

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Bedeutung der Bcl-2-Proteinsuperfamilie für die Progression
des malignen Melanoms

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Christoph Eichhorn
aus Jena

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. rer. nat. J. Eberle
2. Prof. Dr. med. H. Dürkop
3. Prof. Dr. med. M. Kunz

Datum der Promotion: 20.11.2009

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich insbesondere meinem Doktorvater Herrn Dr. Eberle für seine gute und engagierte Betreuung danken. Mit konstruktivem Rat und unermüdlicher Bereitschaft, Fragestellungen zu diskutieren, trug er maßgeblich zur Verbesserung dieser Arbeit bei.

Für die hilfreiche Beratung, speziell in Zusammenhang mit histologischen Fragestellungen, gilt mein besonderer Dank Herrn Dr. Röwert. Außerdem möchte ich mich bei Herrn Dr. Trefzer für Materialien und klinische Daten bedanken.

Bei allen Gutachtern bedanke ich mich herzlich für das Lesen und Beurteilen dieser Arbeit.

Mein Dank gilt außerdem allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe „Apoptose in Hauttumoren“, die mich bei der Entstehung dieser Arbeit begleitet haben. Insbesondere seien dabei Lothar, Frank, Conny, Amir, Bahtier und Jeannine genannt.

Meiner gesamten Familie, insbesondere meiner Mutter, danke ich für die vielen motivierenden Worte, die Geduld und finanzielle Unterstützung. Meiner langjährigen Lebensgefährtin gilt mein Dank für den ständigen Rückhalt, den sie mir durch ihre verständnisvolle Art geben konnte.

Erklärung

„Ich, Christoph Eichhorn, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Bedeutung der Bcl-2-Proteinsuperfamilie für die Progression des malignen Melanoms“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

1	<u>Einleitung</u>	1
1.1	Das maligne Melanom der Haut	1
1.1.1	<i>Epidemiologie</i>	1
1.1.2	<i>Ätiologie und Pathogenese</i>	1
1.1.3	<i>Klinische Diagnostik und Klassifikation</i>	3
1.1.4	<i>Prognostische Parameter</i>	6
1.1.5	<i>Therapie</i>	7
1.2	Apoptose	8
1.2.1	<i>Allgemeines</i>	8
1.2.2	<i>Extrinsische Signalwege</i>	10
1.2.3	<i>Intrinsische Signalwege</i>	11
1.2.3.1	<i>Bedeutung der Mitochondrien für intrinsische Signalwege der Apoptose</i>	11
1.2.3.2	<i>Regulation intrinsischer Apoptosewege durch Proteine der Bcl-2-Superfamilie</i>	12
1.2.3.3	<i>Nachgeschaltete Signalwege</i>	16
1.2.4	<i>Bedeutung der Bcl-2-Superfamilie für die Kanzerogenese</i>	17
1.3	Aufgabenstellung der Arbeit	19
2	<u>Material und Methoden</u>	
2.1	Materialien	20
2.1.1	<i>Lösungen und Chemikalien</i>	20
2.1.2	<i>Materialien für SDS-Page</i>	21
2.1.3	<i>Materialien für Western-Blot-Analyse</i>	22
2.1.4	<i>Materialien für Immunodetektion</i>	23
2.1.5	<i>Materialien für Immunhistologie (APAAP)</i>	24
2.1.6	<i>Geräte und andere Materialien</i>	26
2.2	Methoden	26
2.2.1	<i>SDS-Page</i>	26
2.2.2	<i>Western-Blot-Analyse</i>	27
2.2.3	<i>Immunodetektion</i>	28
2.2.4	<i>Immunhistochemie (APAAP)</i>	29
2.3	Statistische Auswertung	31
3	<u>Ergebnisse</u>	
3.1	Vorversuche Bcl-2	33
3.1.1	<i>Hohe Spezifität des Anti-Bcl-2-Antikörpers in der Western-Blot-Analyse</i>	33
3.1.2	<i>Geringe Farbintensität der immunhistologischen Färbung bei allen getesteten Antikörper-Verdünnungen</i>	33
3.1.3	<i>Höhere Farbintensität bei verlängerter Inkubationszeit des Fuchsin-Substrat-Chromogen-Systems</i>	35
3.2	Bcl-2-Expression in Primärtumoren und Metastasen	36
3.2.1	<i>Geringere Bcl-2-Expression in Metastasen</i>	36
3.2.2	<i>Verlust von Bcl-2 in korrespondierenden Metastasen der Männern</i>	39
3.2.3	<i>Verlust von Bcl-2 in korrespondierenden Metastasen dickerer Primärtumore (T3/T4)</i>	40
3.2.4	<i>Erhöhte Bcl-2-Expression in Metastasen von Primärtumoren mit Clark-Level IV</i>	42

3.2.5	<i>Verlust von Bcl-2 in korrespondierenden Metastasen ulzerierter Primärtumore</i>	43
3.3	Vorversuche Mcl-1	45
3.3.1	<i>Unterschiedliche Spezifität getesteter Mcl-1-Antikörper in der Western-Blot-Analyse</i>	45
3.3.2	<i>Beste Auswertbarkeit der immunhistologischen Färbung bei einer Verdünnung des Primärantikörpers von 1:800</i>	46
3.4	Mcl-1-Expression in Primärtumoren und Metastasen	48
3.4.1	<i>Häufiger Verlust von Mcl-1 in korrespondierenden Metastasen</i>	48
3.4.2	<i>Verlust von Mcl-1 in korrespondierenden Metastasen von Männern</i>	50
3.4.3	<i>Verlust von Mcl-1 in korrespondierenden Metastasen dickerer Primärtumore (T3/T4)</i>	51
3.4.4	<i>Mcl-1-Expression unabhängig vom Clark-Level</i>	53
3.4.5	<i>Mcl-1-Expression unabhängig vom Ulzerationsgrad des Primärtumors</i>	53
3.5	Vorversuche Bax	55
3.5.1	<i>Unterschiedliche Spezifität getesteter Antikörper gegen Bax in der Western-Blot-Analyse</i>	55
3.5.2	<i>Geringe Unterschiede in der immunhistologischen Färbung bei unterschiedlichen Antikörpern gegen Bax</i>	56
3.5.3	<i>Vergleichbare Untersuchungsergebnisse bei unterschiedlichen Verdünnungen des Primärantikörpers</i>	58
3.6	Bax-Expression in Primärtumoren und Metastasen	60
3.6.1	<i>Mäßiger Verlust von Bax in korrespondierenden Metastasen</i>	60
3.6.2	<i>Bax-Expression in primären Melanomen und Metastasen unabhängig vom Geschlecht</i>	62
3.6.3	<i>Verlust von Bax in korrespondierenden Metastasen dickerer Primärtumore (T3/T4)</i>	62
3.6.4	<i>Mäßiger Verlust von Bax in korrespondierenden Metastasen mit zunehmender Invasionstiefe des Primärtumors</i>	63
3.6.5	<i>Verlust von Bax in korrespondierenden Metastasen ulzerierter Primärtumore</i>	64
3.7	Vorversuche Bak	66
3.7.1	<i>Unterschiedliche Spezifität getesteter Bak-Antikörper in der Western-Blot-Analyse</i>	66
3.7.2	<i>Verbesserte Ergebnisse in der immunhistologischen Färbung bei Exposition des primären Antikörpers über Nacht</i>	67
3.8	Bak-Expression in Primärtumoren und Metastasen	70
3.8.1	<i>Keine Änderung der Expression von Bak in korrespondierenden Metastasen</i>	70
3.8.2	<i>Verlust von Bak in Metastasen männlicher Patienten</i>	73
3.8.3	<i>Häufiger Verlust von Bak in korrespondierenden Metastasen dickerer Primärtumore (T3/T4)</i>	74
3.8.4	<i>Zunahme der Bak-Expression in Metastasen mit steigendem Clark-Level des Primärtumors</i>	76
3.8.5	<i>Häufige Zunahme der Bak-Expression in korrespondierenden Metastasen ulzerierter Primärtumore</i>	77
3.9	Vorversuche PUMA	79

3.9.1	<i>Hohe Spezifität des Anti-PUMA-Antikörpers in der Western-Blot-Analyse</i>	79
3.9.2	<i>Durchgehende PUMA-Expression in allen Primärtumoren</i>	79
3.10	PUMA-Expression in Primärtumoren und Metastasen	81
3.10.1	<i>Häufiger Verlust von PUMA in korrespondierenden Metastasen</i>	81
3.10.2	<i>Häufiger Verlust von PUMA in Metastasen männlicher Patienten</i>	83
3.10.3	<i>Häufiger Verlust von PUMA in korrespondierenden Metastasen dickerer Primärtumore (T3/T4)</i>	85
3.10.4	<i>Verlust von PUMA in Metastasen von Primärtumoren mit geringer Invasionstiefe (Clark-Level III)</i>	86
3.10.5	<i>PUMA-Expression unabhängig vom Ulzerationsgrad</i>	87
3.11	Vorversuche Noxa	89
3.11.1	<i>Eindeutige Identifizierung von Noxa in der Western-Blot-Analyse</i>	89
3.11.2	<i>Beste Auswertbarkeit der immunhistologischen Färbung bei einer Verdünnung Primärantikörpers von 1:1000</i>	89
3.12	NOXA-Expression in Primärtumoren und Metastasen	91
3.12.1	<i>Verlust von Noxa in korrespondierenden Metastasen</i>	91
3.12.2	<i>Verlust von Noxa in korrespondierenden Metastasen weiblicher Patienten</i>	93
3.12.3	<i>Mäßiger Verlust von Noxa in korrespondierenden Metastasen dickerer Primärtumore (T3/T4)</i>	94
3.12.4	<i>Häufiger Verlust von Noxa in korrespondierenden Metastasen von Primärtumoren mit Clark-Level IV/V</i>	95
3.12.5	<i>Häufiger Verlust von Noxa in korrespondierenden Metastasen ulzerierter Primärtumore</i>	97
4	<u>Diskussion</u>	99
4.1	Bedeutung antiapoptotischer Bcl-2-Proteine für die Progression des malignen Melanoms	100
4.1.1	<i>Bcl-2-Expression und Progression</i>	100
4.1.2	<i>Mcl-1-Expression und Progression</i>	102
4.2	Antiapoptotische Bcl-2-Proteine in der Tumorthherapie	103
4.3	Bedeutung proapoptotischer Bcl-2-Proteine für die Progression des malignen Melanoms	104
4.3.1	<i>Bax-Expression und Progression</i>	104
4.3.2	<i>Bak-Expression und Progression</i>	105
4.3.3	<i>PUMA-Expression und Progression</i>	106
4.3.4	<i>Noxa-Expression und Progression</i>	107
4.4	Proapoptotische Bcl-2-Proteine in der Tumorthherapie	109
4.5	Limitationen der Arbeit und Ursachen für Diskrepanzen mit Ergebnissen anderer Autoren	109
4.6	Fazit	111
5	<u>Zusammenfassung</u>	113
6	<u>Literaturverzeichnis</u>	116
7	<u>Curriculum Vitae</u>	125

1. Einleitung

1.1 Das maligne Melanom der Haut

1.1.1 Epidemiologie

Beim malignen Melanom der Haut handelt es sich um einen bösartigen Tumor, dessen Entstehung durch die neoplastische Umwandlung epidermaler Melanozyten erfolgt. Weltweit findet sich eine steigende Inzidenz des kutanen Melanoms in allen kaukasischen Populationen, wodurch es inzwischen ein wesentliches Problem der öffentlichen Gesundheit darstellt [Lens, 2008]. In Europa verzeichnet Skandinavien die höchste Inzidenzrate, in mediterranen Ländern ist sie am niedrigsten [Garbe et al, 2001]. Andere Teile der Welt wie die USA oder Australien weisen eine deutlich höhere Inzidenz auf.

In Deutschland betrug die altersstandardisierte Inzidenz im Jahr 2004 bei Männern etwa 13, bei Frauen 16 Fälle pro 100.000 Einwohner und Jahr, wobei trotz steigender Inzidenz die Sterblichkeit seit den 1970er Jahren keine wesentliche Veränderung zeigte [Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V (Hrsg.), 2008]. Dies ist wahrscheinlich auf verbesserte Präventionsmaßnahmen zurückzuführen.

Die Tumor-spezifische 10-Jahresüberlebensrate beträgt bei Primärtumoren ohne Nachweis von Metastasen 75%-85% [Garbe et al, 2007] und sinkt nach erfolgter Metastasierung drastisch ab. Während die meisten Melanome bei Patienten im Alter von 50 bis 60 Jahren diagnostiziert werden, finden sich auch etwa 22% aller diagnostizierten Melanome bei Patienten vor dem vierzigsten Lebensjahr [Garbe et al, 2001]. Neben Alter und Geschlecht beeinflusst auch die ethnische Herkunft die Häufigkeit der Neuerkrankungen beim malignen Melanom. Bei der hellhäutigen Bevölkerung liegen die Inzidenzraten deutlich höher als bei Afroamerikanern, amerikanischen Ureinwohnern und Asiaten [Cormier et al, 2006]. Menschen mit positiver Familienanamnese, einer größeren Zahl kutaner Nävi sowie mit schweren Sonnenbränden in der Kindheit besitzen ein signifikant erhöhtes Risiko für die Entstehung eines malignen Melanoms [Cho et al, 2005].

1.1.2 Ätiologie und Pathogenese

Die Ätiologie des malignen Melanoms ist bis heute weitgehend ungeklärt. Von den bekannten Umwelteinflüssen ist bei der Entstehung die UV-Exposition von besonders hohem Stellenwert.

Dabei war zunächst nicht klar, welchen Rang hierbei Muster und Zeitintervall der UV-Exposition einnehmen [Walter et al, 1999]. Es konnte jedoch mit Hilfe von epidemiologischen Studien gezeigt werden, dass das Risiko, ein malignes Melanom zu entwickeln, nicht mit der kumulativen, sondern der intermittierenden Sonnenexposition assoziiert zu sein scheint [Leiter et al, 2008]. Einen starken UV-assoziierten Risikofaktor zur Entwicklung eines malignen Melanoms stellt die Exposition mit hoher, Sonnenbrand verursachender UV-Strahlung während der Kindheit dar [Marks, 2000]. Auch die regelmäßige Nutzung künstlicher Bräunungsanlagen erhöht das Risiko einer Melanomentstehung [Walter et al, 1990]. Trotz der Bedeutung der intermittierender UV-Exposition für die Genese eines malignen Melanoms kann auch chronische Exposition die Ausbildung bestimmter Subtypen unterstützen. Es konnte gezeigt werden, dass Melanome im Bereich des Kopfes und Nackens eher mit chronischer Sonneneinwirkung einhergehen, während Melanome des Stamms vermehrt infolge intermittierender Sonneneinwirkung auftreten [Whiteman, 2006].

Neben externen Einflüssen spielen auch individuelle Parameter eine wichtige Rolle bei der Genese eines malignen Melanoms. So entwickeln sich etwa 30% aller Melanome in Verbindung mit einem für gewöhnlich dysplastischen Nävus als Wegbereiter [Seykora et al, 1996], welcher bereits als Zwischenstufe zur Tumorentstehung gesehen werden kann. Zusätzlich weisen Menschen, die unter dem „Syndrom der dysplastischen Nävi“ (englisch: *atypical mole syndrome*) leiden, ein erhöhtes Risiko auf, an einem malignen Melanom zu erkranken [Slade et al, 1995]. Im Gegensatz zu dysplastischen Nävi scheinen kleine und mittelgroße kongenitale Nävi kein erhöhtes Risiko darzustellen [Lang, 2002].

Zunehmende Bedeutung bei der Entstehung eines Melanoms nimmt die Immunsuppression im Rahmen der ärztlichen Intervention ein. Diese geschieht insbesondere in Folge von Organtransplantationen oder der Therapie immunologischer Erkrankungen. Untersuchungen zeigten, dass nierentransplantierte Patienten im Vergleich zur gewöhnlichen Bevölkerung eine etwa vierfach höhere Wahrscheinlichkeit aufweisen, ein Melanom zu entwickeln [Hollenbeak et al, 2005]. Ähnliche Beobachtungen wurden auch im Zusammenhang mit der Therapie der Rheumatoiden Arthritis gemacht. Hier hatten beispielsweise mit Methotrexat immunsupprimierte Patienten eine verglichen zur Normalbevölkerung dreimal höhere Wahrscheinlichkeit, ein Melanom auszubilden [Buchbinder et al, 2008].

Es wird auch die Möglichkeit einer Beteiligung von Viren an der Entstehung oder Erhaltung des Tumors diskutiert, insbesondere für Körperregionen, die nur in geringem Maße eine UV-Exposition erfahren, wie beispielsweise dem Rektalbereich [Fratesi et al, 2008]. So wurde beispielsweise das Melanom-assoziierte Retrovirus (MelARV) sowohl bei Mäusen als auch Menschen identifiziert, und es konnte gezeigt werden, dass dieses Virus sowohl durch Insertion zur Mutagenese beiträgt als auch die Immunkontrolle beeinflusst [Hengge, 2008]. Es wurden auch Hinweise gefunden, dass Melanomzellen retrovirusartige Partikel produzieren und sowohl in Primärtumoren als auch Metastasen retrovirale Gene exprimiert werden [Muster et al, 2003]. Die Bedeutung von Viren für die Entstehung des malignen Melanoms ist jedoch bisher noch weitgehend ungeklärt.

Die Rolle Traumata bei der Genese eines malignen Melanoms ist gleichfalls Zeit noch weitgehend unklar. Obwohl epidemiologische, klinische und wissenschaftliche Forschungen darauf hindeuten, dass kein ursächlicher Zusammenhang zwischen einzelnen oder persistierenden traumatischen Ereignissen und der Melanomentstehung existiert [Kaskel et al, 2000] kann eine Beteiligung von Traumata an der Tumorgenese bisher noch nicht eindeutig ausgeschlossen werden.

1.1.3 Klinische Diagnostik und Klassifikation

Obwohl die klinische Begutachtung einer Hautveränderung bereits Hinweise auf das Vorliegen eines malignen Melanoms liefern kann, ist eine endgültige Diagnose nur im Rahmen der histologischen Begutachtung möglich. In der Klinik bereits seit langem etabliert sind die sogenannten ABCD(E)-Kriterien, welche klinisch-morphologische Charakteristika des malignen Melanoms beschreiben. Sie umfassen: A = Asymmetrie des Aufbaus; B = Begrenzung unregelmäßig; C = englisch: *Color*, inhomogene Kolorierung; D = Durchmesser > 6 mm; E = Erhabenheit.

Zur Optimierung der visuellen Begutachtung wird im klinischen Alltag zusätzlich häufig ein Dermatoskop verwendet, mit dem eine etwa 10-fache Vergrößerung der Hautoberfläche [Stolz et al, 1994] und damit eine bessere Beurteilbarkeit erreicht werden kann. Wenn eine Hautveränderung mehrere ABCD(E)-Kriterien erfüllt, folgt zur weiteren histologischen Begutachtung die Exzision. Aufgrund mannigfaltiger Erscheinungsformen können maligne Melanome jedoch trotz ABCD(E)-Kriterien übersehen werden [Fernandez et al, 2004].

Abhängig von klinischen und histologischen Kriterien werden heute die folgenden vier Haupttypen des malignen Melanoms unterschieden:

1) *Superfiziell-spreitendes Melanom (SSM)*. Das SSM ist mit 60-70% die am häufigsten diagnostizierte Form des malignen Melanoms [Wallon-Dumon et al, 2003]. Zusammen mit dem Nodulären Melanom stellt es auch die häufigste Form bei den in der Kindheit auftretenden Melanomen dar [Prosdocimo et al, 2002]. Ein SSM kann sowohl „de novo“ auf zuvor klinisch unauffälliger Haut entstehen als auch aus einem Nävus hervorgehen. Dabei tritt es bevorzugt, wenn auch nicht ausschließlich, am Körperstamm und den Extremitäten auf [Su, 1997]. Die Prognose beim SSM ist verglichen mit anderen Subtypen relativ gut, da es für gewöhnlich bereits während der initialen radialen Wachstumsphase diagnostiziert werden kann [Blois et al, 1977], in der eine Metastasierung äußerst unwahrscheinlich ist.

2) *Lentigo-Maligna-Melanom (LMM)*. Das LLM ist mit 5-10% ein deutlich seltenerer Subtyp des malignen Melanoms [Wallon-Dumon et al, 2003]. Dessen ungeachtet finden sich Hinweise auf Änderungen der Epidemiologie, wobei das LLM aufgrund wechselnder Muster bei Sonnenexposition oder Umweltfaktoren inzwischen häufiger aufzutreten scheint [Forman et al, 2008]. Dieser Subtyp entsteht bevorzugt bei Patienten mittleren oder höheren Alters in Regionen der Haut mit chronischer UV-Exposition (Gesicht, Unterschenkel) auf dem Boden einer *Lentigo Maligna*. Bei einer *Lentigo Maligna* handelt es sich um das intraepidermale Wachstum atypischer Melanozyten, welches ein Carcinoma-in-situ darstellt. Eine *Lentigo Maligna* geht in 30-50% der Fälle in ein LMM über [Gaspar et al, 1997]. Aufgrund seiner relativ langen radialen Wachstumsphase ist die Prognose des LMM vergleichsweise gut.

3) *Noduläres Melanom (NM)*. Das NM hat an den insgesamt diagnostizierten Melanomen einen Anteil von etwa 15%, gleichzeitig stellt dieser Subtyp aber bis zu 70% der mehr als drei Millimeter dicken Melanome dar. Ein wesentliches Charakteristikum dieses Subtyps ist der sehr frühe Übergang in die vertikale Wachstumsphase, sodass es zu einer rasch zunehmenden Invasionstiefe des Tumors kommt [Kelly et al, 2003]. Daher besitzt das NM eine sehr schlechte Prognose.

4) *Akrolentiginöses Melanom (ALM)*. Das ALM ist mit 5% [Wallon-Dumon et al, 2003] ein relativ seltener Subtyp. Allerdings stellt es bei dunkelhäutigen Menschen eine der häufigsten Unterformen dar [Coleman et al, 1980]. Es tritt bevorzugt an den Handinnenflächen und

Fußsohlen oder auch als Nagelmelanom auf. Die Überlebensraten beim ALM ähneln denen des Nodulären Melanoms und sind damit vergleichsweise schlecht [Kuchelmeister et al, 2000].

Neben den vier Haupttypen gibt es weitere, seltene Formen des malignen Melanoms, insbesondere im Bereich des Auges und der Schleimhäute. In der Klinik stellt das amelanotische Melanom eine besondere diagnostische Herausforderung dar, da ihm aufgrund fehlender Pigmentierung ein wesentliches Charakteristikum des malignen Melanoms fehlt. Bei nicht-heilenden, erythematösen Hautveränderungen auch ohne Pigmentierung oder Ulzeration sollte daher an die amelanotische Form gedacht und eine Biopsie durchgeführt werden [Coras B et al, 2004].

Die Stadieneinteilung beim malignen Melanom erfolgt auf Basis der vom *American Joint Committee of Cancer* (AJCC) vorgeschlagenen TNM-Klassifikation [Balch et al, 2001] entsprechend den Empfehlungen der „Deutschen Leitlinie malignes Melanom“ (Herausgeber: Deutsche Krebsgesellschaft und Deutsche Dermatologische Gesellschaft). Die TNM-Klassifikation berücksichtigt den Primärtumor (T), den regionären Lymphknotenstatus (N) und Fernmetastasierung (M). Dabei sind unter anderem die Tumordicke, der Clark-Level und Ulzerationsgrad von Bedeutung. Die Tumordicke, der maximale vertikale Tumordurchmesser, wird in Anlehnung an die Arbeit von A. Breslow ausgehend vom *Stratum granulosum* der Epidermis bis zum Punkt der größten Eindringtiefe gemessen und klassifiziert [Breslow, 1970]. Der Clark-Level gibt die vertikale Invasion des Tumors in die Dermis beziehungsweise das subkutane Fettgewebe an. Eine Ulzeration ist charakterisiert durch das Fehlen einer intakten Epidermis, welche große Teile des Melanoms bedeckt [Balch et al, 2001, Tabelle 1.1.1].

Tabelle 1.1.1 Stadieneinteilung des malignen Melanoms mit 10-Jahre-Überleben

Stadium	Primärtumor (pT)	Regionäre Lymphknotenmetastasen (N)	Fernmetastasen (M)	10-Jahre-Überleben
0	In-situ Tumore	keine	keine	---
IA	< 1,0 mm, keine Ulzeration	keine	keine	88%
IB	≤ 1,0 mm mit Ulzeration oder Clark-Level IV oder V	keine	keine	81 %
	1,01-2,0 mm, keine Ulzeration	keine	keine	
IIA	1,01-2,0 mm mit Ulzeration	keine	Keine	64 %
	2,01-4,0 mm, keine Ulzeration	keine		

IIB	2,01-4,0 mm mit Ulzeration	keine	keine	52 %
	> 4,0 mm, keine Ulzeration	keine	keine	
IIC	> 4,0 mm mit Ulzeration	keine	keine	32 %
IIIA	jede Tumordicke, keine Ulzeration	Mikrometastasen	keine	60 %
IIIB	jede Tumordicke mit Ulzeration	Mikrometastasen	keine	40%
	jede Tumordicke, keine Ulzeration	bis zu drei Makrometastasen	keine	
	jede Tumordicke ± Ulzeration	keine Satelliten und/oder in-transit-Metastasen	keine	
IIIC	jede Tumordicke mit Ulzeration	bis zu drei Makrometastasen	keine	19 %
	jede Tumordicke ± Ulzeration	vier oder mehr Makrometastasen oder kapselüberschreitender Lymphknotenbefall oder Satelliten und/oder in-transit-Metastasen mit Lymphknotenbefall	keine	
IV			Fernmetastasen	8 %

1.1.4 Prognostische Parameter

Die Tumordicke nach Breslow ist ein wesentlicher Parameter in Bezug auf die Prognose beim malignen Melanom. Dabei haben insbesondere Tumoren ab einer Dicke von etwa drei Millimetern eine hohe Metastasierungswahrscheinlichkeit und sind damit für den Patienten prognostisch ungünstig. Häufig ist eine zunehmende Tumordicke zusätzlich von anderen prognostischen Parametern begleitet wie zunehmendem Alter, männlichem Geschlecht oder Lokalisation des Primärtumors [Osborne et al, 2001].

Neben der Tumordicke ist auch der Clark-Level von prognostischer Bedeutung. Die Einteilung erfolgt hier entsprechend der Clark-Klassifikation [Clark et al, 1969, Tabelle 1.1.2], wobei sich die Prognose des Patienten mit zunehmendem Clark-Level verschlechtert [Marghoob et al, 2000]. Obwohl sowohl die Tumordicke nach Breslow als auch der Invasionslevel nach Clark mit der Überlebenszeit von Melanompatienten korrelieren, besitzt der Clark-Level insgesamt wahrscheinlich einen geringeren Vorhersagewert [Balch et al, 1978].

Tabelle 1.1.2 Clark-Klassifikation

Clark-Level	Histologische Kriterien
I	Tumorzellen allein in der Epidermis oberhalb der Basalmembran
II	Tumorzellen durch die Basalmembran bis in das Stratum papillare
III	Tumorzellen bis in die Grenzzone zwischen Stratum papillare und Stratum reticulare

IV	Tumorzellen zwischen Kollagenfasern im Stratum retikulare
V	Tumorzellen bis in das subkutane Fettgewebe

Der Ulzerationsgrad des Primärtumors ist beim malignen Melanom ebenfalls von prognostischer Bedeutung für den Patienten, da eine Ulzeration sich negativ auf dessen Prognose auswirkt und mit einer erhöhten Metastasierungswahrscheinlichkeit einhergeht.

Auch das Geschlecht stellt einen Einflußfaktor für die Prognose von Melanompatienten dar. Frauen besitzen unabhängig von anderen prognostischen Faktoren eine relativ bessere Prognose [de Vries et al, 2008]. Der prognostische Vorteil scheint unabhängig vom Alter und insbesondere unabhängig von der prae- beziehungsweise postmenopausalen Lebensphase zu sein [Stidham et al, 1994].

Unabhängig von den bereits erwähnten prognostischen Faktoren existiert noch eine Vielzahl weiterer Parameter, die Einfluß auf den Krankheitsverlauf nehmen können. Dazu gehören: Lymphknotenstatus, Alter, Lokalisation sowohl des Primärtumors als auch der Metastasen, Mitoserate, Regressionszeichen, lymphozytäres Infiltrat, Vaskularisierung, Satelliten – und in-transit-Metastasen [Homsy et al, 2005] sowie der Hauttyp. Insbesondere haben Patienten mit metastasierten Melanomen eine deutlich schlechtere Prognose als Patienten, bei denen noch keine Metastasierung aufgetreten ist, weshalb eine frühe Erkennung von besonderer Bedeutung ist.

1.1.5 Therapie

Die heute erfolgsversprechendste Therapie des nicht metastasierten malignen Melanoms besteht in der vollständigen operativen Entfernung, weshalb die überwiegende Zahl an primären malignen Melanomen durch chirurgische Exzision angegangen wird. Sicherheitsabstände von 1-2 cm abhängig von der Tumordicke scheinen auszureichen [Hauschild et al, 2003]. In anatomisch schwierigen Regionen (Gesicht, Akren) wird gegebenenfalls auch mikrographisch - kontrolliert exzidiert, um die Sicherheitsabstände reduzieren zu können. Dabei scheint das Zeitintervall zwischen diagnostischer Exzision und nachfolgender weiter Exzision des Tumors bei zweizeitigem Vorgehen auf die Überlebenszeit oder Rezidivrate keinen Einfluß zu nehmen [McKenna et al, 2002]. Bei nachgewiesenem Lymphknotenbefall wird eine regionäre Lymphknotendisektion in Betracht gezogen. Außerdem hat sich in Bezug auf die Prognose die

Wächterlymphknotenbiopsie als invasiv-diagnostische Maßnahme bewährt [Markovic et al, 2007]. Gegebenenfalls kann zusätzlich die Entfernung von Metastasen operativ erfolgen.

Die Strahlentherapie stellt eine weitere Behandlungsoption beim malignen Melanom dar. Bei Primärtumoren erscheint sie insbesondere unter palliativen Gesichtspunkten zur lokalen Tumorkontrolle beitragen zu können [Seegenschmiedt MH et al, 1999]. Auch die elektive Bestrahlung bei Hochrisikopatienten kann zur postoperativen Kontrolle der Erkrankung sinnvoll sein [Cooper et al, 2001]. Zusätzlich kommt die Strahlentherapie bei der Behandlung von Metastasen, ebenfalls unter palliativen Gesichtspunkten, zum Einsatz.

Chemotherapeutika zeigten zur Therapie des metastasierten malignen Melanoms bisher insgesamt nur geringe Erfolge. Dacarbazin (DTIC) als Monochemotherapeutikum zeigte beispielsweise nur eine etwa 20%ige Ansprechrate für einen Zeitraum von fünf bis sechs Monaten [Serrone et al, 2000]. Andere Monochemotherapeutika wie Fotemustin und Temozolomid weisen ähnliche Ansprechraten auf, wobei sie insbesondere bei Patienten mit Hirnmetastasen eine vergleichsweise gute Option darstellen. Die verschiedenen Kombinationen mehrerer Chemotherapeutika zeigten Ansprechraten von 20-40%. Ebenfalls niedrig mit 10-20% sind die Ansprechraten beim alleinigen Einsatz von Zytokinen wie Interferon-alfa and Interleukin-2. Die Kombination verschiedener Regime kann jedoch deutlich höhere Ansprechraten von bis zu 60% aufweisen [Anderson et al, 1995].

Trotz unterschiedlicher therapeutischer Ansätze [Eberle et al, 2007] ist bisher keine Heilung des metastasierten malignen Melanoms möglich. Von grundlegender Bedeutung hierfür ist dessen Resistenz gegenüber der konventionellen Chemotherapie, welche insbesondere auf einer Dysregulation der Apoptose beruht.

1.2 Apoptose

1.2.1 Allgemeines

Sowohl die Entstehung neuer Zellen als auch der Zelltod sind wesentliche Voraussetzungen für einen probat funktionierenden mehrzelligen Organismus. Der Zelltod wird dabei in drei Kategorien eingeteilt: Typ I (Apoptose), Typ II (Autophagie) und Typ III (Nekrose) [Lockshin et al, 2004]. Die Apoptose wird klassischerweise als aktiver (programmierter), die Nekrose als passiver Zelltod bezeichnet. Dem passiven Sterben wird dabei eher ein unbeabsichtigter, starker

und chaotischer Ablauf zugeschrieben, während der Ablauf des aktiven Zellsterbens auf eine kontrollierte Art und Weise abläuft [Fietta, 2006]. Neuere Beobachtungen weisen jedoch darauf hin, dass eine solche kategorische Abgrenzung die Vorgänge des Zelltodes nur unzureichend beschreibt. So konnte gezeigt werden, dass bestimmte Signalwege, wie Todesrezeptor-vermittelte Wege, Kinasekaskaden und mitochondriale Wege sowohl bei Apoptose als auch Nekrose eine Rolle spielen und beide Signalwege modulieren [Proskuryakov et al, 2003]. In einem gesunden Organismus müssen sich die Entstehung neuer Zellen beziehungsweise der Erhalt vorhandener Zellen und der kontrollierte Zelltod im Gleichgewicht befinden. Ungleichgewicht aufgrund einer gestörten Regulation bei Apoptosevorgängen führt zu verschiedensten Erkrankungen, darunter Krebs-, Autoimmun- und degenerative Leiden [Cory et al, 2002].

Die Apoptose wurde 1972 erstmals beschrieben [Kerr et al, 1972]. Sie spielt eine wichtige Rolle bei der Embryogenese, der Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase und dem Immunsystem. Morphologisch ist die Apoptose durch Zellschrumpfung, Zellfragmentierung mit Entstehung sogenannter Apoptosekörperchen (englisch: *apoptotic bodies*), Phagozytosevorgängen und der Kondensation nuklearen Chromatins gekennzeichnet. Biochemische Charakteristika sind: DNA-Fragmentierung und Caspasen-Aktivierung, wobei diese Vorgänge ohne begleitende Entzündungsreaktionen ablaufen [Saraste et al, 2000]. Die Apoptose kann durch verschiedene Faktoren induziert werden, darunter genotoxische Reize wie Strahlung, oxidativer Streß oder

Krebstherapeutika. Auch Entzug von Wachstumsfaktoren oder Zytokinen kann proapoptotische Wirkung besitzen [Kim R et al, 2006].

Bis heute werden zwei grundsätzliche Apoptosewege unterschieden: (1) extrinsische Signalwege, bei welchen membranständige Todesrezeptoren eine zentrale Rolle spielen und (2) intrinsische Signalwege, bei welchen mitochondriale Funktionen im Mittelpunkt stehen [Soengas et al, 2003]. Dennoch sind extrinsische und intrinsische Signalwege nicht vollständig voneinander unabhängig, statt dessen bestehen diverse Verbindungen, aufgrund derer eine gegenseitige Beeinflussung stattfindet [Sprick et al, 2004].

Unter den meisten untersuchten Umständen führen die verschiedenen Signalwege zur Aktivierung unterschiedlicher Cystein-Aspartat-Proteasen, den sogenannten Caspasen. Es konnte

bisher bei Säugetieren eine Vielzahl unterschiedliche Caspasen identifiziert werden, wobei die für die Apoptose relevanten Caspasen in zwei Kategorien eingeteilt werden: (1) Initiator- und (2) Effektorcaspasen. Darüber hinaus sind Entzündungscaspasen bekannt. Initiatorcaspasen sind die Caspasen 2, 8, 9 und 10, zur Gruppe der Effektorcaspasen gehören die Caspasen 3, 6 und 7. Alle Caspasen werden als katalytisch inaktive Vorform (Procaspase) in den Zellen synthetisiert und später durch Prozessierung aktiviert. Dabei erfolgt die Aktivierung der Initiatorcaspasen meist autokatalytisch, während die Effektorcaspasen überwiegend von Initiatorcaspasen aktiviert werden. Nach ihrer Aktivierung vollziehen die Effektorcaspasen die proteolytische Spaltung einer ganzen Reihe von Zellsubstraten (Todessubstraten), was letztendlich den Zelltod herbeiführt [Shi Y, 2002]. Eine zentrale Rolle bei der Kontrolle und Regulation dieser Vorgänge spielen die *Inhibitor-of-Apoptosis-Proteine* (IAPs). Sie können den Zelltod bei diversen Stimuli verhindern, unter anderem durch direkte Inhibition von Caspasen [Deveraux et al, 1997].

1.2.2 Extrinsische Signalwege

Bei den verschiedenen extrinsischen Signalwegen nehmen membranständige Todesrezeptoren eine zentrale Funktion ein. Sie sind Vermittler zwischen extrazellulären Signalen und intrazellulären Signalkaskaden, die letztendlich zum kontrollierten Zelltod führen können. Es sind heute eine Reihe von Todesrezeptoren bekannt [Bhardwaj et al, 2003]. Die grundlegenden Mechanismen, mit welchen die unterschiedlichen Todesrezeptoren Apoptose induzieren können sind (1) Rezeptoroligomerisierung infolge der extrazellulären Bindung verschiedener Liganden (2) intrazelluläre Bindung von Adapterproteinen und (3) Caspasenaktivierung [Daniel et al, 2001]. Zur Rekrutierung von Adapterproteinen besitzen Todesrezeptoren eine spezielle intrazelluläre, etwa 80 Aminosäuren lange, Struktur: die Todesdomäne [Singh et al, 1998].

Auch Adapterproteine besitzen Todesdomänen und zusätzlich Todeseffektordomänen, mit deren Hilfe sie im weiteren Kaskadenverlauf neue Adapterproteine rekrutieren können. Ein wichtiger Zwischenschritt im Rahmen intrazellulären Kaskaden ist die Ausbildung des Zelltod-induzierenden Signalkomplexes (englisch: *death-inducing-signaling-complex*, *DISC*). Er ermöglicht die Rekrutierung weiterer Proteine und als Folge die Aktivierung von Caspasen welche dann den Zelltod vorantreiben.

Die Kaskadenvorgänge im Rahmen der extrinsischen Signalwege unterliegen komplexen Regulationsmechanismen, bei denen *Decoy*-Rezeptoren eine zentrale Rolle spielen. *Decoy*-Rezeptoren konkurrieren mit den Todesrezeptoren um die intrazellulären Liganden, transduzieren aber nach erfolgter Bindung keine apoptotischen Signale, so dass die Apoptose inhibiert wird [Sheikh et al, 2000].

1.2.3 Intrinsische Signalwege

1.2.3.1 Bedeutung der Mitochondrien für intrinsische Signalwege der Apoptose

Neben einer ganzen Reihe wichtiger Funktionen des Mitochondriums, wie der Bereitstellung von Energie in Form von ATP, gewinnt diese Zellorganelle zusätzlich dadurch an Bedeutung, dass sie gleichzeitig einen wichtigen Dreh- und Angelpunkt im Rahmen der Apoptose darstellt. Um die vielfältigen Aufgaben erfüllen zu können, sind verschiedene morphologische Voraussetzungen unabdingbar. Eine wesentliche morphologische Voraussetzung stellt die Bildung und Aufrechterhaltung unterschiedlicher, voneinander abgegrenzter Zellkompartimente dar. Dies wird im Wesentlichen durch zwei Membranen ermöglicht: (1) durch die äußere mitochondriale Membran (englisch: *outer mitochondrial membrane*, *OMM*) und (2) durch die innere mitochondriale Membran (englisch: *inner mitochondrial membrane*, *IMM*). Im Gegensatz zur *OMM* besitzt die *IMM* zahlreiche faltenartige Aufwerfungen durch welche sich die Membranoberfläche deutlich vergrößert. Die *OMM* grenzt das Mitochondrium vom Zytoplasma der Zelle ab, die *IMM* umschließt die mitochondriale Matrix.

Bedingt durch die morphologischen Gegebenheiten entstehen innerhalb des Mitochondriums zwei funktionell unterschiedliche Kompartimente: (1) der äußere Stoffwechselraum (Intermembranraum) und (2) der innere Stoffwechselraum (Matrix). Diese Stoffwechselräume sind jedoch nicht absolut voneinander abgetrennt, statt dessen findet ein gut regulierter Austausch statt, der unter anderem durch multiple Transporter und Poren in den mitochondrialen Membranen ermöglicht wird [Schwarz et al, 2007]. An einer ganzen Reihe von Stoffwechselvorgängen sind auch in den Membranen verankerte Strukturelemente beteiligt. Daher stellen ebenfalls die Membranen selbst eigenständige Kompartimente des Mitochondriums dar [van der Laan et al, 2006].

Die Matrix enthält eine Vielzahl unterschiedlicher Metabolite und Enzyme. Dazu zählen der Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex und Enzyme für den Citratzyklus. Wichtige Metaboliten sind NAD, NADH, ADP und ATP [Logan, 2006]. Auch im Intermembranraum befinden sich eine ganze Reihe unterschiedlicher Proteine, von denen viele eine enzymatische Funktion besitzen. Verschiedene, für die Apoptose relevante Proteine sind hier lokalisiert, darunter Cytochrom C, Smac/DIABLO, Omi/HtrA2 und der Apoptose-induzierende-Faktor (AIF) [Muñoz-Pinedo et al, 2006]. Zusätzlich zu Enzymen und Metaboliten spielen Ionen wie beispielsweise Kalium (K^+) oder Calcium (Ca^{2+}) eine wichtige Rolle für die mitochondriale Homöostase [Kaasik et al, 2007].

Im Rahmen der Apoptose kommt es zur Freisetzung multipler intermembranärer Proteine aus dem Mitochondrium wie beispielsweise Cytochrom C, wodurch nachgelagerte Signalkaskaden der intrinsischen Apoptosewege eingeleitet werden. Die Freisetzung erfolgt wahrscheinlich aufgrund einer Veränderung mitochondrialer Membranpermeabilitäten oder einer Ruptur der OMM. Die genauen Mechanismen sind jedoch unklar. Zum einen ist es möglich, dass membranständige Kanäle, wie beispielsweise der spannungsabhängige Anionenkanal (englisch: *voltage-dependent anion channel*, VDAC) ihren Öffnungszustand ändern [Shoshan-Barmatz et al, 2003]; zum anderen besteht die Möglichkeit der Ausbildung neuer Kanäle wie der PTP (englisch: *permeability transition pore*), einem Multiproteinkomplex, der möglicherweise eine Verbindung zwischen äußeren Kompartimenten und der mitochondrialen Matrix schafft [Rasola et al, 2007].

Da die Freisetzung intermembranärer mitochondrialer Proteine ein entscheidendes Ereignis im Rahmen intrinsischer Apoptosewege darstellt, unterliegt sie einer profunden Regulation, unter anderem durch Proteine der Bcl-2-Superfamilie.

1.2.3.2 Regulation intrinsischer Apoptosewege durch Proteine der Bcl-2-Superfamilie

Die Proteine der Bcl-2-Superfamilie sind bei der Apoptose für die Regulation intrinsischer Signalwege von Bedeutung. Die Familie besteht sowohl aus Apoptose-fördernden (proapoptotischen) Proteinen wie Bax, Bak, PUMA und Noxa als auch -hemmenden (antiapoptotischen) Proteinen wie Bcl-2 und Mcl-1.

Abhängig von ihrem Aufbau in Bezug auf die Gegenwart typischer konservierter Sequenzmotive, den Bcl-2-Homologie-Domänen (BH 1-4), erfolgt die strukturelle Klassifizierung der unterschiedlichen Proteine dieser Familie. Im Gegensatz zu den

proapoptotischen Proteinen weisen die antiapoptotischen Bcl-2-Proteine alle vier BH-Domänen auf. Die proapoptotischen Mitglieder dagegen werden zusätzlich in Multi-Domänen-Proteine (Bax, Bak) und BH3-only Proteine (PUMA, Noxa) unterteilt. Letztere besitzen lediglich die BH3-Domäne [Chan et al, 2004].

Antiapoptotische Bcl-2 Proteine:

(1) Bcl-2: Bei Bcl-2 (englisch: *B-cell lymphoma 2*) handelt es sich um ein etwa 26 kDa grosses antiapoptotisches Protein, welches als Namensgeber für die entsprechende Superfamilie fungiert. In der Zelle ist es in den Membranen des Mitochondriums und Endoplasmatischen Retikulums (ER) sowie im Nukleus lokalisiert, wobei insbesondere die Membranlokalisationen für die Apoptose von Bedeutung zu sein scheinen [Handrick et al, 2005]. Dabei beeinflusst Bcl-2 den Weg der Zelle in Richtung Zelltod beziehungsweise Überleben wahrscheinlich mit Hilfe unterschiedlicher Mechanismen. Diese umfassen vermutlich sowohl Interaktionen mit proapoptotischen Familienmitgliedern als auch von proapoptotischen Proteinen unabhängige Wirkungen.

Bcl-2 fungiert unter anderem als Antagonist proapoptotischer Familienmitglieder. So konnte unter anderem eine Heterodimerisierung von Bcl-2 und Bax nachgewiesen werden [Oltvai et al, 1993]. Solche Interaktionen wirken der Oligomerisierung proapoptotischer Proteine und deren Integration in mitochondriale Membranen im Rahmen der Apoptose entgegen und fördern ein Überleben der Zelle.

Zu den von proapoptotischen Bcl-2 Proteinen unabhängigen Wirkungen zählt höchst wahrscheinlich auch die Beeinflussung des zellulären Ca^{2+} -Haushalts. Es konnte gezeigt werden, dass Bcl-2 die Durchlässigkeit der ER-Membran für Ca^{2+} Zelltyp-spezifisch vergrößern und so die intraluminalen Ca^{2+} -Speicher reduzieren kann. Dies hat einen geringeren intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg in Folge apoptotischer Stimuli zur Folge, wodurch die Aktivität Apoptose induzierender Ca^{2+} -abhängiger Enzyme reduziert wird [Pinton et al, 2006].

Des Weiteren ist Bcl-2 möglicherweise an der Regulation mitochondrialer Membranpermeabilitäten beteiligt. Es konnte gezeigt werden, dass Bcl-2 durch direkte Interaktion mit VDAC diesen Kanal inhibieren kann, wobei diese Fähigkeit wahrscheinlich durch die BH4-Domäne antiapoptotischer Proteine vermittelt wird [Shimizu et al, 2000]. Eine Beeinflussung der mitochondrialen Membranpermeabilität im Sinne einer Membranstabilisierung könnte für die antiapoptotische Wirkung von Bcl-2 mit verantwortlich sein.

(2) Mcl-1: Mcl-1 (englisch: *ML-1 myeloid cell leukemia*) ist ein etwa 38 kDa großes antiapoptotisches Protein, dessen Gen 1993 erstmals beschrieben wurde [Kozopas et al, 1993]. Zusätzlich existieren weitere Mcl-1 Isoformen wie beispielsweise Mcl-1S (30 kDa), deren genaue Charakterisierung jedoch noch nicht abgeschlossen ist [Michels et al, 2004]. Wie auch Bcl-2 ist Mcl-1 im Nukleus lokalisiert, seine Lokalisation in der mitochondrialen Membran ist jedoch wesentlich ausgeprägter und für seine antiapoptotische Wirkung ausschlaggebend [Yang et al, 1995].

Seine Hauptwirkung im Rahmen der Apoptose entfaltet Mcl-1 durch Antagonisierung proapoptotischer Bcl-2-Familienproteine wie Noxa oder Bim [Chen et al, 2005]. Die Antagonisierung erfolgt, wie auch bei Bcl-2, vermutlich mittels Heterodimerbildung und bewirkt eine Stabilisierung der mitochondrialen Membran und Hemmung der Apoptose.

Auch Mcl-1 beeinflusst wahrscheinlich den Ca^{2+} -Haushalt und damit die Apoptose. Die Beeinflussung erfolgt jedoch vermutlich nicht wie bei Bcl-2 auf Ebene des ER, sondern im Mitochondrium. Es gibt Hinweise darauf, dass Mcl-1 eine hemmende Wirkung auf den Ca^{2+} -Haushalt des Mitochondriums ausübt ohne die Ca^{2+} -Speicher im ER zu beeinflussen [Minagawa et al, 2005]. Die proapoptotischen Effekte des rapiden Kalziumanstiegs im Rahmen der Apoptose könnten durch Mcl-1 abgeschwächt und so die mitochondriale Membran stabilisiert werden.

Proapoptotische Bcl-2 Proteine:

(1) Bax: Bei Bax (englisch: *Bcl-2-associated X protein*) handelt es sich um ein proapoptotisches Protein der Bcl-2-Superfamilie, von welchem aufgrund alternativen RNA-Splicings eine ganze Reihe unterschiedlicher Isoformen existieren. Es konnten unter anderem Bax-alpha (21 kDa), Bax-beta (24 kDa), Bax-gamma (4,6 kDa) [Oltvai et al, 1993] und Bax-delta (15 kDa) [Apte et al, 1995] näher charakterisiert werden. In lebensfähigen Zellen ist Bax als Monomer im Zytosol oder locker an die mitochondriale Membran gebunden lokalisiert [Gross et al, 1999]. Zusätzlich konnte auch eine Lokalisation von Bax im ER nachgewiesen werden.

Zu den wichtigsten Funktionen von Bax im Rahmen der Apoptose zählt die Erhöhung der mitochondrialen Membranpermeabilität, was die Freisetzung intermembranärer Proteine ermöglicht, wobei die genauen Mechanismen noch unklar sind. Als Folge proapoptotischer Signale kommt es zu einer Konformationsänderung von zytosolischem Bax und anschließender

Translokation zum Mitochondrium [Lucken-Ardjomande et al, 2005]. Möglicherweise erfolgt mit Hilfe der translozierten Bax-Moleküle eine Porenbildung in der mitochondrialen Membran. Es konnte die Oligomerisierung von bis zu acht Bax Molekülen nachgewiesen werden, wobei Konformationsänderungen in diesem Zusammenhang wahrscheinlich die Integration in die mitochondriale Membran und die Ausbildung von Kanälen ermöglichen [Antonsson et al, 2000].

Neben mitochondrialen Effekten spielt für die proapoptotische Wirkung von Bax wahrscheinlich auch dessen Beeinflussung des zellulären Ca^{2+} -Haushalts eine Rolle. Am ER wirkt Bax als Antagonist von Bcl-2, indem es dessen Reduzierung der intraluminalen Ca^{2+} -Speicher entgegenwirkt. Auf diese Weise wird wahrscheinlich im Rahmen der Apoptose eine verstärkte Ca^{2+} -Ausschüttung ermöglicht welche dann als starker proapoptotischer Reiz den Zelltod fördert [Scorrano et al, 2003]. Eine weitere Möglichkeit zur Beeinflussung der Membranpermeabilität könnte in der Interaktion von Bax mit Kanälen der OMM, wie dem VDAC, und deren Öffnung bestehen [Shimizu, 1999].

(2) Bak: Bak (englisch: *Bcl-2-antagonist/killer*) ist ein etwa 23 kDa grosses proapoptotisches Protein der Bcl-2-Superfamilie, welches sowohl im ER als auch im Mitochondrium lokalisiert ist. In Analogie zu Bax kann wahrscheinlich auch Bak im Rahmen der Apoptose eine Erhöhung der mitochondrialen Membranpermeabilität bewirken. Obwohl es vermutlich auch bei Bak aufgrund proapoptotischer Signale zu Konformationsänderungen kommt, findet im Gegensatz zu Bax scheinbar keine Änderung der subzellulären Lokalisation statt.

Es gibt Hinweise darauf, dass Bak in der mitochondrialen Membran konstitutiv an antiapoptotische Proteine wie Bcl-X_L gebunden ist und sich diese Bindungen durch Konformationsänderungen lösen können [Lucken-Ardjomande et al, 2005], wodurch Bak dann im Rahmen der Apoptose für andere Interaktionen zur Verfügung stünde. Mögliche Interaktionen umfassen, ähnlich wie bei Bax, Oligomerisierung mehrerer Bak-Moleküle oder auch Kanäle der OMM [Shimizu, 1999; Cheng et al, 2003]. In Analogie zu Bax bewirkt Bak wahrscheinlich ebenfalls am ER eine Erhöhung der intraluminalen Ca^{2+} -Speicher [Scorrano L et al, 2003].

(3) PUMA: PUMA (englisch: *p53 up regulated modulator of apoptosis*) oder synonym bbc3 (englisch *Bcl-2 binding component 3*) ist ein proapoptotisches Protein der Bcl-2-Superfamilie,

welches zur Untergruppe der BH3-only Proteine gehört. Es existieren verschiedene Isoformen, darunter Isoform A (etwa 24 kDa) und Isoform B (etwa 18 kDa) [Nakano et al, 2001].

Hauptmechanismus von PUMA zur Förderung der Apoptose ist vermutlich die Interaktion mit antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen und deren damit verbundene Antagonisierung. Wahrscheinlich verdrängen BH3-only Proteine die proapoptotischen Multidomänenproteine von ihren antiapoptotischen Antagonisten und ermöglichen so die proapoptotischen Effekte [Willis et al, 2005].

Im Gegensatz zu anderen BH3-only Proteinen scheint PUMA unselektiv mit allen antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen zu interagieren [Chen et al, 2005]. Des Weiteren scheint auch eine Wechselwirkung von PUMA mit proapoptotischen Multidomänenproteinen der Bcl-2-Familie wie Bax und Bak zu bestehen, welche möglicherweise deren Aktivierung fördert [Cartron et al, 2004]. Es gibt Hinweise darauf, dass BH3-only Proteine ohne Bax und Bak keine Apoptose induzieren können [Zong et al, 2001].

(4) Noxa: Bei Noxa (lateinisch: Schaden) handelt es sich um ein cirka 11 kDa grosses BH3-only Protein der Bcl-2-Superfamilie, welches funktionell große Ähnlichkeiten mit PUMA aufweist. Noxa interagiert wahrscheinlich, wie auch PUMA, mit antiapoptotischen Bcl-2 Proteinen und antagonisiert diese.

Die Interaktionen von Noxa scheinen für bestimmte antiapoptotische Bcl-2 Proteine selektiv zu sein. So konnte beispielsweise keine Wechselwirkung mit Bcl-2 und Bcl-X_L nachgewiesen werden, wohingegen bevorzugt eine Bindung von Noxa an Mcl-1 gefunden wurde [Chen et al, 2005]. Zusätzlich konnte vor kurzem eine Lokalisierung von Noxa im ER nachgewiesen und gezeigt werden, dass eine Noxa-Expression einen schnellen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration bei Melanomzellen hervorrufen kann [Hassan et al, 2008].

1.2.3.3 Nachgeschaltete Signalwege

Infolge einer erhöhten Membranpermeabilität oder einer Ruptur der OMM gelangen im Zuge der Apoptose multiple intermembranäre Proteine wie Cytochrom C aus dem Mitochondrium in das Zytosol. Es konnte gezeigt werden, dass Cytochrom C nach seiner Freisetzung aus dem Mitochondrium an das zytosolische 130 kDa Protein Apaf-1 (englisch: *Apoptosis protease-*

activating factor 1) bindet [Zou et al, 1997]. Nach Bindung von Cytochrom C kann das zunächst monomerische Apaf-1 unter Verbrauch von dATP oligomerisieren.

Der Apaf-1-Cytochrom C- Komplex ist dann in der Lage, Procaspase 9 zu binden und zu prozessieren [Saleh et al, 1999]. Die Bindung wird durch die Interaktion spezieller Domänen des Apaf-1-Cytochrom C- Komplexes und der Procaspase 9 vermittelt, welche als CARDs (englisch: *Caspase activating recruitment domains*) bezeichnet werden [Li et al, 1997]. Die Aktivierung der Caspase 9 führt durch nachfolgende Signalkaskaden zur Aktivierung weiterer Initiatorcaspasen (2, 8, 10) und Effektorcaspasen (3, 6, 7) [Guerrero et al, 2008], zur Spaltung von Todessubstraten und zum Zelltod.

1.2.4 Bedeutung der Bcl-2-Superfamilie für die Kanzerogenese

Die Entstehung maligner Tumore setzt Veränderungen voraus, die es den Tumorzellen erlauben, unabhängig von physiologischen Kontrollmechanismen zu proliferieren und damit das Gleichgewicht zwischen Zellaufbau und –untergang zu stören. Im Rahmen physiologischer Kontrollmechanismen spielt die Apoptose eine wichtige Rolle, da sie eine Möglichkeit zur Elimination entarteter Zellen darstellt.

Apoptoseresistenz kann zur neoplastischen Transformation, Progression und Metastasierung beitragen, da sie Bedingungen ermöglicht, unter welchen genetische Instabilität und Akkumulation genetischer Mutationen von Zellen begünstigt werden [Malaguarnera, 2004]. Die Proteine der Bcl-2-Superfamilie leisten als Regulatoren der Apoptose einen wichtigen Beitrag zur Ausbildung einer Apoptoseresistenz.

(1) Bcl-2: Die Rolle von Bcl-2 für die Tumorgenese und –progression ist bisher nur teilweise geklärt. Einerseits wurden Hinweise gefunden, dass eine höhere Expression von Bcl-2 mit einer höheren Metastasierungswahrscheinlichkeit des malignen Melanoms assoziiert ist [Hernberg et al, 1998], andererseits gibt es Untersuchungen, die zeigen, dass Melanome insbesondere während ihrer radialen Wachstumsphase das Bcl-2-Antigen exprimieren, während gerade in Metastasen ein Verlust auftritt [van den Oord et al, 1994]. Diese Beobachtungen werden auch dadurch gestützt, dass eine Expression von Bcl-2 insbesondere bei dünnen malignen Melanomen vorkommt und mit zunehmender Tumordicke abnimmt [Zhuang et al, 2007]. Möglicherweise ist Bcl-2 lediglich bei der Tumorgenese und frühen Progression des malignen Melanoms von

Bedeutung, während im weiteren Verlauf andere Mechanismen ein Überleben der Metastasen garantieren.

(2) Mcl-1: Die Bedeutung von Mcl-1 für die Tumorgenese und –progression erscheint insgesamt eindeutiger als bei Bcl-2. Es wurde bei verschiedenen tumorösen Geweben eine erhöhte Mcl-1-Expression gefunden [Wuillème-Toumi et al, 2005; Sano et al, 2005], was eine Tumor begünstigende Rolle nahelegt. Auch beim malignen Melanom konnte bereits in dünnen Primärtumoren eine erhöhte Expression von Mcl-1 gezeigt werden, was auf die Erhöhung der Antigen-Expression als ein relativ früh stattfindendes Ereignis im Rahmen der Tumorgenese hindeutet [Tang et al, 1998]. Gleichzeitig wurde bei dünnen malignen Melanomen eine geringere Mcl-1-Expression gefunden als bei dickeren Tumoren und Metastasen [Zhuang et al, 2007], so dass möglicherweise Mcl-1 bei der Tumorprogression von Bedeutung ist.

(3) Bax: Tierexperimentelle Untersuchungen weisen darauf hin, dass ein Verlust von Bax mit vermehrter Tumorgenese und stärkerem Tumorwachstum assoziiert ist [Shibata et al, 1999]. Auch beim malignen Melanom scheint ein Verlust von Bax mit einer verschlechterten Prognose für den Patienten einherzugehen [Fecker et al, 2006]. Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass beim malignen Melanom verglichen zu nicht malignen Hautveränderungen eine erhöhte Bax-Expression auftreten kann [Tang et al, 1998]. Möglicherweise spielt Bax beim malignen Melanom also eher eine Rolle bei der Progression und weniger der Genese.

(4) Bak: Auch bei Bak konnte eine verminderte Expression bei bestimmten Tumorentitäten gezeigt werden [Krajewska et al, 1996]. Eine Herabregulation von Bak scheint zu einem pathologischen Zellwachstum und zur Tumorgenese beizutragen [Lieberman et al, 2008]. Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass ein Verlust von Bak beim malignen Melanom zu einer verschlechterten Prognose für den Patienten führt [Fecker et al, 2006].

(5) PUMA: Tierexperimentelle Untersuchungen zeigten, dass der Verlust von PUMA eine hemmende Wirkung auf die Apoptose besitzt [Villunger et al, 2003]. Beim malignen Melanom konnte außerdem sowohl eine signifikant verringerte PUMA-Expression in Primärtumoren und Metastasen verglichen mit dysplastischen Nävi als auch eine deutlich verschlechterte Prognose für Patienten mit geringer PUMA-Expression beobachtet werden [Karst et al, 2005].

(6) Noxa: Über die Bedeutung von Noxa beim malignen Melanom ist nur wenig bekannt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass eine Blockade von Noxa zu einer Reduktion der proapoptotischen Antwort auf Apoptose-induzierende Substanzen in Melanomzellen führen kann [Qin et al, 2004].

1.3 Aufgabenstellung der Arbeit

Beim malignen Melanom der Haut handelt es sich um einen Tumor, der insbesondere nach Metastasierung hohe Mortalitätsraten aufweist. Ursächlich hierfür ist vor allem ein unzureichendes Ansprechen auf die bekannten therapeutischen Strategien und insbesondere die Resistenz gegenüber Chemotherapeutika. Daher ist die Entwicklung neuer Therapieansätze von großer Bedeutung.

Schon heute dienen verschiedene prognostische Parameter wie beispielsweise die Breslow-Tumordicke, der Clark-Level oder der Ulzerationsgrad dazu, eine stadiengerechte Tumorthherapie durchzuführen. Für die Entwicklung neuer Therapieansätze ist es wichtig, die molekularen Grundlagen der Tumorprogression zu verstehen, um eine spezifische und stadiengerechte Therapie des malignen Melanoms ermöglichen zu können.

Die pro- und antiapoptotischen Proteine der Bcl-2-Superfamilie als wichtige Regulatoren der Apoptose bieten vielversprechende Ansätze, die Therapieresistenz des malignen Melanoms zu überwinden und gleichzeitig die molekularen Mechanismen der Tumorprogression zu verstehen. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit nach einem Zusammenhang zwischen Expression anti- und proapoptotischer Proteine der Bcl-2 Superfamilie, Metastasierung und prognostischen Parametern gesucht werden. Hierzu sollte in zwanzig Primärtumoren und Metastasen jeweils desselben Patienten die Expression ausgewählter anti- und proapoptotischer Bcl-2 Proteine immunhistologisch zunächst gesondert untersucht und später direkt verglichen werden. Des Weiteren sollte die Expression dieser Proteine auf einen Zusammenhang mit gängigen prognostischen Markern hin überprüft werden. Ziel der Arbeit war es, die Bedeutung ausgewählter anti- und proapoptotischer Proteine der Bcl-2 Superfamilie für die Tumorprogression zu überprüfen, sowie das prognostische und therapeutische Potential dieser Proteine näher zu charakterisieren.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Lösungen und Chemikalien

Acryl-/Bisacrylamid 37,5:1	Biorad
Ammoniumpersulfat (APS)	Biorad
Aprotinin 10% in A. bidest	Sigma
Bromphenolblau	Biorad
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
EDTA	Sigma
Ethanol	J.T. Baker
Fetal Calf Serum (FCS)	Sigma
Glycerol	Sigma
Glycin	Serva
H ₂ O ₂	Sigma
Humanserum	Biseko, Biotest 50 ml
Hydroxycoumarinsäure	Sigma
Isopropanol	J.T. Baker
Leupeptin 10 µg/ml in A. bidest	Sigma
Luminol	Sigma
Methanol	J.T. Baker
Natriumazid (NaN ₃)	Roth
Natriumchlorid	Merck
Natriumcitrat	Merck
Pepstatin 0,5 mg/ml in A. Bidest	Sigma
Phenylmethanesulfonylfluoride (PMSF) 100 mM in DMSO	Sigma
Phosphate buffered saline (PBS)	Biochrom AG
Ponceau S Lösung	Sigma
Rinderserum-Albumin (BSA)	Sigma
RPMI	Biochrome
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Amresco
β-Mercaptoethanol	Merck
TEMED	Biorad
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	Invitrogen
Trockenmilchpulver, fettfrei	Biorad
Tween20	Calbiochem

Xylol	J.T. Baker
-------	------------

2.1.2 Materialien für SDS-PAGE

Puffer

Laufpuffer (5x)	0,125 M Tris 1 M Glycin 0,5 % SDS ad 1000 ml A. bidest
Proteinprobenpuffer (4x)	0,25 M Tris, pH 6,8 2 % SDS 40 % Glycerol 20 % β -Mercaptoethanol 0,04 % Bromphenolblau ad 500 ml A. bidest 0,2 M Dithiothreitol (DTT) kurz vor Erhitzen frisch dazugegeben
Sammelgelpuffer, pH 6,8	0,33 M Tris-Base, 0,2% SDS ad 500 ml A. bidest
Trenngelpuffer, pH 8,8	0,64 M Tris-Base, 0,12 M Tris-HCl, 0,2% Sodiumdodecylsulfat (SDS) ad 500 ml A. bidest

Gele

Sammelgel (5%)	1,6 ml A. bidest 2,5 ml Sammelgelpuffer 0,84 ml 30% Acryl-/Bisacrylamid 37,5:1 50 μ l 10% Ammoniumpersulfat 5 μ l TEMED
Trenngel (12%)	1,0 ml A. bidest 5,0 ml Trenngelpuffer 4,0 ml 30% Acryl-/Bisacrylamid 37,5:1 100 μ l 10% Ammoniumpersulfat (APS) 10 μ l TEMED

Proteinlysate humaner Melanom-Zelllinien

Aus Primärtumoren	Mel-HO
Aus Metastasen	SK-Mel-13, SK-Mel-23 Mel-2A MeWo M186

Sonstiges

Proteinmarker	Biorad Dual Color # 161-0374
---------------	------------------------------

2.1.3 Materialien für Western-Blot-Analyse**Lösungen und Chemikalien**

<u>PBS-Tween (0.05%)</u>	9,55 g Phosphate buffered saline (PBS) 0,5 ml Tween®20 ad 1000 ml A. Bidest
TBS (10x), pH 7,6	24,2 g Tris-Base 80 g NaCl ad 1000 ml A. bidest
TBS-Tween (10x), pH 7,6	100 ml 10xTBS 0,05 % Tween®20 ad 1000 ml A. Bidest

Puffer

Lysat-Puffer	0,01 M Tris-HCl pH 7,5 0,144 M NaCl 0,5% Nonidet P-40 0,5% SDS 0,001 M EDTA, pH 8,0 5 µg /ml Pepstatin 0,002 M Phenylmethanesulfonylfluoride (PMSF) 10 µg/ml Leupeptin 0,1% Aprotinin
Transferpuffer	500 ml 1x Elektrophoresepuffer (Laufpuffer) 200 ml Methanol ad 1000 ml A. bidest

Sonstiges

Nitrozellulose-Membran (Porengröße: 0,2 µm)	Protran BA83, Schleicher & Schuell BioScience
Filterpapier 3MM	Whatman
PVDF-Membran (Porengröße: 0.45 µm)	Immobilon-P Transfer-Membrane, Millipore, Catalog-Nummer: IPVH00010

2.1.4 Materialien für Immunodetektion**Blockierungslösungen**

Blockierungslösung 1	5 g Trockenmilchpulver, fettfrei ad 100 ml 1xTBS- Tween20
Blockierungslösung 2	5 g BSA (Rinderserum-Albumin) ad 100 ml PBS- Tween

Primäre Antikörper

Antigen/Bezeichnung	Spezies, Klonalität	Verdünnung	Firma	Produktnummer	Anwendung (WB=Western Blot; IH=Immunhistologie)
Bak	Kaninchen, polyklonal	1:800	DakoCytomation	A3538	WB
Bak	Kaninchen, polyklonal	1:200, 1:400	Biomol	B0055-03	WB
Bak	Kaninchen, monoklonal	1:2500	Epitomics	# 1542-1	WB/IH
Bax (B9)	Maus, monoklonal	1:200	Santa Cruz	sc-7480	WB/IH
Bax (N20)	Kaninchen, polyklonal	1:400	Santa Cruz	sc-493	WB/IH
Bax (P19)	Kaninchen, polyklonal	1:200	Santa Cruz	sc-526	WB/IH
Bax (YTH-2D2)	Maus, monoklonal	1:2000	Trevigen	2282-MC-100	WB
Bcl-2	Maus, monoklonal	1:400	DakoCytomation	M 0887	WB/IH
GAPDH (6C5)	Maus, monoklonal	1:200	Santa Cruz	sc-32233	WB
Mcl-1	Kaninchen, polyklonal	1:700	Serotec	AHP472	WB/IH
Mcl-1	Maus, monoklonal	1:200	Abcam	Ab3184	WB
NOXA	Kaninchen, polyklonal	1:1000	ProSci	# 2437	WB/IH
PUMA	Kaninchen, monoklonal	1:2500	Epitomics	# 1652-1	WB/IH
S100	Kaninchen, polyklonal	1:500	DakoCytomation	Z 0311	IH
α-Tubulin	Kaninchen, polyklonal	1:1000	Cell Signaling	# 2144	WB

β-Aktin	Maus, monoklonal	1:5000	Sigma	A5441	WB
---------	---------------------	--------	-------	-------	----

Sekundäre Antikörper

Antigen/Bezeichnung	Spezies, Klonalität	Verdünnung	Firma	Produktnummer
Anti-Kaninchen/HRP	Ziege, polyklonal	1:5000	DakoCytomation	P 0448
Anti-Maus/HRP	Ziege, polyklonal	1:5000	DakoCytomation	P 0447
Anti-Mouse	Kaninchen, polyklonal	1:20	DakoCytomation	Z 0259

ECL (Enhanced Chemoluminescence)

ECL-Lösung 1	Amersham ECL™ Western Blotting Detection Reagents, Produkt RPN2209
ECL-Lösung 2 (<i>Lösung A+Lösung B+Lösung C</i>)	<p><u>Lösung A:</u> 200 ml 0,1 M Tris/HCL, pH 8,6 50 mg Luminol</p> <p><u>Lösung B:</u> 11 mg Hydroxycoumarinsäure in 10 ml Dimethylsulfoxid (DMSO)</p> <p><u>Lösung C:</u> 30 % H₂O₂</p>
Hyperfilm ECL	Amersham

2.1.5 Materialien für Immunhistologie (APAAP)

Lösungen und Chemikalien

Antikörper-Lösung 1	DAKO Cytomation Antibody Diluent, S0809
Antikörper-Lösung 2	RPMI-Lösung und Humanserum im Verhältnis 7:1
Blockierungslösung APAAP	DAKO Cytomation Protein Block, serumfrei
RPMI-Lösung, pH 7,6	25 ml Roswell Park Memorial Institute-Medium (RPMI-1640) 225 ml A. Bidest 25 ml Fetal Calf Serum (FCS), 30 min bei 56°C inaktiviert 0,25 g NaN ₃
TBS (10x), pH 7,6	4,5 g Tris-Base 34,25 g Tris-HCL 43,9 g NaCl ad 500 ml A. Bidest

TBS-Tween , pH 7,6	100 ml 10xTBS 0,05 % Tween20 ad 1000 ml A. Bidest
--------------------	---

Puffer

Citratpuffer, pH 6,0	4,2 g Natriumcitrat ad 2000 ml A. bidest
----------------------	---

Brücken-Antikörper

Antigen/Bezeichnung	Spezies, Klonalität	Verdünnung	Firma	Produktnummer
Anti-Rabbit	Maus, monoklonal	1:200	DakoCytomation	M 0737

APAAP Antikörper

Antigen/Bezeichnung	Spezies, Klonalität	Verdünnung	Firma	Produktnummer
APAAP	Maus, monoklonal	1:50	DakoCytomation	D 0651

Gewebsschnitte

18x	Pärchen, bestehend aus Primärtumor und Metastase jeweils desselben Patienten* / **	AG Malignes Melanom, Leiter Dr. med. U. Trefzer, Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie Charité Campus Mitte der Charité-Universitätsmedizin Berlin
2x	Primäres Melanom*	
2x	Melanom-Metastase*	

* einschließlich klinisch-histologischer Daten

** primäre Melanome: nodulär / lentigo-maligna / akro-lentiginös / superfiziell-spreitend / unklassifiziert:
n = 2 / 2 / 2 / 13 / 1)

Sonstiges

Delimiting pen	Dako, Produkt S2002
Deckgläser	Roth
Eindeckmittel	Aquamount 50 ml, BDH, Präparat Gurr
Fuchsin-Substrate-Chromogen-System	Dako
Mayers Hämalaunlösung	Merck

2.1.6 Geräte und andere Materialien

Apparatur für Western-Blot-Transfer	Mini-Trans-Blot, Bio-Rad
Bidest-Gerät Destamat	Heraeus
Blue und Red Cap Tubes	Falcon
Brutschrank mit Schüttler	GFL
Elektrophoreseapparaturen	Mini Protean II, Bio-Rad
Elektrophorese-Stromgerät	Model 1000/500, Bio-Rad
Feinwaage	Sartorius
Filmkassetten	Kodak
Gelkammer	Biorad
Magnetrührer	MR 2000, Heidolph
Mikroskop	Olympus, Modell BH-2
pH-Meter	pH 526, WTW
Phosphoimager	Fuji
Pipettierhilfe	Eppendorf
Röntgenfilme	Fuji
Schüttler	Köttermann
Tischzentrifuge (Biofuge)	Heraeus
Vortex	Bender&Holbein

2.2 Methoden

2.2.1 SDS-Page

Die diskontinuierliche SDS-PAGE (englisch: *sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Eine Auftrennung erfolgt dadurch, dass die denaturierten, durch SDS negativ geladenen Proteine zur Anode wandern. Dabei ist die Wanderungsgeschwindigkeit abhängig vom Molekulargewicht. Mit Hilfe von Molekulargewichtsstandards kann auf diese Weise die Größe eines Proteins bestimmt werden.

Zuerst wurde das Trenngel hergestellt. Nach Zugabe des Radikalbildners Ammoniumpersulfat (APS) und des Katalysators Tetramethylethyldiamin (TEMED) wurde die Polymerisierung gestartet und das noch flüssige Gel zwischen die zwei Glasplatten der Gelkammer gegossen;

dann wurde das Gel mit 100 µl Isopropanol überschichtet, um eine möglichst gerade Oberkante zu gewährleisten. Nach einer Polymerisationszeit von 30 Minuten und Abgiessen des Überstandes wurde das noch unpolymerisierte Sammelgel direkt auf das fertige Trenngel gegossen. Sofort wurde in das noch flüssige Sammelgel ein Kamm mit zehn Zähnen eingelassen, um Taschen zum Einfüllen von Proteinen anzulegen. Dabei wurde durch vorsichtiges Vorgehen der Entstehung von Luftblasen vorgebeugt. Auch das Sammelgel polymerisierte innerhalb der nächsten 30 Minuten. Danach wurde der Kamm entfernt und die Gelplatte in die mit Elektrophoresepuffer (Laufpuffer) gefüllte Elektrophoresekammer gegeben. Außerdem wurden die Taschen mit Laufpuffer vorsichtig gespült, um Gelreste und Luftblasen zu entfernen.

Die Proteinlysate wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe „Apoptose in Hauttumoren“ der Charité-Universitätsmedizin Berlin, Leiter PD Dr. Jürgen Eberle, zur Verfügung gestellt. Sie umfassten Proben aus folgenden humanen Melanomzelllinien: SKMel-13, SKMel-23, M186, M221, Mel-2a, Mel-HO und MeWo. Die Lysate waren bei -20°C gelagert und die entsprechende Proteinkonzentration war mit Hilfe des BCA Protein Assays (Pierce) bestimmt worden.

Für die Proteinproben wurde zunächst mittels Verdünnung die Proteinkonzentration der verschiedenen Lysate angepasst. Eine Probe enthielt insgesamt 30 µg Protein. Als Verdünnungslösung wurde Lysat-Puffer verwendet. Zusätzlich wurde bei allen Proben 1/4 ihres Gesamtvolumens Proteinprobenpuffer hinzugefügt. Unmittelbar vor Erhitzen der Proben wurden noch 0,2 M Dithiothreitol (DTT) frisch dazugegeben. Es folgte die Denaturierung der Proteine durch Erhitzen der Proteinsamples bei 95°C im Wasserbad für fünf Minuten. Danach wurden die Proben und der Proteinmarker mittels einer Hamilton-Spritze in die Geltaschen gefüllt. Die Elektrophorese erfolgte zunächst für 15 Minuten bei 75 Volt (V) und wurde dann für 75 Minuten bei 100 V fortgesetzt. Sobald das Bromphenolblau die Unterkante des Sammelgels erreicht hatte, wurde die Elektrophorese gestoppt. Nun wurde die Western-Blot-Apparatur vorbereitet.

2.2.2 Western-Blot-Analyse

Die Western-Blot-Analyse dient dazu, die zuvor mit Hilfe der SDS-Page aufgetrennten Proteine auf eine Membran zu transferieren, um sie dort später durch Bindung spezifischer Antikörper indirekt identifizieren zu können. Der Transfer ist nötig, da eine angemessene Antigen-Antikörper-Reaktion innerhalb eines Polyacrylamid-Gels nicht gewährleistet werden kann.

Der Transfer folgte unmittelbar der zuvor durchgeführten Elektrophorese, wobei das Gel zu jedem Zeitpunkt feucht gehalten wurde. Da die Proteine aufgrund des gebundenen SDS eine negative Ladung aufweisen, wandern sie während des Transfers von dem an der Kathode ausgerichteten Gel zur an der Anode ausgerichteten Membran. Um eine Austrocknung zu verhindern, wurde an den Außenseiten der Kassette je ein in Transferpuffer getränkter Schwamm positioniert, dem nach innen ein nasses und entsprechend großes Filterpapier folgte. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Schichtung der einzelnen Western-Blot-Komponenten keine Luftblasen enthielt. Luftblasen wurden durch Ausrollen eines Blue Caps auf der Schichtung entfernt. Dann wurde die Kassette in die Western-Blot-Kammer eingefügt und die Apparatur soweit mit Transferpuffer aufgefüllt, dass die Elektroden umspült waren. Um die während des Proteintransfers entstehende Wärme adäquat abzuleiten, wurde die Kammer in Eiswasser gebettet und der Transferpuffer mit Hilfe eines Magnetrührers durchmischt. Der Transfer erfolgte nun entweder für 90 Minuten bei 100 V oder über Nacht bei 10 V. Zur Überprüfung eines erfolgreichen Transfers wurde die Membran für zwei bis fünf Minuten auf dem Schüttler in Ponceau S-Lösung bei Raumtemperatur inkubiert, sodass die Proteinbanden gut sichtbar reversibel angefärbt wurden. Anschließend wurde die Färbung durch mehrere Waschungen mit TBS-Tween vollständig entfernt.

2.2.3 Immunodetektion

Um die zuvor auf eine Membran transferierten Proteine identifizieren zu können, wurde ein indirekter Nachweis mittels mehrerer hintereinander geschalteter Antigen-Antikörper-Reaktionen durchgeführt. Hierbei binden zunächst Primärantikörper spezifisch an die Proteine auf der Membran. In einem weiteren Schritt werden an diese Primärantikörper Sekundärantikörper gebunden, welche mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert sind. Dieses Enzym wiederum reduziert in Folgereaktionen H_2O_2 zu Wasser, wobei der entstehende Sauerstoff als Elektronenakzeptator für ein Chemilumineszenzreagenz (Luminol) wirkt, welches durch die Reaktion auf ein höheres Energieniveau gehoben wird. Bei der Rückkehr zu seinem ursprünglichen Energieniveau wird Energie in Form von Licht emittiert, welche dann mit Hilfe eines Röntgenfilms sichtbar gemacht werden kann.

Abhängig von den Angaben im Standardprotokoll des Primärantikörper-Herstellers wurde die Nitrozellulosemembran zunächst unter leichtem Schütteln für 1 h bei Raumtemperatur bzw. bei 4°C über Nacht entweder mit 10 ml Blockierungslösung 1 oder 2 behandelt, um unspezifischen

Bindungen vorzubeugen. Nach Entfernen der Blockierungslösung wurde die Membran mit dem primären Antikörper in entsprechender Blockierungslösung inkubiert. Je nach Antikörper erfolgte diese Inkubation bei Raumtemperatur für 60 Minuten beziehungsweise 120 Minuten oder über Nacht bei 4°C. In allen Fällen erfolgte die Inkubation unter leichtem Schütteln. Anschließend erfolgte eine dreimalige Waschung der Membran für jeweils 5 Minuten mit TBS-Tween20 (0.05%) oder PBS-Tween (0.05%), je nach Herstellerangabe.

Nach abgeschlossener Waschung wurde der mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelte Sekundäntikörper in Blockierungslösung 1 beziehungsweise 2 gegeben und die Membran unter leichtem Schütteln für eine Stunde (h) bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde der oben genannte Waschvorgang wiederholt und zusätzlich eine fünfminütige Waschung nur mit TBS bzw. PBS durchgeführt.

Für die Chemilumineszenzreagenz-Reaktion wurde anfangs die ECL-Lösung 1 im Verlauf der Arbeit dann die ECL-Lösung 2 verwendet. Die Anwendung der ECL-Lösung 1 erfolgte durch Mischung der entsprechenden ECL-Reagenzien zu gleichen Teilen und Inkubation der vollständig mit Lösung bedeckten Membran. Bei Anwendung der ECL-Lösung 2 wurden 2 ml Lösung A, 200 µl Lösung B und 0,6 µl Lösung C gut gemischt und dann auf die Membran aufgetragen. Bei beiden Variationen betrug die Inkubationszeit mit dem Chemilumineszenzreagenz zwei Minuten bei Raumtemperatur.

Als nächstes wurde das Chemilumineszenzreagenz vorsichtig von der Membran abgeschüttelt und diese dann zwischen zwei Folien in der Filmkassette fixiert, wobei vorsichtiges Ausstreichen eine luftblasenfreie Membranplatzierung ermöglichte. Dann wurden Röntgenfilme innerhalb einer Dunkelkammer in die Filmkassette eingeschlossen und so dem emittierten Signal exponiert. Die Expositionszeit betrug abhängig von der Signalstärke 1 Sekunde bis hin zu mehreren Stunden. Die finale Einordnung der auf dem Röntgenfilm sichtbaren Banden erfolgte mit Hilfe des Markers.

2.2.4 Immunhistochemie (APAAP)

Für die Immunhistologie wurden Formalin-fixierte, in Paraffin eingebettete Gewebeschnitte von Melanomen und Aktinischen Keratosen verwendet. Zunächst erfolgte die Entparaffinierung der Schnitte mittels Xylol, danach die Rehydratisierung mit Hilfe einer absteigenden Alkoholreihe. Hierbei wurden die Schnitte in Färbegestelle platziert und für jeweils fünf Minuten 96%igem,

80%igem, 70%igem und 50%igem Ethanol bei Raumtemperatur exponiert. Dann folgte eine weitere Exposition der Schnitte mit doppeldestilliertem Wasser (Aqua bidest) und anschließend eine kurze Zwischenlagerung in TBS, da eine Austrocknung der Schnitte ab diesem Zeitpunkt unbedingt verhindert werden musste.

Zur Steigerung der Antigenität und Demaskierung der Antigene nach Fixation wurden die Schnitte im Dampfdruckkochtopf mit Citratpuffer vollständig bedeckt, erhitzt und drei Minuten sprudelnd gekocht (Antigen-Retrieval). Anschließend kühlten die Schnitte unter sehr langsam fließendem Aqua bidest für 30 Minuten auf Raumtemperatur ab und wurden dann erneut in TBS zwischengelagert. Es folgte die Umrandung und Abgrenzung des Gewebes vom restlichen Objektträger mittels eines entsprechenden Markers (Delimiting pen, Dako).

Anschließend erfolgte für 30 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer die Inkubation der Gewebsschnitte mit Blockierungslösung. Nach einmaliger kurzer Waschung in TBS-Tween folgte die Inkubation der Schnitte mit dem Primärantikörper in Antikörper-Lösung 1. Die Inkubationszeit betrug abhängig vom Antikörper 60-90 Minuten bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C.

Nach der Primärantikörperinkubation wurden die Schnitte 2x10 Minuten unter leichtem Schütteln in TBS-Tween gewaschen. Nur bei den Schnitten, die zuvor mit einem Primärantikörper vom Kaninchen inkubiert worden sind, folgte als nächstes eine 45-minütige Inkubation mit dem Brückenantikörper in Antikörper-Lösung 2 mit anschließender Waschung der Schnitte für 2x10 Minuten unter leichtem Schütteln in TBS-Tween. Anschließend wurden die Schnitte für 45 Minuten mit dem Sekundärantikörper in Antikörper-Lösung 2 inkubiert und erneut für 2x10 Minuten unter leichtem Schütteln in TBS-Tween gewaschen.

Als nächstes wurden die Gewebsschnitte für 45 Minuten mit dem APAAP-Antikörper in RPMI-Lösung inkubiert und wieder für 2x10 Minuten unter leichtem Schütteln in TBS-Tween gewaschen. Bei allen Färbungen, in denen ein Primärantikörper der Spezies Maus verwendet worden war, wurden die letzten beiden Inkubationsschritte zur Signalverstärkung für jeweils 10 Minuten wiederholt. Anschließend wurden die Gewebsschnitte einmal kurz mit TBS-Tween abgespült und nochmals 2x5 Minuten gründlich gewaschen.

Nun erfolgte die 15-minütige Färbung der Gewebsschnitte mit Hilfe des Fuchsin-Substrat-Chromogen-Systems und eine erneute Waschung mit Aqua bidest für 2x5 Minuten. Die Gegenfärbung geschah mit Mayers Hämalaunlösung für 45 Sekunden und anschließender

Waschung der Schnitte mit Leitungswasser für 2x5 Minuten. Zuletzt wurden die Schnitte mit Eindeckmittel und Deckgläsern bedeckt.

Die Auswertung erfolgte durch mehrfache mikroskopische Abschätzung der Anzahl stark, mittelgradig und schwach gefärbter Tumorzellen in Prozent. Tumorzellen mit starker und mittelgradiger Intensität der Farbreaktion wurden als positiv für die Expression des Antigens angesehen. Ein Tumor galt in der Auswertung als positiv, wenn mindestens 30% seiner Zellen das Antigen exprimierten. Der Gradmesser für die Intensität der Farbreaktion wurde für jede einzelne Färbeserie getrennt bestimmt und nie für andere Serien angewendet. Eine Herabbeziehungsweise Heraufregulierung des Antigens in der Duplettanalyse lag dann vor, wenn sich die Gesamtzahl positiver Zellen im Primärtumor und seiner korrespondierenden Metastase um mindestens 10% unterschied. Um eine selektive Beurteilung der Tumorzellen zu gewährleisten, wurden alle Tumore einmalig unter Verwendung des Anti-S100-Antikörpers immunhistologisch gefärbt, was eine Identifizierung der Melanom-Zellen ermöglichte. Es erfolgte außerdem eine Zweitbeurteilung durch OA. Dr. med. Joachim Röwert, Leiter der Dermatopathologie, Klinik für Dermatologie, Venerologie u. Allergologie, Charité Campus Mitte der Charité-Universitätsmedizin Berlin.

2.3 Statistische Auswertung

Die Bewertung der statistischen Relevanz von den durch mikroskopische Auswertung gewonnenen Daten erfolgte abhängig von den betrachteten Stichproben mit Hilfe unterschiedlicher statistischer Tests, wobei stets eine Berechnung des p-Wertes mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS erfolgte. Entsprechend der gängigen Konvention wurde die Nullhypothese bei p-Werten von $p < 0,05$ verworfen und Ergebnisse von $p \geq 0,05$ bei gleichzeitig $p < 0,1$ als Tendenz gewertet. Bei p-Werten von $p \geq 0,1$ behielt die Nullhypothese Geltung.

Auch die zur Testauswahl notwendige Abweichung der Daten von der Normalverteilung (Schiefe) wurde mit SPSS berechnet. Aufgrund des geringen Stichprobenumfangs waren die Daten erwartungsgemäß nicht normalverteilt, und es wurden daher nicht-parametrische Tests verwendet. Der nach Datenerhebung vorhandene Unterschied zwischen starker und mittelgradiger Färbung floß nicht in die statistische Auswertung ein. Statt dessen wurden lediglich die gesamt-positiven Prozentsätze für die Bewertung verwendet.

Die statistische Beratung erfolgte durch Hr. Helmut Orawa, Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie, Charité Campus Mitte der Charité-Universitätsmedizin Berlin.

Wurde eine Variable bei zwei voneinander unabhängigen Kollektiven verglichen, zum Beispiel die Antigen-Expression in Primärtumoren von Männern und Frauen, so wurde der U-Test für zwei unverbundene Stichproben verwendet. Um festzustellen, in wie weit die Antigen-Expression (abhängige Variable) statistisch relevant von einem untersuchten Faktor (unabhängige Variable), zum Beispiel der Tumordicke beeinflusst wird, also ob hier ein Zusammenhang besteht, wurde mit Hilfe von SPSS eine Regressionsanalyse durchgeführt. Angegeben sind jeweils die p-Werte der linearen Regression. Die Auswertung der Dupletts, also der direkte Vergleich der Antigen-Expression in Primärtumoren und korrespondierenden Metastasen jeweils desselben Patienten erfolgte mit Hilfe des Vorzeichen-Rang-Tests nach Wilcoxon für verbundene Stichproben.

3. ERGEBNISSE

3.1 Vorversuche Bcl-2

3.1.1 Hohe Spezifität des Anti-Bcl-2-Antikörpers in der Western-Blot-Analyse

Im Folgenden wurde der Zusammenhang zwischen Bcl-2-Expression und Metastasierung in Primärtumoren und Metastasen untersucht. Zunächst wurde die Spezifität des für die folgenden immunhistologischen Versuche genutzten Antikörpers in der Western-Blot-Analyse an sieben Melanom-Zelllinien getestet. Da vom Hersteller DakoCytomation für diesen Antikörper keine Angaben bezüglich der Western-Blot-Analyse gemacht worden sind, wurde die für Immunzytochemie empfohlene Verdünnung von 1:50 gewählt.

Die Western-Blot-Analyse zeigte eine durchgehende Expression von Bcl-2 in allen sieben Melanom-Zelllinien (Abbildung 3.1.1). Es fand sich ausschließlich die erwartete Bcl-2-Bande bei 23 kDa, sodass auf eine hohe Spezifität des Antikörpers geschlossen wurde. Die Ladekontrolle erfolgte mit Hilfe einer Ponceau-Färbung sowie der Überprüfung der β -Aktin-Expression. Beide Kontrollen zeigten eine einheitliche Proteinbeladung aller Spuren und gleichmäßigen Protein-Transfer.

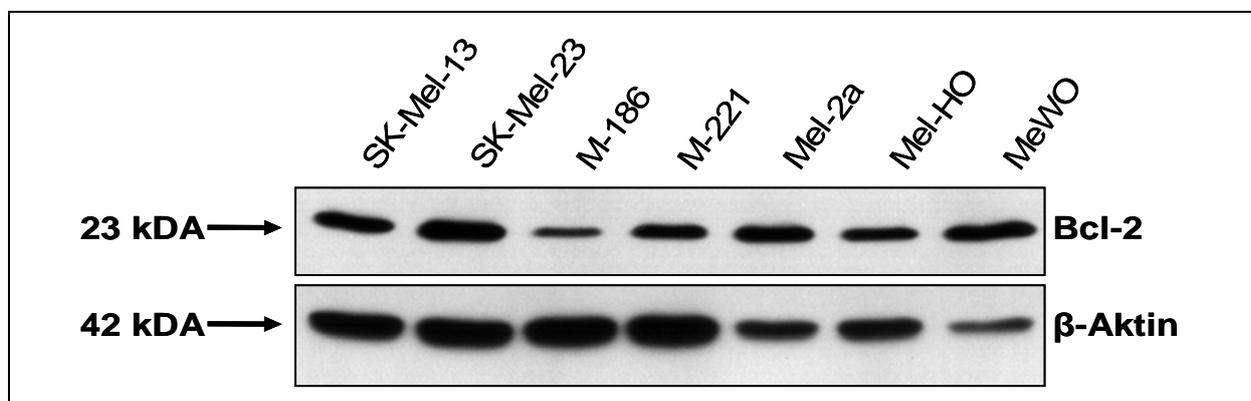


Abbildung 3.1.1 Durchgehende Expression von Bcl-2 in Melanom-Zelllinien

Die Western-Blot-Analyse zeigte eine Expression von Bcl-2 in allen sieben getesteten Melanom-Zelllinien. Die Expositionsdauer betrug 30 Sekunden. Die Beladung erfolgte jeweils mit der gleichen Proteinmenge (30 μ g pro Spur) und ist mittels β -Aktin dargestellt. Hier betrug die Expositionszeit nur fünf Sekunden.

3.1.2 Geringe Farbintensität der immunhistologischen Färbung bei allen getesteten Antikörper-Verdünnungen

Mit Hilfe einer Verdünnungsreihe wurde nach Bestätigung der Spezifität die geeignete Verdünnung des Anti-Bcl-2-Antikörpers für die Immunhistologie ermittelt. Dazu wurden

Schnitte von drei Tumoren jeweils mit Antikörper-Verdünnungen von 1:50, 1:100 und 1:200 gefärbt. Parallel lief eine Negativkontrolle, bei der kein Primärantikörper eingesetzt wurde.

In der mikroskopischen Begutachtung fand sich bei allen Antikörper-Verdünnungen eine schwache Färbung des Zytosols der Tumorzellen, die bei der geringsten Verdünnung von 1:50 am intensivsten war (Abbildung 3.1.2). Nicht tumoröses Gewebe wies keine Färbung auf und konnte so abgegrenzt werden. Auch die Negativkontrolle wies keine Färbung auf, wodurch eine unspezifische Reaktion des sekundären Antikörpers ausgeschlossen wurde. Aufgrund der nur geringen Farbintensität bei höheren Verdünnungen eignete sich lediglich eine Verdünnung von 1:50 für die weiteren immunhistologischen Versuche.

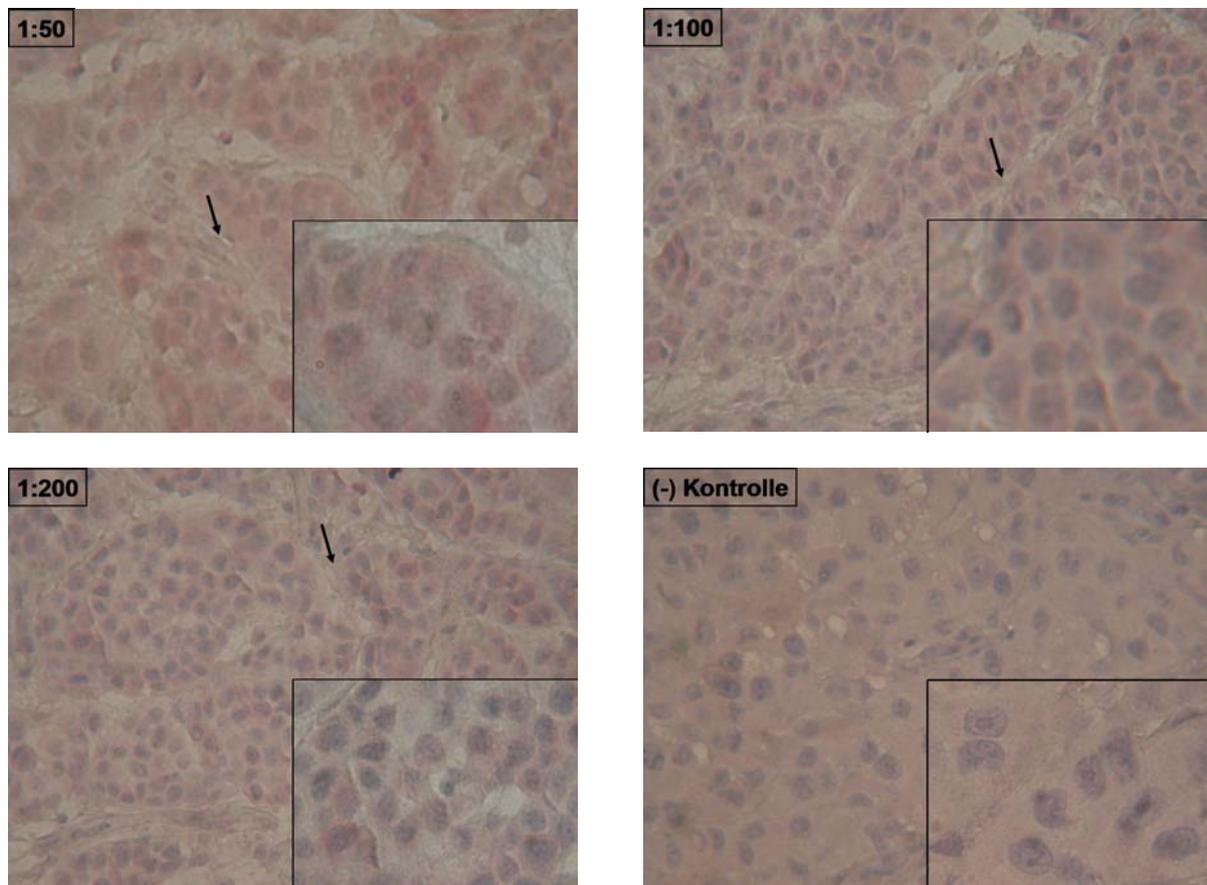


Abbildung 3.1.2 *Verdünnungsreihe mit Anti- Bcl-2-Antikörper in der Immunhistologie*
Es wurden die Verdünnungsstufen 1:50, 1:100 und 1:200 an drei verschiedenen Melanomen getestet, von denen hier exemplarisch ein Tumor dargestellt ist. Bei allen drei Antikörper-Verdünnungen fand sich nur eine schwache Färbung von Bcl-2 im Zytosol der Tumorzellen. Es zeigte sich keine unspezifische Färbung nicht tumorösen Gewebes (Pfeile). Die Negativkontrolle wies keinerlei Färbung auf.

3.1.3 Höhere Farbintensität bei verlängerter Inkubationszeit des Fuchsin-Substrat-Chromogen-Systems

Aufgrund der insgesamt schwachen Farbintensität auch bei geringer Antikörper-Verdünnung, wurden die Inkubationszeiten für die Primärantikörper-Exposition und die Exposition des Fuchsin-Substrat-Chromogen-Systems modifiziert. Hierzu wurde die Expositionszeit des Primärantikörpers bei Schnitten von drei Melanomen abweichend vom Standardprotokoll auf 180 Minuten verlängert, bei weiteren drei Melanomen wurde die Expositionszeit des Fuchsin-Substrat-Chromogen-Systems auf 25 Minuten verlängert und bei zwei Tumoren sowie der Negativkontrolle erfolgte eine Verlängerung beider Expositionszeiten. Zusätzlich wurden zwei Tumore dem Standardprotokoll entsprechend behandelt (Tabelle 3.1.1).

Tabelle 3.1.1 Modifikation ausgewählter Einflußgrößen der immunhistologischen Färbung (APAAP)

Protokoll	Expositionszeit des Primärantikörpers	Expositionszeit des Fuchsin-Substrat-Chromogen-Systems	Getestete Tumore
Standardprotokoll	60'	15'	2
Protokoll 1	180'	15'	3
Protokoll 2	60'	25'	3
Protokoll 3	180'	25'	2

Die Auswertung zeigte eine überwiegend von der Expositionszeit des Fuchsin-Substrat-Chromogen-Systems abhängige Farbintensität. Bei Verlängerung der Bcl-2-Antikörper-Exposition um Faktor drei (Protokoll 1) fand sich keine intensivere Färbung verglichen zum Standardprotokoll. Dagegen zeigte sich bereits bei einer nur 1,6-fachen Verlängerung der Expositionszeit des Fuchsin-Substrat-Chromogen-Systems (Protokoll 2) eine Intensivierung der Färbung. Die gleichzeitige Veränderung beider Parameter (Protokoll 3) brachte keine zusätzliche Verstärkung des Signals (Abbildung 3.1.3). In den folgenden immunhistologischen Versuchen mit Bcl-2 wurde daher die Inkubationszeit des Fuchsin-Substrat-Chromogen-Systems auf 20 Minuten verlängert.

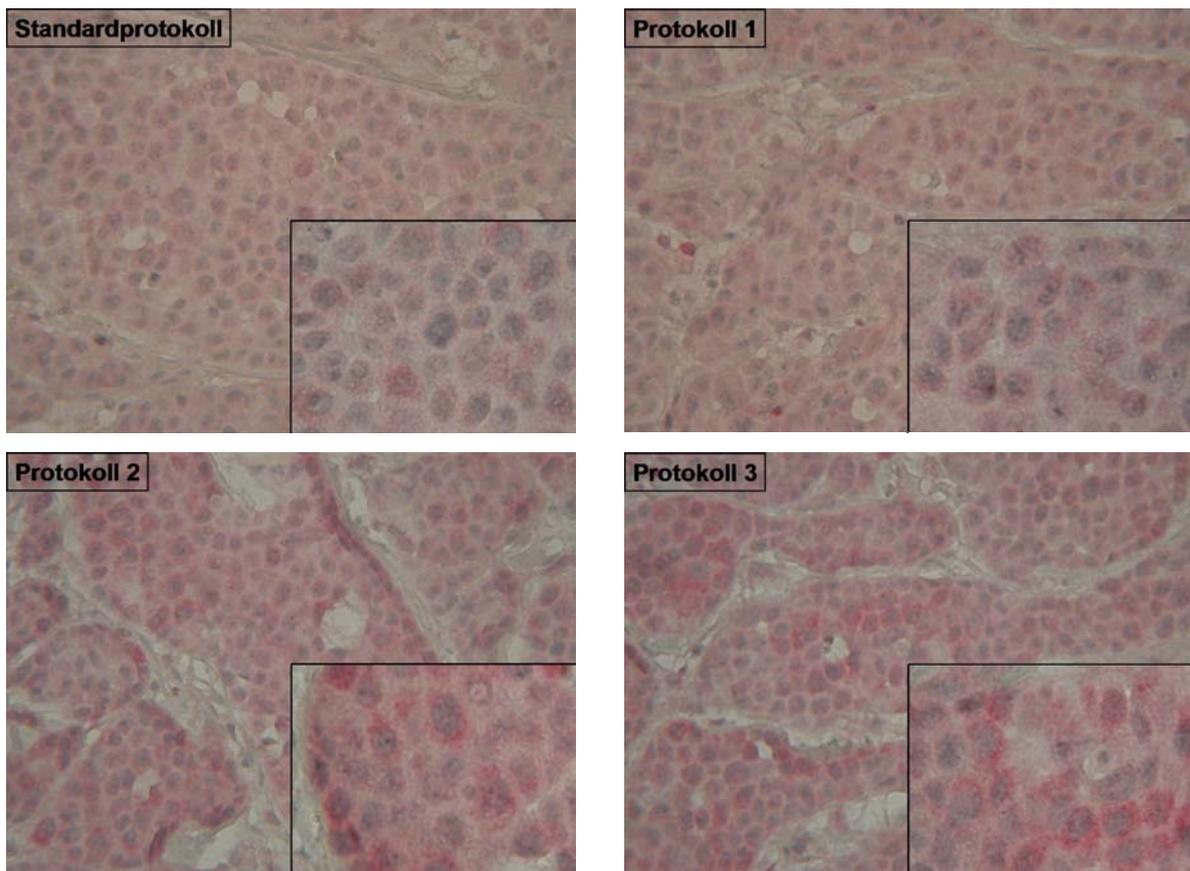


Abbildung 3.1.3 *Farbintensität in der Immunhistologie (APAAP) abhängig von der Expositionszeit des Fuchsin-Substrat-Chromogen-Systems.*

Abweichend vom Standardprotokoll wurden die Expositionszeiten des Bcl-2-Antikörpers und des Fuchsin-Substrat-Chromogen-Systems drei unterschiedlichen Protokollen entsprechend modifiziert (Tab. 3.1.1). Hier beispielhaft dargestellt ist ein getesteter Tumor.

3.2 Bcl-2-Expression in Primärtumoren und Metastasen

3.2.1 Geringere Bcl-2-Expression in Metastasen

Die Expression von Bcl-2 wurde bei jeweils 20 Schnitten von primären Melanomen und Metastasen immunhistologisch (APAAP) untersucht. Davon waren ein Primärtumor und drei Metastasen nicht auswertbar. In 14 von 19 Primärtumoren zeigte sich eine deutliche Bcl-2-Expression (mittelstarke bis starke Farbtintensität; 74%), während nur 8 von 17 der Metastasen das Antigen exprimierten (47%; Tabelle 3.2.1). Auch der Median positiver Tumorzellen war bei Primärtumoren deutlich höher (60%) als bei Metastasen (15%). Diese Aussage war statistisch signifikant ($p = 0,04$).

Der Vergleich der Bcl-2-Expression bei vierzehn Pärchen von Primärtumor und korrespondierender Metastase ergab in 7 von 14 Fällen eine Herabregulation von Bcl-2 in

Metastasen (50%). Hierbei wurden Unterschiede von $\geq 10\%$ gewertet. Es fand sich eine Heraufregulation in nur 3 Fällen (21%) und eine gleich bleibende Expression in 4 Fällen (29%; Abbildung 3.2.1). Dieser Unterschied war jedoch aufgrund der begrenzten Stichprobenzahl nicht signifikant ($p = 0,28$).

Tabelle 3.2.1 Expression von Bcl-2 in Primärtumoren und Metastasen

Es sind die Auswertungsergebnisse der immunhistologischen Überprüfung der Bcl-2-Expression in 20 Primärtumoren (Pt) und Metastasen (Met) dargestellt. Drei Metastasen (P, Q, T) und ein Primärtumor (O) waren nicht auswertbar.

* schwach wurde als negativ gewertet

Patient (Pt)	Tumorzellen mit Farbintensität [%]		
	stark	mittel	Schwach*
A	2,5	35	62,5
B	22,5	42,5	35
C	20	10	70
D	10	50	40
E	0	1	99
F	50	25	25
G	10	55	35
H	10	25	65
I	6	20	74
J	1	25	74
K	1	40	59
L	0,5	70	29,5
M	15	45	40
N	20	40	40
O	---	---	---
P	5	15	80
Q	2,5	15	82,5
R1	25	40	35
S1	15	50	35
T	25	55	20
Median der positiven Tumorzellen: 60%			

Patient (Met)	Tumorzellen mit Farbintensität [%]		
	stark	mittel	Schwach*
A	0	1	99
B	20	50	30
C	2,5	4	93,5
D	1	14	85
E	20	60	20
F	0	1	99
G	0	0,5	99,5
H	1	35	65
I	7,5	32,5	60
J	1,5	35	63,5
K	0	0	100
L	0	70	30
M	0	60	40
N	5,5	35	59,5
O	3	2	95
P	---	---	---
Q	---	---	---
R2	0	15	85
S2	0	5	95
T	---	---	---
Median der positiven Tumorzellen: 15%			

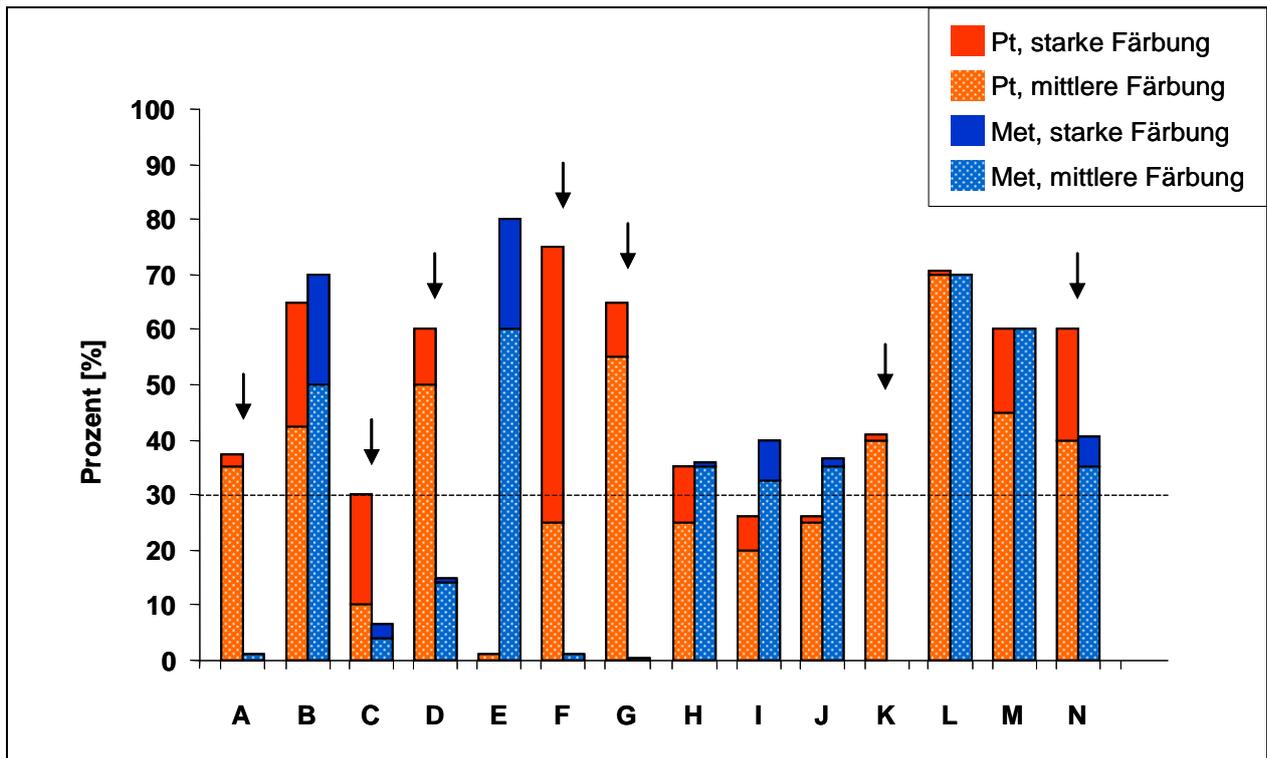
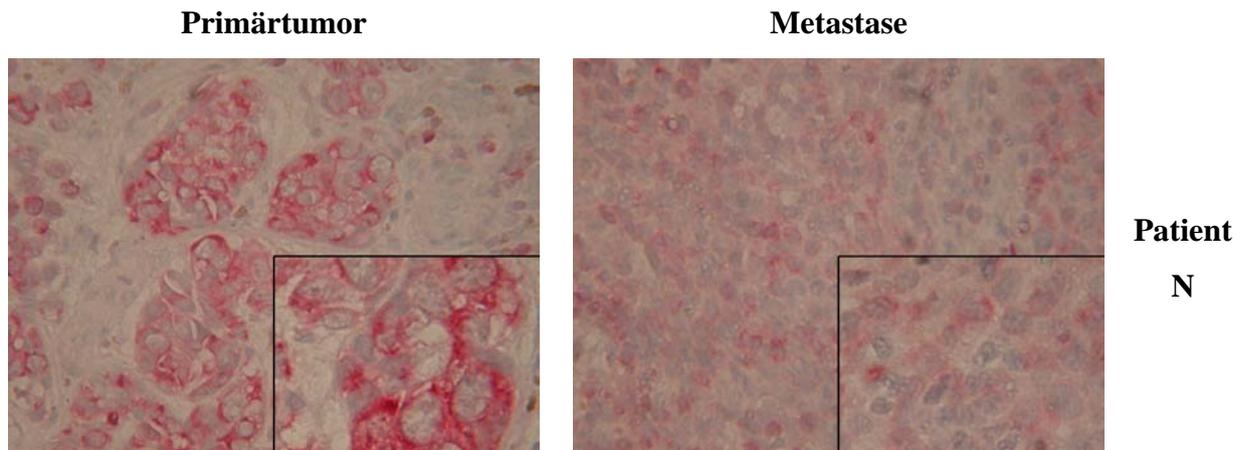


Abbildung 3.2.1 Häufige Herabregulation von Bcl-2 in Metastasen verglichen zum korrespondierenden Primärtumor

Es ist die Expression von Bcl-2 in 14 korrespondierenden Tumorpärchen dargestellt (Patienten: A-N). Es fand sich verglichen mit Primärtumoren (Pt) in 7 von 14 Metastasen (Met) eine Herabregulierung der Bcl-2-Expression (Pfeile). In drei Tumoren (E, I, J) fand sich eine Heraufregulation, während die übrigen keine Veränderung aufwiesen.



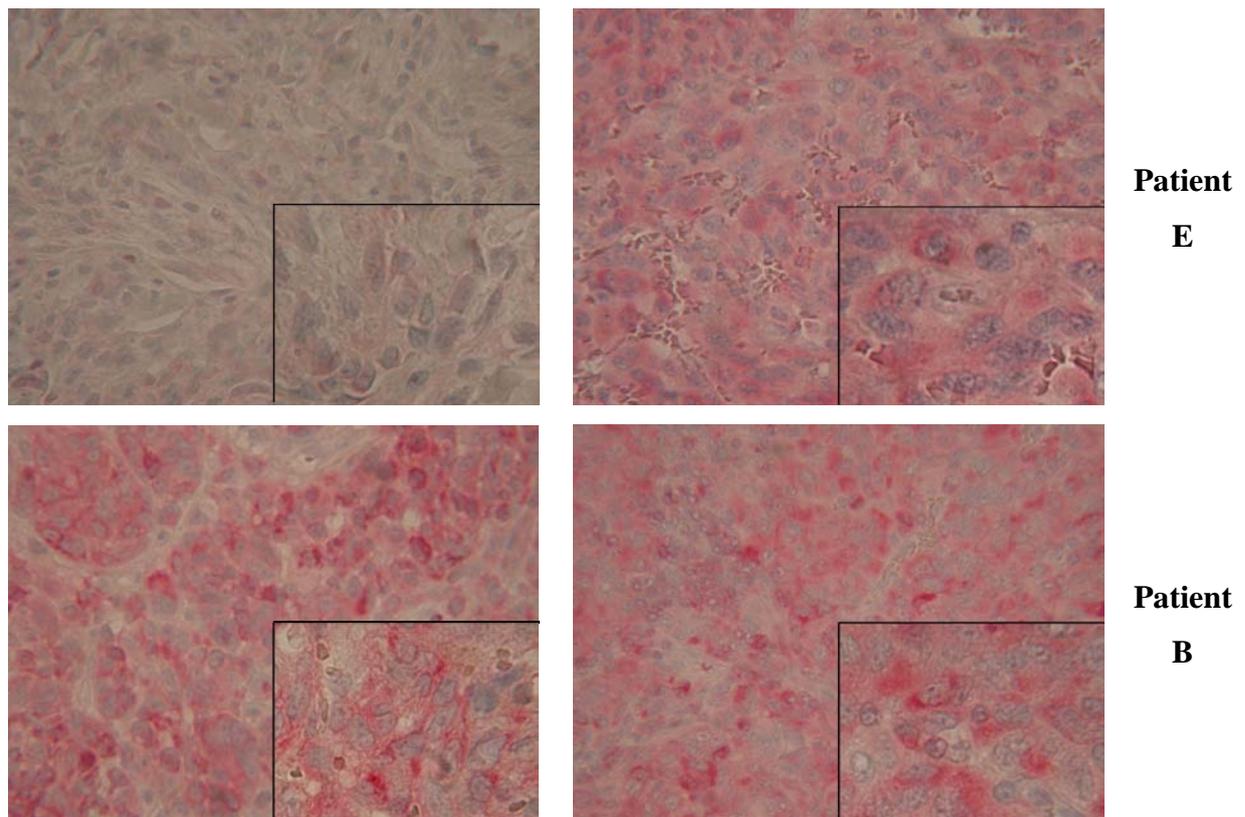


Abbildung 3.2.2 *Bcl-2-Expression in der immunhistologischen Färbung (APAAP)*
 Es ist jeweils ein Beispiel für die Herabregulation (Patient N), die Heraufregulation (Patient E) und die unveränderte Expression von Bcl-2 (Patient B) in den korrespondierenden Metastasen verglichen zum Primärtumor dargestellt.

3.2.2 Verlust von Bcl-2 in korrespondierenden Metastasen der Männer

Es wurde die Bcl-2-Expression in jeweils 10 Primärtumoren und Metastasen von Männern und Frauen verglichen. Bei den Männern waren ein Primärtumor und eine Metastase, bei den Frauen zwei Metastasen nicht auswertbar. Es zeigte sich bei den Primärtumoren in 7 von 9 Fällen der Männer (78%) und in 7 von 10 Fällen der Frauen (70%) eine deutliche Bcl-2-Expression. Im Gegensatz dazu war die Expression von Bcl-2 in den Metastasen der Männer seltener. Es fand sich nur in 2 von 9 Metastasen der Männer (22%), aber in 6 von 8 Metastasen der Frauen (75%) eine deutliche Expression von Bcl-2.

Der Median positiver Tumorzellen unterschied sich bei den Primärtumoren von Männern (60%) und Frauen (49%) nur geringfügig, während er bei den Metastasen größere Unterschiede aufwies. Er betrug hier für die Männer nur 7%, für die Frauen dagegen 39%. Diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant ($p = 0,14$).

Der Vergleich der Bcl-2-Expression bei vierzehn Pärchen von Primärtumor und korrespondierender Metastase zeigte bei Männern in 4 von 6 Fällen (67%) eine Herabregulation in Metastasen, während in nur einem Fall eine Heraufregulation auftrat (Abbildung 3.2.3). Dieser Unterschied erwies sich als Tendenz ($p = 0,08$). Bei den Frauen zeigte sich insgesamt keine Änderung der Bcl-2-Expression. Nur in 3 von 8 Metastasen (38%) fand sich ein Verlust von Bcl-2, bei 2 von 8 Fällen (25%) dagegen eine Heraufregulation.

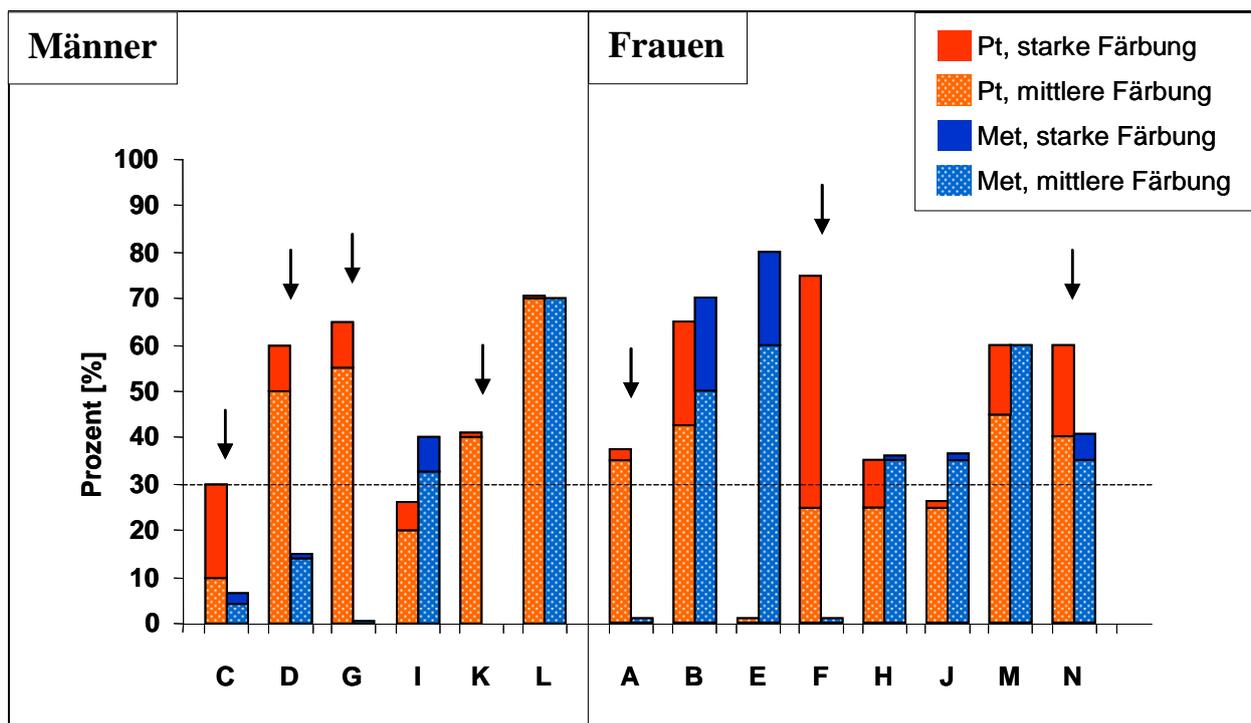


Abbildung 3.2.3 *Verlust von Bcl-2 in korrespondierenden Metastasen der Männer*
 Es ist die Expression von Bcl-2 bei 14 korrespondierenden Tumorpärchen (Patienten: A-N) sortiert nach Geschlecht dargestellt. Bei Männern fand sich ein häufiger Verlust von Bcl-2 in Metastasen (Pfeile), während sich bei den Frauen insgesamt keine Unterschiede zeigten.

3.2.3 Verlust von Bcl-2 in korrespondierenden Metastasen dickerer Primärtumore (T3/T4)

Es wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen Tumordicke und Bcl-2-Expression überprüft. Die Schnitte wurden hierzu entsprechend der Tumordicke nach Breslow des Primärtumors in vier Gruppen eingeteilt (T1-T4; Tabelle 3.2.2). Der Einteilung wurde die T-Klassifikation des malignen Melanoms zugrunde gelegt [Balch et al, 2001].

Tabelle 3.2.2 Gruppeneinteilung der Schnitte entsprechend der Tumordicke des Primärtumors

Gruppe	Tumordicke des Primärtumors	Anzahl untersuchter Primärtumore/Metastasen
T1	≤ 1,0 mm	3/3
T2	1,01-2,0 mm	4/4
T3	2,01-4,0 mm	7/5
T4	> 4,0 mm	5/5

Bei Primärtumoren fand sich in Gruppe T1 in 2 von 3 (~67%), in Gruppe T2 in 3 von 4 (75%), in Gruppe T3 in 5 von 7 (71%) und in Gruppe T4 in 4 von 5 (80%) Fällen eine deutliche Bcl-2-Expression. Bei den Metastasen fand sich in Gruppe T1 bei 2 von 3 (67%), in Gruppe T2 bei 2 von 4 (50%), in den Gruppen T3 und T4 jeweils bei 2 von 5 Tumoren (40%) eine deutliche Bcl-2-Expression.

Der Median positiver Tumorzellen betrug jedoch bei dünnen Primärtumoren (T1) nur 30%, in T2 lag er dagegen bei 62,5%, in T3 bei 60% und in T4 bei 65%. Dünne Primärtumore (T1) wiesen eine signifikant verringerte Bcl-2-Expression verglichen zu dickeren Tumoren (T2-T4) auf ($p = 0,03$). Bei den Metastasen waren die Unterschiede geringer. Der Median positiver Tumorzellen lag hier in T1 bei 35%, in T2 bei 26%, in T3 bei 15% und in T4 bei 1%.

Beim direkten Vergleich der vierzehn Primärtumore und korrespondierenden Metastasen zeigte sich bei dickeren Primärtumoren (T3/T4) in 6 von 9 Fällen (67%) eine Herabregulation von Bcl-2 in Metastasen (Abbildung 3.2.4). Dieser Verlust erwies sich als Tendenz ($p = 0,05$). Eine Heraufregulation fand sich dagegen bei dünneren Tumoren (T1/T2) in 2 von 5 Fällen (40%), bei dickeren Tumoren in nur einem Fall (11%).

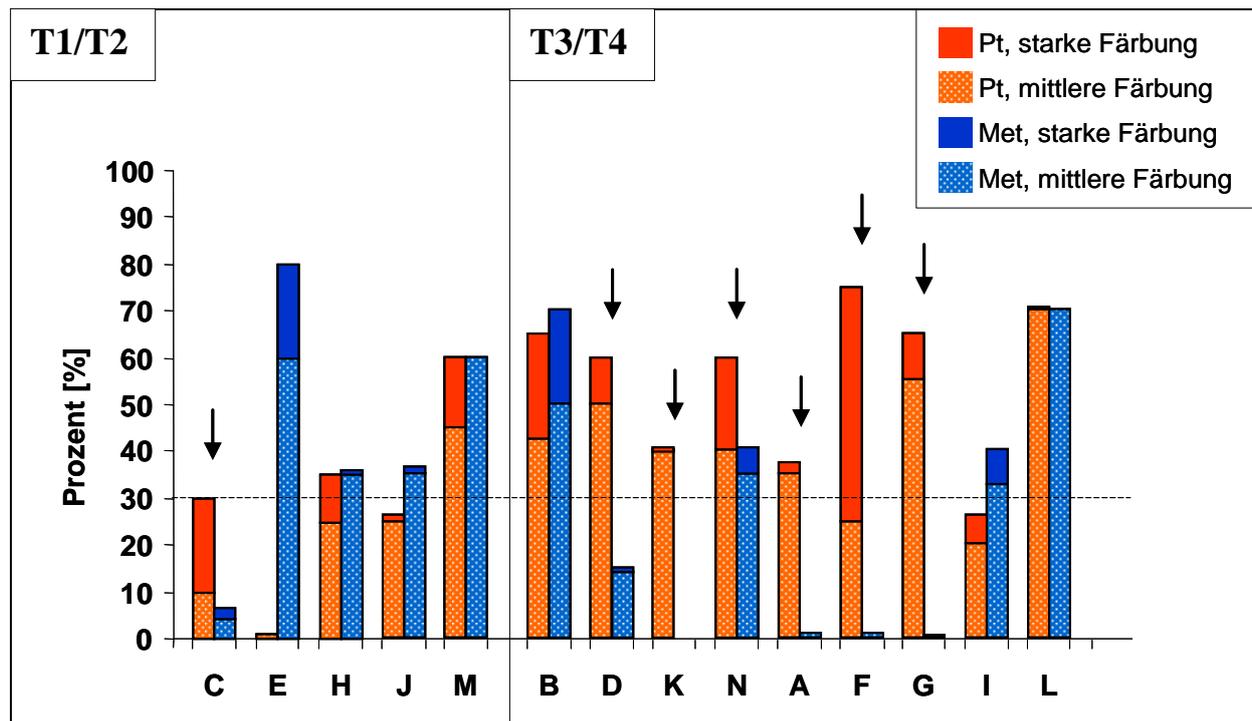


Abbildung 3.2.4 *Bcl-2-Verlust in korrespondierenden Metastasen dickerer Primärtumore (T3/T4)*

Es ist die Expression von Bcl-2 bei 14 korrespondierenden Tumorpärchen (Patienten: A-N) sortiert entsprechend der Tumordicke des Primärtumors (T1-T4) dargestellt. Es zeigte sich bei dickeren Tumoren (T3/T4) ein häufiger Bcl-2-Verlust in den Metastasen (Pfeile). Außerdem fanden sich zwei von drei Bcl-2-Heraufregulationen (E, I, J) bei Metastasen dünnerer Primärtumore (T1/T2).

3.2.4 Erhöhte Bcl-2-Expression in Metastasen von Primärtumoren mit Clark-Level IV

Es wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen Clark-Level und Bcl-2-Expression geprüft. Hierfür wurden die Schnitte zunächst entsprechend der in der Klinik bereits etablierten Clark-Klassifikation in fünf Gruppen (I-V) eingeteilt. Für die Gruppen I und II standen keine Tumore zur Verfügung (Tabelle 3.2.3).

Tabelle 3.2.3 *Clark-Level des Primärtumors*

Clark-Level	Anzahl untersuchter Primärtumore/Metastasen
I	0/0
II	0/0
III	5/5
IV	13/11
V	1/1

In Primärtumoren zeigte sich unabhängig vom Clark-Level in allen Gruppen eine häufige Expression. In Gruppe III exprimierten alle fünf untersuchten Tumore (100%) Bcl-2, in Gruppe IV fand sich in 8 von 13 (62%) Fällen eine deutliche Expression. Auch der Tumor in Gruppe V war Bcl-2-positiv. In den Metastasen von Primärtumoren mit Clark-Level III fand sich verglichen zu Metastasen von Primärtumoren mit Clark-Level IV eine deutlich seltenere Expression von Bcl-2. In Gruppe III exprimierten 1 von 5 (20%), in Gruppe IV dagegen 7 von 11 (~64%) Tumore Bcl-2. Der Tumor in Gruppe V erwies sich als Bcl-2-negativ.

Der Median schwankte bei Primärtumoren unabhängig vom Clark-Level stark. Er lag bei den in Gruppe III bei 41%, in Gruppe IV bei 60% und in Gruppe V bei 37,5%. Bei den Metastasen in Gruppe III betrug er nur 15%, in Gruppe IV dagegen 40%. Dieser Unterschied war allerdings nicht signifikant ($p = 0,19$).

Der Vergleich von vierzehn korrespondierenden Tumorpärchen zeigte eine häufige Herabregulation von Bcl-2 in Metastasen korrespondierender Primärtumore mit Clark-Level III. Es fand sich in Gruppe III bei 3 von 4 (75%) Metastasen und in Gruppe IV bei 3 von 9 (33%) Metastasen ein Verlust von Bcl-2. Auch die Metastase in Gruppe V wies eine Herabregulation auf. Heraufregulation zeigten sich bei 3 von 9 (33%) Metastasen in Gruppe IV. Der häufige Verlust in Gruppe III erwies sich als nicht signifikant ($p = 0,14$).

3.2.5 Verlust von Bcl-2 in korrespondierenden Metastasen ulzerierter Primärtumore

Es wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen Ulzeration und Bcl-2-Expression in jeweils 16 Primärtumoren und Metastasen geprüft. Ein Primärtumor und zwei Metastasen waren nicht auswertbar. Zunächst erfolgte die Einteilung der Schnitte in drei Gruppen (Tabelle 3.2.4).

Tabelle 3.2.4 Gruppeneinteilung anhand der Ulzeration des Primärtumors

Ulzeration bei Primärtumor	Anzahl auswertbarer Primärtumore/Metastasen
Primärtumor ohne Ulzeration	10/10
Primärtumor mit Ulzeration	5/4

In den Primärtumoren zeigte sich unabhängig von der Ulzeration eine häufige Bcl-2-Expression. Bei den nicht-ulzerierten Primärtumoren fand sich in 8 von 10 Fällen (80%), bei den ulzerierten in 4 von 5 Tumoren (80%) eine deutliche Bcl-2-Expression. Auch bei den Metastasen zeigte sich kein Zusammenhang zwischen der Häufigkeit der Bcl-2-Expression und dem Ulzerationsgrad des Primärtumors. Bei Metastasen nicht-ulzerierter Primärtumore fand sich in 4 von 10 Fällen

(40%), bei Metastasen ulzerierter Primärtumore in 2 von 4 Fällen (50%) eine Expression von Bcl-2.

Auch beim Median positiver Tumorzellen fanden sich nur geringe Unterschiede. In beiden Gruppen betrug der Median jeweils 60%. Bei den Metastasen nicht-ulzerierter Tumore lag der Median bei 15%, bei Metastasen ulzerierter Tumore betrug er 21%.

Der Vergleich der Bcl-2-Expression in elf Pärchen von Primärtumor und korrespondierender Metastase ergab einen Verlust von Bcl-2 in Metastasen ulzerierter Tumore. Während sich nur in 3 der 7 Metastasen (43%) nicht-ulzerierter Primärtumore ein Verlust von Bcl-2 fand, zeigte sich in 3 von 4 (75%) Metastasen ulzerierter Primärtumore eine Herabregulation (Abbildung 3.2.5). Dieser Verlust erwies sich in der statistischen Auswertung als Tendenz ($p = 0,06$). Eine Heraufregulation von Bcl-2 fand sich insgesamt in nur zwei Metastasen (29%) der nicht-ulzerierten Tumore.

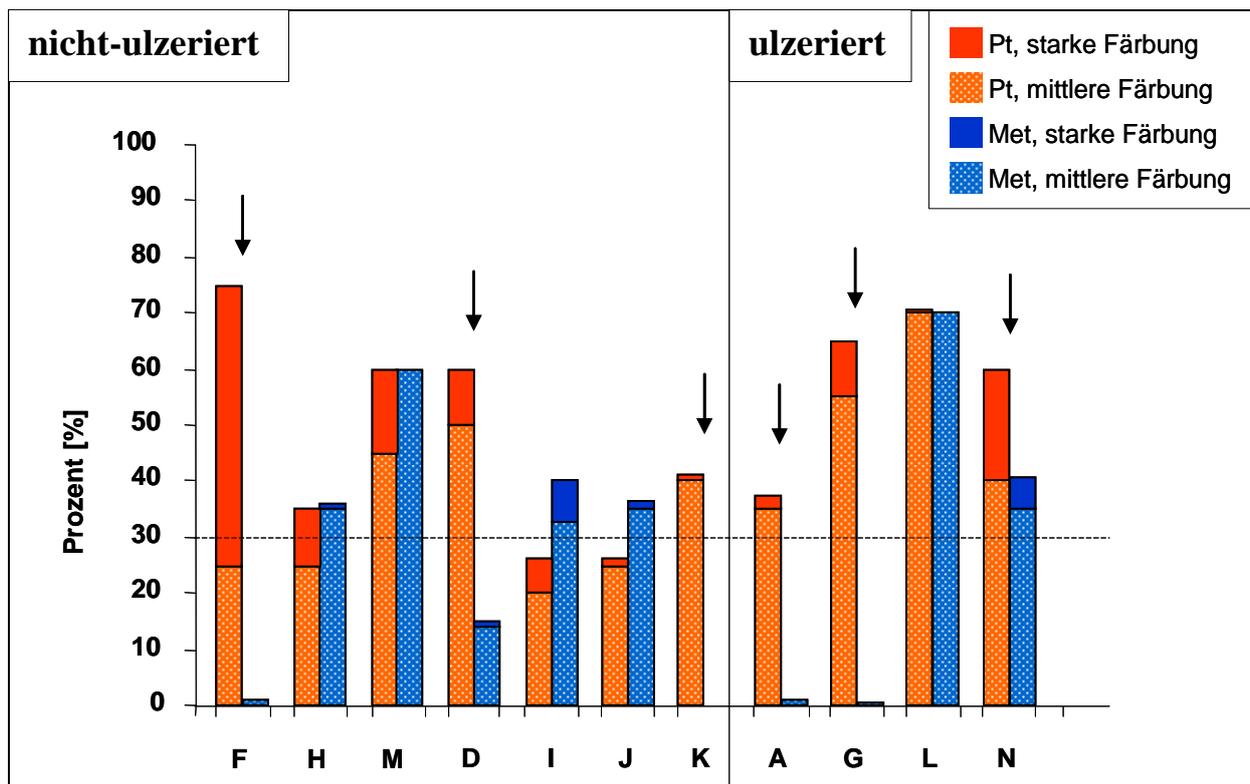


Abbildung 3.2.5 *Bcl-2-Verlust in korrespondierenden Metastasen ulzerierter Primärtumore*

Es ist die Expression von Bcl-2 bei elf korrespondierenden Tumorpärchen (Patienten: A, D, F-N) sortiert entsprechend Ulzerationsgrad des Primärtumors (nicht-ulzeriert/ulzeriert) dargestellt. Es zeigt sich bei ulzerierten Tumoren ein Bcl-2-Verlust in Metastasen (Pfeile).

3.3 Vorversuche Mcl-1

3.3.1 Unterschiedliche Spezifität getesteter Mcl-1-Antikörper in der Western-Blot-Analyse

Es erfolgte zunächst die Überprüfung der Spezifität zweier Antikörper gegen Mcl-1 durch Western-Blot-Analysen von sieben Melanom-Zelllinien. Es wurden die Antikörper AHP472 (Firma Serotec) und Ab3184 (Firma Abcam) getestet. Die Western-Blot-Analysen mit beiden Antikörpern zeigten bei allen überprüften Melanom-Zelllinien die erwartete Bande von Mcl-1 bei 40 kDa (Abbildung 3.3.1). Zusätzlich fand sich bei dem Abcam-Antikörper Ab3184 eine weitere starke Bande bei 30 kDa, die am ehesten der Isoform Mcl-1S entspricht. Außerdem fand sich bei diesem Antikörper eine weitere Bande etwas unterhalb 40 kDa, die eine sichere Identifikation von Mcl-1 erschwerte. Daher wurde für die immunhistologischen Versuche der Antikörper AHP472 gewählt.

Da die Größe von β -Aktin (42 kDa) in etwa der des Mcl-1 Proteins (40 kDa) entspricht, erfolgte die Ladekontrolle abweichend vom Standard mit Alpha-Tubulin (52 kDa). Zusätzlich erfolgte eine Ponceau-Färbung. Die Kontrollen zeigten eine Proteinbeladung aller Spuren und einen gleichmäßigen Protein-Transfer.

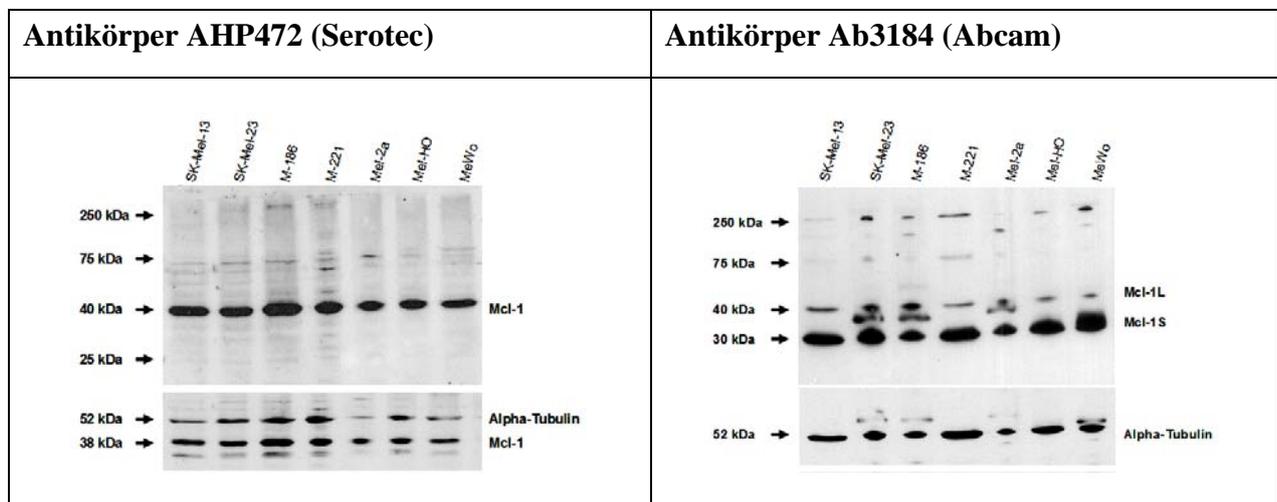


Abbildung 3.3.1 *Unterschiedliche Spezifität von zwei Antikörpern gegen Mcl-1 in der Western-Blot-Analyse*

Die Western-Blot-Analyse zeigte bei beiden Antikörpern (AHP472; Ab3184) eine Expression von Mcl-1 in allen Melanom-Zelllinien. Der Antikörper Ab3184 wies jedoch im Bereich von 40 kDa eine Doppelbande auf. Die Expositionsdauer betrug bei AHP472 zwei, bei Ab3184 sieben Minuten. Die Beladung erfolgte jeweils mit der gleichen Proteinmenge (30 μ g pro Spur) und ist mittels Alpha-Tubulin dargestellt. Hier betrug die Expositionszeit drei Minuten.

3.3.2 Beste Auswertbarkeit der immunhistologischen Färbung bei einer Verdünnung des Primärantikörpers von 1:800

Es wurde für die folgenden immunhistologischen Versuche mit einer Verdünnungsreihe die geeignete Verdünnung für den Antikörper AHP472 ermittelt. Hierzu wurden Schnitte von jeweils vier Tumoren mit den Verdünnungen 1:200, 1:400, 1:800 und 1:1600 immunhistologisch gefärbt. Parallel lief eine Negativkontrolle, bei der kein Primärantikörper eingesetzt wurde.

Um die Ergebnisse der unterschiedlichen Verdünnungen vergleichen zu können, wurde für jeden Tumor der Mittelwert gesamt-positiver Zellen aller Verdünnungen ermittelt. Anhand des Mittelwerts erfolgte die Definition des Tumors als Mcl-1-positiv oder –negativ. Nach Einordnung wurden dann Tumore derselben Antikörperverdünnung auf Übereinstimmung mit der ihnen zuvor zugeordneten Kategorie hin überprüft.

Am häufigsten waren Differenzen bezüglich der zugeordneten Kategorie bei einer Verdünnung von 1:400 (3 Abweichungen), bei sehr hoher Verdünnung von 1:1600 (2 Abweichungen) waren Differenzen ebenfalls häufig (Tabelle 3.3.1). Selten traten Unterschiede bei 1:200 (keine Abweichung) und 1:800 (eine Abweichung) auf.

Tabelle 3.3.1 *Expression von Mcl-1 bei vier Melanomen und unterschiedlichen Antikörper-Verdünnungen*

Es wurden vier Melanome anhand der mittleren Mcl-1-Expression bei verschiedenen Verdünnungen des Primärantikörpers (1:200, 1:400, 1:800, 1:1600) als Mcl-1-positiv (+) oder –negativ (-) definiert. Abweichungen der Mcl-1-Expression innerhalb einzelner Verdünnungen von der definierten Kategorie sind grau unterlegt.

Melanom	Mcl-1-positive Tumorzellen [%]				
	1:200	1:400	1:800	1:1600	Mittelwert
1	85 (+)	20 (-)	25 (-)	10 (-)	35 (+)
2	10 (-)	45 (+)	25 (-)	15 (-)	23,8 (-)
3	25 (-)	30 (+)	25 (-)	30 (+)	27,5 (-)
4	60 (+)	75 (+)	60 (+)	75 (+)	67,5 (+)

Bei der mikroskopischen Begutachtung fiel eine mit höherer Antikörper-Verdünnung einhergehende Verringerung der Farbintensität auf (Abbildung 3.3.2). Während die geringste Verdünnung (1:200) eine sehr starke Färbung aller Tumorzellen aufwies, fand sich bei der höchsten Verdünnung (1:1600) nur noch ein sehr geringer Unterschied zwischen Mcl-1-positiven und –negativen Zellen, sodass hier eine eindeutige Einschätzung der Mcl-1-Expression erschwert wurde. Mittelgradige Verdünnungen (1:400, 1:800) waren dagegen mikroskopisch gut auswertbar und zeigten vergleichbare Farbintensitäten. Aufgrund zuverlässiger und guter

Auswertbarkeit wurde für die weiteren immunhistologischen Versuche für den Antikörper AHP472 eine Verdünnung von 1:800 gewählt.

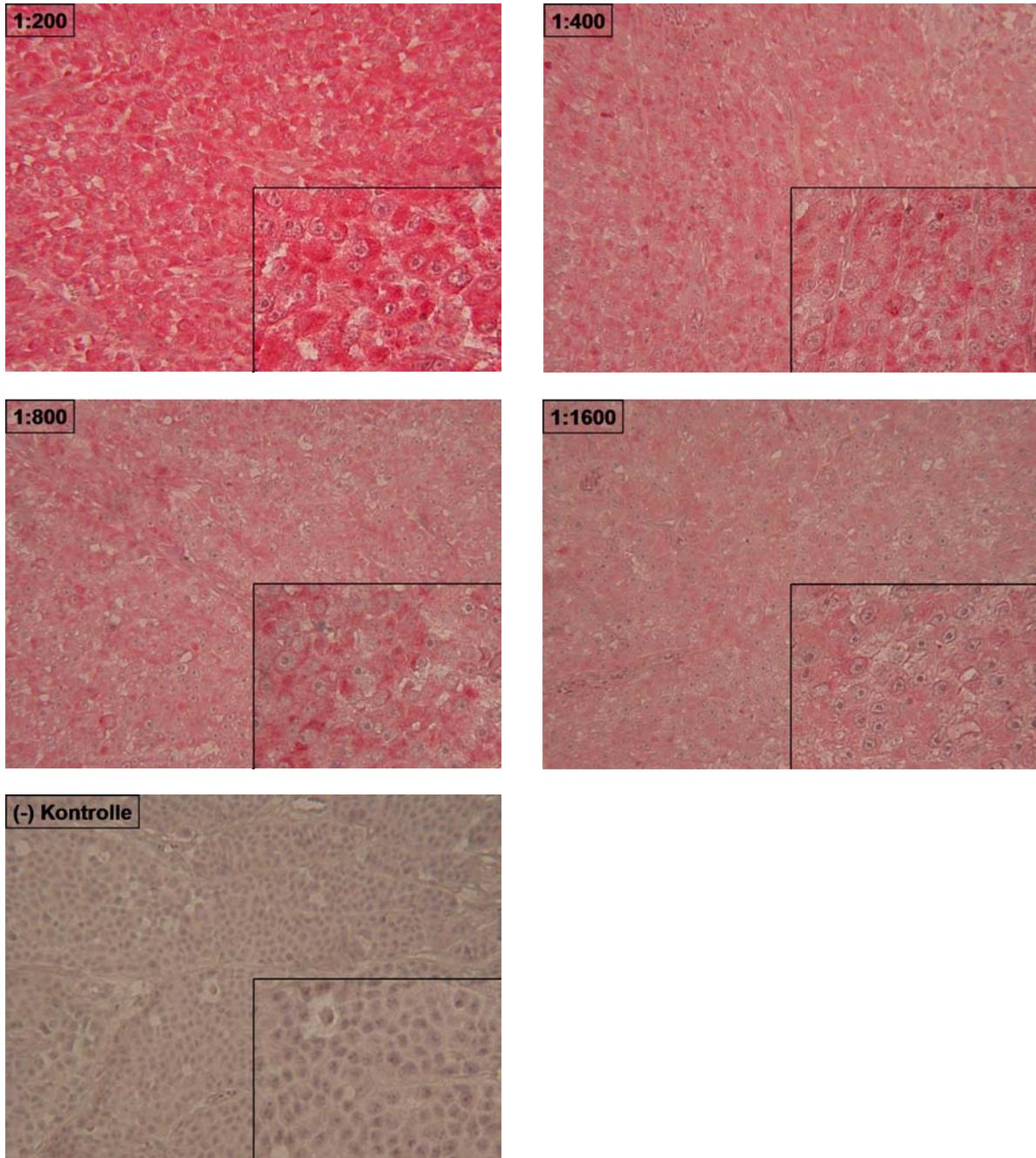


Abbildung 3.3.2 *Verdünnungsreihe mit Anti-Mcl-1-Antikörper AHP472 in der Immunhistologie*

Es wurden in der Verdünnungsreihe die Verdünnungen des primären Antikörpers 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600 an vier Melanomen getestet, von denen hier exemplarisch ein Tumor dargestellt ist. Die Farbintensität nahm mit zunehmender Verdünnung ab. Die Negativkontrolle erfolgte ohne Primärantikörper und wies keine Färbung auf.

3.4 Mcl-1-Expression in Primärtumoren und Metastasen

3.4.1 Häufiger Verlust von Mcl-1 in korrespondierenden Metastasen

Es wurde die Expression von Mcl-1 bei jeweils 20 Schnitten von primären Melanomen und Metastasen immunhistologisch untersucht. Zwei Metastasen waren nicht auswertbar. In 9 von 20 Primärtumoren (45%) und 7 von 18 Metastasen (39%) fand sich eine deutliche Mcl-1-Expression (Tabelle 3.4.1). Der Median positiver Tumorzellen wies zwischen Primärtumoren (26%) und Metastasen (15%) jedoch keinen signifikanten Unterschied auf ($p = 0,22$).

Beim Vergleich der Mcl-1-Expression in sechzehn Pärchen von Primärtumor und korrespondierender Metastase fand sich mit 9 von 16 Fällen (56%) ein häufiger Verlust des Antigens (Abbildungen 3.4.1, 3.4.2). Es wiesen 5 von 16 Fälle (31%) eine Heraufregulation von Mcl-1 in Metastasen auf, zwei Pärchen zeigten eine gleichbleibende Expression. Die unterschiedliche Mcl-1-Expression in Primärtumoren und korrespondierenden Metastasen war nicht signifikant ($p = 0,69$).

Tabelle 3.4.1 Expression von Mcl-1 in Primärtumoren und Metastasen

Es sind die Auswertungsergebnisse der immunhistologischen Überprüfung der Mcl-1-Expression in 20 Primärtumoren (Pt) und Metastasen (Met) dargestellt. Zwei Metastasen (P, T) waren nicht auswertbar.

* schwach wurde als negativ gewertet

Patient (Pt)	Tumorzellen mit Farbintensität [%]		
	stark	mittel	schwach*
A	5	22,5	72,5
B	15	33,5	51,5
C	2,5	10	87,5
D	10	32,5	57,5
E	0	5	95
F	13,5	28	58,5
G	2,5	37,5	60
H	7,5	15	77,5
I	0	7,5	92,5
J	0	0	100
K	0	30	70
L	5	35	60
M	0	7,5	92,5
N	0	15	85
O	5	15	80
P	0	7,5	92,5
Q	5	20	75

Patient (Met)	Tumorzellen mit Farbintensität [%]		
	stark	mittel	schwach*
A	0	5	95
B	0,5	27	72,5
C	0,5	0,5	99
D	0	17,5	82,5
E	5	27,5	67,5
F	0	7,5	92,5
G	5	55	40
H	30	60	10
I	0	7,5	92,5
J	0	30	70
K	0	7,5	92,5
L	5	30	65
M	0	40	60
N	0	2,5	97,5
O	0	5	95
P	---	---	---
Q	0	5	95

R1	35	37,5	27,5
S1	7,5	67,5	25
T	18,5	33,5	48
Median positiver Tumorzellen: 26%			

R2	7,5	30	62,5
S2	0	12,5	87,5
T	---	---	---
Median positiver Tumorzellen: 15%			

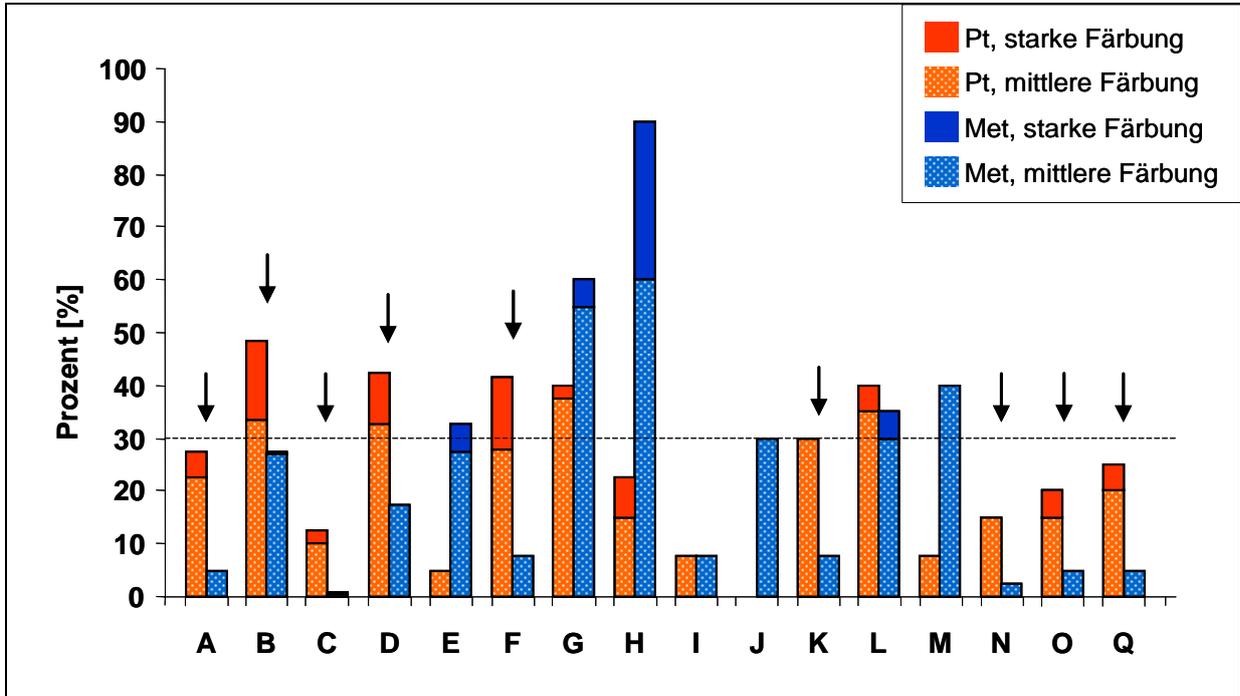
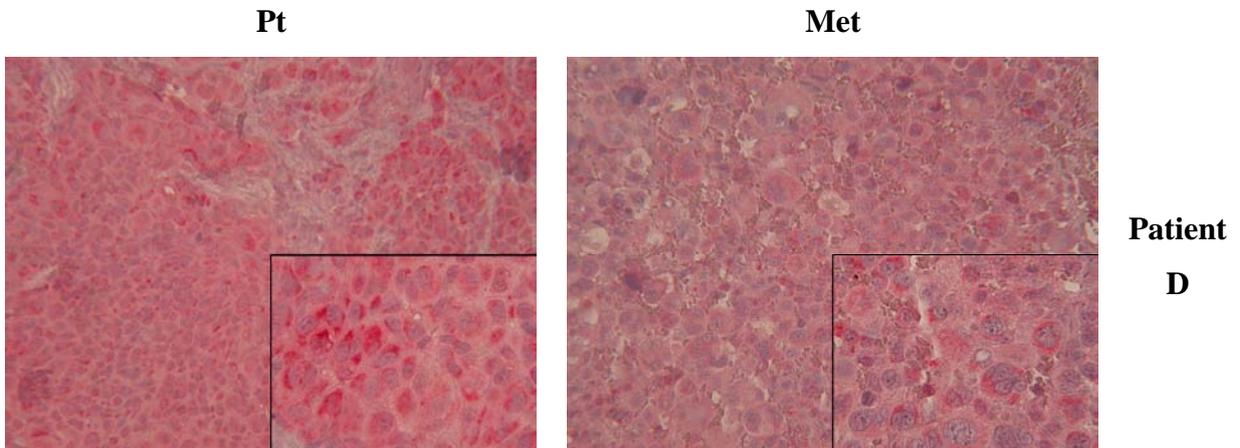


Abbildung 3.4.1 Verlust von Mcl-1 in korrespondierenden Metastasen verglichen zum Primärtumor

Es ist Expression von Mcl-1 in sechzehn Tumorpärchen dargestellt (Patienten: A-O, Q). Es fand sich verglichen mit Primärtumoren (Pt) in 9 von 16 Metastasen (Met) eine Herabregulierung der Mcl-1-Expression (Pfeile). In fünf Tumoren (E, G, H, J, M) fand sich eine Heraufregulation, während die übrigen keine Veränderung aufwiesen.



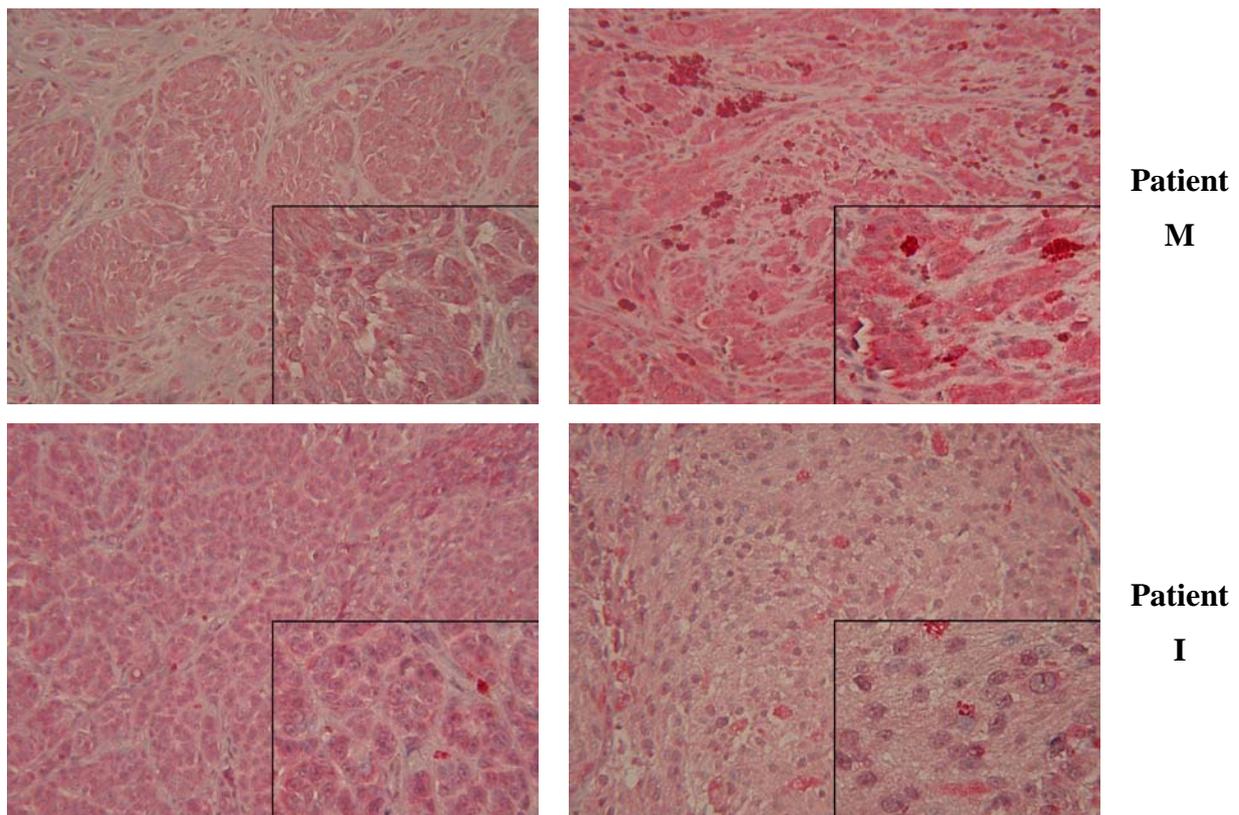


Abbildung 3.4.2 *Mcl-1-Expression in der immunhistologischen Färbung*

Es ist jeweils ein Beispiel für die Herabregulation (Patient D), die Heraufregulation (Patient M) und die unveränderte Expression von Mcl-1 (Patient I) in korrespondierenden Metastasen verglichen zum Primärtumor dargestellt.

3.4.2 Verlust von Mcl-1 in korrespondierenden Metastasen von Männern

Es wurde die Mcl-1-Expression in jeweils 10 Primärtumoren und Metastasen von Männern und Frauen verglichen. Zwei Metastasen von Frauen waren nicht auswertbar. Es wiesen 6 von 10 Primärtumoren von Männern (60%) und nur 3 von 10 von Frauen (30%) eine deutliche Mcl-1-Expression auf. Die Metastasen waren in nur 3 von 10 Fällen von Männern (30%) aber in der Hälfte der Fälle von Frauen Mcl-1-positiv.

Der Median positiver Tumorzellen lag bei den Primärtumoren der Männer höher (35%) als bei Frauen (19%). Bei den Metastasen von Männern war er mit 10% verglichen zu Frauen mit 29% erniedrigt. Diese Unterschiede waren nicht signifikant (Primärtumore: $p = 0,19$; Metastasen: $p = 0,36$).

Der Vergleich der Mcl-1-Expression in sechzehn Pärchen von Primärtumor und korrespondierender Metastase zeigte einen deutlichen Verlust von Mcl-1 in den Metastasen von Männern. Es wiesen 5 von 8 korrespondierende Metastasen von Männern (63%) einen insgesamt

signifikanten Verlust von Mcl-1 auf ($p = 0,04$; Abbildung 3.4.3). Bei Frauen zeigte sich zwar in 4 von 8 Fällen (50%) ein Verlust von Mcl-1, dieser erwies sich jedoch nicht als signifikant ($p = 0,44$). Eine Heraufregulation von Mcl-1 in Metastasen von Männern fand sich in nur einem Fall, von Frauen dagegen in der Hälfte der Fälle. Die übrigen Pärchen zeigten eine gleichbleibende Expression.

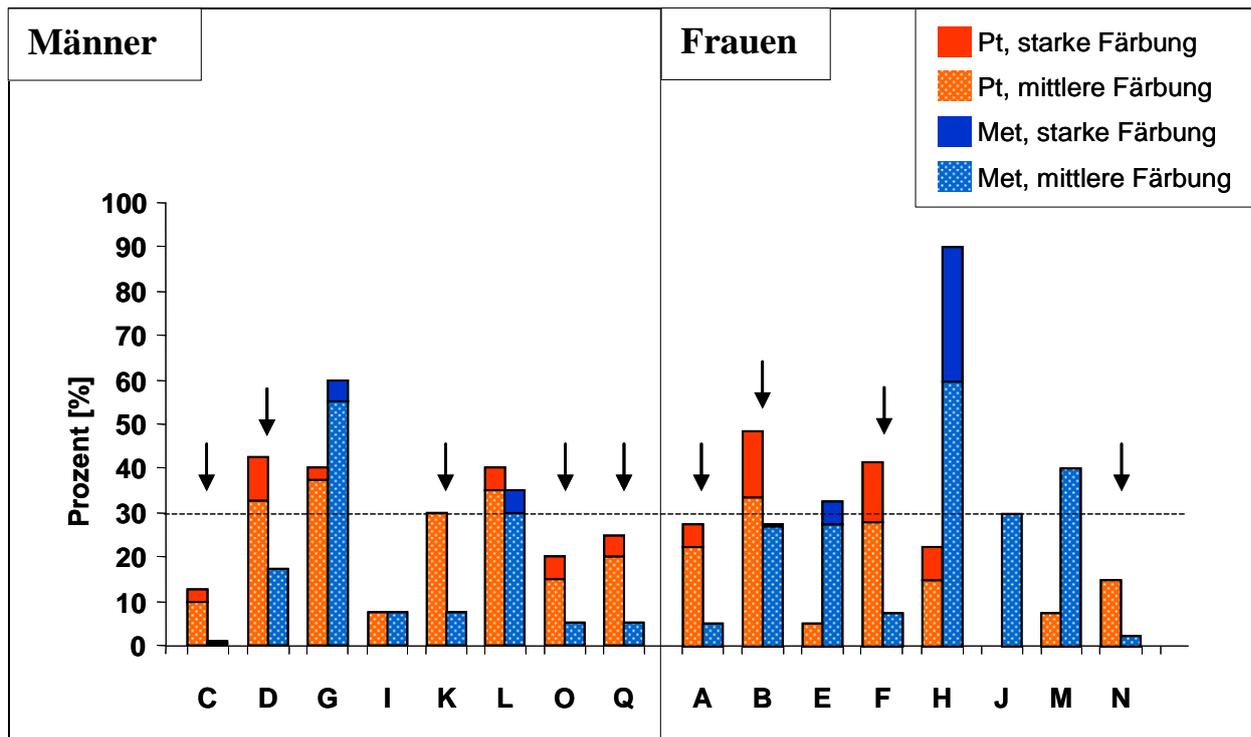


Abbildung 3.4.3 *Verlust von Mcl-1 in korrespondierenden Metastasen von Männern*
 Es ist die Expression von Mcl-1 bei 16 korrespondierenden Tumorpärchen (Patienten: A-O, Q) sortiert nach Geschlecht dargestellt. Bei Männern fand sich ein häufiger Verlust von Mcl-1 in Metastasen (Pfeile), während sich bei Frauen geringere Unterschiede zeigten.

3.4.3 Verlust von Mcl-1 in korrespondierenden Metastasen dickerer Primärtumore (T3/T4)

Es wurde im Folgenden die Mcl-1-Expression in den 20 Primärtumoren und 18 Metastasen in Verbindung mit der Tumordicke untersucht. Hierzu wurden die Schnitte entsprechend der Tumordicke des primären Melanoms in die Gruppen T1-T4 eingeteilt. Bei dünnen Primärtumoren (T1) fand sich kein Mcl-1-positiver Tumor. Dagegen wiesen dickere Tumore (T2, T3) in der Hälfte der Fälle, dicke Tumore (T4) sogar in 3 von 5 Fällen (60%) eine deutliche Mcl-1-Expression auf.

Der Median positiver Tumorzellen lag in T1 bei 12,5%, in T2 bei 40%, in T3 bei 27,5% und in T4 bei 40%. Die verminderte Mcl-1-Expression in dünnen Primärtumoren war aufgrund eines geringen Stichprobenumfangs nicht signifikant ($p = 0,12$). Bei den Metastasen zeigten 2 von 3 dünne Tumore (T1, 67%), 3 von 4 Tumore in T2 (75%) und nur 2 von 5 Tumore (40%) in T4 eine deutliche Mcl-1-Expression. In Gruppe T3 war keine Metastase Mcl-1-positiv. Der Median positiver Tumorzellen lag in den Metastasen in T1 bei 33%, in T2 bei 34%, in T3 bei 6% und in T4 bei 7%. Diese Unterschiede waren nicht signifikant ($p = 0,2$).

Der direkte Vergleich der sechzehn Pärchen zeigte bei dünneren Tumoren (T1, T2) in nur einem von fünf Fällen (20%) einen Verlust von Mcl-1 in den Metastasen, in dickeren Tumoren (T3/T4) dagegen in 8 von 11 Fällen (73%; Abbildung 3.4.4). Der Verlust bei dickeren Tumoren war signifikant ($p = 0,01$). Zusätzlich wiesen dünnere Tumore in 4 von 5 Fällen (80%), die dickeren Tumore dagegen nur in einem von elf Fällen (9%) eine Heraufregulation von Mcl-1 in den Metastasen auf. Die Zunahme der Mcl-1-Expression bei dünneren Tumoren erwies sich als Tendenz ($p = 0,08$). Bei den übrigen Pärchen fand sich keine Änderung.

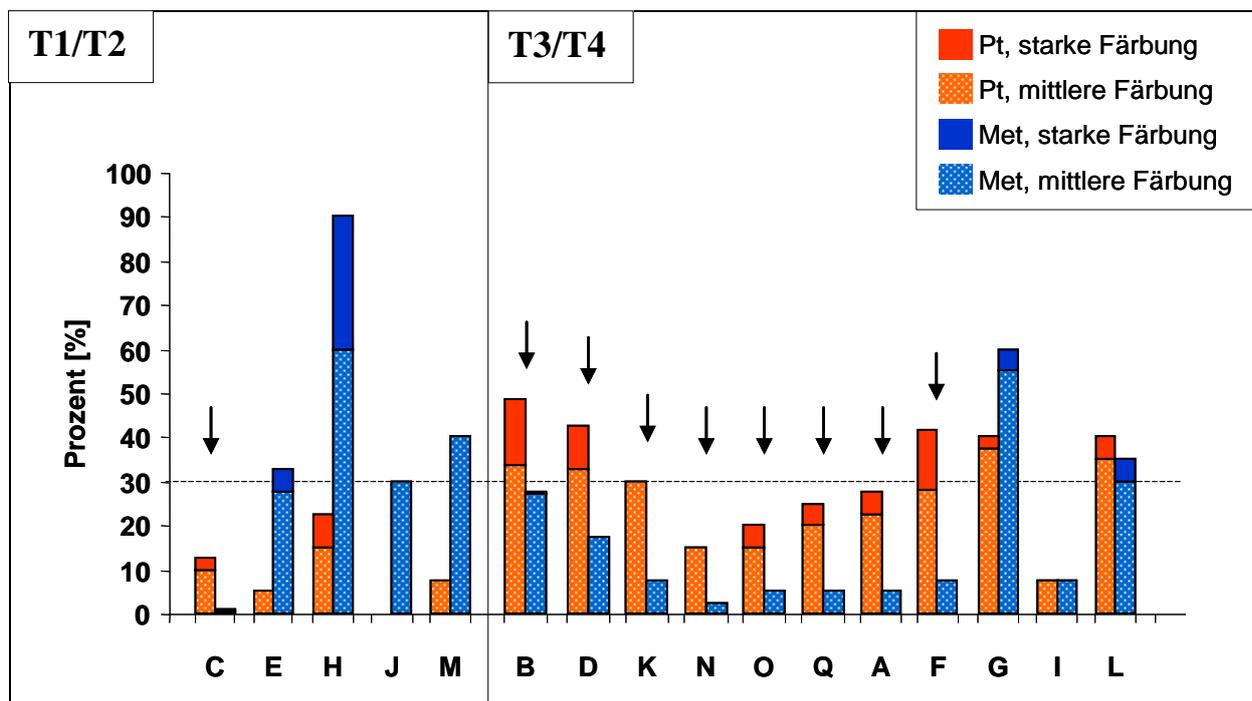


Abbildung 3.4.4 Mcl-1-Verlust in Metastasen dickerer Primärtumore (T3/T4)

Es ist die Expression von Mcl-1 in 16 korrespondierenden Tumorpärchen (Patienten: A-O, Q) sortiert entsprechend der Tumordicke des Primärtumors (T1-T4) dargestellt. Es zeigte sich bei dickeren Tumoren (T3/T4) ein Mcl-1-Verlust in den Metastasen (Pfeile). Außerdem zeigte sich eine häufige Heraufregulation in dünneren Tumoren (T1/T2; E, H, J, M).

3.4.4 Mcl-1-Expression unabhängig vom Clark-Level

Es wurde im Folgenden die Mcl-1-Expression in den 20 Primärtumoren und 18 Metastasen in Verbindung mit dem Clark-Level untersucht. Es zeigte sich bei Primärtumoren der Gruppe III in 3 von 5 Fällen (60%) und der Gruppe IV in 6 von 14 Fällen (43%) eine deutliche Expression von Mcl-1. Der Tumor in Gruppe V war ebenfalls Mcl-1-positiv. Auch der Median positiver Tumorzellen zeigte bei Primärtumoren unabhängig vom Clark-Level starke Schwankungen. Er lag in Gruppe III bei 30%, in Gruppe IV bei 23% und in Gruppe V bei 28%.

Bei den Metastasen fand sich bei Gruppe III in 2 von 5 Fällen (40%) und bei Gruppe IV in 5 von 12 Fällen (42%) eine Mcl-1-Expression. Der Median positiver Tumorzellen lag in Gruppe III bei 18%, in Gruppe IV bei 20% und in Gruppe V bei 5%. Weder bei Primärtumoren noch Metastasen wurde ein signifikanter Zusammenhang zwischen Mcl-1-Expression und Clark-Level gefunden (Primärtumore: $p = 0,51$; Metastasen: $p = 0,32$).

Der direkte Vergleich der sechzehn Pärchen zeigte einen Verlust von Mcl-1 in 3 von 4 Metastasen (75%) in Gruppe III und 5 von 11 Metastasen (45%) in Gruppe IV. Auch die Metastase der Gruppe V zeigte eine Herabregulation von Mcl-1. Eine Heraufregulation fand sich in einer von vier Metastasen (25%) der Gruppe III und bei 4 von 11 Metastasen (36%) der Gruppe IV. Die übrigen Tumore zeigten keine Veränderung.

3.4.5 Mcl-1-Expression unabhängig vom Ulzerationsgrad des Primärtumors

Es wurde die Mcl-1-Expression in 16 Primärtumoren und Metastasen in Verbindung mit dem Ulzerationsgrad untersucht. Zwei Metastasen waren nicht auswertbar. Die Schnitte wurden zunächst in geeignete Gruppen (nicht-ulzeriert/ulzeriert) eingeteilt. Bei Primärtumoren ohne Ulzeration fand sich in 6 von 11 Fällen (55%), bei ulzerierten Tumoren in 2 von 5 Fällen (40%) eine deutliche Mcl-1-Expression. Der Median positiver Tumorzellen lag bei nicht-ulzerierten Primärtumoren bei 30%, bei ulzerierten Primärtumoren betrug er 28%. Diese Unterschiede waren nicht signifikant ($p = 0,53$). Bei Metastasen nicht-ulzerierter Tumore zeigte sich in 4 von 10 Fällen (40%), bei Metastasen ulzerierter Tumore in 2 von 4 Fällen (50%) eine deutliche Mcl-1-Expression. Der Median positiver Tumorzellen lag bei Metastasen nicht-ulzerierter Primärtumore bei 15%, bei Metastasen ulzerierter Primärtumore betrug er 20%. Diese Unterschiede waren nicht signifikant ($p = 0,62$).

Der direkte Vergleich von zwölf Pärchen zeigte keine vom Ulzerationsgrad abhängigen Änderungen der Mcl-1-Expression. In beiden Gruppen fand sich bei jeweils der Hälfte der

untersuchten Pärchen eine Herabregulation von Mcl-1 in Metastasen. Eine Heraufregulation fand sich in 3 von 8 Metastasen (38%) nicht-ulzerierter Tumore und in einer Metastase (25%) von ulzerierten Tumoren. Die übrigen Pärchen wiesen keine Veränderung auf. Die Unterschiede der Mcl-1-Expression zwischen Primärtumoren und korrespondierenden Metastasen waren weder bei nicht-ulzerierten ($p = 0,87$) noch bei ulzerierten Tumoren ($p = 0,19$) signifikant.

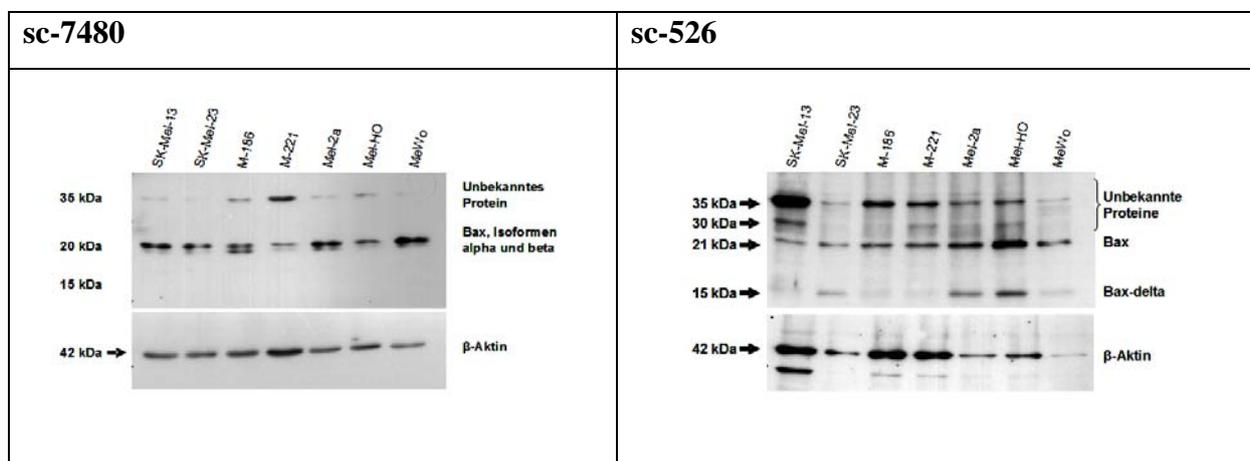
3.5 Vorversuche Bax

3.5.1 Unterschiedliche Spezifität getesteter Antikörper gegen Bax in der Western-Blot-Analyse

Zur Auswahl eines geeigneten Antikörpers gegen Bax wurde zunächst die Spezifität von vier unterschiedlichen Antikörpern durch Western-Blot-Analysen von sieben Melanom-Zelllinien überprüft. Es wurden die Antikörper sc-7480, sc-493, sc-526 (Firma Santa Cruz) und YTH-2D2 (Firma Trevigen) getestet. Letzterer diente als bereits etablierter Antikörper lediglich als Vergleichskontrolle, da er im Handel nicht mehr verfügbar war.

Die Western-Blot-Analyse zeigte bei allen Antikörpern in den überprüften Melanom-Zelllinien die erwartete Bax-Bande im Bereich von 20 kDa (Abbildung 3.5.1). Der Antikörper sc-7480 wies jedoch an dieser Stelle eine Doppelbande auf, die am ehesten durch die beiden Isoformen Bax-alpha (21 kDa) und -beta (24 kDa) erklärbar ist. Außerdem fand sich bei dem Antikörper sc-526 eine Bande bei 15 kDa, die am ehesten der Isoform Bax-delta (15 kDa) entspricht. Banden eines unbekanntes Proteins zeigten zwei der Antikörper bei 35 kDa (sc-7480, sc-526) und ein Antikörper bei 30 kDa (sc-526). Die übrigen Antikörper (sc-493, YTH-2D2) zeigten neben der Bax-Bande (20 kDa) keine weiteren Banden. Die Ladekontrolle erfolgte mit β -Aktin (42 kDa). Zusätzlich erfolgte eine Ponceau-Färbung. Die Kontrollen zeigten eine Proteinbeladung aller Spuren und einen gleichmäßigen Protein-Transfer.

Obwohl von Santa Cruz für die Immunhistologie nicht getestet, wurde für die folgenden immunhistologischen Färbungen der Antikörper sc-493 verwendet, da er in der Western-Blot-Analyse die höchste Spezifität aufwies und deutliche Ähnlichkeit mit dem bereits etablierten Trevigen-Antikörper zeigte.



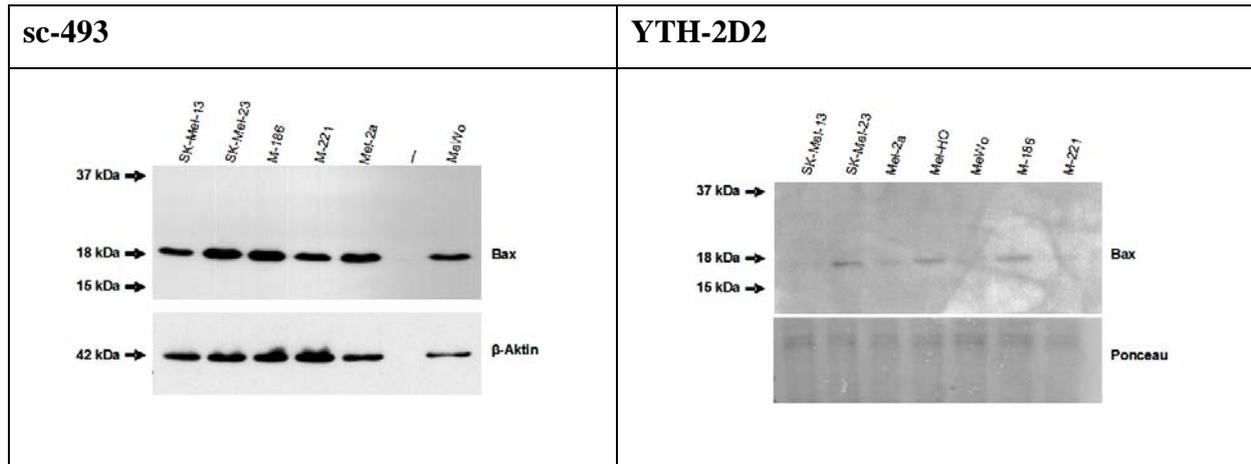


Abbildung 3.5.1 *Unterschiedliche Spezifität von vier Antikörpern gegen Bax in der Western-Blot-Analyse*

Die Western-Blot-Analyse zeigte bei allen Antikörpern (sc-7480, sc-526, sc-493, YTH-2D2) eine Expression von Bax in sieben untersuchten Melanom-Zelllinien. Banden eines unbekanntem Proteins zeigten zwei der Antikörper bei 35 kDa (sc-7480, sc-526) und ein Antikörper bei 30 kDa (sc-526). Die Beladung erfolgte jeweils mit der gleichen Proteinmenge (30 µg pro Spur) und ist mittels β -Aktin dargestellt. Die Expositionsdauer betrug bei YTH-2D2 fünf Sekunden, bei sc-7480 und sc-493 jeweils sechs Minuten und bei sc-526 45 Minuten. Die Expositionszeit für β -Aktin betrug jeweils drei Sekunden mit Ausnahme des Antikörpers sc-526, bei dem β -Aktin 10 Minuten exponiert wurde.

3.5.2 Geringe Unterschiede in der immunhistologischen Färbung bei unterschiedlichen Antikörpern gegen Bax

Da der gewählte Antikörper sc-493 vom Hersteller Santa Cruz nicht für die Immunhistologie getestet war, wurde im Folgenden sein Verhalten in der immunhistologischen Färbung mit dem anderer Antikörper verglichen. Es wurden die Antikörper sc-7480, sc-526 und sc-493 und eine Verdünnung von 1:200 gewählt. Die Untersuchung erfolgte an Schnitten von vier unterschiedlichen Melanomen (1-4). Parallel dazu lief eine Negativkontrolle, bei der kein Primärantikörper eingesetzt wurde.

In der Auswertung zeigten sich nur geringe Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Antikörpern. Die Melanome 1, 2 und 4 wurden unabhängig vom Antikörper immer als Bax-positiv gewertet, das Melanom 3 erwies sich stets als Bax-negativ (Tabelle 3.5.1). Zusätzlich wiesen die getesteten Antikörper bei den jeweiligen Melanomen vergleichbare Farbintensitäten auf und zeigten alle eine der Bax-Lokalisation entsprechende zytosolische Färbung (Abbildung 3.5.2). Bei der Negativkontrolle fand sich keinerlei Färbung. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde von einer Eignung des Antikörpers sc-493 für die immunhistologische Färbung ausgegangen.

Tabelle 3.5.1 Expression von Bax bei Verwendung verschiedener Antikörper

Es wurden an vier verschiedenen Melanomen (1-4) bei einer Verdünnung von 1:200 drei Antikörper (sc-7480, sc-526, sc-493) in der immunhistologischen Färbung getestet. Tumore, die bei $\geq 30\%$ der Zellen eine starke bis mittelgradige Färbung aufwiesen, wurden als positiv (+) gewertet, die übrigen galten als negativ (-). Ein Schnitt war nicht auswertbar. Es zeigte sich in der Auswertung der vier Melanome eine weitgehende Übereinstimmung bei den drei Antikörpern.

Melanom	Bax-positive Tumorzellen [%]		
	sc-7480	sc-526	sc-493
1	70,00 (+)	80,00 (+)	80,00 (+)
2	90,00 (+)	30,00 (+)	40,00 (+)
3	15,00 (-)	15,00 (-)	5,00 (-)
4	---	65,00 (+)	55,00 (+)

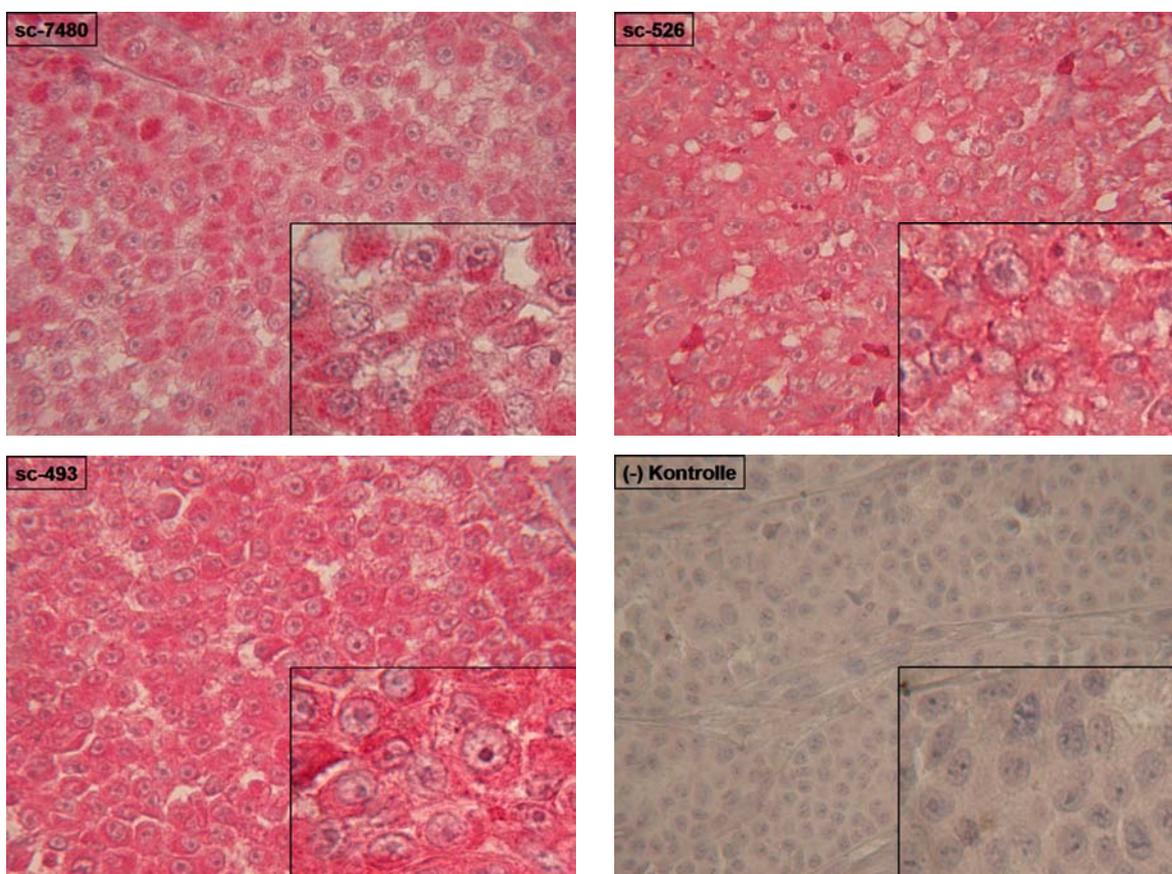


Abbildung 3.5.2 Vergleich verschiedener Antikörper gegen Bax in der immunhistologischen Färbung

Es wurden bei vier Melanomen drei Antikörper (sc-7480, sc-526, sc-49) in der immunhistologischen Färbung getestet. Die Verdünnung betrug 1:200. Hier ist exemplarisch ein Melanom sowie die Negativkontrolle dargestellt. Bei der Kontrolle wurde kein Primärantikörper eingesetzt. Die Antikörper zeigten in Bezug auf Farbintensität und Lokalisation (Zytosol) ein vergleichbares Bild. Bei der Negativkontrolle fand sich keinerlei Färbung.

3.5.3 Vergleichbare Untersuchungsergebnisse bei unterschiedlichen Verdünnungen des Primärantikörpers

Es wurde die geeignete Verdünnung für den gewählten Antikörper gegen Bax (sc-493) mit Hilfe einer Verdünnungsreihe ermittelt. Dazu wurden Schnitte von fünf Melanomen (1-5) jeweils mit verschiedener Verdünnung des Primärantikörpers (1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:600) gefärbt. Es lief zusätzlich eine Negativkontrolle mit, bei der kein Primärantikörper eingesetzt wurde. Zur Ermöglichung einer Vergleichbarkeit verdünnungsabhängiger Ergebnisse wurde das jeweilige Melanom anhand des Mittelwerts positiver Tumorzellen der unterschiedlichen Verdünnungen als positiv oder negativ definiert und dann die Übereinstimmung mit dem Ergebnis der jeweiligen Verdünnung geprüft.

Am häufigsten waren Differenzen bezüglich der zugeordneten Kategorie bei der geringsten Verdünnung von 1:50 (3 Abweichungen, Tabelle 3.5.2). Bei allen anderen Verdünnungen fand sich jeweils nur eine Abweichung. Weiterhin fiel ein Verlust der Farbintensität mit zunehmender Verdünnung des Primärantikörpers auf (Abbildung 3.5.3). Bei der Negativkontrolle fand sich keinerlei Färbung. Da mit Ausnahme der geringsten Verdünnung alle getesteten Verdünnungen vergleichbare Ergebnisse lieferten, stellte die zunehmend geringe Farbintensität bei höheren Verdünnungen den begrenzenden Faktor dar. Es wurde 1:400 als Verdünnung für die weiteren immunhistologischen Färbungen gewählt.

Tabelle 3.5.2 Expression von Bax bei verschiedenen Antikörper- Verdünnungen

Es wurden fünf Melanome anhand der mittleren Bax-Expression bei verschiedenen Verdünnungen des Primärantikörpers (1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:600) als positiv (+) oder negativ (-) definiert. Abweichungen der Bax-Expression innerhalb einzelner Verdünnungen von der definierten Kategorie sind grau unterlegt. Ein Schnitt war nicht auswertbar.

Melanom	Bax-positive Tumorzellen [%]					Mittelwert
	1:50	1:100	1:200	1:400	1:600	
1	30 (+)	20 (-)	10 (-)	5 (-)	5 (-)	14 (-)
2	60 (+)	40 (+)	30 (+)	20 (-)	1 (-)	30,2 (+)
3	31 (+)	30 (+)	30 (+)	25 (-)	20 (-)	27,2 (-)
4	5 (-)	10 (-)	15 (-)	10 (-)	15 (-)	11 (-)
5	35 (+)	---	60 (+)	60 (+)	60 (+)	43 (+)

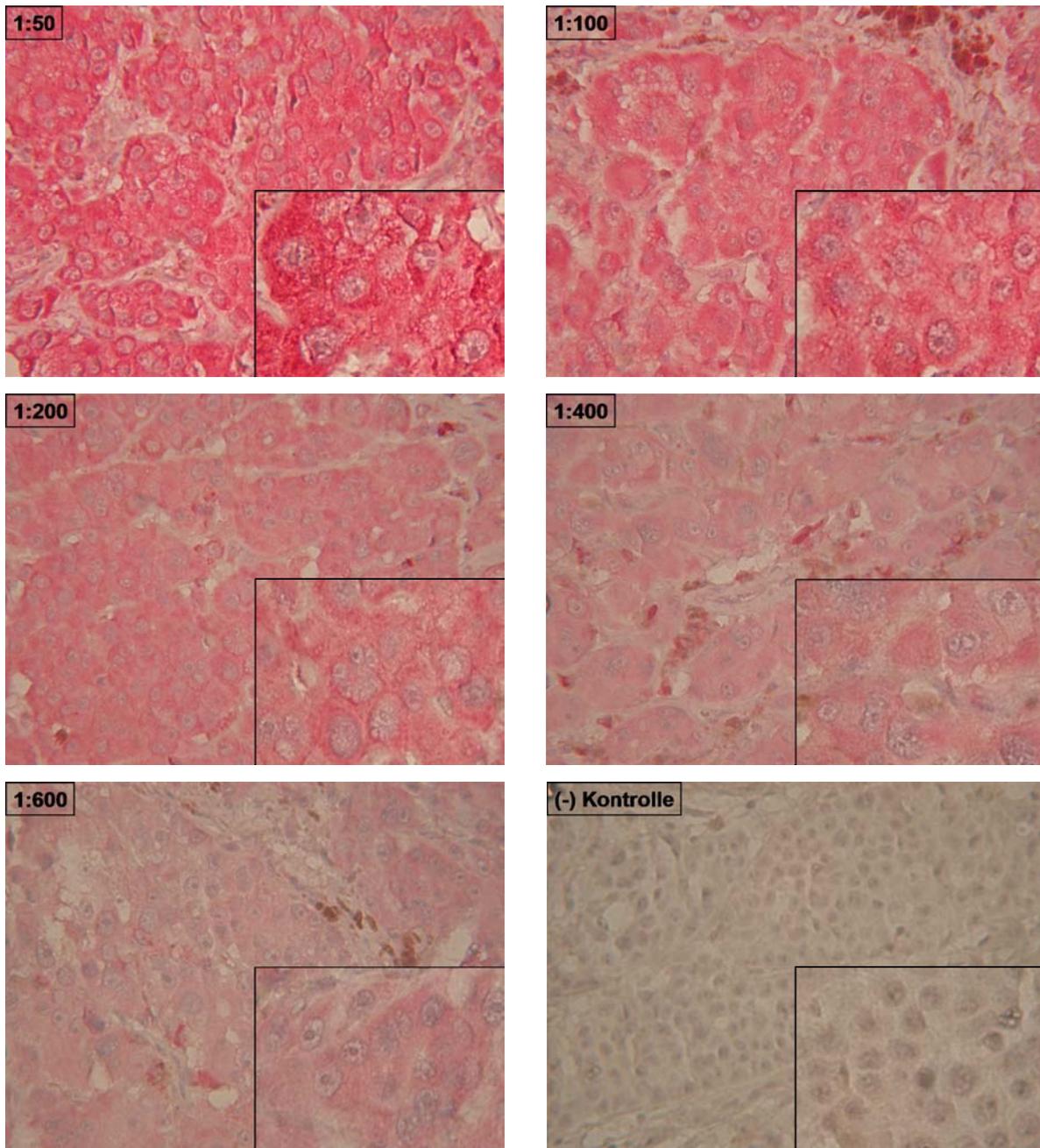


Abbildung 3.5.3 Verdünnungsreihe mit Anti-Bax-Antikörper (sc-493) in der Immunhistologie

Es wurden in der Verdünnungsreihe unterschiedliche Verdünnungen des primären Antikörpers (1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:600) an fünf unterschiedlichen Melanomen getestet, von denen hier exemplarisch ein Tumor dargestellt ist. Die Farbintensität nahm mit zunehmender Verdünnung ab. Die Negativkontrolle erfolgte ohne Primärantikörper und wies keine Färbung auf.

3.6 Bax-Expression in Primärtumoren und Metastasen

3.6.1 Mäßiger Verlust von Bax in korrespondierenden Metastasen

Es wurde die Expression von Bax bei jeweils 20 Schnitten von primären Melanomen und Metastasen immunhistologisch untersucht. Ein Primärtumor und drei Metastasen waren nicht auswertbar. Es fand sich in 16 von 19 (82%) Primärtumoren und 12 von 17 (71%) Metastasen eine deutliche Expression von Bax (Tabelle 3.6.1). Der Median positiver Tumorzellen lag bei Primärtumoren mit 62% höher als bei Metastasen mit 35%. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant ($p = 0,12$).

Beim Vergleich der Bax-Expression in fünfzehn Pärchen von Primärtumor und korrespondierender Metastase fand sich in 6 von 15 (40%) Metastasen ein Verlust von Bax, in 4 von 15 Fällen (27%) zeigte sich eine Heraufregulation (Abbildung 3.6.1). Die übrigen Pärchen wiesen eine unveränderte Expression auf. Die Unterschiede waren nicht signifikant ($p = 0,5$).

Tabelle 3.6.1 Expression von Bax in Primärtumoren und Metastasen

Es sind die Auswertungsergebnisse der immunhistologischen Überprüfung der Bax-Expression in 20 Primärtumoren (Pt) und Metastasen (Met) dargestellt. Ein Primärtumor (Q) und drei Metastasen (P, Q, T) waren nicht auswertbar.

Patient (Pt)	Tumorzellen mit Farbintensität [%]		
	stark	mittel	schwach
A	15	30	55
B	5	70	25
C	0	12,5	87,5
D	10	70	20
E	0	5	95
F	0	15	85
G	10	62,5	27,5
H	10	57,5	32,5
I	5	60	35
J	2,5	30	67,5
K	7,5	35	57,5
L	5	60	35
M	2	60	38
N	5	35	60
O	5	40	55
P	8,5	39	52,5
Q	---	---	---
R1	20	70	10
S1	17,5	72,5	10

Patient (Met)	Tumorzellen mit Farbintensität [%]		
	stark	mittel	schwach
A	0	10	90
B	0	60	40
C	42,5	42,5	15
D	0,5	10	89,5
E	2,5	57,5	40
F	0	20	80
G	21,5	42,5	36
H	30	55	15
I	5	30	65
J	2,5	35	62,5
K	5	30	65
L	0	32,5	67,5
M	5	30	65
N	2,5	35	62,5
O	52,5	42,5	5
P	---	---	---
Q	---	---	---
R2	0	12,5	87,5
S2	0,5	5	94,5

T	22,5	45	32,5
Median der positiven Tumorzellen: 62%			

T	---	---	---
Median der positiven Tumorzellen: 35%			

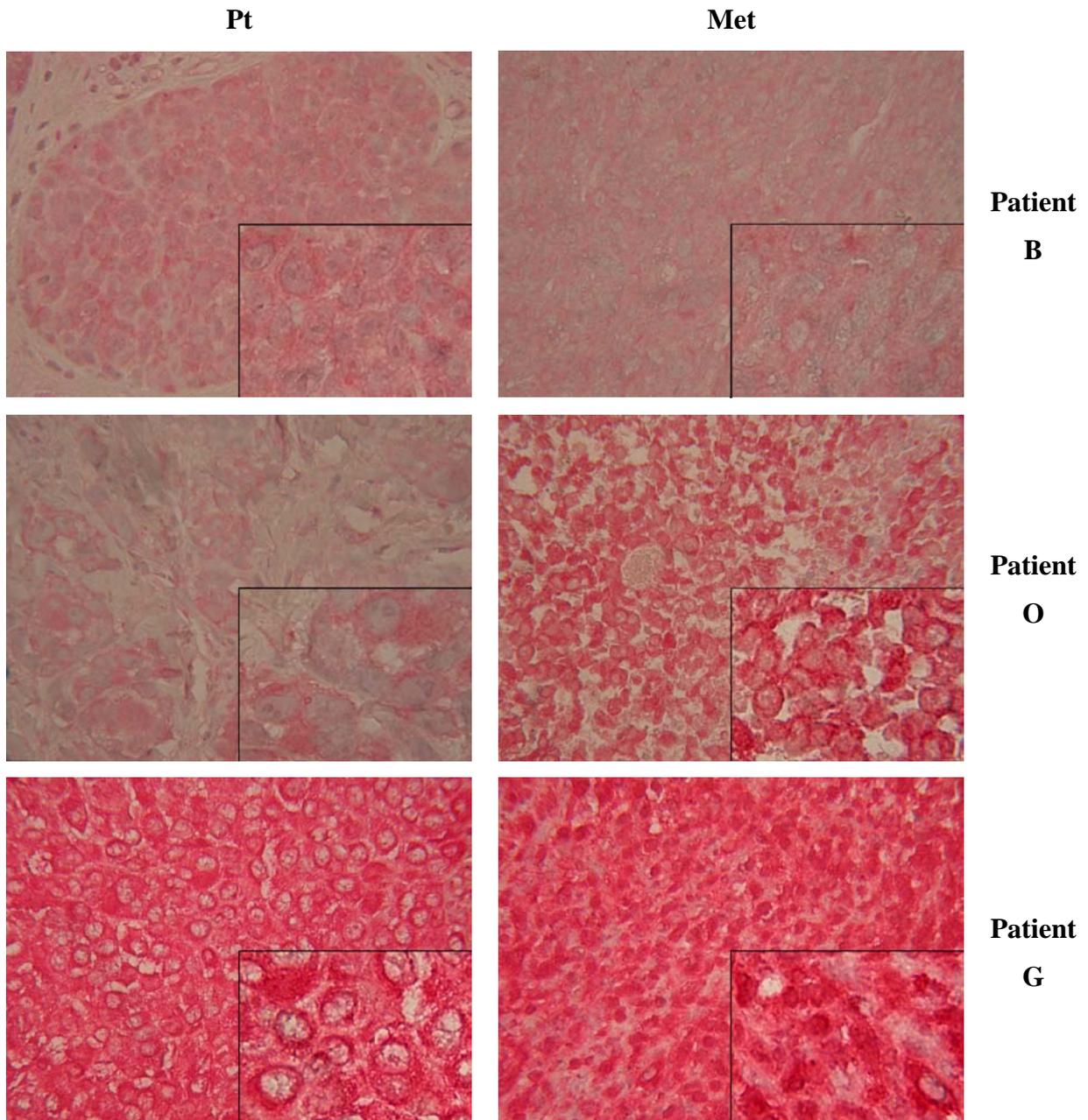


Abbildung 3.6.1 *Bax-Expression in der immunhistologischen Färbung*

Es ist jeweils ein Beispiel für die Herabregulation (Patient B), die Heraufregulation (Patient O) und die unveränderte Expression von Bax (Patient G) in korrespondierenden Metastasen verglichen zum Primärtumor dargestellt.

3.6.2 Bax-Expression in primären Melanomen und Metastasen unabhängig vom Geschlecht

Es wurde die Bax-Expression in jeweils 10 Primärtumoren und Metastasen von Männern und Frauen verglichen. Von Männern waren ein Primärtumor und eine Metastase, von Frauen zwei Metastasen nicht auswertbar. Es exprimierten von Männern 8 von 9 (89%), von Frauen 8 von 10 Primärtumoren (80%) Bax. Bei Metastasen von Männern fand sich in 6 von 10 Fällen (60%), von Frauen in 6 von 8 Fällen (75%) eine deutliche Bax-Expression.

Der Median positiver Tumorzellen lag bei Primärtumoren von Männern etwas höher (65%) als von Frauen (46%). Bei den Metastasen von Männern betrug er 35%, von Frauen 38%. Weder bei Primärtumoren noch Metastasen traten signifikante Unterschiede zwischen Männern und Frauen auf (Primärtumore: $p = 0,15$; Metastasen: $p = 0,66$).

Der Vergleich der Bax-Expression in fünfzehn Pärchen von Primärtumor und korrespondierender Metastase zeigte bei Männern in 3 von 7 Fällen (43%), bei Frauen in 3 von 8 Fällen (38%) einen Verlust von Bax bei korrespondierenden Metastasen. Bei zwei Pärchen jeder Gruppe fand sich eine Heraufregulation, während sich bei den übrigen Pärchen keine Änderung der Bax-Expression fand.

3.6.3 Verlust von Bax in korrespondierenden Metastasen dickerer Primärtumore (T3/T4)

Es wurde die Bax-Expression in 19 Primärtumoren und 17 Metastasen in Verbindung mit der Tumordicke untersucht. Hierzu wurden die Schnitte entsprechend der Tumordicke des primären Melanoms in die Gruppen T1-T4 eingeteilt. Lediglich einer von drei dünnen Primärtumoren (T1) erwies sich als Bax-positiv (33%, Abbildung 3.6.3). Dagegen wiesen alle Tumore der Gruppen T2 und T3 sowie 4 von 5 Primärtumore der Gruppe T4 eine deutliche Bax-Expression auf.

Der Median positiver Tumorzellen lag in T1 bei 12,5%, in T2 bei 76%, in T3 bei 47,5% und in T4 bei 65%. Die deutlich geringere Bax-Expression in dünnen Primärtumoren erwies sich als Tendenz ($p = 0,05$). Außerdem zeigte sich in allen Metastasen der Gruppe T1 und der Hälfte der Metastasen in Gruppe T2 eine deutliche Bax-Expression. In Gruppe T3 waren 4 von 5 Metastasen, bei dicken Tumoren (T4) drei von fünf Metastasen (60%) Bax-positiv.

Der Median positiver Tumorzellen lag bei Metastasen in T1 mit 85% deutlich höher als in den Gruppen T2 mit 24%, T3 mit 38% und T4 mit 33%. Die höhere Bax-Expression in T1 verglichen mit den übrigen Gruppen erwies sich als signifikant ($p = 0,01$).

Der direkte Vergleich der fünfzehn Pärchen zeigte bei dünneren Tumoren (T1/T2) in nur einem von fünf Fällen (20%) einen Verlust von Bax, während sich bei dickeren Tumoren (T3/T4) in der Hälfte aller Fällen eine Herabregulation fand (Abbildung 3.6.2). Die Unterschiede bei dickeren Tumoren waren signifikant ($p = 0,04$). Gleichzeitig wiesen 3 von 5 dünnere Tumore (60%) und nur ein dickerer Tumor eine Zunahme der Bax-Expression auf. Bei den übrigen Pärchen fand sich keine Änderung der Expression.

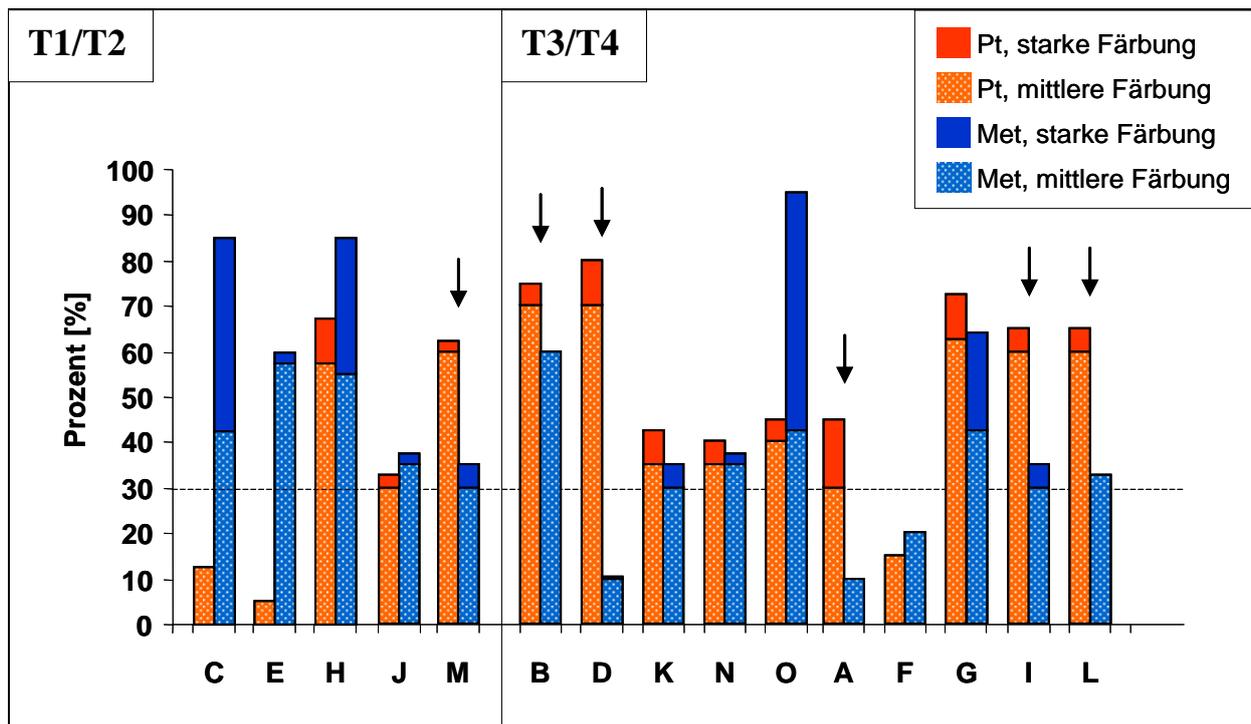


Abbildung 3.6.2 *Bax-Verlust in Metastasen dickerer Primärtumore (T3/T4)*

Es ist die Expression von Bax bei 15 korrespondierenden Tumorpärchen (Patienten: A-O) sortiert entsprechend der Tumordicke des Primärtumors (T1-T4) dargestellt. Es zeigte sich bei dickeren Tumoren (T3/T4) ein Bax-Verlust in den Metastasen (Pfeile) sowie eine häufige Heraufregulation bei dünneren Tumoren (T1/T2; C, E, H).

3.6.4 Mäßiger Verlust von Bax in korrespondierenden Metastasen mit zunehmender Invasionstiefe des Primärtumors

Es die Expression von Bax in den 19 Primärtumoren und 17 Metastasen in Verbindung mit dem Clark-Level untersucht. Für die Gruppen I und II standen keine Tumore zur Verfügung. In Primärtumoren war eine deutliche Bax-Expression mit 4 von 5 Tumoren (80%) in Gruppe III und 11 von 13 Tumoren (85%) in Gruppe IV sehr häufig. Auch der Tumor in Gruppe V war Bax-positiv. Der Median positiver Tumorzellen lag in Gruppe III bei 68%, in Gruppe IV bei 62% und in Gruppe V bei 45%.

Bei Metastasen fand sich in 3 von 5 (60%) Fällen der Gruppe III und 9 von 11 Fällen (82%) der Gruppe IV eine deutliche Bax-Expression, während der Tumor in Gruppe V Bax-negativ war. Der Median positiver Tumorzellen lag hier in Gruppe III bei 35%, in Gruppe IV bei 38% und in Gruppe V bei 10%. Weder bei Primärtumoren noch Metastasen wurde ein signifikanter Zusammenhang mit dem Clark-Level gefunden (Primärtumore: $p = 0,58$; Metastasen: $p = 0,46$).

Der direkte Vergleich der fünfzehn Pärchen zeigte einen Verlust von Bax in nur einer von vier Metastasen (25%) in Gruppe III und 4 von 10 Metastasen (40%) in Gruppe IV. In der Metastase der Gruppe V zeigte sich eine Herabregulation. Eine Heraufregulation in Metastasen fand sich in der Hälfte der Pärchen in Gruppe III aber nur in 2 von 10 Fällen (20%) der Gruppe IV. Die übrigen Tumore zeigten keine Veränderung. Der Verlust von Bax in Metastasen der Gruppen IV/V war statistisch nicht signifikant ($p = 0,37$).

3.6.5 Verlust von Bax in korrespondierenden Metastasen ulzerierter Primärtumore

Es wurde die Bax-Expression in 16 Primärtumoren und 14 Metastasen in Verbindung mit der Ulzeration untersucht. Bei Primärtumoren ohne Ulzeration zeigte sich in 10 von 11 Fällen (91%), bei Primärtumoren mit Ulzeration in allen Fällen eine deutliche Bax-Expression. Der Median positiver Tumorzellen betrug bei nicht-ulzerierten Primärtumoren 65% und bei ulzerierten Primärtumoren 48%. Diese Unterschiede waren nicht signifikant ($p = 0,61$).

Bei Metastasen nicht-ulzerierter Primärtumore zeigte sich in 6 von 10 Fällen (60%), bei Metastasen ulzerierter Tumore in 3 von 4 Fällen (75%) eine deutliche Bax-Expression. Der Median positiver Tumorzellen betrug in beiden Gruppen 35%.

Der direkte Vergleich von zwölf korrespondierenden Tumorpärchen zeigte bei Tumoren ohne Ulzeration in 3 von 8 Fällen (38%) einen Verlust von Bax in Metastasen, bei Tumoren mit Ulzeration dagegen in 2 von 4 Fällen (50%, (Abbildung 3.6.3)). Eine Heraufregulation von Bax in Metastasen fand sich lediglich in 2 von 8 Fällen bei nicht ulzerierten Tumore (25%). Die übrigen Pärchen zeigten keine Änderung der Bax-Expression. Der Verlust von Bax in Metastasen ulzerierter Primärtumore erwies sich als Tendenz ($p = 0,07$).

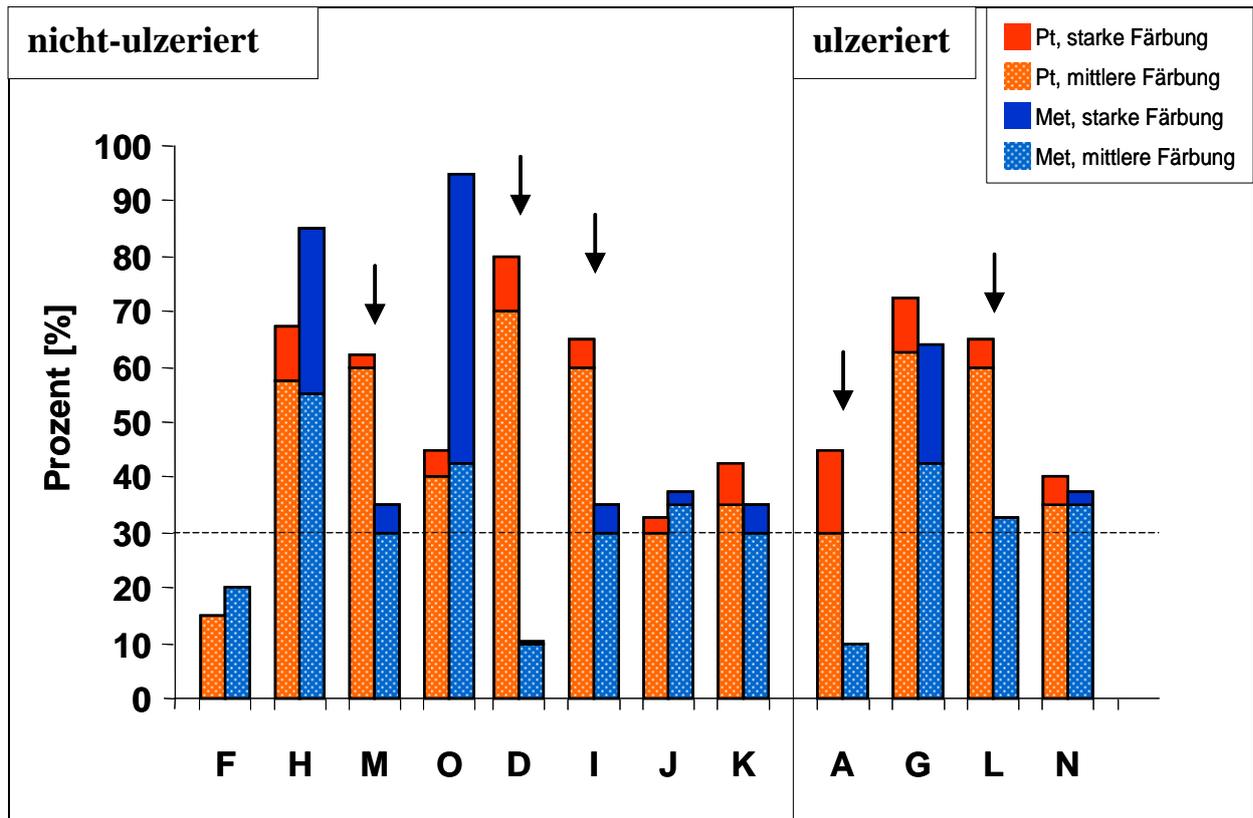


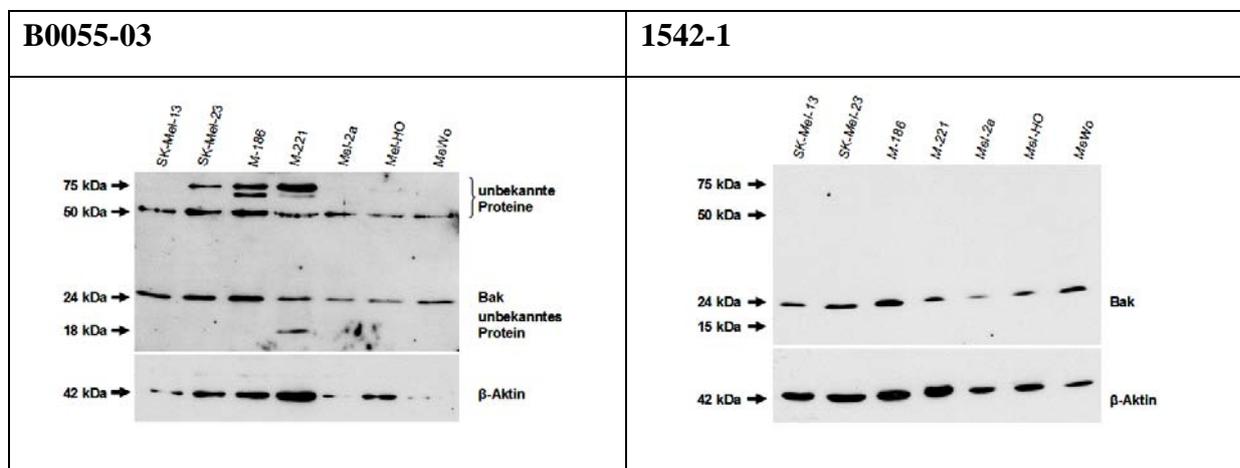
Abbildung 3.6.3 *Bax-Verlust in korrespondierenden Metastasen ulzerierter Primärtumore*
 Es ist die Expression von Bax in zwölf korrespondierenden Tumorpärchen (Patienten: A, D, F-O) sortiert entsprechend Ulzerationsgrad des Primärtumors (nicht-ulzeriert/ulzeriert) dargestellt. Es zeigte sich bei ulzerierten Tumoren ein tendenzieller Verlust von Bax (Pfeile) in den Metastasen.

3.7 Vorversuche Bak

3.7.1 Unterschiedliche Spezifität getesteter Bak-Antikörper in der Western-Blot-Analyse

Es wurde die Spezifität von drei unterschiedlichen Antikörpern gegen Bak bei sieben Melanom-Zelllinien in der Western-Blot-Analyse überprüft. Verwendet wurden die Antikörper B0055-03 (Firma Biomol), 1542-1 (Firma Epitomics) und A3538 (Firma Dako). Bei Letzterem handelte es sich um einen etablierten, aber im Handel nicht mehr verfügbaren Antikörper, welcher lediglich als Vergleichskontrolle genutzt wurde und in den immunhistologischen Versuchen keine Anwendung fand. Die verwendeten Verdünnungen entsprachen den Vorgaben des Herstellers. Die Western-Blot-Analyse zeigte bei allen Antikörpern bei den überprüften Zelllinien die erwartete Bak-Bande (24 kDa; Abbildung 3.7.1). Zusätzlich wiesen die Antikörper B0055-03 und A3538 bei 50 kDa die Bande eines unbekannten Proteins auf. Bei dem Antikörper B0055-03 fanden sich außerdem im Bereich von 75 kDa zwei weitere Banden unbekannter Proteine, sowie eine Bande im Bereich von 18 kDa.

Um auszuschließen, dass die im Bereich von 50 kDa gefundene Bande durch den Sekundärantikörper verursacht wurde, erfolgte eine weitere Western-Blot-Analyse ohne Einsatz eines Primärantikörpers. Hier traten keine Signale auf, sodass der Sekundärantikörper als Ursache ausgeschlossen wurde. Die Ladekontrolle erfolgte mit β -Aktin (42 kDa), zusätzlich wurde eine Ponceau-Färbung durchgeführt. Die Kontrollen zeigten eine Proteinbeladung aller Spuren und einen gleichmäßigen Protein-Transfer. Für die weiteren immunhistologischen Versuche wurde aufgrund hoher Spezifität in der Western-Blot-Analyse und Monoklonalität der Antikörper 1542-1 verwendet.



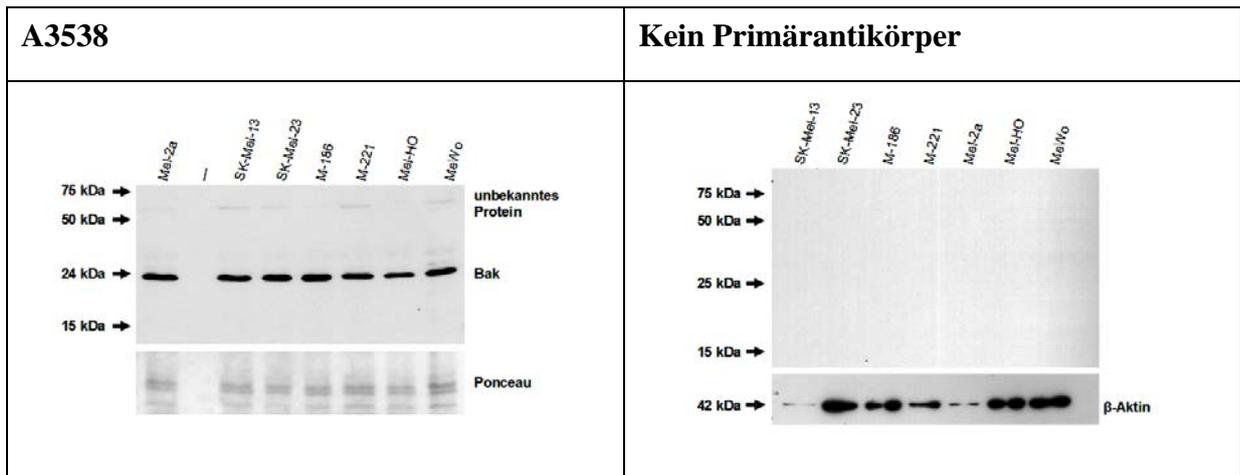


Abbildung 3.7.1 *Unterschiedliche Spezifität von drei Antikörpern gegen Bak in der Western-Blot-Analyse*

Die Western-Blot-Analyse zeigte bei allen Antikörpern (B0055-03, 1542-1, A3538) eine Expression von Bak (24 kDa) in sieben untersuchten Melanom-Zelllinien. Zusätzliche Banden unbekannter Proteine fanden sich insbesondere bei dem Antikörper B0055-03 bei 18 kDa und im Bereich 75 kDa. Die Antikörper B0055-03 und A3538 wiesen eine weitere Bande bei 50 kDa auf. Bei der Western-Blot-Analyse ohne Einsatz eines primären Antikörpers trat dagegen keine Bande auf. Die Beladung erfolgte jeweils mit der gleichen Proteinmenge (30 µg pro Spur) und ist mittels β -Aktin oder Ponceau dargestellt. Bei Antikörper B0055-03 betrug die Expositionszeit 6' (Aktinkontrolle 30''), bei 1542-1 betrug sie 30' (Aktinkontrolle 4'') und bei A3538 drei Minuten. Bei der Western-Blot-Analyse ohne Einsatz von Primärantikörper wurde die Membran 6' exponiert (Aktinkontrolle 3').

3.7.2 Verbesserte Ergebnisse in der immunhistologischen Färbung bei Exposition des primären Antikörpers über Nacht

Es wurde die geeignete Verdünnung für den Antikörper gegen Bak (1542-1) mittels einer Verdünnungsreihe bestimmt. Hierzu wurden Schnitte von vier Melanomen mit Verdünnungen des Primärantikörpers von 1:300, 1:400, 1:500 und 1:600 immunhistologisch gefärbt. Parallel lief eine Negativkontrolle, bei der kein Primärantikörper eingesetzt wurde. Zusätzlich wurde die Färbung entsprechend Standardprotokoll mit einem auf Basis der Herstellerangaben festgelegten modifizierten Protokoll verglichen. Dazu wurde die Expositionszeit für den Primärantikörper von 90 Minuten bei Raumtemperatur (Standard) auf Exposition über Nacht bei 4°C (Modifikation) geändert. Die jeweiligen Ergebnisse für einen Tumor bei den unterschiedlichen Verdünnungen wurden mit der auf Basis des Mittelwerts positiver Tumorzellen aller Verdünnungen festgelegten Kategorie (positiv, negativ) verglichen.

Bei der Färbung nach Standardprotokoll fand sich insgesamt nur eine Abweichung von der zuvor definierten Kategorie des Tumors (Tabelle 3.7.1). Diese trat bei nur einem Melanom und der

größten Verdünnung (1:600) auf. Bei der Färbung mit dem modifizierten Protokoll fanden sich keine Abweichungen. Trotz der nur geringen Unterschiede zwischen den getesteten Protokollen in bezug auf die Kategorie (positiv/negativ) eines Tumors, erwies sich die Färbung entsprechend modifiziertem Protokoll in der mikroskopischen Auswertung als günstiger, da sich hier bei gleicher Verdünnung verglichen zum Standardprotokoll eine höhere Farbintensität zeigte (Abbildung 3.7.2). Daher wurde in den weiteren immunhistologischen Versuchen mit Bak das modifizierte Protokoll verwendet und der Primärantikörper 1:500 verdünnt.

Tabelle 3.7.1 Expression von Bak bei unterschiedlichen Antikörper-Verdünnungen und unter verschiedenen Expositionsbedingungen

Es sind die Auswertungsergebnisse der immunhistologischen Färbung von vier Melanomen bei verschiedenen Verdünnungen (1:300, 1:400, 1:500, 1:600) des Primärantikörpers (1542-1) dargestellt. Die Färbung erfolgte zum einen entsprechend Standardprotokoll (A) und zum anderen entsprechend modifiziertem Protokoll (B). Die Melanome wurden anhand der mittleren Bak-Expression bei den unterschiedlichen Verdünnungen des Primärantikörpers als positiv (+) oder negativ (-) definiert. Abweichungen der Bak-Expression innerhalb einzelner Verdünnungen von der definierten Kategorie sind grau unterlegt.

A (Exposition des Primärantikörpers 90' bei Raumtemperatur)

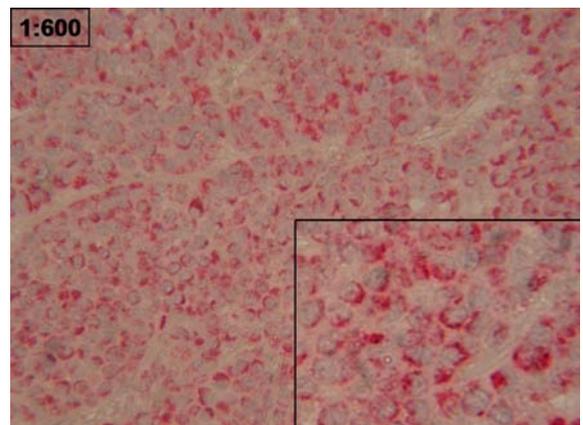
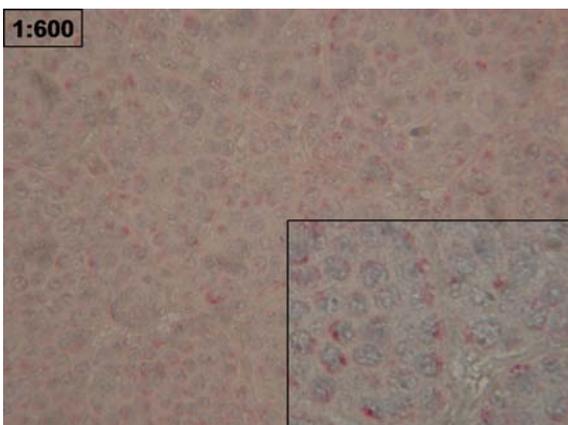
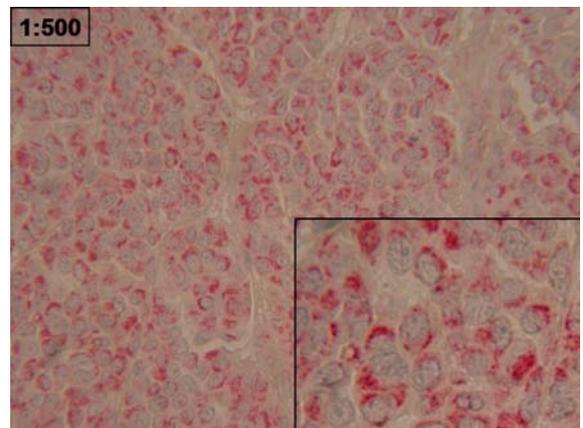
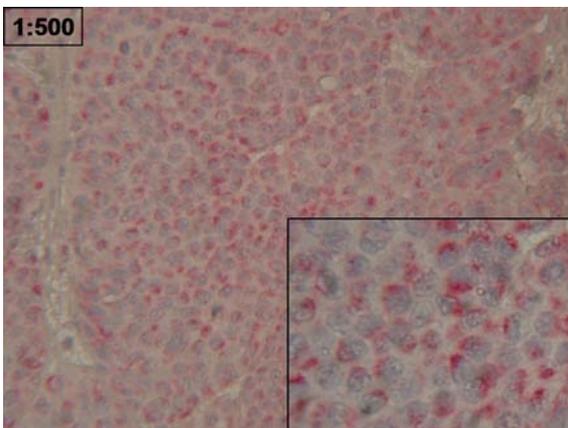
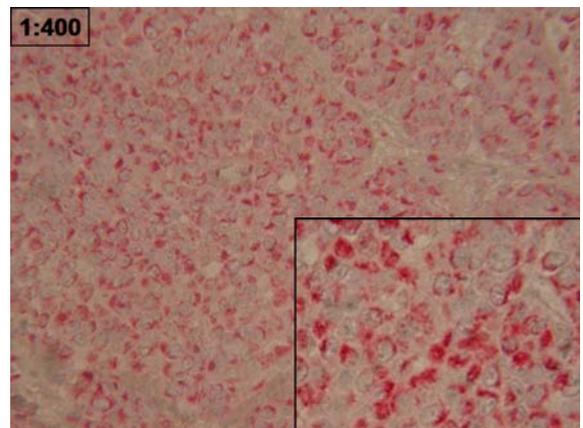
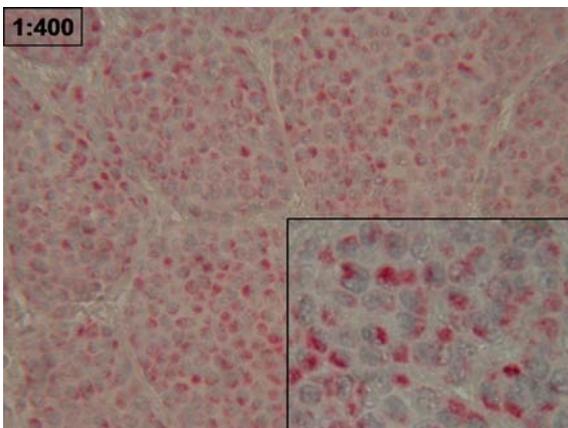
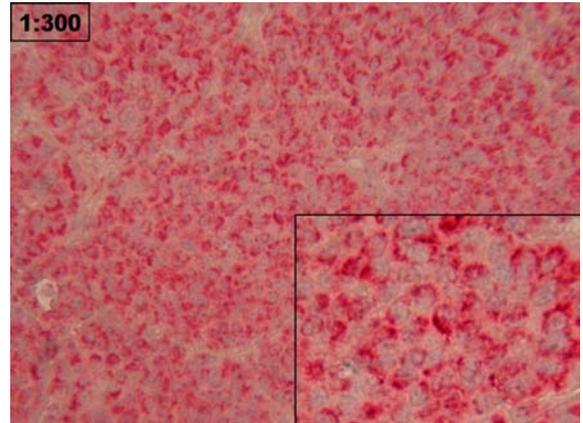
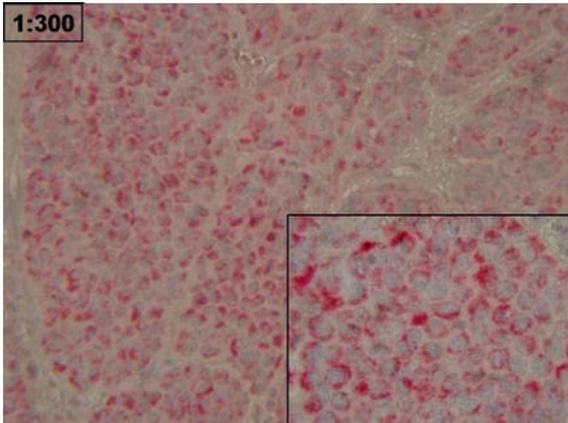
Melanom	Bak-positive Tumorzellen [%]				
	1:300	1:400	1:500	1:600	Mittelwert
1	40 (+)	45 (+)	55 (+)	40 (+)	45 (+)
2	5 (-)	5 (-)	5 (-)	1 (-)	4 (-)
3	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)
4	60 (+)	60 (+)	60 (+)	15 (-)	48,75 (+)

B (Exposition des Primärantikörpers über Nacht bei 4°C)

Melanom	Bak-positive Tumorzellen [%]				
	1:300	1:400	1:500	1:600	Mittelwert
1	65 (+)	65 (+)	45 (+)	50 (+)	56,25 (+)
2	15 (-)	25 (-)	15 (-)	5 (-)	15 (-)
3	0 (-)	1 (-)	0 (-)	0 (-)	0,25 (-)
4	55 (+)	45 (+)	30 (+)	60 (+)	47,5 (+)

90' bei RT

Über Nacht bei 4°C



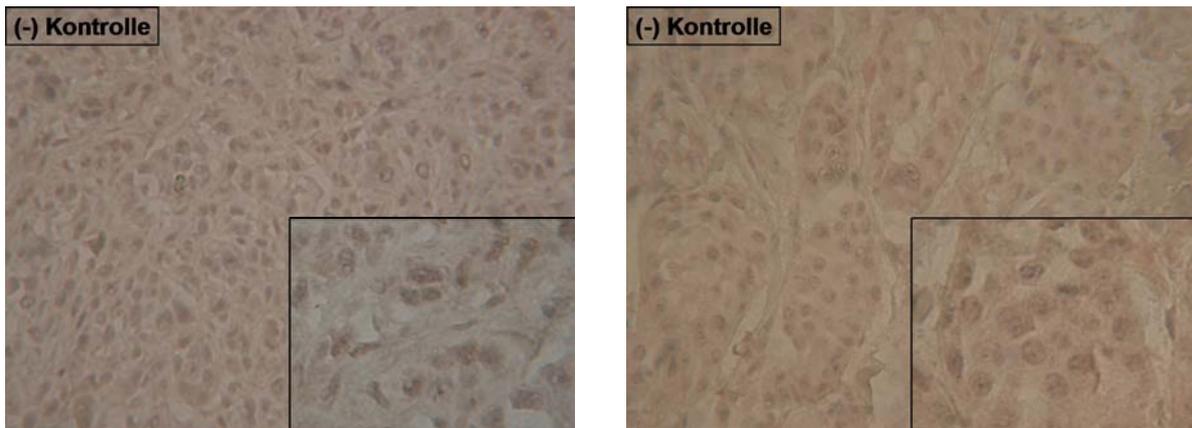


Abbildung 3.7.2 *Verdünnungsreihe mit Anti-Bak-Antikörper (1542-1) unter zwei verschiedenen Expositionsbedingungen in immunhistologischer Färbung*

Es wurden vier Melanome mit unterschiedlichen Verdünnungen (1:300, 1:400, 1:500, 1:600) des Primärantikörpers immunhistologisch gefärbt, von denen hier ein Tumor exemplarisch dargestellt ist. Dabei wurde der Primärantikörper einmal bei 90' und Raumtemperatur (links), einmal bei 4°C über Nacht (rechts) exponiert. Die Negativkontrollen erfolgten ohne Primärantikörper und wiesen keine Färbung auf.

3.8 Bak-Expression in Primärtumoren und Metastasen

3.8.1 Keine Änderung der Expression von Bak in korrespondierenden Metastasen

Die Expression von Bak wurde in jeweils 20 Schnitten von Primärtumoren und Metastasen immunhistologisch untersucht. Drei Metastasen waren nicht auswertbar. In Primärtumoren wiesen 12 von 20 (60%), in Metastasen 9 von 17 (53%) Tumore eine deutliche Expression von Bak auf (Tabelle 3.8.1). Der Median positiver Tumorzellen betrug bei Primärtumoren 35%, bei Metastasen 30%. Dieser Unterschied war nicht signifikant ($p = 0,6$).

Der Vergleich der Bak-Expression in fünfzehn Pärchen von Primärtumor und korrespondierender Metastase ergab in 6 von 15 Fällen (40%) eine Herabregulation von Bak in Metastasen (50%, Abbildung 3.8.1). Dieser Unterschied war nicht signifikant ($p = 0,73$). Eine Heraufregulation fand sich ebenfalls in 6 von 15 Fällen (40%). Die übrigen Tumore zeigten keine Änderung der Expression.

Tabelle 3.8.1 Expression von Bak in Primärtumoren und Metastasen

Es sind die Auswertungsergebnisse der immunhistologischen Überprüfung der Bak-Expression in 20 Primärtumoren (Pt) und Metastasen (Met) dargestellt. Drei Metastasen (P, Q, T) waren nicht auswertbar.

Patient (Pt)	Tumorzellen mit Farbintensität [%]		
	stark	mittel	schwach
A	8,5	27,5	64
B	17,5	42,5	40
C	0	2,5	97,5
D	10	50	40
E	0	0	100
F	3	17	80
G	22	41	37
H	0	5	95
I	0	7,5	92,5
J	0	5	95
K	5	35	60
L	0	20	80
M	15	45	40
N	0	15	85
O	5	30	65
P	7,5	32,5	60
Q	0	30	70
R1	5	30	65
S1	21,5	51,5	27
T	11,5	37	51,5
Median der positiven Tumorzellen: 35%			

Patient (Met)	Tumorzellen mit Farbintensität [%]		
	stark	mittel	schwach
A	20	45	35
B	40	50	10
C	0	0	100
D	0	2,5	97,5
E	9	36,5	54,5
F	0	0	100
G	0	7,5	92,5
H	0	7,5	92,5
I	1	2,5	96,5
J	17,5	62,5	20
K	0	5	95
L	2,5	30	67,5
M	5	37,5	57,5
N	0	30	70
O	2,5	7,5	90
P	---	---	---
Q	---	---	---
R2	5	45	50
S2	7,5	30	62,5
T	---	---	---
Median der positiven Tumorzellen: 30%			

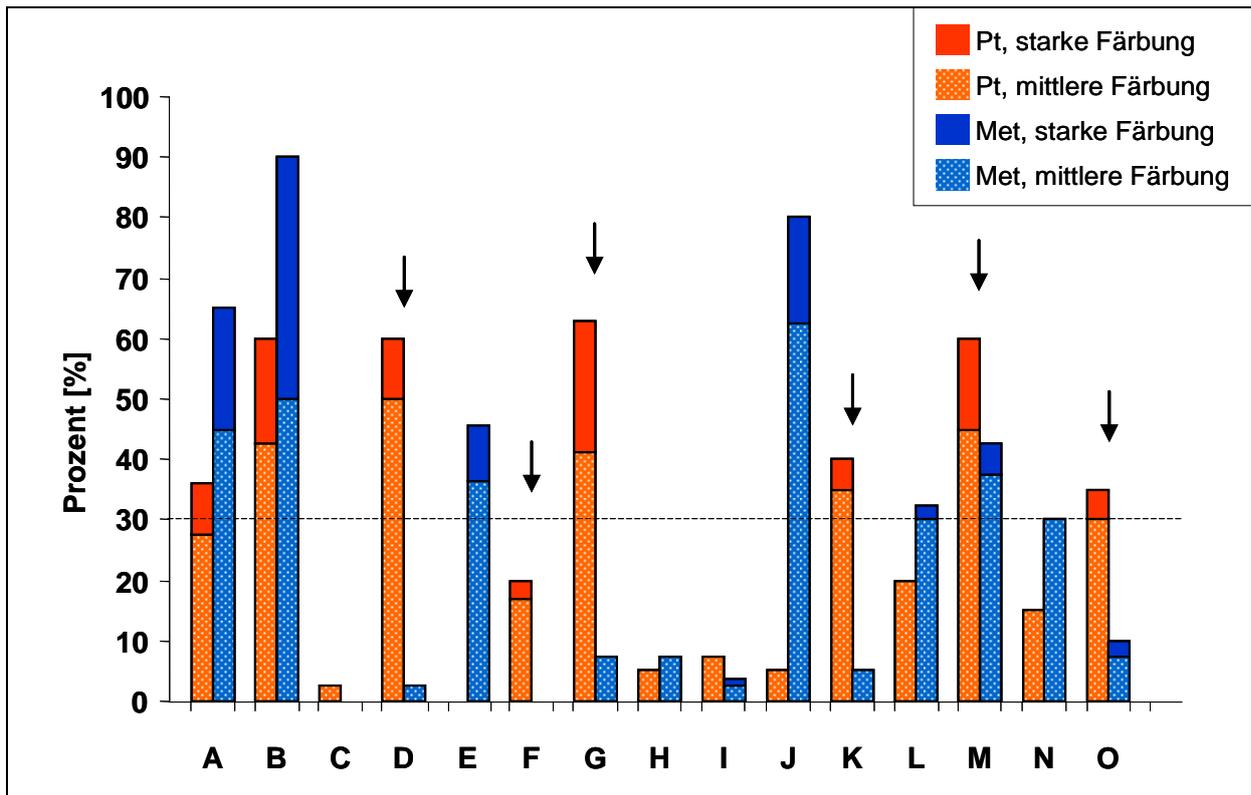
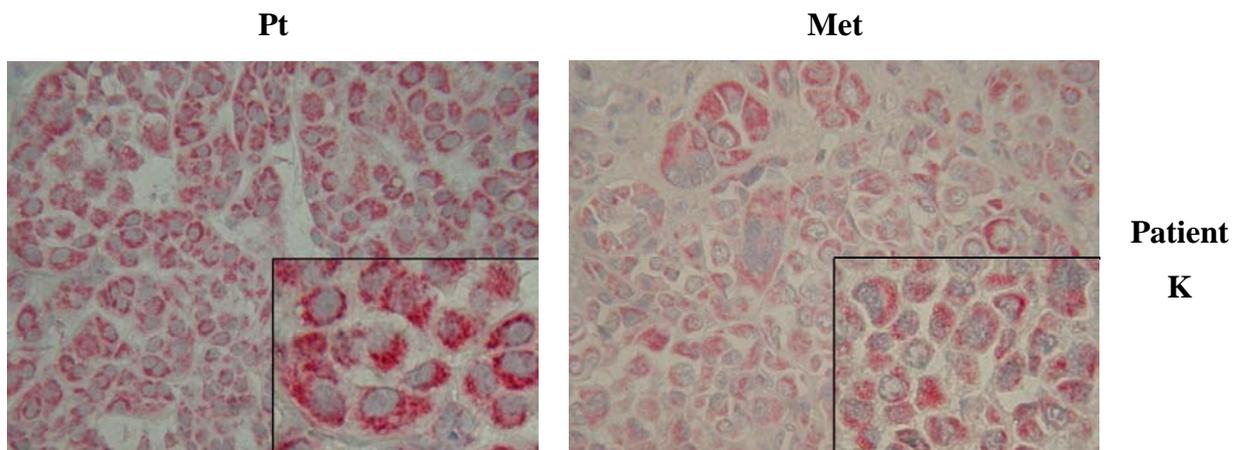


Abbildung 3.8.1 Keine Unterschiede der Bak-Expression in korrespondierenden Metastasen und Primärtumoren

Es ist Expression von Bak in fünfzehn Tumorpärchen dargestellt (Patienten: A-O). Es fand sich verglichen mit Primärtumoren (Pt) bei 6 Metastasen (Met) eine Herabregulierung der Bak-Expression (Pfeile). Ebenfalls in sechs Tumoren (A, B, E, J, L, N) fand sich eine Heraufregulierung. Die übrigen Pärchen zeigen keine Änderung der Expression.



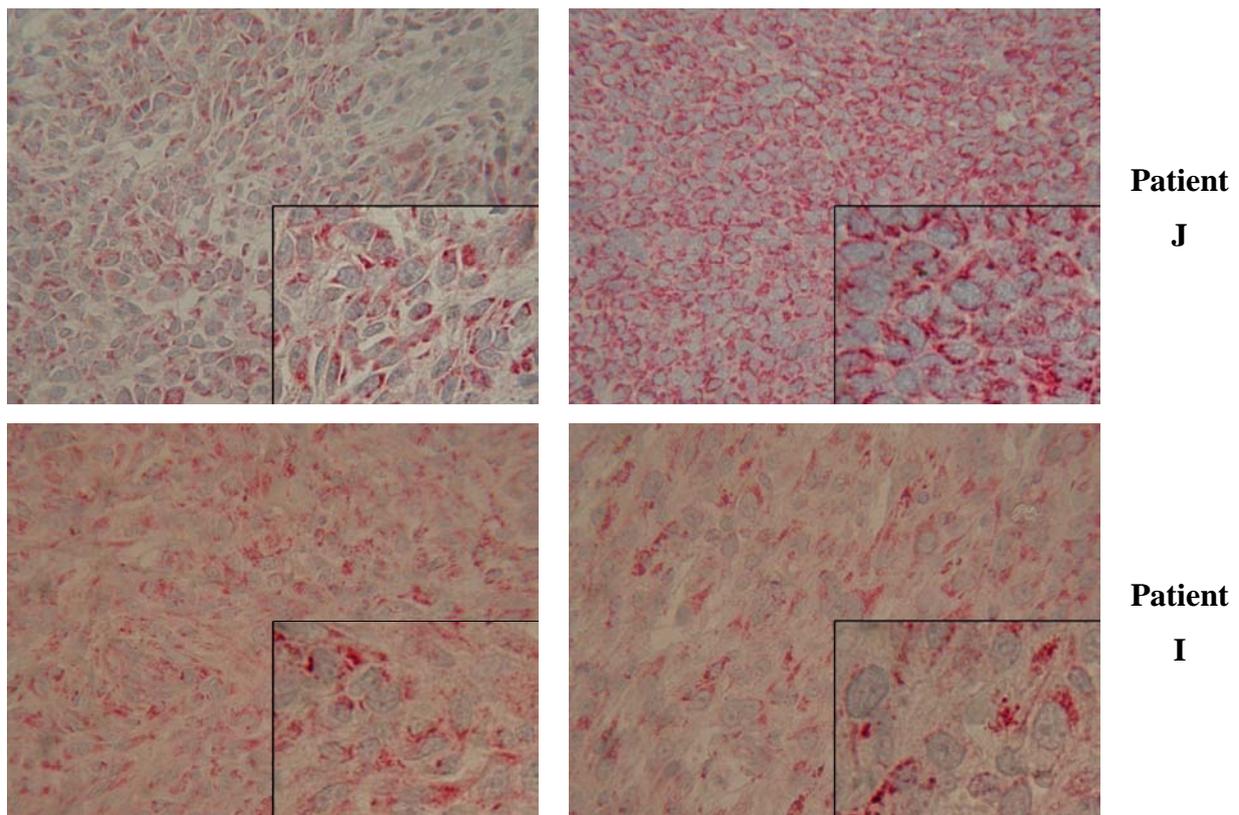


Abbildung 3.8.2 *Bak-Expression in der immunhistologischen Färbung*

Es ist jeweils ein Beispiel für die Herabregulation (Patient K), die Heraufregulation (Patient J) und die unveränderte Expression von Bak (Patient I) in korrespondierenden Metastasen verglichen zum Primärtumor dargestellt.

3.8.2 Verlust von Bak in Metastasen männlicher Patienten

Es wurde die Bak-Expression in jeweils 10 Primärtumoren und Metastasen von Männern und Frauen untersucht. In der Gruppe der Männer waren eine Metastase, in der Gruppe der Frauen zwei Metastasen nicht auswertbar. Bei Primärtumoren zeigte sich in 7 von 10 Fällen (70%) bei Männern und in 5 von 10 Fällen (50%) bei Frauen eine deutliche Expression von Bak. Bei Metastasen wiesen nur 3 von 9 Tumoren (33%) von Männern aber 6 von 8 Tumoren von Frauen (75%) eine Bak-Expression auf.

Der Median positiver Tumorzellen lag bei Primärtumoren von Männern bei 35%, von Frauen bei 28%. Bei den Metastasen von Männern war er mit nur 8% verglichen zu Frauen mit 44% deutlich erniedrigt. Dieser Unterschied erwies sich als Tendenz ($p = 0,08$).

Der Vergleich der Bak-Expression in fünfzehn Pärchen von Primärtumor und korrespondierender Metastase zeigte in 4 von 7 Fällen bei Männern (57%), dagegen bei Frauen

in nur 2 von 8 Fällen (25%) einen deutlichen Verlust von Bak in korrespondierenden Metastasen (Abbildung 3.8.3). Der Verlust von Bak in Metastasen von Männern war signifikant ($p = 0,002$). Eine Heraufregulation fand sich in der Gruppe der Männer in nur einer Metastase, in der Gruppe der Frauen dagegen in fünf Metastasen (63%). Die übrigen Tumore wiesen keine Änderung der Expression auf.

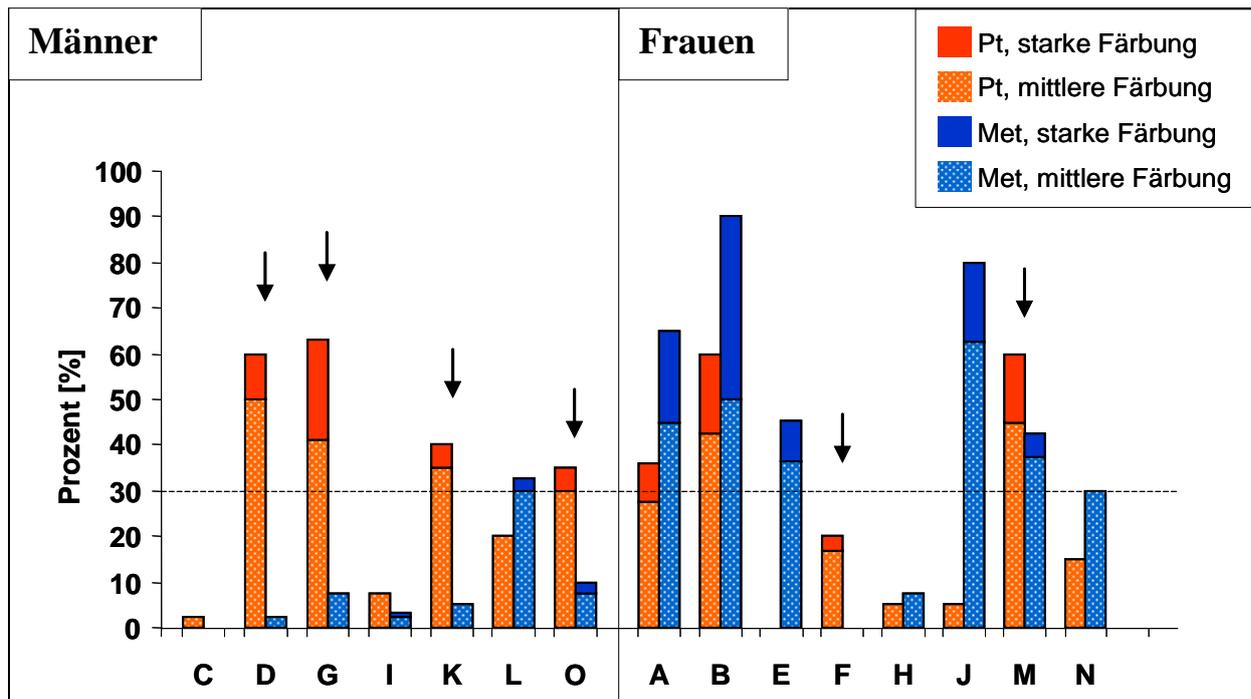


Abbildung 3.8.3 Verlust von Bak in korrespondierenden Metastasen von Männern
 Es ist die Expression von Bak in 15 korrespondierenden Tumorpärchen (Patienten: A-O) sortiert nach Geschlecht dargestellt. Bei Männern fand sich ein deutlicher Verlust von Bak in Metastasen (Pfeile), während sich bei Frauen überwiegend eine Heraufregulation zeigte.

3.8.3 Häufiger Verlust von Bak in korrespondierenden Metastasen dickerer Primärtumore (T3/T4)

Es wurde die Bak-Expression in 20 Primärtumoren und 17 Metastasen in Verbindung mit der Tumordicke untersucht. Die Schnitte wurden entsprechend der Tumordicke des primären Melanoms in die Gruppen T1-T4 eingeteilt. In Gruppe T1 exprimierte kein Primärtumor Bak, während sich in Gruppe T2 in 3 von 4 Tumoren (75%), in T3 in 7 von 8 Tumoren (88%) und in T4 in 2 von 5 Tumoren (40%) eine deutliche Expression zeigte. Bei Metastasen fand sich in Gruppe T1 in einem von drei Tumoren (33%), in T2 in allen Tumoren, in T3 und T4 jeweils in 2 von 5 Tumoren (40%) eine deutliche Bak-Expression.

Der Median positiver Tumorzellen lag bei dünnen Primärtumoren (T1) mit nur 2,5% deutlich niedriger als in den übrigen Gruppen. In Gruppe T2 betrug er 48%, in T3 betrug er 40% und in T4 lag er bei 20%. Die verminderte Bak-Expression in dünnen Primärtumoren (T1) war signifikant ($p = 0,008$). Bei Metastasen lag der Median in T1 bei 8%, in T2 bei 40%, in T3 bei 10% und T4 bei 8%. Diese Unterschiede waren nicht signifikant ($p = 0,67$).

Der direkte Vergleich der fünfzehn Pärchen zeigte bei dünneren Tumoren (T1/T2) in nur einem Fall (20%) einen Verlust von Bak in Metastasen, bei dickeren Tumoren (T3/T4) dagegen in 5 von 10 Fällen (50%; Abbildung 3.8.4). Der Verlust von Bak bei dickeren Tumoren war nicht signifikant ($p = 0,96$). Eine Heraufregulation fand sich bei der Hälfte aller dünneren Tumoren und 4 von 10 dickeren Tumoren (40%). Die übrigen Pärchen zeigten keine Änderung der Bak-Expression.

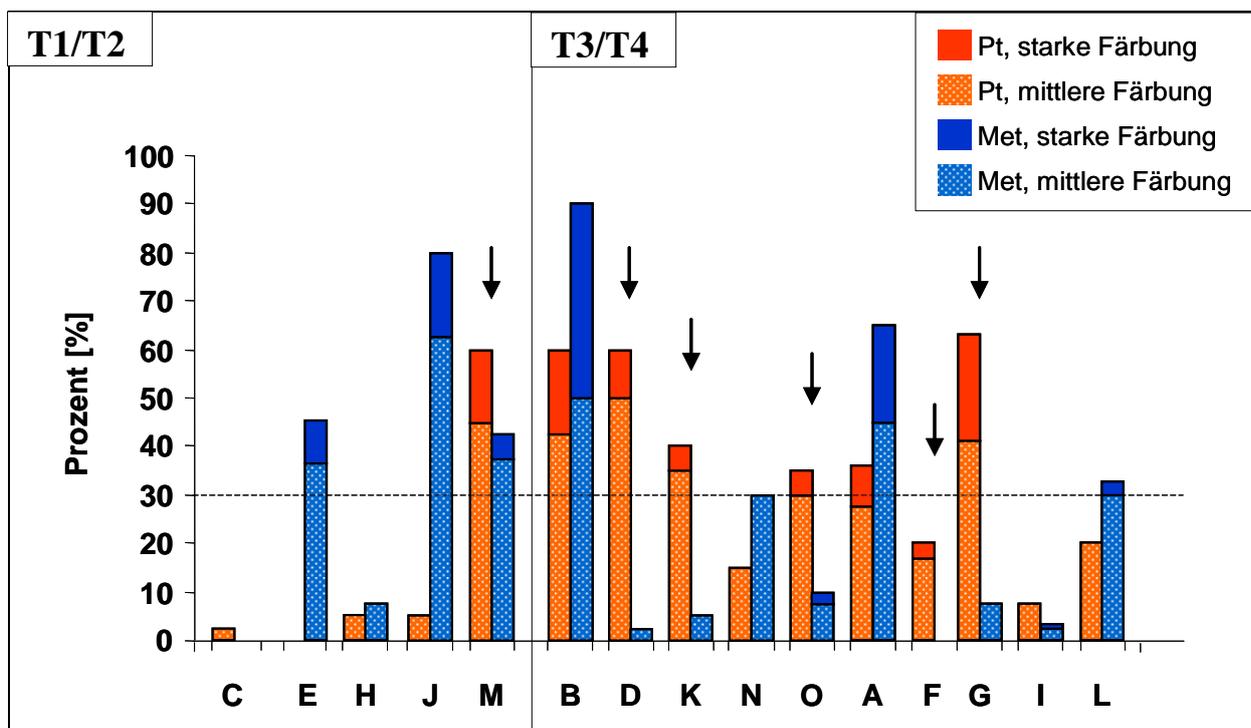


Abbildung 3.8.4 Häufiger Verlust von Bak in korrespondierenden Metastasen dickerer Primärtumore (T3/T4)

Es ist die Expression von Bak in 15 korrespondierenden Tumorpärchen (Patienten: A-O) sortiert entsprechend der Tumordicke des Primärtumors (T1-T4) dargestellt. Dickere Tumoren (T3/T4) wiesen einen häufigen Verlust von Bak in Metastasen auf (Pfeile).

3.8.4 Zunahme der Bak-Expression in Metastasen mit steigendem Clark-Level des Primärtumors

Es wurde die Bak-Expression in 20 Primärtumoren und 17 Metastasen abhängig vom Clark-Level überprüft. Zunächst erfolgte die Einteilung der Schnitte in entsprechende Gruppen. Bei Primärtumoren mit Clark-Level III fand sich in 3 von 5 Fällen (60%) und mit Clark-Level IV in 8 von 14 Fällen (57%) eine deutliche Bak-Expression. Auch der untersuchte Tumor mit Clark-Level V war Bak-positiv. Der Median positiver Tumorzellen lag in Gruppe III bei 35%, in Gruppe IV bei 33% und in Gruppe V bei 36%.

Bei Metastasen zeigte sich in Gruppe III in nur einem Tumor (20%) eine deutliche Bak-Expression, in Gruppe IV bei 7 von 11 Tumoren (64%) und auch in dem Tumor in Gruppe V. Der Median positiver Tumorzellen lag bei Metastasen der Gruppe III bei 5%, der Gruppe IV bei 33% und der Gruppe V bei 65%. Die mit dem Clark-Level zunehmende Bak-Expression in Metastasen erwies sich als Tendenz ($p = 0,06$).

Der direkte Vergleich der fünfzehn Pärchen zeigte bei Tumoren mit Clark-Level III in 2 von 4 Fällen (50%), bei Tumoren mit Clark-Level IV in 4 von 10 Fällen (40%) einen Verlust von Bak in Metastasen (Abbildung 3.8.5). Eine Heraufregulation fand sich bei keinem Pärchen in Gruppe III, während in Gruppe IV die Hälfte der Tumore und auch das Pärchen der Gruppe V eine Zunahme der Bak-Expression in Metastasen aufwiesen. Dieser Unterschied war nicht signifikant ($p = 0,62$). Bei den übrigen Tumoren fand sich keine Änderung der Bak-Expression.

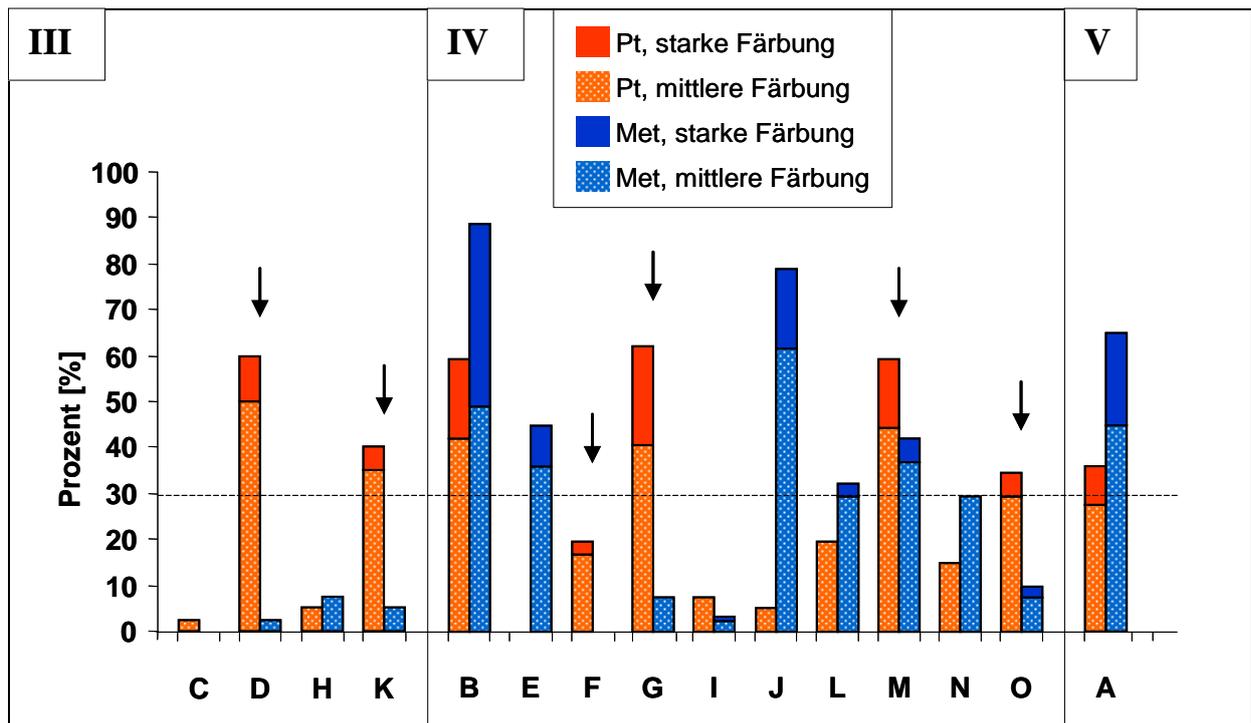


Abbildung 3.8.5 *Bak-Expression in Primärtumoren und Metastasen in Abhängigkeit vom Clark-Level*

Dargestellt ist die Expression von Bak in 15 korrespondierenden Tumorpärchen (Patienten: A-O) sortiert entsprechend Clark-Level des Primärtumors (Pt; T1-T4). Es zeigte sich eine mit dem Clark-Level ansteigende Bak-Expression in Metastasen (Met) und ein Verlust von Bak bei der Hälfte der untersuchten Tumorpärchen mit Clark-Level III (Pfeile).

3.8.5 Häufige Zunahme der Bak-Expression in korrespondierenden Metastasen ulzerierter Primärtumore

Es wurde die Expression von Bak in 20 Primärtumoren und 17 Metastasen in Verbindung mit dem Ulzerationsgrad untersucht. Bei nicht-ulzerierten Primärtumoren fand sich in 7 von 11 Fällen (64%), bei ulzerierten Tumoren in 3 von 5 Fällen (60%) eine deutliche Bak-Expression. Der Median positiver Tumorzellen lag bei nicht-ulzerierten Primärtumoren bei 35% und bei ulzerierten Primärtumoren betrug er 36%.

Bei Metastasen nicht-ulzerierter Primärtumore wiesen 4 von 10 Tumore (40%), bei Metastasen ulzerierter Primärtumore 3 von 4 Tumore (75%) eine deutliche Bak-Expression auf. Der Median positiver Tumorzellen betrug hier 31%, bei Metastasen nicht-ulzerierter Primärtumore 9%. Die Unterschiede waren weder in Primärtumoren ($p = 0,87$) noch Metastasen ($p = 0,44$) signifikant.

Der direkte Vergleich von zwölf Pärchen zeigte in 5 von 8 Tumoren ohne Ulzeration (63%) und nur in einem ulzerierten Tumor (25%) einen Verlust von Bak in Metastasen (Abbildung 3.8.6).

Gleichzeitig fand sich in der Gruppe mit nicht-ulzerierten Tumoren nur eine Heraufregulation von Bak (13%), während sich bei ulzerierten Tumoren in 3 von 4 Fällen (75%) eine Zunahme der Bak-Expression in Metastasen fand. Die Expressionsunterschiede von Bak zwischen Primärtumoren und Metastasen waren jedoch weder bei nicht-ulzerierten Tumoren ($p = 0,26$) noch bei ulzerierten Tumoren ($p = 0,71$) signifikant.

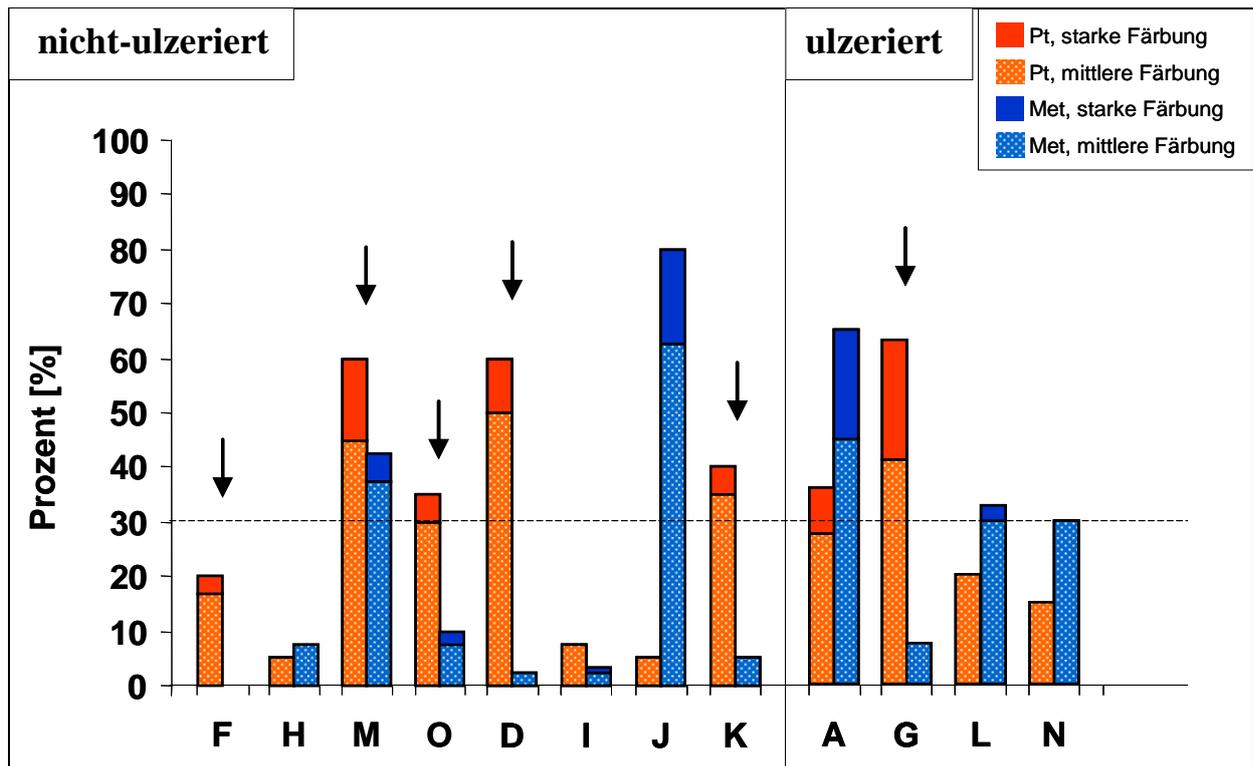


Abbildung 3.8.6 Häufige Zunahme der Bak-Expression in korrespondierenden Metastasen ulzerierter Primärtumore

Es ist die Expression von Bak in zwölf korrespondierenden Tumorpärchen (Patienten: A, D, F-O) sortiert entsprechend Ulzerationsgrad des Primärtumors (nicht-ulzeriert/ulzeriert) dargestellt. Es zeigte sich bei ulzerierten Tumoren eine häufige Zunahme der Bak-Expression in Metastasen (A, L, N) sowie ein seltener Verlust (Pfeile).

3.9 Vorversuche PUMA

3.9.1 Hohe Spezifität des Anti-PUMA-Antikörpers in der Western-Blot-Analyse

Die Spezifität des ausgewählten Antikörpers gegen PUMA (Firma Epitomics, #1652-1) wurde in der Western-Blot-Analyse von sieben Melanom-Zelllinien überprüft. Die verwendete Verdünnung entsprach den Vorgaben des Herstellers. Es zeigte sich eine durchgehende Expression von PUMA bei allen sieben Zelllinien (Abbildung 3.9.1). Zusätzlich zur erwarteten PUMA-Bande (Isoform B, 18 kDa) fand sich ausschließlich eine vom Hersteller ebenfalls angegebene, schwächere Bande bei 24 kDa (Isoform A). Die Ladekontrolle erfolgte mit β -Aktin (42 kDa). Zusätzlich erfolgte eine Ponceau-Färbung. Die Kontrollen zeigten eine Proteinbeladung aller Spuren und einen gleichmäßigen Protein-Transfer.

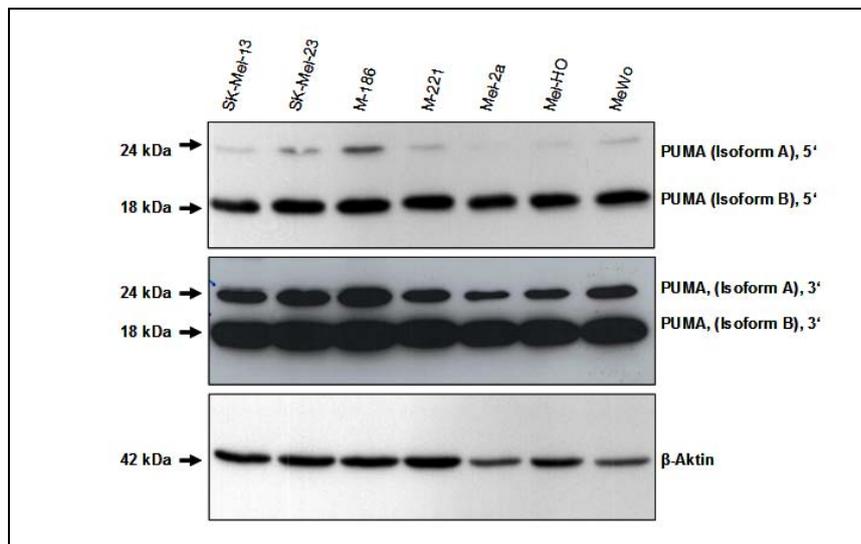


Abbildung 3.9.1 Hohe Spezifität des Anti-PUMA-Antikörpers in der Western-Blot-Analyse

Die Western-Blot-Analyse zeigte eine Expression von PUMA bei sieben Melanom-Zelllinien. Es fanden sich ausschließlich die erwarteten Banden bei 18 kDa (PUMA, Isoform B) und 24 kDa (Isoform A). Die Expositionszeiten betragen fünf Minuten (oben) beziehungsweise drei Minuten (Mitte). Die Beladung erfolgte mit einer Proteinmenge von 30 μ g pro Spur und ist mittels β -Aktin dargestellt. Die Expositionszeit für β -Aktin betrug drei Sekunden.

3.9.2 Durchgehende PUMA-Expression in allen Primärtumoren

Es wurde die geeignete Verdünnung für den Antikörper gegen PUMA (1652-1) mittels einer Verdünnungsreihe bestimmt. Hierzu wurden Schnitte von drei Melanomen mit Verdünnungen des Primärantikörpers von 1:100, 1:200 und 1:400 immunhistologisch gefärbt. Parallel lief eine Negativkontrolle, bei der kein Primärantikörper eingesetzt wurde. Die Bewertung der einzelnen

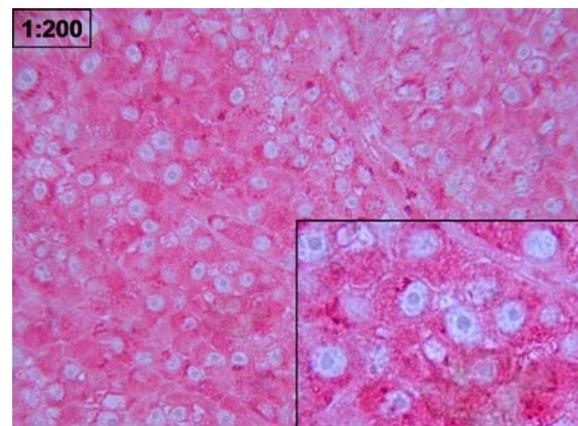
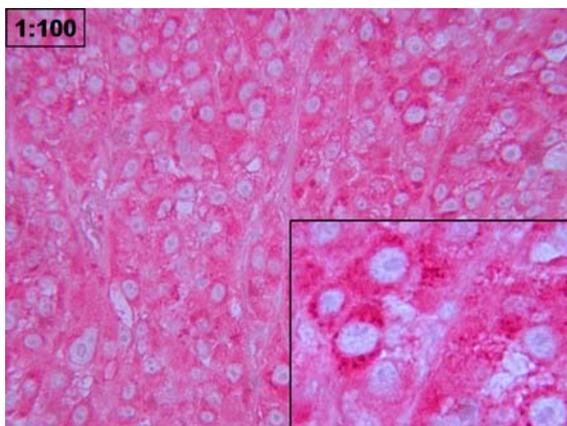
Ergebnisse bei den verschiedenen Verdünnungen erfolgte anhand der auf dem Mittelwert positiver Tumorzellen aller Verdünnungen basierenden Tumorkategorie (positiv, negativ).

In der Auswertung fand sich bei keinem Tumor und bei keiner Verdünnung eine Differenz bezüglich der zugeordneten Kategorie (Tabelle 3.9.1). Es zeigte sich unabhängig von der Verdünnung in allen drei Primärtumoren eine deutliche Expression von PUMA. Die Färbung der Tumorzellen bei höherer Verdünnung (1:400) war insgesamt weniger homogen, sodass Expressionsunterschiede innerhalb des Tumors deutlicher erkennbar waren (Abbildung 3.9.2). Die Negativkontrolle wies keine Färbung auf, wodurch eine unspezifische Reaktion des sekundären Antikörpers ausgeschlossen wurde. Für die folgenden immunhistologischen Versuche mit PUMA wurde 1:400 als Verdünnung gewählt.

Tabelle 3.9.1 Expression von PUMA bei drei Melanomen und unterschiedlichen Antikörper-Verdünnungen

Es wurden drei Melanome anhand der mittleren PUMA-Expression bei verschiedenen Verdünnungen des Primärantikörpers (1:100, 1:200, 1:400) als -positiv (+) oder negativ (-) definiert. Es fanden sich bei keiner Verdünnung Unterschiede bei der Positivität eines Tumors verglichen zuvor definierten Kategorie. Tumor 2 war bei der Verdünnung von 1:400 nicht auswertbar.

Melanom	PUMA-positive Tumorzellen [%]			
	1:100	1:200	1:400	Mittelwert
1	45 (+)	40 (+)	35 (+)	40 (+)
2	80 (+)	65 (+)	---	72,5 (+)
3	80 (+)	90 (+)	90 (+)	87 (+)



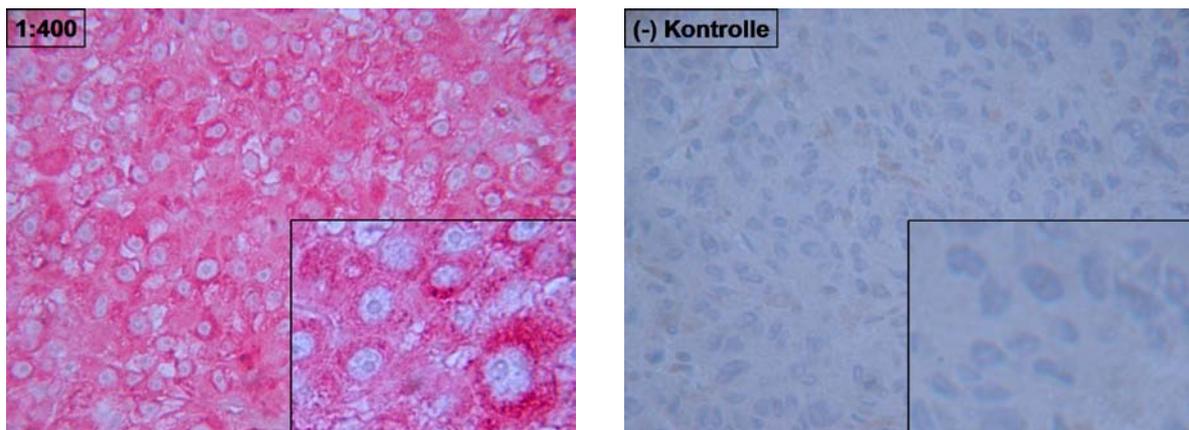


Abbildung 3.9.2 Verdünnungsreihe mit Anti-PUMA-Antikörper 1652-1 in der Immunhistologie

Es wurden in der Verdünnungsreihe die Verdünnungen des primären Antikörpers 1:100, 1:200, 1:400 bei drei Melanomen getestet, von denen hier exemplarisch ein Tumor dargestellt ist. Es fand sich eine von der Verdünnung unabhängige PUMA-Expression. Die Negativkontrolle erfolgte ohne Primärantikörper und wies keine Färbung auf.

3.10 PUMA-Expression in Primärtumoren und Metastasen

3.10.1 Häufiger Verlust von PUMA in korrespondierenden Metastasen

Die Expression von PUMA wurde bei jeweils 20 Schnitten von Primärtumoren und Metastasen immunhistologisch untersucht. Zwei Metastasen waren nicht auswertbar. Bei Primärtumoren wiesen 14 von 20 (70%), bei Metastasen 8 von 18 (44%) Tumore eine deutliche PUMA-Expression auf (Tabelle 3.10.1). Der Median positiver Tumorzellen betrug bei Primärtumoren 49%, bei Metastasen 22%. Dieser Unterschied war nicht signifikant ($p = 0,25$).

Der Vergleich der PUMA-Expression in sechzehn Pärchen von Primärtumor und korrespondierender Metastase zeigte einen Verlust von PUMA in der Hälfte aller Metastasen (Abbildungen 3.10.1, 3.10.2). Die Expressionsunterschiede waren nicht signifikant ($p = 0,43$). Vier der sechzehn Pärchen (25%) wiesen eine Heraufregulation in Metastasen auf. Die übrigen Tumore zeigten keine Änderung der PUMA-Expression.

Tabelle 3.10.1 Expression von PUMA in Primärtumoren und Metastasen

Es sind die Auswertungsergebnisse der immunhistologischen Überprüfung der PUMA-Expression in 20 Primärtumoren (Pt) und Metastasen (Met) dargestellt. Zwei Metastasen (Q, T) waren nicht auswertbar.

Patient (Pt)	Tumorzellen mit Farbintensität [%]		
	stark	mittel	schwach
A	5	45	50
B	9,5	33	57,5

Patient (Met)	Tumorzellen mit Farbintensität [%]		
	stark	mittel	schwach
A	5	30	65
B	20	60	20

C	0	7,5	92,5
D	17,5	52,5	30
E	0	5	95
F	12,5	45	42,5
G	2,5	42,5	55
H	7,5	40	52,5
I	1,5	15,5	83
J	0	15	85
K	10	50	40
L	0	15	85
M	32,5	52,5	15
N	10	55	35
O	37,5	47,5	15
P	30	47,5	22,5
Q	2,5	45	52,5
R1	25	52,5	22,5
S1	35	50	15
T	0	7,5	92,5
Median der positiven Tumorzellen: 49%			

C	0	2,5	97,5
D	0	22,5	77,5
E	11,3	58,8	29,9
F	15	30	55
G	2,5	19	78,5
H	0	17,5	82,5
I	0	7,5	92,5
J	30	55	15
K	0	5	95
L	15	45	40
M	32,5	52,5	15
N	10	50	40
O	0	7,5	92,5
P	2,5	12,5	85
Q	---	---	---
R2	2,5	10	87,5
S2	0	15	85
T	---	---	---
Median der positiven Tumorzellen: 22%			

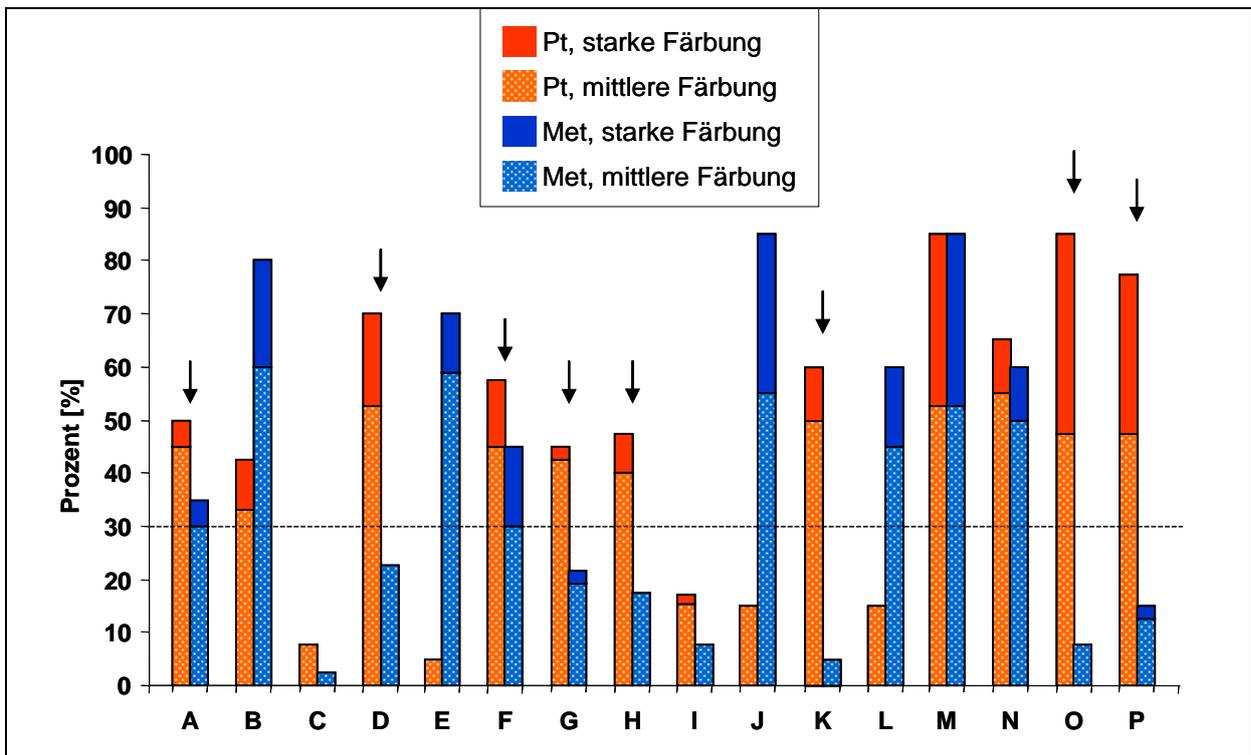


Abbildung 3.10.1 Häufiger Verlust von PUMA in korrespondierenden Metastasen

Es ist Expression von PUMA in sechzehn Tumorpärchen dargestellt (Patienten: A-P). Es fand sich verglichen mit Primärtumoren (Pt) in 8 Metastasen (Met) eine Herabregulierung der PUMA-Expression (Pfeile). Vier Tumore (B, E, J, LN) zeigten eine Heraufregulation. Die übrigen Pärchen zeigten keine Änderung der Expression.

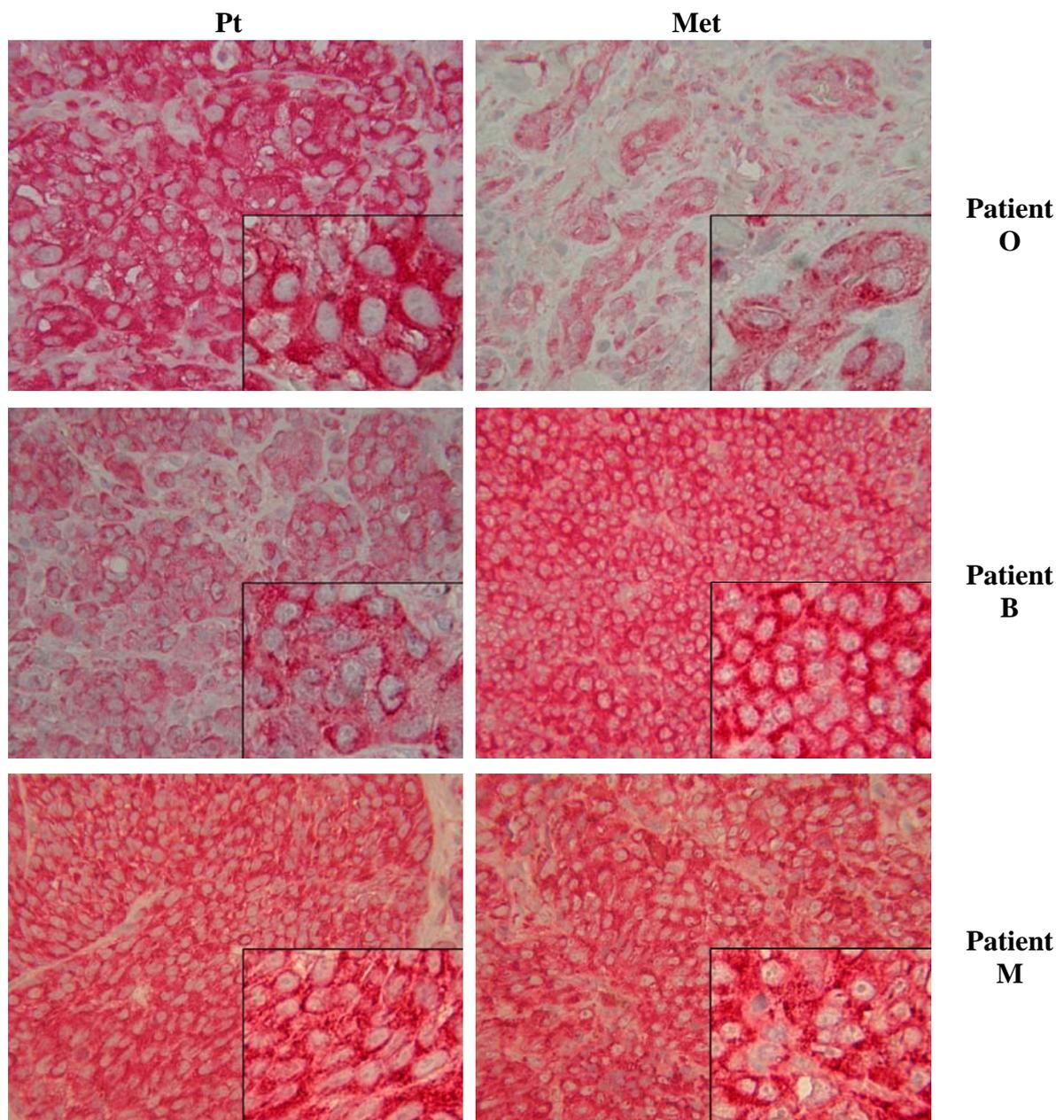


Abbildung 3.10.2 *PUMA-Expression in der immunhistologischen Färbung*

Es ist jeweils ein Beispiel für die Herabregulation (Patient O), die Heraufregulation (Patient B) und die unveränderte Expression von PUMA (Patient M) in korrespondierenden Metastasen verglichen zum Primärtumor dargestellt.

3.10.2 Häufiger Verlust von PUMA in Metastasen männlicher Patienten

Es wurde die PUMA-Expression in jeweils 10 Primärtumoren und Metastasen von Männern und Frauen untersucht. In beiden Gruppen war jeweils eine Metastase nicht auswertbar. In Primärtumoren zeigte sich in beiden Gruppen eine deutliche Expression von PUMA bei 7 von 10

Tumoren (70%). Bei Metastasen von Männern fand sich in einem Fall (11%), von Frauen dagegen in 7 von 9 Fällen (78%) eine deutliche PUMA-Expression. Der Median positiver Tumorzellen lag bei Primärtumoren von Männern bei 54%, von Frauen bei 49%. Bei den Metastasen von Männern betrug nur 13%, von Frauen dagegen 60%. Dieser Unterschied war signifikant ($p = 0,005$).

Der Vergleich der PUMA-Expression in sechzehn Pärchen von Primärtumor und korrespondierender Metastase zeigte einen Verlust in 4 von 7 Metastasen (57%) von Männern und 4 von 9 Metastasen (44%) von Frauen (Abbildung 3.10.3). Dagegen fand sich eine Heraufregulation in nur einem Fall bei Männern (14%) und in 3 von 9 Fällen bei Frauen (33%). Die übrigen Pärchen zeigten keine Änderung der PUMA-Expression.

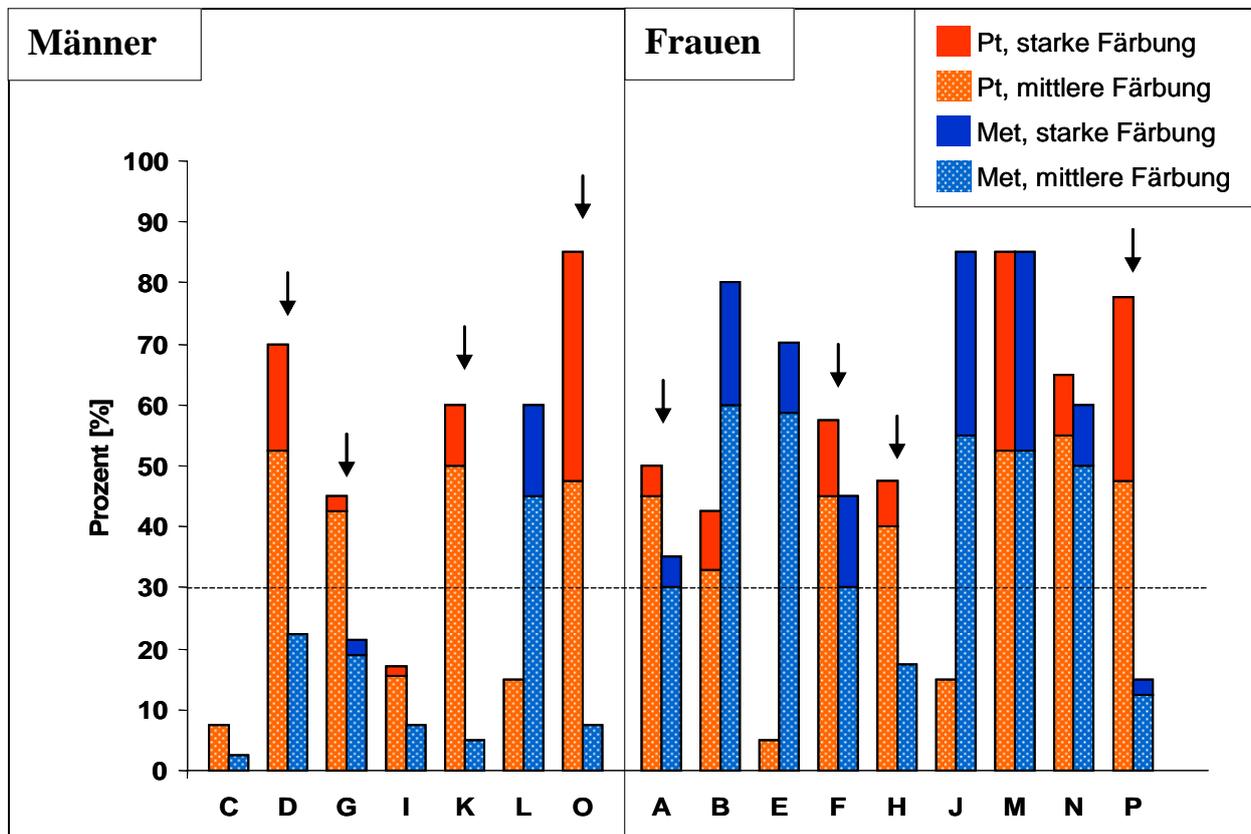


Abbildung 3.10.3 Häufiger Verlust von PUMA in korrespondierenden Metastasen von Männern

Es ist die Expression von PUMA in 16 korrespondierenden Tumorpärchen (Patienten: A-P) sortiert nach Geschlecht dargestellt. Bei Männern fand sich ein häufiger Verlust von PUMA in Metastasen (Pfeile), bei Frauen dagegen zeigte sich in Metastasen eine vergleichsweise hohe PUMA-Expression.

3.10.3 Häufiger Verlust von PUMA in korrespondierenden Metastasen dickerer Primärtumore (T3/T4)

Es wurde die PUMA-Expression in 20 Primärtumoren und 18 Metastasen in Verbindung mit der Tumordicke untersucht. Die Schnitte wurden entsprechend der Tumordicke des primären Melanoms in die Gruppen T1-T4 eingeteilt. In Gruppe T1 exprimierte nur ein Primärtumor PUMA (33%), während sich in Gruppe T2 bei 3 von 4 Tumoren (75%), in T3 bei 7 von 8 Tumoren (88%) und in T4 bei 3 von 5 Tumoren (60%) eine deutliche Expression zeigte. Bei Metastasen fand sich in Gruppe T1 in einem von drei Tumoren (33%), in T2 in 2 von 4 Tumoren (50%), in T3 in 2 von 6 Tumoren (33%) und in T4 in 3 von 5 Tumoren (60%) eine deutliche PUMA-Expression.

Der Median positiver Tumorzellen lag bei dünnen Primärtumoren (T1) mit nur 8% deutlich niedriger als in den übrigen Gruppen. In Gruppe T2 betrug er 81%, in T3 betrug er 63% und in T4 lag er bei 45%. Die erniedrigte PUMA-Expression in dünnen Primärtumoren (T1) erwies sich als Tendenz ($p = 0,05$). Bei Metastasen lag der Median in T1 bei 18%, in T2 bei 50%, in T3 bei 19% und T4 bei 35%. Diese Unterschiede waren nicht signifikant ($p = 0,83$).

Der direkte Vergleich der sechzehn Pärchen zeigte bei dünneren Tumoren (T1/T2) in nur einem Fall (20%) einen Verlust von PUMA in Metastasen, bei dickeren Tumoren (T3/T4) dagegen in 7 von 11 Fällen (64%; Abbildung 3.10.4). Der Verlust von PUMA bei dickeren Tumoren war nicht signifikant ($p = 0,10$). Eine Heraufregulation fand sich bei 2 von 5 dünneren Tumoren (40%) und 2 von 11 dickeren Tumoren (19%). Die übrigen Pärchen zeigten keine Änderung der PUMA-Expression.

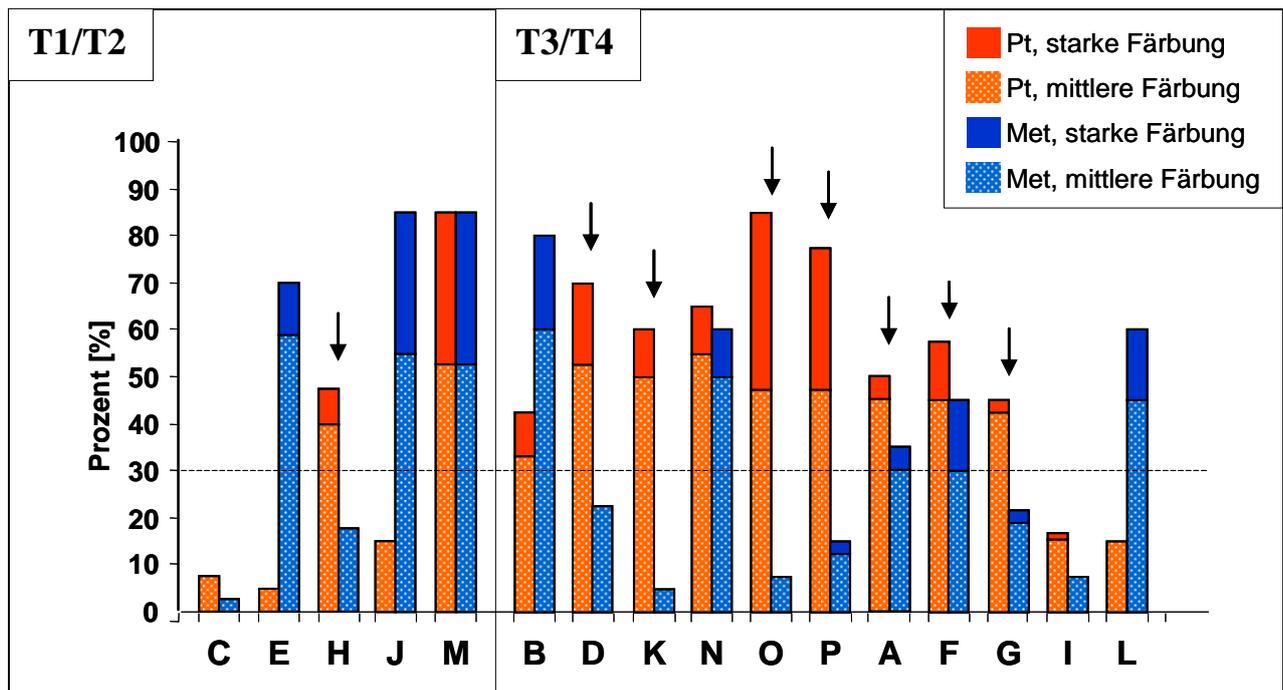


Abbildung 3.10.4 Häufiger Verlust von PUMA in korrespondierenden Metastasen dickerer Primärtumore (T3/T4)

Es ist die Expression von PUMA in 16 korrespondierenden Tumorpärchen (Patienten: A-P) sortiert entsprechend der Tumordicke des Primärtumors (T1-T4) dargestellt. Dickere Tumore (T3/T4) wiesen einen häufigen Verlust von PUMA in Metastasen auf (Pfeile).

3.10.4 Verlust von PUMA in Metastasen von Primärtumoren mit geringer Invasionstiefe (Clark-Level III)

Es wurde die PUMA-Expression in 20 Primärtumoren und 18 Metastasen abhängig vom Clark-Level überprüft. Zunächst erfolgte die Einteilung der Schnitte in entsprechende Gruppen. Bei Primärtumoren mit Clark-Level III fand sich in 4 von 5 Fällen (80%) und mit Level IV in 9 von 14 Fällen (64%) und auch bei dem Tumor mit Level V eine deutliche Expression von PUMA. Der Median positiver Tumorzellen lag in Gruppe III bei 60%, in Gruppe IV bei 40% und in Gruppe V bei 50%. Bei Metastasen exprimierte in Gruppe III kein Tumor PUMA. In Gruppe IV zeigte sich dagegen in 7 von 12 Metastasen (58%) eine deutliche PUMA-Expression, auch der Tumor in Gruppe V erwies sich als positiv. Diese Unterschiede erwiesen sich als Tendenz ($p = 0,08$).

Der direkte Vergleich der sechzehn Pärchen zeigte bei Tumoren mit Clark-Level III in 3 von 4 Fällen (75%), mit Level IV in 4 von 11 Fällen (36%) und auch bei dem Pärchen in Gruppe V einen Verlust von PUMA in Metastasen (Abbildung 3.10.5). Der Verlust bei Tumoren mit Clark-Level III erwies sich als Tendenz ($p = 0,06$). Eine Heraufregulation vom PUMA zeigte sich nur

in 4 von 11 Fällen (36%) bei Tumoren mit Clark-Level IV. Die übrigen Pärchen wiesen keine Änderung der PUMA-Expression auf.

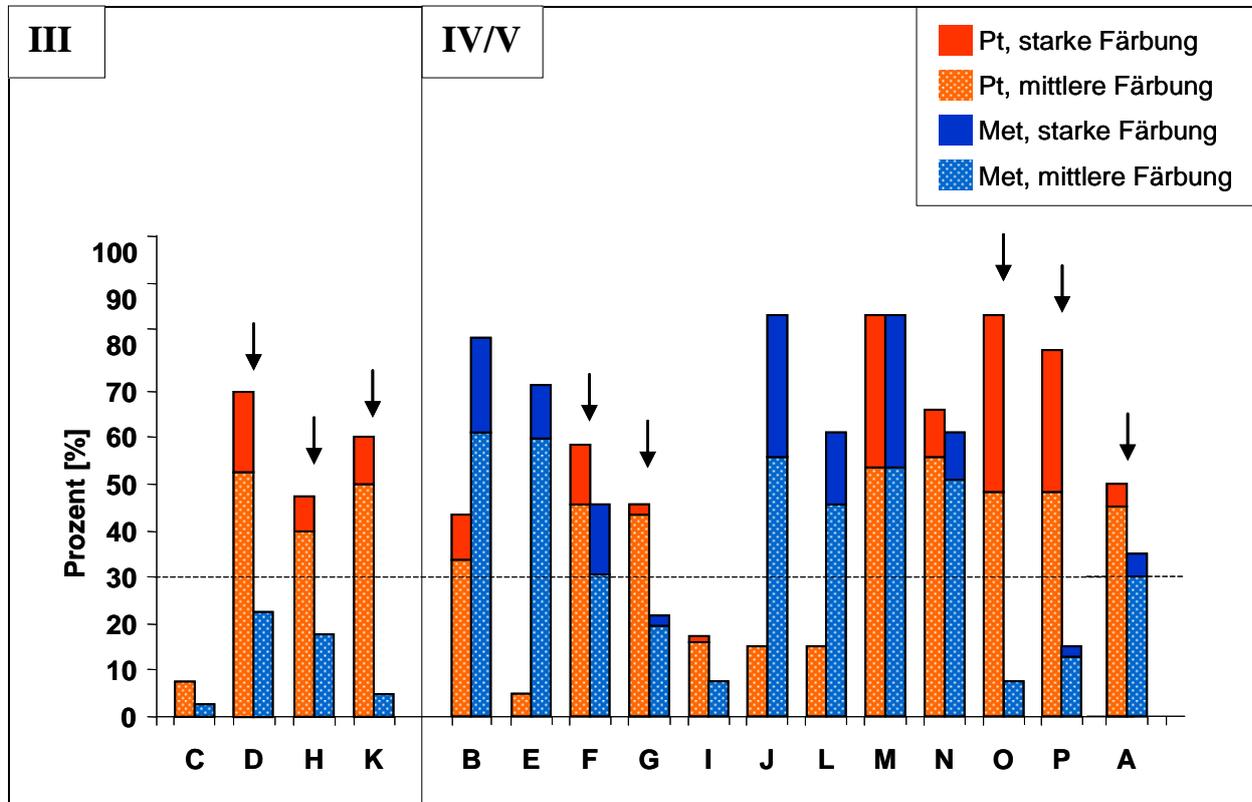


Abbildung 3.10.5 *Verlust von PUMA in korrespondierenden Metastasen von Primärtumoren mit Clark-Level III*

Dargestellt ist die Expression von PUMA in 16 korrespondierenden Tumorpärchen (Patienten: A-P) sortiert entsprechend Clark-Level des Primärtumors (Pt; T1-T4). Es zeigte sich bei geringer Invasionstiefe des Primärtumors (Gruppe III) ein Verlust von PUMA in korrespondierenden Metastasen (Pfeile). Eine Heraufregulation fand sich ausschließlich in Tumorpärchen größerer Invasionstiefen (Gruppe IV/V; B, E, J, L).

3.10.5 PUMA-Expression unabhängig vom Ulzerationsgrad

Es wurde die Expression von PUMA in 20 Primärtumoren und 18 Metastasen in Verbindung mit dem Ulzerationsgrad untersucht. Nicht-ulzerierte Primärtumore wiesen in 8 von 11 Fällen (73%), ulzerierte Primärtumore in 4 von 5 Fällen (80%) eine deutliche PUMA-Expression auf. Der Median positiver Tumorzellen betrug bei nicht-ulzerierten Primärtumoren 60% und bei ulzerierten Primärtumoren 50%. Bei Metastasen nicht-ulzerierter Primärtumore zeigte sich in 3 von 10 Fällen (30%), bei Metastasen ulzerierter Primärtumore in 3 von 5 Fällen (60%) eine deutliche PUMA-Expression. Der Median positiver Tumorzellen betrug hier 35% und bei

Metastasen nicht-ulzerierter Primärtumore 17%. Die Unterschiede waren weder bei Primärtumoren ($p = 0,53$) noch Metastasen ($p = 0,3$) signifikant.

Der direkte Vergleich von dreizehn Pärchen zeigte bei 5 von 8 Tumoren ohne Ulzeration (63%) und 3 von 5 ulzerierten Tumoren (60%) einen Verlust von PUMA in Metastasen. Eine Heraufregulation von PUMA in Metastasen fand sich sowohl bei nicht-ulzerierten als auch bei ulzerierten Tumoren in jeweils nur einem Fall (13%, beziehungsweise 20%). Die übrigen Pärchen zeigten keine Änderung der PUMA-Expression. In keiner der drei untersuchten Gruppen waren die Expressionsunterschiede von PUMA zwischen Primärtumoren und Metastasen signifikant (nicht-ulzerierte Tumore: $p = 0,18$; ulzerierte Tumore: $p = 0,34$).

3.11 Vorversuche Noxa

3.11.1 Eindeutige Identifizierung von Noxa in der Western-Blot-Analyse

Die Spezifität eines Antikörpers gegen Noxa (Firma ProSci, #2437) wurde in der Western-Blot-Analyse von sieben Melanom-Zelllinien überprüft. Die verwendete Verdünnung entsprach den Vorgaben des Herstellers. Es fand sich eine Expression von Noxa bei allen Zelllinien (Abbildung 3.11.1). Neben der erwarteten Bande von Noxa (14 kDa) fand sich zusätzlich die Bande eines unbekannten Proteins bei 21 kDa. Die Ladekontrolle erfolgte mit β -Aktin (42 kDa). Zusätzlich erfolgte eine Ponceau-Färbung. Die Kontrollen zeigten eine Proteinbeladung aller Spuren und einen gleichmäßigen Protein-Transfer. Der Antikörper wurde im Folgenden für die immunhistologischen Versuche mit Noxa verwendet, da er eine eindeutige Identifizierung des Proteins in der Western-Blot-Analyse ermöglichte.

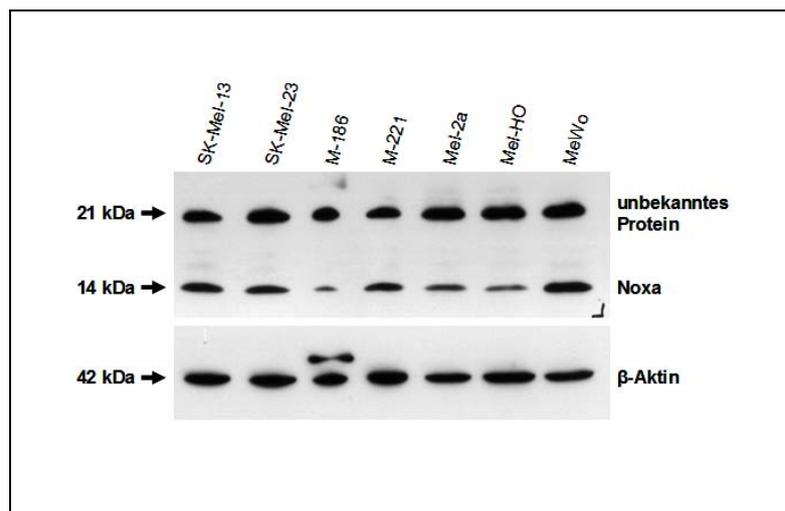


Abbildung 3.11.1 Hohe Spezifität des Anti-Noxa-Antikörpers in der Western-Blot-Analyse

Die Western-Blot-Analyse zeigte eine Expression von Noxa bei sieben Melanom-Zelllinien. Neben der erwarteten Bande (14 kDa) fand sich zusätzlich die Bande eines unbekannten Proteins (21 kDa). Die Expositionszeit betrug drei Minuten. Die Beladung erfolgte mit einer Proteinmenge von 30 μ g pro Spur und ist mittels β -Aktin dargestellt. Die Expositionszeit für β -Aktin betrug fünf Sekunden.

3.11.2 Beste Auswertbarkeit der immunhistologischen Färbung bei einer Verdünnung des Primärantikörpers von 1:1000

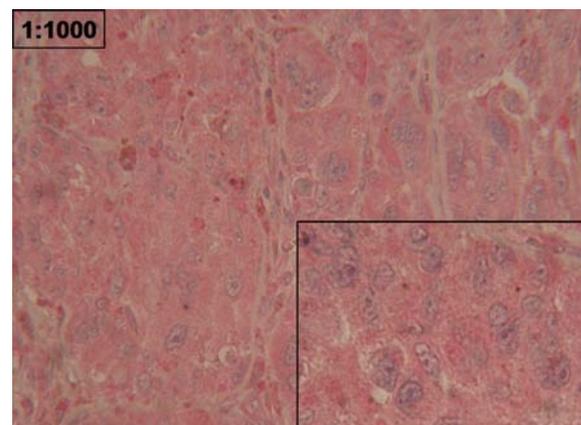
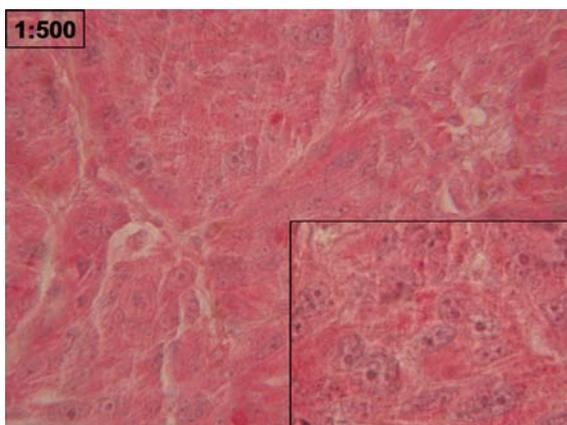
Es wurde mit einer Verdünnungsreihe die geeignete Verdünnung für den Antikörper #2437 gegen Noxa ermittelt. Hierzu wurden Schnitte von jeweils drei Melanomen mit den Verdünnungen 1:500, 1:1000 und 1:2000 immunhistologisch gefärbt. Parallel lief eine

Negativkontrolle, bei der kein Primärantikörper eingesetzt wurde. Die Bewertung der einzelnen Ergebnisse bei den verschiedenen Verdünnungen erfolgte anhand der auf dem Mittelwert positiver Tumorzellen aller Verdünnungen basierenden Tumorkategorie (positiv, negativ). Am seltensten zeigten sich Differenzen zur definierten Tumorkategorie bei der geringsten Verdünnung von 1:500 (Tabelle 3.11.1). Bei den beiden übrigen Verdünnungen stimmte jeweils einmal die Kategorie nicht überein. In der mikroskopischen Begutachtung fiel bei der geringsten Verdünnung von 1:500 eine sehr intensive Färbung auf, während die Färbung bei der höchsten Verdünnung des Primärantikörpers von 1:2000 schwach ausfiel (Abbildung 3.11.2). Daher wurde für die weiteren immunhistologischen Versuche eine Verdünnung von 1:1000 gewählt.

Tabelle 3.11.1 *Expression von Noxa in drei Melanomen bei unterschiedlichen Antikörper-Verdünnungen*

Es wurden drei Melanome anhand der mittleren Noxa-Expression bei verschiedenen Verdünnungen des Primärantikörpers (1:500, 1:1000, 1:2000) als positiv (+) oder negativ (-) definiert. Abweichungen der Noxa-Expression innerhalb einzelner Verdünnungen von der definierten Kategorie sind grau unterlegt. Tumor 3 war bei der Verdünnung von 1:1000 nicht auswertbar.

Melanom	Mcl-1-positive Tumorzellen [%]			
	1:500	1:1000	1:2000	Mittelwert
1	60 (+)	60 (+)	10(-)	43,3 (+)
2	45 (+)	10(-)	60 (+)	38,3 (+)
3	10 (-)	---	10 (-)	10 (-)



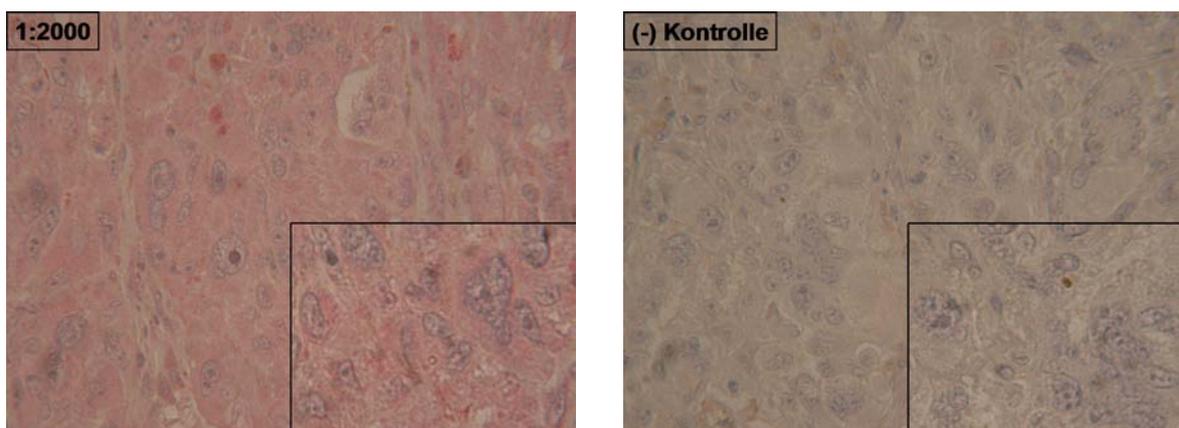


Abbildung 3.11.2 Verdünnungsreihe mit Anti-Noxa-Antikörper #2437 in der Immunhistologie

Es wurden in der Verdünnungsreihe die Verdünnungen des primären Antikörpers 1:500, 1:1000 und 1:2000 bei drei Melanomen getestet, von denen hier exemplarisch ein Tumor dargestellt ist. Die Farbintensität nahm mit zunehmender Verdünnung ab. Die Negativkontrolle erfolgte ohne Primärantikörper und wies keine Färbung auf.

3.12 Noxa-Expression in Primärtumoren und Metastasen

3.12.1 Verlust von Noxa in korrespondierenden Metastasen

Die Expression von Noxa wurde bei jeweils 20 Schnitten von Primärtumoren und Metastasen immunhistologisch untersucht. Zwei Metastasen waren nicht auswertbar. Primärtumore wiesen nur in 5 von 20 Fällen (25%), Metastasen in 2 von 18 Fällen (11%) eine deutliche Noxa-Expression auf (Tabelle 3.12.1). Der Median positiver Tumorzellen betrug sowohl bei Primärtumoren als auch Metastasen 5%.

Der Vergleich der Noxa-Expression in 18 Pärchen von Primärtumor und korrespondierender Metastase zeigte in 4 von 16 Fällen (25%) einen deutlichen Verlust von Noxa (Abbildungen 3.12.1, 3.12.2). Der Verlust erwies sich als Tendenz ($p = 0,08$). Es fand sich in keinem Fall eine Heraufregulation von Noxa in Metastasen. Die Mehrheit der Pärchen, 12 von 16 Tumore (75%), zeigte keine Änderung der Expression.

Tabelle 3.12.1 Expression von Noxa in Primärtumoren und Metastasen

Es sind die Auswertungsergebnisse der immunhistologischen Überprüfung der Noxa-Expression in 20 Primärtumoren (Pt) und Metastasen (Met) dargestellt. Zwei Metastasen (Q, T) waren nicht auswertbar.

Patient (Pt)	Tumorzellen mit Farbintensität [%]		
	stark	mittel	Schwach
A	5	32,5	62,5

Patient (Met)	Tumorzellen mit Farbintensität [%]		
	stark	mittel	Schwach
A	0	5	95

B	0	15	85
C	0	0	100
D	0	32,5	67,5
E	0	0	100
F	0	0	100
G	5	30	65
H	0	5	95
I	0	0	100
J	0	35	65
K	0	5	95
L	0	5	95
M	0	7,5	92,5
N	0	35	65
O	0	5	95
P	0	0	100
Q	0	5	95
R1	0	5	95
S1	0	5	95
T	0	2,5	97,5
Median der positiven Tumorzellen: 5%			

B	0	12,5	87,5
C	0	5	95
D	0	32,5	67,5
E	0	5	95
F	0	0	100
G	0	5	95
H	0	0	100
I	0	0	100
J	0	0	100
K	0	0	100
L	0	7,5	92,5
M	0	0	100
N	0	2,5	97,5
O	0	5	95
P	0	5	95
Q	---	---	---
R2	0	7,5	92,5
S2	0	30	70
T	---	---	---
Median der positiven Tumorzellen: 5%			

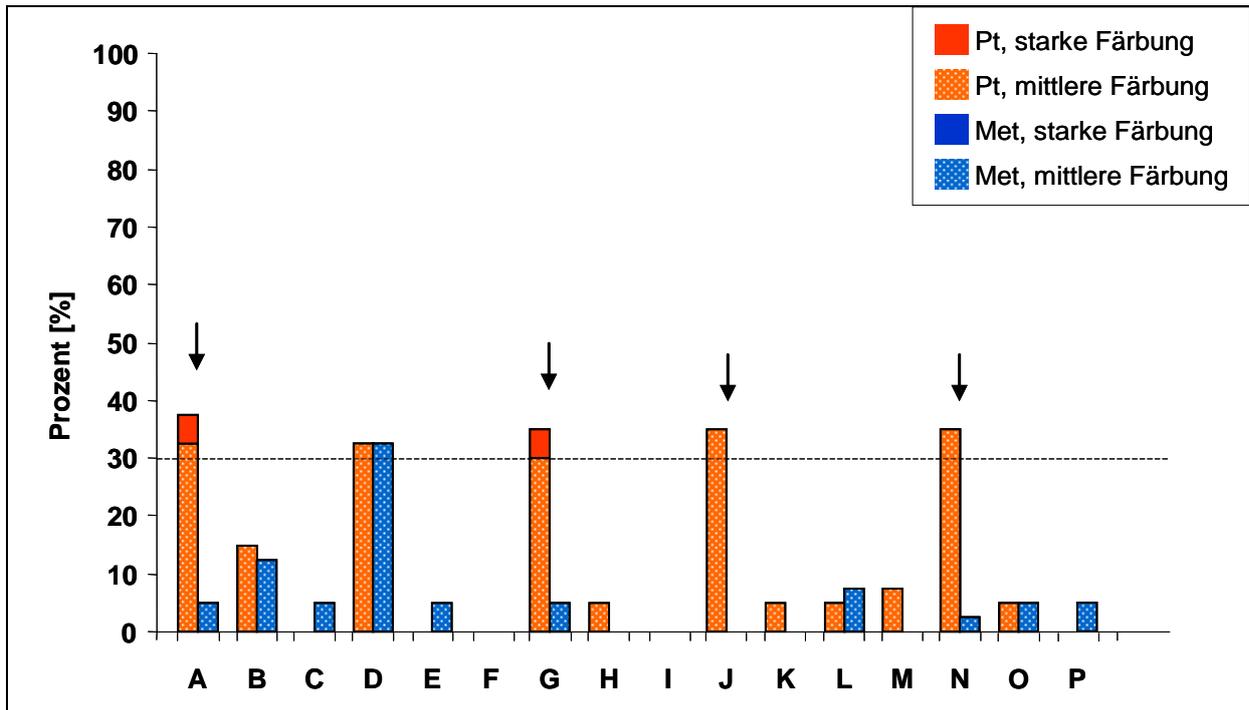


Abbildung 3.12.1 Verlust von Noxa in korrespondierenden Metastasen

Es ist die Expression von Noxa in sechzehn Tumorpärchen dargestellt (Patienten: A-P). Es fand sich verglichen mit Primärtumoren (Pt) in vier Metastasen (Met) ein deutlicher Verlust der Noxa-Expression (Pfeile). Die übrigen Pärchen (75%) zeigten keine Änderung der Expression.

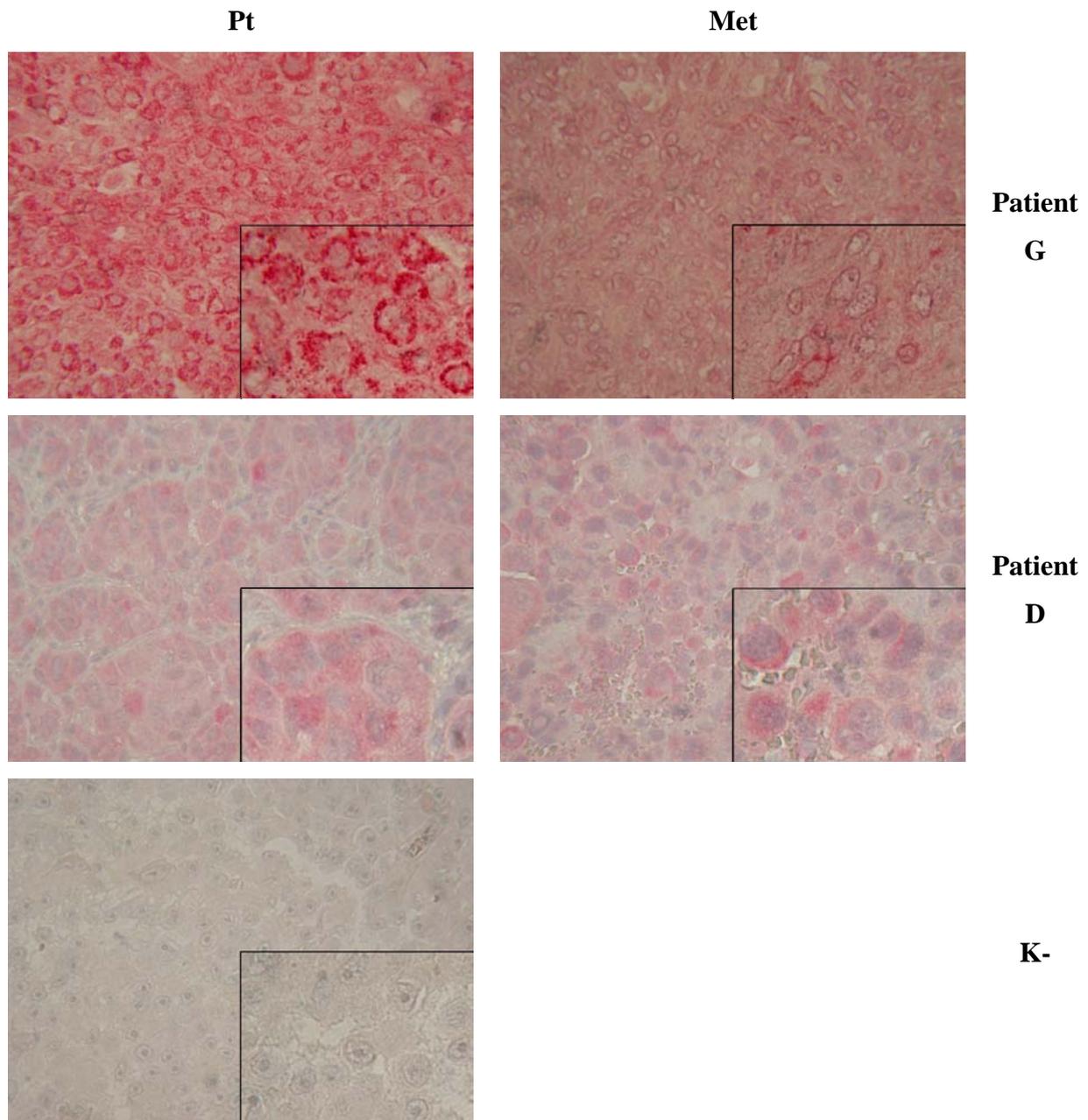


Abbildung 3.12.2 Noxa-Expression in der immunhistologischen Färbung

Es ist jeweils ein Beispiel für die Herabregulation (Patient G) und die unveränderte Expression von Noxa (Patient D) in korrespondierenden Metastasen verglichen zum Primärtumor dargestellt. Beide dargestellten Primärtumore waren insgesamt Noxa-positiv, es fand sich jedoch bei Patient G (starke Farbintensität) verglichen zu Patient D (mittelgradige Farbintensität) eine höhere Expression. Die Negativkontrolle (K-) wies keine Färbung auf.

3.12.2 Verlust von Noxa in korrespondierenden Metastasen weiblicher Patienten

Es wurde die Noxa-Expression in jeweils 10 Primärtumoren und Metastasen von Männern und Frauen untersucht. In beiden Gruppen war jeweils eine Metastase nicht auswertbar. Bei Primärtumoren von Männern zeigte sich in 2 von 10 Fällen (20%), von Frauen in 3 von 10

Fällen (30%) eine deutliche Expression von Noxa. Bei Metastasen von Männern wiesen nur 2 von 9 Tumoren (22%) eine Noxa-Expression auf. Der Median positiver Tumorzellen lag bei Primärtumoren von Männern bei 5%, von Frauen bei 6%. Bei Metastasen von Männern betrug er 5%, von Frauen dagegen 0%. Dieser Unterschied erwies sich als Tendenz ($p = 0,06$).

Der Vergleich der Noxa-Expression bei sechzehn Pärchen von Primärtumor und korrespondierender Metastase zeigte einen Verlust in nur einem Tumor von Männern (14%) aber in 3 von 9 Metastasen (33%) von Frauen (Abbildung 3.12.3). Der Verlust von Noxa in Metastasen von Frauen erwies sich als Tendenz ($p = 0,09$). Die übrigen Pärchen zeigten keine Änderung der Noxa-Expression.

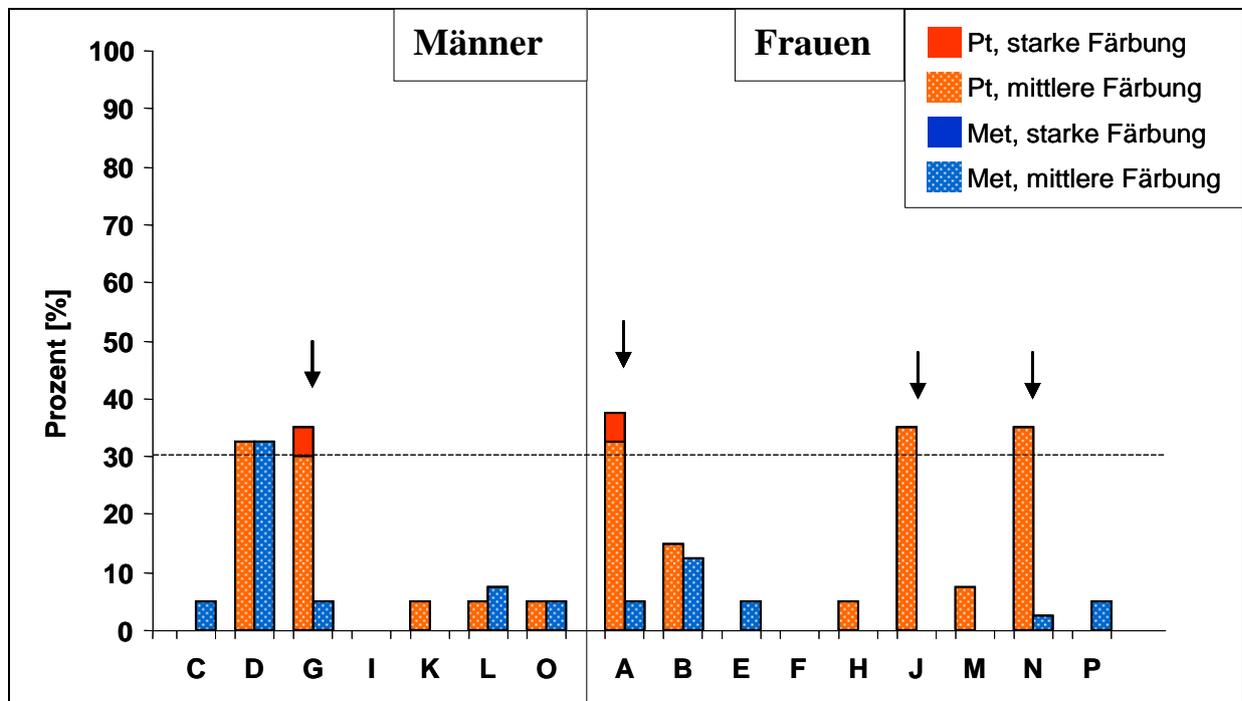


Abbildung 3.12.3 Verlust von Noxa in korrespondierenden Metastasen von Frauen
 Es ist die Expression von Noxa in 16 korrespondierenden Tumorpärchen (Patienten: A-P) sortiert nach Geschlecht dargestellt. Bei Frauen fand sich ein tendenzieller Verlust von Noxa in Metastasen (Pfeile).

3.12.3 Mäßiger Verlust von Noxa in korrespondierenden Metastasen dickerer Primärtumore (T3/T4)

Es wurde die Noxa-Expression in 20 Primärtumoren und 18 Metastasen in Verbindung mit der Tumordicke untersucht. Die Schnitte wurden entsprechend der Tumordicke des Primärtumors in die Gruppen T1-T4 eingeteilt. In dünnen Primärtumoren (T1) zeigte sich keine Noxa-Expression. In Gruppe T2 fand sich in 1 von 4 Fällen (25%), in T3 in 2 von 8 Fällen (25%) eine deutliche

Noxa-Expression. Bei dicken Primärtumoren (T3) waren 2 von 5 Tumoren (40%) positiv. Bei Metastasen fand sich in T1 und T4 kein positiver Tumor, in T2 und T3 war jeweils ein Tumor Noxa-positiv (25% beziehungsweise 17%). Der Median positiver Tumorzellen lag bei dünnen Primärtumoren (T1) bei 0%, in Gruppe T2 bei 6%, in T3 und T4 jeweils bei 5%. Bei Metastasen lag der Median in T1, T3 und T4 bei jeweils 5%, in Gruppe T2 bei 4%.

Der direkte Vergleich der sechzehn Pärchen zeigte bei dünneren Tumoren (T1/T2) in nur einem Fall (20%) einen Verlust von Noxa in Metastasen, bei dickeren Tumoren (T3/T4) in 3 von 11 Fällen (27%; Abbildung 3.12.4). Der Verlust von Noxa in dickeren Tumoren war nicht signifikant ($p = 0,13$). Die übrigen Pärchen zeigten keine Änderung der Noxa-Expression.

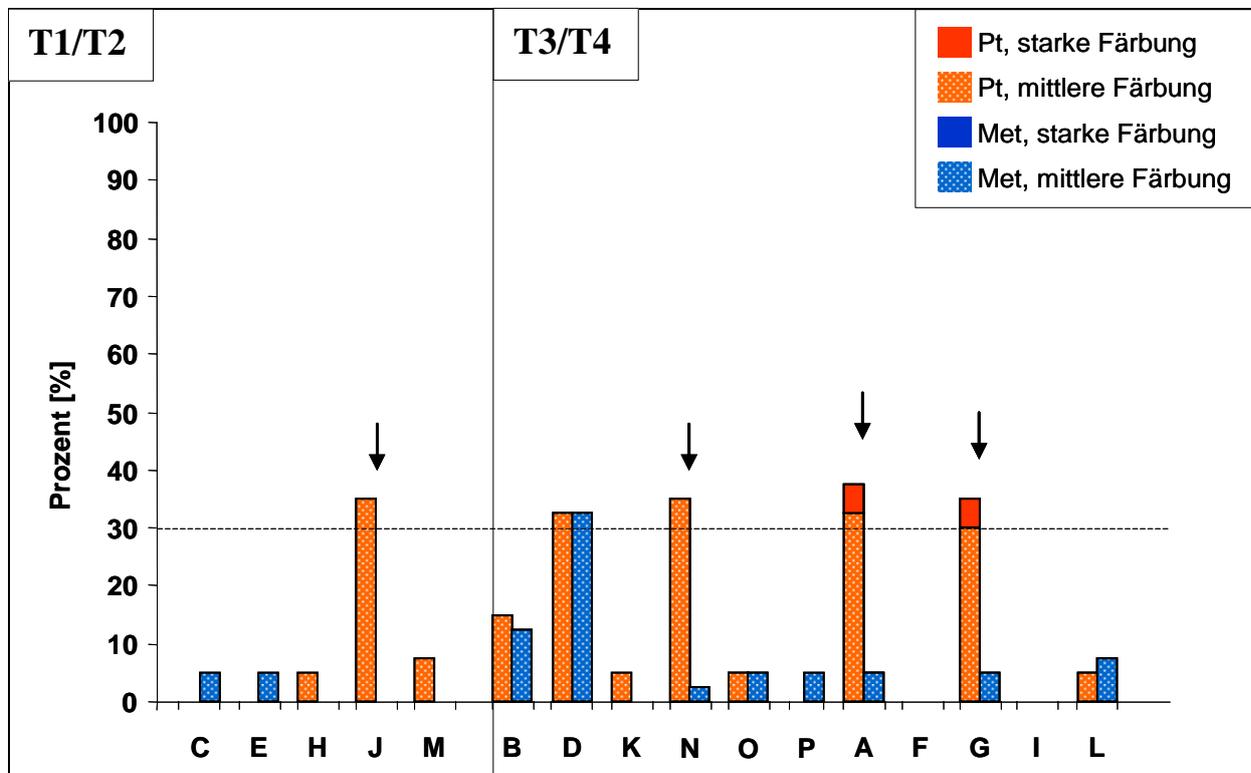


Abbildung 3.12.4 Mäßiger Verlust von Noxa in korrespondierenden Metastasen dickerer Primärtumore (T3/T4)

Es ist die Expression von Noxa in 16 korrespondierenden Tumorpärchen (Patienten: A-P) sortiert entsprechend der Tumordicke des Primärtumors (T1-T4) dargestellt. Dickere Tumoren (T3/T4) wiesen einen relativ häufigen Verlust von Noxa in Metastasen auf (Pfeile).

3.12.4 Häufiger Verlust von Noxa in korrespondierenden Metastasen von Primärtumoren mit Clark-Level IV/V

Es wurde die Noxa-Expression in 20 Primärtumoren und 18 Metastasen abhängig vom Clark-Level überprüft. Zunächst erfolgte die Einteilung der Schnitte in entsprechende Gruppen. Bei

Primärtumoren mit Clark-Level III fand sich in 1 von 5 Fällen (20%) und mit Level IV in 3 von 14 Fällen (21%) eine deutliche Noxa-Expression. Auch der Primärtumor in Gruppe V war Noxa-positiv. Der Median positiver Tumorzellen lag in den Gruppen III und IV jeweils bei 5%, in Gruppe V bei 38%. Die Unterschiede waren nicht signifikant ($p = 0,27$).

Bei Metastasen fand sich in Gruppe III in 1 von 5 Fällen (20%) und in Gruppe IV in 1 von 12 Fällen (8%) eine deutliche Expression von Noxa. Die Metastase in Gruppe V war Noxa-negativ. Der Median positiver Tumorzellen lag bei den Metastasen aller Gruppen bei 5%.

Der direkte Vergleich der sechzehn Pärchen zeigte in keinem der Tumore mit geringen Invasionstiefen (Gruppe III) eine Änderung der Noxa-Expression (Abbildung 3.12.5). In Tumoren mit größeren Invasionstiefen (Gruppen IV, V) fand sich in 4 von 12 Fällen (33%) ein Verlust von Noxa in Metastasen. Dieser Unterschied war statistisch nicht signifikant ($p = 0,10$). Die übrigen Pärchen wiesen keine Änderung der Expression auf.

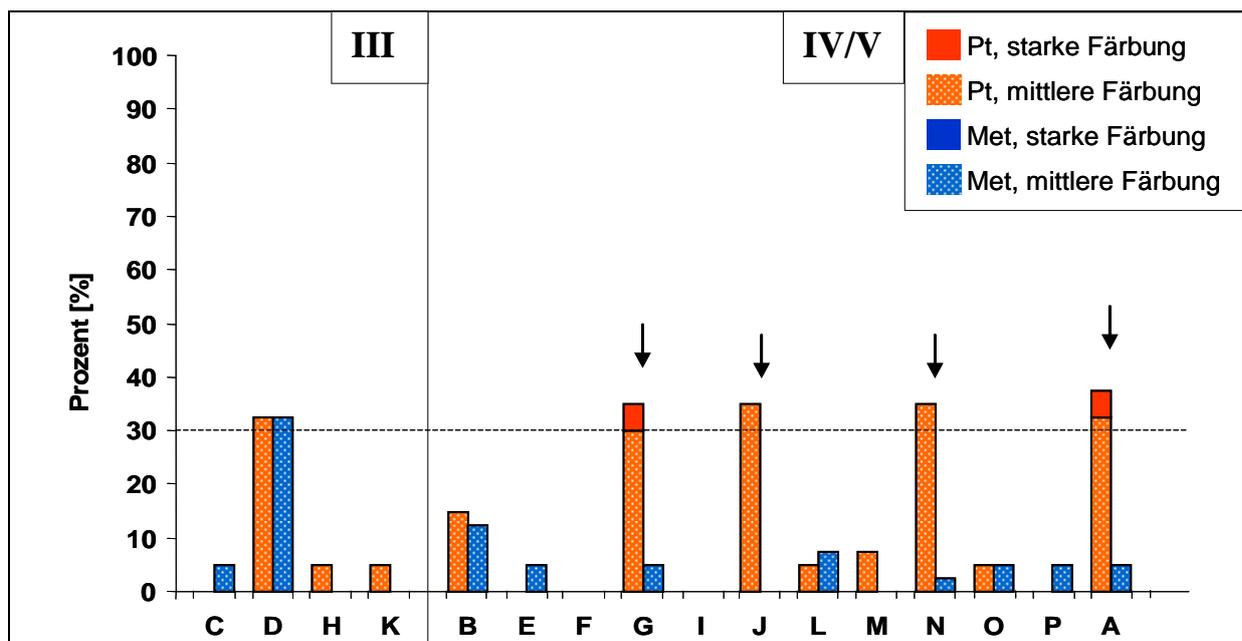


Abbildung 3.12.5

Häufiger Verlust von Noxa in korrespondierenden Metastasen von Primärtumoren mit Clark-Level IV/V

Dargestellt ist die Expression von Noxa in 16 korrespondierenden Tumorpärchen (Patienten: A-P) sortiert entsprechend Clark-Level des Primärtumors (Pt; T1-T4). Es zeigte sich bei größerer Invasionstiefe des Primärtumors (Gruppen IV, V) ein relativ häufiger Verlust von Noxa in korrespondierenden Metastasen (Pfeile).

3.12.5 Häufiger Verlust von Noxa in korrespondierenden Metastasen ulzerierter Primärtumore

Es wurde die Expression von Noxa in 20 Primärtumoren und 18 Metastasen in Verbindung mit dem Ulzerationsgrad untersucht. Bei Primärtumoren ohne Ulzeration fand sich in 2 von 11 Fällen (18%), bei ulzerierten Primärtumoren in 3 von 5 Fällen (60%) eine deutliche Noxa-Expression. Der Median positiver Tumorzellen lag bei den nicht-ulzerierten Tumoren bei 5% und bei den ulzerierten Tumoren bei 35%. Dieser Unterschied waren nicht signifikant ($p = 0,2$). Bei Metastasen nicht-ulzerierter Primärtumore zeigte sich in 2 von 10 Fällen (20%) eine deutliche Noxa-Expression, während keine Metastase von ulzerierten Primärtumoren Noxa exprimierte. Der Median positiver Tumorzellen betrug bei Metastasen nicht-ulzerierter Tumore 0% und bei Metastasen ulzerierter Primärtumore 5%. Dieser Unterschied war nicht signifikant ($p = 0,31$).

Der direkte Vergleich von dreizehn Pärchen zeigte bei den nicht-ulzerierten Tumoren in einer Metastase (13%) einen Verlust der Noxa-Expression, während sich bei den ulzerierten Tumoren in 3 von 5 Metastasen (60%) eine Herabregulation fand (Abb. 3.12.6). Die Unterschiede der Noxa-Expression zwischen Primärtumoren und korrespondierenden Metastasen ulzerierter Tumore waren aufgrund des geringen Stichprobenumfangs nicht signifikant ($p = 0,23$).

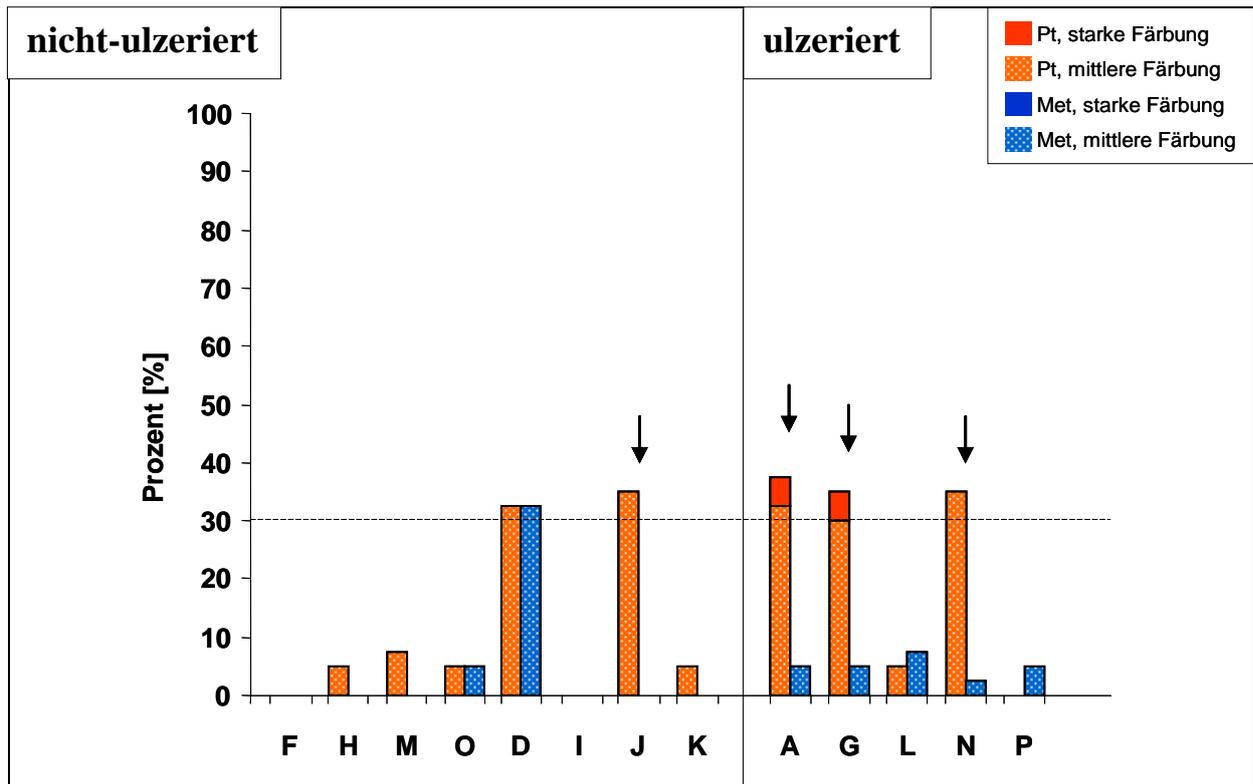


Abbildung 3.12.6 Häufiger Verlust von Noxa in korrespondierenden Metastasen ulzerierter Primärtumore

Es ist die Expression von Noxa in dreizehn korrespondierenden Tumorpärchen (Patienten: A, D, F-P) sortiert entsprechend Ulzerationsgrad des Primärtumors (nicht-ulzeriert/ulzeriert) dargestellt. Tumore mit Ulzeration zeigten einen relativ häufigen Verlust von Noxa in Metastasen (Pfeile).

4. Diskussion

Das maligne Melanom der Haut ist eine aggressive Tumorentität mit weltweit steigender Inzidenz, hochgradiger Therapieresistenz und schlechter Prognose nach Metastasierung. Es konnte gezeigt werden, dass die Prognose mit verschiedenen Parametern wie dem Geschlecht, der Tumordicke, der Invasionstiefe oder dem Ulzerationsgrad assoziiert ist [de Vries et al, 2008; Breslow, 1970; Clark et al, 1969; Balch et al, 2001]. Um auch auf molekularer Ebene aussagekräftige prognostische Marker zu identifizieren, wurden unter anderem Proteine der Zellzyklus-Regulation wie p16, p21 oder Cyklin-D untersucht [Straume et al, 2000; Tchernev, Orfanos, 2007; Georgieva et al, 2001]. Trotz der Bemühungen konnten bisher keine zuverlässigen prognostischen Marker mit ausreichend hoher Aussagekraft identifiziert werden. Ursachen hierfür sind möglicherweise Unterschiede zwischen den Subtypen des malignen Melanoms oder Änderungen der Gen- beziehungsweise Protein-Expression im Verlauf der Tumorprogression. Daher ist ein genaues Verständnis der molekularen Ursachen von Tumorgenese und –progression eine wichtige Voraussetzung zur Identifizierung neuer prognostischer Marker und zur Entwicklung wirksamer Therapien für das maligne Melanom.

Ein wesentliches Merkmal des metastasierten malignen Melanoms ist seine Resistenz gegenüber herkömmlichen therapeutischen Strategien, wie beispielsweise der Chemotherapie. Die Resistenz kommt häufig dadurch zustande, dass ein wichtiges physiologisches Mittel der Zellelimination, die Apoptose, nur unzureichend funktioniert und sich so eine Apoptoseresistenz bei Melanomzellen ausbildet. Für die Ausbildung der Apoptoseresistenz sind Defekte bei extrinsischen und intrinsischen (mitochondrialen) Signalkaskaden von Bedeutung. Die Proteine der Bcl-2-Superfamilie, welche wichtige Regulatoren der mitochondrialen Apoptosewege darstellen, spielen für die Apoptoseresistenz des malignen Melanoms eine wichtige Rolle. Die Ausbildung einer Apoptoseresistenz wird unter anderem durch eine Dysbalance zwischen pro- und antiapoptotischen Mitgliedern dieser Proteinfamilie verursacht [Eberle et al, 2007]. Daher ist eine genaue Charakterisierung der molekularen Vorgänge bezüglich der Bcl-2-Proteine von großer Bedeutung für das Verständnis der Genese und Progression des malignen Melanoms. Gleichzeitig könnten Proteine dieser Familie zukünftig möglicherweise auch als aussagekräftige prognostische Marker dienen.

Bisherige Studien konnten bereits durch vergleichende Untersuchungen von gutartigen melanozytären Veränderungen, primären Melanomen und Metastasen zu einem besseren Verständnis der Bedeutung von Bcl-2-Proteinen für Tumorgenese und –progression beitragen [Tang et al, 1998; Karst et al, 2005, van den Oord et al, 1994]. Die untersuchten Kollektive stammten dabei meist von unterschiedlichen Patienten, sodass Änderungen der Expression von Bcl-2-Proteinen im Zuge der Tumorprogression erfaßt werden konnten. Allerdings konnte bisher nicht geklärt werden, in wie weit eine Dysbalance zwischen pro- und antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen selbst ursächlich für eine Progression des malignen Melanoms sein könnte. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit die Expression ausgewählter Bcl-2-Proteine in Primärtumoren und Metastasen desselben Patienten immunhistologisch untersucht, um deren Bedeutung für die Progression des malignen Melanoms genauer zu charakterisieren.

4.1 Bedeutung antiapoptotischer Bcl-2-Proteine für die Progression des malignen Melanoms

4.1.1 Bcl-2-Expression und Progression

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Bcl-2-Expression in primären malignen Melanomen und Metastasen desselben Patienten untersucht. Die meisten Primärtumore wiesen eine deutliche Bcl-2-Expression auf, in Metastasen war diese dagegen wesentlich seltener. Auch beim direkten Vergleich fand sich ein häufiger Verlust von Bcl-2 in Metastasen. Die Untersuchungen zeigten einen Verlust von Bcl-2 im Zusammenhang mit Tumorprogression. Die Beobachtungen befinden sich in Übereinstimmung mit Arbeiten anderer Arbeitsgruppen [van den Oord et al, 1994; Ramsay et al, 1995]. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen konnte jedoch auch bereits eine erhöhte Bcl-2-Expression in Metastasen gezeigt werden [Leiter et al 2000].

Es ist bekannt, dass Männer trotz niedrigerer Inzidenz eine schlechtere Prognose beim malignen Melanom besitzen [de Vries et al, 2008]. Bei den hier vorgestellten Untersuchungen fand sich in korrespondierenden Metastasen von Männern, nicht aber von Frauen, ein Verlust von Bcl-2. Es könnten also bei Männern andere Mechanismen von Bedeutung sein, die trotz verringerter Bcl-2-Expression eine Förderung der Tumorprogression bewirken.

Ein wichtiger prognostischer Marker beim malignen Melanom in der Klinik ist die Tumordicke nach Breslow, da sich mit deren Zunahme die Metastasierungswahrscheinlichkeit des malignen Melanoms erhöht. In der vorliegenden Arbeit fand sich insbesondere in Tumoren mit einer Tumordicke von mehr als 2 mm ein Verlust von Bcl-2 in korrespondierenden Metastasen. Diese Beobachtung befindet sich in gewisser Übereinstimmung mit einer Arbeit von Zhuang et al, bei der ein mit zunehmender Tumordicke und –progression einhergehender Verlust von Bcl-2 gefunden wurde [Zhuang et al, 2007]. In der hier vorgelegten Arbeit fand sich zudem eine verminderte Bcl-2-Expression in dünnen Primärtumoren (Tumordicke < 1 mm). Dieses Ergebnis ist jedoch nur mit einem relativ kleinen Stichprobenumfang belegt.

Der Clark-Level besitzt einen von anderen prognostischen Markern unabhängigen signifikanten Vorhersagewert [Marghoob et al, 2000]. Im Rahmen dieser Arbeit fand sich in korrespondierenden Metastasen von Primärtumoren mit Clark-Level III ein häufiger Verlust von Bcl-2 sowie eine erhöhte Bcl-2-Expression in Metastasen von Primärtumoren mit Clark-Level IV. Diese Ergebnisse könnten vielleicht auf eine verstärkte Bcl-2-Expression in Metastasen mit steigendem Clark-Level hindeuten. Höhere Bcl-2-Expression könnte die Metastasierung von Tumorzellen mit größerer Tiefenausdehnung begünstigen. Da die bisherigen Beobachtungen in Verbindung mit der Tumordicke nach Breslow eher einen Bcl-2-Verlust in Zusammenhang mit verschlechterter Prognose zeigten, ist eine Bestimmung des Clark-Levels möglicherweise insbesondere bei dünneren Melanomen mit deutlicher Tiefeninvasion sinnvoll. Im Rahmen dieser Arbeit wurde aufgrund fehlender Stichproben keine Begutachtung von Tumoren mit Clark-Level I und II durchgeführt. Zukünftige Untersuchungen könnten eine genauere Aussage zum Zusammenhang zwischen Bcl-2-Expression und Clark-Level ermöglichen.

Einen weiteren wichtigen prognostischen Marker stellt der Ulzerationsgrad des Primärtumors dar, da ulzerierte Primärtumore eine höhere Metastasierungswahrscheinlichkeit besitzen [Balch et al, 2001]. Die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit zeigten einen Verlust von Bcl-2 in korrespondierenden Metastasen ulzerierter Tumore. Die schlechtere Prognose ulzerierter Primärtumore scheint mit einem Verlust von Bcl-2 einherzugehen. Andere Proteine der Bcl-2-Familie oder Signalkaskaden jenseits des mitochondrialen Signalwegs könnten einen die Progression fördernden Einfluß besitzen und die Metastasierung trotz verringerter Bcl-2-Expression ermöglichen.

4.1.2 Mcl-1-Expression und Progression

Die Mcl-1-Expression erwies sich bei den Untersuchungen in dieser Arbeit als relativ kontinuierlich. Es zeigten sich insgesamt nur geringe Unterschiede zwischen Primärtumoren und Metastasen. Dennoch fand sich im direkten Vergleich der korrespondierenden Pärchen eine Verminderung von Mcl-1 bei der überwiegenden Zahl der Metastasen. Auch in der Arbeit von Wong et al wurde, verglichen zu dysplastischen Nävi, eine reduzierte Mcl-1-Expression in Metastasen gefunden [Wong et al, 2008]. Dagegen fand sich in der Arbeit von Tang et al eine verstärkte Mcl-1-Expression bei Tumorprogression [Tang et al, 1998]. Da bei unterschiedlichen Tumorentitäten in vorherigen Untersuchungen eine erhöhte Mcl-1-Expression gefunden wurde [Wuillème-Toumi et al, 2005; Sano et al, 2005], könnte die in dieser Arbeit beobachtete Verminderung von Mcl-1 in Metastasen auf eine Rolle dieses Proteins bei der Tumorgenese und weniger der Progression hindeuten.

Die Betrachtung der Mcl-1-Expression in Abhängigkeit vom Geschlecht zeigte bei Männern einen Verlust in korrespondierenden Metastasen. Die Mcl-1-Expression hat somit bei der Untersuchung Parallelen zur Bcl-2-Expression aufgewiesen. Die Untersuchungen deuten darauf hin, dass es bei Männern zu einem generellen Verlust antiapoptotischer Bcl-2-Proteine in Zusammenhang mit Tumorprogression kommen könnte.

Auch bei der Betrachtung der Mcl-1-Expression in Abhängigkeit von der Tumordicke fanden sich Parallelen zu Bcl-2. Es zeigte sich ein Verlust von Mcl-1 in korrespondierenden Metastasen von Tumoren mit einer Dicke von mehr als 2 mm. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen konnte jedoch auch bei dickeren Melanomen eine verglichen mit dünneren Tumoren erhöhte Mcl-1-Expression gezeigt werden [Zhuang et al, 2007]. Möglicherweise verhalten sich in bezug auf die Mcl-1-Expression nicht alle dicken Tumore identisch, sondern unterscheiden sich beispielsweise in Abhängigkeit vom Subtyp oder der Konstellation anderer molekularer Parameter.

Die Untersuchungen der Mcl-1-Expression in bezug auf den Clark-Level ergaben keinen Zusammenhang. Es fand sich in keiner der betrachteten Untergruppen (III-V) eine Änderung der Expression in korrespondierenden Metastasen verglichen zu Primärtumoren. Im Gegensatz zum Bcl-2-Protein, das eher eine Heraufregulierung mit höherem Clark-Level aufwies, könnte Mcl-1 daher eine geringe Bedeutung für die Metastasierung von Tumorzellen mit deutlicher Tiefeninvasion besitzen.

Auch in Abhängigkeit vom Ulzerationsgrad fanden sich keine Unterschiede zwischen der Mcl-1-Expression in Primärtumoren und korrespondierenden Metastasen. Im Gegensatz zu Bcl-2 scheint ein Verlust von Mcl-1 nicht mit einer Ulzeration einherzugehen.

Insgesamt zeigten die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit einen häufigen Verlust der antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und Mcl-1 in Metastasen in Zusammenhang mit ungünstigen Konstellationen bei prognostischen Markern. Diese Beobachtung widerspricht der ursprünglichen Vorstellung, dass eine Erhöhung antiapoptotischer Proteine mit Tumorprogression einhergeht. Die Ursachen für eine Tumorprogression trotz geringer Expression antiapoptotischer Bcl-2-Proteine sind bisher noch weitgehend ungeklärt und weitere Untersuchungen sollten zukünftig durchgeführt werden, um ein genaueres Verständnis der molekularen Mechanismen von Tumorgenese und –progression zu erlangen. Von Wichtigkeit sind hierbei möglicherweise insbesondere Apoptosemechanismen jenseits des mitochondrialen Signalweges, die Bedeutung des Immunsystems für Tumorgenese und –progression sowie Interaktionen von Tumorzellen mit umliegendem Gewebe [Ruiter et al, 2002].

4.2 Antiapoptotische Bcl-2-Proteine in der Tumorthherapie

Beobachtungen, die darauf hindeuteten, dass eine erhöhte Bcl-2-Expression in primären Tumoren mit Progression vergesellschaftet sein kann [Hernberg et al, 1998], führten zu Substanzen, welche die antiapoptotischen Proteine dieser Familie antagonisieren können, den Antisense-Oligonukleotiden. Bei diesen Substanzen handelt es sich um chemisch synthetisierte, aufgereinigte Sequenzen von Einzelstrang-DNA, welche komplementär zu spezifischen Regionen der mRNA sind und auf diese Weise eine Expression von Genen antiapoptotischer Bcl-2-Proteine hemmen können [Jansen et al, 2000].

Sowohl *in vitro* als auch bei Tierversuchen an SCID-Mäusen (englisch: *Severe combined immunodeficient mice*) konnte unter Einsatz eines Bcl-2-Antisense-Oligonukleotids eine signifikante Induktion der Apoptose in Melanom-Zellen ausgelöst und eine Sensibilisierung für die Behandlung mit DTIC (Dacarbazin) beobachtet werden [Jansen et al, 1998]. In einer groß angelegten Phase-III-Studie mit Melanom-Patienten in fortgeschrittenen Stadium hatte der Einsatz des Antisense-Oligonukleotides Oblimersen einen die Prognose des Patienten verbessernden Effekt, welcher sich allerdings hauptsächlich auf Patienten ohne erhöhtes

Serum-LDH beschränkte [Bedikian et al, 2006]. Unter Einsatz von Mcl-1-Antisense-Oligonukleotiden konnte *in vitro* eine positive Beeinflussung der Chemoresistenz und im Mausmodell eine verstärkte Apoptose bei Melanomzellen gezeigt werden [Thallinger et al, 2003; Nguyen et al, 2007]. Trotz dieser zunächst vielversprechenden Ergebnisse konnte die Überlebensrate bei Patienten mit metastasierten malignen Melanomen bisher nicht wesentlich verbessert werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten einen Verlust von Bcl-2 und zum großen Teil auch von Mcl-1 im Zuge der Metastasierung. Der Verlust antiapoptotischer Proteine der Bcl-2-Superfamilie im Rahmen der Metastasierung könnte einen Grund für die teilweise nur geringe Wirksamkeit der Antisense-Oligonukleotide darstellen. Allerdings zeigten die Ergebnisse auch, dass zwischen der Expression der einzelnen Bcl-2-Proteine Unterschiede existieren. Zukünftig wäre es daher sinnvoll, diese Unterschiede weiter zu charakterisieren, damit antiapoptotische Bcl-2-Proteine zusammen mit den klinisch-prognostischen Parametern gezielt auch als molekulare Marker eingesetzt werden können, um Patienten für eine möglichst Tumor-spezifische Therapie auszuwählen.

4.3 Bedeutung proapoptotischer Bcl-2-Proteine für die Progression des malignen Melanoms

4.3.1 Bax-Expression und Progression

Es wurde in der Arbeit die Expression des proapoptotischen Bcl-2-Proteins Bax im Zusammenhang mit unterschiedlichen prognostischen Markern untersucht. Das gesamte Kollektiv zeigte in Primärtumoren eine deutliche Bax-Expression. Ein Großteil der Tumore regulierte das Antigen aber in den Metastasen herunter. Auch beim Vergleich mit benignen Hautveränderungen (Nävi) wurde in Primärtumoren bereits eine erhöhte Bax-Expression gefunden [Tang et al, 1998]. Es fand sich auch eine, mit Verlust von Bax einhergehende, verschlechterte Prognose für den Patienten [Fecker et al, 2006]. Die Beobachtungen deuten darauf hin, dass eine erhöhte Bax-Expression bei der Tumorgenese von Bedeutung sein und der Verlust die Progression fördern könnte.

Bei der Untersuchung der Bax-Expression in Abhängigkeit vom Geschlecht fand sich kein Zusammenhang. Weder bei Männern noch Frauen fand sich eine Änderung der Expression in korrespondierenden Metastasen. Das Bax-Protein scheint daher für die prognostischen

Unterschiede von Männern und Frauen beim malignen Melanom nicht direkt von Bedeutung zu sein.

Bei den Untersuchungen fand sich ein Zusammenhang zwischen Tumordicke und Bax-Expression. In dünnen Primärtumoren (Tumordicke < 1 mm) fand sich eine erniedrigte, in Metastasen dieser Gruppe dagegen eine erhöhte Bax-Expression. Außerdem zeigte die Pärchenanalyse bei Tumoren mit einer Dicke von mehr als 2 mm einen Verlust von Bax in korrespondierenden Metastasen. Die Ergebnisse zeigen Übereinstimmung mit Tierexperimenten, wo der Verlust von Bax mit vermehrter Tumorgenese und stärkerem Tumorwachstum assoziiert war [Shibata et al, 1999]. Der Verlust von Bax könnte eine Metastasierung dicker maligner Melanome begünstigen. Die Ergebnisse könnten eine Erklärung bieten für die Beobachtung, dass der Verlust von Bax mit verschlechterter Prognose für den Melanom-Patienten assoziiert ist [Fecker et al, 2006].

Bei den Untersuchungen zeigte sich ein häufiger Verlust von Bax in korrespondierenden Metastasen von Primärtumoren mit größeren Invasionstiefen (Clark-Level IV/V). Zusätzlich wiesen korrespondierende Metastasen von Primärtumoren mit Clark-Level III eine häufige Bax-Heraufregulation auf. Die Ergebnisse waren statistisch nicht signifikant; dennoch könnten sie auf einen Bax-Verlust mit zunehmendem Clark-Level hindeuten. In Verbindung mit der eher höheren Bcl-2-Expression könnte ein mit zunehmender Invasionstiefe überwiegender antiapoptotischer Reiz die Metastasierung des malignen Melanoms begünstigen. Die gleichzeitige Bestimmung von Bcl-2 und Bax könnte daher eine Aussage über die Prognose für Tumore mit deutlicher Tiefeninvasion ermöglichen.

Im Rahmen dieser Arbeit fand sich ein Verlust von Bax bei ulzerierten Tumoren. Der Verlust könnte die Metastasierung ulzerierter Tumore begünstigen.

4.3.2 Bak-Expression und Progression

Die Expression des proapoptotischen Bcl-2-Proteins Bak zeigte sich in den vorliegenden Untersuchungen in Primärtumoren und Metastasen als relativ konstant. Die überwiegende Zahl der untersuchten Tumore zeigte eine Bak-Expression, welche insgesamt allerdings relativ gering ausgeprägt war. Beim Vergleich der Tumorpärchen fand sich keine relevante Änderung. Eine geringe Expression von Bak könnte daher sowohl zur Genese als auch Progression des malignen Melanoms beitragen.

Unterschiede fanden sich bei der geschlechtsabhängigen Betrachtung. Während sich bei Männern ein deutlicher Verlust von Bak in korrespondierenden Metastasen zeigte, wiesen die Metastasen von Frauen häufig eine verglichen zum Primärtumor erhöhte Bak-Expression auf. Diese geschlechtsspezifischen Unterschiede könnten ein Hinweis auf Unterschiede in der Apoptoseregulation in malignen Melanomen von Männern und Frauen sein. Die Ergebnisse zeigen Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass ein Verlust von Bak mit einer verschlechterten Prognose assoziiert ist [Fecker et al, 2006].

Die Untersuchung in bezug auf die Tumordicke zeigte in dünnen Primärtumoren (Tumordicke < 1 mm) eine geringe Bak-Expression. Außerdem fand sich eher ein Bak-Verlust in korrespondierenden Metastasen von Primärtumoren mit einer Dicke von mehr als 2 mm. Diese Beobachtung könnten auf einen Verlust von Bak bei dickeren Tumoren hindeuten. Da auch bei Bax ein Verlust bei Tumoren mit einer Dicke von mehr als 2 mm gefunden wurde, zeigte sich in den Untersuchungen ein genereller Verlust proapoptotischer Multidomänen-Proteine der Bcl-2-Familie, welcher eine Erklärung für die schlechtere Prognose dicker Melanome bieten könnte.

Die Untersuchungen zeigten in Metastasen eine mit dem Clark-Level des Primärtumors zunehmende Bak-Expression. Außerdem fand sich mit zunehmendem Clark-Level eine häufige Steigerung der Bak-Expression in Metastasen verglichen zum Primärtumor. Eine Zunahme der Bak-Expression in Metastasen von Primärtumoren mit hoher Invasionstiefe könnte einem Selbstschutzmechanismus zur Tumorabwehr entsprechen. Dies scheint insbesondere vor dem Hintergrund des starken antiapoptotischen Reizes aufgrund des Anstiegs der Bcl-2-Expression und Verlustes von Bax von Bedeutung zu sein.

In korrespondierenden Metastasen ulzerierter Primärtumore zeigte sich häufig eine Zunahme der Bak-Expression. Nicht ulzerierte Tumore dagegen zeigten häufig einen Bak-Verlust. Eine Zunahme der Bak-Expression bei ulzerierten Tumoren könnte einem Mechanismus der Tumorabwehr entsprechen.

4.3.3 PUMA-Expression und Progression

Die Expression von PUMA, einem BH3-only-Protein der Bcl-2-Superfamilie, zeigte in Primärtumoren eine häufige Expression und einen Verlust in einem Großteil korrespondierender Metastasen. Auch Karst et al (2005) fand beim Vergleich von

dysplastischen Nävi, primären Melanomen und Metastasen eine mit Tumorgenese und – progression vergesellschaftete Abnahme der PUMA-Expression. Da PUMA als BH3-only-Protein aufgrund seiner Interaktion mit antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen proapoptotische Multidomänenproteine (beispielsweise Bax, Bak) indirekt beeinflusst, könnte ein PUMA-Verlust zu einer verminderten proapoptotischen Effektorfunktion der Multidomänenproteine beitragen und so die Tumorprogression fördern.

In der vorliegenden Arbeit fand sich in Metastasen von Männern eine deutlich geringere PUMA-Expression als in Metastasen weiblicher Patienten. Außerdem zeigte sich bei Männern ein häufiger Verlust von PUMA in Metastasen im Vergleich zu korrespondierenden Primärtumoren. Die Ergebnisse könnten darauf hindeuten, dass ein Verlust von PUMA die Progression des malignen Melanoms von Männern fördert und sich so prognostisch ungünstig auswirkt. Tumore mit einer Dicke von mehr als 2 mm zeigten ebenfalls einen häufigen Verlust von PUMA in korrespondierenden Metastasen. Der Verlust von PUMA könnte daher die Metastasierung dicker Melanome fördern.

Die Untersuchung zeigte bei Tumoren mit geringer Invasionstiefe (Clark-Level III) eher einen Verlust von PUMA in korrespondierenden Metastasen. Außerdem fand sich in Metastasen mit zunehmendem Clark-Level des Primärtumors eher eine Zunahme der PUMA-Expression. Eine mit der Invasionstiefe des Primärtumors zunehmende PUMA-Expression in Metastasen könnte einen Mechanismus der Tumorabwehr darstellen. Zukünftige Untersuchungen könnten Erklärungen dafür liefern, weshalb Melanome mit großen Invasionstiefen trotz erhöhter Expression proapoptotischer Proteine wie Bak oder PUMA eine Apoptoseresistenz aufweisen. Die Untersuchung der PUMA-Expression in Abhängigkeit vom Ulzerationsgrad zeigte keinen Zusammenhang. PUMA könnte daher bei der Metastasierung ulzerierter Tumore nur eine geringe Rolle spielen.

4.3.4 Noxa-Expression und Progression

Die Expression von Noxa, einem weiteren BH3-only-Protein der Bcl-2-Superfamilie, zeigte sowohl in Primärtumoren als auch Metastasen eine relativ geringe Expression. In der Pärchenanalyse fand sich darüber hinaus eher ein Verlust in korrespondierenden Metastasen. Die Ergebnisse könnten darauf hindeuten, dass eine geringe Expression von Noxa die

Tumorgenese beim malignen Melanom begünstigt durch zusätzlichen Verlust zur Progression beiträgt.

Noxa wies als einziges untersuchtes Bcl-2-Protein in der Pärchenanalyse einen relativ häufigen Verlust in den Metastasen von Frauen auf. Ein Verlust könnte daher die Metastasierung des malignen Melanoms von Frauen unterstützen. Bei Betrachtung der Tumordicke fand sich kein Zusammenhang zwischen Noxa-Expression und Progression. Allerdings trat ein Verlust von Noxa in korrespondierenden Metastasen überwiegend in Primärtumoren mit einer Tumordicke von mehr als 2 mm auf. Die Ergebnisse könnten darauf hindeuten, dass der Verlust von Noxa nur eine geringe Rolle bei der Metastasierung dicker Melanome spielt, bei einigen Tumoren aber zur Progression beiträgt.

Bei Tumoren mit größeren Invasionsstiefen (Clark-Level IV/V) fand sich eher ein Verlust von Noxa in korrespondierenden Metastasen. In Verbindung mit der eher zunehmenden Bcl-2-Expression und dem Verlust von Bax könnte ein Verlust von Noxa in bestimmten Tumoren die Metastasierung von Melanomen mit größerer Tiefeninvasion begünstigen. In ulzerierten Primärtumoren zeigten die Untersuchungen ebenfalls eher einen Verlust von Noxa in den korrespondierenden Metastasen. Ein Verlust des Noxa-Proteins könnte daher eine Metastasierung ulzerierter Melanome begünstigen.

Insgesamt zeigten die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit einen relativ häufigen Verlust proapoptotischer Bcl-2-Proteine im Zuge der Metastasierung maligner Melanome. Meistens ging eine ungünstige Konstellation prognostischer Marker mit dem Verlust einher, wobei der Clark-Level eine Ausnahme darstellte. Die Metastasierung vieler Melanome könnte durch einen generellen Verlust proapoptotischer Bcl-2-Proteine gefördert werden. Zukünftig könnte die Untersuchung der weitgehend noch unbekanntem Wirkmechanismen von BH3-only-Proteinen einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Interaktionen zwischen den unterschiedlichen Signalkaskaden der Apoptose liefern. Außerdem könnte die Betrachtung proapoptotischer Bcl-2-Proteine in Abhängigkeit vom Subtyp des malignen Melanoms zu einem tieferen Verständnis der Unterschiede auf molekularer Ebene führen und somit eine spezifische Tumorthherapie ermöglichen.

4.4 Proapoptotische Bcl-2-Proteine in der Tumorthherapie

Aufgrund des häufigen Verlustes proapoptotischer Bcl-2-Proteine im Zuge der Metastasierung des malignen Melanoms könnte in Zukunft der Einsatz von Substanzen, welche diesem Verlust entgegenwirken, eine Therapieoption darstellen. Bei der Suche nach entsprechenden Substanzen sind unterschiedliche Ansätze von Bedeutung: (1) BH3-only Mimetika und (2) Genterapie. Ein weiterer Ansatz könnte der Einsatz von Antisense-Nukleotiden bilden, um einer erhöhten Expression antiapoptotischer Bcl-2-Proteine entgegenzuwirken.

Insbesondere BH3-only Mimetika erscheinen zur Zeit vielversprechend. Hierbei handelt es sich um Moleküle, welche die Struktur der BH3-Domäne imitieren. Ein wichtiger Vertreter dieser neuen Substanzgruppe ist ABT-737. Neben Apoptoseinduktion wurde bei dieser Substanz zusätzlich in Kombination mit Protease-Inhibitoren wie Bortezomib ein additiver hemmender Effekt gefunden [Chauhan et al, 2007]. Zukünftig könnte die gezielte, Computerbasierte Entwicklung neuer, effektiver BH3-only Mimetika aufgrund der Bedeutung des mitochondrialen Signalweges der Apoptose eine zunehmende Rolle bei der Therapie des malignen Melanoms spielen.

Die Genterapie stellt einen weiteren Versuch dar, dem Verlust proapoptotischer Bcl-2-Proteine entgegenzuwirken. Dabei wird versucht, Tumorsuppressorgene, wie beispielsweise Bax, mittels viraler Vektoren in die Tumorzellen einzuschleusen und so die Expression proapoptotischer Proteine zu erhöhen. Untersuchungen deuten darauf hin, dass eine Therapie mittels viraler Vektoren die Apoptose bei Tumorzellen fördern [Huh WK et al, 2002] und die Effizienz anderer therapeutischer Maßnahmen wie Strahlentherapie erhöhen kann [Arafat et al, 2000]. Beim malignen Melanom konnte das proapoptotische Potential von Bcl-x_s und Bik/Nbk (englisch: *Bcl-2 interacting killer/naural born killer*) nach Überexpression gezeigt werden [Hossini et al, 2003; Oppermann et al, 2005].

4.5 Limitationen der Arbeit und Ursachen für Diskrepanzen mit Ergebnissen anderer Autoren

Stichproben: Die Ergebnisse dieser Arbeit sowie Diskrepanzen zu Beobachtungen anderer Autoren könnten durch die Auswahl der Stichproben beeinflusst worden sein. Im Gegensatz zu anderen Untersuchungen wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht voneinander unabhängige

Stichproben von Primärtumoren und Metastasen verwendet, sondern statt dessen Pärchen desselben Patienten ausgewählt. So konnte der Einfluß individueller Parameter auf die Protein-Expression in Primärtumoren und Metastasen verringert werden. Außerdem besteht die Möglichkeit, dass die verschiedenen Subtypen des malignen Melanoms unterschiedliche molekulare Eigenschaften besitzen und daher Diskrepanzen zu Ergebnissen anderer Autoren auftraten. Des weiteren könnte eine unterschiedliche Behandlung der Schnitte im Vorfeld (beispielsweise bei der Fixation) die Ergebnisse der immunhistologischen Färbung beeinflusst haben.

Auswertung der immunhistologischen Färbung: Die mikroskopische Auswertung einer immunhistologischen Färbung geschieht häufig durch Abschätzung oder Auszählung positiver Tumorzellen und beinhaltet damit eine stark subjektive Komponente. Gleichzeitig ist die Definition eines Tumors als Antigen-positiv oder -negativ nicht standardisiert, sodass unterschiedliche Ergebnisse bei anderen Autoren auch durch unterschiedliche Kriterien diesbezüglich zustande kommen konnten. In dieser Arbeit wurde durch exemplarische Zweitbegutachtung versucht, den subjektiven Charakter der Ergebnisse zu minimieren.

Antikörper: Im Rahmen dieser Arbeit wurde bei der Testung der Spezifität unterschiedlicher Antikörper deutlich, dass diese zum Teil sehr unterschiedlich sein kann. Die Auswahl des Antikörpers könnte daher ebenfalls Einfluß auf die Auswertungsergebnisse sowohl in dieser Arbeit als auch bei anderen Autoren genommen haben. Es wurde in dieser Arbeit mit Hilfe der Western-Blot-Analyse und Antikörpertestung in der Immunhistologie im Vorfeld versucht, eine möglichst hohe Spezifität des Antikörpers zu gewährleisten und das Protokoll der Immunhistologie (Verdünnung, Inkubationszeiten) optimal an die Eigenschaften des jeweiligen Antikörpers anzupassen.

Protokolle: Für die Immunhistologie existiert kein standardisiertes Protokoll. Oft werden Lösungen (beispielsweise für Antikörper), Inkubationszeiten oder einzelne Arbeitsschritte (beispielsweise Antigen-Retrieval) in Abhängigkeit vom Experimentator modifiziert. Dies kann Ergebnisse beeinflussen und ebenfalls Unterschiede dieser Arbeit zu anderen Autoren erklären. Im Rahmen dieser Arbeit wurde so weit wie möglich ein standardisiertes Protokoll verwendet, allerdings musste dieses auch aufgrund unterschiedlicher Antikörper-Eigenschaften teilweise modifiziert werden (Inkubationszeiten, Verdünnungen). Zusätzlich

geschah der Nachweis des Antigens nicht bei allen verschiedenen Autoren immunhistologisch, sondern teilweise auch mittels PCR auf Ebene der Genexpression, sodass Diskrepanzen zu anderen Autoren auch durch unterschiedliche Nachweisverfahren zustande gekommen sein könnten.

Statistik: Die statistische Aussagekraft ist unter anderem abhängig vom Stichprobenumfang. In der vorliegenden Arbeit war dieser mit je zwanzig Primärtumoren und Metastasen relativ gering, sodass teilweise bei Betrachtung der Untergruppen nur wenige Tumore zur Verfügung standen. Im Rahmen der statistischen Beratung wurden verschiedene Tests erörtert. Da bei kleinem Stichprobenumfang häufig eine Abweichung von der Normalverteilung vorliegt, wurden zur Auswertung primär nicht-parametrische Tests verwendet. Des Weiteren standen in dieser Arbeit für die statistische Bewertung der Pärchenanalyse lediglich Tests zur Verfügung, welche positive oder negative Abweichungen der Antigen-Expression berücksichtigen, nicht aber die Häufigkeiten. Daher kam es, insbesondere wenn einzelne Metastasen eine starke Abweichung aufwiesen, nicht zu statistisch signifikanten Ergebnissen. Untersuchungen mit größerem Stichprobenumfang würden sich daher in Zukunft eignen, um den statistischen Einfluß einzelner abweichender Tumore zu reduzieren und die Aussagekraft zu erhöhen.

4.6 Fazit

Aufgrund der großen Bedeutung des mitochondrialen Signalwegs der Apoptose für Tumorgenese, -progression und Therapieresistenz des malignen Melanoms könnte der Einsatz von Bcl-2 Antisense-Oligonukleotiden, BH3-only Mimetika und Gentherapie zukünftig eine wichtige Therapieoption darstellen. Anti- und proapoptische Proteine der Bcl-2-Superfamilie könnten als molekulare Marker helfen, geeignete Patienten für die unterschiedlichen Therapieoptionen auszuwählen.

In der vorliegenden Arbeit fand sich in Zusammenhang mit Metastasierung eher ein Verlust proapoptischer Bcl-2-Proteine, sodass zukünftig insbesondere der Einsatz gezielt entwickelter BH3-only Mimetika erfolgsversprechend zu sein scheint. Es wurde außerdem eher ein Verlust antiapoptischer Proteine in Zusammenhang mit einer Metastasierung gefunden, was eine Erklärung für die verhältnismäßig geringe klinische Wirksamkeit der Therapie mit Bcl-2 Antisense-Oligonukleotiden sein könnte. Die Kombination

verschiedener Therapeutika könnte zukünftig eine Möglichkeit bieten, der Apoptoseresistenz des malignen Melanoms wirksam zu begegnen.

In der vorliegenden Arbeit fanden sich bei Betrachtung unterschiedlicher Untergruppen, insbesondere bei der Tumordicke und dem Geschlecht, Unterschiede bei der Expression von Bcl-2-Proteinen zwischen Primärtumoren und Metastasen. Eine genaue Charakterisierung dieser Unterschiede unter Einbeziehung des Melanom-Subtyps könnte zukünftig die gezielte Therapie des malignen Melanoms abhängig von der Konstellation molekularer Parameter auf Ebene der anti- und proapoptischen Bcl-2-Proteinen ermöglichen.

5. Zusammenfassung

Das maligne Melanom der Haut ist eine aggressive Tumorentität mit weltweit steigender Inzidenz und relativ konstanter Mortalität. Es zeichnet sich insbesondere nach Metastasierung durch eine hochgradige Therapieresistenz und schlechte Prognose aus. Als therapeutische Optionen kommen heute insbesondere operative Verfahren, Chemotherapeutika (Dacarbazin, Fotemustin) und Zytokine (Interferon-alpha, Interleukin-2) in Betracht. Neuere Ansätze bieten sogenannte Antisense-Oligonukleotide, BH3-only-Mimetika oder Gentherapie. Von großer Bedeutung für die Progression und Therapieresistenz des malignen Melanoms ist dessen ausgeprägte Apoptoseresistenz.

Bei der Apoptose handelt es sich um eine genetisch determinierte, geordnet ablaufende Form des Zelltodes. Typische morphologische und biochemische Charakteristika konnten diesem programmierten Abbauprozess zugeordnet werden. Es werden heute im Wesentlichen zwei Apoptosewege unterschieden: die extrinsischen und die intrinsischen Signalkaskaden. Bei den extrinsischen Signalwegen spielen zur Aktivierung membranständige Todesrezeptoren eine zentrale Rolle. Intrinsische Signalwege werden primär durch intrazelluläre Signale infolge einer Zellschädigung, beispielsweise durch UV-Strahlung oder Chemotherapeutika, aktiviert. Bei den intrinsischen Signalkaskaden stehen mitochondriale Funktionen im Vordergrund. Als Effektormoleküle, welche letztendlich den apoptotischen Zelltod herbeiführen, fungieren bei beiden Apoptosewegen unterschiedliche Cystein-Aspartat-Proteasen, die Caspasen.

Die Apoptose unterliegt einer tiefen Regulation. Bei der Regulation intrinsischer Signalwege sind Proteine der Bcl-2-Superfamilie von besonderer Bedeutung. Die Familie besteht aus proapoptischen Proteinen, wie Bax, Bak, PUMA und Noxa und antiapoptischen Proteinen, wie Bcl-2 und Mcl-1. Erstere führen eher zu einer Förderung, Letztere zu einer Hemmung der Apoptose. In Abhängigkeit von der Gegenwart bestimmter Bcl-2-Homologiedomänen (BH 1-4) können die proapoptischen Proteine zusätzlich in Multidomänenproteine (Bax, Bak) und BH3-only Proteine (PUMA, Noxa) unterteilt werden. Bei der Regulation intrinsischer Signalwege ist die Expression fördernder und hemmender Bcl-2-Proteine insgesamt ausgeglichen. Eine Dysbalance trägt dagegen zur Apoptoseresistenz und Tumorprogression bei. Die Expression der Bcl-2-Proteine ist abhängig von unterschiedlichen Signalkaskaden, deren fehlerhafte Regulation regelmäßig in Tumoren zu

finden ist. Insbesondere Metastasen des malignen Melanoms sind durch eine ausgeprägte Therapieresistenz charakterisiert, die durch eine Blockade proapoptotischer Signalwege gekennzeichnet ist. Die Prognose des malignen Melanoms ist sowohl mit unterschiedlichen histologischen Parametern (Tumordicke, Invasionstiefe, Ulzeration) als auch mit nicht-histologischen Parametern (beispielsweise dem Geschlecht) assoziiert.

Für die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien ist es wichtig, neben diesen Parametern auch die molekularen Vorgänge im Rahmen der Tumorprogression zu verstehen. Ziel der Arbeit war es, die Bedeutung ausgewählter anti- und proapoptotischer Proteine der Bcl-2-Superfamilie für die Tumorprogression zu überprüfen, sowie das prognostische und therapeutische Potential dieser Proteine näher zu charakterisieren.

In dieser Arbeit wurde die Expression der Bcl-2-Proteine Bcl-2, Mcl-1, Bax, Bak, PUMA und Noxa in Metastasen untersucht und mit den korrespondierenden Primärtumoren desselben Patienten verglichen. Zwanzig primäre Melanome (nodulär / lentigo-maligna / akrolentiginös / superfiziell-spreitend / unklassifiziert: n = 2 / 2 / 2 / 13 / 1) und Metastasen wurden immunhistologisch untersucht (APAAP). Primäre Antikörper gegen Bcl-2, Mcl-1, Bax, Bak, PUMA und Noxa wurden verwendet und deren Spezifität mittels Western-Blot-Analyse geprüft. Zusätzlich wurde die Expression dieser Bcl-2-Proteine auf einen Zusammenhang mit den prognostischen Markern Geschlecht, Tumordicke, Invasionstiefe und Ulzerationsgrad hin untersucht.

Die mikroskopische Auswertung der Schnitte zeigte interessanterweise einen häufigen Verlust des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 und zum großen Teil auch von Mcl-1 im Zuge der Metastasierung, der oft von einer ungünstigen Konstellation bei prognostischen Markern begleitet wurde. Gleichzeitig fand sich in korrespondierenden Metastasen ein relativ häufiger Verlust proapoptotischer Bcl-2-Proteine, ebenfalls oftmals begleitet von einer ungünstigen Markerkonstellation. Die Ergebnisse deuten einerseits auf einen generellen Verlust von antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen im Zusammenhang mit der Progression des malignen Melanoms hin und unterstreichen andererseits die Bedeutung proapoptotischer Bcl-2-Proteine für die Tumorprogression.

Gleichzeitig bietet der Verlust antiapoptotischer Bcl-2-Proteine eine Erklärung für die relativ geringe klinische Wirksamkeit des Bcl-2-Antisense-Oligonukleotides Oblimersen in einer

groß angelegten Phase-III-Studie [Bedikian et al, 2006]. Aufgrund des im Rahmen dieser Arbeit beobachteten Verlustes proapoptotischer Bcl-2-Proteine könnte in Zukunft der Einsatz von Substanzen, welche diesem Verlust entgegenwirken, eine wichtige Therapieoption darstellen. Insbesondere BH3-only Mimetika erscheinen vor dem Hintergrund dieser Arbeit vielversprechend.

5. Literaturverzeichnis

- 1 Krebs in Deutschland 2003 – 2004. Häufigkeiten und Trends. 6. überarbeitete Auflage. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg). Berlin, 2008
- 2 Ackerman AB. "Solar keratosis is squamous cell carcinoma.." Arch Dermatol. 139(9) (2003): 1216-1217.
- 3 Anderson CM, Buzaid AC, Legha SS. "Systemic treatments for advanced cutaneous melanoma." Oncology (Williston Park). 9(11) (1995): 1149-1158.
- 4 Antonsson B, Montessuit S, Lauper S, Eskes R, Martinou JC. "Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria.." Biochem J. 345 Pt 2 (2000): 271-278.
- 5 Apte SS, Mattei MG, Olsen BR. "Mapping of the human BAX gene to chromosome 19q13.3-q13.4 and isolation of a novel alternatively spliced transcript, BAX delta.." Genomics. 26(3) (1995): 592-594.
- 6 Arafat WO, Gómez-Navarro J, Xiang J, Barnes MN, Mahasreshti P, Alvarez RD, Siegal GP, Badib AO, Buchsbaum D, Curiel DT, Stackhouse MA. "An adenovirus encoding proapoptotic Bax induces apoptosis and enhances the radiation effect in human ovarian cancer.." Mol Ther. 1(6) (2000): 545-554.
- 7 Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG, Fleming ID, Gershenwald JE, Houghton A Jr, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MF, Morton DL, Reintgen DS, Ross MI, Sober A, Thompson JA, Thompson JF. "Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma.." J Clin Oncol. 19(16) (2001): 3635-3648.
- 8 Balch CM, Murad TM, Soong SJ, Ingalls AL, Halpern NB, Maddox WA. "A multifactorial analysis of melanoma: prognostic histopathological features comparing Clark's and Breslow's staging methods.." Ann Surg. 188(6) (1978): 732-742.
- 9 Bedikian AY, Millward M, Pehamberger H, Conry R, Gore M, Trefzer U, Pavlick AC, DeConti R, Hersh EM, Hersey P, Kirkwood JM, Haluska FG, and Oblimersen Melanoma Study Group. "Bcl-2 antisense (oblimersen sodium) plus dacarbazine in patients with advanced melanoma: the Oblimersen Melanoma Study Group.." J Clin Oncol. 24(29) (2006): 4738-4745.
- 10 Bhardwaj A, Aggarwal BB. "Receptor-mediated choreography of life and death.." J Clin Immunol. 23(5) (2003): 317-332.
- 11 Blois MS, Epstein WL. "Melanoma: value of early detection and treatment.." Postgrad Med. 61(6) (1977): 82-88.
- 12 Breslow A. "Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma.." Ann Surg. 172(5) (1970): 902-908.
- 13 Buchbinder R, Barber M, Heuzenroeder L, Wluka AE, Giles G, Hall S, Harkness A, Lewis D, Littlejohn G, Miller MH, Ryan PF, Jolley D. "Incidence of melanoma and other malignancies among rheumatoid arthritis patients treated with methotrexate.." Arthritis Rheum. 59(6) (2008): 794-799.

-
- 14 Cartron PF, Gallenne T, Bougras G, Gautier F, Manero F, Vusio P, Meflah K, Vallette FM, Juin P. "The first alpha helix of Bax plays a necessary role in its ligand-induced activation by the BH3-only proteins Bid and PUMA.." Mol Cell. 16(5) (2004): 807-818.
 - 15 Chan SL, Yu VC. "Proteins of the bcl-2 family in apoptosis signalling: from mechanistic insights to therapeutic opportunities.." Clin Exp Pharmacol Physiol. 31(3) (2004): 119-128.
 - 16 Chauhan D, Velankar M, Brahmandam M, Hideshima T, Podar K, Richardson P, Schlossman R, Ghobrial I, Raje N, Munshi N, Anderson KC. "A novel Bcl-2/Bcl-X(L)/Bcl-w inhibitor ABT-737 as therapy in multiple myeloma.." Oncogene. 26(16) (2007): 2374-2380.
 - 17 Chen L, Willis SN, Wei A, Smith BJ, Fletcher JI, Hinds MG, Colman PM, Day CL, Adams JM, Huang DC. "Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function.." Mol Cell. 17(3) (2005): 393-403.
 - 18 Cheng EH, Sheiko TV, Fisher JK, Craigen WJ, Korsmeyer SJ. "VDAC2 inhibits BAK activation and mitochondrial apoptosis.." Science. 301(5632) (2003): 513-517.
 - 19 Clark WH Jr, From L, Bernardino EA, Mihm MC. "The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin.." Cancer Res. 29(3) (1969): 705-727.
 - 20 Coleman WP 3rd, Loria PR, Reed RJ, Kremenz ET. "Acral lentiginous melanoma.." Arch Dermatol. 116(7) (1980): 773-776.
 - 21 Cooper JS, Chang WS, Oratz R, Shapiro RL, Roses DF. "Elective radiation therapy for high-risk malignant melanomas.." Cancer J. 7(6) (2001): 498-502.
 - 22 Coras B, Hohenleutner S, Raff K, Landthaler M, Hohenleutner U. "The "red melanoma"--a rare form of amelanotic malignant melanoma." J Dtsch Dermatol Ges. 2(7) (2004): 597-600.
 - 23 Cormier JN, Xing Y, Ding M, Lee JE, Mansfield PF, Gershenwald JE, Ross MI, Du XL. "Ethnic differences among patients with cutaneous melanoma.." Arch Intern Med. 166(17) (2006): 1907-1914.
 - 24 Cory S, Adams JM. "The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch.." Nat Rev Cancer. 2(9) (2002): 647-656.
 - 25 Daniel PT, Wieder T, Sturm I, Schulze-Osthoff K. "The kiss of death: promises and failures of death receptors and ligands in cancer therapy.." Leukemia. 15(7) (2001): 1022-1032.
 - 26 de Vries E, Nijsten TE, Visser O, Bastiaannet E, van Hattem S, Janssen-Heijnen ML, Coebergh JW. "Superior survival of females among 10,538 Dutch melanoma patients is independent of Breslow thickness, histologic type and tumor site.." Ann Oncol. 19(3) (2008): 583-589.
 - 27 Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. "X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases.." Nature. 388(6639) (1997): 300-304.
 - 28 Eberle J, Kurbanov BM, Hossini AM, Trefzer U, Fecker LF. "Overcoming apoptosis deficiency of melanoma--hope for new therapeutic approaches.." Drug Resist Updat. 10(6) (2007): 218-234.
 - 29 Er E, Oliver L, Cartron PF, Juin P, Manon S, Vallette FM. "Mitochondria as the target of the pro-apoptotic protein Bax.." Biochim Biophys Acta. 1757(9-10) (2006): 1301-1311.
 - 30 Fecker LF, Geilen CC, Tchernev G, Trefzer U, Assaf C, Kurbanov BM, Schwarz C, Daniel PT, Eberle J. "Loss of proapoptotic Bcl-2-related multidomain proteins in primary melanomas is associated with poor prognosis.." J Invest Dermatol. 126(6) (2006): 1366-1371.
 - 31 Fernandez EM, Helm KF. "The diameter of melanomas.." Dermatol Surg. 30(9) (2004): 1219-1222.

-
- 32 Fietta P. "Many ways to die: passive and active cell death styles.." Riv Biol. 99(1) (2006): 69-83.
- 33 Forman SB, Ferringer TC, Peckham SJ, Dalton SR, Sasaki GT, Libow LF, Elston DM. "Is superficial spreading melanoma still the most common form of malignant melanoma?." J Am Acad Dermatol. 58(6) (2008): 1013-1020.
- 34 Fratesi L, Alhusayen R, Walker J. "Case report of primary rectal melanoma and review of the etiology of melanoma.." J Cutan Med Surg. 12(3) (2008): 117-120.
- 35 Frost C, Williams G, Green A. "High incidence and regression rates of solar keratoses in a queensland community.." J Invest Dermatol. 115(2) (2000): 273-277.
- 36 Fu W, Cockerell CJ. "The actinic (solar) keratosis: a 21st-century perspective.." Arch Dermatol. 139(1) (2003): 66-70.
- 37 Garbe C, Blum A. "Epidemiology of cutaneous melanoma in Germany and worldwide.." Skin Pharmacol Appl Skin Physiol. 14(5) (2001): 280-290.
- 38 Garbe C, Hauschild A, Volkenandt M, Schadendorf D, Stolz W, Reinhold U, Kortmann RD, Kettelhack C, Frerich B, Keilholz U, Dummer R, Sebastian G, Tilgen W, Schuler G, Mackensen A, Kaufmann R. "Evidence and interdisciplinary consensus-based German guidelines: diagnosis and surveillance of melanoma.." Melanoma Res. 17(6) (2007): 393-399.
- 39 Gaspar ZS, Dawber RP. "Treatment of lentigo maligna.." Australas J Dermatol. 38(1) (1997): 1-6.
- 40 Georgieva J, Sinha P, Schadendorf D. "Expression of cyclins and cyclin dependent kinases in human benign and malignant melanocytic lesions.." J Clin Pathol. 54(3) (2001): 229-235.
- 41 Glogau RG. "The risk of progression to invasive disease.." J Am Acad Dermatol. 42(1 Pt 2) (2000): 23-24.
- 42 Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. "BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis.." Genes Dev. 13(15) (1999): 1899-1911.
- 43 Guerrero AD, Chen M, Wang J. "Delineation of the caspase-9 signaling cascade.." Apoptosis. 13(1) (2008): 177-186.
- 44 Halliday GM, Agar NS, Barnetson RS, Ananthaswamy HN, Jones AM. "UV-A fingerprint mutations in human skin cancer.." Photochem Photobiol. 81(1) (2005): 3-8.
- 45 Handrick R, Rudner J, Müller I, Eibl H, Belka C, Jendrossek V. "Bcl-2 mediated inhibition of erucylphosphocholine-induced apoptosis depends on its subcellular localisation.." Biochem Pharmacol. 70(6) (2005): 837-850.
- 46 Hassan M, Alaoui A, Feyen O, Mirmohammadsadegh A, Essmann F, Tannapfel A, Gulbins E, Schulze-Osthoff K, Hengge UR. "The BH3-only member Noxa causes apoptosis in melanoma cells by multiple pathways.." Oncogene. 27(33) (2008): 4557-4568.
- 47 Hauschild A, Rosien F, Lischner S. "Surgical standards in the primary care of melanoma patients.." Onkologie. 26(3) (2003): 218-222.
- 48 Hengge UR. "Role of viruses in the development of squamous cell cancer and melanoma.." Adv Exp Med Biol. 624 (2008): 179-186.
- 49 Hernberg M, Turunen JP, von Boguslawsky K, Muhonen T, Pyrhönen S. "Prognostic value of biomarkers in malignant melanoma.." Melanoma Res. 8(3) (1998): 283-291.

-
- 50 Hollenbeak CS, Todd MM, Billingsley EM, Harper G, Dyer AM, Lengerich EJ. "Increased incidence of melanoma in renal transplantation recipients.." Cancer 104(9) (2005): 1962-1967.
- 51 Holmes C, Foley P, Freeman M, Chong AH. "Solar keratosis: epidemiology, pathogenesis, presentation and treatment.." Australas J Dermatol. 48(2) (2007): 67-74.
- 52 Homsí J, Kashani-Sabet M, Messina JL, Daud A. "Cutaneous melanoma: prognostic factors.." Cancer Control. 12(4) (2005): 223-229.
- 53 Hossini AM, Eberle J, Fecker LF, Orfanos CE, Geilen CC. "Conditional expression of exogenous Bcl-X(S) triggers apoptosis in human melanoma cells in vitro and delays growth of melanoma xenografts.." FEBS Lett. 553(3) (2003): 250-256.
- 54 Huh WK, Gomez-Navarro J, Arafat WO, Xiang J, Mahasreshti PJ, Alvarez RD, Barnes MN, Curiel DT. "Bax-induced apoptosis as a novel gene therapy approach for carcinoma of the cervix.." Gynecol Oncol. 83(2) (2002): 370-377.
- 55 Iftner T, Elbel M, Schopp B, Hiller T, Loizou JI, Caldecott KW, Stubenrauch F. "Interference of papillomavirus E6 protein with single-strand break repair by interaction with XRCC1.." EMBO J. 21(17) (2002): 4741-4748.
- 56 Jackson S, Harwood C, Thomas M, Banks L, Storey A. "Role of Bak in UV-induced apoptosis in skin cancer and abrogation by HPV E6 proteins.." Genes Dev. 14(23) (2000): 3065-3073.
- 57 Jackson S, Storey A. "E6 proteins from diverse cutaneous HPV types inhibit apoptosis in response to UV damage.." Oncogene. 19(4) (2000): 592-598.
- 58 Jansen B, Schlagbauer-Wadl H, Brown BD, Bryan RN, van Elsas A, Müller M, Wolff K, Eichler HG, Pehamberger H. "bcl-2 antisense therapy chemosensitizes human melanoma in SCID mice.." Nat Med. 4(2) (1998): 432-434.
- 59 Jansen B, Wacheck V, Heere-Ress E, Schlagbauer-Wadl H, Hoeller C, Lucas T, Hoermann M, Hollenstein U, Wolff K, Pehamberger H. "Chemosensitisation of malignant melanoma by BCL2 antisense therapy.." Lancet. 356(9243) (2000): 1728-1733.
- 60 Kaasik A, Safiulina D, Zharkovsky A, Veksler V. "Regulation of mitochondrial matrix volume.." Am J Physiol Cell Physiol. 292(1) (2007): C157-C163.
- 61 Karst AM et al. "PUMA expression is significantly reduced in human cutaneous melanomas." Oncogene 24 (2005): 1111-1116.
- 62 Kaskel P, Kind P, Sander S, Peter RU, Krähn G. "Trauma and melanoma formation: a true association?." Br J Dermatol. 143(4) (2000): 749-753.
- 63 Kelly JW, Chamberlain AJ, Staples MP, McAvoy B. "Nodular melanoma. No longer as simple as ABC.." Aust Fam Physician. 32(9) (2003): 706-709.
- 64 Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.." Br J Cancer. 26(4) (1972): 239-257.
- 65 Kim R, Emi M, Tanabe K. "Role of mitochondria as the gardens of cell death.." Cancer Chemother Pharmacol. 57(5).545 (2006): 553
- 66 Kozopas KM, Yang T, Buchan HL, Zhou P, Craig RW. "MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2.." Proc Natl Acad Sci U S A. 90(8) (1993): 3516-3520.

-
- 67 Krajewska M, Moss SF, Krajewski S, Song K, Holt PR, Reed JC. "Elevated expression of Bcl-X and reduced Bak in primary colorectal adenocarcinomas.." Cancer Res. 56(10) (1996): 2422-2427.
- 68 Kuchelmeister C, Schaumburg-Lever G, Garbe C. "Acral cutaneous melanoma in caucasians: clinical features, histopathology and prognosis in 112 patients.." Br J Dermatol. 143(2) (2000): 275-280.
- 69 Lang PG. "Current concepts in the management of patients with melanoma.." Am J Clin Dermatol. 3(6) (2002): 401-426.
- 70 Leiter U, Garbe C. "Epidemiology of melanoma and nonmelanoma skin cancer--the role of sunlight.." Adv Exp Med Biol. 624 (2008): 89-103.
- 71 Leiter U, Schmid RM, Kaskel P, Peter RU, Krähn G. "Antiapoptotic bcl-2 and bcl-xL in advanced malignant melanoma.." Arch Dermatol Res. 292(5) (2000): 225-232.
- 72 Lens M. "Current clinical overview of cutaneous melanoma.." Br J Nurs. 17(5) (2008): 300-305.
- 73 Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. "Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade.." Cell. 91(4) (1997): 479-489.
- 74 Liberman E, Naumov I, Kazanov D, Dvory-Sobol H, Sagiv E, Birkenfeld S, Deutsch V, Trakhtenbrot L, Moshkowitz M, Arber N. "Malignant transformation of normal enterocytes following downregulation of Bak expression.." Digestion. 77(1) (2008): 48-56.
- 75 Lockshin RA, Zakeri Z. "Apoptosis, autophagy, and more.." Int J Biochem Cell Biol. 36(12) (2004): 2405-2419.
- 76 Logan DC. "The mitochondrial compartment.." J Exp Bot. 57(6) (2006): 1225-1243.
- 77 Lucken-Ardjomande S, Martinou JC. "Newcomers in the process of mitochondrial permeabilization.." J Cell Sci. 118(Pt 3) (2005): 473-483.
- 78 Lucken-Ardjomande S, Martinou JC. "Regulation of Bcl-2 proteins and of the permeability of the outer mitochondrial membrane.." C R Biol. 328(7) (2005): 616-631.
- 79 Malaguarnera L. "Implications of apoptosis regulators in tumorigenesis.." Cancer Metastasis Rev. 23(3-4) (2004): 367-387.
- 80 Mannella CA. "The 'ins' and 'outs' of mitochondrial membrane channels.." Trends Biochem Sci. 17(8) (1992): 315-320.
- 81 Marghoob AA, Koenig K, Bittencourt FV, Kopf AW, Bart RS. "Breslow thickness and clark level in melanoma: support for including level in pathology reports and in American Joint Committee on Cancer Staging.." Cancer. 88(3) (2000): 589-595.
- 82 Markovic SN, Erickson LA, Rao RD, Weenig RH, Pockaj BA, Bardia A, Vachon CM, Schild SE, McWilliams RR, Hand JL, Laman SD, Kottschade LA, Maples WJ, Pittelkow MR, Pulido JS, Cameron JD, Creagan ET, and Melanoma Study Group of Mayo Clinic Cancer Center. "Malignant melanoma in the 21st century, part 2: staging, prognosis, and treatment.." Mayo Clin Proc. 82(4) (2007): 490-513.
- 83 Marks R. "Epidemiology of melanoma.." Clin Exp Dermatol. 25(6) (2000): 459-463.
- 84 McGregor JM, Yu CC, Dublin EA, Levison DA, MacDonald DM. "Aberrant expression of p53 tumour-suppressor protein in non-melanoma skin cancer.." Br J Dermatol. 127(5) (1992): 463-469.

-
- 85 McKenna DB, Lee RJ, Prescott RJ, Doherty VR. "The time from diagnostic excision biopsy to wide local excision for primary cutaneous malignant melanoma may not affect patient survival.." Br J Dermatol. 147(1) (2002): 48-54.
- 86 Memon AA, Tomenson JA, Bothwell J, Friedmann PS. "Prevalence of solar damage and actinic keratosis in a Merseyside population.." Br J Dermatol. 142(6) (2000): 1154-1159.
- 87 Michels J, Johnson PW, Packham G. "Mcl-1.." Int J Biochem Cell Biol. 37(2) (2004): 267-271.
- 88 Minagawa N, Kruglov EA, Dranoff JA, Robert ME, Gores GJ, Nathanson MH. "The anti-apoptotic protein Mcl-1 inhibits mitochondrial Ca²⁺ signals.." J Biol Chem. 280(39) (2005): 33637-33644.
- 89 Muster T, Waltenberger A, Grassauer A, Hirschl S, Caucig P, Romirer I, Födinger D, Seppel H, Schanab O, Magin-Lachmann C, Löwer R, Jansen B, Pehamberger H, Wolff K. "An endogenous retrovirus derived from human melanoma cells.." Cancer Res. 63(24) (2003): 8735-8741.
- 90 Muñoz-Pinedo C, Guío-Carión A, Goldstein JC, Fitzgerald P, Newmeyer DD, Green DR. "Different mitochondrial intermembrane space proteins are released during apoptosis in a manner that is coordinately initiated but can vary in duration.." Proc Natl Acad Sci U S A. 103(31) (2006): 11573-11578.
- 91 Münger K, Werness BA, Dyson N, Phelps WC, Harlow E, Howley PM. "Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product.." EMBO J. 8(13) (1989): 4099-4105.
- 92 Nakano K, Vousden KH. "PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53." Mol Cell 7(3) (2001): 683-694.
- 93 Nguyen M, Marcellus RC, Roulston A, Watson M, Serfass L, Murthy Madiraju SR, Goulet D, Viallet J, Bélec L, Billot X, Acoca S, Purisima E, Wiegmanns A, Cluse L, Johnstone RW, Beauparlant P, Shore GC. "Small molecule obatoclax (GX15-070) antagonizes MCL-1 and overcomes MCL-1-mediated resistance to apoptosis.." Proc Natl Acad Sci U S A. 104(49) (2007): 19512-19517.
- 94 Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. "Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death.." Cell. 74(4) (1993): 609-619.
- 95 Oppermann M, Geilen CC, Fecker LF, Gillissen B, Daniel PT, Eberle J. "Caspase-independent induction of apoptosis in human melanoma cells by the proapoptotic Bcl-2-related protein Nbk / Bik.." Oncogene. 24(49) (2005): 7369-7380.
- 96 Osborne JE, Hutchinson PE. "Clinical correlates of Breslow thickness of malignant melanoma.." Br J Dermatol. 144(3) (2001): 476-483.
- 97 Pinton P, Rizzuto R. "Bcl-2 and Ca²⁺ homeostasis in the endoplasmic reticulum.." Cell Death Differ. 13(8) (2006): 1409-1418.
- 98 Prosdocimo T, Smith M, Polack EP. "The diagnosis and treatment of childhood melanoma.." W V Med J. 98(4) (2002): 149-151.
- 99 Proskuryakov SY, Konoplyannikov AG, Gabai VL. "Necrosis: a specific form of programmed cell death?." Exp Cell Res. 283(1) (2003): 1-16.
- 100 Qin JZ, Stennett L, Bacon P, Bodner B, Hendrix MJ, Seftor RE, Seftor EA, Margaryan NV, Pollock PM, Curtis A, Trent JM, Bennett F, Miele L, Nickoloff BJ. "p53-independent NOXA induction overcomes apoptotic resistance of malignant melanomas.." Mol Cancer Ther. 3(8) (2004): 895-902.

-
- 101 Ramsay JA, From L, Kahn HJ. "bcl-2 protein expression in melanocytic neoplasms of the skin.." Mod Pathol. 8(2) (1995): 150-154.
- 102 Rasola A, Bernardi P. "The mitochondrial permeability transition pore and its involvement in cell death and in disease pathogenesis.." Apoptosis. 12(5) (2007): 815-833.
- 103 Ruiter D, Bogenrieder T, Elder D, Herlyn M. "Melanoma-stroma interactions: structural and functional aspects.." Lancet Oncol. 3(1) (2002): 35-43.
- 104 Saleh A, Srinivasula SM, Acharya S, Fishel R, Alnemri ES. "Cytochrome c and dATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a prerequisite for procaspase-9 activation.." J Biol Chem. 274(25) (1999): 17941-17945.
- 105 Sano M, Nakanishi Y, Yagasaki H, Honma T, Oinuma T, Obana Y, Suzuki A, Nemoto N. "Overexpression of anti-apoptotic Mcl-1 in testicular germ cell tumours.." Histopathology. 46(5) (2005): 532-539.
- 106 Saraste A, Pulkki K. "Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis.." Cardiovasc Res. 45(3) (2000): 528-537.
- 107 Sato T, Hanada M, Bodrug S, Irie S, Iwama N, Boise LH, Thompson CB, Golemis E, Fong L, Wang HG. "Interactions among members of the Bcl-2 protein family analyzed with a yeast two-hybrid system.." Proc Natl Acad Sci U S A. 91(20) (1994): 9238-9242.
- 108 Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM. "The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53.." Cell. 63(6) (1990): 1129-1136.
- 109 Schwarz M, Andrade-Navarro MA, Gross A. "Mitochondrial carriers and pores: key regulators of the mitochondrial apoptotic program?.." Apoptosis. 12(5) (2007): 869-876.
- 110 Scorrano L, Oakes SA, Opferman JT, Cheng EH, Sorcinelli MD, Pozzan T, Korsmeyer SJ. "BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis.." Science. 300(5616) (2003): 135-139.
- 111 Seegenschmiedt MH, Keilholz L, Altendorf-Hofmann A, Urban A, Schell H, Hohenberger W, Sauer R. "Palliative radiotherapy for recurrent and metastatic malignant melanoma: prognostic factors for tumor response and long-term outcome: a 20-year experience.." Int J Radiat Oncol Biol Phys. 44(3) (1999): 607-618.
- 112 Serrone L, Zeuli M, Segal FM, Cognetti F. "Dacarbazine-based chemotherapy for metastatic melanoma: thirty-year experience overview.." J Exp Clin Cancer Res. 19(1) (2000): 21-34.
- 113 Seykora J, Elder D. "Dysplastic nevi and other risk markers for melanoma.." Semin Oncol. 23(6) (1996): 682-687.
- 114 Shamanin V, zur Hausen H, Lavergne D, Proby CM, Leigh IM, Neumann C, Hamm H, Goos M, Hausteiner UF, Jung EG, Plewig G, Wolff H, de Villiers EM. "Human papillomavirus infections in nonmelanoma skin cancers from renal transplant recipients and nonimmunosuppressed patients.." J Natl Cancer Inst. 88(12) (1996): 802-811.
- 115 Sheikh MS, Fornace AJ Jr. "Death and decoy receptors and p53-mediated apoptosis.." Leukemia. 14(8) (2000): 1509-1513.
- 116 Shi Y. "Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis.." Mol Cell. 9(3) (2002): 459-470.

-
- 117 Shibata MA, Liu ML, Knudson MC, Shibata E, Yoshidome K, Bandey T, Korsmeyer SJ, Green JE. "Haploid loss of bax leads to accelerated mammary tumor development in C3(1)/SV40-TAg transgenic mice: reduction in protective apoptotic response at the preneoplastic stage.." EMBO J. 18(10) (1999): 2692-2701.
- 118 Shimizu S, Konishi A, Kodama T, Tsujimoto Y. "BH4 domain of antiapoptotic Bcl-2 family members closes voltage-dependent anion channel and inhibits apoptotic mitochondrial changes and cell death.." Proc Natl Acad Sci U S A. 97(7) (2000): 3100-3105.
- 119 Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y. "Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC.." Nature. 399(6735) (1999): 483-487.
- 120 Shoshan-Barmatz V, Gincel D. "The voltage-dependent anion channel: characterization, modulation, and role in mitochondrial function in cell life and death.." Cell Biochem Biophys. 39(3) (2003): 279-292.
- 121 Singh A, Ni J, Aggarwal BB. "Death domain receptors and their role in cell demise.." J Interferon Cytokine Res. 18(7) (1998): 439-450.
- 122 Slade J, Marghoob AA, Salopek TG, Rigel DS, Kopf AW, Bart RS. "Atypical mole syndrome: risk factor for cutaneous malignant melanoma and implications for management.." J Am Acad Dermatol. 32(3) (1995): 479-494.
- 123 Soengas MS, Lowe SW. "Apoptosis and melanoma chemoresistance.." Oncogene. 22(20) (2003): 3138-3151.
- 124 Sprick MR, Walczak H. "The interplay between the Bcl-2 family and death receptor-mediated apoptosis.." Biochim Biophys Acta. 1644(2-3) (2004): 125-132.
- 125 Stidham KR, Johnson JL, Seigler HF. "Survival superiority of females with melanoma. A multivariate analysis of 6383 patients exploring the significance of gender in prognostic outcome.." Arch Surg. 129(3) (1994): 316-324.
- 126 Stolz W, Landthaler M. "[Classification, diagnosis and differential diagnosis of malignant melanoma]." 65(3) (1994): 145-152.
- 127 Straume O, Sviland L, Akslen LA. "Loss of nuclear p16 protein expression correlates with increased tumor cell proliferation (Ki-67) and poor prognosis in patients with vertical growth phase melanoma.." Clin Cancer Res. 6(5) (2000): 1845-1853.
- 128 Su WP. "Malignant melanoma: basic approach to clinicopathologic correlation.." Mayo Clin Proc. 72(3) (1997): 267-272.
- 129 Tang L, Tron VA, Reed JC, Mah KJ, Krajewska M, Li G, Zhou X, Ho VC, Trotter MJ. "Expression of apoptosis regulators in cutaneous malignant melanoma.." Clin Cancer Res. 4(8) (1998): 1865-1871.
- 130 Tchernev G, Orfanos CE. "Downregulation of cell cycle modulators p21, p27, p53, Rb and proapoptotic Bcl-2-related proteins Bax and Bak in cutaneous melanoma is associated with worse patient prognosis: preliminary findings.." J Cutan Pathol. 34(3) (2007): 247-256.
- 131 Thallinger C, Wolschek MF, Wacheck V, Maierhofer H, Günsberg P, Polterauer P, Pehamberger H, Monia BP, Selzer E, Wolff K, Jansen B. "Mcl-1 antisense therapy chemosensitizes human melanoma in a SCID mouse xenotransplantation model.." J Invest Dermatol. 120(6) (2003): 1081-1086.
- 132 van den Oord JJ, Vandeghinste N, De Ley M, De Wolf-Peeters C. "Bcl-2 expression in human melanocytes and melanocytic tumors.." Am J Pathol. 145(2) (1994): 294-300.

-
- 133 van der Laan M, Rissler M, Rehling P. "Mitochondrial preprotein translocases as dynamic molecular machines.." FEMS Yeast Res. 6(6) (2006): 849-861.
- 134 Villunger A, Michalak EM, Coultas L, Müllauer F, Böck G, Ausserlechner MJ, Adams JM, Strasser A. "p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa.." Science. 302(5647) (2003): 1036-1038.
- 135 Wallon-Dumon G, Dréno B. "The clinical diagnosis of melanoma." Presse Med. 32(1) (2003): 33-38.
- 136 Walter SD, King WD, Marrett LD. "Association of cutaneous malignant melanoma with intermittent exposure to ultraviolet radiation: results of a case-control study in Ontario, Canada.." Int J Epidemiol. 28(3) (1999): 418-427.
- 137 Walter SD, Marrett LD, From L, Hertzman C, Shannon HS, Roy P. "The association of cutaneous malignant melanoma with the use of sunbeds and sunlamps.." Am J Epidemiol. 131(2) (1990): 232-243.
- 138 Whiteman DC, Stickley M, Watt P, Hughes MC, Davis MB, Green AC. "Anatomic site, sun exposure, and risk of cutaneous melanoma.." 24(19) (2006): 3172-3177.
- 139 Willis SN, Chen L, Dewson G, Wei A, Naik E, Fletcher JI, Adams JM, Huang DC. "Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins.." Genes Dev. 19(11) (2005): 1294-1305.
- 140 Wong RP, Khosravi S, Martinka M, Li G. "Myeloid leukemia-1 expression in benign and malignant melanocytic lesions.." Oncol Rep. 19(4) (2008): 933-937.
- 141 Wuillème-Toumi S, Robillard N, Gomez P, Moreau P, Le Gouill S, Avet-Loiseau H, Harousseau JL, Amiot M, Bataille R. "Mcl-1 is overexpressed in multiple myeloma and associated with relapse and shorter survival.." Leukemia. 19(7) (2005): 1248-1252.
- 142 Yang T, Kozopas KM, Craig RW. "The intracellular distribution and pattern of expression of Mcl-1 overlap with, but are not identical to, those of Bcl-2.." J Cell Biol. 128(6) (1995): 1173-1184.
- 143 Zhang H, Rosdahl I. "Expression of oncogenes, tumour suppressor, mismatch repair and apoptosis-related genes in primary and metastatic melanoma cells.." Int J Oncol. 19(6) (2001): 1149-1153.
- 144 Zhuang L, Lee CS, Scolyer RA, McCarthy SW, Zhang XD, Thompson JF, Hersey P. "Mcl-1, Bcl-XL and Stat3 expression are associated with progression of melanoma whereas Bcl-2, AP-2 and MITF levels decrease during progression of melanoma.." Mod Pathol. 20(4) (2007): 416-426.
- 145 Zong WX, Lindsten T, Ross AJ, MacGregor GR, Thompson CB. "BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak.." Genes Dev. 15(12) (2001): 1481-1486.
- 146 Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X. "Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3.." Cell. 90(3) (1997): 405-413.
- 147 zur Hausen H, de Villiers EM. "Human papillomaviruses.." Annu Rev Microbiol. 48 (1994): 427-447.

7. Curriculum Vitae

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.