Universitätsklinikum Ulm

Abteilung Dermatologie

Leiter: Prof. Dr. med. R.-U. Peter

Untersuchung zur MUC-18-Expression des metastasierenden malignen Melanoms mittels der RT-PCR-Methode

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin,
(Dr. med.) der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von

Ivonne Bedei

aus Stuttgart

Ulm 2001

Amtierender Dekan: Prof. Dr. R. Marre

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Weber

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Hemmer

Tag der Promotion: 25.10.2001

1 Abkürzungsverzeichnis 1

2 Einleitung 2

2.1 Epidemiologie und prädisponierende Faktoren 2
2.2 Prognostische Faktoren 3
2.3 Maligne Transformation und Metastasierung 5
2.4 MUC 18 6
2.5 Melanomzellen in der Zirkulation 8
2.6 Polymerasekettenreaktion (PCR) 8
2.7 Fragestellung 9

3 Material und Methoden 10

3.1 Patientenkollektiv 10
3.2 Zellkultur 10
3.3 RT-PCR 13
3.4 Kontrollexperimente 26
3.5 Elektrophoretische Auftrennung 28
3.6 Statistik 29

4 Ergebnisse 30

4.1 Patientencharakteristik 30
4.2 MUC-18-PCR-Ergebnisse 33
4.3 RNA-Präparation 38
4.4 Rezidivfreies Gesamtüberleben 42
4.5 Ergebnisse der Kontrollexperimente 47

5 Diskussion 49

5.1 Patientenkollektiv 49
5.2 Diskussion der Methode 50
5.3 Literatur zum MUC-18-Nachweis 52
5.4 Diskussion der eigenen Ergebnisse 53

6 Zusammenfassung 60

7 Literaturverzeichnis 62

1 Abkürzungsverzeichnis

ALM	Akrolentiginöses Melanom
bp	Basenpaare
cDNA	cyclisches Adenosin-monophosphat
dATP	Desoxyadenosin-triphosphat
dCPT	Desoxycytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosin-triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidin-triphosphat
EDTA	Ethylendiamin-tetraessig-säure (Ethylenediamine-tetraacetic acid)
FCS	Fetales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GIT	Guanidinium-Isocyanat
HLA	Human Leucocyte Antigen
HNO	Hals-Nasen-Ohren
LMM	Lentigo Maligna Melanom
mRNA	Messenger-Ribonucleic Acid
NM	Noduläres Melanom
OD	Optische Dichte (Extinktion)
PBMCs	Monozyten im peripheren Blut
PBS	Isotonischer Phosphat-puffer (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase chain reaction
RGP	Radial Growth Phase
RNA	Ribonucleinsäure (ribonucleic acid)
RNAse	Ribonuklease
RT	Reverse Transkription
SSM	Superfiziell Spreitendes Melanom
Taq-Pol	Taq(Thermus aquaticus)-DNA-Polymerase
TBE	Tris/Borsäure/EDTA
TIL	Tumorinfiltrierende Lymphozyten
TNM	Tumor-Nodulus-Metastase
Tris	Tris(hydroxyme-thyl)aminomethan
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
VCP	Vertical Growth Phase
UV	Ultraviolett

2 Einleitung

2.1 Epidemiologie und prädisponierende Faktoren

Zunehmende Inzidenz. Das maligne Melanom ist ein von den Melanozyten ausgehender neuroektodermaler Tumor, dessen Inzidenz in den letzten Jahren beträchtlich zugenommen hat (Balch et al. 1998). Es ist mittlerweile in den USA die am stärksten zunehmende Krebsart und betrifft in erheblichem Maße auch jüngere Altersgruppen (Slominski et al. 1995). Nahezu 50% der Melanome treten bei Personen unter 55 Jahren auf. In Australien stieg die Inzidenz von 14/100 000 im Jahr 1965 auf 60/100 000 im Jahr 1987 (Gloster et al. 1996). Momentan zeichnet sich eher der Trend ab, dass die Inzidenzraten langsamer steigen, vor allem in Ländern mit sehr hoher Inzidenz, bzw. sogar stagnieren, besonders beim jüngeren, weiblichen Kollektiv (Berwick 1998).

Inzidenz um Ulm. Im Einzugsgebiet der Universität Ulm ist die Inzidenzrate in den letzten 10 Jahren auf 12/100 000 gestiegen und hat damit deutlich zugenommen (Kramer et al. 1996).

Todesfälle. Obwohl sein Gesamtanteil an allen Hautkrebsarten nur 5% beträgt, ist das maligne Melanom für 75% aller Todesfälle an Malignomen der Haut verantwortlich (Gloster et al. 1996, Boring et al. 1994). Prädisponierende Faktoren sind unter anderem:

- die weiße Rasse, deren Risiko im gleichen Breitengrad ca. 6fach erhöht ist im Vergleich zur schwarzen Bevölkerung (Gloster et al. 1996),
- sporadische, exzessive Sonnenbestrahlung vor allem in Kindheit und Jugend und
- genetische Prädisposition.

Da das Melanom leicht inspiziert werden kann und seine Prognose entscheidend vom Stadium der Erkrankung abhängt, kommt der Prävention und frühzeitigen Diagnosestellung eine besondere Bedeutung zu.

2.2 Prognostische Faktoren

Parameter der Stadieneinteilung. Über 80% der Patienten werden im Stadium des lokalen Wachstums des Melanoms ohne Metastasierung diagnostiziert (Garbe et al. 1995, Slominski et al. 1995). Anhand verschiedener histologischer und klinischer Parameter wird die Erkrankung in Stadien eingeteilt – mit entsprechenden prognostischen und therapeutischen Konsequenzen:

- *Klinische Parameter:* Als klinische Parameter, die Aussagen über die Prognose im metastasefreien Stadium zulassen, werden Geschlecht, anatomische Lage der Läsion und Alter des Patienten diskutiert.
- *Histologische Parameter:* Histologisch haben die Tumordicke nach Breslow (Breslow et al. 1970) und die Eindringtiefe nach Clark (Clark et al. 1969) die stärkste prognostische Aussagekraft, wobei der vertikale Tumordurchmesser an Signifikanz überwiegt (Morton et al. 1993, Büttner et al. 1995, Garbe et al. 1995, Cox et al. 1996, Häffner et al. 1992, Balch et al. 1982, Day et al. 1982).

Für lokalisierte Primärtumoren differiert die 5-Jahres-Überlebensrate zwischen nahezu 100% bei einer Tumordicke ≤ 0,75 mm und ca. 40% bei einer Tumordicke > 4 mm (Balch et al.1985, Gloster et al. 1996, Slominski et al. 1995).

Weitere prognostische Aussagekraft wird für den Mitoseindex, tumorinfiltrierende Lymphozyten (TIL), sowie die Ulzeration und Regression der Primärläsion angenommen.

TNM-Klassifikation. Die TNM-Klassifikation der internationalen Union gegen den Krebs, Union Internationale Contre le Cancer (UICC) teilt in ihrer modifizierten Fassung von 1988 die Stadien anhand des histologischen Kriteriums der

Tumordicke nach Breslow und dem Ausmaß der Metastasierung postoperativ in 4 Stadien ein:

Tab. 1. Stadieneinteilung des malignen Melanoms nach der Union Internationale Contre le Cancer (UICC)

Stadieneinteilung des malignen Melanoms nach UICC			
Klassifikation	**Stadium**	**Lymphknoten**	**Metastasen**
Stadium I	pT1 (≤ 0,75 mm)	N0	M0
	pT2 (0,76–1,5 mm)	N0	M0
Stadium II	pT3 (1,51–4 mm)	N0	M0
Stadium III	pT4 (> 4 mm)	N0	M0
	jedes pT	N1, N2	M0
Stadium IV	jedes pT	jedes N	M1

Bedeutung der Tumormarker. Melanozyten haben in verschiedenen Phasen der Melanomentwicklung nicht nur makroskopisch und histologisch ein unterschiedliches Erscheinungsbild, sondern verändern im Verlauf der Erkrankung auch ihr Antigenprofil – den veränderten Wachstumseigenschaften angepasst. Da die Möglichkeiten der kurativen Therapie im Stadium der Metastasierung bisher noch sehr begrenzt sind (Lee et al. 1976, Clark et al. 1984, Franceschi et al. 1991, Elwood et al. 1994), ist es von besonderem Interesse, Tumormarker zu finden, die mit der malignen Transformation der Zelle korrelieren, um auf diese Weise eine frühzeitige Diagnosestellung zu ermöglichen und somit die therapeutischen Optionen zu verbessern. Momentan wird daher versucht, die bisherigen Prognosekriterien, die praktisch das sichtbare Korrelat der sich vollziehenden molekularen Veränderungen darstellen, um immunologische und molekularbiologische Kriterien zu erweitern.

2.3 Maligne Transformation und Metastasierung

Antigenprofil-Änderung. Die maligne Transformation ist ein stadienhafter Prozess, in dessen Verlauf sich das Antigenprofil der Melanomzelle mit zunehmender metastatischer Potenz verändert:

- *Radiale Wachstumsphase (RGP):* Ausgehend vom normalen Melanozyten geht der Grad der Metaplasie, über meist gutartige, in manchen Fällen als Vorläufer anzusehende atypische Naevi in die radiale Wachstumsphase (RGP) des malignen Melanoms über. Diese Phase entspricht dem »Melanoma in situ« und kann chirurgisch kurativ behandelt werden. Die Melanomzellen zeichnen sich durch langsames, radiales Wachstum aus und besitzen noch nicht die Fähigkeit zur Metastasierung (Clark 1991, Guerry et al. 1993, Herlyn et al. 1987).
- *Vertikale Wachstumsphase (VGP):* Mit Übergang in die Phase des vertikalen Wachstums (VGP) entwickeln die Melanomzellen die Fähigkeit, die Basalmembran zu durchbrechen, infiltrierend zu wachsen und Metastasen zu bilden (Bani et al. 1996).

RGP-Melanome und atypische Naevi zeichnen sich durch ein ähnliches Antigenprofil aus, während das Antigenprofil des VGP-Melanoms eher dem des metastasierenden Melanoms entspricht (Elder et al. 1989).

Metastasierung. Auch die Metastasierung ist ein dynamischer, mehrphasiger Prozess, der bestimmte Charakteristika der Zelle in Abweichung von der Norm voraussetzt (Juliano 1987, Bastida et al. 1988, Fidler 1989):

- Ablösen der Zellen vom Primärtumor, überwinden der Basalmembran und Migration in die extrazelluläre Matrix,
- Einwanderung in Blut- und Lymphgefäße,
- Überleben von Tumorzellen in der Zirkulation und Adhäsion an das Endothelium der Lymph- oder Blutgefäße,
- Migration durch die Gefäßwand und Anwachsen an einer, vom Primärtumor entfernten Stelle.

Adhäsionsmoleküle. Die Eigenschaften zur Invasion und Metastasierung hängen wesentlich von Zell-Zell-, und Zell-Matrix-Wechselwirkungen ab. Neben anderen

Faktoren (z.B. HLA-Antigene, Cytokine, Wachstumsfaktoren, Ganglioside, Angiogenesefaktoren, Proteasen), die in unterschiedlicher Weise exprimiert werden, sind an den oben beschriebenen Prozessen auch Adhäsionsmoleküle beteiligt, welche die interzellulären und Zell-Matrix-Interaktionen (Integrine) regulieren, und die bei den Melanomen vom physiologischen Verhalten abweichen (Verlust der Kontaktinhibition, Anwachsen in zellfremdem Gewebe, Umgehung des Immunsystems etc.).

In dieser Arbeit soll die prognostische Aussagekraft des Nachweises eines interzellulären Adhäsionsmoleküls, MUC 18, einem Marker der neoplastischen Progression (Ruiter et al. 1990), im peripheren Blut mittels einer qualitativen RT-PCR untersucht und diskutiert werden.

2.4 MUC 18

Aufbau. MUC 18 ist ein Membranglykoprotein mit einem Molekulargewicht von 113 kDa. Es ist ein Mitglied der Immunglobulinsuperfamilie und zeichnet sich durch hohe Sequenzsimilarität mit neuralen Zelladhäsionsmolekülen aus, die während der Organogenese exprimiert werden. Das aus 603 Aminosäuren bestehende Molekül umfasst ein Signalpeptid, 5 immunglobulingleiche Domänen, dem charakteristischen Schema V-V-C2-C2-C2 folgend, eine transmembranäre Region und einen kurzen zytoplasmatischen Schwanz (Lehmann et al. 1989). Dieser Schwanz ist mit Proteinkinase-Erkennungsstellen ausgestattet, was auf eine intrazelluläre Signalfunktion hinweisen könnte (Sers et al. 1994).

Gen. Nach Klonierung erhält man ein Gen, bestehend aus 14 kb, das 16 Exons enthält. Anders als bei den meisten Mitgliedern der Immunglobulinsuperfamilie werden vier der fünf immunglobulinabgeleiteten Domänen von zwei, eine sogar von drei Exons kodiert. Konventionelle TATA- oder CAAT-Boxen, welche nor-

malerweise die Promotoraktivität maßgeblich steuern, fehlen in der Promoterregion des Gens (Sers et al. 1993).

MUC 18 ist ein Marker der Tumorprogression. Einige Autoren fanden, dass seine Expression auf Melanomzellen mit einer schlechten Prognose und dem metastatischen Potenzial der Tumorzellen korreliert (Lehmann et al. 1987, Sers et al. 1994).

Expression auf Melanozyten. Auf normalen Melanozyten in vivo wird es nicht exprimiert, vereinzelt jedoch auf benignen Naevuszellnaevi und atypischen Naevi und in zunehmendem Maße auf primären Melanomen und Metastasen (Holzmann et al. 1987, Lehmann et al. 1987). Interessanterweise entwickeln Melanozyten in vitro die Fähigkeit, MUC 18 zu exprimieren, die sie wieder verlieren, wenn sie mit Keratinozyten co-kultiviert werden. Auf Melanomzellen hat die Kontrolle durch Keratinozyten allerdings keinen Einfluss, was zu der These führte, dass die MUC-18-Expression nicht durch genetische Mutation bzw. Aberration, sondern durch regulierende Einflüsse der Mikroumwelt gesteuert wird (Shih et al. 1994, Rummel et al. 1996). Der Ligand, mit dem MUC 18 interagiert, ist bisher noch unbekannt (Edward 1995).

Expression auf anderen Zellen. Außer auf Melanomzellen und anderen Tumoren neuroektodermalen Ursprungs, wurde MUC 18 auch auf der Oberfläche glatter Muskelzellen aus Lunge, Haut, Gastrointestinaltrakt und Gefäßen nachgewiesen, wobei in der Literatur hinsichtlich dieser Befunde allerdings unterschiedliche Ansichten vertreten werden (Lehmann et al. 1987, Sers et al. 1994). Es wurde ferner auf Endothelien von Kapillaren und Tumorgefäßen, nicht aber auf Arterien und großen Venen nachgewiesen. In Endothelien scheint MUC 18 nur in proliferierenden oder aktivierten Zellen exprimiert zu werden, wohingegen die Expression bei Stimulation der glatten Muskelzellen eingestellt wird. Anscheinend nimmt die Expression in beiden Zellarten mit steigender Motilität zu.

Der Nachweis von MUC 18 sowohl auf den Tumorzellen, als auch auf Gefäß-endothel und -muskelzellen legt eine Beteiligung des Moleküls sowohl an der Angiogenese, als auch der Metastasierung des Tumors nahe (Sers et al. 1994).

2.5 Melanomzellen in der Zirkulation

Das Stadium der Metastasierung ist ein mehrphasiger Prozess. Dabei ist über den Verbleib, die Anzahl und die Bedeutung der in Zirkulation befindlichen Zellen, die nötig sind, um Metastasen zu bilden, wenig bekannt (Mellado et al. 1996).

Fidler untersuchte das Schicksal zirkulierender Melanomzellen, indem er Mäusen jodmarkierte Melanomzellen intravenös injizierte und die Tiere in verschiedenen Intervallen nach Verabreichung der Melanomzellen tötete, um das Ausmaß und die Lokalisation der Metastasierung sowie die Anzahl der überlebenden Melanomzellen in Blut und Geweben zu untersuchen (Fidler 1970). Nach 24 h überlebten nur 1,5% der Zellen, wobei die meisten Tumorzellemboli im Kapillarnetz der Lunge sistierten. Nach 14 Tagen konnten nur noch ca. 2‰ der anfangs injizierten Zellen nachgewiesen werden, wobei sich bereits makroskopisch Melanommetastasen in der Lunge zeigten. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Metastasierung über die Blutbahn ein äußerst selektiver Prozess ist, und nur ein kleiner Prozentsatz der Melanomzellen, die in die Zirkulation gelangen, überlebt und Tochtergeschwülste bilden kann.

2.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die von Kary Mullis 1985 erstmals veröffentlichte Methode der Polymerasekettenreaktion hat seither die Molekularbiologie in enormem Maße beeinflusst. Ursprünglich konzipiert zur Amplifikation von β-Globulin-DNA zur pränatalen Diagnostik der Sichelzellanämie wird die PCR mittlerweile in zahlreichen Gebie-

ten eingesetzt. Seit der Verwendung der thermostabilen Taq-Polymerase anstatt des hitzesensiblen Klenowfragmentes aus E. coli wurde die PCR zu einer hochsensiblen Methode entwickelt, die es erlaubt, auch geringste Mengen einer spezifischen Gensequenz nachzuweisen und von dieser eine enorme Anzahl von Kopien zu produzieren. Laut Watson et al. ist es möglich, mittels PCR eine Krebszelle unter 10^6 normalen Zellen nachzuweisen (Watson et al. 1993). Die Methode wurde bereits zum Nachweis von zirkulierenden Melanomzellen, hauptsächlich basierend auf dem Nachweis des Tyrosinase-Gens nach reverser Transkription, verwendet (Mellado et al. 1996, Bossart et al. 1995, Battayani et al. 1995).

Hoon et al. beschreiben den stadienabhängigen Nachweis zirkulierender Melanomzellen im Blut anhand einer Multimarker-RT-PCR unter anderem auf der Basis des Nachweises der MUC-18-Expression (Hoon et al. 1995).

2.7 Fragestellung

MUC 18 ist ein Glykoprotein, welches auf maligne transformierten Melanozyten exprimiert wird. Laut den bisherigen Befunden unterschiedlicher Autoren korreliert es mit der metastatischen Potenz der Tumorzelle und einer schlechten Prognose. MUC 18 wurde vorwiegend immunhistologisch mittels spezifischer Antikörper in hohem Prozentsatz auf maligne entarteten Melanomzellen nachgewiesen.

In dieser Arbeit soll die stadienabhängige Expression von MUC 18, und die prognostische Aussagekraft dieses Adhäsionsmoleküls mittels einer RT-PCR aus dem Blut von über 200 Melanompatienten untersucht werden.

3 Material und Methoden

3.1 Patientenkollektiv

Die untersuchten Blutproben wurden von April 1995 bis September 1996 nach Aufklärung und schriftlichem Einverständnis von Melanompatienten der Abteilung Dermatologie der Universität Ulm entnommen. Neben der hier vorgestellten Untersuchung auf MUC 18 wurden die Blutproben im Rahmen eines internationalen Ringversuchs auch auf das Vorkommen von Tyrosinase untersucht (Keilholz et al. 1998, Proebstle et al. 2000). Bei allen Patienten war die Diagnose eines malignen Melanoms histologisch gesichert. Es wurde keine Selektion nach histologischen Kriterien oder klinischen Stadien vorgenommen. Die Proben wurden »blind« verarbeitet.

3.2 Zellkultur

3.2.1 Material für die Zellkultur

- **Chemikalien**

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, München
L-Glutamin	Seromed, Berlin
Penicillin/Streptomycin	Seromed, Berlin
nicht essenzielle Aminosäuren	Seromed, Berlin

Lösungen und Seren

Trypsin/EDTA-Lösung (0,05%/0,02%)

Die Lösung wurde in zehnfacher Konzentration von der Firma Seromed, Berlin, bezogen und mit Aqua bidest auf eine Endkonzentration von 0,05% Trypsin und 0,02% EDTA eingestellt. Trypsin ist ein proteolytisches Enzym, das die Zellen aus dem Zellverband und vom Boden der Kulturflasche ablöst. EDTA bildet Chelatkomplexe mit Calciumionen. Da die Zelladhäsion zusätzlich über Calcium vermittelt wird, unterstützt die Zugabe von EDTA die Ablösung der Zellen.

Fetales Kälberserum (FCS)

FCS wurde vom Lieferanten Seromed, Berlin, auf Sterilität, vor allem Mykoplasmen und verschiedene Viren getestet. Die Aufbewahrung erfolgte portioniert auf 50 ml bei -20 °C.

Medium

Als Grundmedium zur Kultur der Melanomzelllinie SK-Mel 28 wurde 500 ml RMPI 16/40 der Firma Seromed, Berlin, mit folgenden Zusätzen verwendet:

- 50 ml hitzeinaktiviertes Kälberserum,
- 5 ml nichtessenzielle Aminosäuren,
- 5 ml L-Glutamin,
- 5 ml Penicillin-Streptomycin (1:1).

Das Medium wurde bis zur Verwendung im Kühlschrank gelagert.

Kulturgefäße

Die Melanomzellen wurden in 75 cm^2 Zellkulturflaschen der Firma Greiner GmbH, Frickenhausen, kultiviert.

- **Geräte und Hilfsmittel**

Brutschrank:	Cytoperm	Heraeus-Holding GmbH, Stuttgart
Zentrifuge:	Minifuge 2	Heraeus-Holding GmbH, Stuttgart
Sterile Werkbank:	Gelaire BSB 6A	Flow Laboratories, Meckenheim
Mikroskop:	Wilovert	
Neubauer-Zählkammer:	Brand	

- **Referenzzelllinie**

Als Referenzzelllinie zur Positivkontrolle wurde die Melanomzelllinie SK-Mel 28 (Carey et al. 1976, Mellado et al. 1996, Holzmann et al. 1987), wegen der nachgewiesen hohen Expression von MUC 18 (Lehmann et al. 1989) verwendet. Die Zellen wurden freundlicherweise von Prof. Dr. U. Keilholz, Universitätsklinik Benjamin Franklin, Freie Universität, Berlin, zur Verfügung gestellt. Die Zellen der Zelllinie SK-Mel 28 wurden bei 37 °C im Brutschrank mit einem CO_2-Gehalt von 5% kultiviert.

3.2.2 Zellkulturmethoden

- **Steriles Arbeiten**

Alle Arbeiten wurden an einer sterilen Werkbank durchgeführt. Die Plastikgefäße wurden vom Hersteller steril geliefert.

- **Auftauen der Zellen**

Das bei –80 °C tiefgefrorene Zellmaterial wurde möglichst schnell bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und in ein 10 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen enthalten DMSO als Kryopräservativ. Um das DMSO, das gleichzeitig auch ein starkes Zellgift darstellt, aus den Zellen zu entfernen, wurde langsam bis zu 7 ml Medium zugetropft. Nach Zentrifugation wurde das Zellpellet in 1 ml Medium resuspendiert und in eine Kulturflasche, in die bereits Medium vorgelegt war,

ausgesät. Nach 24 h Anheftungszeit wurde das Medium gewechselt, um totes Zellmaterial und restliches DMSO zu entfernen.

- **Passage der Zellen**

Um die Zellen in neue Kulturgefäße zu überführen, wurden die Zellen der 75 cm^2 Flaschen mit 5 ml Trypsin/EDTA vom Boden gelöst. Nach Zugabe von 15 ml Medium wurden die Zellen in ein Zentrifugenröhrchen überführt und 10 min. bei 1500 rqm abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 2 ml Medium resuspendiert und auf zwei neue Kulturflaschen verteilt, in denen bereits 15 ml Medium vorgelegt war.

- **Zellzahlbestimmung**

Die Zellzahl wurde mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Nach Trypsinablösung wurden die Zellen zentrifugiert und in einem geeigneten Volumen Medium aufgenommen. Aus dieser Suspension wurde ein Aliquot entnommen und die Zellzahl durch Auszählen von 8 Zählfeldern bestimmt. Aliquots zu je 10^6 Zellen wurden bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.3 RT-PCR

3.3.1 Material für RNA-Präparation, cDNA-Synthese und PCR

- **Chemikalien**

Agarose	Gibco BRL, Eggenstein
Ammoniumchlorid (NH_4Cl)	Merk, Darmstadt
Ammoniumhydrogencarbonat (NH_4CO_3)	Fluka, Buchs
Borsäure	Fluka, Buchs
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen

Chloroform	Fluka, Buchs
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP)	Böhringer, Mannheim
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Fluka, Buchs
Dithiothreitol (DTT)	Gibco BRL, Eggenstein
Eisessig 99,5%	Fluka, Buchs
Ethanol	J. T. Backer B. V. Deventer, Holland
Ethidiumbromid	Gibco BRL, Eggenstein
Ethylendiaminteraessigsäure Dinatriumsalz-Dihydrat (EDTA)	Fluka, Buchs
Ficoll	Pharmacia LKB, Uppsala Sweden
Gelatine	Sigma, Deisenhofen
Guanidinium-Isothiocyanat (GIT)	Roth, Karlsruhe
Isoamylalkohol, 98%	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Fluka, Buchs
Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid ($MgCl_2$)	Fluka, Buchs
β-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
Natriumacetat	Riedel de Haeen AG, Seelze
Natriumchlorid (NaCl)	Riedel de Haeen AG, Seelze
Natriumcitrat	Riedel de Haeen AG, Seelze
Natriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe
N-Laurylsarcosyl	Sigma, Deisenhofen
Phenol (in TE-Puffer äquilibriert ph 7,5-8)	Roth, Karlsruhe
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Riedel de Haeen AG, Seelze
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	USBTM, Cleveland

Elektrophorese-Längenstandard

100 bp DNA-Ladder	Gibco BRL, Eggenstein

Enzyme

Deoxyribonuclease I, Amplification Grade	Gibco BRL, Eggenstein
SUPERSCRIPT II RT Reverse Transkriptase	Gibco BRL, Eggenstein
E.-coli-Rnase H	Gibco BRL, Eggenstein
Taq-DNA-Polymerase	Gibco BRL, Eggenstein

Puffer und Lösungen

10fach Dnase I Reaktionspuffer:	200 mM Tris-HCl (pH 8,4)
(Dnase I Amp. Grade Reaktion,	500 mM KCl
BRL)	20 mM $MgCl_2$
Chloroform/Isoamylalkohol:	49:1 (Vol/Vol)
Erythrozyten-Lysepuffer:	155 mM Ammoniumchlorid (NH_4Cl)
	10 mM Ammoniumhydrogencarbonat (NH_4CO_3)
	0,1 mM EDTA
GIT-Puffer:	4 M Guanidiniumthiocyanat (GIT)
	25 mM Natriumcitrat
	0,5% N-Laurylsarcosyl
	0,1 M β-Mercaptoethanol
PBS:	133 mM Natriumchlorid (NaCl)
	23 mM Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HP_4)
	11 mM Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)

10fach PCR-Puffer (für PCR):	15 mM $MgCl_2$
	500 mM Kaliumchlorid (KCl)
	100 mM Tris/HCl, pH 8,3
	0,01% Gelatine
10fach TBE-Puffer:	0,89 M Tris/HCl
	0,89 M Borsäure
	0,02 M EDTA
6fach Auftragspuffer:	0,25% Bromphenolblau
	25% Ficoll
10fach PCR-Puffer (für cDNA	200 mM Tris-HCl, pH 8,4
Synthese)	500 mM KCl
Synthesepuffer, Superscript™	25 mM $MgCl_2$

- **Verwendete Kits**

SuperScript Preamplification Kit	Gibco BRL, Eggenstein

- **Geräte**

Zentrifugen:	Minifuge 2	Heraeus-Holding GmbH, Stuttgart
	MR 1822	Jouan GmbH, Unterhaching
Photometer:	Ultrospec III	Pharmacia, England
PCR-Gerät:	Omni Gene Thermal Cycler	Hybaid, United Kingdom
Vortex-Gerät:	Vibrofix VF1	IKA-Labortechnik, Staufen
UV-Transluminator:	TFX-20M	Vilber Lourmat, Frankreich
Speedvac	RCT 60	Jouan, Saint Nazaire

3.3.2 Methoden der qualitativen RT-PCR

Zum qualitativen Nachweis von im Blut zirkulierenden Melanomzellen mittels MUC-18-PCR sind im Wesentlichen folgende Arbeitsschritte notwendig:

1. Zellaufarbeitung aus Blutproben mit Erythrozytenlysepuffer

2. RNA-Präparation
3. Reverse Transkription zur Gewinnung von cDNA
4. PCR: Amplifikation der cDNA mit sequenzspezifischen Primern
5. Elektrophoretische Auftrennung und Visualisierung der PCR-Produkte in einem mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegel.

Verarbeitung bis zur RNA-Präparation

Den Patienten wurde 2,7 ml EDTA-Blut entnommen. Zwischen Abnahme und Verarbeitung lag ein maximaler Zeitraum von 2 h, wobei die Blutproben bei Zimmertemperatur gelagert wurden. Nach Zugabe von 20 ml Erythrozytenlysepuffer wurde die Blutprobe 15 min. auf Eis inkubiert, um die Erythrozyten zu lysieren. Daraufhin wurde für 10 min. bei 1000 U/min. zentrifugiert, der Überstand dekantiert und der Bodensatz wieder mit 20 ml Erythrozytenlysepuffer für 5 min. inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation nach obigem Schema wurde das entstehende Pellet mit 10 ml PBS gewaschen (Abwaschen der im Medium enthaltenen Proteine und Einstellen einer optimalen Salzkonzentration), für 10 min. ebenfalls bei 1000 U/min. zentrifugiert und dekantiert. Das so erhaltene Pellet wurde mit 1 ml GIT-Puffer (Zellyse und gleichzeitiger Schutz vor endogenen RNAsen) überschichtet. Die so lysierten Zellen wurden entweder sofort weiterverarbeitet oder bei -80 °C eingefroren.

RNA-Präparation

Vorsichtsmaßnahmen

Folgende Vorsichtsmaßnahmen wurden beim Arbeiten mit RNA eingehalten, um Kontaminationen mit RNAsen zu verhindern:

- Prinzipiell wurde nur mit Handschuhen gearbeitet und nur für diesen Zweck vorgesehene sterile Plastikwaren und Pipetten benutzt.
- Glaswaren wurden vor Gebrauch bei 150 °C 4 h sterilisiert, Plastikwaren wurden 20 min. in 0,5% NaOH gelegt und anschließend mit DEPC-behandeltem Wasser gespült.

- Alle Lösungen und auch das für die Ansätze verwendete Aqua bidest wurden mit 0,1% DEPC versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert; durch anschließendes Autoklavieren wurde das DEPC wieder inaktiviert. DEPC bewirkt eine Modifikation spezifischer Aminosäuren im aktiven Zentrum der RNAsen und inaktiviert sie dadurch.

Die Isolierung der RNA erfolgte nach der von Chomczynski und Sacchi 1987 beschriebenen GIT-Methode ohne Caesiumchlorid (Chomczynski et al. 1987).

Vorgehen

Erster Tag. Das unter 3.3.1, S. 13 beschriebene Zellmaterial wurde, sofern es in eingefrorenem Zustand vorlag, langsam auf Eis aufgetaut. Es wurden nacheinander

- 500 µl 2 M Natriumacetat, pH 4,
- 5 ml Phenol,
- 2 ml Chlorophorm/Isoamylalkohol (Verh. 49 : 1)

hinzugefügt und kräftig gemischt. Das entstandene Gemisch wurde 15 min. auf Eis inkubiert und anschließend 10 min. bei 4 °C und 4500 U/min. zentrifugiert. Dadurch wurde die DNA mit Histonen in die untere Phenolphase gebracht; die durch das Natriumacetat und Chloroform ausgefällten und denaturierten Proteine befanden sich in der Interphase. Jetzt wurde die obere, die RNA enthaltende, wässrige Phase vorsichtig mit einer Pasteurpipette in ein neues Eppendorfgefäß überführt, wobei darauf geachtet wurde, dass die Interphase vollständig im alten Gefäß zurückblieb, mit Isopropanol im Verhältnis 1:1 versetzt und zur Fällung über Nacht bei -20 °C im Kühlschrank belassen.

Zweiter Tag. Am nächsten Tag wurde erneut bei 4 °C und 4500 U/min. 20 min. zentrifugiert, der Überstand verworfen und das entstandene Pellet mit 300 µl GIT gelöst. Nach Zugabe von 300 µl Isopropanol wurde die Probe wiederum über Nacht bei -20 °C im Kühlschrank präzipitiert.

Dritter Tag. Am dritten Tag wurde nach Zentrifugation bei 13 000 U/min. für 30 min. in der Kühlzentrifuge der Überstand verworfen und das Pellet in 300 µl DEPC-Wasser und 750 µl Ethanol gewaschen. Das nach erneuter Zentrifugation nach oben beschriebenem Schema entstandene Pellet wurde im Heizblock getrocknet und mit 60 µl DEPC-Wasser versetzt. Mit Hilfe einer OD-Messung konnte die RNA-Konzentration bestimmt werden. Die RNA-Proben wurden bei -80 °C gelagert.

- **Quantifizierung der RNA durch photometrische Konzentrationsbestimmung**

Grundlage. Nucleotide absorbieren UV-Licht im Bereich zwischen 220 und 320 nm. Die mittleren Absorptionsmaxima liegen bei etwa 260 nm. Die Bestimmung des UV-Absorptionsspektrums liefert qualitative und quantitative Angaben über die untersuchte Nucleinsäurelösung.

Vorgehen. 1 µl der Probe wird mit 99 µl DEPC-Wasser gemischt und dieses Gemisch spektralphotometrisch gemessen. Anhand der Extinktion, der so genannten Optischen Dichte (OD), bei 260 nm (RNA, DNA) und 280 nm (Proteine) werden die RNA-Konzentration und -Reinheit bzw. -Qualität bestimmt.

Konzentrationsmessung. Für die Konzentrationsmessung wurde das mittlere Absorptionsmaximum bei 260 nm verwendet. Einer OD_{260} von 1,0 entspricht eine RNA-Konzentration von 40 µg/ml. Die Qualität bzw. Reinheit der Probe ergibt sich aus dem Quotient $OD_{260} : OD_{280}$, dieser sollte für RNA zwischen 1,4 und 2,0 liegen (Yamaguchi 1992).

- **PCR aus RNA**

Da bei einigen Proben der PCR Nebenbanden auftraten, die das Ergebnis durch kompetitive Amplifikation verfälschten, wurden PCR-Versuche aus RNA ohne vorherige RT-Reaktion durchgeführt, um den Beweis zu führen, dass es sich hierbei um genomische DNA handelt. Hierbei wurde ein Zehntel der zur cDNA-

Synthese verwendeten RNA-Menge eingesetzt. Der weitere PCR-Ablauf erfolgte wie im Absatz »MUC 18 Outer PCR«, S. 23 beschrieben.

DNAsebehandlung der Proben

Um die genomische DNA aus den Proben zu eliminieren, wurden diese Proben mit dem Enzym Deoxyribonuklease I, Amplification Grade von BRL vor der RT-PCR behandelt. Dazu wurde zu 1 µg RNA

- 1 µl 10fach DNAse I Reaktionspuffer und
- 1 µl DNAse I, Amp Grade, 1 U/µl

pipettiert und das Gemisch mit DEPC-Wasser auf 10 µl aufgefüllt, bei Raumtemperatur 15 min. inkubiert und anschließend mit 1 µl 25 mM EDTA bei 65 °C für 10 min. die DNAse wieder inaktiviert.

Reverse Transkription (RT)

Bei der RT-Reaktion wird durch das Enzym Reverse Transkriptase aus Gesamt-RNA eine Erststrang-cDNA hergestellt. Dazu wurde das SuperScript™-Preamplification-System der Firma Gibco BRL verwendet, das neben dem Enzym Reverse Transkriptase alle für die Reaktion nötigen Reagenzien enthielt. Die Reaktion erfolgte nach dem im Folgenden beschriebenen Schema.

Random Hexamers. Jeweils 3 µg RNA, die langsam auf Eis aufgetaut wurden, wurde 1 µl Random Hexamers (50 ng/µl) zugefügt und der Ansatz mit DEPC-Wasser auf ein Gesamtvolumen von 12 µl aufgefüllt. Die im Versuch verwendeten Random Hexamers sind Zufallssequenzen, die, im Gegensatz zu Oligo(dT), welchen nur mRNA als Template dienen kann, unspezifisch an alle im Ansatz vorhandenen RNA-Typen binden können.

Denaturierung der Sekundärstruktur. Der Ansatz wurde gemischt und abzentrifugiert und zur Denaturierung der Sekundärstruktur bei 70 °C im Thermocycler inkubiert, anschließend sofort für 1 min. auf Eis gekühlt.

Nachfolgend wurde ein »Mastermix« aus folgenden Zusätzen hergestellt und dem Ansatz beigefügt:

- 2 µl 10fach PCR-Puffer,
- 2 µl 25 mM $MgCl_2$,
- 2 µl 0,1 M DTT,
- 1 µl 10 mM dNTP Mix.

cDNA-Synthese. Nach dem Mischen und Abzentrifugieren wurde der Ansatz für 5 min. bei 25 °C im Thermocycler inkubiert und anschließend 1 µl Superscript-II-RT zupipettiert. Nach weiteren 10 min. bei 25 °C wurde der Ansatz für 50 min. auf 42 °C zur Extension und für weitere 15 min. auf 70 °C zur Termination erhitzt. In diesem Reaktionsschritt nach Zugabe des »Mastermixes« findet die eigentliche cDNA-Synthese statt.

Entfernung eventuell interferierender RNA. Zum Abschluss der cDNA-Synthese wurde das Gemisch für 1 min. auf Eis gekühlt und abzentrifugiert. Die Zugabe von 1 µl RNAse H (2 U/µl) und Inkubation bei 37 °C für 20 min. bewirkt die Verdauung von RNA-Templates. Dieses Vorgehen erhöht somit die Sensitivität der nachfolgenden PCR durch Entfernung eventuell interferierender RNA.

Die Proben wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C im Kühlschrank gelagert.

Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mittels der Methode der PCR ist es möglich, eine enorme Anzahl von Kopien einer spezifischen DNA-Sequenz zu amplifizieren. Die gewünschte Sequenz wird durch die in der Reaktion verwendeten Primer definiert, die sich jeweils am 3`OH-Ende des getrennten DNA-Strangs anlagern. Das thermostabile Enzym Taq-DNA-Polymerase synthetisiert daran anschließend neue DNA-Stränge, die dann durch Erhitzen wieder getrennt werden und im nächsten Zyklus als Matrize zur Verfügung stehen. Die DNA-Sequenz wird dabei exponenziell vervielfältigt. Man kann auf diese Weise die PCR zur Vervielfältigung auch kleinster Mengen von DNA benutzen.

Die PCR ist ein zyklisches Verfahren, das aus folgenden drei, sich stets wiederholenden Schritten, sowie der primären Denaturierung und der terminalen Postelongation besteht:

1. Erhitzen des PCR-Ansatzes auf > 90 °C und damit verbunden Trennung der doppelsträngigen Template-DNA.
2. Annealing der Primer: der PCR-Ansatz wird auf die, für die verwendeten Primer optimale Temperatur herabgekühlt, bei der diese an die komplementäre Sequenz binden können. Diese Annealing-Temperatur ist für die verwendeten Primer individuell und bestimmt entscheidend die Spezifität der PCR.
3. Elongation der Primer bei einer Temperatur von 72 °C. Dies ist das Temperaturoptimum der hier verwendeten Taq-Polymerase. Die Dauer dieses Reaktionsschrittes hängt von der Länge der zu synthetisierenden DNA-Sequenz ab. Es werden pro Minute 1000 bp synthetisiert.

Diese drei Schritte werden 20–60-mal wiederholt, wobei der bei jedem Zyklus synthetisierte DNA-Strang im nächsten Zyklus als Matrize dienen kann. Die DNA wird dabei exponenziell vervielfältigt, bei n Zyklen erhält man 2^n DNA-Moleküle, bis schließlich eine Plateauphase erreicht wird. Auf diese Weise wird das DNA-Molekül millionenfach vermehrt und kann nachfolgend im Agarose-Gel sichtbar gemacht werden.

Inner und Outer PCR. Schließt sich an diese Reaktion nochmals eine PCR wie oben beschrieben an, wobei das PCR-Produkt aus der ersten PCR-Reaktion als Template verwendet wird, wird dies als *Inner PCR* oder Nested PCR bezeichnet. Mit diesem Verfahren wird eine weitere Steigerung der Sensitivität erreicht. Primer, die jeweils an einer Sequenz innerhalb des bereits vervielfältigten Genprodukts binden, synthetisieren ausgehend von Produkten der zuerst durchgeführten oder auch als *Outer PCR* bezeichneten PCR.

Vermeidung von Kontaminationen. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden die Schritte der RT-Reaktion, PCR und die elektrophoretische Auftrennung räum-

lich getrennt, die Pipetten wurden entweder für DNA, RNA oder PCR-Produkte verwendet. Alle Reagenzien wurden aliquotiert.

MUC 18 Outer PCR

Die PCR wurde nach den von Hoon et al. 1995 veröffentlichten Bedingungen durchgeführt, die Primer wurden nach der in dieser Veröffentlichung angegebenen Sequenz bei INTERACTIVA/Ulm bestellt. Als Template für die MUC 18 Outer PCR dienten 2 µl des RT-Ansatzes.

Das Standardreaktionsgemisch betrug 50 µl und setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

- 28,5 µl Aqua bidest,
- 4 µl dNTPs (dATP, dCPT, dTTP, dGTP) in Konzentration von 10 mmol/l,
- 5 µl Primer MUC 18-1 (10 pmol/µl),
- 5 µl Primer MUC 18-2 (10 pmol/µl),
- 5 µl 10fach PCR-Puffer (15 mmol/l),
- 0,5 µl Taq-Polymerase (5 U/µl),
- 2 µl des RT-Ansatzes, die zum Schluss zugegeben wurden.

Die entsprechenden Primer, Nukleotide, PCR-Puffer, Taq-Polymerase und Aqua bidest wurden als Stammlösung (»Mastermix«) in Eppendorfgefäßen vorgelegt und die jeweiligen Templates zugegeben.

Negativkontrolle. Um eine Kontamination mit fremder cDNA, DNA, Plasmiden oder auch mit PCR-Produkten in den PCR-Lösungen und an den Pipetten auszuschließen, wurde immer auch eine Negativkontrolle neben den üblichen Ansätzen der PCR-Reaktion vorgenommen: Dabei wurde statt des Templates 2 µl Aqua bidest zugegeben.

Positivkontrolle. Die Positivkontrolle wurde durch Zugabe von 1 µl cDNA von Sk-Mel 28 zum oben beschriebenen »Mastermix« durchgeführt. Die Positivkontrolle dient zum Nachweis, dass die Reaktion ordnungsgemäß stattgefunden hat.

Die Ansätze wurden mit 20 µl Paraffinöl als Verdunstungsschutz überschichtet.

PCR-Reaktion. Nach Mischen und Anzentrifugieren wurde die PCR-Reaktion im Thermocycler unter folgenden Konditionen durchgeführt:

- Initiale Denaturierung 95 °C für 5 min.
- Zyklenparameter
  - Zyklenzahl: 40
  - Denaturierung: 95 °C, 70 sec.
  - Primerannealing: 52 °C, 70 sec.
  - Extension: 72 °C, 70 sec.
- Postextension 72 °C, 10 min.

Anschließend wurden die PCR-Produkte auf 20 °C heruntergekühlt, sodass die Reaktion auch über Nacht durchgeführt werden konnte. Bis zur weiteren Verwendung in der Inner PCR wurden die PCR-Produkte bei 4 °C aufbewahrt.

Primereigenschaften

Die Primer wurden von der Firma INTERACTIVA/Ulm im Synthesemaßstab 0,2 µmol synthetisiert und HPLC-gereinigt.

- MUC 18-1:
  - Länge: 22 bp
  - Sequenz: 5` - CCAAGGCAACCTCAGCCATGTC - 3`
  - GC-Anteil: 59,1%
- MUC 18-2:
  - Länge: 25 bp
  - Sequenz: 5` - CTCGACTCCACAGTCTGGGACGACT - 3`
  - GC-Anteil: 60%

Das bei der Outer PCR mit diesen Primern entstehende Produkt hat eine Länge von 437 bp.

MUC 18 Inner PCR

Die MUC 18 Inner PCR wurde ebenfalls nach dem von Hoon et al. 1995 veröffentlichten Schema durchgeführt, die Primer wurden von der Firma INTERACTIVA

bezogen. Als Template für die MUC 18 Inner PCR dienten 5 µl des Outer-PCR-Produkts.

Das Reaktionsgemisch hatte ein Endvolumen von 50 µl und setzte sich (ohne den Outer-Ansatz) folgendermaßen zusammen:

- 25,5 µl Aqua bidest,
- 4 µl dNTPs (dATP, dCPT, dTTP, dGTP) in Konzentration von 10 mmol/l,
- 5 µl Primer MUC 18-3 (10 pmol/µl),
- 5 µl Primer MUC 18-4 (10 pmol/µl),
- 5 µl 10fach PCR-Puffer (15 mmol/l),
- 0,5 µl Taq-Polymerase (5 U/µl).

Die entsprechenden Primer, Nukleotide, PCR-Puffer, Taq-Polymerase und Aqua bidest wurden, wie bereits bei der Outer PCR beschrieben, als Stammlösung (»Mastermix«) in Eppendorfgefäßen vorgelegt. Nach Vortexen und Zentrifugieren wurden 5 µl des Outer-Ansatzes zugefügt. Dieser Arbeitsschritt erfolgte mit gestopften Spitzen, um Kontaminationen der Pipetten zu vermeiden. Wie bereits bei der Outer PCR wurde eine Negativkontrolle durch Zugabe von 5 µl Aqua bidest statt des Templates neben den üblichen Ansätzen der PCR-Reaktion vorgenommen. Die Ansätze wurden mit 20 µl Paraffinöl überschichtet. Nach Mischen und Abzentrifugieren wurde die Inner PCR im Thermocycler unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

- Initiale Denaturierung 95 °C für 5 min.
- Zyklenparameter:
  - Zyklenzahl: 40
  - Denaturierung: 95 °C, 70 sec.
  - Primerannealing: 55 °C, 70 sec.
  - Extension: 72 °C, 70 sec.
- Postextension 72 °C, 10 min.

Anschließend wurden die PCR-Produkte auf 20 °C heruntergekühlt, sodass die Reaktion auch über Nacht laufen konnte. Bis zur elektrophoretischen Auftrennung wurden die PCR-Produkte bei 4 °C aufbewahrt.

Als Negativkontrolle wurde das »Mastermix« ohne Zugabe von Outer-PCR-Produkt verwendet. Zur Positivkontrolle dienten 5 µl aus der Positivkontrolle des Outer-Ansatzes.

Primereigenschaften

Die Primer wurden von der Firma INTERACTIVA/Ulm im Synthesemaßstab 0,2 µmol synthetisiert und HPLC gereinigt.

- MUC 18-3:
  - Länge: 20 bp
  - Sequenz: 5` – GTCATCTTCCGTGTGCGCCA – 3`
  - GC-Anteil 60%
- MUC 18-4:
  - Länge: 25 bp
  - Sequenz: 5` – GTAGCGACCTCCTCAGGCTCCTTAC – 3`
  - GC-Anteil: 60%

Das bei der Inner PCR mit diesen Primern entstehende Produkt hat eine Länge von 262 bp.

3.4 Kontrollexperimente

3.4.1 Sensitivität der Methode

Um die Sensitivität der Methode zu überprüfen, wurde sowohl die Outer als auch die Inner PCR an Verdünnungen der cDNA von 10^6 Melanomzellen der Melanomzelllinie SK-Mel 28 durchgeführt. Die Verdünnung erfolgte in 10er-Schritten mit Aqua bidest, ausgehend von 1 µl cDNA.

3.4.2 Spezifität der Methode

Zum Nachweis der Spezifität von MUC 18 für Melanomzellen wurde als Kontrolle das Blut von 15 gesunden Spendern untersucht.

3.4.3 Kontrolle der Präparate mittels GAPDH-PCR

Negative Ergebnisse lassen darauf schließen, dass MUC-18-exprimierende Zellen fehlen. Theoretisch können die Ergebnisse aber auch negativ sein, wenn mRNA degradiert – zum Beispiel bei Lagerungsfehlern, RNA-Isolation oder cDNA-Synthese. Daher wurde ein Kontrollversuch mit einem im Stoffwechsel der Glykolyse vorkommenden Enzym, der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), durchgeführt. Dieses auch als Housekeeping bezeichnete Enzym wird gewebeunabhängig ubiquitär exprimiert und muss bei intakter mRNA in allen Zellen des Körpers nachweisbar sein. Die negativen Proben wurden daher mit Hilfe publizierter Primer auf das Vorhandensein von GAPDH geprüft (Ercolani et al. 1988). Folgende Primer wurden verwendet:

- GAPDH-1:
  - Länge: 20 bp
  - Sequenz: 5`- GGTCGGAGTCAACGGATTTG - 3
- GAPDH-2:
  - Länge: 21 bp
  - Sequenz: 5`– ATGAGCCCCAGCCTTCTCCAT – 3

Die Primer wurden von der Firma TIB/Molbiol, Berlin synthetisiert.

PCR-Ansatz. Zur PCR wurde 1 µl des cDNA-Ansatzes verwendet. Der Ansatz hatte ein Endvolumen von 50 µl und setzte sich (ohne Taq-Polymerase) folgendermaßen zusammen:

- 37,8 µl Aqua bidest,
- 5 µl dNTPs (dATP, dCPT, dTTP, dGTP) in Konzentration von 10 mM,
- 0,5 µl Primer GAPDH (100 pmol/µl),
- 0,5 µl Primer GAPDH (100 pmol/µl),

- 5 µl 10fach PCR-Puffer (15 mmol/l),
- 1 µl cDNA.

Die Ansätze wurden nach Mischen und Zentrifugieren mit 20 µl Paraffinöl überschichtet.

PCR-Reaktion. Die PCR-Reaktion erfolgte im Thermocycler nach folgendem Schema:

- Initiale Denaturierung: 95 °C für 5 min.
- Zyklenparameter:
  - Zyklenzahl: 30
  - Denaturierung: 94 °C, 45 sec.
  - Primerannealing: 60 °C, 45 sec.
  - Extension: 72 °C, 45 sec.
- Postextension: 72 °C, 5 min.

Nach der initialen Denaturierung wurde 0,2 µl Taq-Polymerase zugegeben. Dieses Verfahren der späteren Zugabe nennt sich »hot start«.

Anschließend wurden die PCR-Produkte auf 20 °C heruntergekühlt, sodass die Reaktion auch über Nacht laufen konnte. Bis zur elektrophoretischen Auftrennung wurden die PCR-Produkte bei 4 °C aufbewahrt. Die bei PCR mit diesen Primern entstehende Gensequenz hatte eine Länge von 319 bp.

3.5 Elektrophoretische Auftrennung

Die Auftrennung sowohl der MUC 18 PCR als auch der GAPDH-PCR-Produkte erfolgte in Agarose-/Ethidiumbromid-Gelen mit Hilfe einer Stratagene-Elektrophoreseeinheit.

Für die Herstellung eines 2,5%-Gels wurde 2,5 g Agarose in einen Erlenmeyerkolben abgewogen und mit 100 ml 1fach TBE-Puffer unter Rühren aufgekocht. Nach Abkühlen auf ca. 60 °C wurde 10 µl Ethidiumbromid zupipettiert, gemischt und das Agarose-Gel in eine, mit einem 32-zähnigen Kamm bestückte Gelkammer

gegossen. Nach Polymerisation des Gels wurde der Kamm gezogen und die fest gewordene Agarose mit 1fach TBE-Puffer überschichtet.

Jeweils 5 µl Probe wurde mit 5 µl Auftragspuffer gemischt und in die Taschen des Gels verbracht. Als Längenstandard lief 0,5 µl 100 bp DNA-Ladder – in 10 µl Auftragspuffer gemischt – in der ersten und letzten Tasche des Gels mit.

Der Gel-Lauf erfolgte bei einer Spannung von ca. 80 mV. Da das fluoreszierende Ethidiumbromid in die DNA-Helices interkaliert, konnten die Ergebnisse auf einem UV-Transluminator (TFX-20M) sichtbar gemacht und mit Hilfe eines Videocopy-Prozessorsystems (LTF Labortechnik) photographiert werden.

3.6 Statistik

Die erhobenen Daten wurden überwiegend deskriptiv-statistisch dargestellt. Für die stetigen Merkmale wurde der Median sowie 1. und 3. Quartile bestimmt, und für die diskreten Merkmale die absolute und relative Häufigkeit berechnet.

Zur Darstellung der qualitativen Merkmale dienen Säulendiagramme. Zur Auswertung der Überlebenszeiten wurden Kaplan-Meier-Kurven verwendet. Auf Logrank-Tests wurden wegen der kleinen Gruppengröße im MUC 18-Outer-positiven und MUC-18-Inner-negativen Kollektiv verzichtet.

4 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die stadienabhängige Expression von MUC 18 im Blut von 187 Melanompatienten ermittelt werden. Dies erfolgte mittels reverser Transkription und PCR-Amplifikation der so erhaltenen cDNA (RT-PCR).

Zur Präparation der RNA aus dem Blut der Patienten wurde die Methode nach Chomczynski angewandt (Chomczynski et al. 1987). Auf die Korrelation zwischen RNA-Ausbeute bzw. -Reinheitsfaktor und PCR-Ergebnis soll im Folgenden näher eingegangen werden. Es wurden nur Blutproben verwendet, deren intakte RNA mittels GAPDH-PCR überprüft wurde und deren Negativkontrolle bis zur Übertragung auf das Agarose-Gel negativ blieben.

Anhand der statistischen Auswertung der Ergebnisse soll untersucht werden, ob ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von MUC 18 im Blut und der Rezidivfreiheit bzw. der Überlebenszeit der Patienten besteht.

4.1 Patientencharakteristik

Es wurden 256 Blutproben von 187 Patienten ausgewertet. Zum Zeitpunkt der Analyse war das Erkrankungsstadium dem Untersucher nicht bekannt. Vor Abnahme der Blutproben, die unselektiv auf zufälliger Basis erfolgte, wurde das Einverständnis der Patienten eingeholt. Drei Proben waren in der Kontrolle GAPDH-negativ und wurden daher von der Auswertung ausgeschlossen.

4.1.1 Krankheitsstadien

Die Krankheitsstadien verteilten sich entsprechend dem Patientenkollektiv der Abteilung der Dermatologie der Universität Ulm, wie es sich in der Ambulanz und auf Station einfindet. Die Einteilung wurde anhand der UICC-Klassifikation vorgenommen (Tab. 1, S. 4).

Tab. 2. Anzahl der untersuchten Blutproben und Patienten, unterteilt nach klinischem Erkrankungsstadium nach der Union International Contre le Cancer (UICC)

Anzahl der untersuchten Blutproben und Patienten						
Stadium	**IA**	**IB**	**II**	**III**	**IV**	**Summe**
Anzahl der Blutproben	65	51	42	50	48	256
Anzahl der Patienten	58	38	36	33	22	187
◆ **davon weiblich**	29	24	24	17	11	105
◆ **davon männlich**	29	14	12	16	11	82

4.1.2 Altersverteilung

Die Altersverteilung der Patienten zeigte mit zunehmendem Erkrankungsstadium leicht steigende Tendenz. Die Altersmediane liegen zwischen 52,5 und 56 Jahren zum Zeitpunkt der Probenabnahme.

Tab. 3. Altersverteilung der untersuchten Patienten, unterteilt nach klinischem Erkrankungsstadium (Union Internationale Contre le Cancer, UICC)

Altersverteilung der untersuchten Patienten						
Stadium	**IA**	**IB**	**II**	**III**	**IV**	**Mittelwert**
Altersmedian	54	52,5	55	54	56	55
1. Quartile	42	39,5	45	50	49,25	44
3. Quartile	64	63	65	67	67	65

4.1.3 Histologische Tumortypen

Die Verteilung der verschiedenen histologischen Tumortypen bezogen auf das Erkrankungsstadium ist in Tab. 4, S. 32 dargestellt. Insgesamt überwiegt mit ca. 46%, vor allem in Stadium I, das superfiziell spreitende Melanom. Im klinischen Stadium IV fällt vor allem die Zunahme der mit schlechter Prognose verbundenen Aderhaut- und Schleimhautmelanome auf. Melanome mit unbekannter

Primärtumorlokalisation sind per definitionem Stadium III oder höher und werden in der Tabelle unter dem Stichwort »Sonstige« zusammengefasst.

Tab. 4. Stadienabhängige Verteilung der histologischen Tumortypen, Erkrankungsstadium nach der Union Internationale Contre le Cancer (UICC): SSM = superfiziell spreitendes Melanom, ALM = akrolentiginöses Melanom, NM = noduläres Melanom, LMM = Lentigo-maligna-Melanom

Stadienabhängige Verteilung der histologischen Tumortypen						
Stadium	**IA**	**IB**	**II**	**III**	**IV**	**Summe**
SSM	41	28	9	5	3	86
ALM	2	0	3	6	3	14
NM	1	6	20	14	4	45
LMM	9	1	2	0	0	12
Sonstige	5	3	2	8	12	30

4.1.4 Primärtumorlokalisation

Die mit günstigerer Prognose behaftete Lokalisation an Extremitäten und Gesicht überwiegt leicht gegenüber der weniger günstigen Lokalisation im Kopf-, Hals-, oder Stammgebiet im dargestellten Patientengut. Dabei wurden die histologischen Typen mit der Lokalisation nicht korreliert.

In Stadium III und IV fällt erneut ein Ansteigen der mit ungünstiger Prognose verbundenen Ader- und Schleimhautmelanome und Melanome unbekannten Ursprungs auf, welche unter der Rubrik »Sonstige/unbekannt« aufgeführt sind.

Tab. 5. Erkrankungsstadium nach der Union Internationale Contre le Cancer (UICC)

Primärtumorlokalisation der untersuchten Patienten						
Stadium	**IA**	**IB**	**II**	**III**	**IV**	**Summe**
Kopf/Hals/Stamm	27	15	10	12	3	67
Gesicht/Extremitäten	31	27	26	19	11	110
Sonstige/unbekannt	0	0	0	2	8	10

4.2 MUC-18-PCR-Ergebnisse

Im Rahmen dieser Untersuchungen soll die Expression von MUC 18 und deren mögliche Stadienabhängigkeit ermittelt werden. In Tab. 6, S. 36 sind die Ergebnisse für die Outer und für die Inner PCR dargestellt. Es wird unterschieden zwischen den Gesamtblutproben und den Erstabnahmen der einzelnen Patienten. Gesamtblutproben bedeutet hierbei, dass sämtliche im Verlauf der Therapie und Nachsorge, d.h. in zeitlicher Abfolge gewonnenen Blutproben, Verwendung finden, während bei den Erstabnahmen nur die jeweils erste Blutabnahme bei Diagnosestellung in die Auswertung eingeht. Darin begründet sich auch die geringere Menge des letztgenannten Kollektivs.

Das Produkt der Outer PCR hatte eine Länge von 437 bp, das der Inner PCR von 262 bp.

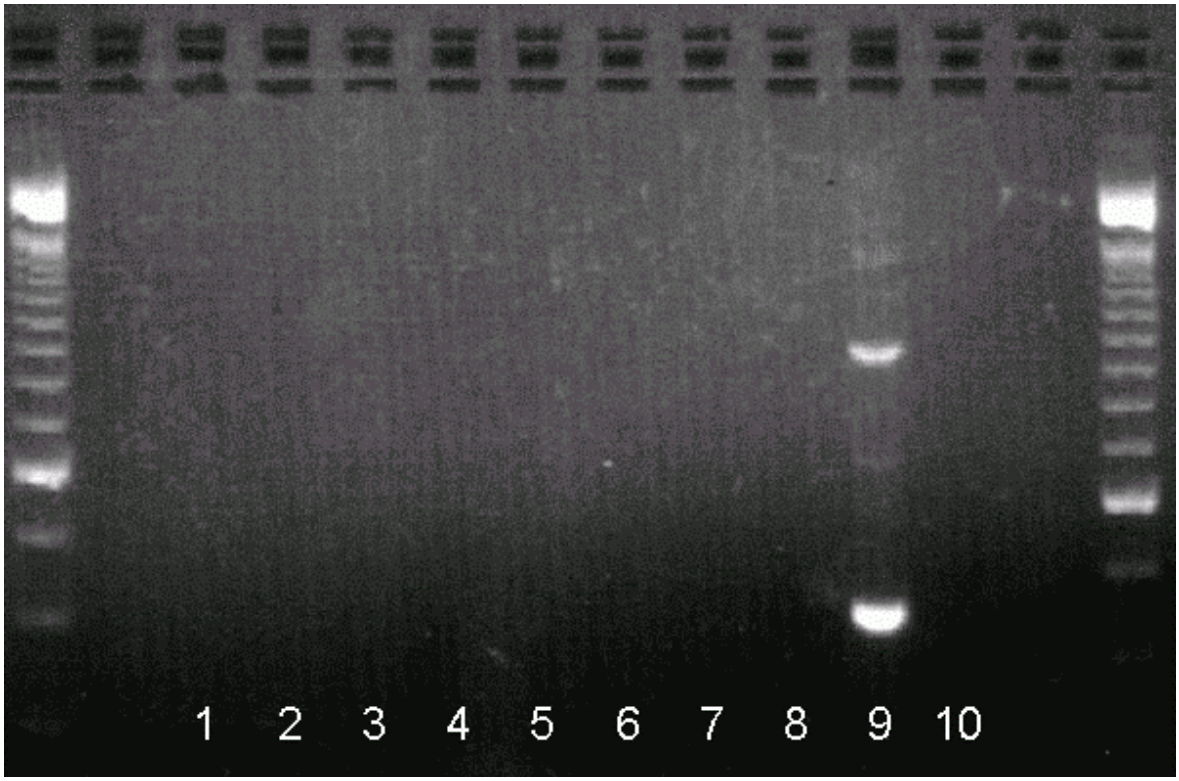


Abb. 1. Agarose-Gel-Elektrophorese der Outer-PCR-Produkte. Mit Ausnahme der Linie 9 sind alle Linien negativ. Ziffern 1–8: Blutproben von Melanompatienten, 9: Positivkontrolle (10^6 SK-Mel-Melanomzellen), 10: Negativkontrolle (Aqua bidest), 100 bp: Längenstandard, 437 bp: Lokalisation des 437 bp langen Outer-PCR-Produkts

Einige der untersuchten Proben wiesen PCR-Produkte auf, die etwa 100 bp länger als das erwartete und beschriebene Produkt von MUC 18 waren. Der Nachweis, dass es sich hierbei um genomische DNA und nicht um Splicingvarianten handelt, wurde mittels RNA-PCR verifiziert und konnte durch DNAse-Behandlung der Proben aufgehoben werden. Die hier zur Auswertung verwendeten Resultate sind die Ergebnisse nach DNAse-Behandlung.

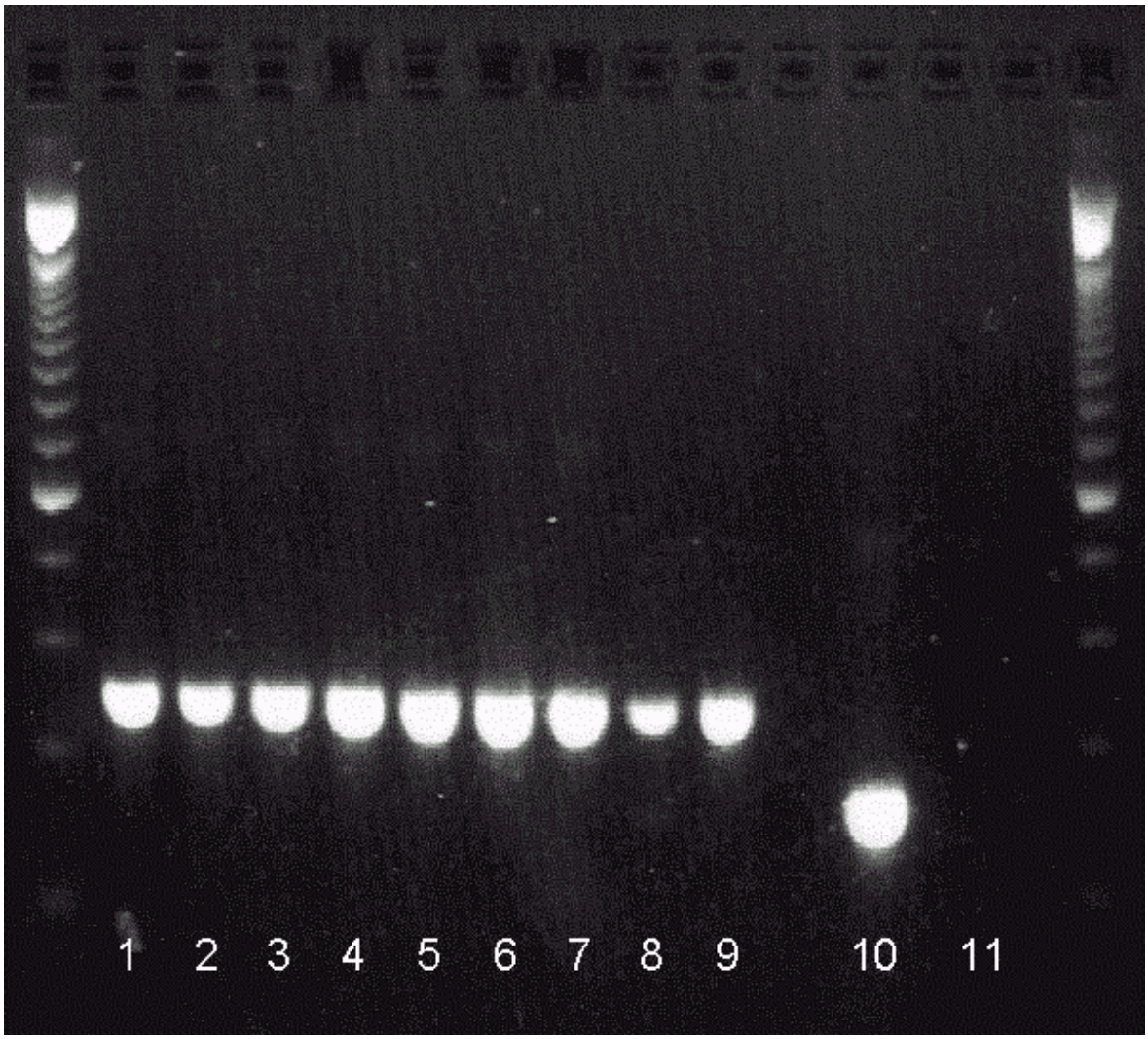


Abb. 2. Agarose-Gel-Elektrophorese der PCR-Produkte des inneren PCR-Zyklus. Nachweis genomischer DNA nach Durchführung der PCR ohne vorherige RT-Reaktion. Ziffern 1–9: Blutproben von Melanompatienten, 10: Positivkontrolle (10^6 SK-Mel-Melanomzellen), 11: Negativkontrolle (Aqua bidest), 100 bp: Längenstandard, 262 bp: Lokalisation des 262 bp langen inneren PCR-Produkts

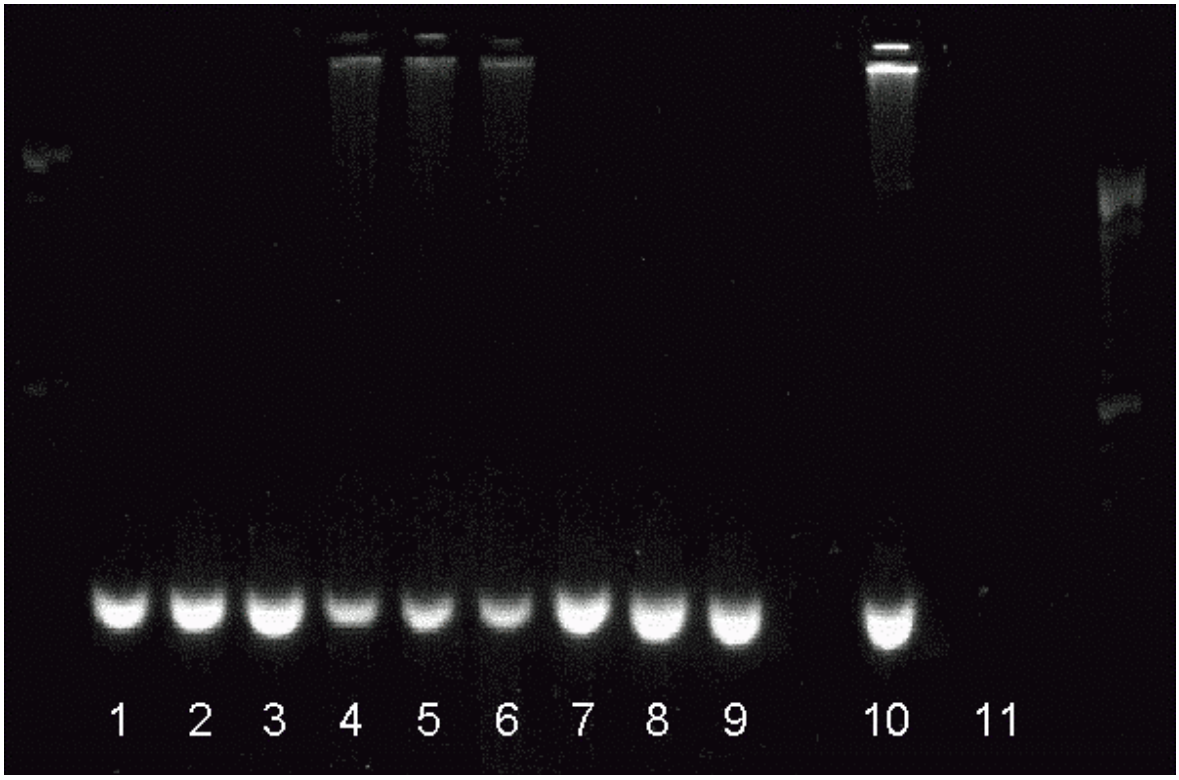


Abb. 3. Agarose-Gel-Elektrophorese der PCR-Produkte des inneren PCR-Zyklus nach DNAse-Behandlung. Ziffern 1–9: Blutproben von Melanompatienten, 10: Positivkontrolle (10^6 SK-Mel-Melanomzellen), 11: Negativkontrolle (Aqua bidest), 100 bp: Längenstandard, 262 bp: Lokalisation des 262 bp langen inneren PCR-Produkts

Stadienabhängigkeit des MUC-18-Nachweises

Tab. 6. Stadienabhängigkeit des Nachweises von MUC 18. Anzahl getesteter Blutproben und positiver Resultate bei Outer und Inner PCR

Stadienabhängigkeit des MUC-18-Nachweises						
Stadium	**IA**	**IB**	**II**	**III**	**IV**	**Summe**
Gesamtproben						
Anzahl	65	51	42	50	48	256
Outer PCR	13	9	11	5	15	53
Inner PCR	61	49	39	44	44	237
Erstabnahmen						
Anzahl	58	38	36	33	22	187
Outer PCR	12	6	11	4	6	39
Inner PCR	55	37	33	29	20	174

Die Ergebnisse aus Tab. 6 sind in Abb. 4 graphisch dargestellt. Die prozentualen Anteile MUC-18-positiver Proben sind gegen das klinische Stadium aufgetragen, jeweils eine Säule für die Outer PCR und eine Säule für die Inner PCR. Abb. 4A zeigt die Darstellung für die Gesamtblutproben, in Abb. 4B sind die Ergebnisse für die Erstabnahme dargestellt.

Ergebnisse. Die Ergebnisse der Outer PCR zeigen leicht steigende Tendenz hin zu höheren Erkrankungsstadien, die Werte schwanken zwischen 16% und 31% bei den Erstabnahmen und 10% und 31% bei Berücksichtigung aller Blutproben. Bei den Ergebnissen der Inner PCR ist kein Trend erkennbar. Die positiven Blutproben liegen bei Werten zwischen 88% und 96% für alle Blutproben bzw. 88% und 97% für die Erstabnahmen. Insgesamt sind die Werte sehr hoch und lassen keine Stadienabhängigkeit erkennen.

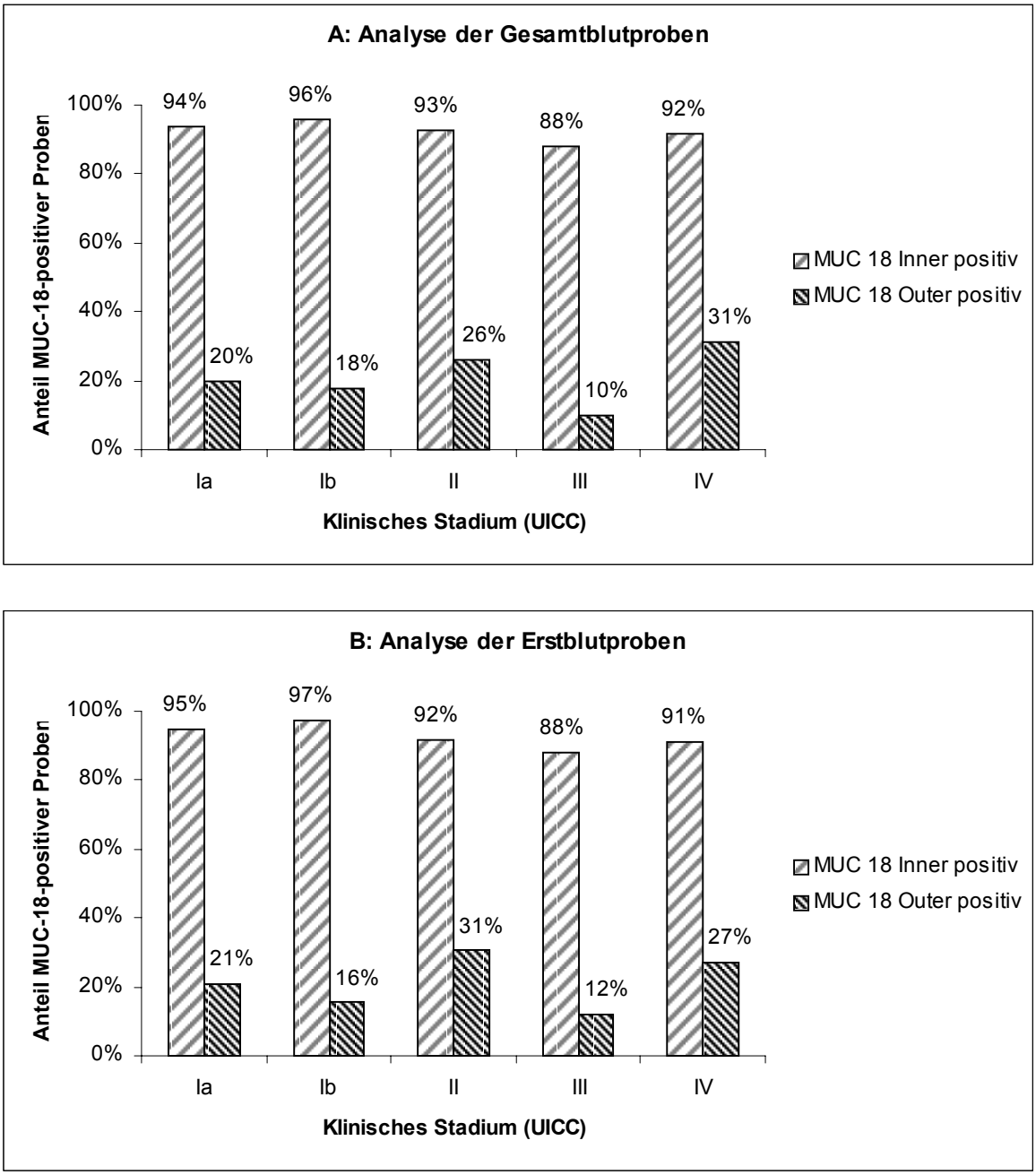


Abb. 4. Stadienabhängiger Anteil MUC-18-positiver Blutproben. Die Ergebnisse aus Outer und Inner PCR sind jeweils in einer Säule dargestellt. **A:** Gesamtblutproben. **B:** Erstabnahmen bei den einzelnen Patienten

4.3 RNA-Präparation

4.3.1 Ausbeute der RNA-Präparation

RNA-Ausbeute nach Krankheitsstadien. Die Menge und Reinheit der erhaltenen RNA ist unter anderem abhängig von der Methode der Blutprobenaufbereitung und der RNA-Extraktion. Sie beeinflusst möglicherweise das Ergebnis der nachfolgenden PCR. Im Folgenden soll die Menge der RNA bezogen auf die einzelnen Krankheitsstadien betrachtet werden, wie sie nach Erythrozytenlyse und anschließender RNA-Extraktion nach Chomczynski erzielt wurde. Die Blutproben wurden dabei, vor der Fixierung der RNA mit GIT-Puffer, mit Erythrozytenlysepuffer behandelt. Bei der Auswertung wurde unterschieden zwischen der Gesamtzahl aller Blutproben (im Folgenden zuerst dargestellt) und der Erstabnahme bei den einzelnen Patienten.

Tab. 7. RNA-Ausbeute der untersuchten Blutproben als Median (1. / 3. Quartil), in Korrelation zum klinischem Erkrankungsstadium (Union Internationale Contre le Cancer, UICC)

RNA-Ausbeute aller untersuchten Blutproben						
Stadium	**IA**	**IB**	**II**	**III**	**IV**	**Mittelwert**
Anzahl der Proben	65	51	42	50	48	256
totale RNA (µg)	9,3	9,9	10,6	8,5	7,1	9,1
1. Quartil	6	4,6	5,3	2,9	3,7	4,5
3. Quartil	16,6	14,6	33,5	16,6	17,3	17,8

Betrachtet man die RNA-Menge bezogen auf das Stadium der Erkrankung, fällt die geringere Ausbeute in Stadium IV auf. Dies kann dadurch erklärt werden, dass die Proben der Patienten im klinischen Stadium IV normalerweise um 7:30 Uhr auf der Station abgenommen werden, d.h. die Proben konnten durchschnittlich erst eine Stunde später verarbeitet werden.

■ Positive MUC 18-PCR in Abhängigkeit von der RNA-Menge

Um den Einfluss der absoluten RNA-Menge auf das Endergebnis, also den positiven MUC-18-Nachweis, zu untersuchen, wurde die Positivreaktion der PCR in Abhängigkeit von der Ausgangsmenge an RNA untersucht. Untergruppen wurden anhand der RNA-Menge definiert.

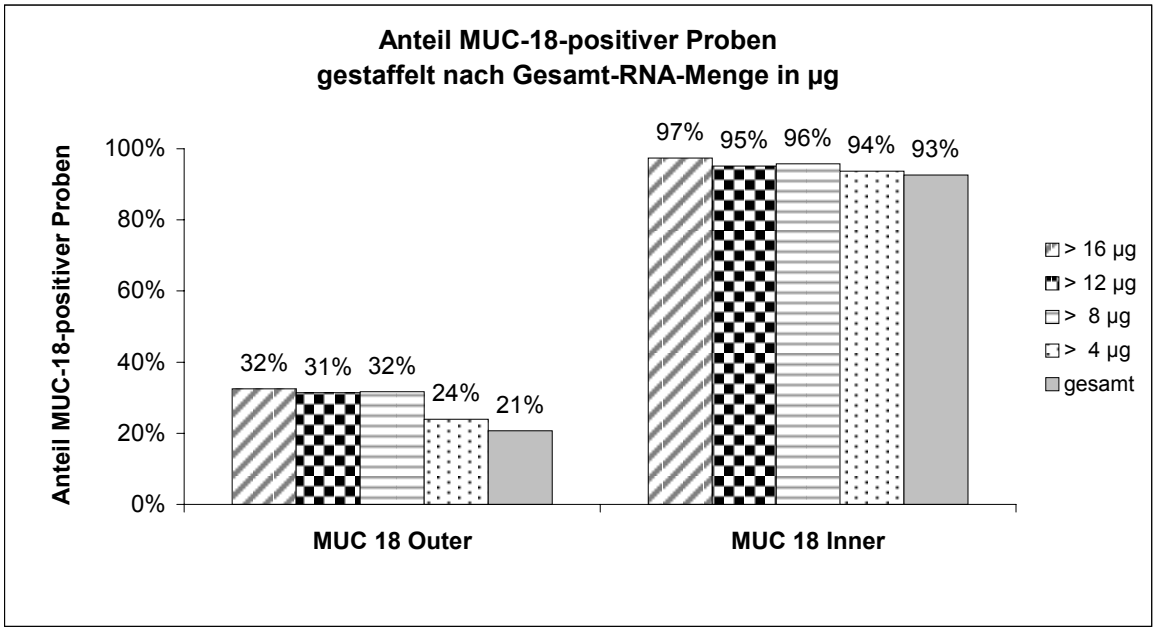


Abb. 5. Anteil MUC-18-positiver Blutproben, in Korrelation zur untersuchten RNA-Menge in µg, dargestellt sind sowohl für die Ergebnisse der MUC 18 Outer, als auch der MUC 18 Inner PCR

Abb. 5 zeigt den Anteil MUC-18-positiver Ergebnisse getrennt dargestellt für MUC 18 Outer und MUC 18 Inner PCR. Durch die Einführung unterer Grenzwerte der RNA-Menge wurden Untergruppen definiert. Diese Grenzwerte lagen bei 4 µg, 8 µg, 12 µg und 16 µg. Die Schrittweiten ergaben sich aus den der Tab. 7, S. 38 zu entnehmenden Werten für Median und Quartile. Der Anteil positiver Proben liegt bei der Outer PCR bei 21% (53/256) und bei der Inner PCR bei 93% (237/256). Sowohl bei den Ergebnissen der Outer als auch der Inner PCR lässt sich eine leicht ansteigende Tendenz des positiven Anteils mit steigenden Grenzwerten erkennen, wobei diese bei der Outer PCR stärker ausgeprägt ist.

Entsprechend dieser Analyse für die gesamten Blutproben wurden auch die einzelnen Patienten untersucht.

Tab. 8. RNA-Ausbeute der Erstblutproben der einzelnen Patienten als Median (1. / 3. Quartile), unterteilt nach klinischem Erkrankungsstadium (Union Internationale Contre le Cancer, UICC)

RNA-Ausbeute der Erstblutproben						
Stadium	**IA**	**IB**	**II**	**III**	**IV**	**Gesamt**
Anzahl der Proben	58	38	36	33	22	187
totale RNA	9,63	8,4	12,7	8,4	6,84	9
1. Quartile	6	4,4	6	2,6	4,0	4,9
3. Quartile	17,8	12,4	38,6	12,3	17,4	17,6

Die Auswertung zeigt, dass die Daten aus Tab. 8 weitgehend denen aus Tab. 7, S. 38 entsprechen. Auf die Darstellung der Daten soll daher verzichtet werden.

4.3.2 Reinheit der präparierten RNA

Neben der Menge der extrahierten RNA kann auch deren Reinheit, d.h. der Grad der Proteinverunreinigung, das Ergebnis der nachfolgenden PCR beeinflussen. Der Reinheitsfaktor, definiert als Quotient $OD_{260} : OD_{280}$, wie bereits im Abschnitt Material und Methoden (S. 19) beschrieben, wurde für jede einzelne Probe photometrisch bestimmt. Die Ergebnisse der Analyse, zunächst aller Blutproben, sind in Tab. 9 dargestellt.

Tab. 9. RNA-Reinheitsfaktor der untersuchten Blutproben als Median (1. / 3. Quartile), unterteilt nach klinischem Erkrankungsstadium (Union Internationale Contre le Cancer, UICC)

RNA-Reinheitsfaktor der untersuchten Blutproben						
Stadium	**IA**	**IB**	**II**	**III**	**IV**	**Gesamt**
Anzahl der Proben	65	51	42	50	48	256
Reinheitsfaktor Median	1,5	1,5	1,5	1,6	1,6	1,6
1. Quartile	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4
3. Quartile	1,8	1,8	1,7	1,8	1,8	1,8

Reinheitsgrad der Blutproben. Der Reinheitsgrad der Blutproben ist – auf die einzelnen Stadien verteilt – relativ konstant. Trotz der längeren Lagerungszeit der Blutproben aus Stadium IV zeigen die Werte eher einen Trend zu höherem Reinheitsgrad. Der Reinheitsgrad wird also – im Gegensatz zur RNA-Menge – von der Zeit bis zur Verarbeitung nicht beeinflusst. Insgesamt liegen die Werte aller Stadien in Bereichen, in denen die Proteinverunreinigung vernachlässigt werden kann.

■ Positive MUC 18 PCR in Abhängigkeit von der Reinheit der RNA

Sensitivität der PCR und Reinheitsgrad der RNA. Es soll im Folgenden untersucht werden, ob eine Abhängigkeit der Sensitivität der PCR von dem Reinheitsgrad der RNA besteht. In Abb. 6 sind alle positiv getesteten Blutproben in Abhängigkeit der als Auswahlkriterien verwendeten unteren Grenze für den Reinheitsfaktor dargestellt.

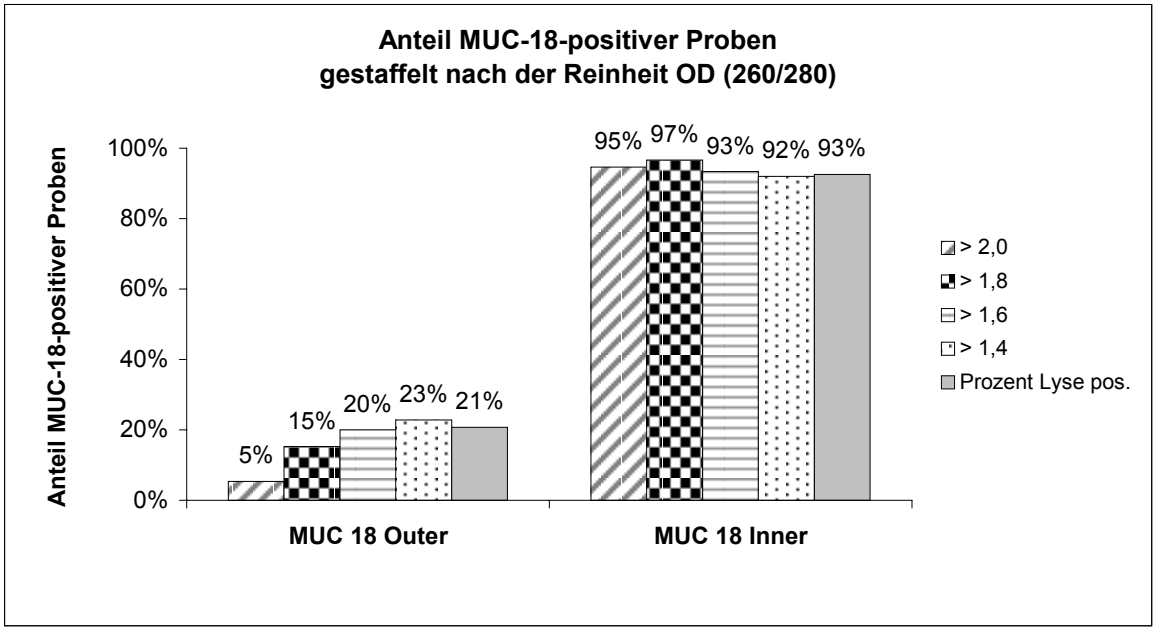


Abb. 6. Stadienunabhängiger Anteil MUC-18-positiver Blutproben in Abhängigkeit vom Reinheitsgrad der Blutproben. Die Ergebnisse der Outer und Inner PCR wurden getrennt voneinander dargestellt

Bei der Outer PCR sinkt der Anteil MUC-18-positiver Resultate mit steigendem Grenzwert des RNA-Reinheitsfaktors. Besonders ausgeprägt ist der Abfall bei

Werten > 2, wo der Anteil positiver Proben auf 5% absinkt. Allerdings sind in diesem Bereich die verbleibenden Gruppengrößen auch sehr klein. Bei der Inner PCR sind die Werte eher uneinheitlich, mit leicht steigenden Werten bei höherem Reinheitsfaktor.

Um einen möglichen Einfluss der mehrfach getesteten Patienten auszuschließen, wurde der RNA-Reinheitsfaktor stadienabhängig nur für die Erstabnahmen der Patienten bestimmt. Tab. 10 zeigt die daraus ermittelten Mediane und Quartile. Wie schon bei der RNA-Menge entsprechen die Darstellungen weitgehend denen für die gesamten Blutproben. Auf die grafische Darstellung soll daher verzichtet werden.

Tab. 10. RNA-Reinheitsfaktor der untersuchten Blutproben als Median (1. / 3. Quartile), unterteilt nach klinischem Erkrankungsstadium. Nur die erste Blutprobe wurde berücksichtigt

RNA-Reinheitsfaktor der untersuchten ersten Blutproben						
Stadium	**IA**	**IB**	**II**	**III**	**IV**	**Gesamt**
Anzahl der Proben	58	38	36	33	22	187
RNA-Reinheitsfaktor Median	1,53	1,48	1,51	1,63	1,625	1,52
1. Quartile	1,38	1,373	1,4	1,41	1,453	1,39
3. Quartile	1,75	1,72	1,71	1,823	1,775	1,755

4.4 Rezidivfreies Gesamtüberleben

Auswertung in den klinischen Stadien III und IV. Die Rezidivfreiheit und das Gesamtüberleben im Zusammenhang mit dem Ergebnis der MUC 18 PCR wurde nur in den klinischen Stadien III und IV ausgewertet. In Stadium I und II waren Rezidive nur sporadisch, und Todesfälle als Folge des Melanoms nicht beobachtet worden.

Verwendung der Erstblutabnahme. Zur Auswertung wurde jeweils das Ergebnis der ersten Blutabnahme verwendet:

- Patienten, die bei dieser negativ getestet wurden, wurden auch dann als negativ behandelt, wenn die folgenden Blutproben im Verlauf der Erkrankung positiv wurden.
- Ebenso wurden Patienten als positiv erachtet, deren Blutproben im Verlauf der Therapie negativ wurden.

Beobachtungsdauer. Die Beobachtungsdauer erstreckte sich vom Zeitpunkt der ersten Blutabnahme bis zum Auftreten eines Ereignisses, bzw. bei Vollremission bis zum Zeitpunkt der letzten Melanomnachsorge. Lag diese längere Zeit zurück, wurde beim behandelnden Haus- bzw. Hautarzt telefonisch die entsprechenden Informationen erfragt.

4.4.1 Klinisches Stadium III

Outer PCR. Im klinischen Stadium III, das 33 Patienten umfasst, waren 4 Proben in der Outer PCR MUC-18-positv und 29 negativ. Bei den 4 positiven Patienten trat ein Rezidiv auf, in der negativen Gruppe waren 16 Rezidive zu verzeichnen. Die mediane Beobachtungszeit betrug im MUC-18-Outer-negativen Arm 18 Monate und im MUC-18-Outer-positiven Arm 23,5 Monate.

Inner PCR. In der Inner PCR waren 29 Patienten positiv, wovon 14 im Beobachtungsintervall ein Rezidiv erlitten. Drei der in der Inner PCR negativ getesteten Patienten erlitten ein Rezidiv. Das mediane Beobachtungsintervall lag bei 20 Monaten im positiven Arm und 18 Monaten im negativen Arm.

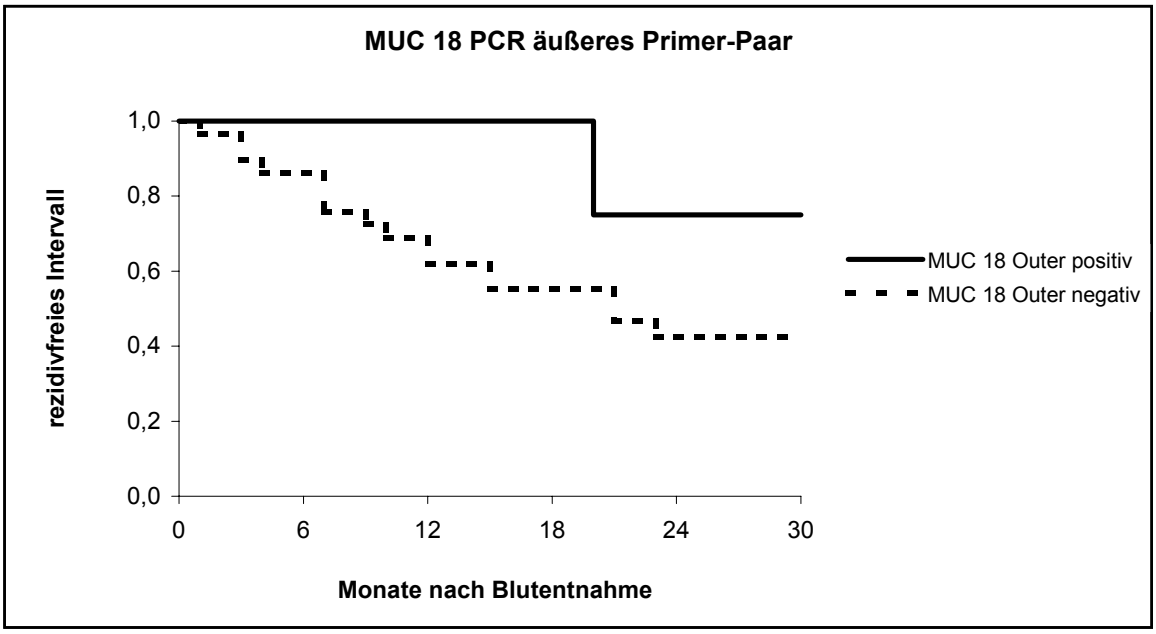


Abb. 7. Kaplan-Meier-Kurve des rezidivfreien Überlebens im klinischen Stadium III, unterschieden nach dem Ergebnis des MUC-18-Outer-Nachweises

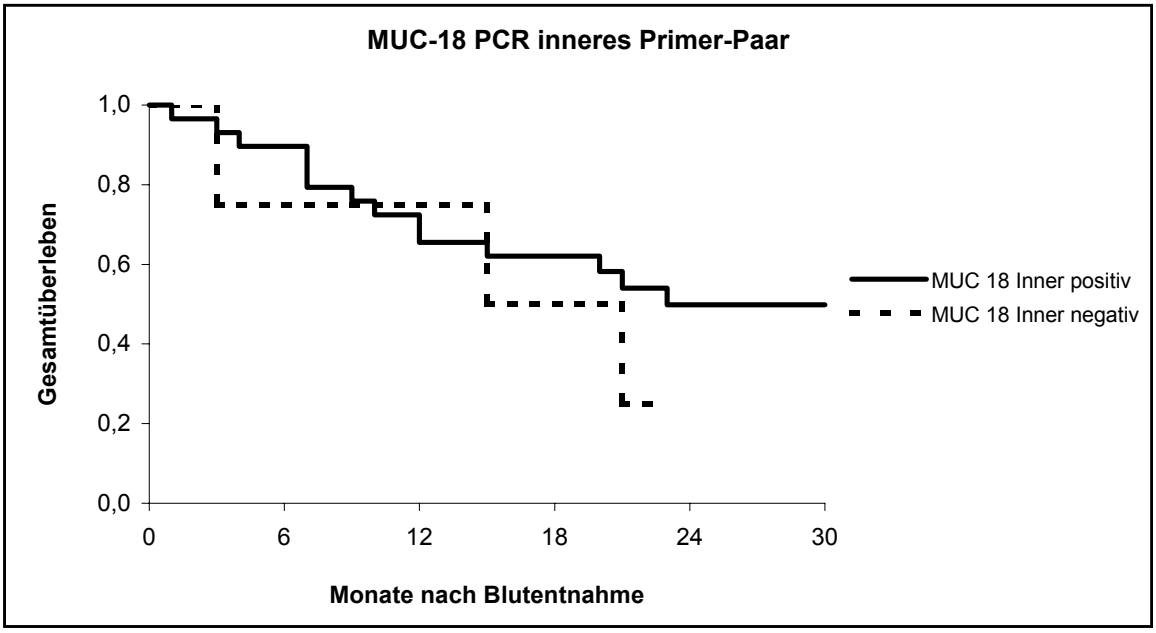


Abb. 8. Kaplan-Meier-Kurve des rezidivfreien Überlebens im klinischen Stadium III, unterschieden nach dem Ergebnis des MUC-18-Inner-Nachweises

4.4.2 Klinisches Stadium IV

Outer PCR. Im klinischen Stadium IV wurde das Überleben der Patienten im Zusammenhang mit den Ergebnissen der PCR untersucht. Die Daten von 22 Patienten konnten ausgewertet werden, davon waren in der Outer PCR 5 positiv und 17 negativ. In der positiven Gruppe wurden bis zum Zeitpunkt der Auswertung 4, in der negativen Gruppe 14 Todesfälle verzeichnet. Die Beobachtungszeit lag bei den positiv getesteten Patienten bei 12, bei den negativ getesteten Personen bei 11 Monaten.

Inner PCR. In der Inner PCR wurden 16 Todesfälle in der MUC-18-positiven Gruppe (20 Patienten) verzeichnet und 2 Todesfälle in der MUC-18-negativen Gruppe (2 Patienten). Der Beobachtungszeitraum betrug 12 Monate in der positiven Gruppe und 2 Monate in der negativen Gruppe.

Sowohl bei den Ergebnissen der Inner als auch der Outer PCR lässt sich im klinischen Stadium III und IV ein Trend dahingehend erkennen, dass das Vorhandensein von MUC 18 eher für längere Rezidivfreiheit und längeres Überleben spricht.

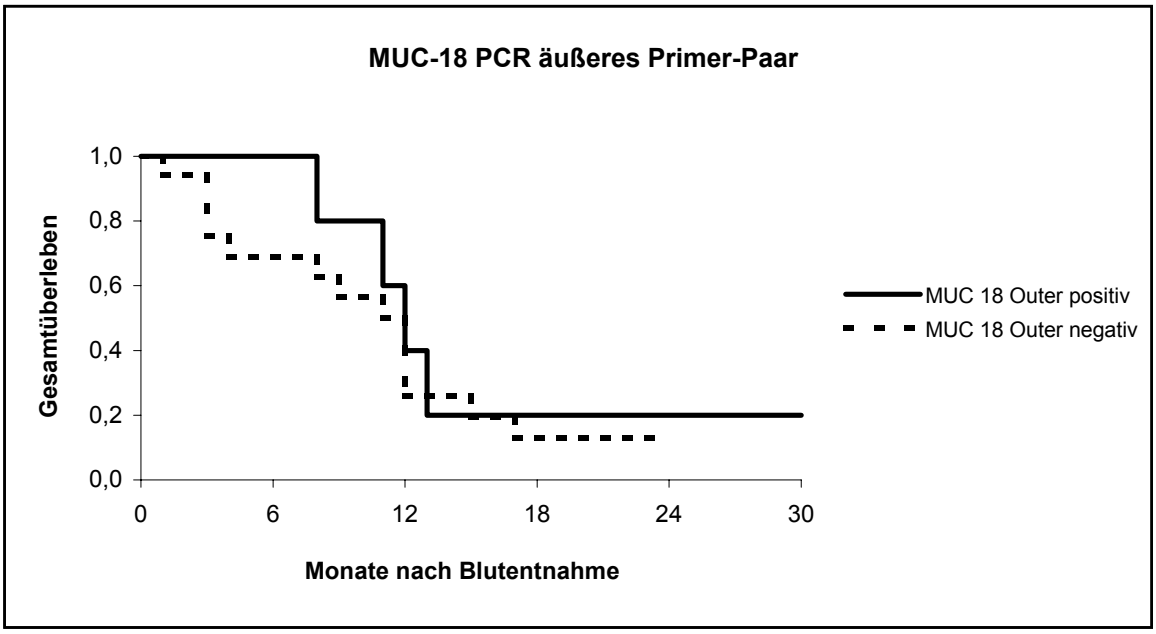


Abb. 9. Kaplan-Meier-Plot des Überlebens im klinischen Stadium IV, unterschieden nach dem Ergebnis des MUC-18-Outer-Nachweises

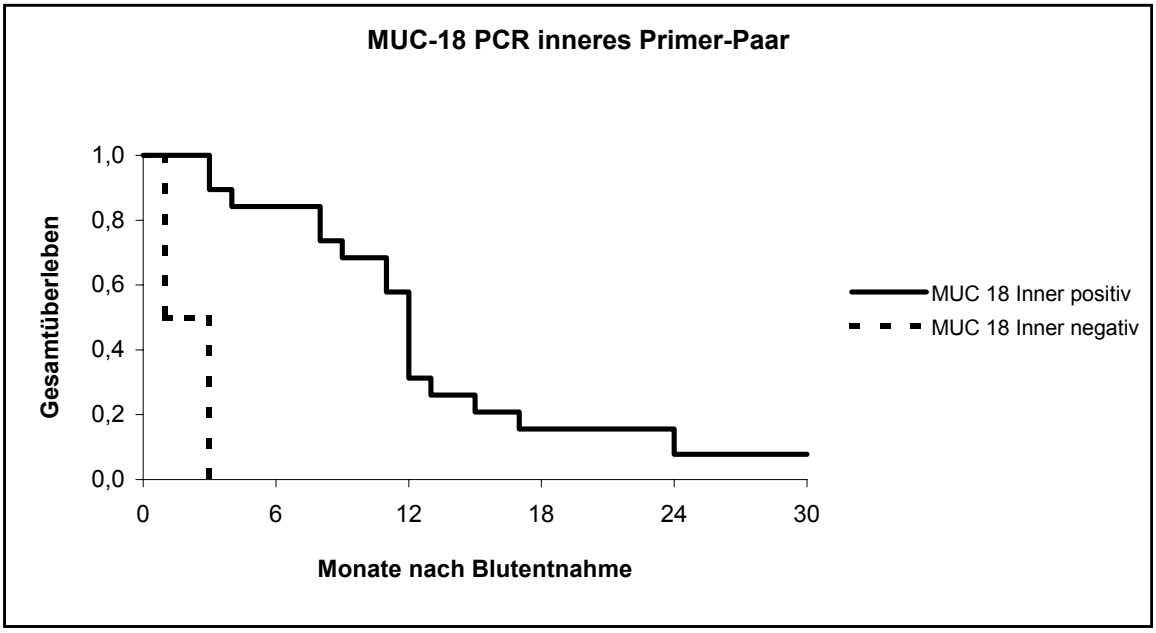


Abb. 10. Kaplan-Meier-Plot des Überlebens im klinischen Stadium IV, unterschieden nach dem Ergebnis des MUC-18-Inner-Nachweises

4.5 Ergebnisse der Kontrollexperimente

4.5.1 Sensitivität der Methode

In der Outer PCR konnte das Produkt bis zur Verdünnung auf 0,1 µl der eingesetzten cDNA nachgewiesen werden. In der Inner PCR konnte das Produkt bis zur Verdünnung auf 0,001 µl des ursprünglich eingesetzten Produktes nachgewiesen werden.

4.5.2 Spezifität der Methode

Bei den getesteten 15 Blutproben von gesunden Probanden stellte sich überraschenderweise heraus, dass auch bei wiederholten Kontrollen 14 der 15 Proben in der Inner PCR MUC-18-positiv waren. Die Negativkontrolle war dabei stets negativ, sodass ein positives Ergebnis aufgrund von Kontamination ausgeschlossen werden kann.

4.5.3 Kontrolle der Präparate mittels GAPDH-PCR

Um auszuschließen, dass negative Ergebnisse durch tatsächlich nicht vorhandene Expression von MUC 18, und nicht durch degradierte RNA begründet sind, wurden Kontrollexperimente mit dem Housekeeping GAPDH wie unter Abschnitt 3.4.3, »Material und Methoden, Kontrolle der Präparate mittels GAPDH-PCR« beschrieben, durchgeführt. Drei Proben waren negativ und wurden von der Auswertung ausgeschlossen.

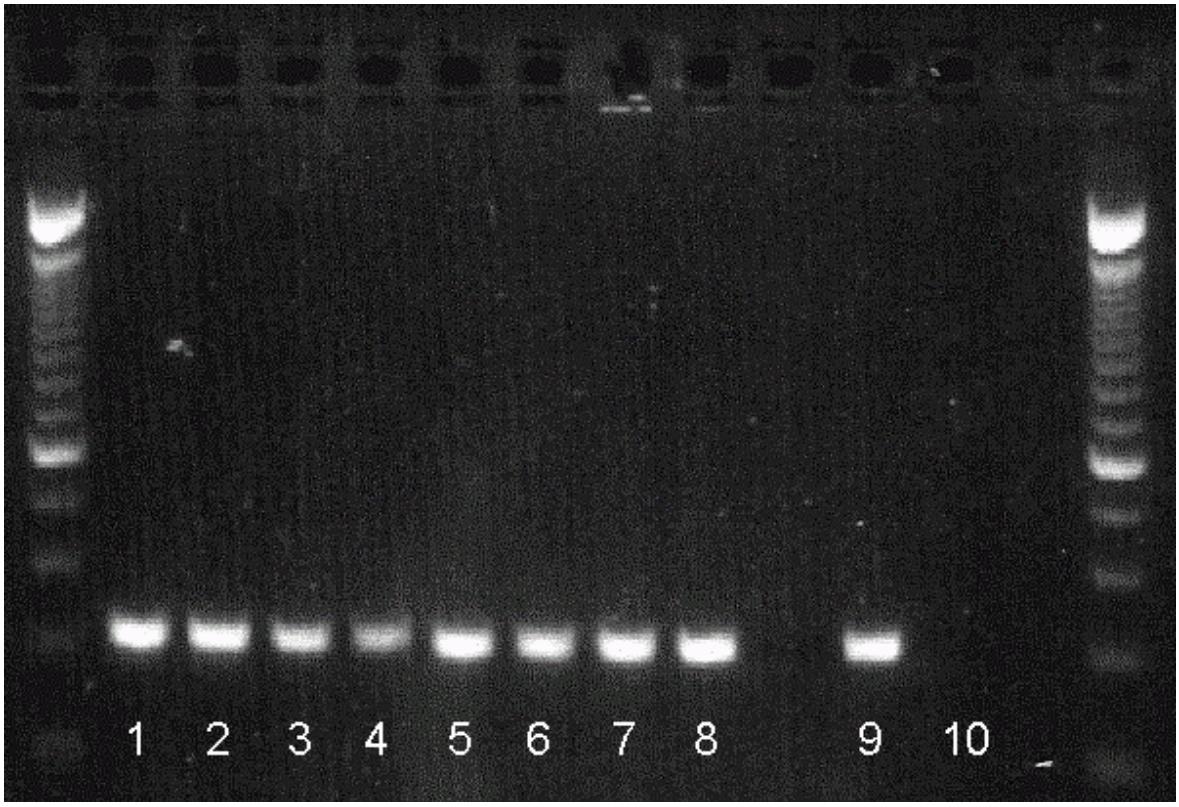


Abb. 11. Agarose-Gel-Elektrophorese der GAPDH-PCR-Produkte. Ziffern 1–8: Blutproben von Melanompatienten. 9: Positivkontrolle (10^6 SK-Mel-Melanomzellen), 10: Negativkontrolle (Aqua bidest), 100 bp: Längenstandard, 319 bp: Lokalisation des 319 bp langen GAPDH-PCR-Produkts

5 Diskussion

5.1 Patientenkollektiv

Patientenanzahl, Zeitraum. Das Patientenkollektiv umfasst 187 Patienten mit der histologisch gesicherten Diagnose »malignes Melanom«. Es wurde im Zeitraum von zwei Jahren, 1995–1996, unselektiert in der Ambulanz und auf Station der dermatologischen Abteilung der Universität Ulm untersucht. Die epidemiologischen Daten entsprechen weitgehend denjenigen, welche von Kramer et al. 1996 zum malignen Melanom im Einzugsgebiet der Universität Ulm veröffentlicht wurden.

Geschlechterverteilung. Der Anteil der Frauen am untersuchten Kollektiv liegt bei 56% und spiegelt die allgemein höhere Prävalenz im weiblichen Geschlecht wider, wie sie weitgehend den bisher veröffentlichten Daten entspricht (Kramer et al. 1996, Garbe et al. 1995, Büttner et al. 1995). Der Trend zur Angleichung der Geschlechterverteilung, wie bereits in der Studie von Kramer ersichtlich, setzt sich allerdings auch hier fort. Die Verteilung der Altersmediane entspricht dem langjährigen Mittel (Tab. 3, S. 31).

Verteilung auf die Erkrankungsstadien. Die 187 bei der Auswertung berücksichtigten Patienten verteilen sich relativ gleichmäßig auf die Erkrankungsstadien IA, IB, II, III und IV nach UICC, mit leichtem Überhang der Fallzahlen in den Stadien IA und IB (Tab. 2, S. 31).

Verteilung nach histologischen Tumortypen. Bei der Analyse der histologischen Tumortypen wurde Folgendes festgestellt:

- *SSM:* Beim superfiziell spreitenden Melanom (SSM) findet sich eine hohe Prävalenz (Tab. 4, S. 32). Hohe Fallzahlen sind dabei vor allem in den klinischen Stadien IA und IB zu finden. Dies hängt mit der vergleichsweise langen

Persistenz des SSM in der horizontalen Wachstumsphase (s. S. 5) zusammen, sodass diese Melanome öfter im nicht metastasierten Zustand diagnostiziert werden.

- *Sonstige:* Im Gegensatz dazu steigt der Anteil der als »Sonstige« klassifizierten Melanome in Stadium III und IV an. Diese Gruppe umfasst vorwiegend Retina- und Schleimhautmelanome, die erst im metastasierten Stadium in die Abteilung Dermatologie überwiesen wurden.
- *NM:* Auch die Anzahl des nodulären Melanoms (NM) steigt in den Stadien III und IV an.
- *LMM:* Mit 6,4% ist das LMM unterrepräsentiert, im Gegensatz zur Erstdiagnose; es ist in den Stadien III und IV nicht vertreten. Das kann dadurch erklärt werden, dass diese Melanome wie das SSM oft bereits in frühen Stadien erkannt und daher seltener überwiesen werden, wenn bereits Metastasen aufgetreten sind.

Tumorlokalisation. Mit 36% sind die Tumoren etwas häufiger als in den von Kramer et al. veröffentlichten Daten an Kapillitium und Stamm lokalisiert – und haben daher eine ungünstigere Prognose. Patienten mit dieser Tumorlokalisation fanden sich daher häufiger zur Nachsorge ein, was wiederum das häufigere Vorkommen dieser Lokalisation in der vorgestellten Studie erklärt.

5.2 Diskussion der Methode

Das Ziel dieser Arbeit ist es, im Blut von Melanompatienten zirkulierende Melanomzellen nachzuweisen und gegebenenfalls prognostische Aussagen anhand der Bestimmung eines geeigneten Markers (hier MUC 18) zu ermöglichen. Die hier vorgestellte MUC 18 PCR wurde entsprechend der von Hoon et al. 1995 publizierten Methode mit der dort veröffentlichten Primersequenz durchgeführt. Die Komponenten und PCR-Bedingungen sind im Abschnitt »Material und Methoden« (S. 10ff.) genauer beschrieben.

Vorteile der PCR-Methode. Vorteile der PCR-Methode sind Sensitivität, Primer-Spezifität und die Möglichkeit einer automatisierten Analyse:

- *Sensitivität:* Die in dieser Arbeit verwendete RT-PCR-Methode zeichnet sich durch eine – im Vergleich zu anderen Methoden – sehr hohe Sensitivität aus. Theoretisch kann ein einziges Transkript aus der gesamten vorhandenen RNA nachgewiesen werden (Saiki et al.1988). Aufgrund der sehr variablen Effizienz der reversen Transkription setzt man in der Praxis jedoch die Nachweisgrenze bei 10 oder mehr Transkriptkopien an (Piatak et al. 1993). Die Methode ist um ein Vielfaches sensitiver als die Immunhistochemie (Brossart et al. 1995, Moreno et al. 1992, Smith et al. 1991), mit der eine Krebszelle unter 10^4–10^5 Zellen nachgewiesen werden kann. Die Immunhistochemie hat außerdem die Nachteile, dass die verwendeten Antikörper eventuell mit normalen Zellen kreuzreagieren und die Auswertung stark von der Erfahrung des Untersuchers abhängt (Datta et al. 1994). Dies ist von besonderem Interesse, da bisher zum Nachweis von MUC 18 auf Melanomzellen fast ausschließlich monoklonale Antikörper verwendet wurden.
- *Primer-Spezifität:* Die RT-PCR-Methode kann durch Modifikation der Reaktionsbedingungen, wie z.B. der Annealingtemperatur und Magnesiumkonzentration, für die jeweils verwendeten Primer maximal spezifiziert werden.
- *Automatisierte Analyse:* Außerdem eignet sich die PCR-Methode zur relativ schnellen, automatisierten Analyse einer großen Probenanzahl.

Gefahren der PCR-Methode. Gerade die hohe Sensitivität der Methode birgt auch die Gefahr einer ungewollten *Kontamination.* Außerdem kann die illegitime Transkription, d.h., die auf sehr niedrigem Niveau ablaufende Transkription eines gewebespezifischen Genprodukts durch *unspezifische Zellen* durch die hohe Amplifikation zur Quelle falsch positiver Ergebnisse werden.

5.3 Literatur zum MUC-18-Nachweis

Mit der Expression von MUC 18 auf verschiedenen Geweben, vor allem aber auf Melanomzellen, sowie dessen Bedeutung als potenzieller Marker für Tumorprogression und Prognoseverschlechterung haben sich in der Literatur zahlreiche Autoren auseinandergesetzt.

Sers et al. 1993. Sers et al. wiesen MUC 18 auf verschiedenen Melanomzelllinien, ferner auf Neuroblastom- und Glioblastomzelllinien nach. Dagegen zeigten B-Lymphoblastoid-, Kolonkarzinom- und Neurogliomzelllinien negative Ergebnisse. Die Autoren postulieren, MUC 18 sei kein Melanomzellen-spezifisches Antigen.

Lehmann et al. 1989. Lehmann et al. berichten, die Expression von MUC 18 auf Melanomzellen stehe in linearer Korrelation zum vertikalen Tumordurchmesser.

Rummel et al. 1996. Rummel et al. konnten MUC 18 auch auf Kolonkarzinom-, Brustkrebs- und Zervixkarzinomzelllinien nachweisen, hingegen nicht auf T-/B-Lymphoplasmoidzelllinien. In den genannten Arbeiten wurden monoklonale Antikörper zum Nachweis von MUC 18 verwendet.

In weiteren Arbeiten wurde MUC 18 auf glatten Muskelzellen und Endothelien von Blutkapillaren, sowie Tumorgefäßen gefunden (Sers et al. 1994).

Hoon et al. 1995. Hoon et al. berichten, dass durch Verwendung einer Multimarker-PCR (Tyrosinase, MUC 18, p97 und MAGE 3) zum Nachweis zirkulierender Melanomzellen die Sensitivität im Vergleich zur Verwendung von nur einem Tumormarker gesteigert werden kann, da Tumorzellen heterogen in der Genexpression sind. Dabei war MUC 18 allerdings auch bei einigen gesunden Probanden positiv.

Curry et al. 1998. Curry et al. modifizieren diese Untersuchungen und verwenden MART-1 und Tyrosinase, wobei gp 100, p97 und MUC 18 nicht mehr verwendet

wurden, nachdem sie, ebenso wie bei Hoon et al., auch bei gesunden Probanden positive Resultate erbrachten.

Schittek et al. 1999. Auch Schittek et al. konnten MUC 18 im Blut von nicht am malignen Melanom erkrankten Personen nachweisen.

5.4 Diskussion der eigenen Ergebnisse

In verschiedenen Publikationen wird über den Nachweis von im Blut zirkulierenden Melanomzellen mittels RT-PCR und der Korrelation dieses Befundes mit dem klinischen Stadium bzw. der Progressionstendenz der Erkrankung berichtet. Die hier vorgestellte Studie untersucht den prognostischen Wert des Tumormarkers MUC 18 bezogen auf das klinische Stadium und das Überleben der Patienten. Dabei soll auch auf die Aufarbeitungsmodalitäten der untersuchten Proben und Interferenzen mit der Menge und Reinheit der extrahierten RNA als mögliche Einflussfaktoren eingegangen werden.

5.4.1 Stadienabhängigkeit der positiven MUC 18 PCR

Patientendaten. In den erhobenen Daten von 187 Patienten lässt sich bezüglich des Auftretens eines positiven MUC-18-PCR-Ergebnisses in Korrelation mit dem klinischen Stadium der Erkrankung keine eindeutige Stadienabhängigkeit nachweisen (Abb. 4, S. 33). Es war dabei von untergeordneter Bedeutung, ob die Ergebnisse der Gesamtproben (n = 256; Abb. 4A) oder nur die Ergebnisse der Erstabnahmen (n = 187; Abb. 4B) berücksichtigt wurden.

- Man kann in der *Outer PCR* eine leicht steigende Tendenz positiver Ergebnisse hin zu höheren Krankheitsstadien verzeichnen.
- Die Ergebnisse der *Inner PCR* zeigen uneinheitliche Resultate, sodass eine Stadienabhängigkeit nicht nachweisbar ist.

- Bemerkenswert ist sowohl in der Outer PCR als auch in der Inner PCR eine Abnahme *positiver Resultate im klinischen Stadium III,* für die keine Erklärung gefunden werden konnte.
- Auffallend ist weiterhin der hohe Prozentsatz der *MUC-18-positiven Proben* in der Inner PCR, der in den einzelnen Stadien zwischen 88% und 96% für die Gesamtproben und 88% und 97% für die Erstabnahmen liegt. Diese Zahlen übertreffen die von Hoon et al. (Hoon et al. 1995) veröffentlichen Daten, bei denen MUC 18 in 72% der getesteten Proben nachweisbar war und sie liegen höher als die bisher veröffentlichten Zahlen. Dies kann eventuell durch die unterschiedliche Aufarbeitung der Blutproben, wie im nachfolgenden Abschnitt erläutert, zurückgeführt werden.

5.4.2 RNA-Präparation

Beeinflussung der Ergebnisse. Sowohl die unterschiedliche Aufarbeitung der Blutproben als auch die RT-Reaktion beeinflussen die Ergebnisse. Dies kann teils als Begründung für die unterschiedlichen Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen bei Verwendung desselben Markers angesehen werden (Buzaid et al. 1996, Schittek et al. 1999).

Methode der RNA-Extraktion. In der vorliegenden Arbeit wurde die RNA nach vorheriger Erythrozytenlyse extrahiert. Bei der Extraktion der RNA wurde die Eigenschaft des Guanidiniumthiozyanats genutzt, Zellen zu lysieren und RNAsen zu inhibieren. Aus dem DNA, RNA, Lipide und Protein enthaltenden Lysat kann die RNA entweder durch Ultrazentrifugation isoliert oder aber durch Phenol-Extraktion im sauren Milieu gewonnen werden (Chomczynski u. Sacchi 1987).

RNA-Extraktion in der Literatur. In den bisher veröffentlichten Arbeiten zur MUC 18 PCR wurde entweder Vollblut verwendet (Curry et al. 1998) oder die Lymphozytenfraktion nach Ficoll-Gradientenzentrifugation extrahiert (Hoon et al. 1995). Bei der *Vollblutmethode* muss die potenzielle Proteinverunreinigung der RNA durch Porphyrine als nachteilig angesehen werden. Die *Ficoll-Gradienten-*

zentrifugation ist mit einem hohen zeitlichen Arbeitsaufwand pro Einzelprobe behaftet. Allerdings weisen Schittek et al. in einer Arbeit zur Standardisierung der RT-PCR beim malignen Melanom nach, dass die Ficoll-Gradientenzentrifugation sowohl die höchste Sensitivität, als auch die höchste Reproduzierbarkeit aufweist, gefolgt von der Lysemethode. Die geringste Sensibilität weist hierbei die Vollblutmethode auf (Schittek et al. 1999).

5.4.3 RNA-Ausbeute

Extraktionsmethode. Die Methode der Extraktion beeinflusst die Menge der gewonnenen RNA. Bei der hier angewendeten Methode lag der Median der extrahierten RNA bei 9 µg pro 2,7 ml EDTA-Blut (Tab. 6, S. 36), vergleichbar mit der von Schittek et al. (Schittek et al. 1999). Auffallend war die geringere Ausbeute im Stadium IV mit einem Median von 7,12 µg pro Blutprobe. Dies ist mit hoher Wahrscheinlichkeit darauf zurückzuführen, dass die Proben dieser überwiegend stationären Patienten auf Station durchschnittlich eine Stunde früher abgenommen wurden, als dies bei den ambulanten Patienten der niedrigeren klinischen Stadien der Fall war. Zudem wurden sie bei Raumtemperatur gelagert. Infolge der längeren Lagerung ist daher schon vor Probenaufbereitung ein Teil der RNA degeneriert. Setzt man die unteren Grenzwerte zum positiven MUC-18-Nachweis ins Verhältnis, so kann man den Trend erkennen, dass das positive Ergebnis der MUC 18 PCR mit steigenden unteren Grenzwerten ansteigt. Es ist daher zu vermuten, dass infolge der geringeren Ausbeute der RNA in Stadium IV der Anteil an positiven Proben niedriger liegt als dies bei sofortiger Verarbeitung der Proben der Fall gewesen wäre und die Gesamtmenge der RNA eventuell Einfluss auf das Ergebnis der MUC 18 PCR hat. Dabei ist allerdings zu beachten, dass der Einfluss der Gesamtmenge der RNA in der weiteren Verarbeitung durch Standardisierung der verwendeten RNA-Menge pro RT-Ansatz nivelliert wurde.

RNA-Ursprung. Die extrahierte RNA stammt zum überwiegenden Teil nicht aus Melanomzellen, sondern aus den im Blut hauptsächlich zirkulierenden Leuko-

zyten. So ist bei höherem RNA-Gehalt ein »Verdünnungseffekt« durch ein höheres Leukozyten-Melanomzellen-Verhältnis anzunehmen. Da bei höheren RNA-Mengen die Anzahl MUC-18-positiver Proben steigt, weist dies ebenfalls, wie im Folgenden bei der Diskussion der Ergebnisse weiter ausgeführt, auf eine Expression dieses Markers von Nicht-Melanomzellen hin. Wird für die Auswertung ausschließlich die Erstprobe der Patienten verwendet (n = 187), so ergibt sich kein weiterer Erkenntnisgewinn.

5.4.4 Reinheit der RNA

Neben der Ausgangsmenge der extrahierten RNA kann auch der Reinheitsgrad des erhaltenen Produkts die Ergebnisse der PCR beeinflussen.

Reinheitsfaktor. Der Reinheitsfaktor, d.h. der Grad der Proteinverunreinigung jeder einzelnen Probe, wurde photometrisch anhand des Ratio (260/280) bestimmt. Er erwies sich als relativ konstant in allen klinischen Stadien (Tab. 9, S. 40) und bewegte sich in Bereichen, in denen die Proteinverunreinigung vernachlässigt werden kann. Die Mediane lagen zwischen 1,5 und 1,64, die ersten Quartilen zwischen 1,38 und 1,45, die dritten Quartilen zwischen 1,72 und 1,83.

Lagerungszeit. Die längere Lagerungszeit hatte keinen Einfluss auf den Reinheitsfaktor, da der Grad der Proteinverunreinigung sich durch Lagerung nicht ändert.

Stadienunabhängige Beurteilung. Werden nun die Ergebnisse durch Einteilung unterer Grenzwerte geordnet und in den jeweiligen Gruppen der Anteil MUC-18-positiver Ergebnisse beurteilt, so fällt bei der stadienunabhängigen Betrachtung ein gegenläufiger Trend in der Outer und Inner PCR auf (Abb. 6, S. 41): Während bei der Outer PCR die positiven Ergebnisse bei niedrigeren Werten für den Reinheitsfaktor eher ansteigen, ist bei der Inner PCR eine entgegengesetzte Tendenz sichtbar. Generell sind die Unterschiede aber nicht sehr ausgeprägt, sodass – möglicherweise durch die insgesamt befriedigenden Ergebnisse hinsichtlich des Ratio

(260/280) – von einer zu vernachlässigenden Beeinflussung des PCR-Ergebnisses ausgegangen werden kann.

5.4.5 Prognose in Abhängigkeit der MUC-18-PCR-Reaktivität

Ergebnis. Die in Abschnitt 0, S. 42f. des Ergebnisteils vorgestellten Befunde bezüglich des rezidivfreien Überlebens in Stadium III bzw. des Gesamtüberlebens in Stadium IV deuten sowohl für die Resultate der Outer PCR, als auch der Inner PCR darauf hin, dass MUC-18-Reaktivität wider Erwarten mit einer besseren Prognose verbunden ist. Die Patienten, in deren Blut der Marker nachgewiesen werden konnte, hatten wie in den Abb. 7–10 dargestellt ist, eine niedrigere Rezidivrate und in Stadium IV eine bessere Prognose quoad vitam.

Einschränkung. Einschränkend muss darauf hingewiesen werden, dass die Gruppengröße der untersuchten Kollektive stark schwankt und zum Teil zu klein ist, um eindeutige Aussagen machen zu können. Besonders klein war das Kollektiv der MUC-18-negativen Gruppe der Inner PCR im klinischen Stadium IV (2 Patienten). Außerdem müssen bei einer solchen prospektiv angelegten Untersuchung zusätzlich längere Nachbeobachtungszeiträume erfasst werden, bevor der prognostische Wert und die Aussagekraft des Markers abschließend bewertet werden können.

Bewertung. MUC 18 wurde als Einzelmarker zum Nachweis oder zur prognostischen Beurteilung des malignen Melanoms laut den Angaben in der Literatur nicht untersucht. Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit ist die prognostische Aussagekraft des Markers, untersucht mittels RT-PCR, zweifelhaft. Der hohe Anteil MUC-18-positiver Proben auch bei gesunden Probanden legt die Vermutung nahe, dass der Marker außer von Melanomzellen auch von anderen Bestandteilen des Blutes exprimiert wird und daher als unspezifisch bewertet werden muss. Inwieweit die Reaktivität von MUC 18 mit der Prognose korreliert, kann hier nicht abschließend beantwortet werden. Im Gegensatz zu den Veröffentlichungen, auf die in Abschnitt 5.3, S. 52 näher eingegangen wird, konnten wir

nicht bestätigen, dass das Auftreten von MUC 18 mit Tumorprogression verbunden ist, sondern schließen uns den Ergebnissen von Curry et al. an, der MUC 18 als nicht spezifisch klassifiziert.

5.4.6 Blutproben gesunder Spender

Es wurde eine MUC 18 PCR an Blutproben von 15 gesunden Spendern durchgeführt, 14 von 15 der Proben zeigten wiederholt positive Ergebnisse. Die Negativkontrolle war stets negativ und die positive Kontrollprobe von SK-Mel 28 stets positiv, sodass falsch positive Ergebnisse durch Kontamination ausgeschlossen werden können. Angesichts der hohen Anzahl positiver Proben wurde die PCR mit niedrigerer Zyklenzahl als Kontrolle durchgeführt, wobei sich das Ergebnis nicht änderte. Wie bereits oben aufgeführt, kann MUC 18 auch auf anderen Geweben nachgewiesen werden (Sers et al. 1994).

MUC 18 im Blut gesunder Personen. Sowohl Hoon et al. (Hoon et al. 1995) als auch Curry et al. (Curry et al. 1998) und Schittek et al. (Schittek et al. 1999) berichten über den Nachweis von MUC 18 im Blut von gesunden Personen. In der Studie von Curry et al. führt dies zum Ausschluss des Markers wegen mangelnder Spezifität und somit Quelle falsch positiver Ergebnisse. Die Reaktionsbedingungen und Primersequenzen wurden dabei verschieden modifiziert, um die Spezifität zu erhöhen.

Pseudogene. Bostick et al. sehen eine Erklärung hierfür eventuell in der Expression von Pseudogenen der gesuchten mRNA durch normale Zellen, wie z.B. bei Cytokeratinen und Globulinen beschrieben. Pseudogene sind Gene, die im Laufe der Evolution durch Mutationen verändert wurden und bis zu einem gewissen Prozentsatz mit dem gesuchten Gen in der Sequenz übereinstimmen. Diese Pseudogene sind funktionsunfähig. Auch mRNA-spezifische Primer können an die Pseudogensequenz hybridisieren (Bostick et al. 1998). Pseudogene können durch Sequenzierung unterschieden werden.

Illegitime Transkription. Als Erklärungsmöglichkeit könnte auch die von Chelly et al. (Chelly et al. 1988, 1989) postulierte These der illegitimen Transkription dienen, wonach alle, auch zellspezifische Gene in jedem Zelltyp nachgewiesen werden können. Dies erfolgt in sehr geringem Umfang (sehr geringe Transkriptzahl) und ist zu gering, um immunhistochemisch nachgewiesen zu werden, verfälscht aber PCR-Ergebnisse (Schoenfeld et al. 1994).

Geringe MUC-18-Spezifität. Da in dieser Arbeit nur eine qualitative und keine quantitative RT-PCR durchgeführt wurde und wie beschrieben, die RT-PCR auch geringe Mengen an mRNA nachweist, können Nicht-Krebszellen, die den Marker auf niedrigerem Niveau exprimieren, nicht eindeutig von Krebszellen unterschieden werden. Eine Multimarker-PCR könnte als »semiquantitative« Methode angesehen werden, um die Spezifität zu verbessern. Abschließend kann die Frage nach der quantitativ unterschiedlichen Expression aber nur durch eine quantitative RT-PCR geklärt werden. Unsere Studie bekräftigt die von Curry postulierte These, dass MUC 18 als alleiniger Marker einer qualitativen PCR falsch positive Ergebnisse liefert. Es muss angenommen werde, dass MUC 18 auch von Zellkomponenten, die im Blut gesunder Personen zirkulieren, exprimiert wird. Zu denselben Ergebnissen kommt Brouwenstijn, der den Melanommarker gp 100 untersucht und einen Vergleich zu den durch Western blot erhaltenen Ergebnisse zieht. Auch hier führte der Nachweis mittels RT-PCR zu einer Expression des Markers auf Nicht-Melanomzellen und zu einem Verlust der Spezifität im Vergleich zu den Western-blot-Ergebnissen (Brouwenstijn et al. 1997).

Schlussfolgernd stellt sich der MUC-18-Nachweis im Blut von Melanompatienten als Methode dar, die weder mit dem klinischen Stadium der Erkrankung noch mit der Tumorprogression korreliert und sich wegen der hohen Rate »falsch« positiver Ergebnisse nicht zur Routinekontrolle in der Nachsorge von Melanompatienten eignet.

6 Zusammenfassung

Problematik. MUC 18 ist ein Glykoprotein, das sowohl auf Melanomzellen als auch auf Zellen anderer Gewebe nachgewiesen werden kann. In der Literatur wurde der Nachweis von MUC 18 hauptsächlich mit monoklonalen Antikörpern geführt. In den bisher veröffentlichten Arbeiten, in denen der Nachweis mittels einer RT-PCR durchgeführt wurde, ist die Aussagekraft des Markers eher zweifelhaft. So wurde wiederholt über das Vorhandensein von MUC 18 auch bei gesunden Probanden berichtet, sodass seine Spezifität mittlerweile als nicht sehr hoch eingeschätzt wird.

Gegenstand und Methode dieser Arbeit. In dieser Arbeit wurde die MUC-18-Reaktivität im Blut von Melanompatienten sowie von gesunden Spendern sowie die prognostische Aussagekraft eines positiven Ergebnisses mittels einer RT-PCR-Methode untersucht. MUC 18 wurde hierbei als Einzelmarker verwendet. Es wurden 256 Blutproben von 187 Melanompatienten und 15 Blutproben von gesunden Probanden untersucht. Die RNA wurde nach Erythrozytenlyse und Aufarbeitung nach der von Chomczynski et al. 1987 veröffentlichten Methode gewonnen. Der so erzielte RNA-Anteil betrug im Median 9 µg pro 2,7 ml Blut. Der photometrisch bestimmte Reinheitsfaktor lag im Median bei 1,55.

Ergebnisse für Outer und Inner PCR. Bei Betrachtung der Gesamtresultate war bei der Outer PCR ein leicht ansteigender Trend positiver Ergebnisse in höheren klinischen Stadien zu verzeichnen, während die Ergebnisse der Inner PCR bei einem insgesamt sehr hohen Anteil an positiven Ergebnissen keine entsprechende Tendenz erkennen ließen. Die Untersuchung der gesunden Probanden ergab 14 (von 15) positive Ergebnisse für die Inner PCR.

Prognostische Ergebnisse. Wird MUC 18 im Zusammenhang mit rezidivfreiem Überleben betrachtet, so zeigt sich ein Trend dahingehend, dass das Vorhandensein von MUC 18 eher mit längerer Rezidivfreiheit einhergeht. Diese Aussage lässt

sich auch bei Betrachtung des Gesamtüberlebens im Stadium IV machen, wobei das Auftreten des Markers mit längerem Überleben verbunden ist.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der hier vorgestellte Marker in hohem Prozentsatz im Blut von Melanompatienten aller Stadien und auch bei Gesunden nachgewiesen werden kann, sodass davon ausgegangen werden muss, dass MUC 18 nicht spezifisch von Melanomzellen exprimiert wird.
Die hier vorgestellte Tendenz, dass das Vorkommen von MUC 18 mit besserer Prognose vergesellschaftet ist, bedarf weiterer Untersuchungen.
Insgesamt halten wir eine MUC 18 PCR als Routinetest zum Nachweis von zirkulierenden Melanomzellen im Blut von Melanompatienten im Bereich der Nachsorge als nicht geeignet.

7 Literaturverzeichnis

1 Balch CM, Soong SJ, Milton GW, Shaw HM, McGovern VJ, Murad TM, McCarthy WH, Maddox WA: A comparison of prognostic factors and surgical results in 1786 patients with localized (stage I) melanoma treated in Alabama, USA and New South Wales, Australia. Ann Surg 196, 677–684 (1982)

2 Balch CM, Soong SJ, Shaw HM: A comparison of worldwide melanoma data. In: Balch CM, Milton GW, Shaw HM, Soong SJ (eds.) Cutaneous melanoma: clinical management and treatment results worldwide (ed 1). Lippincott, Philadelphia, 507–518 (1985)

3 Bani MR, Janusz R, Adachi D, Wiltshire R, Trent JM, Kerbel RS, Ben-David Y: Multiple features of advanced melanoma recapitulated in tumorigenic variants of early stage (radial growth phase) human melanoma cell lines: Evidence for dominant phenotype. Cancer Res 56, 3075–3086 (1996)

4 Bastida E: The metastatic cascade: Potenzial approaches for the inhibition of metastasis. Semin Thromb Hemost 14, 66–72 (1988)

5 Berwick M: Epidemiology. Current trends, risk factors and environmental concerns. In: Balch CM, Houghson AN, Sober AJ, Soong S-J (eds.) Cutaneous melanoma: clinical management and treatment results worldwide (ed 3). Quality Medical Publishing, Inc. St. Louis, Missouri, 551–571,(1998)

6 Boring CC, Squires TS, Tong T, Montgomery S: Cancer statistics, 1994. CA Cancer J Clin 44, 7–26 (1994)

7 Breslow A: Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. Ann Surg 172, 902–908 (1970)

8 Brossart P, Schmier JW, Krüger S, Willhauk M, Scheibenbogen C, Möhler T, Keilholz U: A polymerase chain reaction-based semiquantitative assessment of malignant melanoma cells in peripheral blood. Cancer Res 55, 4065–4068 (1995)

9 Brouwenstijn N, Slager EH, Bakker ABH, Scgreurs MWJ, Van den Spek CW, Adema GJ, Schrier PI, Figdor CG: Transcription of the gene encoding melanoma-associated antigen gp 100 in tissues and cell lines other than those of the melanocytic lineage. Br J Cancer 76, 1562–1566 (1997)

10 Büttner P, Garbe C, Bertz J, Burg G, d´Hoedt B, Drepper H, Guggenmoos-Holzmann I, Lechner W, Lippold A, Orfanos CE, Peters A, Rassner G, Stadler R, Stroebel W: Primary cutaneous melanoma. Cancer 75, 2499–2506 (1995)

11 Buzaid AC, Balch CM: Polymerase chain reaction for detection of melanoma in peripheral blood: too early to assess clinical value. J Natl Cancer Inst 88, 569–570 (1996)

12 Carey TE, Takahashi T. Resnick LA, Oettgen HF, Old LJ: Cell surface antigens of human malignant melanoma: Mixed hemadsorption assays for humoral immunity to cultured autologous melanoma cells. Proc Natl Acad Sci USA 73, 3278–3282 (1976)

13 Chelly J, Concordet JP, Kaplan JK, Kahn A: Illegitimate transcription: Transcription of any gene in all cell type. Proc Natl Acad Sci 86, 2617–2621 (1989)

14 Chelly J, Kaplan JC, Pascal M, Gautron S, Kahn A: Transcription of the dystrophin gene in human muscle and non-muscle tissues. Nature 333, 858–860 (1988)

15 Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chlorophorm extraction. Anal Biochem 162, 156–159 (1987)

16 Clark WH: Tumor progression and the nature of cancer. Br J Cancer 64, 631–644 (1991)

17 Clark WH, Elder DE, Guerry D, Epstein MN, Greene MH, Van Horn MA: A study of tumor progression: the precurser lesions of superficial spreading melanoma and nodular melanoma. Hum Pathol. 15, 1147–1165 (1984)

18 Clark WH Jr, From L, Berbardino EA, Mihm MC: The histogenesis and biologig behavior of primary human malignant melanomas of the skin. Cancer Res 29, 705–726 (1969)

19 Cox NH, Aitchison TC, Sirel JM, MacKie RM: Comparison between lentigo maligna melanoma and other histogenetic types of malignant melanoma of the heat and neck. Br J Cancer 73, 940–944 (1996)

20 Curry BJ, Myers K, Hersey P: Polymerase chain reaction detection of melanoma cells in the circulation: relation to clinical stage, surgical treatment, and recurrence from melanoma. J Clin Oncol 16, 1760–1769 (1998)

21 Datta YH, Adams PT, Drobyski WR, Ethier SP, Terry VH, Roth MS: Sensitive detection of occult breast cancer by the reverse-transcriptase polymerase chain reaction. J Clin Oncol 12, 475–482 (1994)

22 Day CL Jr, Lew RA, Mihm Mc Jr, Sober AJ, Harris MN, Kopf AW, Fitzpatrick TB, Harrist TJ, Golomb FM, Postel A, Hennessey P, Gumport SL, Raker JW, Malt RA, Cosimi AB, Wood WC, Roses DF, Gorstein F, Riegel D, Friedman RJ, Mintzis MM, Grier RW: A multivariate analysis of prognostic factors for melanoma patients with lesions ≥ 3,65 mm in thickness. The importance of revealing alternative Cox models. Ann Surg 195, 44–49 (1982)

23 Denton, KJ, Strech JR, Gatter KC, Harris AL: A study of adhesion molecules as markers of progression in malignant melanoma. J Pathol 167, 187–191 (1992)

24 Edward M: Integrins and other adhesion molecules involved in melanocytic tumor progression. Curr Opin Oncol 7, 185–191 (1995)

25 Elder DE, Rodeck U, Thurin J, Cardillo F, Clark WH, Steward R, Herlyn M: Antigenic profile of tumor progression in human melanocytic nevi and melanomas. Cancer Res 49, 5091–5096 (1989)

26 Elwood JM, Koh HK: Etiology, epidemiology, risk factors and public health issues of melanoma. Curr Opin Oncol 6, 179–187 (1994)

27 Ercolani L, Florence B, Denaro M, Alexander M: Isolation and complete sequence of a functional human glycerinaldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene. J Biol Chem 30, 15335–15341 (1988)

28 Fidler IJ: Origin and biology of cancer metastasis. Cytometry 10, 673–680 (1989)

29 Fidler IJ: Metastasis: Quantitative analysis of distribution and fate of tumor emboli labeled with 125I-5-Iodo-2´-deoxyuridine. J Nat Cancer Inst 45, 773–782 (1970)

30 Franceschi S, La Vecchia C, Lucchini F, Cristofolini M: The epidemiology of cutaneous malignant melanoma: etiology and European data. Eur J Cancer Prev 1, 9–22 (1991)

31 Garbe C, Büttner P, Bertz J, Burg G, d´Hoedt B, Drepper H, Guggenmoos-Holzmann I, Lechner W, Lippold A, Orfanos CE, Peters A, Rassner G, Stadler R, Stroebel W: Primary cutaneous melanoma. Cancer 75, 2484–91 (1995)

32 Gloster HM, Brodland DG: The epidemiology of skin cancer. Dermatol Surg 22, 217–226 (1996)

33 Guerry D, Synnestvedt M, Elder DE, Schultz D: Lessions from tumor progression: The invasive radial growth phase of melanoma is common, incapable of metastasis, and indolent. J Invest Dermatol 100, 342–345 (1993)

34 Häffner AC, Garbe C, Burg, Büttner P, Orfanos CE, Rassner G: The prognosis of primary and metastasing melanoma. An evaluation of the classification in 2495 patients. Br J Cancer 66, 856–861 (1992)

35 Herlyn M, Clark WH, Rodeck U, Mancianti ML, Jambrosic J, Koprowski H: Biology of tumor progression in human melanocytes. Lab Invest 56, 461–474 (1987)

36 Holzmann B, Bröcker EB, Lehmann J, Ruiter DJ, Sorg C, Reithmuller G, Johnson J: Tumor progression in human malignant melanoma: Five stages defined by their antigenic phenotypes. Int J Cancer 39, 466–471 (1987)

37 Hoon DSB, Wang Y, Dale p. S, Conrad AJ, Schmid P, Garrison D, Kuo C, Foshag LJ, Nizze AJ, Morton DL: Detection of Occult Melanoma Cells in Blood with a Multiple-Marker Polymerase Chain Reaction Assay. J Clin Oncol 13, 2109–2116 (1995)

38 Juliano RL: Membrane receptors for extracellular matrix macromolecules: Relationship to cell adhaesion and tumor metastasis. Biochim Biophys Acta 907, 261–278 (1987)

39 Kramer M, Weber L, Proebstle TM: Epidemiologische Daten zum malignen Melanom im Einzugsbereich der Universitätshautklinik Ulm. Z Hautkr 71, 687–694 (1996)

40 Keilholz U, Willhauck M, Rimoldi D, Brasseur F, Dummer W, Rass K, de Vries T, Blaheta J, Voit C, Lethe B, Burchill S: Reliability of reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)-based assays for the detection of circulating tumour cells: a quality-assurance initiative of the EORTC Melanoma Cooperative Group. Eur J Cancer 34, 750–753 (1998)

41 Lee JAH: The current rapid increase in incidence of mortality from malignant melanoma in developed societies. Pigm Cell 2, 414–420 (1976)

42 Lehmann JM, Holzmann B, Breitbart EW, Schmiegelow P, Riethmüller G, Johnson JP: Discrimmination between benign and malignant cells of melanocytic lineage by two novel antigens, a glycoprotein with a molecular weight of 113,000 and a Protein with a molecular weight of 76000. Cancer Res 47, 841–845 (1987)

43 Lehmann JM, Riethmüller G, Johnson JP: MUC 18, a marker of tumor progression in human melanoma, shows sequence similarity to the neural cell adhesion molecules of the immunglobulin superfamily. Proc Natl Acad Sci USA 86, 9891–9895 (1989)

44 Mellado B, Colomer D, Castel T, Munoz M, Carballo E, Galán M, Mascaró JM, Vives-Corrons j. Ll, Grau j. JJ, Estapé J: Detection of circulating neoplastic cells by reverse-transcriptase polymerase chain reaction in malignant

melanoma: Association with clinical stage and prognosis. J Clin Oncol 14, 2091–2097 (1996)

45 Moreno JG, Croce CM, Fischer R, Monne M, Vikho P, Mulholland SG, Gomella L: Detection of hematogenous micrometastasis in patients with prostate cancer. Cancer Res 52, 6110–6112 (1992)

46 Morton DL, Davtyan DG, Wanek LA, Foshag LJ, Cochran AJ: Multivariate analysis of the relationship between survival and the microstage of primary melanoma by clark level and breslow thickness. Cancer 71, 3737–43 (1993)

47 Piatak M, Luk KC, Williams B, Lifson JD: Quantitative competitive polymerase chain reaktion for accurate quantitation of HIV DNA and RNA species. Biotechniques 14, 70–81 (1993)

48 Proebstle TM, Jiang W, Hogel J, Keilholz U, Weber L, Voit C: Correlation of positive RT-PCR for tyrosinase in peripheral blood of malignant melanoma patients with clinical stage, survival and other risk factors. Br J Cancer 82, 118–123 (2000)

49 Ruiter DJ, van Muijen GNP, van Nouhuys H, Ferrone S: Immunopathology of melanoma with monoclonal antibodies. In Ferrone S (Hrsg): Human Melanoma 1. Auflage Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 252–277 (1990)

50 Rummel MM, Sers C, Johnson JP: Phorbol ester and cyclic AMP-mediated regulation of the melanoma-associated cell adhesion molecule MUC 18/MCAM. Cancer Res 56, 2218–2223 (1996)

51 Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R; Horn GT, Mullis KB; Erlich HA: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239, 487–491 (1988)

52 Schittek B, Blaheta HJ, Florchinger G, Sauer B, Garbe C: Increased sensitivity for the detection of malignant melanoma cells in peripheral blood using an

improved protocol for reverse transcription-polymerase chain reaction. Br J Dermatol 141, 37–43 (1999)

53 Sers C, Kirsch K, Rothbächer U, Riethmüller G, Johnson JP: Genomic organization of the melanoma-associated glycoprotein MUC 18: Implications for the evolution of the immunglobulin domains. Proc Natl Acad Sci USA 90, 8514–8518 (1993)

54 Sers C, Riethmüller G, Johnson JP: MUC 18, a melanoma-progression associated molecule, and its potenzial role in tumor vascularization and hematogenous spread. Cancer Res 54, 5689–5694 (1994)

55 Shih LM, Elder DE, Hsu MY, Herlyn M: Regulation of Mel-Cam/MUC 18 expression on melanocytes of different stages of tumor progreesion by normal keratinocytes. Am J Pathol 145, 837–845 (1994)

56 Slominski A, Ross J, Mihm MC: Cutaneous melanoma: pathology, relevant prognostic indicators and progression. Br Med Bull 51, 548–569 (1995)

57 Smith B, Selby P, Southgate J, Pittman K, Bradley C, Blair GE: Detection of melanoma cells in peripheral blood by means of reverse transcriptase and polymerase chain reaction. Lancet 338, 1227–1229 (1991)

58 Watson JD, Gilman M, Witkowski J, Zoller M: Die Polymerasekettenreaktion. In: Watson JD, Gilman M, Witkowski J, Zoller M (Hrsg): Rekombinierte DNA. Spektrum Akademischer Verlag 71–88 (1993)

59 Yamaguchi M, Dieffenbach CW, Connolly R, Cruess DF, Baur W, Sharefkin JB: Effect of different Laboratory Techniques for Guanidinium-phenol-chlorophorm RNA extraction on A260/280 and on accuracy of mRNA quantitation by RT-PCR. PCR Methods Appl 1, 286–290 (1992)

Danksagung

Herrn Professor Dr. med. Weber danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit durchzuführen und für seine stetige freundliche Unterstützung bei der Durchführung und Niederschrift meiner Arbeit.

Frau Dr. med. Christiane Voit und Frau Dipl. biol. Frederike Braun möchte ich für die Anleitung und Hilfe sowohl bei der Durchführung als auch bei der schriftlichen Niederlegung dieser Arbeit und für die vielen Tipps und Anregungen danken.

Des Weiteren danke ich Frau Heidi Heinzel für die tatkräftige Unterstützung im Labor.

Frau Wen Yiang danke ich für die zur Verfügung Stellung der von Ihr gesammelten Blutproben.

Frau Dr. Krone von der Abteilung für Biomathematik danke ich für die Anregungen, den statistischen Teil dieser Arbeit betreffend.

Herrn Martin Kortenhaus möchte ich für die Hilfe bei der Ausarbeitung des Layouts danken.

Schließlich möchte ich meinen Eltern und Freunden danken, die durch Ihre stetige Unterstützung, Geduld und Verständnis erheblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Lebenslauf

Name:	Ivonne Alexandra Bedei
Geburtsdatum:	06.05.1973
Adresse:	Freihofstr. 57 73033 Göppingen Tel. 07161/685793

Beruflicher Werdegang

1979–1990:	Besuch der Grundschule und des Gymnasiums in Backnang
1990–1992:	Hellensteingymnasium in Heidenheim, 1992 Abitur
1992:	Beginn des Studiums der Humanmedizin Universität Ulm
1994/1995/1998	Physikum (Note: gut)/Erstes Staatsexamen (Note: gut)/Zweites Staatsexamen (Note: gut)
Nov. 1999:	Drittes Staatsexamen (Note: sehr gut)
Dez. 1999:	Beginn als ÄiP der Gynäkologie/Geburtshilfe, Klinik am Eichert, Göppingen

Absolvierte Praktika/Famulaturen

Feb. 1995:	Hafenkrankenhaus Hamburg: Chirurgie
Nov. ´95–Jan. ´96:	Hospital »Dr. Enrique Garces C.«, Quito: Intensivmedizin
Jan. ´96–März ´96:	Consultorio »Christo Vive«, Santiago de Chile
Aug. ´96–Sept. ´96:	Hospital del Seguro »Andrade Marin«, Quito: Innere Medizin, Gynäkologie
Juli ´97–Aug. ´97:	Kreiskrankenhaus Bad Oldesloe: Innere Medizin
Sept. ´97–Okt. ´97:	Praxis Dr. Dahl Stuttgart: Allgemeinmedizin/Gynäkologie

Praktisches Jahr

Okt. ´98–Jan. ´99:	Universidad del Valle/Cali, Kolumbien: Chirurgie
Jan. ´99–Mai ´99:	DAAD Stipendium an der Tufts University/Boston: Innere Medizin
Mai ´99–Sept. ´99:	Klinik am Eichert, Göppingen: Gynäkologie

Göppingen den 03. September 2000