

**Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Dermatologikum Hamburg
Praxis Prof. Steinkraus und Partner**

**Identifizierung molekulargenetischer Pattern beim malignen
Melanom und Assoziationen mit klinischen,
histopathologischen, pathogenetischen und prognostischen
Charakteristika**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Leonie von Eichel-Streiber
aus Königstein im Taunus

Hamburg 2011

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 10.05.2011**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. V. Steinkraus

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. M. Augustin

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: PD Dr. R. Simon

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	V
TABELLENVERZEICHNIS.....	VII
FRAGESTELLUNG.....	1
1 Einleitung.....	3
1.1 Das maligne Melanom	3
1.2 Die Epidemiologie des malignen Melanoms	3
1.3 Die Ätiologie des malignen Melanoms	5
1.4 Umweltbedingte Risikofaktoren.....	6
1.5 Genetische Risikofaktoren	7
1.5.1 Suszeptibilitätsgene in erblich bedingten Melanomen.....	7
1.5.2 Erworbene Mutationen und Signalwege in der Melanomgenese	9
1.5.2.1 BRAF	11
1.5.2.2 NRAS.....	12
1.5.2.3 c-KIT	13
1.5.2.4 Mikrosatelliteninstabilitäten (MSI) und „Loss of Heterozygosity“ (LOH)	14
1.6 Klinik und Histopathologie.....	15
1.6.1 Klassifizierung der wichtigsten Melanomtypen.....	15
1.6.2 Histopathologie und Prognose	17
1.6.3 Stadieneinteilung des malignen Melanoms.....	23
2 Materialien und Methoden	27
2.1 Materialien	27
2.1.1 Patientenkollektiv	27
2.2 Methoden.....	29
2.2.1 DNA Extraktion.....	29
2.2.2 Detektion von BRAF Mutationen	30
2.2.2.1 TaqMan Real-time-PCR Assay	30
2.2.2.2 Amplifikation und direkte Sequenzierung des BRAF-Genes (Exon 15).....	31

2.2.3	Detektion von NRAS Mutationen.....	34
2.2.4	Detektion von c-KIT Mutationen.....	34
2.2.4.1	Real-time-PCR- Ansatz:.....	35
2.2.5	Analyse ausgewählter Mikrosatelliten	36
2.2.6	Einteilung der Melanome nach histomorphologischen Kriterien.....	38
2.2.7	Statistische Methoden.....	39
3	Ergebnisse.....	40
3.1	Klinische, molekularbiologische, morphologische und prognostische Merkmale der Melanome.....	40
3.2	Statistische Auswertung.....	41
3.2.1	Das Muster von NRAS- und BRAF Mutationen.....	41
3.2.2	BRAF Mutationen sind mit dem Nichtauftreten von instabilen Mikrosatelliten (MSI) assoziiert	47
3.2.3	Melanome mit instabilen Mikrosatellitenmutatrn stammen häufiger von chronisch sonnenexponierter Haut.....	49
3.2.4	Melanome mit instabilen Mikrosatelliten sind häufiger undeutlich nach lateral abgegrenzt	51
3.2.5	LOH positive Melanome entsprechen häufiger dem NRAS-Wildtyp 52	
3.2.6	Melanome mit Allelverlusten an Mikrosatelliten-Genorten stammen häufiger von intermittierend sonnenexponierten Körperregionen.....	53
3.2.7	Bei Kopf-Hals-Melanomen sind intraepidermale Melanozyten als Einzelzellen angeordnet	55
3.2.8	Melanome des Kopf-Halsbereiches zeigen häufiger einen kontinuierlichen Übergang von Tumorgewebe zum lateralen Normalhautgewebe	57
3.2.9	c-KIT Mutationen waren nicht nachweisbar	58
4	Diskussion.....	60
5	Zusammenfassung	70

6	Abkürzungsverzeichnis	72
7	Literaturverzeichnis	74
8	Danksagung	85
9	Lebenslauf	86
10	Eidesstattliche Erklärung	87

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1:	Jährliche Neuerkrankungs- und Sterbefälle sowie altersstandardisierte Neuerkrankungs- und Sterberaten (Europastandard) nach Geschlecht, Deutschland 1980 – 2004, ICD-10 C43 (Robert Koch Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland, 2008)	5
Abbildung 2:	MAPK Signalweg	10
Abbildung 3:	Superfiziell spreitendes Melanom (SSM)	15
Abbildung 4:	Lentigo-maligna Melanom (LMM)	16
Abbildung 5:	Akral-lentiginöses Melanom (ALM)	16
Abbildung 6:	Noduläres Melanom (NM)	16
Abbildung 7:	Histopathologie des Melanoms: Atypische Melanozyten in allen Epidermislagen.	18
Abbildung 8:	Histopathologie des Melanoms: Atypische Melanozyten verteilt und als Einzelzellen an der dermo-epidermalen Junktionszone angeordnet.	18
Abbildung 9:	Histopathologie des Melanoms: Melanozyten in Nestern an der dermo-epidermalen Junktionszone sowie suprabasal angeordnet.	19
Abbildung 10:	Histopathologie des Melanoms: Der Tumor ist nach lateral unscharf begrenzt	19
Abbildung 11:	Histopathologie des Melanoms: Der Tumor ist asymmetrisch.	19
Abbildung 12:	Histopathologie des Melanoms: Es findet sich ein inflammatorisches Infiltrat und Pigmentinkontinenz.	20
Abbildung 13:	Clark Level und Breslow Index (www.med-ars.it).	23

Abbildung 14: Ergebnisse der Real-time PCR für BRAF V600E Mutationen.	42
Abbildung 15: Agarose Gelelektrophorese der BRAF PCR Produkte.....	43
Abbildung 16: BRAF Wildtyp, Sequenzanalyse von Probe 3.....	43
Abbildung 17: BRAF V600E-Mutation, Sequenzanalyse von Probe 10.....	44
Abbildung 18: BRAF V600K Mutation, Sequenzanalyse von Probe 8.....	44
Abbildung 19: Agarose-Gelelektrophorese NRAS PCR Produkte	44
Abbildung 20: NRAS Wildtyp, Sequenzanalyse von Probe 10.	45
Abbildung 21: NRAS Q61R Mutation, Sequenzanalyse von Probe 30,.....	45
Abbildung 22: NRAS Q61K Mutation, Sequenzanalyse von Probe 63	45
Abbildung 23: Darstellung der Assoziation zwischen BRAF und NRAS.....	46
Abbildung 24: Beispiel eines instabilen Mikrosatelliten: Probe 64 am Genort D9S157	48
Abbildung 25: Darstellung der Assoziation zwischen MSI und BRAF (bzw. Assoziation zwischen dem Auftreten von BRAF und dem Nichtauftreten von MSI).....	48
Abbildung 26: Darstellung der Assoziation zwischen Lokalisation und MSI. ..	50
Abbildung 27: Darstellung der Assoziation zwischen lateraler Abgrenzbarkeit und MSI.....	51
Abbildung 28: Darstellung der Assoziation zwischen LOH und NRAS (bzw. Assoziation zwischen dem Auftreten von LOH und dem Nichtauftreten von NRAS).....	52
Abbildung 29: Allelverlust der Probe 24 am Genort D9S157.....	54
Abbildung 30: Darstellung der Assoziation zwischen Lokalisation und LOH. .	54
Abbildung 31: Darstellung der Assoziation zwischen Nesterbildung und Lokalisation.	56
Abbildung 32: Darstellung der Assoziation zwischen lateraler Abgrenzbarkeit und Lokalisation.	57
Abbildung 33: Real-time PCR zur Detektion von c-KIT Mutationen.....	59
Abbildung 34: Wildtyp c-KIT Sequenzanalyse vom Exon 11 des c-KIT Gens,59	

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Klinisch-histopathologische Subtypen kutaner maligner Melanome im deutschsprachigen Raum Europas.	17
Tabelle 2: Vertikale Tumordicke nach Breslow (Garbe, 2003)	21
Tabelle 3: Invasionslevel nach Clark, (Clark, From, Bernhadino & Mihm, 1969)	22
Tabelle 4: TNM Klassifikation für Melanome (Balch <i>et al.</i> , 2009)	26
Tabelle 5: Stadieneinteilung des malignen Melanoms (UICC/AJCC 2009)	26
Tabelle 6: Patientendaten.....	28
Tabelle 7: Klinische, molekularbiologische, morphologische und prognostische Faktoren der Melanome	41
Tabelle 8: Chi-Quadrat-Test zur Darstellung der Assoziation von BRAF und NRAS	46
Tabelle 9: Exakter Test nach Fischer zur Errechnung der Assoziation zwischen BRAF und NRAS (bzw. Assoziation zwischen dem Auftreten von NRAS mit dem Nichtauftreten von BRAF)	46
Tabelle 10: Chi-Quadrat-Test zur Darstellung der Assoziation von BRAF Mutationen und MSI (bzw. Assoziation zwischen dem Auftreten von BRAF Mutationen mit dem Nichtauftreten von MSI)	49
Tabelle 11: Exakter Test nach Fischer zur Errechnung der Assoziation zwischen BRAF Mutation und MSI (bzw. dem Auftreten von BRAF Mutation mit dem Nichtauftreten von MSI).....	49
Tabelle 12: Chi-Quadrat-Test zur Errechnung der Assoziation von MSI und Lokalisation	50
Tabelle 13: Exakter Test nach Fischer zur Errechnung der Assoziation zwischen MSI und Lokalisation	50
Tabelle 14: Chi-Quadrat-Test zur Errechnung der Assoziation zwischen lateraler Abgrenzbarkeit und MSI.....	51
Tabelle 15: Exakter Test nach Fischer zur Errechnung der Assoziation zwischen lateraler Abgrenzbarkeit und MSI	52
Tabelle 16: Chi-Quadrat-Test zur Errechnung der Assoziation zwischen LOH und NRAS	53

Tabelle 17: Exakte Signifikanz nach Fischer zur Errechnung der Assoziation zwischen LOH und NRAS	53
Tabelle 18: Chi-Quadrat-Test zur Errechnung der Assoziation zwischen Lokalisation und LOH.....	55
Tabelle 19: Exakter Test nach Fischer zur Errechnung der Assoziation zwischen Lokalisation und LOH	55
Tabelle 20: Chi-Quadrattest zur Errechnung der Assoziation zwischen Nesterbildung und Lokalisation	56
Tabelle 21: Exakter Test nach Fischer zur Errechnung der Assoziation zwischen Nesterbildung und Lokalisation.....	57
Tabelle 22: Chi-Quadrat-Test zur Errechnung der Assoziation zwischen lateraler Abgrenzbarkeit und Lokalisation	58
Tabelle 23: Exakter Test nach Fischer zur Errechnung der Assoziation zwischen lateraler Abgrenzbarkeit und Lokalisation.....	58

FRAGESTELLUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden 65 Melanome auf molekulargenetische, histomorphologische, klinische und prognostische Merkmale untersucht und statistisch signifikante Assoziationen zwischen den einzelnen Merkmalen herausgearbeitet. Ziel war hierbei, eine umfassende Charakterisierung von Melanomen zu erstellen, die die vorhandenen Klassifikationen unter Berücksichtigung molekularbiologischer Merkmale ergänzt. Eine Klassifikation von Tumoren bedeutet eine systematische Unterteilung der Läsionen in unterschiedliche Kategorien. Bei der Einteilung, sollte soweit möglich, auch das Ansprechen auf verschiedene Therapieformen berücksichtigt werden.

Derzeit sind folgende Systeme zur Einteilung von Melanomen verfügbar: Einerseits die WHO (World Health Organisation) Klassifikation von Hautkrebs (LeBoit *et al.*, 2006) und andererseits die American Joint Committee on Cancer (AJCC) Klassifikation (Balch *et al.*, 2009). In der WHO Klassifikation werden vier verschiedene Typen von Melanomen unterschieden: Superfiziell spreitendes Melanom (SSM), lentigo-maligna Melanom (LMM), noduläres Melanom (NM) und akral lentiginöses Melanom (ALM). Die Unterteilung der Melanome basiert hierbei vor allem auf Aussehen, Art des Wachstums, Neigung zur Metastasierung und auf klinischen Eigenschaften wie Lokalisation und Patientenalter. Bei der American Joint Committee on Cancer (AJCC) Klassifikation (Balch *et al.*, 2009) zählen Tumordicke Lymphknoten- und Fernmetastasierungsstatus (TNM) zu den wichtigsten Merkmalen anhand derer Patienten in verschiedene prognostische Gruppen eingeteilt werden.

Die genannten Systeme unterscheiden und teilen Melanome nach klinischen morphologischen und prognostischen Kriterien ein, berücksichtigen jedoch keine molekularbiologischen Merkmale, die zu untersuchen uns seit einigen Jahren möglich ist. Von besonderem Interesse wäre daher eine Klassifikation der Melanome, die sowohl molekulargenetische, klinische und morphologische Merkmale, als auch prognostische Faktoren berücksichtigt und so möglicherweise mehr Einfluss auf die klinische Handhabung der

Melanompatienten nehmen kann. In Zukunft könnte durch die Berücksichtigung von molekulargenetischen Merkmalen bei der Einteilung von Melanomen eine Gruppierung möglich sein, die eine bessere Prognostizierbarkeit des Ansprechens auf zukünftig verfügbare Therapien erlaubt und somit mehr Einfluss auf das klinische Management der einzelnen Gruppen nehmen kann.

1 EINLEITUNG

1.1 Das maligne Melanom

Das maligne Melanom ist ein von den Melanozyten der basalen Epidermis ausgehende maligne Neoplasie mit einer hohen Tendenz zur Metastasierung (Ackerman, 1980). Bevorzugt manifestiert sich das Melanom als stark pigmentierte, asymmetrisch begrenzte, in Größe zunehmende Läsion der Haut. Selten werden auch amelanotische Melanome beobachtet oder die Neoplasie entsteht an einer ungewöhnlichen Lokalisation auf Schleimhäuten, am Auge oder an den Hirnhäuten. Mit steigender Inzidenz der letzten Jahre nimmt die Bedeutung des Melanoms in der Medizin und Forschung stetig zu (Lens und Dawes, 2004). Vor allem für junge Erwachsene ist das Melanom eine der häufigsten Formen von bösartigen Neubildungen (Jemal *et al.*, 2005).

1.2 Die Epidemiologie des malignen Melanoms

Die Inzidenz des malignen Melanoms hat in den letzten Jahrzehnten rapide zugenommen (Desmond und Soong, 2003). Zu besonders hohen Inzidenzraten kommt es in Australien, Neuseeland, Südafrika, Europa und in den Vereinigten Staaten (Florenz und Cruces, 2004). Es sind vor allem Länder hellhäutiger Bevölkerungen und intensiver Sonneneinstrahlung betroffen (Fears *et al.*, 2002).

Die höchsten Werte kommen jedoch aus Australien, wo in Queensland 42 Fälle für Frauen und 56 Fälle für Männer pro 100.000 Einwohner gezählt wurden (MacLennan *et al.*, 1992). Hier ist das Melanom in der Bevölkerungsgruppe zwischen 14-45 Jahren die häufigste Krebserkrankung und, wenn man alle Altersgruppen betrachtet, bei Frauen die dritthäufigste und bei Männern die vierthäufigste maligne Neoplasie.

Auch in Deutschland steigt die Inzidenz des malignen Melanoms. Bei beiden Geschlechtern lässt sich von 1980 bis 2004 ein erheblicher Anstieg der Inzidenz auf das Dreifache des Ausgangswertes feststellen. Die Zahl der jährlichen Neuerkrankungen stieg etwa auf das Vierfache. Neueste Daten liefert die Gesundheitsberichterstattung des Bundes mit einer Inzidenz von 13,2 für Männer und 16,1 für Frauen pro 100.000 Einwohnern im Bundesgebiet (Robert Koch Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland, 2008). Seit 1980 sind die Erkrankungsraten bei Frauen altersstandardisiert um 270%, bei Männern um 210% angestiegen (Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes, 2010). Bei Männern liegt das mittlere Erkrankungsalter mit 63 Jahren deutlich über dem der Frauen, die im Mittel mit 57 Jahren am Melanom erkranken. Frauen sind häufiger vom Melanom betroffen: Etwa 8.400 Frauen und 6.500 Männer erkrankten im Jahre 2004 an einem malignen Melanom. An diesem Tumor starben ca. 1.037 Frauen und 1.256 Männer.

Nach einer deutlichen Verbesserung der Überlebensraten in den 1970er Jahren von 75% auf 84% bei Männern und von 80% auf 88% bei Frauen (Abbildung 1), konnte seit Beginn der 1980er Jahre keine weitere Steigerung der Lebenserwartung mehr verzeichnet werden (Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes 2010).

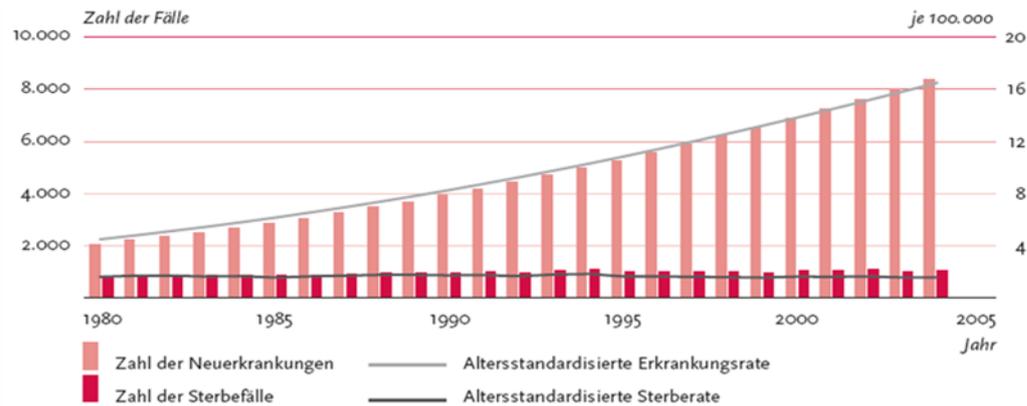


Abbildung 1: Jährliche Neuerkrankungs- und Sterbefälle sowie altersstandardisierte Neuerkrankungs- und Sterberaten (Europastandard) nach Geschlecht, Deutschland 1980 – 2004, ICD-10 C43 (Robert Koch Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland, 2008)

1.3 Die Ätiologie des malignen Melanoms

Sowohl exogene als auch endogene Faktoren tragen zur Melanomentstehung bei. Es ist das Ziel vieler aktueller Studien die Pathogenese der über viele Zwischenstufen stattfindenden Tumorprogression (Elder *et al.*, 1993) des Melanoms zu verstehen. Zum Einen wird ein Zusammenhang zur Exposition gegenüber UV-Licht vermutet, zum Anderen konnte vielfach bewiesen werden, dass auch die genetische Prädisposition eine entscheidende Rolle in der Melanomentwicklung spielt (Curtin *et al.*, 2005).

Risikofaktoren, die zur Entwicklung eines Melanoms prädisponieren, lassen sich im Wesentlichen in zwei Gruppen einteilen: Umwelteinflüsse und genetische Faktoren. Dabei ist auch das Zusammenspiel beider Faktoren von Bedeutung.

1.4 Umweltbedingte Risikofaktoren

Sonnenlicht stellte sich bereits früh als ein wichtiger Faktor für die Entstehung von Hautkrebs heraus. Schon vor hundert Jahren hatte man beobachtet, dass aus Großbritannien stammende Auswanderer in Australien deutlich häufiger Melanome entwickelten als ihre in der Heimat zurückgelassenen Verwandten (Gilles *et al.*, 1988). Neuere epidemiologische Studien konnten beweisen, dass die Exposition mit UV B- (260-320 nm) und UV A- (320-400 nm) Strahlung der wichtigste karzinogene Umweltfaktor für die Entwicklung von sporadischen Melanomen ist (van Schranke *et al.*, 2005).

UV-Licht verursacht genetische Mutationen in der Haut, beeinflusst die kutane Immunfunktion, erhöht die lokale Produktion von Wachstumsfaktoren und induziert die Formation von Sauerstoffradikalen, die Melanozyten und Keratinozyten schädigen (Thomson *et al.*, 2005). Durch ihren direkten mutagenen Effekt auf die DNA und den Verlust von Adhäsionsrezeptoren können sich Melanozyten der Kontrolle durch Keratinozyten entziehen, proliferieren daraufhin und breiten sich in der Epidermis aus (Thomson *et al.*, 2005).

Das UV Spektrum des Sonnenlichts ist in drei Wellenlängen unterteilt: UVC (200-290 nm), UVB (290-320 nm) und UVA (320-400 nm). UVC wird vollständig durch die Erdatmosphäre absorbiert, UVB wird teilweise durch die Ozonschicht absorbiert, wohingegen UVA nicht absorbiert wird. UVA und UVB werden deshalb für die Melanom induzierenden Schäden verantwortlich gemacht.

Epidemiologische Studien konnten zeigen, dass multiple Sonnenbrände in jedem Lebensalter das Risiko an einem Melanom zu erkranken fast verdoppeln (Elwood und Jopson, 1997). Von besonderer Bedeutung scheint hierbei eine intensive intermittierende UV-Exposition auf nicht an Sonnenlicht gewöhnte Haut zu sein (Gandini *et al.*, 2005). Die Anzahl und die Intensität der Sonnenbrände, die ein Individuum von Kindheit bis ins junge Erwachsenenalter

erleidet, scheint hier ebenfalls von Bedeutung zu sein (Garbe, 1995; McKie, 1989). Doch auch eine lebenslang hohe UV-Belastung und multiple Sonnenbrände im Erwachsenenalter erhöht signifikant das Risiko, an einem Melanom zu erkranken (Autier und Dore, 1998).

Melanome werden nach Lokalisation und damit verbunden nach Menge der Sonnenexposition unterschieden. Bei Melanomen der Kopf-Hals-Region geht man von einer chronischen Sonnenexposition aus. Melanome der Rumpfhaut waren intermittierender Sonnenbestrahlung ausgesetzt und Melanome, die auf Schleimhäuten entstanden sind, waren vor jeglicher UV-Strahlung geschützt. Auf intermittierend sonnenexponierter Haut entwickeln sich am häufigsten Melanome. Bei Frauen finden sie sich bevorzugt an den Beinen, bei Männern häufiger am Rücken. Menschen, die chronisch Sonnenlicht ausgesetzt sind, weil sie zum Beispiel hauptsächlich im Freien arbeiten, entwickeln hingegen seltener Melanome (Elwood und Jopson, 1997).

1.5 Genetische Risikofaktoren

1.5.1 Suszeptibilitätsgene in erblich bedingten Melanomen

Bereits 1857 konnte Norris als Erstbeschreiber des malignen Melanoms, das gehäufte Auftreten von Hautkrebs in einigen Familien dokumentieren. Heute weiß man, dass eine positive Familienanamnese für Melanome einer der wichtigsten Risikofaktoren für die Entwicklung von Hautkrebs ist (Cho *et al.*, 2005).

In bis zu 10% der Fälle treten Melanome im Rahmen einer positiven Familienanamnese als genetisch bedingte Läsion auf (Meyer und Zone, 1993). Im Falle der erblich bedingten Melanome konnten verschiedene Gendefekte identifiziert werden, die als Keimbahnmutationen auf folgende Generationen vererbt werden. In 20-40% der Fälle (Goldstein, 2004) konnte eine Mutation im „cyclin-dependent kinase inhibitor 2a“-Gen (CDKN2A) für die erhöhte Melanominzidenz verantwortlich gemacht werden, welches auf dem kurzen Arm

von Chromosom 9 lokalisiert ist. Hierbei handelt es sich um eine „loss of function“ (Park, 1998) Mutation.

Als Tumorsuppressorgen kodiert CDKN2A die zwei Proteine p16^{INK4a} und p14^{ARF} (alternative reading frame), welche beide als negative Regulatoren im Zellzyklus fungieren (High und Robinson 2007). Der Wildtyp des P16^{INK4a} inhibiert die „cyclin-dependent kinase 4“ (CDK4), welche mit Cyclin D einen Komplex eingeht und so das Retinoblastom Protein (Rb) zu phosphorylieren vermag. In diesem Zustand führt Rb die entsprechende Zelle in die S-Phase des Zellzyklus (Serrano *et al.*, 1993). Das alternative Spleissprodukt P14^{ARF} inhibiert indirekt den Abbau von p53 (Kamijo *et al.*, 1998). Auch hierdurch kommt es zu einer gesteigerten Proliferation und einer besseren Überlebensfähigkeit entsprechender Zellen mit defekter DNA. Im Wildtyp sind beide Proteine dafür verantwortlich den Zellzyklus an Kontrollpunkten zu arretieren. Menschen mit Mutationen im CDKN2A Gen haben ein bis zu 70% erhöhtes Risiko ein malignes Melanom zu entwickeln (High und Robinson, 2007). Es konnte sogar gezeigt werden, dass bei familiären Melanomen, die die CDKN2A Mutationen aufweisen, die Tumordicke direkt mit Abnahme der Expression von p16 in Assoziation steht (Ghizoro *et al.*, 2004).

Auch eine Keimbahnmutation im „cyclin dependent kinase 4-Gen“ (CDK4) führt durch Beeinträchtigung des Retinoblastom-Protein-(Rb)-Signalwegs zur unkontrollierten Proliferation der Zellen (High und Robinson, 2007).

Einige Merkmale, wie blaue Augen oder rote Haare, korrelieren ebenfalls mit einem erhöhten Risiko an einem Melanom zu erkranken. Auf molekularer Ebene wird eine vermehrte Pigmentierung der Haut als Reaktion auf Sonnenlicht durch das Melanozyten stimulierende Hormon (α -MSH) bewirkt, indem es den Melanocortin-1-Rezeptor (MC1R) anregt. Hierdurch werden vermehrt Proteine produziert, die in die Melaninproduktion involviert sind. Rothaarige oder hellhäutige Menschen tragen häufig eine Keimbahnmutation im MC1R Gen (Valverde *et al.*, 1995). Eine solche Mutation erhöht das Risiko zur Entwicklung eines Melanoms deutlich, da Melanin als wichtigster Schutzfaktor

der Haut nur in verminderter Menge synthetisiert werden kann. In 50-60% der familiär bedingten Melanome konnte bisher allerdings keine der oben genannten Mutationen identifiziert werden (High und Robinson, 2007).

Auch wenn Tests zur Mutationsanalyse bereits zur Verfügung stehen und bewiesen werden konnte, dass der Einfluss von Genen auf die Pathogenese von Melanomen eine entscheidende Rolle spielt, empfiehlt das International Melanoma Genetics Consortium bisher eine Mutationstestung nur innerhalb von klinischen Studien durchzuführen (Hansen *et al.*, 2004; Keffort *et al.*, 2002)

1.5.2 Erworbene Mutationen und Signalwege in der Melanomgenese

Bei sporadisch auftretenden Melanomen betreffen die Mutationen, die dann an alle Abkömmlinge weitergegeben werden, eine einzelne Zelle, oder aber sehr wenige Zellen. (Gray-Schopfer *et al.*, 2007). Solche somatischen Mutationen können durch UV-Strahlung ausgelöst werden (Ivry *et al.*, 2006). Hierbei werden vor allem Gene aktiviert, die die Zellproliferation begünstigen. Schon durch Mutationen in einem Allel kann sich die Veränderung phänotypisch auswirken (Park, 1998). Derartig mutierte Gene werden als Onkogene bezeichnet (Bishop, 2006). Eine wichtige Rolle spielt hierbei vor allem der MAPK (mitogen-activated protein kinase) Signalweg (Abbildung. 2). Dieser, auch bekannt als RAS/MAF/MAPK-Signalweg, setzt sich aus einer Kaskade signalübertragender Proteine zusammen. Der MAPK-Signalweg ist nicht nur an der Pathogenese des Melanoms, sondern auch für die Entstehung vieler anderer Tumoren von Bedeutung (Fecher *et al.*, 2008).

Als Reaktion auf exogene Reize reguliert der MAPK-Signalweg (Abbildung 2) eine Reihe von zellulären Prozessen wie Proliferation, Differenzierung oder Apoptose. Der Signalweg wird initiiert, indem unterschiedliche Wachstumsfaktoren membranständige Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) stimulieren, die ihrerseits Ras, ein kleines G-Protein mit drei Isoformen (HRAS, KRAS und NRAS), aktivieren (Peyssonnaud und Eychene, 2001). Nun kann

Ras einen Komplex mit einem Protein aus der RAF-Familie (ARAF, BRAF und CRAF) eingehen (Avruch *et al.*, 2001). Dieser Komplex kann die Serin-Kinase MEK, welche in zwei Isoformen existiert (MEK1 und MEK2), phosphorylieren. Hierdurch wird MEK dazu gebracht, MAPK mit den Isoformen MAPK3 und MAPK 1 zu phosphorylieren, die ihrerseits wiederum ERK1 und ERK2 phosphorylieren und dadurch aktivieren. Letztlich aktivieren ERK1 und ERK2 Transkriptionsfaktoren, die die Proliferation anregen (Peyssonnaud und Eychene, 2001).

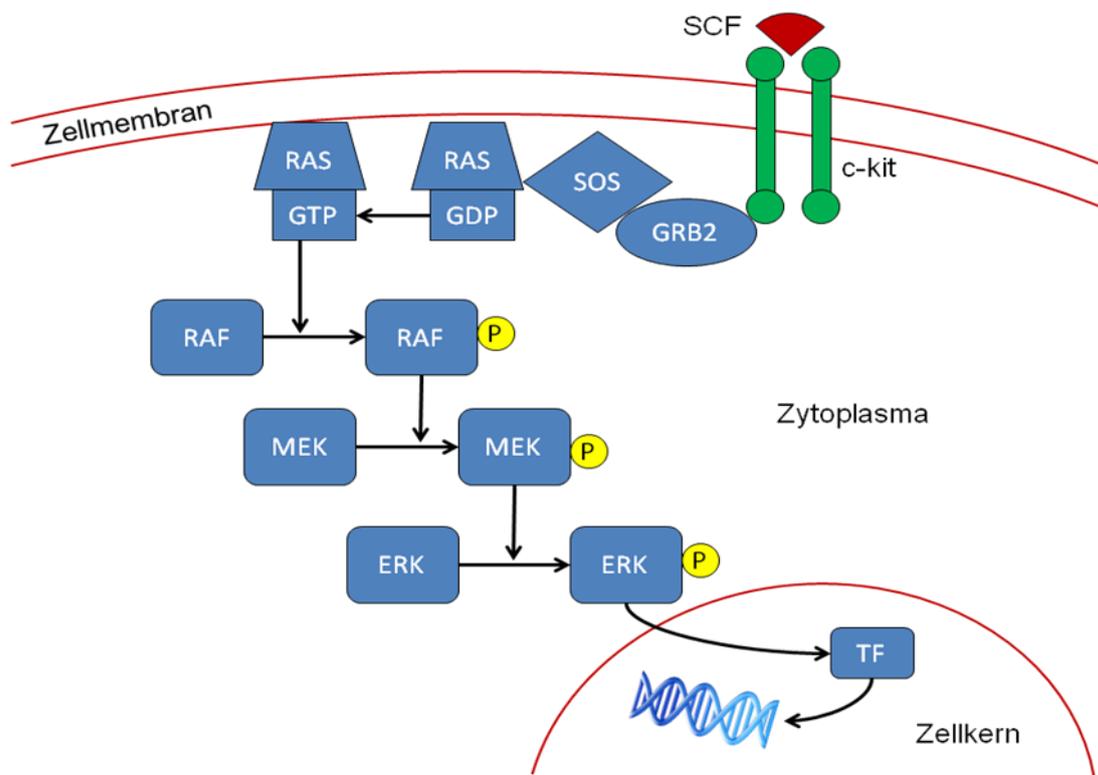


Abbildung 2: MAPK Signalweg.

Einige Veränderungen der einzelnen Komponenten des MAPK-Signalweges führen zu einer Hyperphosphorylierung von MAPK und bilden damit die Basis für die außer Kontrolle geratene Zellproliferation von bis zu 90% aller Melanome (Cohen *et al.*, 2002).

1.5.2.1 BRAF

Seit der Entdeckung des BRAF Gens (Davies *et al.*, 2002) konnten Mutationen in einer Vielzahl von Karzinomen gefunden werden. Bei Melanomen wurden in 20-80% der Fälle BRAF Mutationen nachgewiesen (Libra *et al.*, 2005; Maldonado *et al.*, 2003; Davies *et al.*, 2002). Es wurden über 30 verschiedene BRAF Mutationen identifiziert. Die mit 90% am häufigsten auftretende BRAF Mutation ist durch eine Punktmutation im Exon 15 mit einem Austausch von Adenin gegen Thymin im Codon 1796 (A1796T) verursacht, wodurch es zum Austausch von Valin gegen Glutamat an Position 600 im Protein kommt (V600E Mutation) (Davies *et al.*, 2002). Hieraus ergibt sich eine anhaltende Aktivität der Kinase (Garnett und Marais, 2004).

Die hohe Prävalenz von BRAF Mutationen bei Melanomen im Vergleich zu nicht melanozytären Krebsarten legt die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um eine durch UV-Strahlung induzierte Mutation handeln könnte. Dieser Verdacht wird durch die Tatsache bestärkt, dass BRAF Mutationen häufiger in Melanomen nachgewiesen werden konnten, die von Körperregionen mit intermittierender Sonnenexposition stammen (59%), verglichen mit Melanomen, die auf der Schleimhaut entstehen (11%) (Maldonado *et al.*, 2003; Edmunds *et al.*, 2003). Auf chronisch sonnenexponierter Haut zeigen Melanome hingegen nur in 11% der Fälle eine BRAF V600E Mutation (Maldonado *et al.*, 2003). Trotz Abwesenheit der typischen durch UV Licht induzierten C → T oder CC → TT Mutationen (Daya-Grosjean *et al.*, 1995) sprechen diese Daten für einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer BRAF Mutation und UV Exposition. Letztlich ist bis heute die Rolle des UV Lichtes in diesem Zusammenhang jedoch nicht vollständig verstanden.

Auch in gutartigen melanozytären Tumoren, den Nävi, finden sich sehr häufig aktivierende BRAF Mutationen (Pollock *et al.*, 2003). Da der Großteil der melanozytären Nävi nicht entarten (Pollock *et al.*, 2003), drängt sich der Verdacht auf, dass zusätzliche genetische Ereignisse notwendig sind, um eine

maligne Transformation zu erreichen. Im Zebrafisch-Modell konnte gezeigt werden, dass eine BRAF Mutation allein keine maligne Transformation von Melanozyten bewirkt. Hier führte die V600E Mutation lediglich zur Entwicklung von multiplen melanozytären Nävi, wohingegen die Progression zum malignen Melanom nur in Kooperation mit einem p53 Defekt möglich war (Patton *et al.*, 2005).

1.5.2.2 NRAS

Erste Beobachtungen zu dem Vorkommen von aktivierenden RAS Genen im humanen Melanom wurden 1984 veröffentlicht. Sekiya *et al.* (Sekiya *et al.*, 1984) ermittelten die Nukleotidsequenz des *c-Ha-RAS-1* Gens, das in einem Melanom eines Patienten aus Japan aktiviert war. 1984 konnten Albino *et al.* in 4 von 30 untersuchten Melanomen aktivierende Mutationen im RAS Gen nachweisen. Hierbei handelte es sich um Veränderungen in der Isoform NRAS, die daraufhin als erstes Proto-Onkogen bei Melanomen etabliert werden konnte (Albino *et al.*, 1984). Veränderungen in den Isoformen KRAS oder HRAS sind bei Melanomen hingegen sehr selten. Es wird je nach Quelle von Häufigkeiten zwischen 5 und 36% beim malignen Melanom berichtet (Albino *et al.*, 1989; Van't Veer *et al.*, 1989; Demunter, *et al.*, 2001). Mutationen treten vor allem im Codon 61 des NRAS Gens auf und repräsentieren missense Mutationen: CAA (Glutamin) zu CGA (Arginin) (Q61R), bzw. CAA (Glutamin) zu AAA (Lysin) (Q61K) (Whitwam *et al.*, 2007). NRAS ist eine GTPase. Eine Aktivierung findet durch extrazelluläre Signale statt. Kommt es zur aktivierenden Mutation, führt diese zu einer andauernden Tätigkeit des Proteins und somit zur Initialisierung des MAPK-Kinase-Signalwegs.

Die Häufigkeit mit der NRAS Mutationen beim Melanom nachgewiesen werden konnten, variieren hierbei zwischen 5 und 36% (Albino *et al.*, 1989; Platz *et al.*, 1996). Die Diskrepanz der Mutationsfrequenzen in unterschiedlichen Quellen kann teilweise durch abweichende Screening Methoden erklärt werden, aber auch durch die unterschiedliche Auswahl der untersuchten Melanome. Die

Mutationen konnten häufiger auf chronisch sonnenexponierter Haut nachgewiesen werden (Van't Veer *et al.*, 1989). Die auslösenden Mutationen betreffen vor allem Genabschnitte, welche besonders pyrimidinreich sind. Hier kommt es zur Bildung von Pyrimidin-Dimeren, was ein typischer durch UV-Strahlung induzierter Schaden ist.

Melanome besitzen entweder BRAF oder NRAS Mutationen. Es konnte mit wenigen Ausnahmen keine Koexistenz beider genetischer Ereignisse in ein und demselben Melanom nachgewiesen werden (Curtin *et al.*, 2005).

1.5.2.3 c-KIT

c-KIT ist auf dem humanen Chromosom 4q11-q12 lokalisiert (d'Auriol *et al.*, 1988) und kodiert für eine Rezeptor-Tyrosin-Kinase. Als Ligand konnte der Stammzellofaktor SCF identifiziert werden (Columbo *et al.*, 1990), welcher bei Bindung eine Dimerisierung und Autophosphorylierung des Rezeptors bewirkt. Hierdurch kommt es unter anderem zu einer Aktivierung verschiedenster intrazellulärer Signalwege, hierunter auch die Aktivierung des MAPK Signalweges (Grichnik, 2006).

Der c-KIT-Rezeptor ist in der Haut vermehrt in der basalen Epidermis und den Haarfollikeln nachweisbar (Lammie *et al.*, 1994) und ist an der Genese, Differenzierung, Proliferation und dem Überleben von multiplen Zellen beteiligt. Zudem ist er maßgeblich für die Migration von embryonalen Melanoblasten und für die Differenzierung von Melanozyten verantwortlich (Mayer und Green, 1968).

Der Signalweg von c-KIT hat auch beim malignen Melanom eine besondere Bedeutung und wurde in der Vergangenheit kontrovers diskutiert. Die ersten Studien, die sich mit dem c-kit Rezeptor beim malignem Melanom befassten, konnten zeigen, dass mit fortschreitender Tumorprogression die c-KIT Expression verloren geht (Easty und Bennett, 2000) und dass eine

Überexpression von KIT das Wachstum von Melanomzellen in vivo und in vitro unterdrücken kann (Huang *et al.*, 1996). So ist bei der Mehrzahl der metastasierten Melanome keine Expression des c-kit Rezeptors mehr vorhanden (Lassam und Bickford, 1992). Allerdings konnten neuere Studien zeigen, dass aktivierende c-KIT Mutationen in Melanomen nachweisbar waren, die negativ für NRAS oder BRAF Mutationen waren. Diese Tatsache weist darauf hin, dass eine konstitutive Aktivierung von c-KIT funktionell äquivalent zur dauerhaften Aktivierung von BRAF und NRAS sein könnte, und sie führt ebenso zur Aktivierung des MAPK Signalweges (Curtin *et al.*, 2006).

KIT Mutationen konnten in besonders hoher Frequenz bei Melanomen nachgewiesen werden, die auf Körperregionen mit geringer oder fehlender Sonneneinstrahlung entstanden sind, wie den Fußsohlen, Handflächen (akrale Melanome) und den Schleimhäuten (mukosale Melanome) (Curtin *et al.*, 2006). Eine Erklärung auf molekularer Ebene gibt es hierfür allerdings noch nicht. Die weitere Erforschung der Bedeutung des c-kit Rezeptors für Melanome ist von besonderem Interesse, weil ein therapeutischer Ansatz mit Rezeptor-Tyrosin-Kinase-Inhibitoren wie Imatinib hier möglich ist.

1.5.2.4 Mikrosatelliteninstabilitäten (MSI) und „Loss of Heterozygosity“ (LOH)

Mikrosatelliten sind repetitive DNA Sequenzen, die aus 10-60 Kopien (Beckmann und Weber, 1992) von 1-5 Basenpaaren bestehen und über das gesamte Genom verteilt sind. Viele dieser Mikrosatelliten sind hochpolymorph, d.h. es existieren sehr häufig viele Allele eines Genortes (Saletti *et al.*, 2001). Sie treten alle 50-100 Basenpaare auf, bestehen meist aus „CA“ Wiederholungssequenzen und machen ca. 1% der DNA aus. Mikrosatelliten kodieren nicht für Proteine, es wird vermutet, dass sie an der Genregulation beteiligt sind.

Kommt es zu somatischen Variationen innerhalb der repetitiven Elemente, durch Deletion, Insertion bzw. fehlerhafte DNA Replikation und werden diese

nicht durch DNA Reparaturmechanismen erkannt und behoben, können sogenannte instabile Mikrosatelliten entstehen (MSI). Der Nachweis eines instabilen Mikrosatelliten gibt also direkte Hinweise auf Defekte im DNA Reparatursystem. Instabile Mikrosatelliten konnten beim primären Malignen Melanom in 8-37% der Fälle nachgewiesen werden, bei atypischen Nävi mit einer Häufigkeit von 9-50% und bei gutartigen melanozytären Nävi in 0-32% der Fälle (Hussein *et al.*, 2002). Neoplasien, die durch instabile Mikrosatelliten charakterisiert sind, zeigen häufiger eine distinkte Klinik bzw. distinkte pathologische und molekulare Eigenschaften. Der vollständige Verlust eines der beiden Allele eines Mikrosatelliten wird demgegenüber als „Loss of Heterozygosity“ (LOH) bezeichnet.

1.6 Klinik und Histopathologie

1.6.1 Klassifizierung der wichtigsten Melanomtypen

Das maligne Melanom lässt sich klinisch und histologisch in vier unterschiedliche Hauptgruppen einteilen (Abbildung 3- 6): Das superfiziell spreitende Melanom (SSM), das Lentigo-maligna Melanom (LMM), das akral-lentiginöse Melanom (ALM) und das noduläre Melanom (NM) (Clark *et al.*, 1979)



Abbildung 3: Superfiziell spreitendes Melanom (SSM)



Abbildung 4: Lentigo-maligna Melanom (LMM)



Abbildung 5: Akral-lentiginöses Melanom (ALM)



Abbildung 6: Noduläres Melanom (NM)

Subtypen kutaner maligner Melanome		
Typ	Prozentualer Anteil	Medianes Alter
Superfiziell spreitendes Melanom	SSM 57,4%	51 Jahre
Noduläres Melanom	NM 21,4%	56 Jahre
Lentigo-maligna-Melanom	LMM 8,8%	68 Jahre
Akral-lentiginöses Melanom	ALM 4,0%	63 Jahre
Nicht klassifizierbares Melanom	UCM 3,5%	54 Jahre
Sonstige	4,9%	54 Jahre

Tabelle 1: Klinisch-histopathologische Subtypen kutaner maligner Melanome im deutschsprachigen Raum Europas. Ergebnisse des Zentralregisters Malignes Melanom der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft 1983 - 1995 (n = 30.015) (Garbe 2003).

Einige Melanome lassen sich in keine der vier Gruppen einteilen. Beispiele hierfür sind amelanotische Melanome, mukosale Melanome oder extrakutane Melanome, die zusammengezählt 5% aller Melanome ausmachen.

1.6.2 Histopathologie und Prognose

Folgende histopathologische Kriterien werden zur Diagnose des malignen Melanoms herangezogen (Maize und Ackermann, 1987):

- Atypische Melanozyten, die sich zu einer asymmetrischen Läsion zusammenfinden und sich durch große, pleomorphe und hyperchromatische Nuclei auszeichnen. Die Melanozyten sind entweder in Nestern lokalisiert, oder sie befinden sich als Einzelzellen an der dermo-epidermalen Grenze (Abbildung 7 und 8). Die Tumorzellen sind in

der gesamten Epidermis vorhanden (full thickness atypia) und zeigen eine Aufwärtmigration.

- Die Tumorzellen in der Dermis zeigen eine gesteigerte Anzahl von Mitosen und keine Anzeichen für eine Auseifung.
- Invasives Wachstum ist erreicht, wenn die entarteten Melanozyten die Basalmembran überschreiten. Sie zeichnen sich hier durch Wachstum in Nestern und Strängen aus, die bis in die Dermis reichen, in einigen Fällen sogar in die Subkutis infiltrierend.
- Häufig lässt sich Pigmentinkontinenz und ein asymmetrisch verteiltes (Abbildung 11) inflammatorisches Infiltrat (Abbildung 12) nachweisen.
- Die Melanomzellen selbst zeigen keine einheitliche Form.

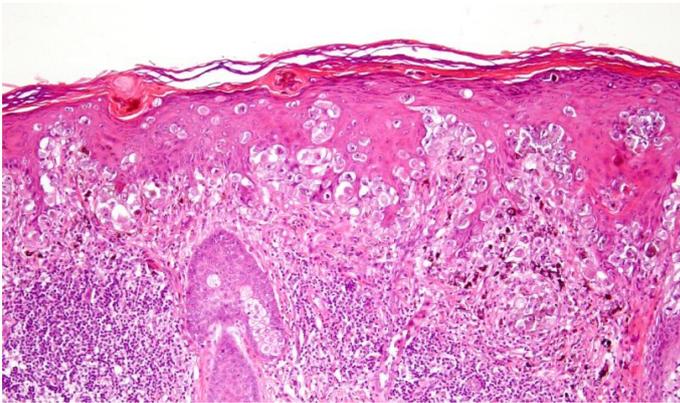


Abbildung 7: Histopathologie des Melanoms: Atypische Melanozyten in allen Epidermislagen.

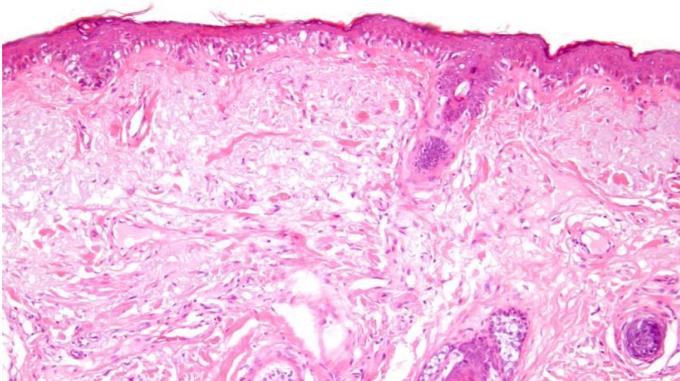


Abbildung 8: Histopathologie des Melanoms: Atypische Melanozyten verteilt und als Einzelzellen an der dermo-epidermalen Junctionszone angeordnet.

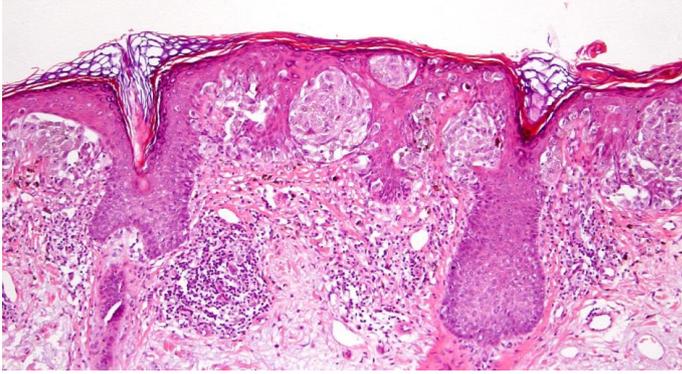


Abbildung 9: Histopathologie des Melanoms: Melanozyten in Nestern an der dermo-epidermalen Junctionszone sowie suprabasal angeordnet.

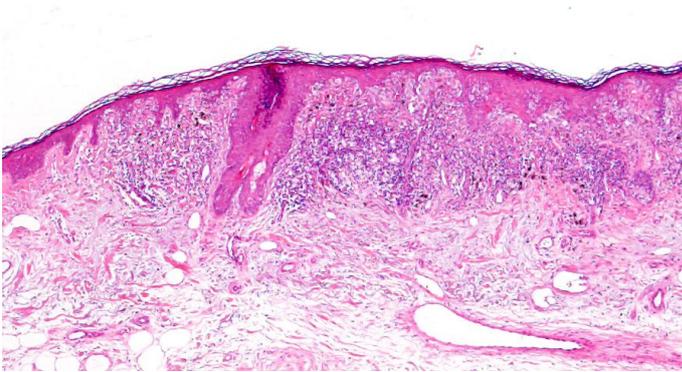


Abbildung 10: Histopathologie des Melanoms: Der Tumor ist nach lateral unscharf begrenzt

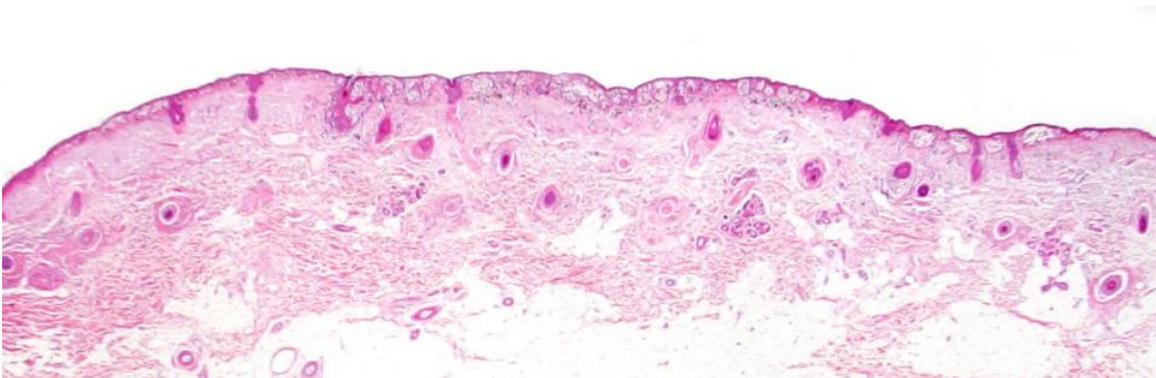


Abbildung 11: Histopathologie des Melanoms: Der Tumor ist asymmetrisch.

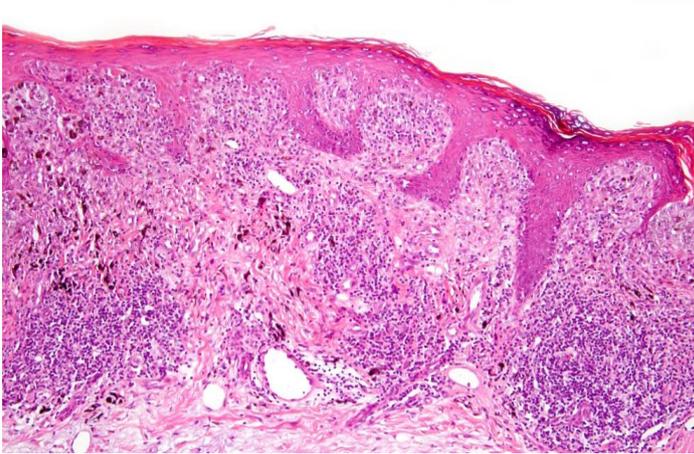


Abbildung 12: Histopathologie des Melanoms: Es findet sich ein inflammatorisches Infiltrat und Pigmentinkontinenz.

Die histopathologische Untersuchung des malignen Melanoms ist von besonderer Bedeutung, weil sie die einzige Methode darstellt, die klinische Diagnose zu bestätigen und wichtige Tumorparameter, wie Tumordicke nach Breslow, die Anzahl der Mitosen pro mm^2 , sowie die Eindringtiefe nach Clark zu bestimmen. Diese Parameter sind von höchster Wichtigkeit für Therapie und Prognose (Buzaid und Anderson, 2000). Unten aufgelistet finden sich die wichtigsten prognostischen Kriterien für Melanome ohne Lymphknoten- oder Fernmetastasen nach Rangfolge sortiert (Hengge und Dummer, 2006):

- Die Messung der vertikalen Tumordicke nach Breslow (Tabelle 2) wurde 1970 (Breslow, 1970) eingeführt. Im histologischen Präparat wird von der oberen Granularzellschicht der Epidermis bis zum tiefsten Punkt der Tumorinvasion gemessen. Anhand vieler Studien konnte gezeigt werden, dass die Tumordicke der wichtigste Faktor für prognostische Aussagen für Melanome im Stadium I und II ist (Balch *et al.*, 2001).

Vertikale Tumordicke nach Breslow		
T-Stadium	Tumordicke nach Breslow	10 Jahre Überlebensrate
pT1	MIS, <0,76 mm	97% 10 JÜR
pT2	0,76-1,5 mm	90% 10 JÜR
pT3	1,5-4 mm	65% 10 JÜR
pT4	> 4mm	50% 10 JÜR

MIS= Melanoma in situ, 10 JÜR= 10 Jahre Überlebensrate

Tabelle 2: Vertikale Tumordicke nach Breslow (Garbe 2003).

- Mitoserate pro mm²: Die Proliferationsrate des Tumors, definiert durch die Anzahl der Mitosen pro mm², stellte sich als unabhängiger Faktor mit prognostischer Aussagekraft heraus. In multiplen statistischen Analysen durch das AJCC zeigte sich eine statistisch hoch signifikante Korrelation zwischen steigender Anzahl von Mitosen pro mm² und sinkenden Überlebensraten. In einer multifaktoriellen Analyse von 10233 Patienten aus den Datenbanken des AJCC zum Staging von Melanomen, stellte sich die Mitoserate als zweitaussagekräftigster prognostischer Parameter heraus (Balch *et al.*, 2009).
- Das Vorhandensein von Ulzerationen stellt den drittwichtigsten prognostischen Faktor dar. Zeigt sich beim Primärtumor eine Ulzeration, bedeutet das ein biologisch aggressiveres Tumorwachstum; die 5 JÜR sinkt im Stadium I von 80% auf 55% und im Stadium II von 53% auf 12% (Balch *et al.*, 1980).
- Mit zunehmendem Alter der Patienten bei Diagnosestellung konnte ein kontinuierlicher Rückgang des rezidiv-freien Überlebens festgestellt werden (Austin *et al.*, 1994). Auch wenn Melanome bei älteren Patienten zum Zeitpunkt der Primärdiagnose dicker und häufiger ulzeriert sind, konnte in großen Studien gezeigt werden, dass Alter ein unabhängiger prognostischer Faktor ist (Balch, 1992).
- Lokalisation des Primärtumors: Melanome am Körperstamm, Hals oder auf der Kopfhaut sind mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Garbe *et al.*, 1995) als Melanome der Extremitäten.

- Das Invasionslevel nach Clark (Tabelle 3) wurde 1969 zur histopathologischen Diagnostik durch Clark (Clark *et al.*, 1969) eingeführt. Es werden fünf verschiedene Level unterschieden. Die Einteilung nach Clark hat zwar eine zusätzliche, jedoch eine geringfügigere prognostische Bedeutung als die des Breslow-Index. Einige Studien beschäftigten sich mit der prognostischen Bedeutung des Invasionslevels in Abhängigkeit von der Tumordicke und konnten zeigen, dass die Invasionsstufe nur bei einer Eindringtiefe von < 1mm einen signifikanten Einfluss auf die Prognose hatte (Büttner *et al.*, 1995). Dieses Erkenntnis wurde bis 2009 bei der Festlegung der AJCC-Klassifikation berücksichtigt, so dass das Invasionslevel nach Clark nur bei Melanomen mit einer Tumordicke von < 1 mm zur Klassifizierung herangezogen wurde. In der 7. Version der 2009 von Balch *et al.* überarbeiteten AJCC Melanoma Staging Klassifikation (Balch *et al.*, 2009) wurde die Eindringtiefe nach Clark durch die Mitoserate pro mm² zur Subklassifizierung von Melanomen in einer Tumordicke von < 1mm ersetzt.

Invasionslevel nach Clark	
Clark Level I	Epidermis infiltriert, Basalmembran intakt
Clark Level II	Tumorinfiltration bis ins Stratum papillare
Clark Level III	Tumorinfiltration bis zur Grenze Stratum papillare /reticulare
Clark Level IV	Tumor bis ins Stratum reticulare

Tabelle 3: Invasionslevel nach Clark, (Clark *et al.*, 1969).

- Das Geschlecht eines Patienten spielt für das Überleben eine Rolle: In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass männliche Patienten eine signifikant schlechtere Prognose haben als weibliche Patienten (Garbe *et al.*, 1995).

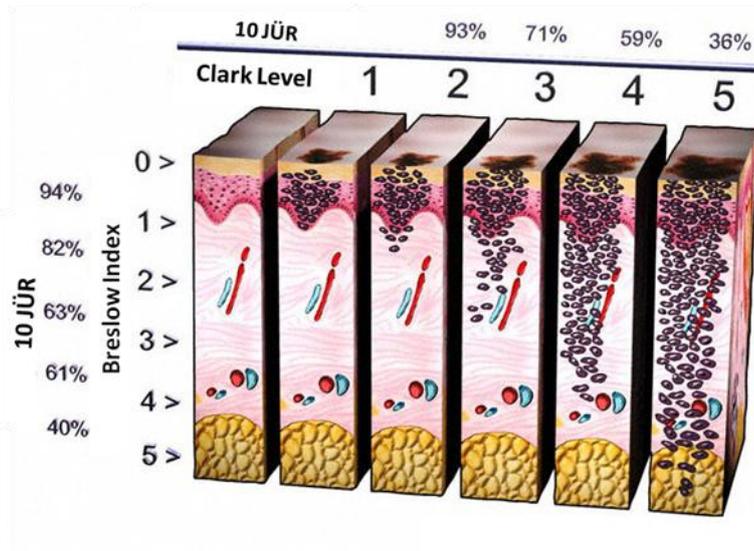


Abbildung 13: Clark Level und Breslow Index (www.med-ars.it).

1.6.3 Stadieneinteilung des malignen Melanoms

Das American Joint Committee on Cancer (Balch *et al.*, 2009) stellte 2009 die siebte überarbeitete Version eines Schemas vor, das zum Staging von Malignen Melanomen dient (Tabelle 4).

Die Anzahl der Mitosen pro mm^2 wurde hierbei als zusätzliches Einteilungskriterium für Tumoren mit einer Tumordicke von $<1\text{mm}$ (T1 Melanome) benutzt. Die Überschreitung des Grenzwertes von ≥ 1 Mitose pro mm^2 führt zu einer Hochstufung von T1a zu T1b. Das Vorhandensein einer Ulzeration führt in allen T-Stadien zur Hochstufung.

Das N-Stadium wird durch die Anzahl der befallenen Lymphknoten bestimmt. Die Anzahl der befallenen Lymphknoten stellt primär den wichtigsten prognostischen Faktor dar (Roses *et al.*, 1985). Die Metastasierung kann mikroskopisch bei der Schildwächterlymphknoten-Biopsie oder nach elektiver Lymphknotendissektion nachgewiesen werden. Als Makrometastasen bezeichnet man Befunde, die sich schon vor histopathologischer Untersuchung klinisch und/oder radiologisch, als auffällig darstellen.

Mikrometastasen sind hingegen klinisch oder radiologisch nicht feststellbar und werden erst nach histopathologischer Untersuchung von operativ entnommenen Lymphknoten festgestellt. Der prognostische Unterschied zwischen Mikro- und Makrometastasen ist signifikant (Cascinelli *et al.*, 2000). Seitdem immunohistochemische Methoden zum Nachweis von Mikrometastasen zur Verfügung stehen, sind Lymphknotenmetastasen schon festzustellen, wenn sie nur aus einem Aggregat von wenigen Tumorzellen bestehen (Ohsie *et al.*, 2008). In der 7. überarbeiteten Version der AJCC Klassifikation von 2009 wurde die Diagnose einer Lymphknotenmetastase auf der Basis von immunohistochemischen Methoden möglich, wenn die Diagnose auf wenigstens einem für das Melanom positiven Marker (z.B. HMB-45, Melan-A oder MART 1) basiert und wenn die Zellen morphologisch maligne Eigenschaften aufweisen.

In-transit und Satelliten-Metastasen gehören zu den intralymphatischen Metastasen. Bei Satellitenmetastasen handelt es sich um Tumoren, die nach Primärexzision bis zu 2 cm von der Lokalisation des Primärtumors entfernt auftreten. Bei in-transit Metastasen befindet sich der Tumor zwischen der Primärlokalisierung und dem ersten befallenen Lymphknoten.

Die M-Klassifikation erfolgt nach Lokalisation der Metastasen und Berücksichtigung der Serum LDH Werte. Hier wurde bei Elevation, unabhängig von Ort und Anzahl der Metastasen, eine Einteilung in Klasse M2c vorgenommen, weil einige Studien zeigen konnten, dass eine Erhöhung der LDH Werte zu den unabhängigsten prädiktiven Werten zählt und sich mit Anstieg dieses Parameters die Prognose rapide verschlechtert (Franzke *et al.*, 1998; Eton *et al.*, 1998).

Dieses System formt den Grundstein für die Klassifizierung von Melanomen und ist in der folgenden Tabelle aufgeführt:

TNM Klassifikation für Melanome

	Primärtumor
pTx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
pTis	Melanoma in situ (Clark- Level I) ;atypische Melanozytenhyperplasie, schwere Melanozytendysplasie, keine invasive maligne Läsion
pT1	< 1mm
pT1a	keine Ulzeration, < 1 Mitose mm ²
pT1b	mit Ulzeration oder ≥ 1 Mitose mm ²
pT2	1,01- 2 mm
pT2a	ohne Ulzeration
pT2b	mit Ulzeration
pT3	2,01- 4 mm
pT3a	ohne Ulzeration
pT3b	mit Ulzeration
pT4	> 4 mm
pT4a	ohne Ulzeration
pT4b	mit Ulzeration

N-Stadium	Ausmaß der befallenen Lymphknoten
Nx	Lymphknotenstatus nicht beurteilbar
N1	1 Lymphknoten befallen
N1a	Mikrometastase
N1b	Makrometastase
N2	2-3 Lymphknoten befallen
N2a	Mikrometastase
N2b	Makrometastase
N2c	In-transit oder Satellitenmetastasen, ohne Befall regionaler Lymphknoten
N3	≥ 4 Lymphknotenmetastasen oder in-transit/ Satellitenmetastasen mit Befall regionaler Lymphknoten oder Lymphknotenkonglomerate

M-Status	Lokalisation	LDH (Laktatdehydrogenase)
M0	Fernmetastasierung nicht beurteilbar	
M1a	Befall von Kutis, Subkutis, oder Lymphknoten jenseits der regionalen Lymphknoten	Normal
M1b	Lungenmetastasen	Normal
M1c	-alle anderen viszerale Organe, -alle Fernmetastasen	Normal Erhöht

Tabelle 4: TNM Klassifikation für Melanome (Balch *et al.*, 2009)

In der folgenden Tabelle (Tabelle 4) findet man einen Überblick über die Stadieneinteilung des Malignen Melanoms nach UICC 2009:

Stadieneinteilung des Malignen Melanoms nach UICC 2009			
Stadium	T-Status	N-Status	M-Status
Stadium 0	pTis	N0	M0
Stadium Ia	pT1a	N0	M0
Ib	pT1b	N0	M0
	pT2a	N0	M0
Stadium IIa	pT2b	N0	M0
	pT3a	N0	M0
IIb	pT3b	N0	M0
	pT4a	N0	M0
IIc	pT4b	N0	M0
Stadium IIIa	T1a-4b	N1a, N2a	M0
IIIb	T1a-4a	N1b, N2b,	M0
	T4a/b	N2c	M0
IIIc	T1a-4b	N1b, N2b	M0
	Jedes T	N3	M0
Stadium IV	Jedes T	Jedes N	M1

Tabelle 5: Stadieneinteilung des Malignen Melanoms (UICC/AJCC 2009).

UICC = Union Internationale Contre le Cancer, AJCC = American Joint Committee on Cancer, TNM = Tumor / Nodus / Metastase

2 MATERIALIEN UND METHODEN

2.1 Materialien

2.1.1 Patientenkollektiv

Als Untersuchungsmaterial diente die aus Tumorgewebe und der dazugehörigen Normalhaut extrahierte DNA von 65 Patienten. Diese Proben stammten aus dem Probenarchiv des Dermatologikum Hamburg. Es wurden Patienten einbezogen, deren Melanome von Januar 2001 bis Dezember 2008 entweder am Dermatologikum diagnostiziert wurden, oder von auswärtigen Praxen oder Kliniken ins dermatohistopathologische Labor des Dermatologikum eingeschickt wurden. Hierbei konnten folgende, schon zum Zeitpunkt der Diagnosestellung archivierten klinischen und histopathologischen Daten zur Charakterisierung der Melanome verwendet werden: Alter, Geschlecht, Geburtsdatum, Lokalisation des Primärtumors oder der Metastase, Breslow Index, Clark Level und das Vorliegen einer Ulzeration (Tabelle 6). 31 der einbezogenen Proben stammten von chronisch sonnenexponierter Haut des Kopf-Hals-Bereichs, die restlichen 34 Melanome waren auf intermittierend sonnenexponierten Körperstellen entstanden. 63 der Melanome waren als Primärtumore exzidiert worden, die restlichen drei Proben wurden aus kutanen Metastasen entnommen.

Patientendaten	
Anzahl der Patienten	65
Geschlecht	
- weiblich	18 (27,7%)
- männlich	47 (72,3%)
medianes Alter	67 Jahre
Lokalisation der Melanome	
- Kopf-Hals-Region	31 (47,7%)
- Körperstellen intermittierend sonnenexponierter Haut	34 (52,3 %)
Ulzeration	
- nicht ulzeriert	63 (95,5%)
- ulzeriert	3 (4,5%)

Tabelle 6: Patientendaten

2.2 Methoden

2.2.1 DNA Extraktion

Die 66 untersuchten Gewebeproben waren formalin-fixiert und in Paraffinblöcke eingebettet. Es wurden je zwei Schnitte (1x 10µm und 1x 4 µm) angefertigt. Die Schnitte wurden für 15 min bei 70 °C im Brutschrank inkubiert und anschließend für 15 min in Xylol (J.T. Baker, Netherlands) entparaffiniert. Der 4 µm Schnitt wurde hierauf in Hämalaun-Eosin (Merck, Darmstadt) gefärbt und als Kontrolle für die Extraktion verwendet. Die gefärbten Schnitte wurden von erfahrenen Dermatohistopathologen begutachtet und die Region, die für die Gewebeentnahme von Normalhaut- und Tumormaterial geeignet erschien, wurde markiert.

Nach Entparaffinierung wurden die 10 µm Schnitte in 100%igem Ethanol (Rotisol, Roth, Karlsruhe) gewaschen und an der Luft getrocknet. 5 µl DNA-Extraktionspuffer (90 µl Reaktionspuffer Y, Peqlab, Erlangen plus 10 µl Proteinase K, Qiagen, Hilden) wurde auf die entsprechend auf den HE-Schnitten gekennzeichneten Areale pipettiert (jeweils einmal Tumormaterial sowie einmal Normalhautmaterial). Nach ca. 5-10 min. Inkubation konnten die entsprechenden Areale abgelöst und in ein Eppendorfgefäß überführt werden. Der endgültige Verdau dieser Gewebebezirke erfolgte in einem Gesamtvolumen von 100 µl Extraktionspuffer für mindestens 24 Stunden bei 56 °C im Thermomixer (Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg). Anschließend wurde die Proteinase durch Inkubation bei 95°C für 20 Minuten inaktiviert. Für alle anschließenden Untersuchungen wurden diese DNA-Rohextrakte 1:2 in HPLC-Wasser (Roth, Karlsruhe) verdünnt und in den PCR Analysen eingesetzt. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20°C.

2.2.2 Detektion von BRAF Mutationen

2.2.2.1 TaqMan Real-time-PCR Assay

Zunächst wurden alle Proben im Doppelansatz mit einem TaqMan Real-time-PCR Assay auf eine der häufigsten Mutationen im Exon 15 des BRAF Genes, V600E, untersucht (Smyth *et al.*, 2005). Folgende Primer und Hybridisierungssonden wurden verwendet:

Primer:

Forward Primer: 5'-CATGAAGAC CTCACAGTAAAATAGGTGAT-3'

Reverse Primer: 5'-GGATCCAGACAACCTGTTCAAACCTGA-3'

Hybridisierungssonden:

Wildtyp: HEX-5'-CCATCGAGATTTCACTGTAG-3'-TAMRA

V600E-Mutation: FAM-5'-CCATCGAGATTTCTCTGTAG-3'-TAMRA

Real-time-PCR- Ansatz:

Herstellung des Mastermixes: 178 µl BioRad IQ Supermix (BioRad Laboratories, München), jeweils 8 µl Primer (20 µM) und jeweils 3 µl der beiden Sonden (20 µM).

Reaktionsansatz:

14 µl Mastermix plus 11 µl DNA.

Die Amplifikation und Detektion der Fluoreszenzen erfolgte auf einem BioRad IQ5 Thermocycler (BioRad Laboratories). Es wurde folgendes Temperaturprogramm gewählt: 1. Denaturierung: 95 °C für 3 min.; 2. 50 Zyklen: 95 °C für 15 sec., 59 °C für 1 min. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgte jeweils während der 59 °C Inkubation.

2.2.2.2 Amplifikation und direkte Sequenzierung des BRAF-Genes (Exon 15)

Proben, die keine spezifische V600E Mutation aufwiesen oder unklare Ergebnisse lieferten, wurden über einen weiteren PCR Ansatz (Davies *et al.*, 2002) und anschließende Sequenzierung der entsprechenden PCR Produkte auf andersgeartete Mutationen des Exons 15 untersucht:

Es wurden folgende Primer verwendet:

Forward Primer: 5´-TCATAATGCTTGCTCTGATAGGA-3´

Reverse Primer: 5´-GGCCAAAATTTAATCAGTGGA-3´

Herstellung des Mastermixes:

184 µl HotStarTaq Master Mix (Qiagen, Hilden), jeweils 8 µl Primer (20 µM).

Reaktionsansatz:

21.7 µl Mastermix plus 6.3 µl HPLC-Wasser plus 12 µl DNA.

PCR-Programm:

1. Denaturierung: 95 °C für 15 min.; 2. 10 Zyklen: 1. 94 °C für 20 sec., 57 °C für 30 sec., 72 °C für 30 sec.; 3. 55 Zyklen: 1. 94 °C für 20 sec., 55 °C für 30 sec., 72 °C für 30 sec.; 4. 72 °C für 8 min. Die PCR Läufe wurden auf einem Primus 25 (PeqLab, Erlangen) durchgeführt. Nach Amplifikation wurden die PCR Produkte (ca. 235 bp) bis zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert.

Elektrophoretische Analyse und Aufreinigung der PCR Produkte:

Die BRAF Exon 15 PCR Produkte wurden anschließend elektrophoretisch in 2%igen Agarosegelen auf ihre Spezifität hin überprüft.

Gelkomposition:

2% Agarose (PeqGold Universal Agarose, PeqLab, Erlangen), TBE-Puffer (Rotiphorese 10x TBE-Puffer, Roth); Trennsystem: Blue Marine 100, Serva, Heidelberg). Trennbedingungen: 150 Volt konstant. Die Trennungen wurden in

vorgekühlten Gelen und vorgekühltem (ca. 8°C) Laufpuffer (1x TBE) durchgeführt. Probevolumen: 5 µl.

Nach erfolgter Trennung wurden die Gele in Ethidiumbromid (1%ige Ethidiumbromidlg., Serva, Heidelberg) haltigem TBE-Puffer (100 µl Ethidiumbromid/200 ml 1x TBE Puffer) für 20 min. gefärbt. Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe eines Videodokumentationssystems der Firma PeqLab (BioCapt).

Erfolgreich amplifizierte PCR Produkte einer Größe von ca. 235 bp wurden folgendermaßen aufgereinigt (GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, UK)):

Ca. 30 µl PCR Produkt wurden in 300 µl Capture Buffer aufgenommen und auf die GFX-Säule aufgetragen. Anschließend wurde bei 10.000 rpm für 1 min. zentrifugiert (Hettich Micro 200, Tuttlingen). Nach dem anschließenden Waschen der Säulenmatrix mit 500 µl Waschpuffer (10.000 rpm, 1 min.) und einem weiteren Zentrifugationsschritt (14.000 rpm für 2 min.) wurde die DNA mit 20-40 µl HPLC-Wasser eluiert. Das Elutionsvolumen wurde entsprechend der Konzentration des PCR Produktes in Abschätzung aus den vorherigen elektrophoretischen Analysen eingestellt. Die so aufgereinigten PCR-Produkte wurden vor der Sequenzierreaktion bei -20°C gelagert.

Sequenzierung der PCR Produkte:

Die Sequenzierreaktionen erfolgten mit Hilfe des BigDye Terminator V. 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Darmstadt):

Sequenzieransatz:

1 µl BigDye, 3 µl 2.5fach Puffer, 3-4 µl HPLC-Wasser, 1 µl Primer (20 µM) 1-2 µl aufgereinigtes PCR- Produkt.

PCR-Sequenzier-Protokoll:

30 Zyklen: 96 °C für 30 sec.; 55 °C für 15 sec., 60 °C für 4 min..

Die PCR Produkte wurden jeweils sowohl mit dem Forward- als auch mit dem Reverse-Primer sequenziert.

Aufreinigung der Sequenzieransätze:

Die Aufreinigung der einzelnen Sequenzieransätze erfolgte über DyeEx 2.0-Spin-Säulen (Qiagen, Hilden).

Vorgehensweise:

1. Vorzentrifugation der Gelfiltrationssäulen bei 3000 rpm für 3 min. (Hettich Micro 200, Tuttlingen). 2. Anschließend wurde der 10 µl Sequenzieransatz auf das Säulenbett aufgetragen, die Säule in ein neues Eppendorf Tube überführt und erneut unter identischen Bedingungen zentrifugiert. Die so eluierten und aufgereinigten Sequenzieransätze wurden bei 85 °C eingetrocknet und anschließend in 5 µl Sequenzierladepuffer (Loading Dye, GE Healthcare, UK) aufgenommen. Die Denaturierung der Proben erfolgte bei 92 °C für 3 min. Nach sofortiger Abkühlung der Proben waren diese sequenzierfähig. Die Lagerung der denaturierten Proben erfolgte für max. 1 h bei -20 °C.

Die Sequenzierung der BRAF Exon 15 Ansätze erfolgte auf einem ABI 377 Sequenzierer (Applied Biosystems) im Sequenzier-Labor des Dermatologikum Hamburg unter Einsatz von 4.5%igen denaturierenden Acrylamidgelen (Probenvolumen: 1,5 µl). Die erhaltenen Sequenzen wurden mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Die DNA Sequenzen wurden anschließend mit BioEdit Version 5.0.9. bearbeitet, evaluiert und via Datenbankabgleich (NCBI Blast Algorithmus) auf ihre Identität hin überprüft.

2.2.3 Detektion von NRAS Mutationen

Die Detektion von NRAS Exon 2 Mutationen erfolgte ausschließlich über direkte Sequenzierung der PCR Produkte entsprechend (Greene *et al.*, 2008).

Folgende Primer wurden verwendet:

Forward Primer: 5'-GGTGAAACCTGTTTGTGGA-3'

Reverse Primer: 5'-AACCTAAAACCAACTCTTCCCA-3'

Herstellung des Mastermixes:

184 µl HotStarTaq Master Mix (Qiagen, Hilden), jeweils 8 µl Primer (20 µM).

Reaktionsansatz:

21.7 µl Mastermix plus 6.3 µl HPLC-Wasser plus 12 µl DNA.

PCR-Programm:

1. Denaturierung: 95 °C für 15 min.; 2. 10 Zyklen: 1. 94 °C für 20 sec., 62 °C für 30 sec., 72 °C für 30 sec.; 3. 50 Zyklen: 1. 94 °C für 20 sec., 60 °C für 30 sec., 72 °C für 30 sec.; 4. 72 °C für 8 min. Die PCR Läufe wurden auf einem Primus 25 (PeqLab, Erlangen) durchgeführt. Nach Amplifikation wurden die PCR Produkte (ca. 290 bp) bis zur weiteren Analyse bei -20 °C gelagert.

Die weitere Vorgehensweise bis hin zur Sequenzierung der NRAS Exon 2 PCR Produkte entsprach der bereits für BRAF Exon 15 beschriebenen Methodik. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte ebenfalls analog der BRAF Exon 15 Sequenzen.

2.2.4 Detektion von c-KIT Mutationen

Für die Detektion von c-KIT L576P Mutationen wurde ein im molekularbiologischen Labor des Dermatologikum Hamburg bereits etablierter

Real-time PCR Assay eingesetzt. Bei dieser Mutation handelt es sich um einen Austausch von Thymin gegen Cytosin im Exon 11 (Gomes *et al.*, 2007). Folgende Primer und Hybridisierungssonden wurden verwendet:

Primer:

Forward Primer: 5'-CAGTGGAAGGTTGTTGA GGA-3'

Reverse Primer: 5'-GCCTGTTTCTGGGAAACTCC- 3'

Hybridisierungssonden:

Wildtyp: HEX-5'-CCCAACACAACCTTCCTTATGATC-3'-TAMRA

c-KIT L576P-Mutation: FAM-5'-CCCAACACAACCTTCCTTATGATC-3'-TAMRA

2.2.4.1 Real-time-PCR- Ansatz:

Herstellung des Mastermixes:

178 µl BioRad IQ Supermix (BioRad Laboratories), jeweils 8 µl Primer (20 µM) und jeweils 3 µl der beiden Sonden (20 µM).

Reaktionsansatz:

14 µl Mastermix plus 11 µl DNA.

Die Amplifikation und Detektion der Fluoreszenzen erfolgte auf einem BioRad IQ5 Thermocycler (BioRad Laboratories). Es wurde folgendes Temperaturprogramm gewählt: 1. Denaturierung: 95 °C für 3 min.; 2. 50 Zyklen: 95 °C für 15 sec., 61 °C für 1 min. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgte jeweils während der 61 °C Inkubation.

Als Positivkontrolle für die c-KIT L576P Mutation wurde die isolierte DNA eines Adenokarzinoms verwendet.

Einige Proben (N=12) lieferten kein ausreichendes bzw. klar interpretierbares Fluoreszenzsignal und wurden daher anschließend direkt sequenziert. Hierfür wurden die oben genannten Primer verwendet.

Herstellung des Mastermixes:

184 µl HotStarTaq Master Mix (Qiagen, Hilden), jeweils 8 µl Primer (20 µM).

Reaktionsansatz:

21.7 µl Mastermix plus 6.3 µl HPLC-Wasser plus 12 µl DNA.

PCR-Programm:

1. Denaturierung: 95 °C für 15 min.; 2. 60 Zyklen: 1. 94 °C für 20 sec., 61 °C für 30 sec., 72 °C für 30 sec.; 3. 72 °C für 8 min. Die PCR Läufe wurden auf einem Primus 25 (PiqLab, Erlangen) durchgeführt. Nach Amplifikation wurden die PCR Produkte bis zur weiteren Analyse bei -20 °C gelagert.

Die weitere Vorgehensweise bis hin zur Sequenzierung der c-KIT PCR Produkte entsprach der bereits für BRAF Exon 15 beschriebenen Methodik. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte ebenfalls analog der BRAF Exon 15 Sequenzen.

2.2.5 Analyse ausgewählter Mikrosatelliten

Die Analyse von sechs ausgewählten Mikrosatelliten erfolgte mit Hilfe des ABI PRISM Linkage Mapping Sets v 2.5-MD10 (Applied Biosystems). Folgende Loci wurden auf den Verlust von Allelen (Loss of heterozygosity: LOH) bzw. genetische Instabilität (Microsatellite instability: MSI) untersucht: D9S161, D9S157, D9S288, D9S157, D9S175, D9S287.

Auch für diese Untersuchungen wurden die isolierten DNA Rohextrakte der entsprechenden Melanom- sowie Normalhautproben paarweise im direkten Vergleich eingesetzt. Das Pipettieren der Mastermixe und DNA-Proben erfolgte bei Raumtemperatur.

PCR- Ansatz:

1 µl fluoreszenzmarkierte Primer (jeweils 5 µM), 6 µl HotStarTaq Master Mix Kit (Qiagen, Hilden) und 5 µl DNA der zu untersuchenden Proben.

PCR-Programm:

1. Denaturierung: 95 °C für 15 min.; 2. 50 Zyklen: 1. 94 °C für 30 sec., 55 °C für 30 sec., 72 °C für 45 sec.; 3. 72 °C für 10 min. Die PCR Läufe wurden auf einem Primus 25 (PeqLab, Erlangen) durchgeführt. Nach Amplifikation wurden die PCR Produkte bis zur weiteren Analyse bei -20 °C gelagert.

Nach Überprüfung der erfolgreichen Amplifikation der sechs unterschiedlichen PCR-Produkte (2%ige Agarosegele) erfolgte die endgültige GeneScan-Analyse auf einem ABI 377 Sequenzierer (Applied Biosystems) im Sequenzier-Labor des Dermatologikum Hamburg unter Einsatz von 4.5%igen denaturierenden Acrylamidgelen (verwendete Längenstandards: GeneScan-500 ROX Size Standard; Probevolumen 1,5 µl). Die Ergebnisse dieser Analysen wurden mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Die Auswertung der Mikrosatelliten-Analysen erfolgte mit Hilfe der GeneScan 3.0 Software (Applied Biosystems). Für die Bestätigung des Verlustes eines Allels (LOH) wurde folgende Berechnung verwandt:

$$\frac{\text{(Peakhöhe des größeren Allels (Normalhaut)) / Peakhöhe des kleineren Allels (Normalhaut)}}{\text{(Peakhöhe des größeren Allels (Tumorgewebe) / Peakhöhe kleineren Allels (Tumorgewebe)}}$$

Bei einem Quotienten kleiner als 0.5 bzw. größer als 1.5 wurde das Ergebnis als positiv interpretiert, entsprechend dem Verlust eines Allels. Die genetische Instabilität eines Mikrosatelliten (MSI) wurde bestätigt, wenn entsprechende Fragmentlängendifferenzen in den Tumorproben nachweisbar waren.

2.2.6 Einteilung der Melanome nach histomorphologischen Kriterien

Alle histopathologischen Untersuchungen wurden an HE gefärbten Schnitten der Melanome durchgeführt. Hierbei wurde der architektonische Aufbau der Läsion beachtet und nach folgenden Kriterien begutachtet und eingeteilt:

Nesterbildung der intraepidermalen Melanozyten: Ein Zusammenschluss von drei oder mehr intraepidermalen Melanozyten, wurden als Melanozytennest definiert und folgenderweise klassifiziert:

- Nesterbildung dominant: > 25 % der Melanozyten ordnen sich in Nestern an
- Nesterbildung nicht dominant: die intraepidermalen Melanozyten sind hauptsächlich als Einzelzellen angeordnet.

Laterale Abgrenzbarkeit: Die Abgrenzbarkeit nach lateral wird durch die Untersuchung des Übergangs von tumorös involvierter zu gesunder Epidermis beurteilt:

- lateral gut abgrenzbar: Der Übergang von gesunder zur maligne transformierten Epidermis ist abrupt.
- schlechte Abgrenzbarkeit: Die Anzahl der maligne transformierten Melanozyten nimmt kontinuierlich nach lateral ab. Die Grenze zur normalen Haut ist nicht eindeutig zu definieren.

-
Durchsetzung höherer Epidermislagen mit Melanozyten: Die Anordnung der intraepidermalen Melanozyten wurde folgendermaßen klassifiziert:

- Verteilung in höheren Epidermislagen: > 50% der intraepidermalen Melanozyten finden sich in höheren Epidermislagen
- Anordnung der Melanozyten in basalen Epidermislagen: der Großteil (75-100%) der Melanozyten ist an der dermo-epidermalen Junctionszone situiert. Nur einzelne Zellen befinden sich in höheren Lagen.

Atypie: Die Form und Größe der Tumorzellen und deren Nuclei wurde untersucht.

- Atypie nachweisbar: Melaozyten wurden als atypisch bezeichnet, wenn sich ihr Kern größer als der von Lymphozyten darstellte.
- Keine Atypie nachweisbar: Waren die Nuclei der Tumorzellen kleiner oder genauso groß wie Lymphozyten, wurden die Zellen als nicht-atypisch bezeichnet.

2.2.7 Statistische Methoden

Die statischen Auswertungen wurden mit Hilfe von SPSS für Windows, Version 18.0 (SPSS Inc., U.S.A.) durchgeführt. Die Darstellung der kontinuierlichen Variablen erfolgte als Mittelwerte, während als Streumaße die Standardabweichungen gewählt wurden.

Die kategorisierten Daten wurden hingegen mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests, bzw. des exakten Tests nach Fisher ausgewertet. Bei Verwendung des Chi-Quadrat-Tests wurden die erforderlichen Testvoraussetzungen erfüllt, so dass bei allen Tests weniger als 20% der erwarteten Häufigkeit kleiner 5 war.

Bei allen durchgeführten Tests erfolgte eine zweiseitige Signifikanzüberprüfung, wobei für alle statistischen Tests ein p-Wert $< 0,05$ als statistisch signifikant angenommen wurde.

In den grafischen Darstellungen, die ebenfalls mit SPSS erstellt wurden, wurden die kategorisierten Daten in Balkendiagrammen dargestellt.

3 ERGEBNISSE

3.1 Klinische, molekularbiologische, morphologische und prognostische Merkmale der Melanome

Es wurden insgesamt 65 Melanome auf die unten aufgeführten Merkmale untersucht. In Tabelle 7 sind klinische Informationen, molekulargenetische Merkmale, morphologische Charakteristika und prognostische Faktoren der 65 untersuchten Melanome zusammengefasst.

Ergebnisse	
Merkmale	Melanome n (%)
<u>Alter</u> < 50 > 50	8 (12,3) 57 (87,7)
<u>Geschlecht</u> männlich weiblich	18 (27,7) 47 (72,3)
<u>Lokalisation</u> chronisch sonnenexponiert intermittierend sonnenexponiert	31 (47,7) 34 (52,3)
<u>Breslow- Index</u> ≤ 1 mm 1,01mm- 2mm 2,01mm- 4mm >4mm nicht auswertbar, Metastase	44 (67,7) 9 (13,8) 5 (7,7) 4 (6,2) 3 (4,6)
<u>Clark Level</u> I II III und III-IV IV und IV- V V nicht auswertbar, Metastase	0 18 (27,7) 26 (40) 15 (23,1) 3 (4,6) 3 (4,6)
<u>Nesterbildung</u> dominant nicht dominant nicht auswertbar, Metastase	23 (35,4) 39 (60) 3 (4,6)
<u>Laterale Abgrenzbarkeit</u> gut schlecht nicht auswertbar, Biopsie nicht auswertbar, Metastase	15 (23,1) 39 (60) 8 (12,3) 3 (4,6)

<u>Durchsetzung höherer Epidermislagen mit Melanozyten</u>	
Aszension	33 (50,8)
keine Aszension	29 (44,6)
nicht auswertbar, Metastase	3 (4,6)
<u>Atypie</u>	
ja	51 (78,5)
nein	11(16,9)
nicht auswertbar, Metastase	3 (4,6)
<u>BRAF</u>	
Mutation	22 (33,8)
Wildtyp	42 (64,7)
nicht auswertbar	1 (1,5)
<u>NRAS</u>	
Mutation	6 (9,3)
Wildtyp	58 (89,2)
nicht auswertbar	1 (1,5)
<u>C-KIT</u>	
<u>Mutation</u>	0
<u>Wildtyp</u>	65
<u>LOH</u>	
kein LOH	45 (69,3)
≥ 1 LOH nachweisbar	19 (29,2)
nicht auswertbar	1 (1,5)
<u>MSI</u>	
kein MSI	19 (29,2)
≥ MSI nachweisbar	44 (67,7)
nicht auswertbar	2 (3,1)

Tabelle 7: Klinische, molekularbiologische, morphologische und prognostische Merkmale der untersuchten Melanome

3.2 Statistische Auswertung

Im Folgenden sind Assoziationen zwischen den erhobenen Merkmalen untersucht und auf signifikante Zusammenhänge geprüft worden.

3.2.1 Das Muster von NRAS- und BRAF Mutationen

Zur Detektion von BRAF Mutationen wurden die 65 Proben nach Extraktion der DNA erst mittels Real-time PCR untersucht (Abbildung 14), anschließend

mittels konventioneller PCR (Abbildung 15) und Sequenzierung (Abbildung 16-18) analysiert, eine Probe war nicht auswertbar. Jede Probe wurde jeweils mit beiden Verfahren untersucht. Hierbei stellte sich bei 22 von 64 auswertbaren Melanomen (34,4%) eine BRAF Mutation heraus.

Um den NRAS-Mutationsstatus der Melanome zu überprüfen, wurden die Proben via PCR (Abbildung 19) und anschließender direkter Sequenzierung analysiert (Abbildung 20- 22). Eine Probe war nicht auswertbar. Es zeigten sich bei 6 von 64 Proben (9,4%) Mutationen im NRAS Gen.

Zwei Melanome waren sowohl für NRAS als auch für BRAF Mutationen positiv. Dies entspricht 33% der hier insgesamt nachgewiesenen NRAS Mutationen. Bei 4 Proben konnten zwar NRAS Mutationen gefunden werden, jedoch keine BRAF Mutationen, was einem Anteil von 66,7% der NRAS Mutationen entspricht ($p = 1,0$). Somit konnte keine statistisch signifikante Assoziation zwischen dem Auftreten von NRAS und BRAF gezeigt werden.

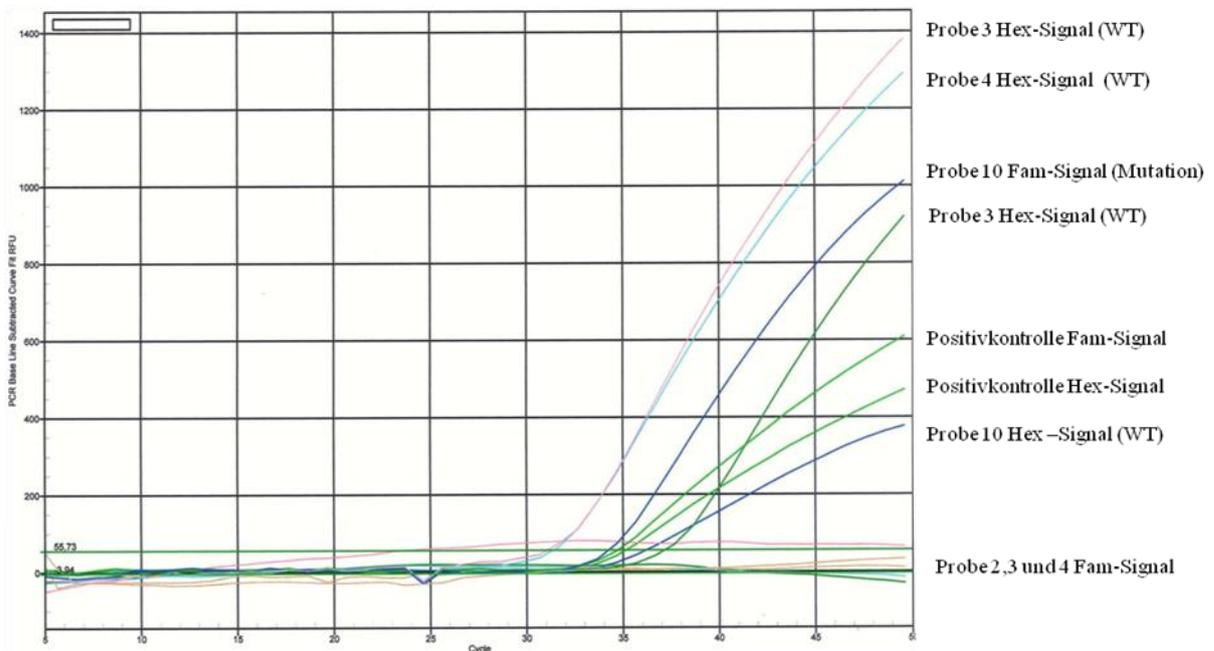


Abbildung 14: Ergebnisse der Real-time PCR für BRAF V600E Mutationen.

Die Proben 2, 3, 4 und 10 und die Positivkontrollen wurden hier im Real-time Verfahren untersucht. Bei den fluoreszenzmarkierten Sonden handelt es sich um Sequenzen, die entweder komplementär zum Wildtyp oder zu der im Ansatz gesuchten Mutation V600E waren. Sie wurden mit unterschiedlichen

Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Die Wildtyp-Sonden waren mit dem Reporterfluoreszenzfarbstoff Hex (Hexachloro-6-carboxyfluorescein) markiert, die V600E Sonde war FAM (6-Carboxyfluorescein) markiert. Das detektierbare Signal wird mit etwa 1000 Kopien erreicht. Hiernach kann ein exponentieller Anstieg des jeweiligen Signals beobachtet werden, welches proportional zur Bindung der DNA Sonden an ihre komplementären DNA Sequenzen ist.

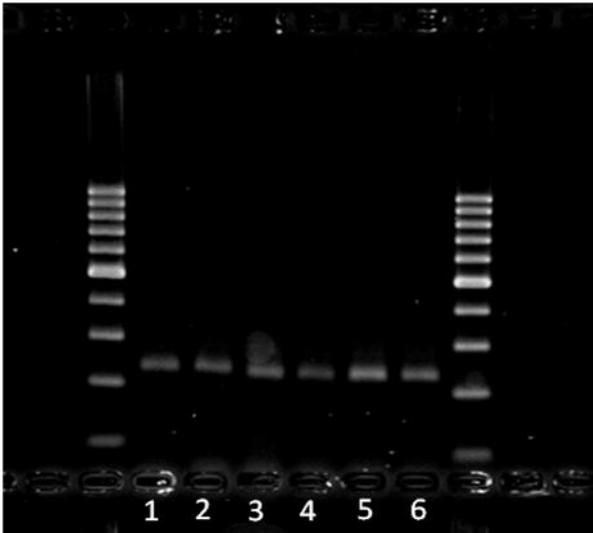


Abbildung 15: Agarose Gelelektrophorese der BRAF PCR Produkte

Repräsentatives Ergebnis der elektrophoretischen Trennung der BRAF PCR Produkte. Spuren 1- 6: BRAF PCR Produkte unterschiedlicher Proben (Proben 5, 8, 10, 15, 16 und 17).

T A C A G T G A A A T C T C G A
100

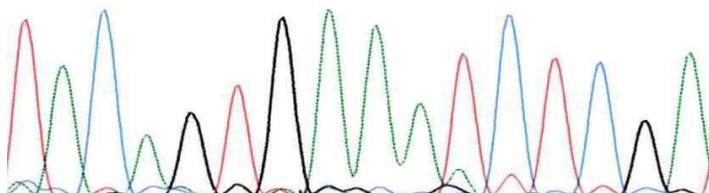


Abbildung 16: BRAF Wildtyp, Sequenzanalyse von Probe 3.

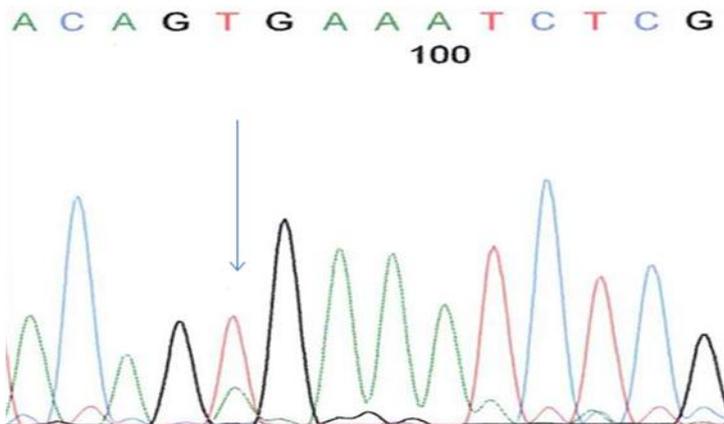


Abbildung 17: BRAF V600E-Mutation, Sequenzanalyse von Probe 10
Austausch von Adenin gegen Thymin im Codon 600 des BRAF Gens.

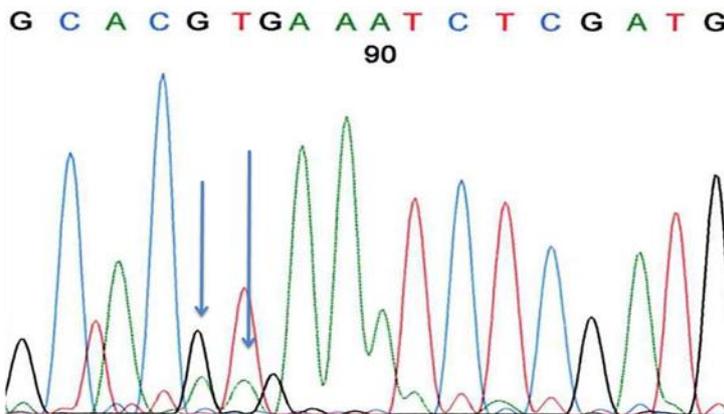


Abbildung 18: BRAF V600K Mutation, Sequenzanalyse von Probe 8
Austausch von Guanin und Thymin gegen Adenin im Exons 15 des BRAF Gens.

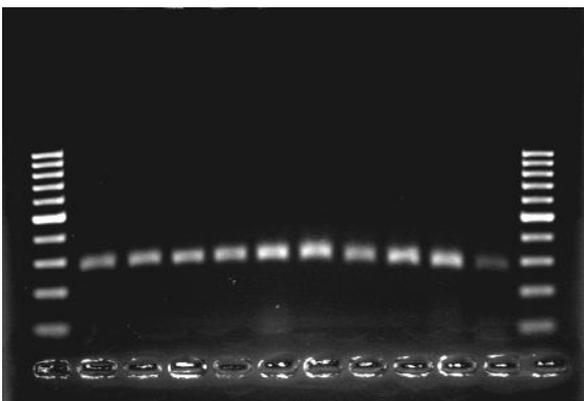


Abbildung 19: Agarose-Gelelektrophorese NRAS PCR Produkte
(Proben: 4- 14).

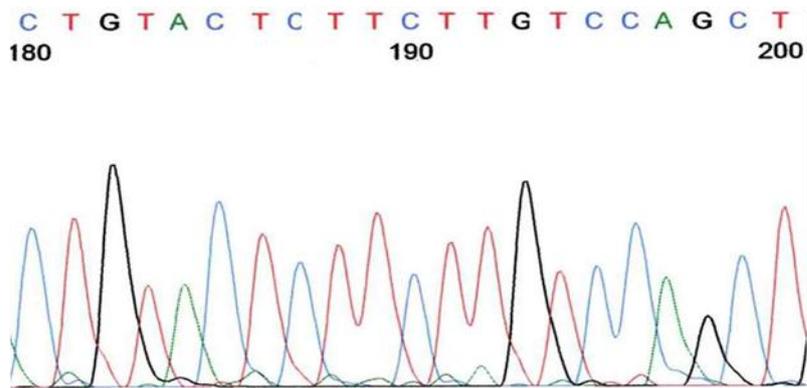


Abbildung 20: NRAS Wildtyp, Sequenzanalyse von Probe 10.

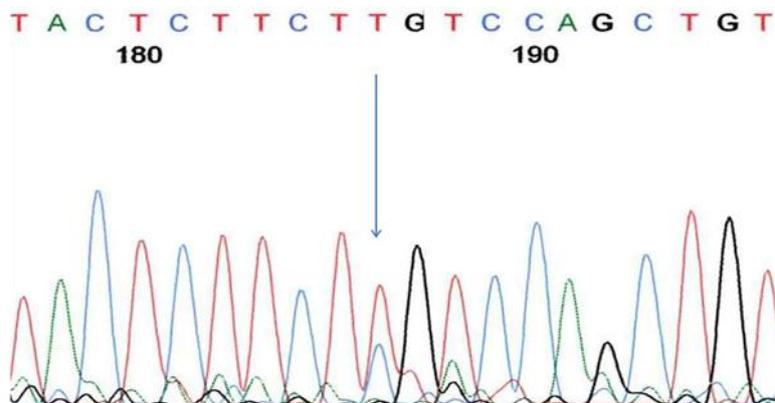


Abbildung 21: NRAS Q61R Mutation, Sequenzanalyse von Probe 30,
 Austausch von Thymin gegen Cytosin im Codon 61 des NRAS Gens.

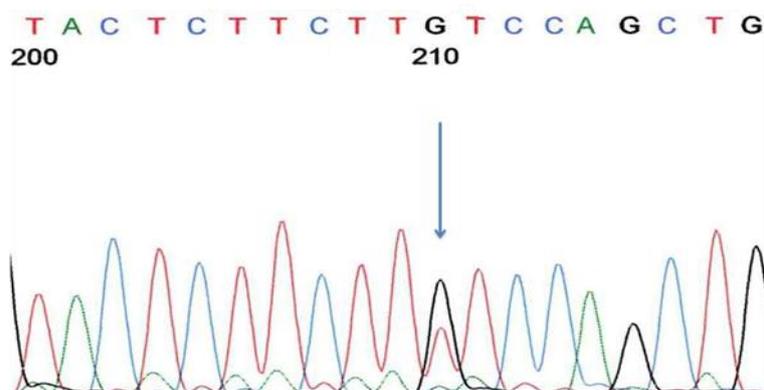


Abbildung 22: NRAS Q61K Mutation, Sequenzanalyse von Probe 63
 Austausch von Guanin gegen Thymin im Codon 61.

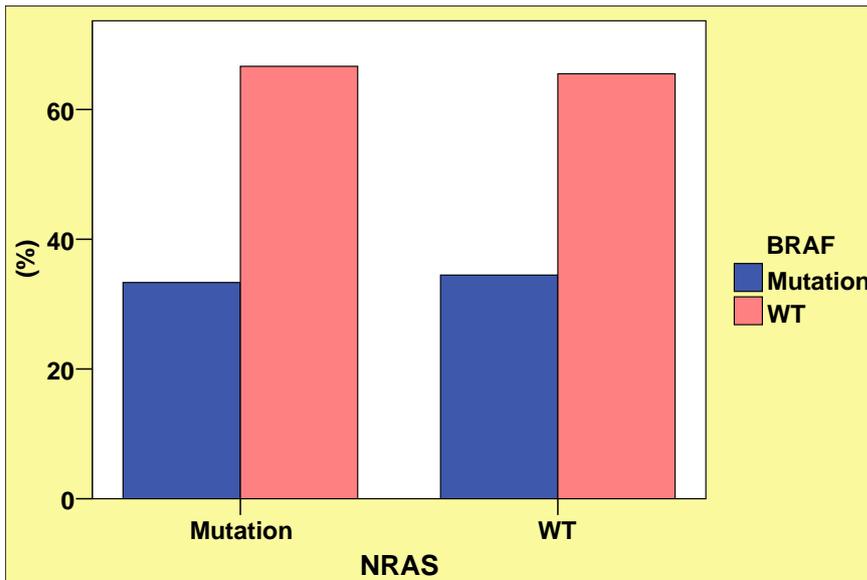


Abbildung 23: Darstellung der Assoziation zwischen BRAF und NRAS.

			NRAS		Gesamt
			Mutation	WT	Mutation
BRAF	Mutation	Anzahl	2	20	22
		% von NRAS	33,3%	34,5%	34,4%
	WT	Anzahl	4	38	42
		% von NRAS	66,7%	65,5%	65,6%
Gesamt	Anzahl		6	58	64
	% von BRAF		9,4%	90,6%	100,0%
	% von NRAS		100,0%	100,0%	100,0%

Tabelle 8: Chi-Quadrat-Test zur Darstellung der Assoziation von BRAF und NRAS.

	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)
Exakter Test nach Fisher	1,000	0,664

Tabelle 9: Exakter Test nach Fisher zur Errechnung der Assoziation zwischen BRAF und NRAS (bzw. Assoziation zwischen dem Auftreten von NRAS mit dem Nichtauftreten von BRAF).

3.2.2 BRAF Mutationen sind mit dem Nichtauftreten von instabilen Mikrosatelliten (MSI) assoziiert.

Instabile Mikrosatelliten lassen sich über Fragmentlängenanalysen nachweisen. (Abbildung 24). Insgesamt wurden 6 Mikrosatelliten auf dem Chromosom 9 untersucht. Als mikrosatellitenstabil wurden Tumoren bezeichnet, die in keinem der getesteten Marker Instabilitäten aufwiesen. Bei 19 der insgesamt 63 informativen Fälle (30,2%), konnten instabile Mikrosatelliten mindestens in einem der hier untersuchten Mikrosatellitenmarker (D9S161, D9S157, D9S288, D9S157, D9S175, D9S287) gefunden werden. BRAF Mutationen wurden in insgesamt 22 Fällen nachgewiesen. Lediglich bei 3 Melanomen konnte sowohl das Auftreten von instabilen Mikrosatelliten als auch das Auftreten von BRAF Mutationen nachgewiesen werden, was einen Anteil von 13,6% der insgesamt nachweisbaren BRAF Mutationen ausmacht. 19 von 22 der hier detektierten BRAF Mutationen zeigten hingegen ein negatives Ergebnis bei der Suche nach instabilen Mikrosatelliten, was einem Anteil von 86,4% der insgesamt nachgewiesenen BRAF Mutationen entspricht. Im exakten Test nach Fischer konnte mit einem p-Wert von 0,046 eine eindeutige Signifikanz zwischen dem Auftreten von BRAF und dem Nichtauftreten von instabilen Mikrosatelliten errechnet werden. Instabile Mikrosatelliten und BRAF Mutationen schließen sich also mit der Ausnahme von 3 Fällen nahezu aus.

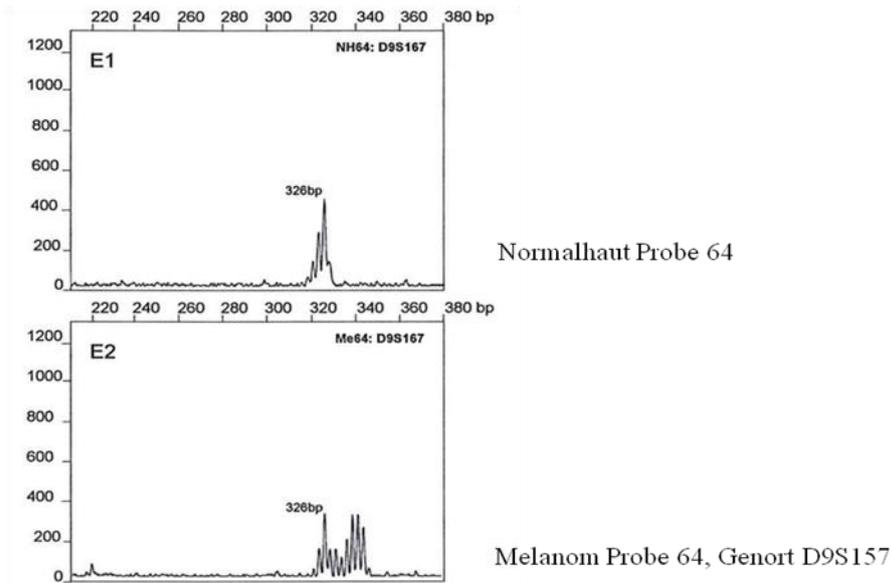


Abbildung 24: Beispiel eines instabilen Mikrosatelliten: Probe 64 am Genort D9S157

Fragmentlängenanalyse eines instabilen Mikrosatelliten. Instabile Mikrosatelliten zeichnen sich unter anderem durch eine Verschiebung der Fluoreszenzsignale der PCR Produkte aus.

Hier: Zusätzliche Signale im höhermolekularen Bereich der Melanomprobe im Vergleich zur Normalhaut Probe.

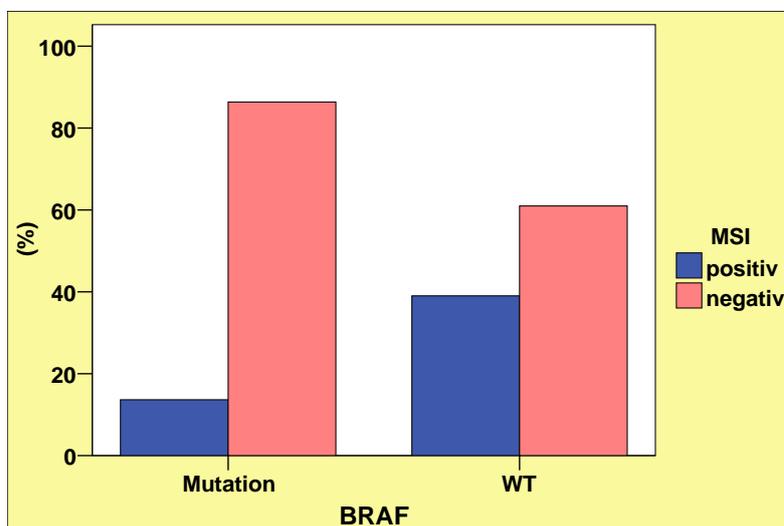


Abbildung 25: Darstellung der Assoziation zwischen MSI und BRAF (bzw. Assoziation zwischen dem Auftreten von BRAF und dem Nichtauftreten von MSI).

			MSI		Gesamt
			positiv	negativ	
BRAF	Mutation	Anzahl	3	19	22
		% von BRAF	13,6%	86,4%	100,0%
	WT	Anzahl	16	25	41
		% von BRAF	39,0%	61,0%	100,0%
Gesamt		Anzahl	19	44	63
		% von BRAF	30,2%	69,8%	100,0%
		% von MSI	100,0%	100,0%	100,0%

Tabelle 10: Chi-Quadrat-Test zur Darstellung der Assoziation von BRAF Mutationen und MSI (bzw. Assoziation zwischen dem Auftreten von BRAF Mutationen mit dem Nichtauftreten von MSI).

			Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)
Exakter Test nach Fisher			0,046	0,032

Tabelle 11: Exakter Test nach Fisher zur Errechnung der Assoziation zwischen BRAF Mutation und MSI (bzw. dem Auftreten von BRAF Mutation mit dem Nichtauftreten von MSI).

3.2.3 Melanome mit instabilen Mikrosatellitenmutatoren stammen häufiger von chronisch sonnenexponierter Haut

Bei 19 der insgesamt 63 (30,2%) auswertbaren Proben wurden instabile Mikrosatelliten gefunden. Davon waren 15 Melanome (78,9%) im Kopf-Hals-Bereich, also an Körperstellen chronischer Sonnenexposition lokalisiert. Nur 35% der mikrosatellitenstabilen Melanome, fanden sich im Kopf-Halsbereich ($p = 0,002$). Damit wird deutlich dass Melanome des Kopf-Halsbereiches hoch signifikant häufiger instabile Mikrosatelliten zeigen, als Melanome von Körperstellen intermittierender Sonnenexposition.

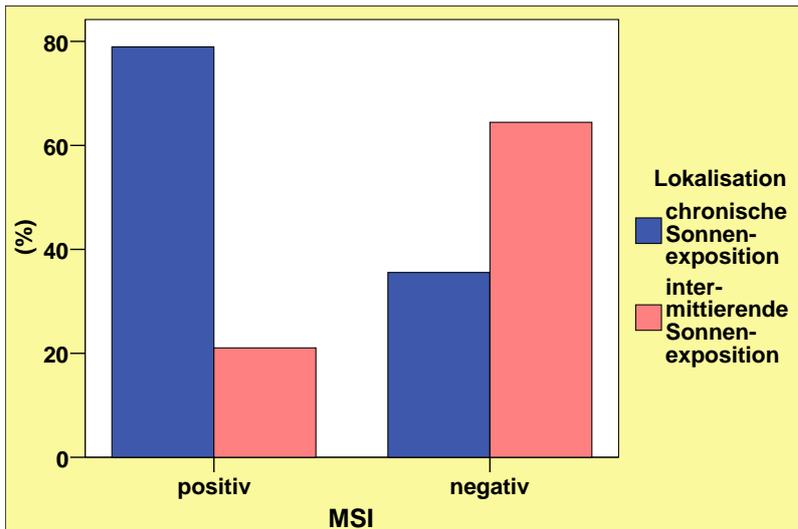


Abbildung 26: Darstellung der Assoziation zwischen Lokalisation und MSI.

			MSI		Gesamt
			Positiv	Negativ	
Lokalisation	chronische Sonnenexposition	Anzahl	15	16	31
		% von Lokalisation	48,4%	51,6%	100,0%
		% von MSI	78,9%	35,6%	48,4%
	intermittierende Sonnenexposition	Anzahl	4	29	33
		% von Lokalisation	12,1%	87,9%	100,0%
		% von MSI	21,1%	64,4%	51,6%
Gesamt	Anzahl	19	45	64	
	% von Lokalisation	29,7%	70,3%	100,0%	
	% von MSI	100,0%	100,0%	100,0%	

Tabelle 12: Chi-Quadratstest zur Errechnung der Assoziation von MSI und Lokalisation.

Positiv/Negativ in den Tabellen groß oder klein schreiben?

	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)
Exakter Test nach Fisher	0,002	0,002

Tabelle 13: Exakter Test nach Fisher zur Errechnung der Assoziation zwischen MSI und Lokalisation.

3.2.4 Melanome mit instabilen Mikrosatelliten sind häufiger undeutlich nach lateral abgegrenzt

93,3% der Melanome, die über instabile Mikrosatelliten charakterisiert waren, zeigten eine undeutliche Abgrenzung des Tumorgewebes zur Normalhaut. 34,2% der Melanome, die keine instabilen Mikrosatelliten aufwiesen, waren gut nach lateral abgegrenzt. Daraus ergibt sich ein P-Wert von 0,08 und damit ein deutlicher Trend bezüglich der Assoziation zwischen mikrosatelliteninstabilen Melanomen und einer unscharfen Begrenzung des Tumors nach lateral.

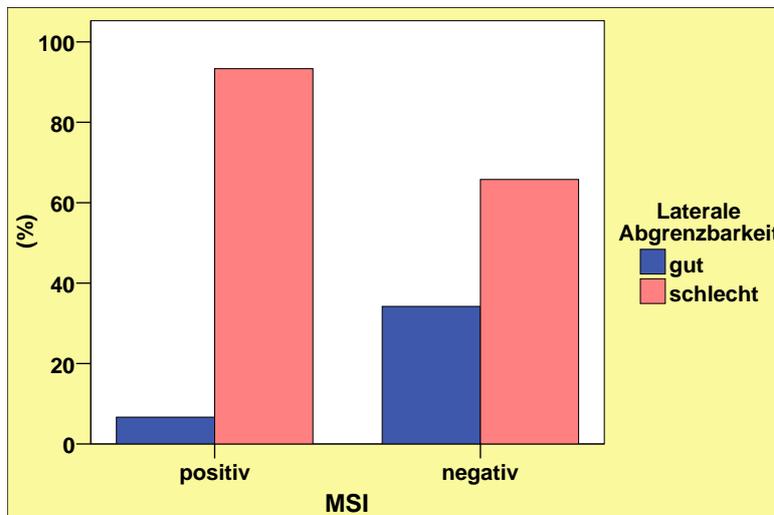


Abbildung 27: Darstellung der Assoziation zwischen lateraler Abgrenzbarkeit und MSI.

			MSI		
			positiv	negativ	Gesamt
Laterale Abgrenzbarkeit	gut	Anzahl	1	13	14
		% von Laterale Abgrenzbarkeit	7,1%	92,9%	100,0%
	schlecht	Anzahl	14	25	39
% von Laterale Abgrenzbarkeit		35,9%	64,1%	100,0%	
Gesamt	schlecht	% von MSI	93,3%	65,8%	73,6%
		Anzahl	15	38	53
	gut	% von Laterale Abgrenzbarkeit	28,3%	71,7%	100,0%
		% von MSI	100,0%	100,0%	100,0%

Tabelle 14: Chi-Quadrat-Test zur Errechnung der Assoziation zwischen lateraler Abgrenzbarkeit und MSI .

	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)
Exakter Test nach Fisher	0,080	0,038

Tabelle 15: Exakter Test nach Fisher zur Errechnung der Assoziation zwischen lateraler Abgrenzbarkeit und MSI.

3.2.5 LOH positive Melanome entsprechen häufiger dem NRAS-Wildtyp

LOH wurden durch die Untersuchung von 6 polymorphen Mikrosatellitenmarkern, die auf Chromosom 9 liegen, untersucht. 42 der insgesamt 44 Proben (73,7%), die positiv für LOH waren, entsprachen dem NRAS Wildtyp, wohingegen bei 66,7% der Proben mit NRAS Mutationen keine Allelverluste der entsprechenden Mikrosatelliten nachweisbar waren. Hieraus ergibt sich ein p-Wert von 0,062, der einen deutlichen Trend bezüglich der Assoziation zwischen Melanomen zeigt, die dem NRAS-Wildtyp entsprechen mit mindestens einem Allelverlust (LOH) an einem Genort.

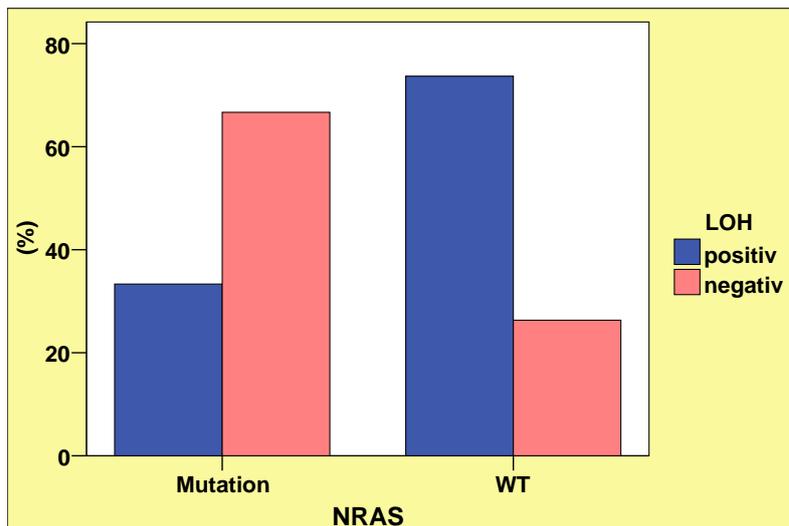


Abbildung 28: Darstellung der Assoziation zwischen LOH und NRAS (bzw. Assoziation zwischen dem Auftreten von LOH und dem Nichtauftreten von NRAS).

			NRAS		Gesamt
			Mutation	WT	
LOH	positiv	Anzahl	2	42	44
		% von NRAS	33,3%	73,7%	69,8%
Gesamt	negativ	Anzahl	4	15	19
		% von NRAS	66,7%	26,3%	30,2%
	Anzahl		6	57	63
	% von LOH		9,5%	90,5%	100,0%
		% von NRAS	100,0%	100,0%	100,0%

Tabelle 16: Chi-Quadrat-Test zur Errechnung der Assoziation zwischen LOH und NRAS.

			Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)
Exakter Test nach Fisher			0,062	0,062

Tabelle 17: Exakte Signifikanz nach Fisher zur Errechnung der Assoziation zwischen LOH und NRAS.

3.2.6 Melanome mit Allelverlusten an Mikrosatelliten-Genorten stammen häufiger von intermittierend sonnenexponierten Körperregionen

Es wurde bei 45 (70,3%) der informativen Proben an einem oder mehr als einem der untersuchten Genorte ein Allelverlust nachgewiesen (Abbildung 29). 60% der nachgewiesenen Allelverluste waren an Körperstellen intermittierender Sonnenexposition lokalisiert und 68% der Proben, die keinen Allelverlust aufwiesen, waren im Kopf-Halsbereich lokalisiert ($p= 0,055$). Hier zeichnet sich ein deutlicher Trend ab: Melanome von Körperregionen mit intermittierender Sonnenexposition weisen häufiger Allelverluste auf, als die vom Kopf-Halsbereich.

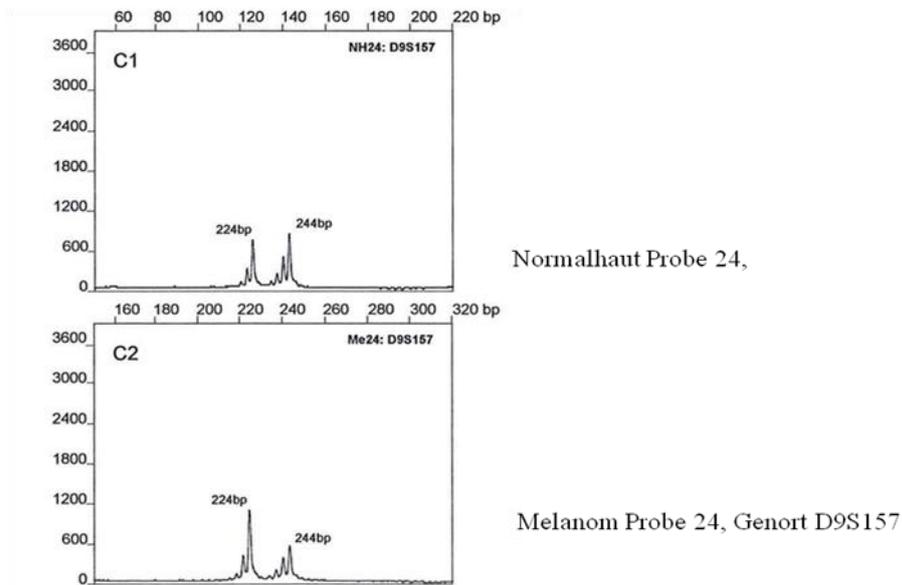


Abbildung 29: Allelverlust der Probe 24 am Genort D9S157

Fragmentlängenanalyse der entsprechenden PCR Produkte. Das Allel einer Länge von 244bp ist in der Tumorprobe nur noch aufgrund der Verunreinigung des Untersuchungsmaterials mit Normalhautgewebe nachweisbar. Allelratio: 2,15.

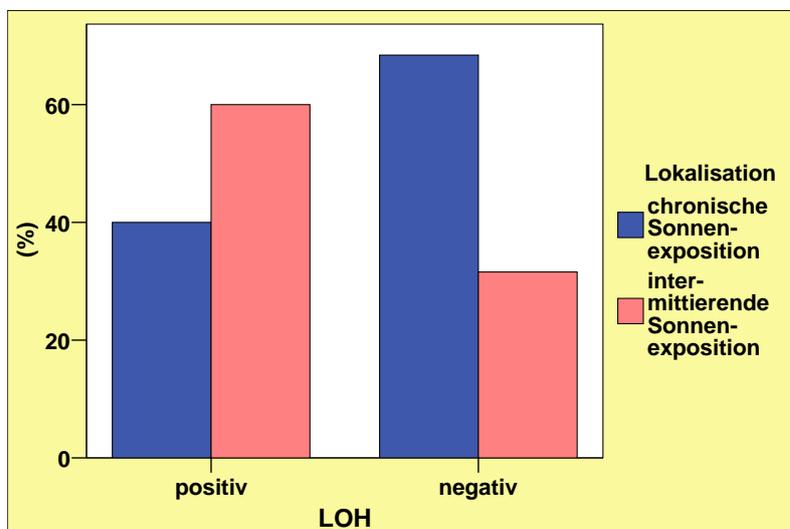


Abbildung 30: Darstellung der Assoziation zwischen Lokalisation und LOH.

			LOH		Gesamt
			Positiv	negativ	
Lokalisation	chronische Sonneneexposition	Anzahl	18	13	31
		% von Lokalisation	58,1%	41,9%	100,0%
	% von LOH	40,0%	68,4%	48,4%	
	intermittierende Sonneneexposition	Anzahl	27	6	33
		% von Lokalisation	81,8%	18,2%	100,0%
	% von LOH	60,0%	31,6%	51,6%	
Gesamt		Anzahl	45	19	64
		% von Lokalisation	70,3%	29,7%	100,0%
		% von LOH	100,0%	100,0%	100,0%

Tabelle 18: Chi-Quadrat-Test zur Errechnung der Assoziation zwischen Lokalisation und LOH.

	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)
Exakter Test nach Fisher	0,055	0,035

Tabelle 19: Exakter Test nach Fischer zur Errechnung der Assoziation zwischen Lokalisation und LOH.

3.2.7 Bei Kopf-Hals-Melanomen sind intraepidermale Melanozyten als Einzelzellen angeordnet

Nesterbildung wurde angenommen, wenn bei mehr als 25% der intraepidermalen Melanozyten eine Anordnung in Nestern, d.h. eine Gruppenbildung von mehr als drei Melanozyten, zu beobachten war. Bei 23 (37,1%) der informativen Fälle konnte eine Nesterbildung festgestellt werden. 17 der 23 (73,9%) Proben, die eine Nesterbildung zeigten, waren auf Körperstellen intermittierender Sonneneexposition positioniert, wohingegen 25 der 31 (80,6%) Melanome, die chronischer Sonneneexposition ausgesetzt waren, im Kopf-Halsbereich lokalisiert waren ($p= 0,008$). Hieraus ergibt sich eine signifikante Assoziation zwischen Nesterbildung und Lokalisation:

Melanome, bei denen sich die intraepidermalen Melanozyten überwiegend als Einzelzellen anordnen, sind häufiger im Kopf-Halsbereich lokalisiert.

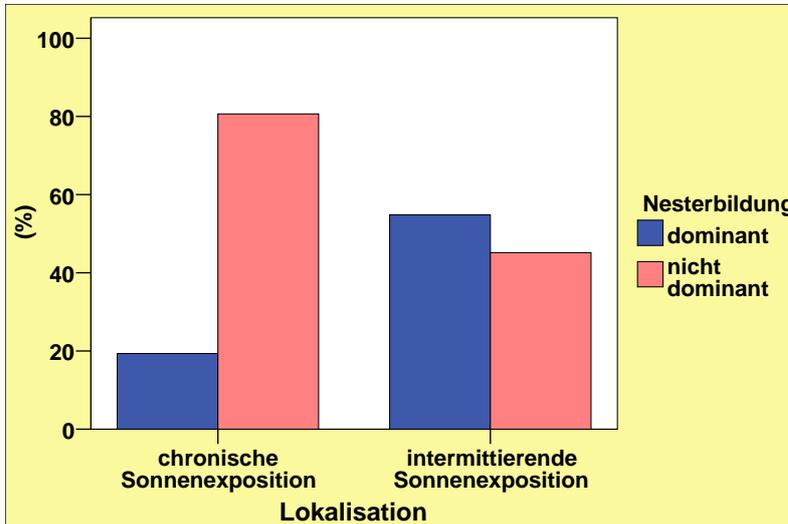


Abbildung 31: Darstellung der Assoziation zwischen Nesterbildung und Lokalisation.

Nesterbildung		Lokalisation		Gesamt
		Chronische Sonnenexposition	Intermittierende Sonnenexposition	
dominant	Anzahl	6	17	23
	% von Nesterbildung	26,1%	73,9%	100,0%
	% von Lokalisation	19,4%	54,8%	37,1%
nicht dominant	Anzahl	25	14	39
	% von Nesterbildung	64,1%	35,9%	100,0%
	% von Lokalisation	80,6%	45,2%	62,9%
Gesamt	Anzahl	31	31	62
	% von Nesterbildung	50,0%	50,0%	100,0%
	% von Lokalisation	100,0%	100,0%	100,0%

Tabelle 20: Chi-Quadratstest zur Errechnung der Assoziation zwischen Nesterbildung und Lokalisation.

	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)
Exakter Test nach Fisher	0,008	0,004

Tabelle 21: Exakter Test nach Fisher zur Errechnung der Assoziation zwischen Nesterbildung und Lokalisation.

3.2.8 Melanome des Kopf-Halsbereiches zeigen häufiger einen kontinuierlichen Übergang von Tumorgewebe zum lateralen Normalhautgewebe.

Das Merkmal laterale Abgrenzbarkeit wurde durch die mikroskopische Untersuchung des Übergangs zwischen intraepidermalem Tumoranteil und normaler Haut beurteilt. 24 von insgesamt 26 Melanomen (92,3%), die sich durch eine unscharfe Begrenzung vom Tumorgewebe zur Normalhaut auszeichneten, waren auf Körperteilen mit chronischer Sonnenexposition lokalisiert ($p=0,005$). Es zeigt sich also eine signifikante Assoziation von Melanomen chronischer Sonnenexposition mit einer schlechten Abgrenzbarkeit des Tumors nach lateral.

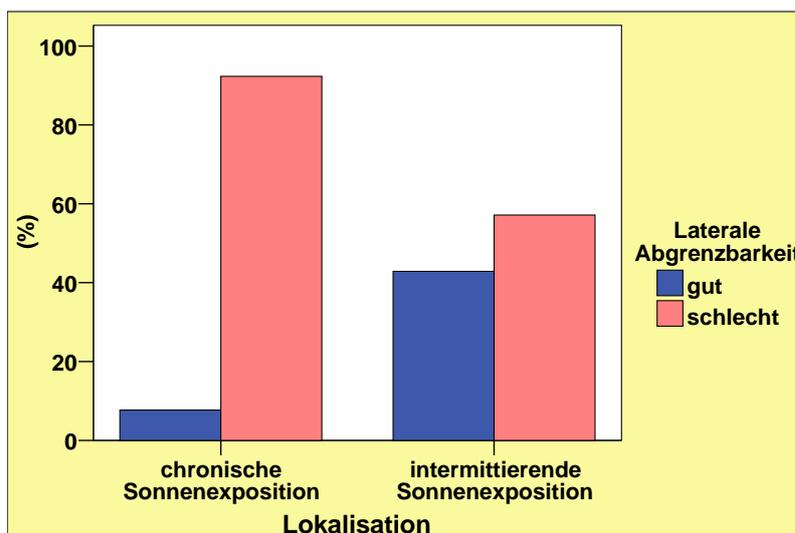


Abbildung 32: Darstellung der Assoziation zwischen lateraler Abgrenzbarkeit und Lokalisation.

			Lokalisation		
			chronische Sonnen- exposition	Inter- mittierende Sonnen- exposition	Gesamt
Laterale Abgrenzbarkeit	gut	Anzahl	2	12	14
		% von Lokalisation	7,7%	42,9%	25,9%
Gesamt	schlecht	Anzahl	24	16	40
		% von Lokalisation	92,3%	57,1%	74,1%
	Laterale Abgrenzbarkeit	Anzahl	26	28	54
		% von Lokalisation	48,1%	51,9%	100,0%
	% von Lokalisation	100,0%	100,0%	100,0%	

Tabelle 22: Chi-Quadrat-Test zur Errechnung der Assoziation zwischen lateraler Abgrenzbarkeit und Lokalisation

	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)
Exakter Test nach Fisher	0,005	0,003

Tabelle 23: Exakter Test nach Fisher zur Errechnung der Assoziation zwischen lateraler Abgrenzbarkeit und Lokalisation

3.2.9 c-KIT Mutationen waren nicht nachweisbar

Alle Melanome wurden mittels Real-time-PCR (Abbildung 33) auf c-KIT L576P Mutationen hin untersucht. Proben mit nicht eindeutigen Ergebnissen wurden zusätzlich via konventioneller PCR und anschließender direkter Sequenzierung (Abbildung 34) analysiert.

In keiner der insgesamt 65 Proben konnte eine c-KIT Mutation nachgewiesen werden. Eine Probe war nicht auswertbar.

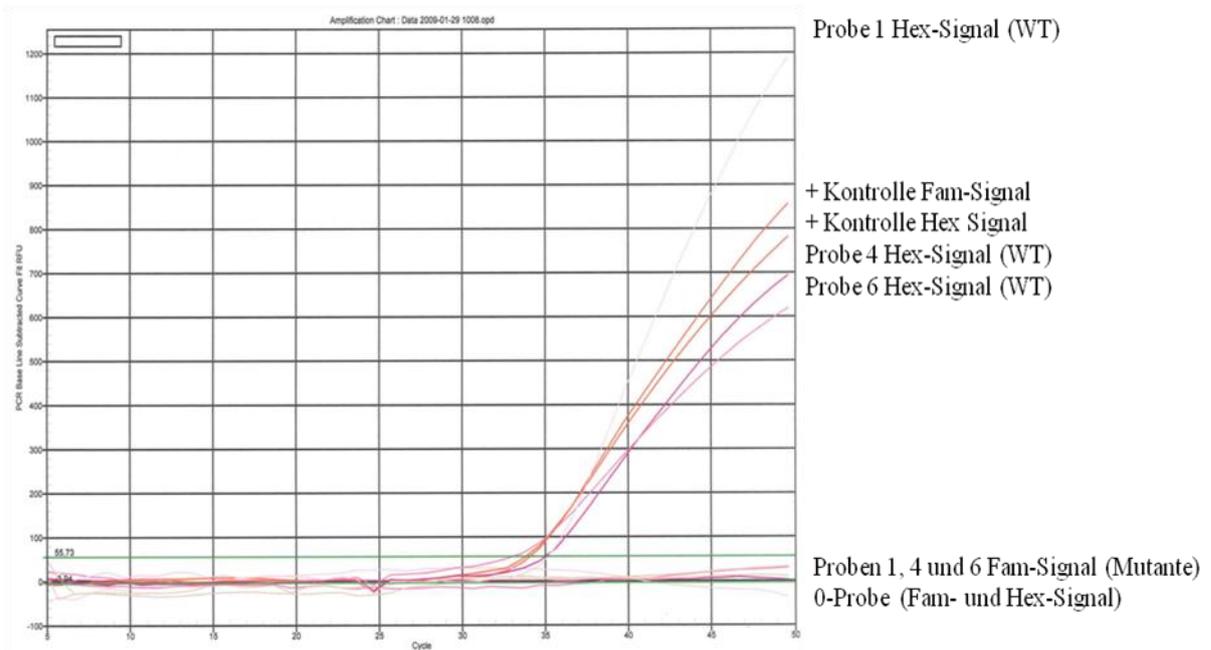


Abbildung 33: Real-time PCR zur Detektion von c-KIT Mutationen

In keiner der hier untersuchten Proben konnte ein Signal für die mit FAM markierte mutations-spezifische Sonde erzielt werden.

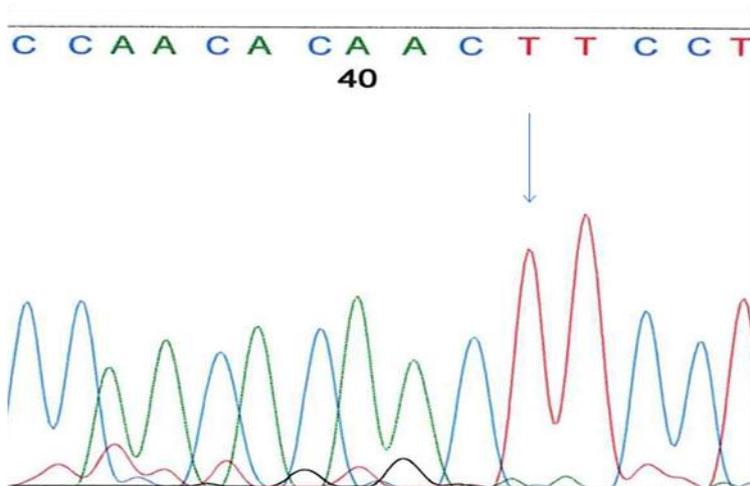


Abbildung 34: Wildtyp c-KIT, Sequenzanalyse vom Exon 11 des c-KIT Gens,

bei einer L576P Mutation wäre an der mit dem Pfeil markierten Position Thymin durch Cytosin ersetzt.

4 DISKUSSION

Das maligne Melanom gehört aufgrund seiner frühen Tendenz zur Metastasierung und seiner Resistenz gegenüber Chemotherapeutika zu den aggressivsten humanen Neoplasien.

Die Transformation von benignen Melanozyten zu Melanomzellen ist an die Aktivierung von wachstumsstimulierenden Signalwegen gekoppelt. Die häufigsten genetischen Veränderungen sind aktivierende Mutationen im BRAF (Davies *et al.*, 2002), NRAS (Albino *et al.*, 1989) oder c-KIT (d'Auriol *et al.*, 1988) Gen. Diese Proto-Onkogene kodieren für Proteine des MAPK-Kinase-Signalwegs, welcher an der Regulation von Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose beteiligt ist. BRAF, NRAS und c-KIT sind im Wildtyp für eine intermittierende Aktivierung des Signalwegs verantwortlich. Durch somatische Mutationen können aus Protoonkogenen Onkogene werden, die unabhängig von extrazellulären Stimuli eine mehr oder minder dauerhafte Aktivierung des Signalweges bewirken können.

Als genetische Basis für die Entstehung von Melanomen werden derartige Mutationsmechanismen (Bishop, 2006) oder Funktionsverluste von Tumorsuppressorgenen diskutiert (Weinberg, 1991). Den Mechanismus, der zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen führt, versucht die „Two Hit“ Hypothese von Knudson (Knudson, 1971) zu erklären: Nach Punktmutation (first hit) auf einem Allel könnte der Verlust von genetischem Material auf dem funktionsaufrechterhaltenden zweiten Allel (second hit) erfolgen. Verlust von genetischem Material ist beim malignen Melanom gehäuft auf dem kurzen Arm des Chromosoms 9 (Uribe *et al.*; 2009) nachgewiesen worden.

In der vorliegenden Arbeit wurden 65 Melanome auf molekulargenetische, morphologische, klinische und prognostische Merkmale untersucht und statistisch signifikante Assoziationen zwischen den einzelnen Merkmalen herausgearbeitet. Ziel war hierbei, eine Charakterisierung von Melanomen zu

erstellen, die die vorhandenen Klassifikationssysteme durch die Miteinbeziehung molekularbiologischer Merkmale ergänzt. Eine Tumorklassifikation beinhaltet die systematische Unterteilung der Läsionen in verschiedenen Kategorien, die bestimmte Eigenschaften teilen und sich so von anderen Gruppen abgrenzen lassen. Besonders hilfreich sind Klassifikationssysteme, bei deren Einteilung das Ansprechen auf verschiedene Therapieformen berücksichtigt worden ist.

Die derzeitige WHO (World Health Organisation) Klassifikation zur Einteilung von Melanomen (LeBoit *et al.*, 2006) unterscheidet vier verschiedene Typen: Das superfiziell spreitendes Melanom (SSM), das lentigo-maligna Melanom (LMM), das noduläre Melanom (NM) und das akral-lentiginöse Melanom (ALM). Diese Klassifikation basiert auf Aussehen, Art des Wachstums, Neigung zur Metastasierung und klinischen Eigenschaften, wie Lokalisation und Patientenalter. Durch die American Joint Committee on Cancer (AJCC) Klassifikation (Balch *et al.*, 2009) werden Melanome in verschiedenen Stadien eingeteilt. Hierbei wird sowohl Tumordicke sowie Lymphknoten- und Metastasierungsstatus (TNM) berücksichtigt und somit werden Patienten in unterschiedliche prognostische Kategorien eingeteilt. Auch wenn in dieser Einteilung wichtige klinische und histopathologische Eigenschaften von Melanomen berücksichtigt werden, ist doch die Bedeutung für das klinische Management von malignen Hauttumoren limitiert.

Durch die oben genannten Systeme werden Melanome zwar klassifiziert, folgende Punkte werden jedoch nicht berücksichtigt: Melanome werden hierbei weder abhängig von ihrem Ansprechen auf spezifische Therapieformen unterschieden, noch werden melanom-spezifische Biomarker oder genomische Informationen als Kriterien für die Klassifikation mit einbezogen. Staging-Schemata und therapeutische Entscheidungen basieren hauptsächlich auf der Tumordicke, Ulzeration und dem Ausmaß der Metastasierung.

Von besonderem Interesse ist daher, eine Einteilung für Melanome zu erstellen die sowohl molekulargenetische, klinische und morphologische Merkmale, als

auch prognostische Faktoren berücksichtigt, und so möglicherweise mehr Einfluss auf die klinische Handhabung von Melanomen nehmen kann. Diese Gruppierungen sollten sich hinsichtlich ihres klinischen Verlaufs und auch hinsichtlich ihres Ansprechens auf zukünftig verfügbare Therapien unterscheiden und damit Einfluss auf das Management der einzelnen Gruppen nehmen.

Nach intensiver Forschungsarbeit ist eine bessere Verständlichkeit von Schlüssel-Signalwegen und potentiellen therapeutischen Zielen in der Tumorprogression von Melanomen möglich. Die Übertragung der Erkenntnisse von in vitro Studien zur klinischen Anwendung ist im Gange und mittlerweile konnten vielversprechende Behandlungserfolge durch die Berücksichtigung der molekularen Eigenschaften bei der Therapieentscheidung von Melanomen erzielt werden:

In einer im August 2010 veröffentlichten Studie zur Wirkung eines neuartigen BRAF-Kinase Inhibitors PLX4032 zeigten sich Ergebnisse, die Anlass zur Hoffnung bei der Behandlung des metastasierten Melanoms geben (Flaherty *et al.*, 2010). In der Phase-I-Dosisescalationsstudie wurden 55 Patienten mit dem neuen Medikament behandelt. In der darauf folgenden Extensionsstudie wurden 32 Patienten eingeschlossen, die alle eine V600E Mutation im BRAF Gen aufwiesen. Schon in der Dosisfindungsphase zeigte sich eine komplette Remission bei einem Patienten und eine partielle Remission bei 63% der behandelten Patienten. In der Extensionsstudie war bei 24 der 32 behandelten Patienten (81%) eine partielle Remission nachweisbar und zwei Patienten zeigten sogar eine komplette Remission. Zum Zeitpunkt der Veröffentlichung wurden noch 16 Patienten im Rahmen der Studie behandelt und die mediane progressionsfreie Überlebenszeit betrug bereits 7 Monate.

Keffort et al (Keffort *et al.*, 2010) konnten durch ihre Studie bestätigen, dass BRAF ein geeignetes Ziel für die Behandlung von Melanomen ist. In einer Phase I/II Studie untersuchten sie die Wirkung eines neuartigen BRAF Kinase Inhibitors GSK2118436. 52 der 61 in dieser Studie eingeschlossenen Patienten

litten an einem BRAF-mutierten Melanom. Bei 60% der Studienteilnehmer, inklusive der Patienten mit Hirnmetastasen, zeigte sich ein Ansprechen auf die Therapie.

Bei 10-15% der mukosalen und akrolentiginösen Melanome sind Mutationen im c-KIT Gen nachweisbar. Guo et al. untersuchten in einer Phase-II-Studie 390 Patienten mit mukosalen und akralen Melanomen im Stadium IV in China (Guo et al., 2010). Diejenigen Patienten, bei denen eine Mutation im c-KIT Gen nachweisbar war (10,5%), wurden mit dem c-KIT-Inhibitor Imatinib behandelt. 21% der Patienten zeigten eine partielle Remission, 35% zumindest eine Stabilisierung der Erkrankung.

Diese Daten zeigen, dass Melanome abhängig von ihren genetischen Merkmalen auch unterschiedlich auf die verfügbaren Therapieansätze reagieren. Einige Medikamente sind z.B. bei Melanomen mit BRAF Mutationen wirksamer als bei Melanomen mit dem entsprechenden Wildtyp. Bei allen wissenschaftlichen Bemühungen zur Therapie des metastasierten Melanoms der vergangenen Jahrzehnte konnte niemals zuvor eine Ansprechrate von 81%, wie in der oben beschriebenen Studie von Flaherty et al. erzielt werden. Durch eine gezielte Therapie der Melanome, entsprechend ihres genetischen Profils, konnten also erstmals durchschlagende Therapieerfolge erzielt werden. Hiernach wäre es also ein sinnvoller Ansatz, Melanome in Zukunft ihrem genetischen Profil entsprechend zu klassifizieren und zu behandeln und so eine bessere Auswahl der einzelnen Medikamente zu ermöglichen. Durch die molekulare Charakterisierung von Melanomen könnte in Zukunft eine rationale und individualisierte Behandlung von Melanomen möglich sein, die ein gemeinsames molekulares Merkmal teilen.

Eine Analyse von BRAF und NRAS Mutationen in Korrelation mit histopathologischen Merkmalen ergab eine Assoziation von einigen morphologischen Merkmalen mit BRAF Mutationen, nicht aber mit Alterationen im NRAS Gen. Viros et al. konnten herausstellen, dass Melanome mit BRAF Mutationen gehäuft intraepidermale Nesterbildung zeigen, der Tumor sich

deutlicher nach lateral abgrenzen lässt und häufiger eine intraepidermale Aszension der Melanozyten nachweisbar ist (Viros *et al.*, 2008). Diese Merkmale sind identisch mit denen von superfiziell spreitenden Melanomen und grenzen sich von den Merkmalen der Lentigo-maligna Melanome ab.

In der hier vorliegenden Studie wurden die Melanome abhängig von der anatomischen Lokalisation, an der der Primärtumor auftrat, in zwei Gruppen eingeteilt: Zum einen Melanome, die sich auf chronisch sonnenexponierter Haut gebildet hatten, hierfür wurde exemplarisch die Kopf-Hals-Region gewählt, zum anderen Melanome, die auf nur intermittierend der Sonne ausgesetzter Haut wie an Stamm und Extremitäten entstanden waren.

Ein grundlegendes Ergebnis war der Nachweis einer signifikanten Assoziation zwischen dem Auftreten von Mikrosatelliteninstabilitäten und dem Nichtauftreten von BRAF-Mutationen. Die Melanome zeigten mit der Ausnahme von drei Proben entweder BRAF Mutationen oder waren mikrosatelliteninstabil. Diese Assoziation lässt folgende Hypothese zu: Die Mutation von BRAF stellt ein wichtiges genetisches Ereignis in der Genese des malignen Melanoms dar. Eine zusätzliche Mikrosatelliteninstabilität, würde möglicherweise dazu führen, dass die Zelle nicht mehr überlebensfähig ist. Ein genetisches Ereignis reicht also aus, um eine maligne Transformation zu erreichen.

Interessanterweise zeigte sich bei unseren Untersuchungen auch, dass Melanome, bei denen Mikrosatelliteninstabilitäten nachweisbar waren, mit Ausnahmen von drei Melanomen, vom Kopf-Hals-Bereich stammten. Vorgegangene Studien konnten zeigen, dass vor allem UVB Strahlung die Entstehung von instabilen Mikrosatelliten induzieren kann (Hussein *et al.*, 2005). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass UV-Strahlung hier einen erheblichen DNA Schaden anrichtet, der die Kapazität von DNA Reparaturmechanismen limitiert. Auch unsere Ergebnisse lassen sich mit dieser Hypothese vereinen. Melanome, die sich im Kopf-Hals-Bereich entwickelt haben, waren chronischer Sonnenexposition ausgesetzt und sind signifikant

häufiger über instabile Mikrosatelliten charakterisiert, als Melanome auf Haut mit intermittierender Sonnenexposition.

Die Kopf-Hals-Region ist im Laufe des Lebens kumulativ mehr UV-Licht ausgesetzt als das übrige Integument. Während sich mehr als 90% der spinozellulären und der Basalzellkarziome auf chronisch sonnenexponierter Haut entwickeln, finden sich im Kopf-Hals-Bereich zwischen 10 und 30% der Melanome (Cox *et al.*, 1996). Sie entstehen mit 11-21% überproportional häufiger (Gillgren *et al.*, 1999) im Kopf-Hals-Bereich, setzt man die Körperoberfläche der Kopf-Halsregion mit nur 9% mit der restlichen Körperoberfläche ins Verhältnis. Es wurde daher angenommen, dass Melanome des Kopf-Hals-Bereiches einer eigenen Entität zugeordnet werden können. Bei unseren Untersuchungen zeigte sich bei Melanomen auf chronisch sonnenexponierter Haut einerseits, wie schon oben erwähnt, häufiger das Auftreten instabiler Mikrosatelliten, andererseits waren die Tumoren schlechter nach lateral abgegrenzt und zeigten weniger intraepidermale Nesterbildung. Diese Tatsache lässt sich damit erklären, dass Kopf Hals Melanome zu 47,4% Lentigo-maligna Melanome sind (Hoersch *et al.*, 2006). Diese zeichnen sich durch fehlende Aszension der intraepidermalen Melanozyten sowie weniger stark ausgeprägter Nesterbildung aus und sind charakterisiert durch solitäre Proliferation von Melanozyten entlang der Basalzellschicht und eine undeutliche Abgrenzbarkeit des Tumors nach lateral (Duncan, 2009). Es zeigt sich hier also eine Übereinstimmung der konventionellen klinisch-morphologischen Klassifikation mit einem molekulargenetischen Merkmal, dem Auftreten instabiler Mikrosatelliten.

Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass bei Melanomen auf intermittierend sonnenexponierten Körperstellen häufiger Allelverluste an Mikrosatelliten-Genorten nachweisbar waren. In anderen Untersuchungen stellte sich heraus, dass Melanome mit BRAF Mutationen häufiger an Körperstellen mit intermittierender Sonnenexposition nachweisbar waren und seltener im Kopf-Halsbereich (Maldonado *et al.*, 2005), was sich mit unseren Ergebnissen bezüglich der Exklusivität von BRAF Mutationen und instabilen Mikrosatelliten

in Einklang bringen lässt. Melanome im Kopf-Hals-Bereich zeigen instabile Mikrosatelliten aber keine BRAF Mutationen. Dieses Ergebnis zeigt, dass das Auftreten von instabilen Mikrosatelliten mit chronischer Sonnenexposition, der Nachweis von Allelverlusten bzw. BRAF Mutationen dagegen mit intermittierender Sonnenexposition assoziiert ist.

Mutationen im NRAS- und BRAF-Gen gehören zu den häufigsten genetischen Veränderungen beim malignen Melanom. Die Frequenz der Mutationen liegt je nach Quelle bei NRAS zwischen 4-50% und bei BRAF zwischen 20-80%. Die Variationen in den Häufigkeiten beruhen wahrscheinlich auf Unterschieden in der Probenauswahl, hinsichtlich ihrer histopathologischen Subklassifizierung, der anatomischen Lokalisation und dem Ausmaß der UV-Exposition.

In vorangegangenen Studien (Davies *et al.*, 2002; Tsao und Zhang, 2000) konnte wiederholt die Exklusivität von NRAS und BRAF Mutationen nachgewiesen werden. Die Aktivierung an einem Punkt des MAPK Signalweges scheint ausreichend, um die Kaskade zu aktivieren und damit Zellproliferation und Tumorgenese zum Teil zu initiieren (Kumar *et al.*, 2003). Bei unseren Ergebnissen konnte keine statistisch signifikante Assoziation zwischen dem Auftreten von NRAS und dem Nichtauftreten von BRAF gezeigt werden. Dies lässt sich mit der niedrigen Anzahl der NRAS Mutationen unserer Proben insgesamt erklären. Nur fünf der insgesamt 65 untersuchten Proben zeigten NRAS Mutationen und zwei von ihnen exprimierten gleichzeitig Mutationen im BRAF Gen. Die Häufigkeit der in unserer Studie detektierten NRAS Mutationen liegt bei 8% und somit an der unteren Grenze der aus der Literatur bekannten Werte mit 5-36% (Albino *et al.*, 1989; Van't Veer *et al.*, 1989). Das Auftreten von NRAS Mutationen folgt zwei unterschiedlichen Mustern. Sie treten entweder im Frühstadium der Melanomentwicklung oder als spätes genetisches Ereignis im metastasierten Stadium auf (Demunter *et al.*, 2001). Auf dieser Erkenntnis beruhend, lässt sich die niedrige Frequenz von NRAS Mutationen in dieser Studie erklären. Es wurden keine in-situ Melanome eingeschlossen und, mit Ausnahme von drei Proben, wurden nur Melanome untersucht, die zum Zeitpunkt der Exzision noch nicht metastasiert waren.

Das c-KIT Gen kodiert für eine Rezeptortyrosinkinase, die als Rezeptor für SCF (Stem Cell Factor) fungiert. Einige Studien konnten nachweisen, dass es im Rahmen der malignen Progression eines Melanoms vom Melanoma in situ zum Metastasierungsstadium zu einem Verlust der c-KIT Expression kommt (Montone *et al.*, 1997; Shenn *et al.*, 2003). Demnach scheint c-KIT nicht in das Profil der aktivierenden Rezeptortyrosinkinasen beim Melanom zu passen. Dennoch konnte die L576P Mutation im c-KIT Gen wiederholt beim Melanom gefunden werden (Willmore-Payne *et al.*, 2005). Die Häufigkeit der Mutationen, die für c-KIT angegeben werden, variieren extrem in Abhängigkeit von der Art der untersuchten Melanome. Auf sonnengeschützten Körperstellen entwickeln sich häufiger c-KIT Mutationen-tragende Melanome. So konnten bei Melanomen, die auf Fußsohlen (36%) oder Schleimhäuten (39%) entstanden sind, gehäuft c-KIT Mutationen gefunden werden (Curtin *et al.*, 2006). In unserer Studie wurde bei keinem der untersuchten Melanome eine c-KIT Mutation festgestellt. Dies lässt sich möglicherweise durch die Lokalisation der gewählten Melanome erklären. Keine der hier untersuchten Proben stammte von Schleimhäuten oder von anatomischen Lokalisationen, die vollständig vor UV Exposition geschützt waren. In der c-KIT Real-time PCR waren in den Positivkontrollen (Proben aus kutanen Metastasen eines Mammakarzinoms) Mutationen im c-KIT Gen nachweisbar, so dass falsch negative Ergebnisse für alle Proben eher unwahrscheinlich sind, zumal alle Proben im Doppelansatz untersucht wurden.

Drei der von uns untersuchten Proben stammten aus kutanen Metastasen eines malignen Melanoms. Interessanterweise zeigt sich in diesen drei Fällen ein erheblicher Grad genetischer Degeneration. Die Metastasen wiesen jeweils in allen getesteten und auswertbaren Mikrosatellitenmarkern Verluste von Allelen und Mutationen im BRAF Gen auf. Daher drängt sich die Frage auf, ob der Verlust von chromosomalem Material mit der Progression des malignen Melanoms zunimmt. Andere Autoren konnten feststellen, dass der Verlust von genetischem Material beim malignen Melanom mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist (Healy *et al.*, 1998).

Clark et al. unterteilten Melanome vor mehr als 40 Jahren in 3 verschiedenen Typen und stellten dabei fest, dass tief invasive Tumorzellen ähnlich imponierten, unabhängig davon ob sie von einem superfiziell spreitenden, einem nodulären oder einem Lentigo-maligna Melanom stammten. Diese Tatsache lässt bezüglich morphologischer und genomischer Korrelationen einen neuen Blickwinkel zu: Melanome bestehen aus einer heterogenen Gruppe von Tumorzellen, welche sich im Verlauf der Tumorprogression weiter dedifferenzieren bzw. entdifferenzieren. Eine molekularbiologische Charakterisierung von Melanomzellen für ein und denselben Tumor bleibt also im Verlauf einer Tumorprogression vermutlich nicht statisch. Erstellt man ein genetisches Profil von einem Melanom, so repräsentiert dieses Profil das eines Teils der Melanomzellen, welche nicht den „bösartigsten“ Zellen des Tumors entsprechen müssen. Eine kleine Untergruppe von malignen Zellen mit einem divergenten genomischen Profil kann sich aus dem Zellverband lösen und zur Metastasierung führen. Auch nachdem sich Metastasen gebildet haben, ist eine erneute Veränderung des genetischen Profils möglich. Diese Hypothese unterstützt die Beobachtung, dass sowohl bei Primärmelanomen als auch bei Melanommetastasen intratumoral heterogene Tumorzellverbände nachgewiesen wurden (Zubovits *et al.*, 2004). Diese intratumorale Heterogenität der Tumorzellen beim Melanom mag mitverantwortlich sein für die Resistenz der Melanome gegenüber medikamentösen Behandlungsversuchen.

Weiterführende Untersuchungen könnten durch eine längerfristige Nachbeobachtung die prognostischen Kriterien der untersuchten Melanome genauer beleuchten und so mehr Aussagekraft über den klinischen Verlauf der mit einbezogenen Melanompatienten im Zusammenhang mit den molekulargenetischen und histologischen Merkmalen erbringen.

In den letzten Jahren konnten bereits sinnvolle Ansätze herausgearbeitet werden, verlässliche molekulare Marker zu finden, die auf sinnvolle Art Zielstrukturen einer Therapie des malignen Melanoms werden können. Einige Studien, wie auch die hier vorliegende, konnten Assoziationen zwischen

molekularbiologischen Merkmalen und morphologischen Eigenschaften zeigen. Weiterführende Untersuchungen mit höheren Patientenzahlen und aussagekräftigeren Verlaufsdaten der Patienten, können möglicherweise zu einem neuartigen Verständnis der Pathogenese und Tumorprogression des malignen Melanoms auf molekularer sowie morphologischer Ebene führen und so in einer klinisch brauchbaren Einteilung für Melanome resultieren, die maßgeblichen Einfluss auf die jeweiligen Therapieentscheidungen nehmen kann.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Das maligne Melanom ist ein hochgradig bösartiger Tumor der Pigmentzellen. Er neigt früh zur Metastasierung und ist die am häufigsten tödlich verlaufende Hautkrankheit mit weltweit stark steigender Anzahl an Neuerkrankungen.

Ziel der Arbeit war eine Charakterisierung von Melanomen, die sowohl die bekannten Kriterien der WHO Klassifikation wie Aussehen, Art des Wachstums und Lokalisation berücksichtigt, als auch neue molekularbiologische Merkmale miteinschließt. In unserer Studie wurden insgesamt 65 Patienten mit einbezogen. Die zuvor archivierten Daten wie Alter, Geschlecht, Lokalisation des Tumors, Breslow Index und Clark Level konnten zur Charakterisierung der Melanome verwendet werden. 34 Melanome stammten von Körperstellen intermittierender Sonnenexposition und 31 Melanome waren auf chronisch lichtgeschädigter Haut entstanden.

Alle Melanome wurden auf Mutationen in den Onkogenen NRAS und BRAF untersucht. Zusätzlich wurden sechs unterschiedliche Mikrosatelliten des Chromosom 9 analysiert. Darüber hinaus wurden die Proben auf morphologische Kriterien untersucht.

Wesentliche Ergebnisse:

- a) Mikrosatelliteninstabilitäten wurden signifikant häufiger bei Melanomen nachgewiesen, die auf chronisch lichtgeschädigter Haut entstanden sind.
- b) Mikrosatelliteninstabile Melanome und damit auch Melanome von chronisch sonnenexponierter Haut waren häufiger undeutlich nach lateral abgegrenzt. Darüber hinaus konnten wir feststellen, dass chronisch lichtexponierte Melanome seltener Nesterbildung zeigten.
- c) Mikrosatelliteninstabilitäten wurden häufiger bei Melanomen nachgewiesen, die dem BRAF-Wildtyp entsprachen. BRAF-Mutationen und Mikrosatelliteninstabilitäten schließen sich also mit Ausnahme von wenigen Melanomen aus.

d) Melanome auf intermittierend sonnenexponierter Haut zeigten hingegen häufiger Allelverluste an Genorten einzelner Mikrosatelliten.

In unseren Untersuchungen ließen sich Gruppen von Melanomen bilden, die sich in molekulargenetischen und morphologischen Merkmalen gleichen und sich dadurch von anderen Melanomen abgrenzen lassen. In Zukunft kann durch die zunehmende Berücksichtigung molekulargenetischer Merkmale bei der Einteilung von Melanomen eine neue Gruppierung möglich werden. Offensichtlich haben molekulargenetisch und morphologisch unterschiedliche Melanome auch eine unterschiedliche Pathogenese und Ätiologie. Es ist zu vermuten, dass eine zukünftige Melanomklassifikation unter Einbezug molekulargenetischer Daten eine bessere Prognostizierbarkeit des Ansprechens der Melanome auf zukünftig verfügbare Therapien erlaubt und somit mehr Einfluss auf das klinische Management der einzelnen Patientengruppen nehmen kann.

6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AJCC	American Joint Committee on Cancer 2010
ALM	Akral-lentiginöses Melanom
A-MSH	Melanozyten- stimulierendes Hormon
AK	Antikörper
Bp	Basenpaar(e)
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CDK4	Cyclin-dependent kinase 4
CDKN2A	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
c-KIT	v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene
CTLA	T-Lymphozyten assoziiertes Antigen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
d.h.	das heißt
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et aliter
HE	Hämatoxylin-Eosin
kb	Kilobasenpaar(e)
LMM	Lentigo-maligna-Melanom
LOH	Loss of heterozygosity
MC1R	Melanocortin 1 Rezeptor
N	Nodus
M	Metastase
NMM	Noduläres malignes Melanom
MSI	Mikrosatelliteninstabilitäten
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer (Maß der Wellenlänge des Lichts)
PCR	Polymerase Chain Reaction; Polymerasekettenreaktion

HRAS	Harvey rat sarcoma virus oncogene
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene
NRAS	Neuroblastoma rat sarcoma viral oncogene
Rb	Retinoblastom Protein
RAF	Rapidly growing fibrosarcoma or rat fibrosarcoma
RAS	Rat sarcoma virus oncogene
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SSM	Superfiziell spreitendes Melanom
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Tumor
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
UICC	Union International Contre le Cancer
UCM	nicht klassifizierbares Melanom
UV	Ultraviolettes Licht
WHO	World health organisation

SI-Einheiten

g	Gramm
h	Stunde(n)
l	Liter
m	Milli-
min	Minute(n)
μ	Mikro-
M	Molar
n	Nano-
sec	Sekunde(n)
V	Volt

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Ackerman AB (1980) Malignant Melanoma: an unifying concept. *Human Pathol.* 11: 591-595.
- Ackermann J, Frutschi M, Kaloulis K, McKee T, Trumpp A, Beermann F (2005) Metastasizing melanoma caused by expression of activated NRASQ61K on INK4a-deficient background. *Cancer Res.* 65: 4005-4011.
- Albino AP, Nanus DM, Mentle IR, Cordon-Cardo C, McNutt NS, Bressler J, Andreeff M (1989) Analysis of ras oncogenes in malignant melanomas and precursor lesions: correlation of point mutations with differentiation phenotype. *Oncogene.* 4: 1363-1374.
- Albino AP, Le Strange R, Oliff A L, Furth M E, und Old L J (1984) Transforming ras genes from human melanoma: a manifestation of tumor heterogeneity? *Nature.* 308: 69-72.
- Austin PF, Cruse CW, Lyman G, Schroer K, Glass F, und Reintgen DS (1994) Age as a prognostic factor in the malignant melanoma population. *Ann Surg Oncol.* 1: 487- 494.
- Autier P, Dore JF (1998) Influence of sun exposures during childhood and during adulthood on melanoma risk. *Int J Cancer.* 77: 533- 537.
- Avruch J, Khokhlatchev A, Kyriakis JM, Luo Z, Tzivion G, Vavvas D, Zhang XF. (2001) Ras activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade. *Recent Proc Horm Res.* 56: 127- 155.
- Balch CM, Wilkerson JA, Murad TM, Soong SJ, Ingalls AL, Maddox WA (1980) The prognostic significance of ulceration of cutaneous melanoma. *Cancer.* 45: 3012- 3017.
- Balch CM (1992) Cutaneous melanoma: prognosis and treatment results worldwide. *Semin Surg Oncol.* 8: 400- 414.
- Balch CM, Soong SJ, Gershenwald JE, Thompson JF, Reintgen DS, Cascinelli N, Urist M, McMasters KM, Ross MI, Kirkwood JM, Atkins MB, Thompson JA, Coit DG, Byrd D, Desmond R, Zhang Y, Liu PY, Lyman

- GH, Morabito A (2001) Prognostic factors analysis of 17 600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. *J Clin Oncol.* 19: 3622- 3634.
- Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, Buzaid AC, Cochran AJ, Coit DG, Ding S, Eggermont AM, Flaherty KT, Gimotty PA, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MC Jr, Morton DL, Ross MI, Sober AJ, Sondak VK (2009) Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol.* 27: 6199-206.
- Beckmann J S, Weber J L (1992) Survey of human and rat MS. *Genomics.* 12: 627- 631.
- Bishop JN, Harland M, Bishop DT (2006) The genetics of melanoma. *Br J Hosp Med,* 67(6):299-304.
- Breslow A (1970) Thickness cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg.* 172: 902- 908.
- Büttner P, Garbe C, Bertz J, Burg G, d'Hoedt B, Drepper H, Guggenmoos-Holzmann I, Lechner W, Lippold A, Orfanos CE (1995) Primary cutaneous melanoma. Optimized cutoff points of tumor thickness and importance of Clark's level for prognostic classification. *Cancer.* 15: 2499- 2506.
- Buzaid AC, Anderson CM (2000) The changing prognosis of melanoma. *Curr Oncol Rep.* 2: 322- 328
- Cascinelli N, Belli F, Santinami M, Fait V, Testori A, Ruka W, Cavaliere R, Mozzillo N, Rossi CR, MacKie RM, Nieweg O, Pace M, Kirov K (2000) Sentinel lymph node biopsy in cutaneous melanoma: The WHO Melanoma Program experience. *Ann Surg Oncol.* 7: 469-474.
- Cho E, Rosner BA, Feskanich D, Colditz GA (2005) Riskfaktors and individual probabilities of melanoma for whites. *J Clin Oncol.* 23: 2669- 2675.
- Clark W, From L, Bernhadino EA, Mihm MC (1969) The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanoma of the skin. *Cancer Res.* 29: 705-729.

- Clark WH, Goldman LI, Mastrangelo MJ (1979) Human Malignant Melanoma. New York: Grune & Stratton. 42- 43.
- Cohen C, Zavala-Pompa A, Sequeira JH, Shoji M, Sexton DG, Cotsonis G, Cerimele F, Govindarajan B, Macaron N, Arbiser JL (2002) Mitogen-activated protein kinase activation is an early event in melanoma progression. *Clin Cancer Res.* 8: 3728- 3733.
- Columbo M, Horowitz EM, Botana LM, MacGlashan DW Jr, Bochner BS, Gillis S, Zsebo KM, Galli SJ, Lichtenstein LM (1990) The human recombinant c-kit receptor ligand, rhSCF, induces mediator release from human cutaneous mast cells and enhances IgE-dependent mediator release from both skin mast cells and peripheral blood basophils. *J Immunol.* 149: 599-608.
- Cox NH, Aitchison TC, Sirel JM, MacKie RM (1996) Comparison between lentigo maligna melanoma and other histogenetic types of malignant melanoma of the head and neck. Scottish Melanoma Group. *Br J Cancer.* 73: 940- 944.
- Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T (2005) Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med.* 353: 621- 47.
- Curtin JA, Busam K, Pinkel D, Bastian BC (2006) Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma. *J Clin Oncol.* 24: 4340-4346.
- d'Auriol L, Mattei MG, Andre C, Galibert F (1988) Localization of the human c-kit protooncogene on the q11-q12 region of chromosome 4. *Hum Genet.* 78: 374- 376.
- Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster

- R, Stratton MR, Futreal PA (2002) Mutation of the BRAF gene in human Cancer. *Nature*. 417: 949- 954.
- Daya-Grosjean L, Damaz N, Sarasin A (1995) The specificity of p53 mutation spectra in sunlight induced human cancer. *J Photochem Photobiol B*. 28: 115-124.
- Demunter A, Stas M, Degreef H, De Wolf-Peeters C, van den Oord JJ (2001) Analysis of N- and K-ras mutations in the distinctive tumor progression phases of melanoma. *J Investig Dermatol*. 117: 1483- 1489.
- Desmond RA und Soong SJ (2003). Epidemiology of malignant melanoma. *Surg Klin North Am*. 83: 1-19.
- Easty DJ, Bennett DJ (2000) Protein tyrosin kinases in malignant melanoma. *Melanoma Res*. 10: 401- 411.
- Edmunds SC, Cree IA, Dí Nicolás F, Hungerford JL, Hurren JS, Kelsell DP (2003) Absence of BRAF gene mutations in uveal melanoma in contrast to cutaneous melanoma. *Br J Cancer*. 88: 1403- 1405.
- Elder DE, Clark WH, Elentitsas R, Guerry D, Halpern AC (1993) The early and intermediate precursor lesions of tumorprogression in the melanocytic system: Common acquired nevi and atypical (dysplastic) nevi. *Semin Diagn Pathol*. 10: 18- 35.
- Elwood JM und Jopson J (1997) Melanoma and sun exposure: an overview of published studies. *Int J Cancer*. 73: 198- 202.
- Eton O, Legha SS, Moon TE, Buzaid AC, Papadopoulos NE, Plager C, Burgess AM, Bedikian AY, Ring S, Dong Q, Glassman AB, Balch CM, Benjamin RS (1998) Prognostic factors for survival of patients treated systemically for disseminated melanoma. *J Clin Oncol*. 16: 1103- 1111.
- Fears TR, Bird CC, Guerry D 4th, Sagebiel RW, Gail MH, Elder DE, Halpern A, Holly EA, Hartge P, Tucker MA (2002) Average midrange ultraviolet radiation flux and time outdoors predict melanoma risk. *Cancer Res*. 69: 3992- 3996.

- Fecher LA, Amaravadi RK, Flaherty KT (2008) The MAPK pathway in melanoma. *Curr Opin Oncol.* 20: 183- 189.
- Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, Ribas A, McArthur GA, Sosman JA, O'Dwyer PJ, Lee RJ, Grippo JF, Nolop K, Chapman PB (2010) Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med.* 363: 809- 819.
- Florenz A, Cruces M (2004) Melanoma epidemic: true or false? *Int J Dermatol.* 43: 405- 407.
- Franzke A, Probst-Kepper M, Buer J, Duensing S, Hoffmann R, Wittke F, Volkenandt M, Ganser A, Atzpodien J (1998) Elevated pretreatment serum levels of soluble vascular cell adhesion molecule 1 and lactate dehydrogenase as predictors of survival in cutaneous metastatic malignant melanoma. *Br J Cancer.* 78: 40- 41.
- Gandini S, Sera F, Cataruzza MS (2005) Meta-analysis of riskfaktors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. *Eur J Cancer.* 41: 45-60.
- Garbe C (1995) Risikofaktoren für die Entwicklung maligner Melanome und Identifikation von Risikopersonen im deutschsprachigem Raum. *Hautarzt.* 46: 309- 314.
- Garbe C, Büttner P, Bertz J, Burg G, d'Hoedt B, Drepper H, Guggenmoos-Holzmann I, Lechner W, Lippold A, Orfanos CE (1995) Primary cutaneous melanoma. Identification of prognostic groups and estimation of individual prognosis for 5093 patients. *Cancer.* 75: 2484- 2491.
- Garbe C, Schadendorf D (2003) Surveillance and follow-up examinations in cutaneous melanoma. *Onkologie.* 26: 241- 246.
- Garnett MJ, Marais M (2004) Guilty as charged: BRAF is a human oncogene. *Cancer Cell.* 6: 313- 319.
- Ghiorzo P, Villaggio B, Sementa AR, Hansson J, Platz A, Nicoló G, Spina B, Canepa M, Palmer JM, Hayward NK, Bianchi-Scarrà G (2004) Expression and localization of mutant p16 proteins in melanocytic lesions from familial melanoma patients. *Hum Pathol.* 35: 25- 33.

- Gilles GG, Marks R, Foley P (1988) Incidence of non-melanocytic skin cancer treated in Australia. *Br Med J.* 296: 13-17.
- Gillgren P, Månsson-Brahme E, Frisell J, Johansson H, Larsson O, Ringborg U (1999) Epidemiological characteristics of cutaneous malignant melanoma of the head and neck-a population-based study. *Acta Oncol.* 38:1069-1074.
- Goldstein AM (2004) Familial melanoma, pancreatic cancer and germline CDKN2A mutations. *Hum Pathol.* 23: 630.
- Gray-Schopfer V, Wellbrock C, Marais R (2007) Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature.* 445: 851- 857.
- Grichnik JM. (2006) Kit and melanocyte migration. *J Invest Dermatol.* 126: 945-947.
- Guo J, Si L, Kong Y, Xu X, Flaherty K, Corless CL, Zhu Y, Li L, Li H (2010) A phase II Study of Imatinib for advanced melanoma patients with KIT abberations. ASCO annual Meeting 2010. Abstract 8527.
- Hansen CB, Wadge LM, Lowstuter K, Boucher K, Leachman SA (2004) Clinical germline genetic testing for melanoma. *Lancet Oncol.* 5: 314-19.
- Healy E (1998) Prognostic significance of allelic losses in primary melanoma. *Oncogene.* 16: 2213–2218.
- Hengge UR, Dummer R (2006) *Malignes Melanom.* Köln: Deutscher Ärzte-Verlag.
- High WA, Robinson WA (2007) Genetic mutations involved in melanoma: a summary of our current understanding. *Adv Dermatol.* 23: 61- 79.
- Hodi FS, Friedlander P, Corless CL (2008) Major response to imatinib mesylate in KIT-mutated melanoma. *J Clin Oncol.* 26: 2046- 2051.
- Hoersch B, Leiter U, Garbe C (2006) Is head and neck melanoma a distinct entity? A clinical registry-based comparative study in 5702 patients with melanoma. *Br J Dermatol.* 155: 771- 777.
- Huang S, Luca M, Gutman M, McConkey DJ, Langley KE, Lyman SD, Bar-Eli M (1996) Enforced c-KIT expression renders highly metastatic human

melanoma cells susceptible to stem cell factor-induced apoptosis and inhibits their tumorigenic and metastatic potential. *Oncogene*. 5: 2339-2347.

Hussein MR, Sun M, und Rogero E (2002) Loss of heterozygosity, microsatellite instability, and mismatch repair protein alterations in the radial growth phase of cutaneous malignant melanomas. *Mol Carcinog*. 34: 35-45.

Hussein MR, Haemel AK, Sudilovsky O, Wood GS (2005) Genomic instability in radial growth phase melanoma cell lines after ultraviolet irradiation. *J Clin Pathol*, 58(4): 389–396.

Ivry GB, Ongle CA, Shim EK (2006) Role of sun exposure in melanoma. *Dermatol Surg*. 32: 481-492.

Jemal A, Murray T, Ward E (2005) Cancer statistics 2005. *CA Cancer J Clin*, 55: 10- 29.

Kamijo T, Weber JD, Zambetti G, Zindy F, Roussel MF, Sheer CF (1998) Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2. *Proc Natl Acad Sci*. 95: 8292- 8297.

Keffort R, Bishop JN, Tucker M (2002) Genetic testing for melanoma. *Lancet Oncol*, 3: 653-4.

Keffort R, Arkenau H, Brown MP, Millward M, Infante JR, Long G V, Ouellet D, Curtis M, Lebowitz PF, Falchock GS (2010) Phase I/II study of GSK2118436, a selective inhibitor of oncogenic mutant BRAF kinase, in patients with metastatic melanoma and other solid tumors. *ASCO Annual Meeting 2010*. Abstract 8501.

Knudson AG Jr (1971) Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 68: 820- 823.

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.

- Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends. 7. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg). Berlin, 2010.
- Kumar R, Angelini S, Hemminki K (2003) Activating BRAF and N-Ras mutations in sporadic primary melanomas: an inverse association with allelic loss on chromosome 9. *Oncogene*. 22: 9217- 9224.
- Lammie A, Drobnjak M, Gerald W, Saad A, Cote R, Cordon-Cardo C (1994) Expression of c-kit and kit ligand proteins in normal human tissues. *J Histochem Cytochem*. 42: 1417- 1425.
- Lassam M, Bickford S (1992) Loss of c-kit expression in cultured melanoma cells. *Oncogene*. 7: 51- 56.
- LeBoit P E, Burg G, Weedon D, Sarasin A (2006) Skin tumours. Pathology and genetics. Lyon: IARC Press.
- Lens MB, Dawes M (2004) Global perspectives of contemporary epidemiological trends of cutaneous malignant melanoma. *Br J Dermatol*. 150: 179- 85.
- Libra M, Malaponte G, Navolanic PM, Gangemi P, Bevelacqua V, Proietti L, Bruni B, Stivala F, Mazzarino MC, Travali S, McCubrey JA (2005) Analysis of BRAF mutation in primary and metastatic melanoma. *Cell Cycle*. 4: 1382- 1384.
- MacLennan R, Green AC, McLeod GR, Martin NG (1992) Increasing incidence of cutaneous melanoma in Queensland, Australia. *J Natl Cancer Inst*. 84: 182- 87.
- Maize JC, Ackerman AB (1987). Pigmented lesions of the skin. Lea & Febiger, Philadelphia.
- Maldonado JL, Fridlyand J, Patel H, Jain AN, Busam K, Kageshita T, Ono T, Albertson DG, Pinkel D, Bastian BC (2003) Determinants of BRAF Mutations in primary melanomas. *J Natl Cancer Inst*. 95: 1878-1890.
- Mayer TC, Green MC (1968) An experimental analysis of the pigment defect caused by mutations at the W and S1 loci in mice. *Dev Biol*. 18: 62- 75.

- Meyer LJ, Zone JH (1993). Genetics of cutaneous Melanoma. *J Invest Dermatol.* 103: 112-116.
- Maldonado JL, Fridlyand J, Patel H, Jain AN, Busam K, Kageshita T, Ono T, Albertson DG, Pinkel D, Bastian BC (2003) Determinants of BRAF mutations in primary melanomas. *J Natl Cancer.* 95:1878-90.
- Montone KT, van Belle P, Elenitas R, Elder DE (1997) Proto-oncogene c-kit expression in malignant Melanoma: Protein loss with tumor progression. *Mol Pathol.* 10: 939- 944.
- Ohsie SJ, Sarantopoulos GP, Cochran AJ, Binder SW (2008) Immunohistochemical characteristics of melanoma. *J Cutan Pathol.* 35: 433- 444.
- Park M (1998) *The Genetic Basis of Human Cancer.* New York: McGraw Hill.
- Patton EE, Widlund HR, Kutok JL, Kopani KR, Amatruda JF, Murphey RD, Berghmans S, Mayhall EA, Traver D, Fletcher CD, Aster JC, Granter SR, Look AT, Lee C, Fisher DE, Zon LI (2005) BRAF Mutations are sufficient to promote nevi formation and cooperate with p53 in the genesis of melanoma. *Curr Biol.* 15: 249- 254.
- Peyssonnaud C, Eychene A (2001) The Raf/MEK/ERK pathway: new concepts of activation. *Biol Cell.* 93: 53- 62.
- Platz A, Sevigny P, Norberg T, Ring P, Langerlöf B, Ringborg U (1996) Genes involved in cell cycle G1 checkpoint control are frequently mutated in human melanoma metastases. *Br J Cancer.* 74: 936- 941.
- Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, Yudt LM, Stark M, Robbins CM, Moses TY, Hostetter G, Wagner U, Kakareka J, Salem G, Pohida T, Heenan P, Duray P, Kallioniemi O, Hayward NK, Trent JM, Meltzer PS (2003) High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet:* 19- 20.
- Roses DF, Provet JA, Harries NM, Gumport SL, Dubin SN (1985) Prognosis of patients with pathologic stage II cutaneous malignant melanoma. *Ann Surg.* 201: 103-107.

- Saletti P, Edwin ID, Pack K, Cavalli F, Aktin WS (2001) Microsatellite instability: Application in hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Ann Oncol.* 12: 151- 160.
- Sekiya T, Fushimi M, Hori M, Hirohashi M, Nishimura S, Sugimura T (1984) Molecular cloning and the total nucleotide sequence of the human c-Ha-ras-1 gene activated in a melanoma from a Japanese patient. *Proc Natl Acad Sci.* 81: 4771– 4775.
- Serrano M, Hannon GJ, Beach D (1993) A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature.* 366: 704-707.
- Shenn, SS, Zhang PS, Eton O, Prieto VG (2003) Analysis of protein tyrosine kinase expression in melanocytic lesions by tissue array. *Cutan Pathol.* 30: 539- 547.
- Smyth P, Finn S, Cahill S, O'Regan E, Flavin R, O'Leary JJ, Sheils O (2005) Ret/PTC and BRAF act as distinct molecular, time-dependant triggers in a sporadic Irish cohort of papillary thyroid carcinoma. *Int J Surg Pathol.* 13: 1- 8.
- Thomson JF, Scolyer RA, Kefford RF (2005) Cutaneous Melanoma. *Lancet.* 365: 687- 701.
- Tsao H, Zhang X (2000) Relative reciprocity of NRAS and PTEN/MMAC1 alterations in cutaneous melanoma cell lines. *Cancer Res.* 60: 1800- 1804.
- Uribe P, Wistuba II, Gonzalez S (2009) Allelotyping, microsatellite instability, and BRAF mutation analyses in common and atypical melanocytic nevi and primary cutaneous melanomas. *Am J Dermatopathol.* 31: 354- 363.
- Valverde P, Healy E, Jackson I, Rees JL, Thody AJ (1995) Variants of the melanocyte-stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans. *Nat Genet.* 11: 328- 330.
- van 't Veer LJ, Burgering BM, Versteeg R, Boot AJ, Ruitter DJ, Osanto S, Schrier PI, Bos JL (1989) N-ras mutations in human cutaneous melanoma from sun-exposed body sites. *Moll Cell Biol.* 9: 3114- 3116.

Viros A, Fridlyand J, Bauer J, Lasithiotakis K, Garbe C, Pinkel D, Bastian BC (2008) Improving Melanoma Classification by integrating Morphologic Features. *Plos med.* 5: 120.

Weinberg RA (1991) Tumor suppressor genes. *Science.* 254: 1138-1146.

Whitwam T, Vanbrocklin MW, Russo ME, Haak PT, Bilgili D, Resau JH, Koo HM, Holmen SL (2007) Differential oncogenic potential of activated RAS isoforms in melanocytes. *Oncogene.* 26: 4563- 4570.

Willmore-Payne C, Holden J, Tripps S, Layfield LJ (2005) Human malignant melanoma: detection of BRAF- and c-kit-activating mutations by high amplicon melting analysis. *Human Pathol.* 36: 486- 493.

Zubovits J, Buzney E, Yu L (2004) HMB-45, S-100, NK1/C3, and MART-1 in metastatic melanoma. *Hum Pathol.* 35: 217- 223.

8 DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen ganz herzlich bedanken, die mich bei der Anfertigung meiner Arbeit so tatkräftig unterstützt haben:

Besonderer Dank gebührt meinem Doktorvater, Prof. Dr. med. Volker Steinkraus für die freundliche Überlassung dieses interessanten Themas und die tatkräftige Unterstützung meiner Arbeit sowie für die Bereitstellung aller für die Durchführung dieser Arbeit erforderlichen Hilfsmittel und wissenschaftliche Unterstützung.

Weiterhin gilt mein besonderer Dank Frau Dr. med. Almut Boer-Auer und Dr. rer. nat. Thomas Falk für ihre sehr engagierte, sachkundige und umfassende Dissertationsbetreuung. Sie zeigten unermüdliches Engagement und waren mir mit ihrem großen Fachwissen jederzeit mit Rat und Tat behilflich.

Außerdem danke ich dem Team des Labors des Dermatologikum Hamburg für die freundliche und geduldige Hilfe bei der Arbeit im Labor.

Abschließend gebührt mein besonderer Dank meiner Mutter Susanne von Eichel und meinem Vater Jürgen von Eichel für die liebevolle Unterstützung bei dieser Arbeit und während meines gesamten Studiums.

9 LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE ANGABEN

Geburtsdatum	27.05.1983
Geburtsort	Königstein
Nationalität	deutsch
Konfession	römisch- katholisch

ÄRZTLICHE TÄTIGKEIT

seit Nov. 2009	Dermatologikum, Hamburg Praxis Professor Steinkraus & Partner Assistenzärztin
Mär.- Sept. 2009	Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Hamburg Assistenzärztin

VERÖFFENTLICHUNG

Aug. 2007	Goss P, von Eichel L (2007) Summary of aromatase inhibitor trials: the past and future. J Steroid Biochem Mol Biol. 106: 40- 8.
-----------	--

AUSBILDUNG

Okt. 2006- Okt. 2008	Medizinstudium Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Hamburg Ärztliche Prüfung Okt. 2008
Okt. 2002 - Sept. 2006	Medizinstudium, J.-W.-Goethe Universität, Frankfurt Ärztliche Vorprüfung im Sept. 2004 und klinisches Studium bis zum 8. Semester
Aug. 1993 - Jun. 2002	Lessing-Gymnasium, Frankfurt Abitur mit den Leistungskursen Biologie und Deutsch

PRAKTISCHES JAHR

Apr.- Jun. 2008	Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Hamburg Wahlfach in Hals-Nasen-Ohrenheilkunde
Dez. 2007 - Apr. 2008	Department of General Surgery, New Somerset Hospital, Kapstadt Chirurgie
Aug. 2007 - Dez. 2007	II. Medizinische Klinik für Hämatologie und Onkologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Hamburg Innere Medizin

10 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: