Regionen und Synthese neuer Stränge) wurde 35 mal wiederholt, wobei die Produkte des Vorherigen Zyklus als Matrize dienen.

Die gesuchten Sequenzen können aus folgenden Gründen aber nicht beliebig lange exponentiell vermehrt werden:

Die Enzymmenge ist begrenzt.

Die Aktivität der Enzyme nimmt im Laufe der Reaktion durch Denaturierung ab.

Der molare Überschuß des PCR-Produktes limitiert die Reaktion, die der Michaelis-Menten-Kinetik unterliegt.

Mit zunehmender Konzentration neigen die Stränge zur Hybridisierung untereinander, so dass dadurch Schwierigkeiten zur Anlagerung der Primer entstehen.

Aus diesen Gründen ist zur weiteren Erhöhung der Sensitivität der PCR-Methode eine sogenannte „nested PCR“ nötig. Als Matrize für die nested PCR dient das Produkt, das in der ersten PCR-Runde entstanden ist. Die Primer einer nested PCR hybridisieren innerhalb der Bindungsstellen, die innerhalb der von dem ersten Primerpaar begrenzten Sequenz liegen. Wenn nur wenige oder eine Zelle zur Verfügung stehen und das gesuchte Gen schwach exprimiert wird, kann das nach der ersten PCR trotz millionenfacher Amplifizierung unter die Nachweisgrenze fallen. Die nested PCR steigert durch eine nochmalige exponentielle Vervielfältigung die Sensitivität erheblich.

Nested Primer erhöhen nicht nur die Sensitivität sondern auch die Spezifität der PCR-Reaktion. Die Wahrscheinlichkeit, dass unerwünschte Sequenzen vervielfacht werden, erhöht sich mit der Anzahl der PCR-Zyklen. Sie kann aber gesenkt werden, indem zwei aufeinander folgende PCR-Runden durchgeführt werden und dazu zwei unterschiedliche Primerpaare eingesetzt werden. Zur Konstruktion der beiden Primerpaare dient die bekannte

Sequenz. Die inneren Primer (nested Primer) liegen dabei innerhalb des Bereichs, der mit dem ersten Paar vervielfältigt wurde. Es ist eher unwahrscheinlich, dass die mit Hilfe der äußeren Primer (outer Primer) vervielfältigten DNA-Bereiche Sequenzen enthalten, an denen die inneren Primer hybridisieren können. Somit werden bei der zweiten PCR-Runde selektiv Fragmente amplifiziert, welche die gewünschte Sequenz enthalten (Abbildung 4).

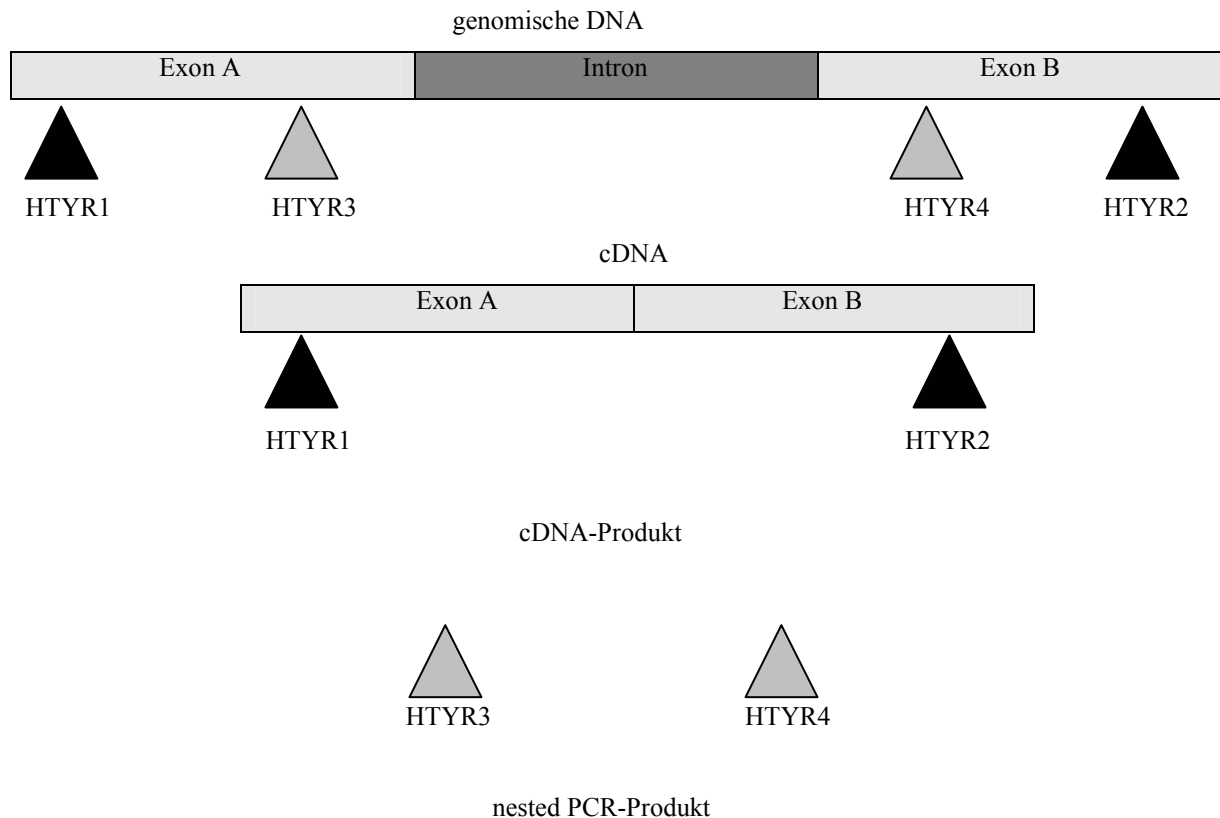


Abbildung 4: nested PCR-Produktion.

Für die nested PCR wurden das aus der ersten PCR-Runde erhaltene Produkt mit Aqua injectable verdünnt. Ein Teil von dem verdünnten Produkt wurde wiederum zu Aqua injectable, dNTP-Mix, den inneren Primer (nested Primer) HTYR3 und HTYR4, DNA-Polymerase, $MgCl_2$ und PCR-Puffer hinzugefügt. Der Ansatz wurde mit Mineralöl bedeckt. Die Reamplifikation erfolgte in einem Thermocycler.

GAPDH (Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) ist ein Gen, das in nahezu allen Zelltypen und Geweben exprimiert wird. Deswegen eignet sich der Nachweis der mRNA-Expression von GAPDH zur Erfolgskontrolle der beschriebenen Arbeitsschritte

(Erythrolyse, RNA-Isolation und reverse Transkription). Da es in großer Anzahl transkribiert wird, wird nur eine einstufige PCR durchgeführt.

Die Ablesung der PCR-Resultate erfolgte mittels der elektrophoretischen Auftrennung und Detektion mittels UV-Transluminations. Diese Technik basiert auf der Tatsache, dass DNA bei neutralem pH-Wert negativ geladen ist und somit, wenn ein elektrisches Feld an ein Agarosegel angelegt wird, durch dessen Poren zum positiven Pol wandert. Das Agarosegel verlangsamt dabei die Wanderungsgeschwindigkeit. Gleich große Moleküle bewegen sich im Gel gleich schnell, und weil kleinere DNA-Fragmente schneller wandern als größere, trennen sie sich in Banden gleichgroßer Fragmente. Auf diese Weise werden gleich große DNA-Fragmente aufgetrennt.

Nach der Amplifikation das PCR-Produkt mit Gel loading-Buffer vermischt und in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Als im UV-Licht fluoreszierende Farbsubstanz diente Ethidiumbromid. Die elektrophoretische Trennung erfolgte bei 125 Volt über ca. 40 Minuten. Die Fragmente wurden mit Hilfe der UV-Transluminations sichtbar gemacht und photographisch dokumentiert.

2.3 Positive Kontrollen

Zur Bestimmung der Sensitivität der einzelnen RT-PCR-Analysen für Tyrosinase-mRNA wurden Positivkontrollen der etablierten, humanen Melanomzelllinien SkMel-19 und SkMel-

28 (Carey et al. 1976) in absteigenden Konzentrationen in Normalblut der gesunden Probanden untersucht.

Die Proben der Verdünnungsreihe wurden entsprechend dem Vorgehen für die Patientenproben den einzelnen Arbeitsschritten unterzogen (Erythrozytolyse, RNA-Isolation, reversen Transkription und PCR).

2.4 Statistische Methoden

Die Dateneingaben und Auswertungen wurden mit dem Programm SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) für Windows durchgeführt. Als Signifikanzniveau wurde $p < 0,05$ festgelegt. Der Zusammenhang zwischen dem positiven Nachweis von Tyrosinase-mRNA im Blut und der darauf folgenden Progression des malignen Melanoms wurde mit dem Kaplan-Meier-Verfahren (Kaplan und Meier 1958) auf statistische Signifikanz geprüft. Als „abgeschlossen“ wurden die Fälle klassifiziert, bei denen eine Progression des malignen Melanoms nach der Diagnosestellung festgestellt wurde. In der Analyse wurde der Verlauf der progressionsfreien Zeit (in Monaten) in den Gruppen mit negativem und positivem PCR-Nachweis der Tyrosinase-mRNA miteinander verglichen.

Gemäß dem Kaplan-Meier-Verfahren wurden die Zielereignisse (Eintreffen einer Progression) zu den k Zeitpunkten t_0, t_1, \dots, t_k beobachtet. Die Anzahl der zu diesen Zeitpunkten progredient gewordenen Patienten wird mit d_1, d_2, \dots, d_k bezeichnet. Die Anzahl der unmittelbar vor einem Zeitpunkt t_i noch nicht progredient gewordenen Patienten, die also unter dem Risiko stehen, zum Zeitpunkt t_i progredient zu werden, wird r_i genannt. Die bedingte Wahrscheinlichkeit q_i , zum Zeitpunkt t_i progredient zu werden, lässt sich durch

$$q_i = d_i / r_i$$

schätzen. Die bedingte Wahrscheinlichkeit, auch zum Zeitpunkt t_i nicht progredient zu bleiben, bezeichne ich mit

$$p_i = 1 - q_i = (r_i - d_i) / r_i$$

Die Wahrscheinlichkeit, zu dem Zeitpunkt t_i nicht progredient zu werden, berechnet sich dann als die Wahrscheinlichkeit p_1 , zunächst zu dem Zeitpunkt t_1 nicht progredient zu werden, multipliziert mit der Wahrscheinlichkeit p_2 , dann auch noch zu dem Zeitpunkt t_2 nicht progredient zu bleiben usw.. Allgemein beträgt die geschätzte Funktion Nichteintreffens einer Progression $S(t)$ für einen der Zeitpunkte t_i

$$S(t_i) = p_1 \times p_2 \times \dots \times p_i$$

Mit $t_0 = 0$, $S(t_0) = S(0) = 1$ läßt sich die Rechenvorschrift auch folgendermaßen formulieren:

$$S(t_i) = p_1 S(t_{i-1}) = S(t_{i-1}) \times (r_i - d_i) / r_i$$