

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
Abteilung Dermatoonkologie
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. T. Schwarz)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**KORRELATIONSBESTIMMUNG ZWISCHEN
POLYMORPHISMEN IM MC1-REZEPTOR GEN UND
SOMATISCHEN B-RAF UND N-RAS MUTATIONEN
AN PRIMÄRTUMORGEWEBE DES MALIGNEN MELANOMS**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Medizinischen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

FRANZISKA ULRIKE NORDSTRÖM

(geb. MEHNERT)

aus Helmstedt

Kiel 2010

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Hauschild

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung: 10.12.2010

Zum Druck genehmigt, Kiel den 10.12.2010

gez. Prof. Dr. Wiedow

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Das maligne Melanom - klinische und epidemiologische Aspekte	1
1.2. Risikofaktoren und Prädisposition	2
1.3. Klinik und Typeneinteilung	3
1.4. Pathogenese und genetischer Hintergrund	3
1.4.1. Tumorsuppressorgene	4
1.4.1.1. <i>P53</i> und seine Produkte	4
1.4.1.2. <i>Cyclin dependent kinase inhibitor 2A</i> und seine Produkte	5
1.4.2. RAS-RAF-MEK-ERK-Signalkaskade	6
1.4.3. Onkogene	7
1.4.3.1. <i>Ras</i> -Familie und die Produkte	7
1.4.3.2. <i>Raf</i> -Familie und die Produkte	8
1.4.4. <i>Melanocortin-1-Rezeptor</i> Gen	10
1.5. Ziel und Fragestellung der Arbeit	13
2. Patienten, Material und Methoden	14
2.1. Patienten	14
2.1.1. Ein- und Ausschlusskriterien	14
2.1.2. Dokumentation	14
2.2. Material	15
2.2.1. Gebrauchsmaterial	15
2.2.2. Verbrauchsmaterial	15
2.2.3. Geräte und Software	16
2.2.4. Chemikalien	16
2.2.5. Puffer	17
2.2.6. Molekularbiologische Reagenzien	17
2.2.7. Molekularbiologische Kits	17
2.2.8. Primer	18
2.2.9. Proben	18
2.3. Methoden	19
2.3.1. Entnahme des Primärtumors und Konservierung	19
2.3.2. Isolierung der genomischen Desoxyribonukleinsäuren	19
2.3.2.1. Schnitte	19

2.3.2.2.	Entparaffinierung.....	19
2.3.2.3.	Isolierung von DNA	19
2.3.2.4.	Bestimmung der Konzentration und Reinheit	21
2.3.3.	Untersuchung der Einzelnukleotidpolymorphismen in <i>MC1R</i> durch direktes Sequenzieren	22
2.3.3.1.	Polymerasenkettenreaktion zur Vervielfältigung der paraffinisierten und aufgereinigten DNA	22
2.3.3.2.	Gelelektrophorese zur Auftrennung von Nukleinsäuren.....	23
2.3.3.3.	Agarose-Gelelektrophorese	24
2.3.3.4.	ExoSAP-Verdau	25
2.3.3.5.	Direkte Sequenzierung zum Nachweis der Polymorphismen	25
2.3.3.6.	Sequenzierreaktion mit Big Dye® Terminator Cycle Kit.....	26
2.3.3.7.	Präzipitation	26
2.3.4.	Untersuchung von somatischen Mutationen in <i>B-raf</i> und <i>N-ras</i> durch SSCP	27
2.3.4.1.	Single-Strand Conformation Polymorphism Analyse	27
2.3.4.2.	PCR mit radioaktiv markiertem Nukleotid-Mix	28
2.3.4.3.	Nicht-denaturierte Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE).....	29
2.3.4.4.	Direkte Sequenzierung zur Validierung der Mutationen	30
2.3.5.	Datenauswertung und statistische Methoden	31
2.3.5.1.	Datenauswertung der direkten Sequenzierung	31
2.3.5.2.	Statistische Auswertung	31
3.	Ergebnisse	33
3.1.	Charakteristika der untersuchten 90 Patienten	33
3.1.1.	Alters-, Geschlechtsverteilung und Mortalitätsdaten	33
3.1.2.	Histologie des Primärtumors	34
3.1.3.	Tumordicke nach Breslow.....	35
3.1.4.	Invasionslevel nach Clark	35
3.1.5.	Ulzeration	35
3.1.6.	Primärtumorstadium nach AJCC	35
3.1.7.	Lokalisation des Primärtumors.....	36
3.1.8.	Sentinel-Lymphknoten	36
3.1.9.	Fernmetastasen	37
3.1.9.1.	Metastasenfreies Überleben	37
3.1.9.2.	Überleben nach der Diagnose von Metastasen.....	38
3.2.	Qualitätsprüfung der verwendeten DNA.....	38

3.2.1.	Spektrophotometrische Konzentration und Reinheit der isolierten DNA.....	38
3.3.	Ergebnisteil der MC1R-Einzelnukleotidpolymorphismen.....	39
3.3.1.	Ergebnisse der Polymerase-Ketten-Reaktion und der Agarose-Gelelektrophorese.	39
3.3.2.	Sequenzieranalyse und Auswertung von MC1R.....	39
3.4.	Ergebnisteil der somatischen Mutationen	41
3.4.1.	Ergebnisse der SSCP-Analyse mit PAGE für B-raf, Exon 15	41
3.4.2.	Ergebnisse der SSCP-Analyse mit PAGE für N-ras, Exon 2.....	42
3.4.3.	Sequenzanalyse und Auswertung von B-raf, Exon 15.....	42
3.4.4.	Sequenzanalyse und Auswertung von N-ras, Exon 2	43
3.5.	Korrelation von MC1R-Einzelnukleotidpolymorphismen und somatischen B-raf und N-ras Mutationen.....	45
3.5.1.	Korrelation von MC1R und B-raf	45
3.5.2.	Korrelation von MC1R und N-raf	46
3.6.	Korrelation zwischen den klinischen Daten und MC1R bzw. B-raf.....	47
3.6.1.	MC1R bzw. B-raf und die Geschlechtsverteilung	48
3.6.2.	MC1R bzw. B-raf und die Mortalität	48
3.6.3.	MC1R bzw. B-raf und der Ulzerationsstatus	49
3.6.4.	MC1R bzw. B-raf und der Metastasenstatus.....	50
4.	Diskussion	52
4.1.	Klinische Patientencharakteristika	52
4.2.	Molekulargenetische Tumorgenese.....	54
4.2.1.	Variabilität im menschlichen Genom durch SNPs.....	55
4.2.2.	Kutanes malignes Melanom und die Risikobeziehung zu <i>MC1R</i>	55
4.2.3.	Zusammenhang zwischen MC1R-Polymorphismen und Mutationen in <i>B-raf</i> und <i>N-ras</i> Genen	58
4.2.4.	MC1R-Polymorphismen und das Auftreten von somatischen Mutationen in <i>B-raf</i> und <i>N-ras</i> Genen	61
4.2.5.	Einflüsse der MC1R Varianten bzw. B-raf Mutationen auf klinische Faktoren	64
5.	Zusammenfassung	66
6.	Literaturverzeichnis.....	68
7.	Anhang	80
7.1.	Tabellen.....	80
7.2.	Fragebogen, Case Report Form.....	89
8.	Danksagung.....	91
9.	Lebenslauf	93

Verzeichnis der Abkürzungen

A	Absorption
Abb.	Abbildung
AC	Adenylatzyklase
AJCC	American Joint Committee on Cancer
ALM	Akral-lentiginöses Melanom
APS	Ammoniumpersulfat
ARF	alternatives Spleissprodukt, alternate reading frame (p14)
AS	Aminosäure
BAX	Bcl-2-assoziiertes-X-Protein, proapoptotisches Protein
Bcl-2	antiapoptotisches Protein
bp	Basenpaar
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CDK	Cyclin dependent kinase
CDKN2A	Cyclin dependent kinase inhibitor 2A
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CHROMA	Consensus-based colouring of multiple alignments
CI	Konfidenzintervall
cm	Zentimeter
CpG-Insel	Cytosin-phosphatidyl-Guanosin-Insel
CREB	cAMP responsive element binding Protein
DCT	Dopachrome Tautomerase
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
d.h.	das heißt
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum (Heidelberg)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
E2F	Transkriptionsfaktor
ERK	Extracellular signal regulated kinase
<i>et al.</i>	und andere
F	Forward
g	Gramm
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
IL	Interleukin
JÜR	Jahresüberlebensrate
kb	Kilobasen
l	Liter
LDH	Laktatdehydrogenase
LK	Lymphknoten
LMM	Lentigo-maligna-Melanom
LOH	Verlust der Heterozygotie (loss of heterozygosity)
Kpt.	Kapitel
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
M	molar

M	Fernmetastase(n)
mA	Milliampère
MAP	Mitogen activated protein
MAP-Kinase	Mitogen activated protein kinase, MEK, Serin-Threonin-Kinase
MC1R	Melanocortin-1-Rezeptor
MDM2	Mouse double minute 2 Protein
MEK	MAP-Kinase, Extracellular signal regulated kinase kinase
mg	Milligramm
Min	Minute(n)
ml	Milliliter
MM	maligne(s) Melanom(e)
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mRNA	Messenger (Boten-) RNA
MW	Molekulargewicht
N	Lymphknoten
na	nicht amplifizierbar, keine Auswertung
NCBI	National Center of Biotechnology Information
NK	Negativkontrolle
nm	Nanometer
NMM	Noduläres malignes Melanom
NZN	Nävuszellnävus
OR	Odds Ratio
p	kurzer Arm eines Chromosoms
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PIP ₃	Phosphatidylinositol-Phosphats
PK	Positivkontrolle
pmol	Picomol
(p)T	Primärtumor
q	langer Arm eines Chromosoms
R	Reverse
Rb	Retinoblastom-Protein
RHC	Rote-Haar-Farbe-Varianten (red hair colour variants)
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Rotation (Umdrehungen) pro Minute
RTK	Rezeptor Tyrosin Kinase
s.	siehe
SNP	Single Nucleotide Polymorphism/ Einzelnukleotidpolymorphismus/-Variante
SOS	son of sevenless Homologue, Adaptormolekül
SSCP	Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis
SSM	Superfiziell spreitendes Melanom
Std.	Stunde(n)
Tab.	Tabelle
Tis	Primärtumor/Melanoma in situ
Tris	Tris(-hydroxymethyl)-aminomethan
TYR	Tyrosinase
TYRP1	Tyrosinase related protein 1
U	Unit (Enzymaktivitätseinheit) oder Umdrehungen

UCM	Nicht klassifizierbares Melanom (unclassified melanoma)
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumenanteil
w/v	Gewicht pro Volumenanteil
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

DNA-Basen

A	Adenin	C	Cytosin
G	Guanin	T	Thymin

Aminosäuren

C	Cystein	D	Asparaginsäure
E	Glutaminsäure	H	Histidin
I	Isoleucin	L	Leucin
M	Methionin	Q	Glutamin
R	Arginin	T	Threonin
V	Valin	W	Tryptophan

<u>Abbildungsverzeichnis:</u>	Seite
Abb. 1: Die Antwort von p14 ^{ARF} und p53 auf DNA-Schädigung	5
Abb. 2: Der RAS-RAF-MEK-ERK-Signalweg	8
Abb. 3: Der Pigmentierungsweg über MC1R	11
Abb. 4: Abfolge der DNA-Isolierung	20
Abb. 5: Schematische Darstellung der Vorgehensweise für die Genotypisierung des <i>MC1R</i> Gens und seine relevanten Polymorphismen	22
Abb. 6: Vereinfachte Darstellung der SSCP-Analyse	28
Abb. 7: Graphische Darstellung der Alters- und Geschlechtsverteilung in den jeweiligen Altersklassen bei Erstdiagnose des MM	34
Abb. 8: Verteilung der Melanomsubtypen des Primärtumors	35
Abb. 9: Übersicht über die Verteilung der jeweiligen AJCC-Stadien der 90 Patienten zu Beginn der Datenerhebung	36
Abb. 10: Überleben in Monaten nach der Erstdiagnose von Metastasen	38
Abb. 11: Darstellung der amplifizierten MC1R-Fragmente I-III	39
Abb. 12: Ausschnitt der Basenabfolge des sequenzierten DNA-Fragments II	40
Abb. 13: Ausschnitt eines B-raf-SSCP Autoradiogramm des 209bp-langen Fragments	42
Abb. 14: Ausschnitt von Basenabfolgen der einzelnen sequenzierten Stränge des <i>B-raf</i> Gens	43
Abb. 15: Ausschnitt von Basenabfolgen der einzelnen sequenzierten Stränge des <i>N-ras</i> Gens	44
Abb. 16: Graphische Darstellung der Verteilung der Mutationen im <i>B-raf</i> Gen von Trägern und Nicht-Trägern (Konsensus) der <i>MC1R</i> Varianten	46
Abb. 17: Graphische Darstellung der Verteilung der Mutationen im <i>N-ras</i> Gen von Trägern und Nicht-Trägern (Konsensus) der <i>MC1R</i> Varianten	47
Abb. 18: RAS-RAF-MEK-ERK-Signalkaskade in Melanomen	60

<u>Tabellenverzeichnis</u>	Seite
Tabelle 1a: TNM-Klassifikation des malignen Melanoms nach AJCC (2002)	80
Tabelle 1b: Stadieneinteilung beim malignen Melanom (AJCC 2002), klinisch und pathologisch	81
Tabelle 2: Subtypen des Melanoms	81
Tabelle 3a: Primer des <i>MC1R</i> Gens zur Amplifikation und direkten Sequenzierung	18
Tabelle 3b: Primer der <i>B-raf</i> und <i>N-ras</i> Gene zur radioaktiven Amplifikation und Sequenzierung	18
Tabelle 4: Reaktionsansatz für <i>MC1R</i> , Fragment I-III	82
Tabelle 5: PCR Konditionen zur Amplifikation des <i>MC1R</i> Gens	23
Tabelle 6: PCR-Standard-Programme für <i>MC1R</i>	83
Tabelle 7: ExoSAP-Verdau	83
Tabelle 8: Cycle Sequencing	83
Tabelle 9a: Reaktionsansatz für <i>B-raf</i> , Exon 15 und <i>N-ras</i> , Exon 2	83
Tabelle 9b: Reaktionsansatz für <i>B-raf</i> und <i>N-ras</i> , Sequenzierreaktion	84
Tabelle 10: SSCP-PCR-Standard-Programme für <i>B-raf</i> bzw. <i>N-ras</i>	84
Tabelle 11: Patientencharakteristika	85
Tabelle 12: Überleben	86
Tabelle 13: Verteilung der anatomischen Lokalisation des Primärtumors	36
Tabelle 14: Lokalisation der Metastasierung	37
Tabelle 15: Zusammenfassung der Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der DNA-Präparate	86
Tabelle 16: Zusammenfassung der Sequenzanalyse von <i>MC1R</i> aus der isolierten Tumor-DNA des Primärtumors	40
Tabelle 17: Zusammenfassung aller untersuchten <i>MC1R</i> -Einzelnukleotid- Polymorphismen der isolierten Tumor-DNA	41
Tabelle 18: Zusammenfassung der Sequenzanalyse von <i>B-raf</i> aus der isolierten Tumor-DNA des Primärtumors	43
Tabelle 19: Zusammenfassung der Sequenzanalyse von <i>N-ras</i> aus der isolierten Tumor-DNA des Primärtumors	44

Tabelle 20:	Darstellung der Häufigkeit des Konsensustyps bzw. der SNPs in <i>MC1R</i> und der Häufigkeit des Wildtyps bzw. der Mutation in <i>B-raf</i> nach Ausschluss der nichtamplifizierbaren Proben	45
Tabelle 21:	Verteilung der Mutations- und Polymorphismenhäufigkeiten	87
Tabelle 22:	Darstellung der Häufigkeit des Konsensustyps bzw. der SNPs in <i>MC1R</i> und der Häufigkeit des Wildtyps bzw. der Mutation in <i>N-ras</i> nach Ausschluss der nichtamplifizierbaren Proben	46
Tabelle 23:	Darstellung der Häufigkeit des Konsensustyps bzw. der SNPs in <i>MC1R</i> und der Häufigkeit des Wildtyps bzw. der Mutation in <i>B-raf</i> sowie die Geschlechtsverteilung innerhalb des Patientenkollektivs nach Ausschluss der nichtamplifizierbaren Proben	48
Tabelle 24:	Verteilung der Polymorphismen in <i>MC1R</i> und der klinischen Daten	88
Tabelle 25:	Verteilung der Mutationen in <i>B-raf</i> und der klinischen Daten	88
Tabelle 26:	Darstellung der Häufigkeit des Konsensustyps bzw. der SNPs in <i>MC1R</i> und der Häufigkeit des Wildtyps bzw. der Mutation in <i>B-raf</i> sowie die Verteilung des Mortalitätsstatus	49
Tabelle 27:	Darstellung der Häufigkeit des Konsensustyps bzw. der SNPs in <i>MC1R</i> und der Häufigkeit des Wildtyps bzw. der Mutation in <i>B-raf</i> sowie die Verteilung des Ulzerationsstatus	50
Tabelle 28:	Darstellung der Häufigkeit des Konsensustyps bzw. der SNPs in <i>MC1R</i> und der Häufigkeit des Wildtyps bzw. der Mutation in <i>B-raf</i> sowie die Verteilung des Metastasenstatus (M1)	51

1. Einleitung

1.1. Das maligne Melanom - klinische und epidemiologische Aspekte

Das maligne Melanom (MM), der schwarze Hautkrebs, stellt einen der aggressivsten Tumoren dar. Das MM nimmt seinen Ursprung in Veränderungen der pigmentbildenden (melaninbildenden) Zellen der Epidermis, den Melanozyten. Es macht ca. zwei Prozent aller bösartigen Neubildungen beim Erwachsenen aus und steht an 15. Stelle der tumorbedingten Todesursachen (Garbe et al., 2005). Neben der Hauptmanifestation an der Haut gibt es extrakutanen Auftreten an den Schleimhäuten, am Auge, an den Hirnhäuten oder an den inneren Organen (<10%). Das MM macht nur vier Prozent aller Hautkrebsarten aus, ist aber für eine Sterblichkeit von bis zu 90% aller Hautkrebsarten verantwortlich (Garbe et al., 2008). Ursache dafür ist seine Tendenz zur frühen Metastasierung in umgebende Lymphgefäße und -knoten bei verhältnismäßig geringer Primärtumormasse.

Rund 90% aller MM werden als Primärtumor ohne erkennbare Metastasierung diagnostiziert. Zu den wichtigsten prognostischen Faktoren im Primärtumorstadium ohne Metastasen zählen der maximale, vertikale Tumordurchmesser nach Breslow, der Invasionslevel nach Clark (Eindringtiefe in die anatomischen Schichten der Haut) und das Vorliegen einer Ulzeration (Clark et al., 1969, Breslow, 1970). Weitere ungünstige Prognosefaktoren stellen die männliche Geschlechtszugehörigkeit (Garbe et al., 1995a), die Tumorlokalisation am oberen Stamm, an den Oberarmen, am Hals und an der behaarten Kopfhaut dar (Garbe et al., 1995b, Balch et al., 2001).

Das MM kann primär lymphogen (ca. 80%) als auch primär hämatogen metastasieren. Meist findet die Erstmetastasierung in der Umgebung des Primärtumors statt. Bei Lymphknotenbefall sind Mikrometastasen (Nachweis durch Sentinel-LK-Biopsie, Dreijahresüberlebensrate 88,5%) und Makrometastasen (klinisch manifeste LK-Metastasen, Dreijahresüberlebensrate 55,8%) prognostisch bedeutsam (Gershenwald et al., 1999). Bei ca. 30% der Patienten treten Fernmetastasen, hauptsächlich in Lunge, Gehirn und Leber auf (Meier et al., 2002, Leiter et al., 2004). Die 10-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit verschlechtert sich nach Metastasierung deutlich. Bei Fernmetastasierung ist die Prognose zumeist infaust. Hier beträgt die 10-Jahres-Überlebensrate unter zwei Prozent bei einer medianen Überlebenszeit von lediglich sechs bis neun Monaten (Garbe et al., 2005).

In Deutschland treten 12 MM pro 100.000 Einwohner auf, wobei ein Großteil der Patienten zwischen dem 45. und 65. Lebensjahr erkrankt (Hauschild et al., 2003). Die Zahl der jährlichen Neuerkrankungen wird auf ca. 10.000 Fälle geschätzt (Garbe and Blum, 2001). Die weltweite Melanominzidenz hat in den vergangenen Jahrzehnten in der hellhäutigen

Bevölkerung dramatisch zugenommen (Garbe and Blum, 2001, Desmond and Soong, 2003). Sie stieg von drei auf sieben Prozent, so dass das MM die am schnellsten zunehmende Krebsart in der weißen Bevölkerung ist (Lin et al., 2008). Australien ist das Land mit den höchsten Inzidenzraten weltweit (50/100 000 Einwohner/Jahr) (Florez and Cruces, 2004).

Das fortgeschrittene MM zeichnet sich durch ein geringes Ansprechen auf Chemo-, Chemoimmun- und Strahlentherapie im Vergleich zu anderen Tumoren aus. Seit 1970 konnte die Langzeitüberlebensrate nicht signifikant verlängert werden (Edwards et al., 2005). Bis zum heutigen Zeitpunkt konnten randomisierte Studien kein Überlebensvorteil für ein bestimmtes Behandlungsregime im Vergleich aufzeigen (Eigentler et al., 2003). Hoffnung für die Zukunft geben neueste klinische Studien mit therapeutischen Ansätzen, die als „targeted therapy“ bezeichnet werden. Ansatzpunkte dieser Biologicals sind z.B. die Signal- und Regulationswege der Melanomzellen (Chin et al., 2006).

Die in der vorliegenden Untersuchung angewandte TNM-Stadieneinteilung nach dem American Joint Committee on Cancer (AJCC-Klassifikation, 2002) findet sich im Anhang (Balch et al., 2004) (s. Tab. 1).

1.2. Risikofaktoren und Prädisposition

Zu den wichtigsten Risikofaktoren zählen eine hohe Anzahl von Nävuszellnävi (NZN), das Vorhandensein von Melanomvorläufern (sog. dysplastischer Nävus, kongenital oder erworben), die verminderte Pigmentierungsfähigkeit der Haut (heller Hauttyp) und das vermehrte Auftreten von Sommersprossen (Melanocortin-1-Rezeptor bedingte Varianten) als konstitutionelle Risikoparameter (Bauer and Garbe, 2003, Wiecker et al., 2003). Bei 10% der Melanomfälle lässt sich eine positive Familienanamnese nachweisen, wobei ein polygener Erbgang verantwortlich gemacht wird (Greene et al., 1985). Neben diesen konstitutionellen Risikofaktoren nimmt die UV-Exposition als exogener Faktor eine zentrale Rolle ein (Wiecker et al., 2003). Die intermittierende Sonnenexposition mit wiederkehrenden Sonnenbränden ist dabei der wichtigste, umweltbedingte Risikofaktor (Elwood, 1996, Curtin et al., 2005). UV-Licht führt zu spezifischen Mutationen in zellulären Genen (p53 und Ras) (Van der Lubbe et al., 1988). Von Bedeutung sind außerdem immunologische Faktoren. So weist das MM signifikant erhöhte Inzidenzen bei Immunsupprimierten auf (Brockner and Becker, 1995).

1.3. Klinik und Typeneinteilung

Es gibt vier histologische Subtypen des primären MMs: Superfiziell-spreitendes Melanom (SSM), noduläres Melanom (NMM), Lentigo-maligna Melanom (LMM) und akral-lentiginöses Melanom (ALM). Seltenerer Formen sind amelanotische Melanome ohne Pigmentierung und extrakutane Melanome. Einige Typen lassen sich nicht klassifizieren oder sind Mischformen (UCM). Das SSM stellt mit 57% den häufigsten Subtyp aller MM bei Kaukasiern dar (Garbe and Leiter, 2009) (s. Tab. 2).

1.4. Pathogenese und genetischer Hintergrund

Die Pathogenese des MM weist genetische Heterogenität mit vielfältiger Ätiologie auf (Chin et al., 2006). Sie beruht auf zahlreichen Mechanismen und Wechselwirkungen, die bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht vollständig geklärt sind. Dabei sind Krebsbeginn und Krebsprogression mit genetischen Abweichungen in kritischen Genen assoziiert, die Bedeutung in der zellulären Regulation und beim Überleben haben. Grundlage der Melanomentstehung, also die maligne Transformation von normalen Zellen zu Tumorzellen und ihre Progression sind Summationen und Akkumulationen verschiedener genetischer Veränderungen (Evan and Vousden, 2001).

Das MM kann durch Erwerb somatischer Mutationen sporadisch auftreten oder im Rahmen eines familiären Melanomsyndroms (z.B. autosomal-dominant vererbtes atypisches Nävus-Syndrom) durch Vererbung von Keimbahnmutationen vorkommen. Beides kann durch Triggerung (Initiationsereignis, z.B. durch UV-Strahlung) die Ereigniswahrscheinlichkeit erhöhen.

Es kommen vor allem den Genen eine tragende Rolle zu, die die Proliferation, das Zellwachstum, die Differenzierung und den Zelltod (Apoptose) beeinflussen (Evan and Vousden, 2001). Es handelt sich dabei insbesondere um Mutationen, die zur Aktivierung von Onkogenen (Bishop, 1991) bzw. zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (Marshall, 1991) führen. Die resultierenden zytogenetischen Veränderungen manifestieren sich phänotypisch und können Selektionsvorteile für die veränderten Zellen gegenüber gesunden Zellen mit sich bringen.

Der Mechanismus der Onkogen-Aktivierung beinhaltet das Auftreten von Genamplifikation, -inversion und -mutation. Dabei sind die mutierten Onkogene gewöhnlich dominant. Tumorsuppressorgene sind in der Regel rezessiv. Sie werden überwiegend durch Punktmutationen oder homozygote Deletionen inaktiviert. Zusätzlich kann es zum Verlust der Expression von Tumorsuppressorgenen durch epigenetische Methylierung der CpG-Insel

(Cytosin-phosphatidyl-Guanosin-Insel) im Promotor kommen. Die Inaktivierung des Tumorsuppressorgens benötigt den Verlust beider Allele entsprechend der Knudson Hypothese (Knudson, 1971).

Zu den wichtigsten genetischen Veränderungen in der Pathogenese des MMs gehören bei den Onkogenen die aktivierenden Mutationen in der *Raf*- und *Ras*-Genfamilie bzw. bei den Tumorsuppressorgenen die Mutationen mit Funktionsverlust des *p53*-Gens und des *Cyclin dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2A)*-Gens (s. Kpt.1.4.1. & 1.4.3.).

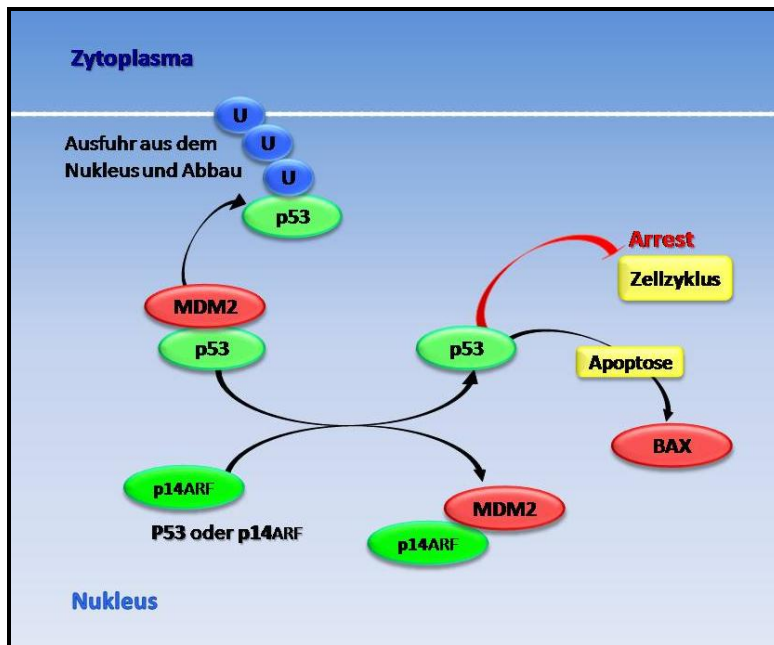
1.4.1. Tumorsuppressorgene

1.4.1.1. *P53* und seine Produkte

P53 ist auf dem Chromosom 17p lokalisiert und kodiert ein nukleäres Protein, den Transkriptionsfaktor p53 (Stretch et al., 1991, Basset-Seguin et al., 1993). Es lässt sich in der mutierten Form in mehr als 50% aller Tumore nachweisen (Toledo and Wahl, 2006). Das *P53*-Gen, auch „Wächter des Genoms“ genannt, übernimmt wichtige Funktionen in der Regulation des Zellzyklus (Efeyan and Serrano, 2007). Es sorgt für die Aufrechterhaltung der Integrität und Stabilität des Genoms einschließlich der DNA-Reparatur und der Steuerung, Einleitung und Kontrolle der Apoptose (Wang and Harris, 1996). Unter normalen (stressfreien) Zellbedingungen wird p53 durch das Mouse double minute 2 (MDM2) Protein gebunden. MDM2 ist eine Ligase, die p53 kontinuierlich abbaut, um das Konzentrationsniveau konstant zu halten. Bei zellulären Stresssituationen (z.B. Hypoxie) und DNA-Schäden (z.B. durch UV-Strahlen) wird p53 hingegen aktiviert (Ziegler et al., 1994, Graeber et al., 1996).

Es fördert die Expression des Adaptorproteins 14-3- σ und des Inhibitors p21^{Cip/Waf}. Beide führen zur Blockierung des Zellzyklus durch Bindung an Cyclin dependent Kinase-Komplexe und ermöglichen dadurch Reparaturen von geschädigter DNA (Harris and Levine, 2005). Es konnte sogar eine Unterdrückung des Tumorwachstums bei Überexpression von p21^{Cip/Waf} nachgewiesen werden (Gartel et al., 1996). Des Weiteren ist p53 ein Aktivator für apoptoseeinleitende Proteine (z.B. Bcl-2-assoziiertes Protein, BAX) und reguliert darüber den programmierten Zelltod (Miyashita and Reed, 1995) (s. Abb. 1 & 2).

P53-Mutationen sind beim MM relativ selten (5-25%) (Albino et al., 1994, Sparrow et al., 1995, Weiss et al., 1995). Jedoch korreliert das Auftreten der Mutationen mit Lokalisationen von Melanomen an sonnenexponierten Arealen, an Akren und an Schleimhäuten sowie mit der Tumordinvasionstiefe (Sparrow et al., 1995, Curtin et al., 2005).

Abbildung 1: Die Antwort von p14^{ARF} und p53 auf DNA-Schädigung

Modifiziert nach Miller und Mihm aus dem New England Journal of Medicine 2006 (355,51-65);
 U: Ubiquitierung mit Abbau im Proteosom.

1.4.1.2. Cyclin dependent kinase inhibitor 2A und seine Produkte

Cyclin dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2A) ist ein Gen, das auf Chromosom 9p21 lokalisiert ist und eine entscheidende Rolle in der Überwachung des Zellzyklus in Melanozyten einnimmt (Nobori et al., 1994). Zu den wichtigsten genetischen Veränderungen des Melanoms gehören familiär vermittelte Keimbahnmutationen im *CDKN2A*-Gen. Sie stellen den stärksten genetischen Risikofaktor für die Entwicklung eines Melanoms dar und finden sich zu 25 bis 50% beim familiären Melanom (*CDKN2A*-bedingtes familiäres atypisches Nävus-Syndrom) (Gibbs et al., 2002, Goldstein, 2004, Goldstein et al., 2007). Neben vererbten Keimbahnmutationen konnten Veränderungen im *CDKN2A*-Gen wie Punktmutationen, homozygote Deletionen oder Promotor-Methylierung auch beim sporadischen MM in ca. vier bis neun Prozent der Fälle gefunden werden (Monzon et al., 1998, Cachia et al., 2000, Straume et al., 2002). Diese sporadischen Mutationen zielen eher auf genetische Änderungen innerhalb von drei Hauptsignalwegen ab: der RAS-RAF-MEK-ERK-, der p16-RB- und der p14^{ARF}-p53-Signalweg (Dahl and Guldberg, 2007).

CDKN2A kodiert zwei Tumorsuppressorproteine, p16 und p14^{ARF} (alternate reading frame, alternatives Spleissprodukt), die den Zellzyklus inhibieren (Kamb et al., 1994, Nobori et al., 1994). P16 sorgt für eine Unterbrechung der Proliferation, insbesondere bei geschädigten und gealterten Zellen (Sharpless and Chin, 2003). Zellen mit inaktivem p16-Protein sind einer unkontrollierten Proliferation und erhöhten Mitoserate unterworfen. Der Verlust der p16-

Funktion ist mit einem fortgeschrittenen Stadium des sporadischen MM assoziiert (Straume et al., 2000, Pavey et al., 2002). Das Genprodukt p14^{ARF} übt seine Funktion indirekt über p53 aus (p14^{ARF}-p53-Kaskade). Es agiert mit dem MDM2 Protein, welches für den Abbau von p53 verantwortlich ist. Nach Bindung am MDM2 Protein löst sich dieses von p53 und verhindert den Abbau (Pomerantz et al., 1998, Miller and Mihm, 2006). Genveränderungen mit Verlust der CDK2A-Funktion sind besonders bei Melanomen der Schleimhäute und an den Akren (ALM) beschrieben worden (Curtin et al., 2005) (s. Abb. 1 & 2).

1.4.2. RAS-RAF-MEK-ERK-Signalkaskade

Signalübertragung in Melanomzellen

Das Zellsystem des menschlichen Organismus benötigt ein umfassendes Kommunikationssystem, damit komplizierte Vorgänge wie Wachstum, Differenzierung und Stoffwechsel koordiniert ablaufen können. Dafür verfügt es über verschiedene Möglichkeiten der Signalübermittlung an Rezeptoren (Liganden-gesteuerte Ionenkanäle, G-Protein-gekoppelte- oder Tyrosin-Kinase-Rezeptoren). Liganden wie Ionen, Hormone und Wachstumsfaktoren dienen als Signalmoleküle der interzellulären Kommunikation nach Bindung an spezifischen Rezeptorproteinen (Lodish and Darnell, 1996).

Die Rezeptor-Tyrosin-Kinase (RTK) nimmt in Melanomzellen bei der Übermittlung von Signalen eine Schlüsselrolle im Rahmen der RAS-RAF-MEK-ERK- (MEK: MAP-Kinase, Mitogen activated protein kinase kinase oder Extracellular signal regulated kinase kinase; ERK: Mitogen activated protein kinase oder Extracellular signal regulated kinase) Signalkaskade ein. Dabei binden Liganden an die RTK. Es resultiert eine Rezeptordimerisierung und eine Autophosphorylierung bestimmter Tyrosylreste am zytosolischen Teil des Rezeptors (Ullrich and Schlessinger, 1990), die dann als Bindungsstellen für intrazelluläre Adaptorproteine (SOS, son of sevenless Homologue) dienen (Cohen et al., 1995). Diese Adaptoren verbinden die aktivierten Rezeptoren mit der intrazellulären Signalkaskade.

Es konnte gezeigt werden, dass diese Signalkaskade bei der onkogenen Transformation in Melanozyten den Hauptbeitrag zur onkogenen Signalwirkung leistet (Satyamoorthy et al., 2003). In Melanozyten wird der RAS-RAF-MEK-ERK-Signalweg durch eine Vielfalt von Wachstumsfaktoren (z.B. basic fibroblast growth factor, acidic fibroblast growth factor, melanoma growth stimulatory activity, IL 6, 8 bzw. 10) stimuliert. Nach Bindung an die RTK initiieren sie eine Änderung der physiologischen Aktivität und des Genexpressionsmusters in Melanozyten. Entscheidend bei der Aktivierung sind Mutationen innerhalb des RAS-RAF-MEK-ERK-Signalwegs in den Onkogenen *B-raf* und *N-ras* (Satyamoorthy et al., 2003).

1.4.3. Onkogene

1.4.3.1. *Ras*-Familie und die Produkte

Zur humanen *Ras*- (Onko-) Genfamilie gehört das *N-ras* Gen, das auf Chromosom 1 lokalisiert ist (Marshall, 1985). Es kodiert für gleichnamige Proteine, die kleine, zellmembranassoziierte G-Proteine mit GTPase Aktivität sind (Macaluso et al., 2002, Malumbres and Barbacid, 2003). Diese stellen zentrale Proteine in der Signaltransduktion von der Zellmembran bis hin zum Zellkern dar, durch Verbindung der RTK mit der MAP-Kinasen-Kaskade und dienen der Weitergabe von extrazellulären Wachstumssignalen (Barbacid, 1987, Schubbert et al., 2007).

Infolge der Stimulation der RTK und des Einfluss der Adaptormoleküle wird aktiviertes Ras durch Austausch von GDP zu GTP gebildet. Die aktive GTP-gebundene Form, die mit hoher Affinität direkt oberhalb der Raf-Kinasen ansetzt, aktiviert indirekt die MAP-Kinase (= MEK1 bzw. MEK2) durch eine der drei Raf Serin-Threonin-Kinasen (A-raf, B-raf oder C-raf) (Kolch, 2000). Die genauen Mechanismen der Raf-Aktivierung durch Ras sind allerdings nicht vollständig identifiziert (Kerkhoff and Rapp, 2001). MEK triggert nachfolgend die Kinasen, ERK 1 und 2. Es entsteht ein Protein der Familie der Mitogen activated protein kinase (MAPK), welches in den Nukleus transloziert und zur Aktivierung einer Reihe von relevanten Transkriptionsfaktoren (z.B. Cyclin D1) führt (Geilen et al., 1997) (s. Abb. 2).

Bei einer Suppression des Onkogens *N-ras* in Melanomzellen resultiert eine gesteigerte Apoptose, eine Senkung der ERK-Phosphorylierung und eine Blockierung des Zellzyklus (durch verminderte Expression von Cyclin D1 über den Cyclin dependent Kinase-Komplex, CDK) (Hinds and Weinberg, 1994).

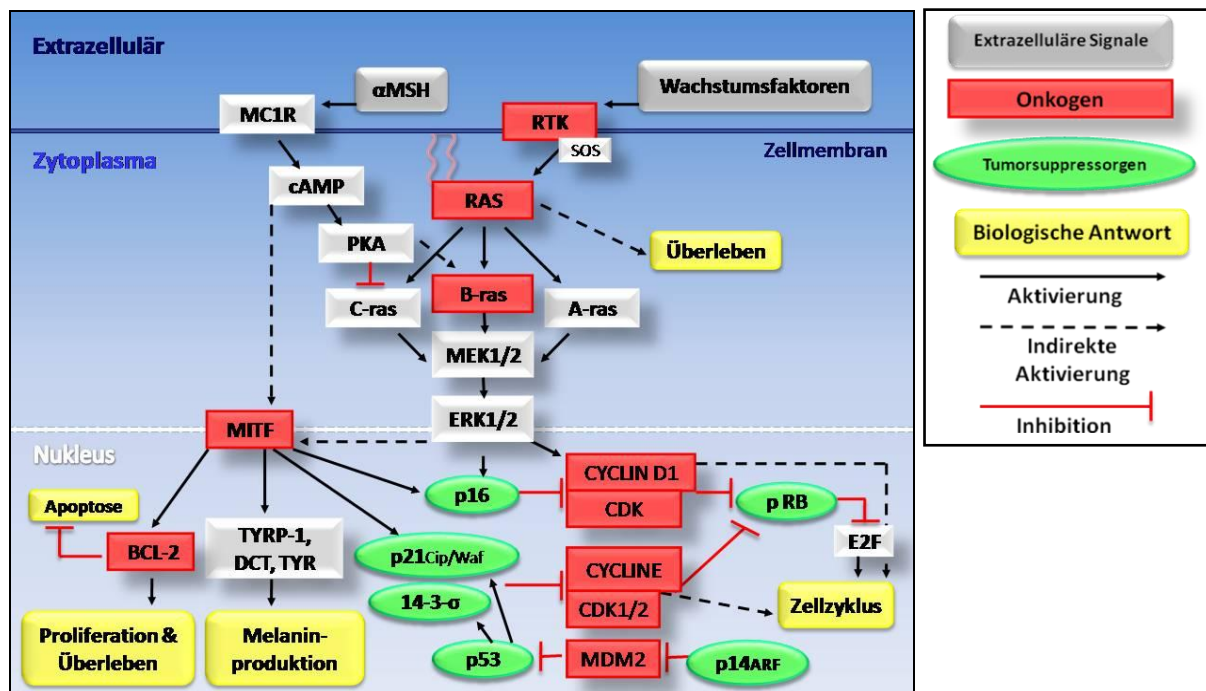
In Melanozyten ist vornehmlich *N-ras* durch Mutation funktionell aktiv (Albino et al., 1989, Platz et al., 1994, Busca et al., 2000, Demunter et al., 2001). Ras ist in humanen Tumoren das am häufigsten mutierte Onkogen. Punktmutationen von Ras wurden in bis zu 30% aller humanen Tumoren, inklusive der Primärmelanome und Melanommetastasen nachgewiesen (Ball et al., 1994, Demunter et al., 2001). Die häufigste Mutation erscheint in Exon 2 am Codon 61 (Omholt et al., 2002, Schubbert et al., 2007). Diese Mutation wurde bei ca. einem Drittel in kutanen MM nachgewiesen (Omholt et al., 2002). Sie erhöht die Affinität von Ras zu GTP und bewirkt, dass Ras im GTP-gebundenen aktivierten Zustand verbleibt (Bos, 1989). Zusammenfassend ergibt sich eine permanente Stimulierung der RAF-MEK-ERK-Kaskade mit Induktion des Zellzyklus bzw. Inhibition der Apoptose (Lin et al., 1998, Klint and Claesson-Welsh, 1999).

Untersuchungen durch ALBINO *et al.* (1989) konnten belegen, dass Mutationen mit aktivierten *Ras*-Genen in dysplastischen Nävi vorkommen. N-ras Mutationen erscheinen wahrscheinlich frühzeitig während der Melanomentstehung, beweisend durch hohe Mutationsraten in gewöhnlichen, erworbenen Nävi (10%) und in angeborenen Nävi (bis zu 50%).

DERMUNTER *et al.* (2001) zeigten, dass Mutationen im Exon 2 vorzugsweise mit einem fortgeschrittenen Stadium der Tumorprogression, mit einem höheren Clark-Level sowie einem höheren Diagnosealter assoziiert sind.

Im Gegensatz zu B-raf Mutationen, welche überwiegend in nicht chronisch sonneninduzierten Melanomen erscheinen, sind N-ras Mutationen vornehmlich in Melanomen von chronisch sonnenexponierten Hautarealen vorzufinden. Dies lässt vermuten, dass UV-Strahlen eine Rolle in der Formation von N-ras Mutationen im MM spielen (Omholt *et al.*, 2002). Mehrheitlich tritt die N-ras Aktivierung in der frühen Tumorgenese, d.h. in der frühen radialen Wachstumsphase auf und stellt einen Angriffspunkt für zukünftige Therapieansätze (z.B. Farnibe) dar (Omholt *et al.*, 2003).

Abbildung 2: Der RAS-RAF-MEK-ERK-Signalweg



Der RAS-RAF-MEK-ERK-Signalweg und sein Mitwirken in der Tumorgenese. Er beeinflusst viele Prozesse, die mit der Zellproliferation und dem Zellüberleben vergesellschaftet sind. Modifiziert nach Michaloglou *et al.* aus der Zeitschrift *Oncogene* 2008 (27, 877-95), E2F: Transkriptionsfaktor

1.4.3.2. Raf-Familie und die Produkte

Die *Raf*- (Onkogen-) Familie setzt sich aus drei funktionellen Genen zusammen, *A-raf*, *B-raf* und *C-raf*, die auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert sind (*A-raf* auf dem X-

Chromosom Xp11.2, *B-raf* auf Chromosom 7p34 und *C-raf* auf 3p25). Sie kodieren für drei Serin-Threonin-spezifische Kinasen, A-raf, B-raf und C-raf. Dabei ist B-raf mit der Melanom-entstehung vergesellschaftet (Barnier et al., 1995, Marais et al., 1997).

Die drei Raf-Serin-Threonin-spezifischen Kinasen sind in den RAS-RAF-MEK-ERK-Signalweg involviert, wobei die Kaskade in Melanozyten hauptsächlich durch B-raf aktiviert wird (Dumaz et al., 2006). B-raf weist die höchste basale Kinaseaktivität auf (Barnier et al., 1995, Marais et al., 1997). A-raf, B-raf und C-raf sind strukturell verwandte Raf Proteine.

B-raf enthält für die maximale Aktivierung des Proteins lediglich zwei Ras-abhängige Phosphorylierungsstellen (Chong et al., 2003). Dies stellt den entscheidenden Unterschied zu seinen strukturverwandten A-raf und C-raf Proteinen dar, die vier Aktivierungsstellen beherbergen.

Etliche Tumoren (Pankreasadeno-, kolonrektale-, Ovarial- oder Schilddrüsenkarzinome) sind mit Mutationen im *B-raf* Gen assoziiert (Davies et al., 2002). Durchschnittlich erscheinen B-raf Mutationen bei ca. sieben Prozent aller humanen Tumoren (Dhomen and Marais, 2007). Nach DAVIES *et al.* (2002) treten B-raf Mutationen besonders in MM mit einer höheren Frequenz im Vergleich zu anderen Tumoren auf und wurden in bis zu 66% nachgewiesen. Die meisten somatischen Mutationen sind in Exon 15 lokalisiert (Davies et al., 2002, Gorden et al., 2003, Omholt et al., 2003). Aus einer einzelnen Transversion (Thymin zu Adenin) an der Nukleotidposition 1799 Codon 600 in *B-raf* resultiert ein Aminosäurewechsel von Valin zu Glutamin (V600E). Die V600E-Mutation zählt zu den häufigsten und macht mehr als 90% aller B-raf Mutationen aus (Davies et al., 2002, Wan et al., 2004). Sie imitiert eine B-raf Phosphorylierung an den zwei Ras-abhängigen Phosphorylierungsstellen (T599 und S602) und bedingt ein konstant aktiviertes Protein. Durch die kontinuierliche Stimulation sowie durch die höhere basale Aktivität im Vergleich zu den anderen Kinasen (A-raf und C-raf) kommt es nachfolgend zur Hyperaktivität im MEK-ERK-Signalweg (= aktivierende B-raf Mutation).

Interessanterweise kann B-raf in Melanozyten zusätzlich durch den cAMP-Signalweg unterhalb von MC1R aktiviert werden, wobei gleichzeitig die C-raf-Funktion durch den MC1R-Signalweg gehemmt wird (Michaloglou et al., 2008) (s. Abb. 2).

Nach CURTIN *et al.* (2005) und EDLUNDH-ROSE *et al.* (2006) erscheinen Primärmelanome mit B-raf Mutationen signifikant häufiger an intermittierend sonnenexponierter Haut (Rumpf) als an chronisch (Gesicht) bzw. nicht sonnenexponierter Haut (palmoplantar, Schleimhäute). Es zeigt sich, dass dies mit dem Auftreten unter jüngeren Individuen vergesellschaftet ist.

B-raf Mutationen wurden in 80% sowohl in kongenitalen als auch erworbenen Nävi nachgewiesen (Edlundh-Rose et al., 2006, Poynter et al., 2006, Hoeflich et al., 2008). Sie treten in benignen Nävi mit der gleichen Häufigkeit auf, wie in primären und metastasierten Melanomen (Pollock et al., 2003).

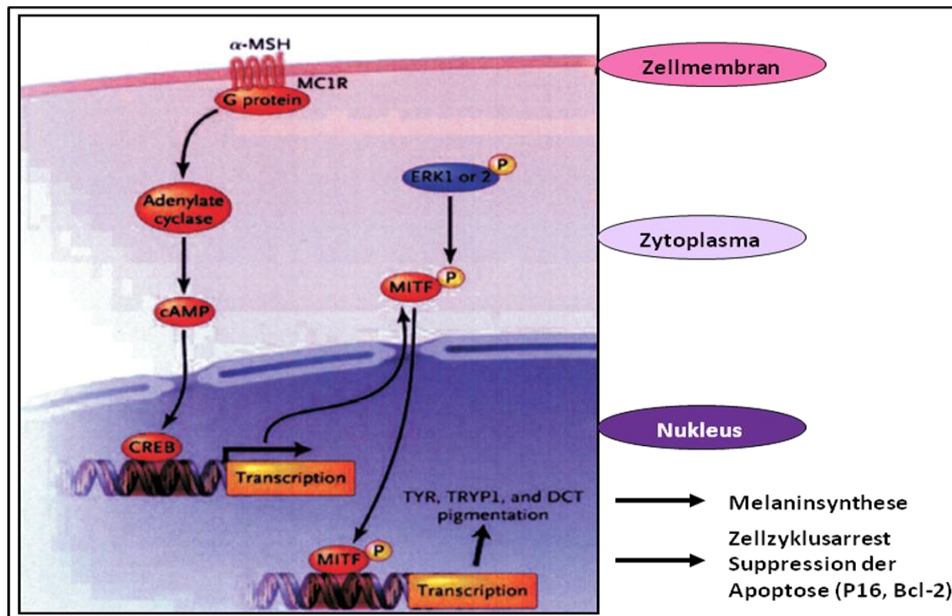
1.4.4. Melanocortin-1-Rezeptor Gen

Die Pigmentierung der Haut nach UV-Exposition ist eine Schutzmaßnahme und ermöglicht der Haut, sich entsprechend der UV-Belastung anzupassen (Quevedo et al., 1975). Durch UV-Strahlung geben Keratinozyten das α -Melanocortin-stimulierende Hormon (α -MSH) zur Aktivierung des Pigmentierungsweges im Melanozyten ab. Letztere synthetisieren Melanin und überführen es in die benachbarten Keratinozyten. Dort sorgt das Melanin für eine Absorption bzw. für einen Abbau der ultravioletten Energie, die allgemein zu genetischen Veränderungen (Pyrimidindimere), zur Beeinflussung der Immunfunktion und zur Zunahme der Produktion von Wachstumsfaktoren führt (Gilchrest et al., 1999).

Die Pigmentierung wird auf molekularer Ebene durch α -MSH vermittelt, das an seinem Rezeptor, dem Melanocortin-1-Rezeptor (MC1R) bindet. MC1R wird durch das gleichnamige Gen *MC1R* kodiert, das auf dem Chromosom 16 q24.3 liegt. Es besteht aus einem einzelnen Exon.

MC1R ist ein G_s-Protein (Guaninnukleotid-bindendes Protein) gekoppelter Rezeptor mit einer heptahelikalen Struktur. Es wird überwiegend an der Oberfläche von Melanozyten exprimiert (Rouzaud et al., 2005).

Nachdem α -MSH am MC1R gebunden hat, stimuliert die aktive Untereinheit des Rezeptors eine Adenylatzyklase (AC). Es folgt der konsequente, intrazelluläre Anstieg von zyklischem AMP (cAMP, second messenger) mit Stimulation der Proteinkinase A (PKA). Anschließend resultiert eine Interaktion mit Faktoren der CREB-Familie (cAMP responsive element binding Protein) und schließlich die vermehrte Expression des Melanins über die CREP-vermittelte Bildung des Transkriptionsfaktors MITF (Microphthalmia associated transcription factor). MITF steigert die relevante Transkription bzw. Translation von Pigmentierungsgenen und -enzymen [Tyrosinase (TYR), Tyrosinase related protein 1 (TYRP1) und Dopachrome Tautomerase (DCT)], die für die Eumelaninsynthese relevant sind (Yasumoto et al., 1997, Goding, 2000). Daneben beeinflusst MITF das Melanozytenüberleben und die Melanozyten-differenzierung (Barsh, 2003, Garcia-Borrón et al., 2005) (s. Abb. 2 & 3).

Abbildung 3: Der Pigmentierungsweg über MC1R

Der Pigmentierungsweg wird primär durch Bindung eines α -MSH-Agonisten an den transmembranen MC1R gestartet. Die Aktivierung der cAMP-Kaskade führt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB und nachfolgend zur Transkription des MITF. MITF induziert die Transkription von Pigmentierungsenzymen (TYR, TYRP1, DCT) und Proteinen. P: Phosphat

Modifiziert nach Miller und Mihm aus dem New England Journal of Medicine 2006 (355,51-65)

Das Rezeptor-Gen ist reich an Einzelnukleotidpolymorphismen/-varianten (Single Nucleotide Polymorphism, SNPs). Aktuell werden mehr als 100 SNPs beschrieben, die nicht gleichbedeutend sind (Garcia-Borron et al., 2005).

Funktionelle Analysen von MC1R Varianten deckten eine ineffiziente Stimulation unterhalb des cAMP-Signalweges auf. Dabei reduzieren bestimmte SNPs die Aktivität des Rezeptors z.B. durch inkomplette Integration von Rezeptormolekülen in die Melanozytenmembran, durch verminderte Bindungskapazität des Rezeptors zum α -MSH oder durch defekte Aktivität des G_s -Proteins. Damit wird der Hauptverteidigungsmechanismus des Melanozyten gegen UV-Strahlung gehemmt (Kennedy et al., 2001, Beaumont et al., 2007).

Der Zusammenhang zwischen von MC1R Varianten und Hautkolorit sowie Bräunungsfähigkeit lässt vermuten, dass eine Verbindung zwischen den Polymorphismen und einer Prädisposition für Hautkrebs besteht. Diese Assoziation wurde in einer Vielzahl von Studien an MM, genauso wie an anderen Hautkrebsarten analysiert (Fargnoli et al., 2006). Besonders bei Individuen mit phänotypisch heller Haut und Sommersprossen sowie bei rothaarigen Personen lassen sich Keimbahnpolymorphismen im *MC1R* Gen mit reduzierter Aktivität des MC1R Proteins (Naysmith et al., 2004) und ein erhöhtes Erkrankungsrisiko für das MM nachweisen (Kennedy et al., 2001, Beaumont et al., 2007, Beaumont et al., 2008).

Neben den Pigmentierungseigenschaften der SNPs des *MC1R* Gens beeinflussen sie auch die Penetranz von Mutationen in Onko- und Tumorsuppressorgenen.

Anhand der Vielzahl von Indizien und der Studienlage scheinen *MC1R* sowie seine Polymorphismenvarianten mehr zu beeinflussen als nur die Pigmentation. Dabei spielt wahrscheinlich nicht nur der Funktionsverlust des Proteins durch die SNPs mit nachfolgender, reduzierter Bräunungsfähigkeit eine Rolle (Matichard et al., 2004). Dies untermauert die Wichtigkeit von *MC1R* als prädisponierendes Gen im MM über seine Pigmentations-eigenschaften hinaus.

1.5. Ziel und Fragestellung der Arbeit

Über die Bedeutung wichtiger Gene in der Pathogenese des malignen Melanoms wird seit vielen Jahren diskutiert. Vor diesem Hintergrund wurden Genanalysen an Primärtumorgewebe von Melanompatienten durchgeführt.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der retrospektiven Auswertung epidemiologischer Primärtumordaten und der Dokumentation klinischer Verläufe von 90 Melanompatienten. Anschließend erfolgte die genetische Untersuchung der Primärmelanome dieser Patienten auf Keimbahnpolymorphismen im *MC1R* Gen und somatische Mutationen in den Onkogenen *B-raf* und *N-ras* mit nachfolgender Korrelationsbestimmung.

Daraus ergaben sich folgende Fragen:

1. Zeigt die epidemiologische Auswertung Abweichungen zu den allgemeinen epidemiologischen Daten des malignen Melanoms?
2. Was für Genmutationsmuster zeigen die Primärtumore?
3. Korrelieren die Einzelnukleotidpolymorphismen im *MC1R* Gen mit den somatischen *B-raf* bzw. *N-ras* Mutationen?
4. Stehen bestimmte Charakteristika der Patienten bzw. der Primärtumore in Korrelation mit den Polymorphismenmustern in *MC1R* oder dem *B-raf* Mutationsmuster?

2. Patienten, Material und Methoden

2.1. Patienten

Die Erfassung der Patientendaten erfolgte durch die Auswertung der stationären Akten und der Tumorambulanzakten der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, einschließlich der Befundberichte aller beteiligten Kliniken und Institute (Klinik für allgemeine Chirurgie, Institut für Pathologie und Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde).

Die Akten beinhalteten den gesamten Krankheitsverlauf seit klinischer und histologischer Diagnosestellung des MM. Das Patientenkollektiv umfasst 90 Patienten. Die Daten wurden retrospektiv aus den Jahren 2002 bis 2005 erhoben und umfassten den fortlaufenden Untersuchungs- und Behandlungszeitraum bis zum 28. Februar 2009. Die Diagnose eines MM wurde jeweils durch histologische Untersuchung bestätigt. Dabei wurden die Tumoreindringtiefe nach Breslow und der Invasionslevel nach Clark bestimmt. Die Stadieneinteilung erfolgte nach der TNM Klassifikation des AJCC von 2002 (s. Tab. 1a & b).

2.1.1. Ein- und Ausschlusskriterien

Es wurden nur Patienten einbezogen, die einen Primärtumor aufwiesen, der in der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, entnommen und histologisch bewertet wurde. Auf auswärtige diagnostizierte und histologisch evaluierte Primärtumoren wurde verzichtet. Eingeschlossen wurden Patienten mit kutanem Melanom und einem maximalen vertikalen Tumordurchmessers des Primarius von ≥ 1 mm nach Breslow.

2.1.2. Dokumentation

Dokumentiert wurden allgemeine Patientendaten, Primärtumordaten, die Ersttumorversorgung sowie anschließende Interventionen wie Nachresektion, Sentinel-Node-Biopsie, komplette Lymphknotendissektion und/oder Metastasen- bzw. Rezidiventfernung. Weiterhin wurden der Sentinel-Node-Status, die Therapiedaten und der Krankheitsverlauf erfasst. Alle Informationen wurden in einem standardisierten Dokumentationsbogen (Case Report Form) festgehalten (s. Kapt. 7.2).

2.2. Material

2.2.1. Gebrauchsmaterial

BioMax Casette	Kodak, Rochester, New York, USA
Gelgießapparat	Hoefer & Amersham Bioscience, San Francisco, USA
Glas-Küvette (für 200ml)	C. Roth, Karlsruhe
Glasplattensystems (24,5 x 18 x 1mm)	Hoefer & Amersham Bioscience, San Francisco, USA
Kamm (Comb 20 well, 0,75)	Hoefer & Amersham Bioscience, San Francisco, USA
Küvettenständer (Schlitten)	C. Roth, Karlsruhe
Laborschale, Rotilabo®	C. Roth, Karlsruhe
Mehrkanalpipette (10-100µl)	Eppendorf, Hamburg
Multipette plus (1-20, 2-20, 5-100µl)	Eppendorf, Hamburg
Pinsel (Nr. 2)	Pelikan, Hannover
Pipetten (2-1000µl)	Gilson, Middleton, USA
Reaktionsgefäßständer	Eppendorf, Hamburg
Schutzschild (Radioaktivitätsschutz)	Schäfer, Offenburg

2.2.2. Verbrauchsmaterial

Adhesive Plate Seals (Abdeckklebefolien)	peQLab, Erlangen
Antifect® N Liquid (Flächendesinfektionsmittel)	Schülke und Mayr, Norderstedt
Aluminiumfolie	Sylvana, Köln
BD Discardet™2 (Spritzen 10ml)	BD Becton Dickinson, Fraga, Spanien
BD Microlance™3 (sterile Nadeln 0,6x30mm)	BD Becton Dickinson, Fraga, Spanien
Blotting- Paper Sheets (Whatman-Filterpapier)	Sartorius, Göttingen
BioMax Film (Fotopapier 35x43cm)	Kodak, Rochester, New York, USA
Biophere® Filter-Tips (10-20µl type Gilson/Ep)	Sarstedt, Nümbrecht
Comb 20 well (Kamm 0,75mm)	Hoefer & Amersham Bioscience, San Francisco, USA
Combitips plus (0,1-0,5ml)	Eppendorf, Hamburg
Disposable Scapels (Einwegskapelle)	Feather, Jp; PfM (Produkte für Medizin), Köln
ep Tips (Pipettenspitzen) (10-1000µl)	Eppendorf, Hamburg
Filter-Tips (Pipettenspritzen) (10-1000µl)	np nerbe plus, Winsen/Luhe
Freeform SE Examination gloves	Microflex, Wien, Österreich
Frischhaltefolie GH 58	Igefa, Dahlewitz
Latex Handschuhe (S, powder free)	Kimberly Clark, Zaventem, Belgien
Microtome blades S35 Typ (Klingen)	Feather, Jp; PfM (Produkte für Medizin), Köln
Objektträger (76x26mm/3x1inch)	R. Langenbrinck, Teningen
Safe-Lock Tubes (0,5; 1,5; 2ml)	Eppendorf, Hamburg
Stripette® (5-25ml)	Costar®, Corning, New York, USA
Thermo-Fast® 96 PCR Plates	peQLab, Erlangen
Tubes (autoklaviert, 0,5; 1,5; 2ml)	Eppendorf, Hamburg

2.2.3. Geräte und Software

3139 XL Genetic Analyzer	AB Applied Biosystem/Hitachi, Darmstadt
Biofuge Fresco	Heraeus instruments, Düsseldorf
Centrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg
CHROMA software	CHROMA@lg.ndirect.co.uk
COMPACT™ 2 (Autoradiographie-Entwickler)	PROTEC® medical system, Oberstenfeld
DNA Engine Tetrad 2 (Thermocycler)	PeltierThermalCycler, Oldendorf
function line (Wärmeschrank)	Heraeus instruments, Düsseldorf
Gefrierschrank, (-20°C)	Liebherr, Ochsenhausen
Gefrierschrank, Vip Series (-86°C)	SANYO, München
HI 1219 (Wasserbad)	Leica, München
Hofer SE 600 (Gelanlage)	Hofer & Amersham Bioscience, San Francisco, USA
Kühlschrank	Liebherr, Ochsenhausen
Microtome RM 2125 RT (Schnittmaschine)	Leica, München
MR 3001(Magnetrührer)	Heidolph, Waldenbach
MultiTemp III (Kühlvorrichtung)	Amersham Bioscience, San Francisco, USA
Pipetboy acu	IBS integra biosciences, Fernwald
Power Pac 200 (Elektrophoresegerät)	Bio Rad, München
Sequencing Analysis 5.2 Programm	AB Applied Biosystem, Darmstadt
Slab Dryer M 483 (Vakuumtrockenkammer)	Bio Rad, München
Spectrafuge Mini (Tischzentrifuge)	Labnet international, Windsor Berkshire, UK
Syngene, Gene Genius (Transilluminator)	Bio Imagine System, Cambridge, UK
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Vortex Genie 2	Scientific industries, New York, USA
Ultraspec 3000 (UV/Visible Spectrophotometer)	Pharmacia Biotech, Freiburg

2.2.4. Chemikalien

AccuGENE® (molecular biology water)	LONZA, Verviers, Belgien
Agarose (Elektrophoresis grade)	Invitrogen, Paisely, Schottland, UK
DMSO	Sigma-Aldrich, Steinheim
EDTA	Biochrom, Berlin
Essigsäure (glacial acetic acid)	Sigma-Aldrich, Seelze
Ethanol absolut	Sigma-Aldrich, Seelze
Ethidium Bromid	Sigma-Aldrich, Seelze
Formamid, Brophenol blue	DKFZ, Heidelberg
H ₂ O Aqua ad iniectabilia	Braun, Melsungen
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Seelze
Silanization Solution II	Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim
TEMED p.a.	Roth, Karlsruhe
Tris	Merck, Darmstadt
Xylol	Merck, Darmstadt

2.2.5. Puffer

TAE Sigma-Aldrich, Seelze
 50x TAE (Tris-acetate)
 242g Tris in 500ml H₂O
 100ml 0,5M EDTA pH 8,0
 57,1ml Eisessig
 dH₂O auffüllen zu 1l

TBE Sigma-Aldrich, Seelze
 10x TBE
 108g Tris Base
 55g Boric Acid/Eisessig
 40ml 0,5M EDTA pH 8
 dH₂O auffüllen zu 1l

2.2.6. Molekularbiologische Reagenzien

6x Loading puffer	DKFZ, Heidelberg
50mM MgCl ₂	Invitrogen, Karlsruhe
10x PCR reaction Buffer (MgCl ₂)	Invitrogen, Karlsruhe
dNTP`s	Invitrogen, Karlsruhe
EasyTide dCTP [α -32-P]-3000Ci/mmol	Perkin Elmer Lifesciences, Massachusetts, USA
ExoSAP-IT®	USB Corporation, Cleveland, Ohio, USA
Fast Ruler™ DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
RNase A (100mg Pulver/ml Puffer)	Roche, Mannheim
Taq- E Hot Start® DNA Polymerase	Genaxxon BioScience GmbH, Biberach

2.2.7. Molekularbiologische Kits

Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Foster City, Californien, USA
Cycle Sequencing Mix	
5x sequencing buffer	
QIAamp® DNA Mini Kit (250 Preparations)	QIAGEN, Hilden
250 Spin Columns	
collection tubes (2ml)	
54ml AL-buffer	
50ml ATL-buffer	
95ml AW1-buffer (concentrate), (add 125ml Ethanol)	
66ml AW2-buffer (concentrate), (add 160ml Ethanol)	
110ml AE-buffer	
6ml Proteinase K	

2.2.8. Primer

Primer sind synthetisierte Oligonukleotide mit gegensinniger Orientierung, die den gewünschten zu sequenzierenden DNA-Bereich eingrenzen und als Angriffsort für die DNA-Polymerase dienen. Die Primer und ihre Basenabfolgen wurden anhand der Referenzsequenz, die in der öffentlichen Datenbank NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) zu finden ist, und mit Hilfe des OLIGO5.0™ Computerprogramms für das *MC1R*, das *B-raf* und das *N-ras* Gen ausgewählt. Dieses Programm ist speziell für die Primer-Konstruktion entwickelt und gibt die PCR-Bedingungen an. Die für uns relevanten und häufigsten Polymorphismen in *MC1R* befinden sich in einer Region, die durch 3 Primer-Paare abgedeckt wurde, so dass *MC1R* in drei Fragmenten amplifiziert bzw. analysiert wurde (s. Abb. 5). *B-raf*, Exon 15 und *N-ras*, Exon 2 wurden jeweils durch ein Primer-Paar amplifiziert. Die Primer banden komplementär an den Enden des gewünschten Bereichs und wurden bei Invitrogen (Karlsruhe) bestellt (s. Tab. 3).

Tabelle 3a: Primer des *MC1R* Gens zur Amplifikation und direkten Sequenzierung

<i>MC1R</i> Gen	Primer (6)	Sequenz von 5' nach 3'	Länge (bp)	Abgedeckte Polymorphismen
Fragment 1	F	GGA GGT GTC CAT CTC TGA CG	231	V60L, D84E, V92M
	R	GAC ATT GTC CAG CTG CTG C		
Fragment 2	F	GAC GTG ATC ACC TGC AGC TC	182	R142H, R151C, I155T, R16W, R163Q
	R	CGG CCA CGT GGT CGT AGT AG		
Fragment 3	F	CTG GGC ATT TTC TTC CTC TG	230	D294H
	R	TGC CCA GCA CAC TTA AAG C		

Primer-Sequenzen zur Vervielfältigung und zur Sequenzierung des *MC1R* Gens, Länge und Polymorphismen des jeweiligen Fragments. F: Forward, R: Reverse, bp: Basenpaar

Tabelle 3b: Primer der *B-raf* und *N-ras* Gene zur radioaktiven Amplifikation und Sequenzierung

<i>B-raf</i> Gen	Primer (2)	Sequenz von 5' nach 3'	Länge (bp)
Exon 15	F	CCT AAA CTC TTC ATA ATG CTT	209
	R	ATA GCC TCA ATT CTT ACC AT	
<i>N-ras</i> Gen	Primer (2)	Sequenz von 5' nach 3'	Länge (bp)
Exon 2	F	CAA GTG GTT ATA GAT GGT GA	110
	R	AGG AAG CCT TCG CCT GTC CT	

Primer-Sequenz zur Vervielfältigung und zur Sequenzierung des *B-raf* bzw. *N-ras* Gens und Fragmentlänge. F: Forward, R: Revers, bp: Basenpaar

2.2.9. Proben

Die DNA-Proben wurden aus den Paraffinschnitten der Primärtumoren gewonnen.

2.3. Methoden

2.3.1. Entnahme des Primärtumors und Konservierung

Die Entnahme erfolgte durch eine standardisierte, chirurgische, spindelförmige Exzision mit stadiengerechtem Sicherheitsabstand zu allen Seiten (d.h.: bei einem maximalen vertikalen Tumordurchmesser von bis zu 2mm, betrug der Sicherheitsabstand 1cm zu allen Seiten, bei einem MM > 2mm wurden 2cm zu allen Seiten entfernt). Die nachfolgende Konservierung bzw. Fixierung im Paraffin wurde nach dem Protokoll der histologischen Abteilung der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie des Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, durchgeführt.

2.3.2. Isolierung der genomischen Desoxyribonukleinsäuren

2.3.2.1. Schnitte

Vor der Isolierung wurden von den Paraffinblöcken, die die Tumorpräparate enthielten pro Patient sechs Schnitte mit einer Dicke von 6-8µm angefertigt (Microtome, Leica-schnittmaschine, München). Die Schnitte wurden direkt in ein 43°C warmes Wasserbad (HI 1219 Leica, München) zur Glättung überführt und anschließend mit Hilfe eines Pinsels auf Objektträger aufgetragen. Zur Fixierung folgte die Trocknung im Wärmeschrank (function line, Heraeus instruments, Düsseldorf) über Nacht bei 37°C.

2.3.2.2. Entparaffinierung

Zur Extraktion des Paraffins vom Gewebe (Primärtumor) wurden die Objektträger nach folgendem Schema in Glasküvetten mit je 200ml gewaschen:

10	min	Xylol Bad
5	min	100%iges Ethanol Bad
5	min	90%iges Ethanol Bad
5	min	70%iges Ethanol Bad
5	min	50%iges Ethanol Bad
15	min	H ₂ O Bad

Danach trockneten die Objektträger 60min bei Zimmertemperatur.

2.3.2.3. Isolierung von DNA

Die DNA-Isolierung wurde unter Verwendung des QIAamp DNA Mini Kit 250 (QIAGEN, Hilden) mit dem dazugehörigen Gewebeprotokoll durchgeführt. Nach der Trocknung wurde das entparaffinierte Gewebe durch Einwegskapelle von den Objektträgern gekratzt unter

Befeuchtung des Skalpell mit dem ATL-Puffer. Die durchschnittliche Gewebemenge aus sechs Schnitten entsprach ca. 25mg. Die „schmierige“ DNA-Masse wurde in 1,5ml autoklavierte Eppendorfröhrchen (Tubes) überführt, die 180µl ATL-Puffer enthielten.

Im zweiten Schritt erfolgte die Gewebslyse mit 20µl Proteinase K pro Tube mit einer Inkubationszeit von 24h bei 56°C. Bei inkompletter Lyse wurde erneut mit 20µl Proteinase K lysiert und für weitere 4h bei 56°C inkubiert.

Der dritte Schritt beinhaltete den RNA-Verdau durch Zugabe von 4µl RNase A (100mg/ml). Nach Vortexen, Zentrifugieren und zweiminütigem Warten bei Zimmertemperatur folgte das Auftragen auf Säulen (Silican-Gel Auftrennsäulen) unter Verwendung der vorgegebenen Pufferbedingungen von QIAGEN:

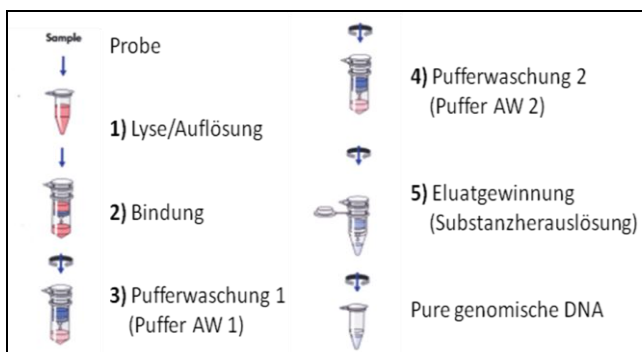
1. Zugabe von 200µl AL-Puffer (Präparationspuffer) und Inkubation bei 70°C für 10min
2. Zugabe von 200µl Ethanol (100-96%), vortexen und zentrifugieren
 - ⇒ Auftragung auf die QIAampsäulen der Tubes (spin columns)
 - ⇒ Zentrifugation von 1min bei 8000rpm
 - ⇒ Verwerfung des gefilterten Überstandes/Filtrats durch Dekantieren in einen Erlenmeierkolben

Puffer-Waschung zum Entfernen von Verunreinigungen (Proteine etc.) der an der Säule gebundenen DNA:

3. Zugabe von 500µl AW1-Puffer (Waschpuffer)
4. siehe 2.
5. Zugabe von 500µl AW2-Puffer (Waschpuffer)
 - ⇒ Aufpipettieren auf die QIAampsäulen der Tubes (spin columns)
 - ⇒ Zentrifugation von 3min bei 13000rpm
 - ⇒ Verwerfung des Filtrats

Nach der Reinigung wurden die Säulen in ein sauberes 2ml vorgefertigtes Zentrifugationsgefäß umgesteckt (Baukasten-Prinzip) und schließlich mit 100µl destilliertem Wasser ausgewaschen. Nach dem Zentrifugieren (13000rpm, 1min) blieben 90µl reine genomische DNA als Eluat übrig, dessen Konzentration photometrisch bestimmt wurde (s. Abb. 4).

Abbildung 4: Abfolge der DNA-Isolierung



Modifizierte Darstellung des Gewebeprotokolls aus dem QIAamp DNA Mini Kit 250, 02/2003, QIAamp Spin Prozedere (QIAGEN, Hilden).

2.3.2.4. Bestimmung der Konzentration und Reinheit

An einem Spektralphotometer (Ultraspec 3000, Spectrophotometer, Pharmacia Biotech, Freiburg) wurden die Spektren der DNA-Verdünnungslösung ermittelt, wobei sich hierdurch Rückschlüsse auf die Konzentration und Reinheit ziehen lassen. Das Messverfahren basiert auf Eigenschaft der Nukleinsäuren, aus aromatischen Molekülen (den Basen) ultraviolettes Licht zu absorbieren. Daher lassen sich Nukleinsäuren mit einem charakteristischen Absorptionsmaximum von $\lambda = 260\text{nm}$ photometrisch quantifizieren.

Nach CREYER *et al.* (1975) entspricht die Optische Dichte OD_{260} von 1,0 A (Absorption), 50 μg doppelsträngiger DNA-Konzentration pro ml unter der Verwendung einer Küvette mit der Schichtdicke von 10mm.

Formel:

$$c_{\text{dsDNA}} (\mu\text{g/ml}) = OD_{260\text{nm}} * V * F$$

$$c_{\text{dsDNA}} (\mu\text{g/ml}) = OD_{260\text{nm}} * 50 \mu\text{g/ml}$$

c = Konzentration

OD = optische Dichte

V = Verdünnungsfaktor

F = Multiplikationsfaktor
(50 für dsDNA)

Nach Abgleichen des Nullwertes mit Wasser gegen Null konnte analog dazu das Absorptionsmaximum (OD) bestimmt werden bzw. die jeweilige Konzentration errechnet werden (siehe Gleichung). Zur Ermittlung wurde eine Verdünnungslösung von 1 zu 10 des gewonnenen DNA-Eluats (8 μl DNA-Eluat und 72 μl H₂O) verwendet ($c = OD * 10 * 50 \mu\text{g/ml}$).

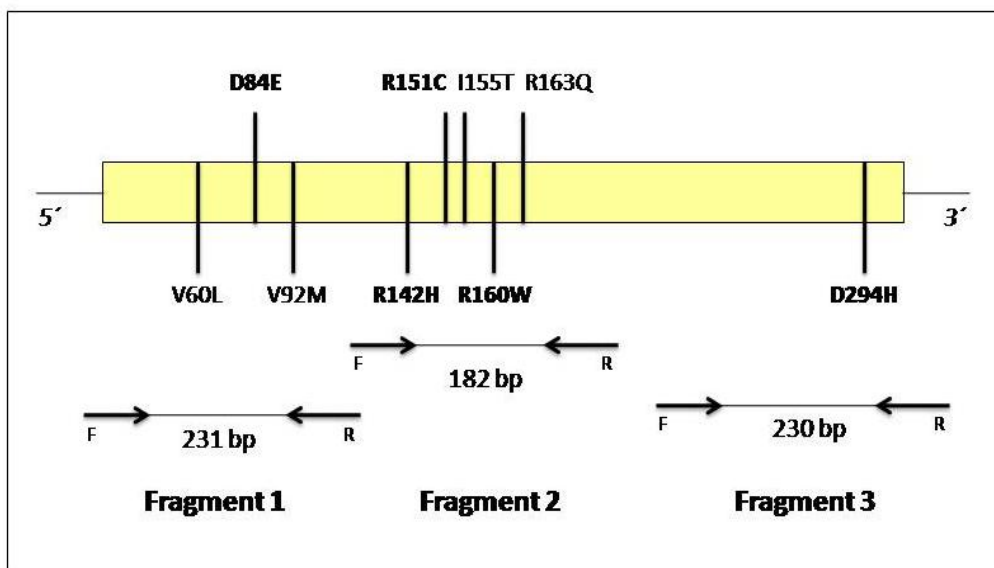
Proteine können die Ergebnisse verfälschen, da sie aromatische Aminosäuren enthalten, die ebenfalls UV-Licht absorbieren und somit höhere DNA-Konzentrationen vortäuschen (Münch, 2002). Um eine Aussage über die DNA-Reinheit zu treffen, kann der Quotient aus OD_{260}/OD_{280} herangezogen werden. Da Proteine ein spezifisches Maximum bei $\lambda = 280\text{nm}$ haben, wird dieser Quotient zur Beurteilung des Grades der Proteinkontamination gewählt. Für reine, proteinfreie Nukleinsäure sollte der Wert zwischen 1,5 und 2,0 liegen (Thomas and Abelson, 1967). Werte ≥ 2 bzw. $< 1,5$ sind Hinweise für Verunreinigungen mit RNA, Salzen bzw. Proteinen. Der Quotient ist nicht besonders sensitiv, da Faktoren wie der pH-Wert und der Salzgehalt des verwendeten Wassers Einfluss auf die Bestimmung nehmen (Wilfinger *et al.*, 1997, Mülhardt, 2006).

2.3.3. Untersuchung der Einzelnukleotidpolymorphismen in *MC1R* durch direktes Sequenzieren

2.3.3.1. Polymerasenkettenreaktion zur Vervielfältigung der paraffinisierten und aufgereinigten DNA

Das Verfahren der Polymerasenkettenreaktion (Polymerase-Chain-Reaction, PCR) wurde 1983 bis 1985 von K. B. MULLIS entwickelt (Münch, 2002). Es handelt sich um eine in vitro Vervielfältigung (Amplifikation) von kleinsten selektiven DNA-Fragmenten, die als Vorlagematrizen dienen. In der vorliegenden Arbeit wurde dieses in vitro Verfahren für die zuvor aufgereinigte DNA verwendet. Für die Genotypisierung erfolgte die Vervielfältigung des *MC1R* Gens in drei Fragmenten, die die Regionen aller relevanten Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs) enthalten (s. Abb. 5).

Abbildung 5: Schematische Darstellung der Vorgehensweise für die Genotypisierung des *MC1R* Gens und seine relevanten Polymorphismen



Der graue Balken stellt das *MC1R* Gen mit seinen SNPs dar. Darunter sind die drei Fragmente dargestellt, die für die Genotypisierung der paraffinisierten DNA amplifiziert und später sequenziert wurden.

F: Forward, R: Reverse, bp: Basenpaar

Zur Durchführung der PCR wurden folgende Reaktionsansätze hergestellt (s. Tab. 4):

- DMSO 0-5%
- 10x PCR reaction Puffer 1µl (Endkonzentration im Ansatz 1x)
- MgCl 2,0-2,5mM
- dNTP (dATP, dTTP, dCTP und dGTP) 0,11mM
- Primer 0,15-0,3µM
- Taq-E Hot Polymerase 0,4U/µl
- Isolierte DNA 20ng/µl
- H₂O auf 10µl pro Ansatz

Nach dem Zusammenpipettieren der Reagenzien, wurde die Mixtur einer zyklischen, wiederkehrenden Abfolge verschiedener Temperaturschritte ausgesetzt, so dass es zu einer Vermehrung des gewünschten DNA-Abschnittes kam. An einem frei programmierbaren Thermocycler (DNA Engine Tetrad 2, Peltier Thermal Cycler, Oldendorf) wurde ein zyklisches Temperaturprogramm eingestellt, das folgende drei Temperaturschritte beinhaltet: Denaturierung: Beim Erhitzen auf 94°C schmilzt die zu amplifizierende doppelsträngige DNA und es entstehen Einzelstränge.

Annealing: Durch rasches Abkühlen wird die Reassoziaton der Einzelstränge verhindert und die Primer lagern sich über Wasserbrücken an entsprechend komplementäre Strangabschnitte an den Einzelsträngen an (Matrizenvorlage).

Extension: Die DNA-Polymerase verlängert bei 72°C die Primer durch den Einbau der dNTP's und vervollständigt so den Einzelstrang zum Doppelstrang. Diese neuen Moleküle dienen im nächsten Zyklus wieder als Matrizenvorlage.

Die Probe durchlief im nächsten Zyklus dieselbe Abfolge und so wuchs die Zahl der doppelsträngigen DNA (dsDNA) theoretisch nach n^2 (n = Anzahl der Zyklen). Es gibt jedoch eine Limitierung der Zyklen, da sich einerseits bei der Replikation Fehler einschleichen können (in vitro Entstehung von Mutationen), die dann akkumulieren und andererseits die Mengen an Substratkonzentration (intakte Polymerase, intakte Nukleotide) abnehmen (Mülhardt, 2006). Die Limitierung lag bei dem hiesigen PCR-Programm bei 37 Zyklen.

Der erste Schritt beginnt mit der Denaturierung für 2min. Es folgen 37 Zyklen mit einer Denaturierung für 25s, Abkühlung mit der geeigneten Annealing-Temperatur für 20s und schließlich der Extensionsschritt für 30s (s. Tab. 5 & 6).

Tabelle 5: PCR Konditionen zur Amplifikation des *MC1R* Gens

Fragmente	Primer-Konzentration in μm	DMSO in %	MgCl ₂ in mM	Annealing-Temp. in C°
1	0,20	0	2,5	62
2	0,15	5	2,0	63
3	0,30	5	2,5	61

2.3.3.2. Gelelektrophorese zur Auftrennung von Nukleinsäuren

Die Gelelektrophorese ermöglicht die Auftrennung unterschiedlich großer, geladener Moleküle im elektrischen Feld. DNA besteht aus Nukleotiden mit negativ geladenen Phosphatgruppen und wandert aufgrund dieser Ladung im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode. Als elektrisch neutrale dreidimensionale Trägermatrix dienen Agarose- oder Polyacrylamidgele. Durch sie entstehen netzartige Strukturen, die die gelösten DNA-Moleküle der Länge entsprechend auftrennen. Die Laufgeschwindigkeit wird dabei durch

Molekülgröße, Gelkonzentration, Zusammensetzung des Laufpuffers, DNA-Konformation und die Höhe der angelegten Spannung beeinflusst. In dieser Arbeit wurde die Agarose- (für MC1R) und die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (für B-raf und N-ras) durchgeführt.

2.3.3.3. Agarose-Gelelektrophorese

In dieser Arbeit diente die Agarose-Gelelektrophorese indirekt der Genotypisierung von *MC1R* durch die Qualitäts- und Quantitätskontrolle der zuvor vervielfältigten DNA. Agarose, ein pflanzliches Polysaccharid ermöglicht DNA-Fragmente von einer Länge von 0,5- bis 25 kb (50-25.000bp) aufzutrennen und zu identifizieren (Mühlhardt, 2006). Die Konzentration der Agarose (w/v) richtete sich jeweils nach der Größe (Basenlänge) der aufzutrennenden Fragmente. Der prozentuale Anteil der Agarose bestimmt die Porengröße der Gelmatrix. Je mehr Agarose verwendet wird (hochprozentiges Gel), desto feinmaschiger das Gel. Es wurden 1%tige Agarosegele gegossen. Dazu wurde 1g Agarose mit 100ml TAE-Puffer im Erlenmeierkolben durch zweiminütiges Erhitzen in der Mikrowelle gelöst. Diese Agaroselösung wurde direkt in eine horizontal gelagerte Gel-Kammer gegossen und mit einem Kammdeckel bedeckt, um Taschen für das spätere Auftragen zu erhalten. Das Gel härtete 30min aus. Danach wurde die Kammer mit dem TAE-Puffer (mit Tris für konstanten pH-Wert von 8) als Laufpuffer gefüllt. Es folgte die Auftragung von 3µl vervielfältigtem PCR-Produkt, das zuvor mit 2µl gefärbtem Loading puffer beschwert wurde, in die Gel-taschen. In die rechten Außentaschen wurde 5µl Fast RulerTM DNA Ladder (low range), als Größenleiter gegeben. Die Elektrophorese lief unter einer konstanten Spannung von 80Volt für 20min (Power Pac 200 Bio Rad, München). Schließlich folgte die Färbung mit Ethidiumbromid für 10min in einer Dunkelkammer, um später eine Fluoreszenz der DNA-Banden nach Anregung mit UV-Licht im Transilluminator zu bekommen (Syngene, Bio Imagine System, Cambridge, England). Ethidiumbromid ist ein stark mutagen-fluoreszierender Farbstoff. Bei Bestrahlung mit UV-Licht (254 und 300nm) emittiert der Ethidiumbromid-Nukleinsäure-Komplex oranges Licht im sichtbaren Bereich (500-590nm). Die Intensität der Fluoreszenz ist proportional zur Menge der in die DNA eingelagerten Ethidiumbromid-Moleküle.

Nur wenn die Banden der Probe denen der positiven Kontrolle (Kontroll-DNA aus Blut) entsprachen, wurden die entsprechenden amplifizierten DNA-Proben zur Sequenzierung weiter verwertet. Dies wurde unter UV-Belichtung im Transilluminator (320nm) nach TAE-Puffer-Waschung überprüft und zur Dokumentation fotografiert (s. Abb. 11).

2.3.3.4. ExoSAP-Verdau

Der ExoSAP-Verdau dient dazu, das vervielfältigte PCR-Produkt von seinen Primern zu befreien und die überschüssigen dNTPs aus der vorherigen PCR-Reaktion zu inaktivieren, um mit der nachfolgenden Sequenzierreaktion zu beginnen.

Durchführung: Zum PCR-Produkt ($7\mu\text{l} = 10\mu\text{l} - 3\mu\text{l}$ für die Gelelektrophorese) wurden jeweils $1\mu\text{l}$ H_2O und $0,75\mu\text{l}$ ExoSAP-IT® dazugegeben. Nach dem Mischen und Zentrifugieren lief das PCR-Programm (EXOS) im automatisierten Thermocycler (DNA Engine Tetrad 2, Peltier Thermal Cycler, Oldendorf) ab. Der erste Schritt dient der Befreiung vom Primer und der zweite Schritt der Enzym-Inaktivierung (s. Tab. 7).

2.3.3.5. Direkte Sequenzierung zum Nachweis der Polymorphismen

In der vorliegenden Arbeit fand die Sequenzierung nach der Kettenabbruch-Methode nach SANGER *et al.* (1977) in modifizierter Weise Verwendung. Diese Methode ermöglicht eine exakte Darstellung eines DNA-Abschnitts mit seinen Basenpaarabfolgen.

Da das *MC1R* Gen, das aus einem einzelnen Exon besteht, unzählige SNPs enthält, stellt die direkte Sequenzierung die einzige Methode dar, die Nukleotidvielfalt genauestens zu bestimmen.

Bei der nachfolgenden Reaktion, das sogenannte Cycle Sequencing, wird für jeden Reaktionsansatz nur ein Primer (forward bzw. reverse) eingesetzt, um somit eine lineare Amplifikation zu erreichen. Die DNA-Menge wächst linear mit der Anzahl der Zyklen.

In einer Amplifikations-/Sequenzierreaktion werden zusätzlich zu den vier natürlichen Mononukleotidtriphosphaten (dNTPs) fluoreszenzmarkierte 2', 3'-Didesoxynukleotidtriphosphate (ddNTPs) aller vier Nukleotide dazu gegeben. Sie werden von der DNA-Polymerase in gleicher Weise an das 3'-Ende des Startprimers eingebaut wie die natürlichen dNTPs. Sie zeichnen sich jedoch durch das Fehlen der 3'-Hydroxylgruppe des Zuckers aus und verhindern eine weitere Anlagerung von dNTPs an die neu synthetisierte Polynukleotidkette. Somit führen sie nach jeder Base zu einem Kettenabbruch. Dadurch werden DNA-Fragmente jeder möglichen Länge hergestellt, die alle den Startprimer am 5'-Ende und eines der vier markierten ddNTPs am 3'-OH-Ende besitzen. Diese unterschiedlichen Fragmente werden elektrophoretisch aufgetrennt, so dass die jeweils endständige Base der nächsten Position der DNA Sequenz entspricht. Der automatische Sequenzierer (3130 XL Genetic Analyzer, Applied Biosystem/Hitachi, Darmstadt) erfasst die verschiedenen Fluoreszenz-Markierungen mit einem Laser und gibt die einzelnen Basen als farbige Peaks (Blau: C, Grün:

A, Rot: T und Schwarz: G) in der Aufzeichnung wieder. Die detektierten Peaks werden schließlich computergestützt direkt in die Sequenz umgewandelt.

2.3.3.6. Sequenzierreaktion mit Big Dye® Terminator Cycle Kit

Nach dem Verdau der Primer (ExoSAP) wurde ein Master Mix für die Sequenzierungsreaktion, das sogenannte Cycle Sequencing, vorbereitet (jeweils 6,25µl H₂O und 0,5µl Primer pro Sample). Es wurde immer ein Reaktionsansatz für einen Primer getrennt zubereitet, wobei für jedes Fragment dieselben Primer verarbeitet wurden, die in der vorangegangenen PCR Verwendung fanden (s. Tab. 3a). Es folgte die Zugabe von 1,75µl Big Dye Terminator 5x sequencing buffer und 0,5µl Big Dye® Terminator (Big Dye® Terminator: an Nukleotide gekoppelte Fluoreszenzfarbstoffe) pro Sample. Von diesem MasterMix wurde nach dem üblichen Prozedere (Vortexen, Zentrifugieren) jeweils 9µl pro Well in einer 96-PCR-Well-Platte vorgelegt. Dazu kam je 1µl PCR-Produkt aus dem vorangegangenen ExoSAP-Verdau, dass mit einer Mehrkanalpipette (1-10µl Eppendorf, Hamburg) in die neue Platte überführt wurde. Die Platten wurden verklebt und schließlich die Sequenzierungsreaktion im Thermocycler (DNA Engine Tetrad 2, Peltier Thermal Cycler, Oldendorf) mit dem Seq-PCR-Programm gestartet (s. Tab. 8).

2.3.3.7. Präzipitation

Nach dem Cycle Sequencing wird das Produkt mit Alkohol (Isopropanol und Ethanol) gefällt (präzipitiert), um nicht verbrauchte Bestandteile, beispielsweise nicht eingebautes ddNTP oder dNTP, zu eliminieren.

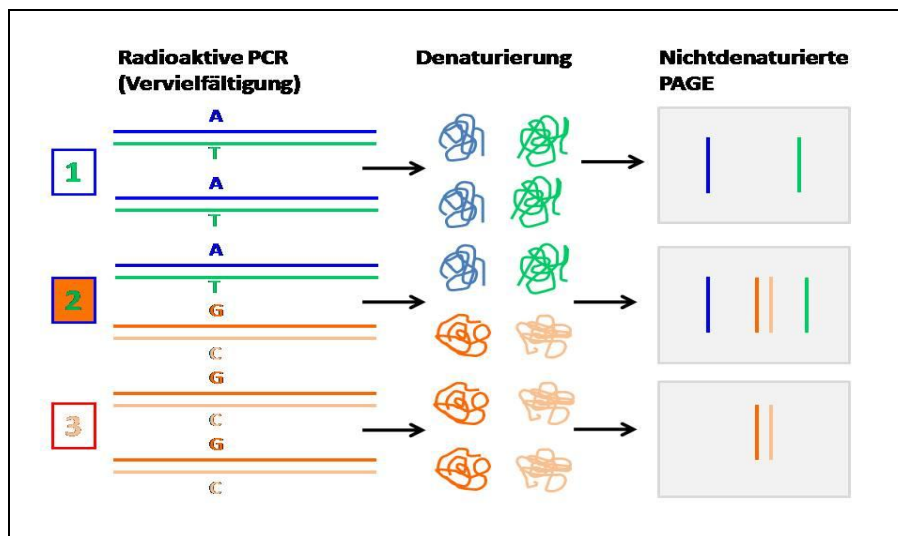
Durchführung: Als erstes wurde das Extensionsprodukt aus der Seq-PCR zentrifugiert, um Tropfen am Cup-Rand zu entfernen. Es folgte die Zugabe von 15µl Isopropanol (2-Propanol) mit der Mehrkanalpipette. Das Reaktionsgemisch wurde nachfolgend bei 4000rpm für 40min und 20°C zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend auf Papiertüchern ausgeschlagen. Im zweiten Schritt gab man 25µl Ethanol (75%) auf die Proben. Es folgte die Zentrifugation bei 4000rpm, diesmal für nur 15min mit nachfolgendem Ausschlagen (Überstandentfernung). Danach wurden die offenen Platten umgedreht, auf Papiertüchern für 3min bei 300rpm zentrifugiert und anschließend für 5min bei Raumtemperatur belassen. Für den nachfolgenden Sequenzierlauf wurden 25µl H₂O hinzupipettiert. Nach dem Programmieren des Sequenziergeräts begann der Lauf am 3139 XL Genetic Analyzer (Applied Biosystem/Hitachi, Darmstadt).

2.3.4. Untersuchung von somatischen Mutationen in *B-raf* und *N-ras* durch SSCP

2.3.4.1. Single-Strand Conformation Polymorphism Analyse

Die Einzelstrangkonnformationspolymorphismus-Analyse (Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis, SSCP) ist eine sensitive Methode mit der sich kleinste Abweichungen in der Primärsequenz (Punktmutationen, Insertionen und Deletionen) nachweisen lassen (Orita et al., 1989a, Orita et al., 1989b, Hayashi and Yandell, 1993). Sie weist eine Wahrscheinlichkeit von 60-85% auf beliebige Mutationen zu entdecken und ist auf Fragmentlängen von ca. 250bp beschränkt (Sheffield et al., 1993). Erstbeschreiber sind ORITA *et al.* (1989). Dabei handelt sich um eine Elektrophorese, bei der das spezielle Faltungsverhalten (Rückfaltung und Ausbildung von Sekundärstrukturen) von DNA-Einzelsträngen bedingt durch intramolekulare Wechselwirkung unter nicht-denaturierten Bedingungen ausgenutzt wird. In Abhängigkeit von der Primärsequenz entstehen komplexe dreidimensionale Strukturen, die jeweils ein spezifisches Laufverhalten je nach Länge und Konformation haben. Das elektrophoretische Wanderungsverhalten hängt also nicht nur von der Länge des Stranges ab, sondern auch von dessen Konformation (räumliche Anordnung). Kleinste Unterschiede, wie einzelne Nukleotidveränderungen in der Primärsequenz zwischen dem Wildtyp (Standardvariante der Bevölkerung, Kontrollindividuum dessen Genom in einem natürlicherweise durch die Evolution entstanden Zustand vorliegt) und dem mutierten DNA-Einzelstrang können zu einer anderen Sekundärstruktur und damit zu einem veränderten Laufverhalten führen (elektrophoretische Mobilitätsänderung). Dies erscheint später auf einem Autoradiogramm als zusätzlich verändertes Bandenmuster zu parallel gelaufenen Kontrollindividuen (Orita et al., 1989a). Bei den auffälligen Banden (band-shifts) handelt es sich lediglich um Sequenzänderungen, die durch direkte Sequenzierung lokalisiert und identifiziert werden können.

Aufgrund der Doppelsträngigkeit der DNA und des diploiden Chromosomensatzes erhält man aus den Tumorzellkernen 4 verschiedene Einzelstränge (Doppelstrang DNA mütterlicherseits und Doppelstrang DNA väterlicherseits), die im denaturierten Polyacrylamidgel aufgetrennt jeweils 4 Banden ergeben können (s. Abb. 6, Reihe 2).

Abbildung 6: Vereinfachte Darstellung der SSCP-Analyse

1= homozygote Allele (mütterlicher und väterlicher Strang identisch)

2= heterozygote Allele (mütterlicher und väterlicher Strang sind nicht identisch)

3= homozygote Allele (mütterlicher und väterlicher Strang identisch)

Modifizierte Abbildung von Dr. sc.hum. D. Scherer, DKFZ C050, lab meeting 03/2009

2.3.4.2. PCR mit radioaktiv markiertem Nukleotid-Mix

In dieser Arbeit wurde zur Analyse von Einzelstrangkonnformationspolymorphismen die radioaktive PCR angewendet. Sie ermöglicht einen sensitiven Nachweis kleinster Mutationsfraktionen. Sogar niedrige Mutationshäufigkeiten im *B-raf* bzw. *N-ras* Gen, selbst bei Heterogenität, und das Vorhandensein von gesunden Gewebezellen im Tumorgewebe können dadurch detektiert werden. Unterschiede zur bereits erwähnten PCR ergeben sich bei der Zusammensetzung des Nukleotidmixes mit der Zugabe von radioaktivem [α - 32 -P]dCTP und durch zusätzliche Schutzmaßnahmen.

Herstellung des Reaktionsansatzes (s. Tab. 9a):

- DMSO 0%
- 10x PCR reaction Puffer 1 μ l (Endkonzentration im Ansatz 1x)
- MgCl₂ 2,0mM
- Nukleotidmix
 - dNTP (dATP, dTTP, dCTP und dGTP) 0,11mM
 - **Easy Tide** [α - 32 -P]dCTP 3000 Ci/mmol
- Primer 0,2 μ M
- Taq-E Hot Polymerase 0,4U/ μ l
- Isolierte DNA 20ng/ μ l
- H₂O auf 10 μ l pro Ansatz

Das Fragment der zu untersuchenden Region wurde nach einem zuvor ausgetesteten Standard-PCR-Programm des DKFZ durchgeführt. Es startet mit der initialen Denaturierung bei 94°C für 2min. Es folgten 3 Zyklen mit einer Denaturierungsdauer von 30s bei üblichen 94°C, die Abkühlung bei der jeweiligen spezifischen Annealing-Temperatur (*B-raf*, Exon 15: 50°C, *N-ras*, Exon 2: 49°C) für 30s und die Extension für 30s bei 72°C. Anschließend folgten weitere 37 Zyklen für jeweils 45s mit den identischen Denaturierungs- und Extensionstemperaturen. Die Annealing-Temperatur lag diesmal bei *B-raf* bei 51°C und bei *N-ras* bei 50°C (s. Tab. 10). Die Primer wurden wie unter Tabelle 3b erwähnt, verwendet.

Das radioaktive dCTP wurde während der PCR in die DNA eingebaut und markierte diese. Nach Ablauf der PCR wird das Amplifikationsprodukt, die doppelsträngige DNA, durch Hitzedenaturierung (94°C) voneinander getrennt und als Einzelstrang in einem nicht-denaturierendem Polyacrylamidgel aufgetragen (Mülhardt, 2006). Der gesamte Ablauf wurde aus Strahlenschutzgründen in einem speziellen Radioaktivlabor vorgenommen (Radioaktivcontainer, Plexiglasschutzschilder, kontinuierliche Galgenzählermessung und Personen-Alarmdosimeter am Kittel).

2.3.4.3. Nicht-denaturierte Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Polyacrylamidgele werden vor allem bei der gelelektrophoretischen Auftrennung von besonders kleinen DNA-Fragmenten eingesetzt. Im Gegensatz zu Agarosegelen, bei denen nur die Agarosekonzentration die Porengröße angibt, wird bei der Polyacrylamidgelmatrix die Größe durch die Polyacrylamidkonzentration und den Vernetzungsgrad bestimmt. Dabei bilden die Komponenten der flüssigen Acrylamid-Methylenbisacrylamidlösung ein Netzwerk, das durch freie Radikale polymerisiert. Diese freien Radikale werden von Ammoniumpersulfat (APS) geliefert und von TEMED stabilisiert. Unterschiedliche Acrylamidkonzentrationen erlauben dabei eine besonders gute Auftrennung verschieden großer DNA-Moleküle (Sambrook et al., 1989).

Herstellung der Polyacrylamidgel-Lösung für 75ml (zwei Gele):

- 51,75ml H₂O
- 18,75ml 2x MDE
- 4,5ml 10x TBE
- 350µl APS 10%
- 37,5µl TEMED

Zunächst wurden die Substanzen ohne APS und TEMED zusammen gemischt. Kurz vor dem Gießen wurden APS und TEMED dazu pipettiert und eingerührt. Nach der Herstellung

erfolgte die Auftragung zwischen zwei Glasplatten unter Verwendung eines speziellen und gereinigten (ddH₂O, 70% Ethanol, Silanization Lösung) Glasplattensystems, (Größe 24,5x18x1mm). Als Elektrophorese-Laufpuffer diente 0,6 facher TBE-Puffer. Danach wurde das Set zusammengebaut mit 1mm Glasplattenzwischenraum (Abstandhalter) und in die Gelgießständervorrichtung eingespannt. In den erzeugten Zwischenraum wurden in vertikaler Lage 35ml der vorbereiteten Gellösung gegossen. Dies erfolgte zügig mit Hilfe einer 25ml Glaspipette, da durch die Zugabe des TEMED die Polymerisierungsreaktion sofort gestartet wurde. Wichtig war es, Blasenentstehung im Gel zu vermeiden. Sogenannte Käbme wurden zwischen die Glasplatten als Platzhalter für die späteren Auftragstaschen eingesetzt. Nach dem Auspolymerisieren (ca. 2h) wurden die Käbme für die Auftragstaschen (Slots) herausgezogen. Die Glasplatten mit dem Gel wurden anschließend senkrecht in die Elektrophoresekammern eingespannt. Der Puffertank (die Kammer) war mit 7l 0,6x TBE gefüllt. Nach Abschluss der Gelvorbereitung wurden jeweils 9µl des SSCP-Auftragspuffers (Formamid, Brophenol blue im Verhältnis 19 zu 1) in Tubes vorgelegt und mit 2µl des radioaktiven PCR-Produkts vermischt. Es folgte die Hitzedenaturierung für 2min bei 94°C, um die doppelsträngige DNA als Einzelstrang der PAGE zu unterziehen. Der Denaturierung schloss sich das sofortige Kühlen der Proben an, indem sie auf Eis gestellt wurden. Jeweils 10µl von dem Gemisch wurden auf das Gel in die Slots aufgetragen. Schließlich wurde eine Spannung von 5Watt angelegt und der Lauf über Nacht gestartet. Dabei wurde eine konstante Puffer-Temperatur von 15°C durch das Anschließen der Elektrophoresekammer an eine Kühlung sichergestellt. Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurden das Polyacrylamid-Gel aus der Elektrophoresekammer genommen, von den Glasplatten getrennt, auf Whatman-Filterpapier gelegt und mit Klarsichtfolie abgedeckt. Es folgte die Trocknung dieses „Gel-Päckchens“ im Vakuumtrockner (Slab Dryer M 483, Bio Rad, München) bei 80°C für 2-4h, um es für Dokumentationszwecke haltbar zu machen.

Nach Ablauf dieser Zeitspanne wurde das Gel der Autoradiographie unterworfen. Hierzu wurde die Folie entfernt und ein Röntgenfilm auf das getrocknete Gel gelegt. Beides wurde in einer Röntgenkassette verstaut und im Autoradiographieapparat COMPACT™ 2 (PROTEC® medical systems, Oberstenfeld) entwickelt (s. Abb. 13).

2.3.4.4. Direkte Sequenzierung zur Validierung der Mutationen

Wie oben bereits erwähnt führen einzelne Nukleotidveränderungen (z.B. Punktmutationen) im Einzelstrang zu einem veränderten Laufverhalten im Vergleich zum Kontrollindividuum, dem Wildtyp. Diese Veränderungen lassen sich im Autoradiogramm als zusätzliche Banden

nachweisen. Mit Hilfe des Röntgenbildes aus der Autoradiographie lässt sich die Lokalisation der Banden auf das Gel übertragen und später die DNA daraus isolieren.

Durchführung: Das Röntgenbild wurde auf dem Gel fixiert, um die Banden zu markieren. Diese Gelabschnitte mit der zu isolierenden DNA wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten und in Röhrchen (Tubes) überführt, in denen bereits 50µl H₂O vorgelegt war. Es folgte eine einstündige Inkubation und die Lösung des Gels bei Raumtemperatur mit anschließendem Vortexen und einminütigen Zentrifugieren bei 1300rpm. Aus diesem Ansatz wurde 1µl isolierte DNA für die nachfolgende PCR entnommen und der gleiche Reaktionsansatz wie unter Kapitel 2.3.4.2 hergestellt. Diesmal erfolgte jedoch keine Zugabe von dem radioaktiven Desoxynukleotidtriphosphat (EasyTide[α -³²P]dCTP) (s. Tab. 9b). Ebenso wurden die identischen PCR-Konditionen angewendet (s. Tab. 10).

Nachfolgend liefen die Standardschritte für das Sequenzieren ab. Zunächst der ExoSAP-Verdau zum Entfernen des Primers, anschließend die Sequenzierreaktion (Cycle Sequencing) mit dem Big Dye® Terminator Cycle Kit zum Einbau der fluoreszenzmarkierten 2', 3'-Didesoxynukleotidtriphosphate (ddNTPs) und zuletzt die Präzipitation (Fällung), um überflüssige Bestandteile (dNTPs und ddNTPs) zu entfernen. Anschließend konnte der Sequenzierlauf gestartet werden und die Sequenzanalyse beginnen (Sequencing Analysis 5.2 Programm, Applied Biosystem, Darmstadt).

2.3.5. Datenauswertung und statistische Methoden

2.3.5.1. Datenauswertung der direkten Sequenzierung

Nach dem Sequenzieren erfolgte die Mutationsanalyse mit dem Sequencing Analysis 5.2 Programm (Applied Biosystem), wobei die Sequenz der Tumor-DNA mit den physiologischen Referenzsequenzen durch die sogenannte CHROMA-Software (consensus-based colouring of multiple alignments for publication, <http://www.llew.org.uk/chroma/index.html>, CHROMA@lg.ndirect.co.uk) verglichen wurden. Die unveränderten Referenzsequenzen wurden dafür aus der Datenbank NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) herangezogen. Mögliche Abweichungen wurden detektiert und Mutationen identifiziert.

2.3.5.2. Statistische Auswertung

Alle statistischen Analysen wurden mit der Software SAS® Version 9.1 (SAS Institute Inc., Cary NC) ausgeführt. Die Statistik umfasst die Darstellung der demographischen Daten und der Mutationsanalyse mittels arithmetischer Mittelwerte, Medianen, zugehörigen Streumaßen

und Chi-Quadrat Test. Proportionen kategorisierter Merkmale wurden mit absoluten Zahlen und Prozentsätzen aufgelistet.

Die statistische Analyse mit der Verhältnisbestimmung zwischen MC1R-SNPs und B-raf bzw. N-ras Mutationen wurde mit dem SAS-Befehl „proc freq data = melanoma; table BRAF/NRAS*MC1RX/chisq relrisk; run“ der SAS® Version-Software 9.1 ausgeführt. (SAS Chisq BRAF MC1R.xls und SAS Chisq NRAS MC1R.xls).

Zusätzlich erfolgte der Korrelationsvergleich zwischen den Mutationsergebnissen (MC1R Varianten und B-raf Mutationen) mit den klinischen Daten (Geschlecht, Mortalität, Metastasen- und Ulzerationsstatus). Die statistische Analyse der Verhältnisbestimmung zwischen den Mutationsergebnissen (MC1R Varianten und B-raf Mutationen) wurde mit dem SAS-Befehl „proc freq data = melanoma; tableSEX/DEAD/ULC/METASIS*MC1RX/BRAFX/chisq relrisk; run“ der SAS® Version Software 9.1 durchgeführt (SAS Chisq SEX/DEAD/ULC/METASTASIS MC1R/BRAF.xls).

In dieser Arbeit soll die Wahrscheinlichkeit bestimmt werden, ein MM (definiertes Ereignis) zu entwickeln beim Nachweis von SNPs in *MC1R* und gleichzeitig vorhandenen bzw. fehlenden Mutationen im *B-raf* oder *N-ras* Gen. Hierfür wurde die Odds Ratio als statistisches Messinstrument verwendet, um Aussagen über die Stärke des Zusammenhangs treffen zu können. Außerdem sollte mit der Odds Ratio der Zusammenhang zwischen den klinischen Merkmalen und den Ergebnissen der Genanalyse untersucht werden. Die Genauigkeit der Odds Ratio wird durch das 95% Konfidenzintervall angegeben. Ein großes Konfidenzintervall bedeutet eine hohe Variabilität der Daten (große Streuung) bzw. eine zu kleine Stichprobe (geringe Fallzahl = geringer Stichprobenumfang). Als statistisch signifikant wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit mit einem p-Wert $\leq 0,05$ festgelegt.

Analyse der Progression des malignen Melanoms

Um die durchschnittlichen Überlebenszeiten der Patienten zu analysieren, wurden unterschiedliche Parameter (Gesamtüberleben mit Unterteilung in metastasenfreies und Überleben mit Metastasen) verwendet. Diese wurden mit dem Excel-Programm berechnet (Excel 2007, DATEDIF; Formel: " =DATEDIF (A1; B1;"m/y")).

3. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden retrospektiv die Daten von insgesamt 90 Patienten mit einem malignen Melanom (MM) ausgewertet, die zwischen den Jahren 2002 bis 2005 in der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, behandelt wurden. Die Dokumentation erfolgte hinsichtlich der histologischen Aufarbeitung des Primärtumors, der klinischen Patientencharakteristika und des weiteren Krankheitsverlaufs. Die Nachbeobachtungszeit der Patienten betrug im Median 2 Jahre (35 Monate).

Die experimentellen Untersuchungen des Tumorgewebes erfolgen in Zusammenarbeit mit der klinischen Kooperationseinheit Dermato-Onkologie, der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie des Universitätsklinikums Mannheim (Prof. Dr. med. Dirk Schadendorf) und dem Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ), Abteilung Molekulare Genetische Epidemiologie (Prof. Dr. Kari Hemminki und Prof. Dr. Rajiv Kumar) in Heidelberg.

Analysiert wurden die Gene, *MC1R*, *B-raf* und *N-ras*, einschließlich der Korrelationsbestimmungen zwischen *MC1R*-Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs) und *B-raf* bzw. *N-ras* Mutationen. Dabei erfolgte die Genanalyse von *MC1R* durch direkte Sequenzierung bzw. die Analyse des *B-raf* und *N-ras* Gens durch die SSCP-Methode. Bei einigen Patienten wurden keine Ergebnisse bei der Mutations- und Polymorphismen-Analyse erzielt, so dass die Daten dieser Variablen nicht vollständig in die Studie einbezogen werden konnten.

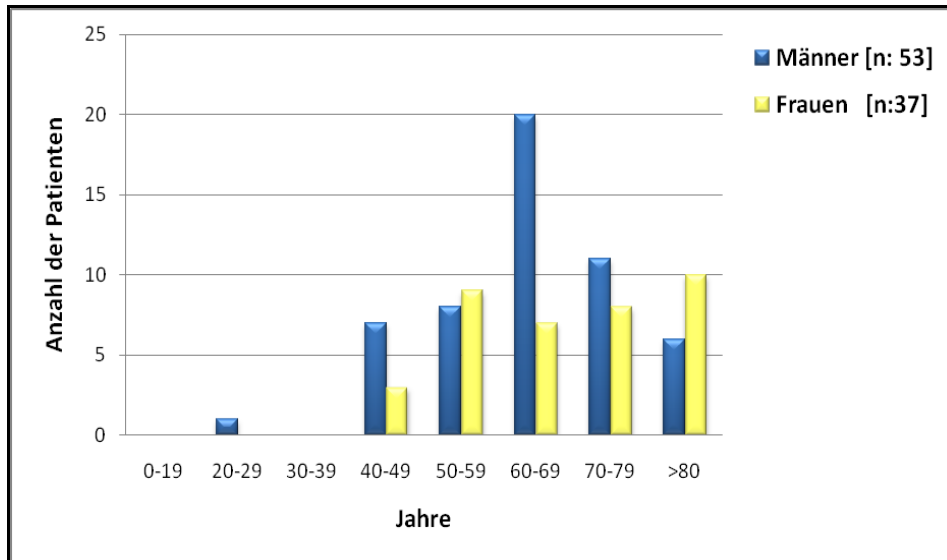
Am Ende wurden die Ergebnisse der Genanalyse mit folgenden Einzelfaktoren der klinischen Datenerhebung, Geschlecht, Mortalität und Metastasen- sowie Ulzerationsstatus in Korrelation gesetzt.

3.1. Charakteristika der untersuchten 90 Patienten

3.1.1. Alters-, Geschlechtsverteilung und Mortalitätsdaten

Das durchschnittliche Alter der untersuchten Patienten lag zum Zeitpunkt der Erstdiagnose des MMs bei 65,7 Jahren. Der Altersmedian betrug 65 Jahre (21 bis 93 Jahre) (s. Tab. 11). Das untersuchte Patientenkollektiv setzte sich aus 37 Frauen (41,11%) und 53 Männern (58,89%) zusammen. Der Altersdurchschnitt der Frauen betrug 68,1 Jahre (43-92 Jahre) und der Männer 64 Jahre (21-93Jahre) (s. Abb. 7).

Abbildung 7: Graphische Darstellung der Alters- und Geschlechtsverteilung in den jeweiligen Altersklassen bei Erstdiagnose des MM



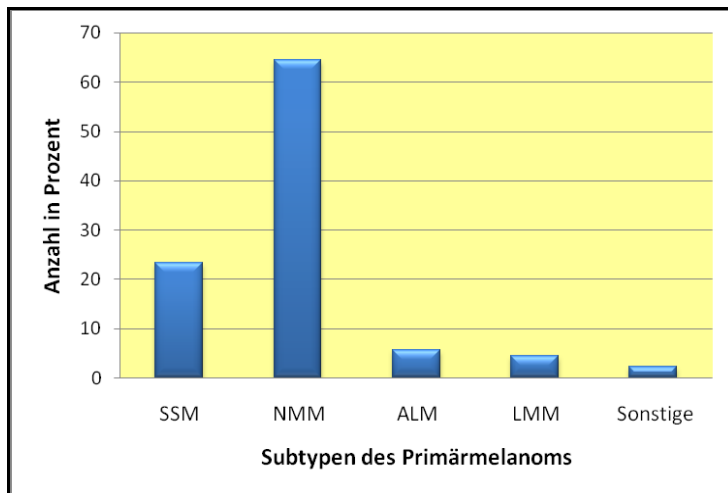
Insgesamt sind während der Datenerhebung 34 Patienten (37,78%) verstorben. Davon starben 29 Patienten am MM (32,22%). Die mittlere Überlebenszeit betrug vom Zeitpunkt der Erstdiagnose bis zum Tod 32,3 Monate (2,2 Jahre). Der Median lag bei 32 Monaten (2 Jahre). Das Gesamtüberleben betrug durchschnittlich 48,3 Monate (3,6 Jahre). Der Median lag bei 45,5 Monaten (3,5 Jahre).

Das metastasenfreie Überleben lag bei durchschnittlich 48,1 Monaten (3,5 Jahre) mit einem Median von 47,5 Monaten (3,5 Jahre). Das Überleben mit Metastasierung wird in der Ergebnisauswertung unter Kapitel 3.1.9 aufgeführt (s. Tab 12).

3.1.2. Histologie des Primärtumors

Bei 88 Patienten konnte dem Primärtumor ein klassisch histologischer Tumorsubtyp zugeordnet werden. In zwei Fällen (2,22%) war keine sichere Zuordnung anhand des histologischen Befundes möglich.

Bei der Verteilung der klassisch histopathologischen Tumorsubtypen überwog das noduläre maligne Melanom (NMM) mit 64,44% (n=58). 23,33% der Patienten (n=21) wiesen das superfiziell spreitende maligne Melanom (SSM) und 5,56% (n=5) das akrolentiginöse maligne Melanom (AML) auf. Das Lentigo Maligna Melanom zeigte sich in vier Fällen (4,44%) (s. Abb. 8 & Tab. 11).

Abbildung 8: Verteilung der Melanomsotypen des Primärtumors

3.1.3 Tumordicke nach Breslow

Im Gesamtpatientengut lag die durchschnittliche Tumordicke nach Breslow bei 3,2mm, der Median bei 2,5mm.

Bei neun Patienten fand sich eine Tumordicke ≤ 1 mm, bei 37 zwischen 1,01 und 2mm. Bei 26 Patienten lag die Tumordicke zwischen 2,01 und 4mm und bei 18 über 4mm. Die kleinste Tumordicke bei den untersuchten Patienten betrug 0,75mm, die größte 11mm (s. Tab. 11).

3.1.4 Invasionslevel nach Clark

Bei allen Patienten ließ sich die Tumoreindringtiefe nach Clark (Clark-Level) im histopathologischen Befund bestimmen. Bei Angaben zwischen zwei Leveln wurde immer der nächsthöhere gewählt (z.B. Clark II-III \Rightarrow III). Die Mehrzahl der Patienten (n=53) zeigte bei Erstdiagnose ein MM mit einem Clark-Level IV (58,89%). Bei 33,33% (n=30) lag der Invasionslevel nach Clark bei III. Sechs Fälle (6,67%) wiesen einen Clark-Level V und ein Patient (1,11%) Clark-Level II auf (s. Tab. 11).

3.1.5 Ulzeration

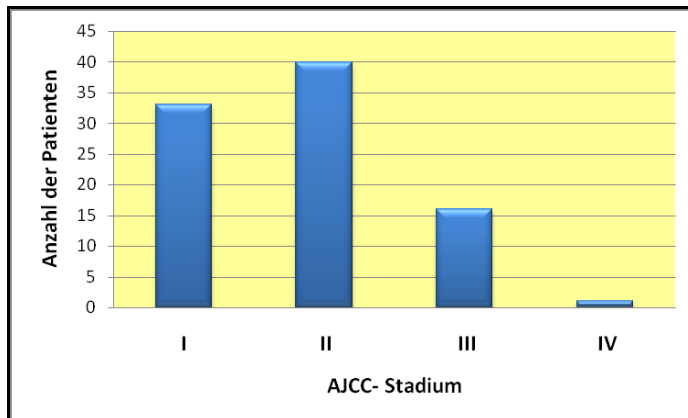
Bei den untersuchten Patienten zeigte sich in 38,89% (n=35) der Fälle ein histologisch gesichertes exulzeriertes Melanom (s. Tab.11).

3.1.6 Primärtumorstadium nach AJCC

Bei Diagnoseerhebung konnten alle 90 Patienten anhand der AJCC 2002 (Balch et al., 2004) den unterschiedlichen Stadien zugeteilt werden. 33 Patienten (36,67%) befanden sich im

Stadium I, 40 Patienten (44,44%) im Stadium II, 16 Patienten (17,78%) im Stadium III und bei einem Patienten (1,11%) wurde das Stadium IV diagnostiziert (s. Abb. 9 & Tab. 11).

Abbildung 9: Übersicht über die Verteilung der jeweiligen AJCC-Stadien der 90 Patienten zu Beginn der Datenerhebung



AJCC: American Joint Committee on Cancer

3.1.7 Lokalisation des Primärtumors

Die Lokalisation des Primärtumors konnte im gesamten Patientenkollektiv anhand der Krankenakte bestimmt und jeweils einer Hauptlokalisationsregion zugeordnet werden. Dazu zählen der Kopf/Hals, der Rumpf/Stamm, die obere sowie die untere Extremität. Bei der Mehrheit der Patienten zeigte sich das MM im Bereich des Rumpfes mit 37,78% (n=34) bzw. an der unteren Extremität mit 36,67% (n=33). Am Kopf war es zu 15,56% (n=14) lokalisiert. An der oberen Extremität trat es bei neun Patienten (10%) auf.

Bei der Differenzierung nach dem Geschlecht zeigte sich bei den weiblichen Patienten (n=37) im Gegensatz zu den männlichen Patienten (n=53) als klassische Primärlokalisierung die untere Extremität mit 54,05% (n=20). Bei den Männern überwog das Auftreten am Rumpf mit 50,94% (n=27) (s. Tab. 13).

Tabelle 13: Verteilung der anatomischen Lokalisation des Primärtumors

Lokalisation	Häufigkeit		Häufigkeit		Häufigkeit	
	Alle	in %	Männer	in %	Frauen	in %
Kopf/Hals	14	15,56	8	15,09	6	16,22
Rumpf/Stamm	34	37,78	27	50,94	7	18,92
Obere Extremität	9	10,00	5	9,43	4	10,81
Untere Extremität	33	36,67	13	24,53	20	54,05
Gesamt	90	100	53	100	37	100

3.1.8 Sentinel-Lymphknoten

Insgesamt wurde bei 48 Personen des Patientenkollektivs eine Exstirpation des sogenannten Wächterlymphknotens (Sentinel Lymph Node Dissection, SLND) vor-

genommen. Bei 12 der 48 SLN-Patienten (25%) konnte mindestens ein positiver Sentinel-Lymphknoten nachgewiesen werden (s. Tab.11). Anschließend erhielten 11 dieser Patienten eine vollständige regionäre Lymphknotenausräumung (Complete Lymph Node Dissection, CLND). Dabei zeigten 18,18% (n=2) weitere Lymphknotenmetastasen.

3.1.9 Fernmetastasen

Die Erfassung der Fernmetastasierung erfolgte durch bildgebende Verfahren (sogenanntes Staging mittels Röntgen-Thorax, Computertomographie, Skelettszintigraphie und/oder Magnetresonanztomographie). Demnach entwickelten 31,11% (n=28) der Patienten im Laufe ihrer Krankengeschichte Metastasen (M1, Stad. IV). Bei 57 Patienten (63,33%) fanden sich keine Fernabsiedlungen. Bei fünf Patienten (5,56%) wurde auf die Staging-Untersuchung wegen der Multimorbidität verzichtet (s. Tab. 11).

Hauptabsiedlungsorte der Metastasen waren mit 21,52% die Lunge (n=17), mit 17,72% das ZNS (n=14) und mit 13,92% die Leber (n=11). Die weitere Häufigkeitsverteilung der Metastasierungsorte ist in Tabelle 14 zu sehen.

Tabelle 14: Lokalisation der Metastasierung

Lokalisation der Metastase	Häufigkeit	Verteilung in %
Lunge	17	21,52
ZNS	14	17,72
Leber	11	13,92
Skelett	10	12,66
Haut	9	11,39
Lymphknoten	8	10,13
Milz	4	5,06
Nebenniere	2	2,53
Peritonealkarzinose	2	2,53
Pankreas	1	1,27
Gehörgang	1	1,27

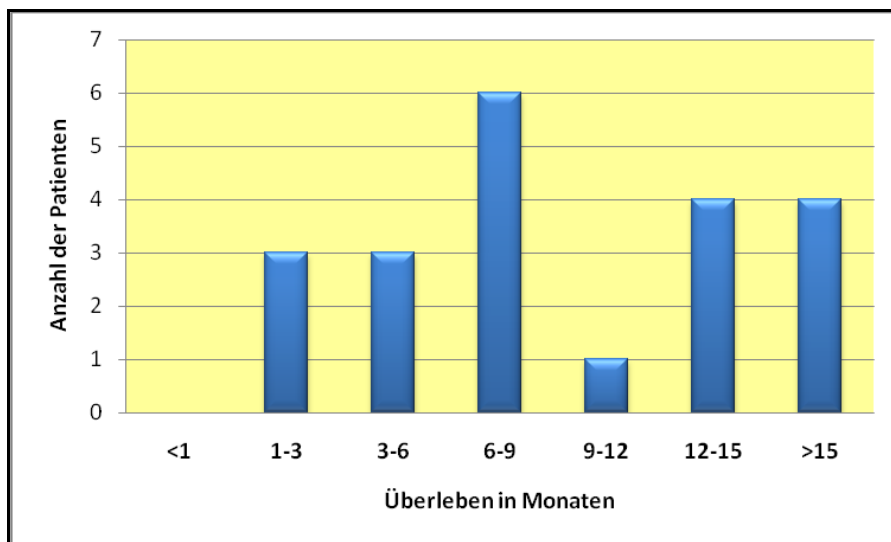
3.1.9.1 Metastasenfreies Überleben

Die durchschnittliche Zeitspanne zwischen Erstdiagnose des MM bis zum Auftreten der ersten Metastase lag bei 19,5 Monaten (1,2 Jahre). Der Median betrug 21,5 Monate (1 Jahr). Bei vier Patienten stellten sich bei Diagnosestellung des Primärtumors bereits Fernmetastasen heraus. Die Zeitspanne erstreckte sich von Null Monaten bei Erstdiagnose eines bereits metastasierten Melanoms bis zu einem Zeitraum von 55 Monaten.

3.1.9.2 Überleben nach der Diagnose von Metastasen

Das Überleben mit Metastasierung beschreibt den Zeitraum von der Erstdiagnose der Metastasen bis zum Tod des Patienten (in Monaten/Jahren). Diese Zeitspanne konnte bei 21 Patienten berechnet werden. In sieben weiteren Fällen wurden Metastasen diagnostiziert, bis zum Zeitpunkt der letzten Datenerhebung führten diese jedoch nicht zum Tod der Patienten. Die durchschnittliche Überlebenszeit zwischen Metastasenerstdiagnose und Tod lag bei 10,9 Monaten (0,5 Jahre). Der Median betrug neun Monate. Der kürzeste Zeitraum betrug zwei Monate. Der längste Überlebenszeitraum mit Metastasen betrug 26 Monate (s. Abb. 10).

Abbildung 10: Überleben in Monaten nach der Erstdiagnose von Metastasen



Das Gesamtüberleben mit Metastasierung ist definiert als der Zeitraum (in Monaten/Jahren) von der Erstdiagnose der Metastasen bis zum Tod bzw. bis zum Abschluss der Datenerhebung (28.02.09). Der Mittelwert ergab eine Zeitspanne von 18,4 Monaten (1,1 Jahre), der Median lag bei 10,5 Monaten (0,5 Jahre) (s. Tab. 12).

3.2. Qualitätsprüfung der verwendeten DNA

3.2.1. Spektrophotometrische Konzentration und Reinheit der isolierten DNA

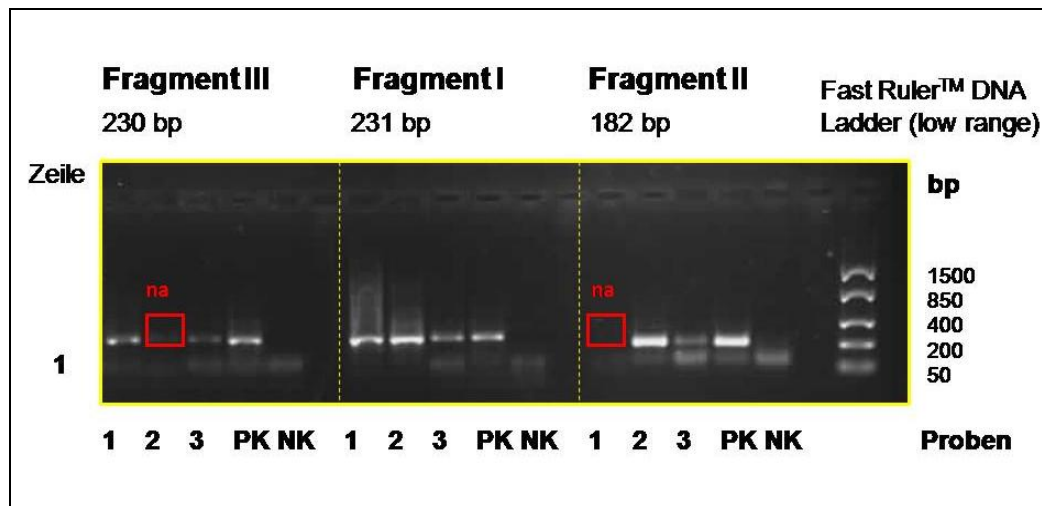
Tabelle 15 (s. Kapt. 7.1.) zeigt die Konzentrationen und Werte der Quotienten aus $\Delta E_{260}/\Delta E_{280}$ der DNA-Präparate. Sie sind ein Indikator für die Reinheit der DNA hinsichtlich des Protein- und RNA-Gehaltes. Die gemessenen Werte lagen mit wenigen Ausnahmen in den von THOMAS & ABELSON (1967) für reine DNA angegebenen Bereichen. Verunreinigungen zeigten sich bei fünf Patienten. Diese hatten jedoch keinen Einfluss auf die weiteren Analysen. Bei weiteren zwei Samples konnte weder die Konzentration noch der Quotient $\Delta E_{260}/\Delta E_{280}$ bestimmt werden. Bei diesen Patienten war infolgedessen die Amplifikation nicht möglich, so dass für die B-raf- und MC1R-Analysen keine Ergebnisse erzielt wurden.

3.3. Ergebnisteil der MC1R-Einzelnukleotidpolymorphismen

3.3.1. Ergebnisse der Polymerase-Ketten-Reaktion und der Agarose-Gelelektrophorese

MC1R wurde in den drei Fragmenten (Frag. I 231bp, Frag. II 182bp und Frag. III 230bp) amplifiziert und später sequenziert (Genotypisierung), um die relevanten Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs) optimal zu analysieren. Die Agarose-Gelelektrophorese mit der anschließenden Gel-Darstellbarkeit diente dabei zur Qualitätskontrolle der PCR. Diese wurde anhand der Gelbilder, die durch Fluoreszenz die amplifizierte DNA als Banden darstellten, dokumentiert und ausgewertet. Die Abbildungen 11 zeigen Ausschnitte aus einem 1%igen Agarosegel.

Abbildung 11: Darstellung der amplifizierten MC1R-Fragmente I-III



Dargestellt sind die Bandenmuster von 9 amplifizierten Patientenproben der Fragments I-III. Die DNA von zwei Patienten ließ sich nicht erfolgreich amplifizieren (Zeile 1, Probe 1 Fragment II und Zeile 1 Probe 2 Fragment III). Die Zahlen, an der rechten Seite geben die Größe der einzelnen DNA-Fragmente an (nach Fermentas, Fast Ruler™ DNA Ladder, St. Leon-Rot).

na = nicht amplifizierbare DNA, PK = Positivkontrolle, NK = Negativkontrolle.

Die Vervielfältigung des Fragments I scheiterte in 25, für Fragment II in zwei und für Fragment III in neun Proben. Diese Proben konnten für die weitere Sequenzierung und Genotypisierung nicht verwendet werden. Ursache dafür war die unzureichende DNA-Qualität aus den Paraffingewebeblöcken. Aus diesem Grund konnte auch für *MC1R* bei insgesamt 10 Proben (9%) keine Aussage getroffen werden (= na) (s. Tab. 16).

3.3.2. Sequenzieranalyse und Auswertung von MC1R

Die Auswertung der Sequenzen erfolgte visuell, indem nach Auffälligkeiten und Abweichungen im Vergleich zur Kontrollsequenz gesucht wurde.

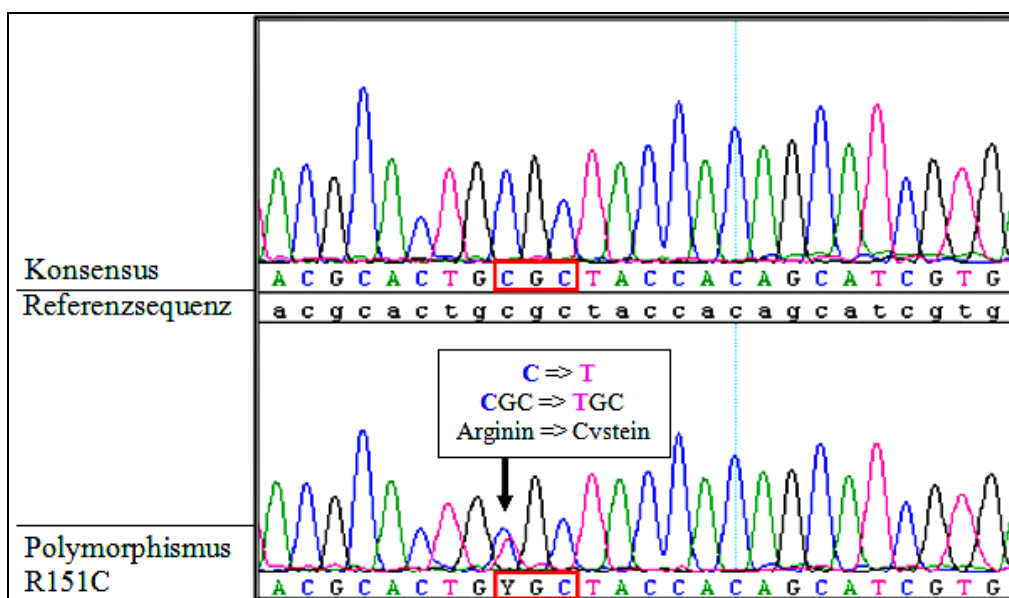
Der MC1R-Konsensus-Genotyp trat mit einer Häufigkeit von 20% (n=16) in den 90 Primärmelanomen auf. Konsensus bedeutet, dass die DNA-Sequenz mit der physiologischen Referenzsequenz übereinstimmt. Demgegenüber ließen sich in 64 Proben (80%) ein oder mehrere MC1R-SNPs (≥ 1 Variante) nachweisen. Dabei zeigten 60% (n=48) der Tumorpatienten nur eine Variante und 20% (n=16) zwei MC1R-SNPs. Mehr als zwei SNPs konnten bei dem untersuchten Patientenkollektiv nicht nachgewiesen werden (s. Tab. 16).

Tabelle 16: Zusammenfassung der Sequenzanalyse von MC1R aus der isolierten Tumor-DNA des Primärtumors

Gen	Variante	Anzahl	Häufigkeit in %
<i>MC1R</i>	Konsensus	16	20
	1	48	60
	2	16	20
nicht amplifizierbar	-	10	

Bei den untersuchten SNPs führten die Nukleotidwechsel zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz. Der am häufigsten beobachtete SNP war R151C in Fragment II, ein Basenaustausch von Cytosin durch Thymin. Er veränderte die Aminosäuresequenz von Arginin (Codon CGC) zu Cystein (Codon TGC). Dieser SNP wurde in 31 Proben (38,75%) nachgewiesen (s. Abb.12). Bei zwei Patienten zeigte sich in der Tumor-DNA ein homozygotes Auftreten, bei den anderen lag die genetische Veränderung in heterozygoter Form vor.

Abbildung 12: Ausschnitt der Basenabfolge des sequenzierten DNA-Fragments II



Die Abbildung zeigt einen Konsensustyp, die Referenzsequenz zur Kontrolle und den Polymorphismus R151C in heterozygoter Form. **Grün:** Adenin, **Blau:** Cytosin, **Rosa:** Thymin, **Schwarz:** Guanin

Im Fragment II trat als zweithäufigster SNP R160W auf [CGG (Arginin) => TGG (Tryptophan)]. Er ließ sich in 15 Proben (18,75%) detektieren. Dabei zeigte sich einmalig ein homozygotes Auftreten.

Bei 12 Melanompatienten (15%) war der SNP V60L nachweisbar (Fragment I), der durch den Basenaustausch von Guanin durch Thymin [GTG (Valin) => TTG (Leucin)] gekennzeichnet war. Diese genetische Veränderung zeigte sich bei drei Patienten in homozygoter Form.

Der Nachweis des im Fragment II vorhandenen SNP R163Q [CGA (Arginin) => CAA (Glutamin)] und des im Fragment I vorkommenden SNP V92M [GTG (Valin) => ATG (Methionin)] gelang in 11,25% (n=9) und 8,75% (n=7) der DNA-Proben. Der SNP D294H [GAC (Asparaginsäure) => CAC (Histidin)] wurde in vier Fällen (5%) beobachtet. D84E [GAC (Asparaginsäure) => GAA (Glutaminsäure)] bzw. I155T [ATC (Isoleucin) => ACC (Threonin)] konnte jeweils einmalig detektiert (1,25%) werden. Diese SNPs waren alle heterozygot. Der in Fragment II auftretende Polymorphismus R142H [CGC(Arginin) => CAC (Histidin)] wurde in keiner der isolierten Tumor-DNA-Proben nachgewiesen (s. Tab.17).

Tabelle 17: Zusammenfassung aller untersuchten MC1R-Einzelnukleotid-Polymorphismen der isolierten Tumor-DNA

SNP	Fragment	Anzahl	Prozent in %	Basen-Austausch	Homozygot
R151C	II	31	38,75	C => T	2
R160W	II	15	18,75	C => T	1
V60L	I	12	15	G => T	3
R163Q	II	9	11,25	G => A	0
V92M	I	7	8,75	G => A	0
D294H	III	4	5	G => C	0
D84E	I	1	1,25	C => A	0
I155T	II	1	1,25	T => C	0
R142H	II	0	0	-	-

C: Cystein, D: Asparaginsäure, E: Glutaminsäure, H: Histidin, I: Isoleucin, L: Leucin, M: Methionin, Q: Glutamin, R: Arginin, T: Threonin, V: Valin, W: Tryptophan

3.4. Ergebnisteil der somatischen Mutationen

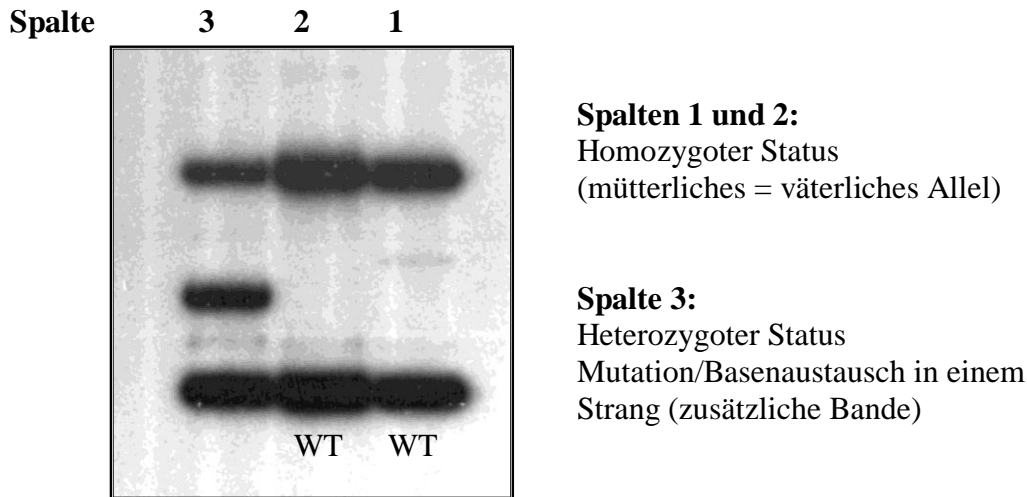
3.4.1. Ergebnisse der SSCP-Analyse mit PAGE für B-raf, Exon 15

Die Region, die die relevante Mutation in Exon 15 beherbergt, wurde in einem Fragment (Länge: 209bp) amplifiziert. Neun Proben ließen sich nicht vervielfältigen. Hierfür war die unzureichende DNA-Qualität aus den Paraffingewebeblöcken verantwortlich. Für die restlichen 81 Proben konnten Amplifikations- und Sequenzierergebnisse erzielt werden.

Dabei wurden die zusätzlichen Bandenmuster, die lediglich Sequenzänderungen in einem Strang darstellen, weiter untersucht (sequenziert).

Es zeigte sich in der SSCP-Analyse in 17 Fällen ein aberrantes Bandenmuster im PAGE-Gel. Die direkte Sequenzierung der einzelnen Banden identifizierte einen Basenaustausch von Thymin zu Adenin (T => A) (s. Abb. 6 & 13).

Abbildung13: Ausschnitt eines B-raf-SSCP Autoradiogramm des 209bp-langen Fragments



Elektrophoretische Mobilitätsänderung: Spalte 3 zeigt ein verändertes Laufverhalten mit einer zusätzliche Bande durch eine Nukleotidveränderung in der Primärsequenz eines DNA-Stranges (heterozygoter Wechsel von GTG zu GAG). Die 1. und 2. Reihe zeigen das Wanderungsmuster des Wildtyps (WT).

3.4.2. Ergebnisse der SSCP-Analyse mit PAGE für N-ras, Exon 2

Die Region, die die relevante Mutation beherbergt, wurde in einem Fragment mit einer Länge von 110bp amplifiziert. Die Vervielfältigung von sieben Proben war nicht erfolgreich. Hierfür war wiederum die unzureichende DNA-Qualität aus den Paraffingewebeblöcken verantwortlich. Für die restlichen 83 Proben konnten Amplifikations- und später Sequenzierungsergebnisse erzielt werden.

In 10 Fällen zeigte sich ein aberrantes Bandenmuster im PAGE-Gel. Die direkte Sequenzierung der einzelnen Banden detektierte mehrere Basenwechsel am Codon 61 des Exons 2. Dabei trat der Basenaustausch von Cytosin zu Adenin (C => A) am häufigsten auf (6x). Der Basenaustausch von Adenin zu Guanin (A => G) konnte dreimal identifiziert werden. Einmalig trat der Basenwechsel von Adenin zu Thymin (A => T) auf.

3.4.3. Sequenzanalyse und Auswertung von B-raf, Exon 15

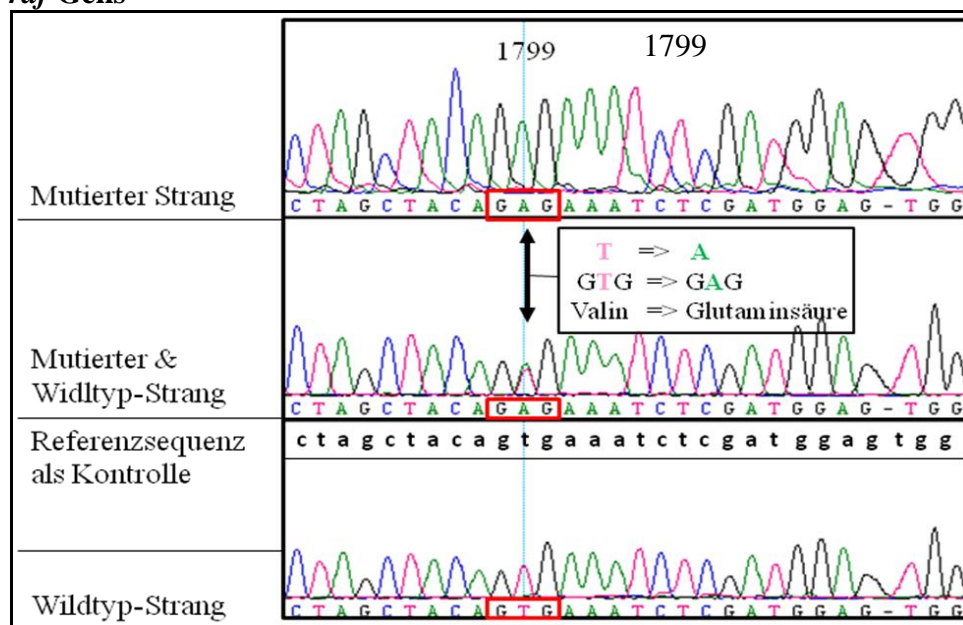
64 Patienten (79,01%) zeigten bei der Sequenzauswertung den Wildtyp. Dieser entspricht der Standardvariante in der Normalbevölkerung ohne Mutation. Somatische B-raf Mutationen wurde in 20,99% in den Primärmelanomproben gefunden (n=17). Dabei wurden die

Mutationen an dem Hot Spot des Exons 15, am Codon 600, beobachtet. Bei diesen 17 Melanompatienten zeigte sich ein heterozygoter Basenaustausch von Thymin durch Adenin mit einem Aminosäurewechsel von Valin zu Glutaminsäure [GTG (V) => GAG (E)], eine somatische Punktmutation (V600E). Da es sich bei *B-raf* um ein mutiertes, dominantes Onkogen handelt, reicht das Vorhandensein eines modifizierten Allels für die Ausbildung eines veränderten Proteins aus (s. Tab. 18 & Abb. 14).

Tab. 18: Zusammenfassung der Sequenzanalyse von *B-raf* aus der isolierten Tumor-DNA des Primärtumors

Gen	Variante	Anzahl	Häufigkeit in %
<i>B-raf</i>	Wildtyp	64	79,01
	Mutation (V600E)	17	20,99
nicht amplifizierbar	-	9	

Abbildung14: Ausschnitt von Basenabfolgen der einzelnen sequenzierten Stränge des *B-raf* Gens



Die Abbildung zeigt die Sequenzen der Einzelstrang- und der Referenzsequenz. Es sind die somatischen Mutationen, die Sequenz des Wildtyps und die Referenzsequenz zur Kontrolle dargestellt. Die mittlere Darstellung zeigt die Sequenz des mutierten und des Wildtyp-Stranges aufgrund der dicht beieinander liegenden und gemeinsam sequenzierten Banden in einer Analyse.

Grün: Adenin, **Blau:** Cytosin, **Rosa:** Thymin, **Schwarz:** Guanin

3.4.4. Sequenzanalyse und Auswertung von N-ras, Exon 2

73 Patienten (87,95%) zeigten bei der Sequenzauswertung den Wildtyp. In 12,05% wurden somatische N-ras Mutationen in den Primärmelanomproben gefunden (n=10). Alle Mutationen wurden an der häufigsten und typischen Lokalisation für das kutane Melanom nachgewiesen, in Exon 2, am Codon 61 (Omholt et al., 2002, Schubbert et al., 2007).

Dabei zeigten die 10 Melanompatienten jedoch unterschiedliche Basenwechsel. In sechs Fällen wurde die Umwandlung von Cytosin zu Adenin mit dem Aminosäurewechsel von Glutamin zu Lysin gefunden (CAA => AAA). In drei Fällen führte der Basenaustausch von Adenin zu Guanin zum Aminosäurewechsel von Glutamin zu Arginin (CAA => CGA) sowie bei einem Patienten von Adenin zu Thymin und damit zur Aminosäure Leucin (CAA => CTA) (s. Tab.19 & Abb.15).

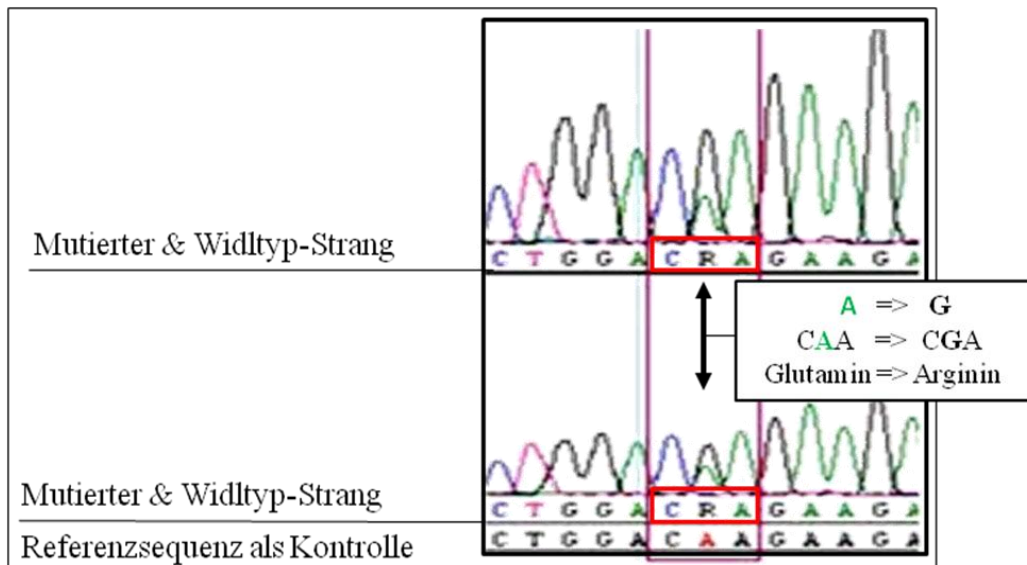
In der untersuchten Patienten-DNA lagen die jeweiligen genetischen Veränderungen in heterozygoter Form vor. Da es sich bei *N-ras* um ein mutiertes Onkogen handelt, das gewöhnlich dominant ist, reicht das Vorhandensein eines modifizierten Allels für die konstante Aktivierung des Proteins aus.

Tabelle 19: Zusammenfassung der Sequenzanalyse von N-ras aus der isolierten TumordNA des Primärtumors

Gen	Variante	Anzahl	Häufigkeit in %
<i>N-ras</i>	Wildtyp	73	87,95
	Mutation	10	12,05
	Q > K	6	(60 %)
	Q > R	3	(30 %)
	Q > L	1	(10 %)
nicht amplifizierbar	-	7	

K: Lysin, L: Leucin, Q: Glutamin, R: Arginin

Abbildung 15: Ausschnitt von Basenabfolgen der einzelnen sequenzierten Stränge des N-ras Gens



Die Abbildung zeigt die Sequenzen der Einzelstrang- und der Referenzsequenz. Es sind die somatischen Mutationen, die Sequenz des Wildtyps und die Referenzsequenz zur Kontrolle dargestellt. Die obere und mittlere Darstellung zeigt die Sequenz des mutierten und des Wildtyp-Stranges aufgrund der dicht beieinander liegenden und gemeinsam sequenzierten Banden in einer Analyse.

Grün: Adenin, **Blau:** Cytosin, **Rosa:** Thymin, **Schwarz:** Guanin

3.5. Korrelation von MC1R-Einzelnukleotidpolymorphismen und somatischen B-raf und N-ras Mutationen

Nachdem die 90 Proben der Primärmelanompatienten sowohl auf SNPs in *MC1R* als auch auf somatische Mutationen in *B-raf* und *N-ras* untersucht wurden, folgte die Analyse der Korrelation zwischen den genetischen Varianten.

3.5.1. Korrelation von MC1R und B-raf

Es wurden in 72 Tumorproben die kombinierten Genotypen von MC1R-SNPs und B-raf Mutationen detektiert. Es konnten nur die Proben in die Korrelationsbestimmung einbezogen werden, die erfolgreich amplifiziert wurden. Für 18 Proben war das nicht möglich [MC1R: 10 na, B-raf: 9 na, ein Patient (ID 14) bei dem MC1R sowie B-raf nicht amplifizierbar war => 18 na] (s. Tab. 20).

Tabelle20: Darstellung der Häufigkeit des Konsensustyps bzw. der SNPs in *MC1R* und der Häufigkeit des Wildtyps bzw. der Mutation in *B-raf* nach Ausschluss der nichtamplifizierbaren Proben

Gen	Varianten	Anzahl	Häufigkeit in %
<i>MC1R</i>	Konsensus	15	20,83
	1	42	58,33
	2	15	20,83
	≥ 1	57	79,17
<i>B-raf</i>	Wildtyp	57	79,17
	V600E	15	20,83
Korrelationsbestimmung		72 (na: 18)	

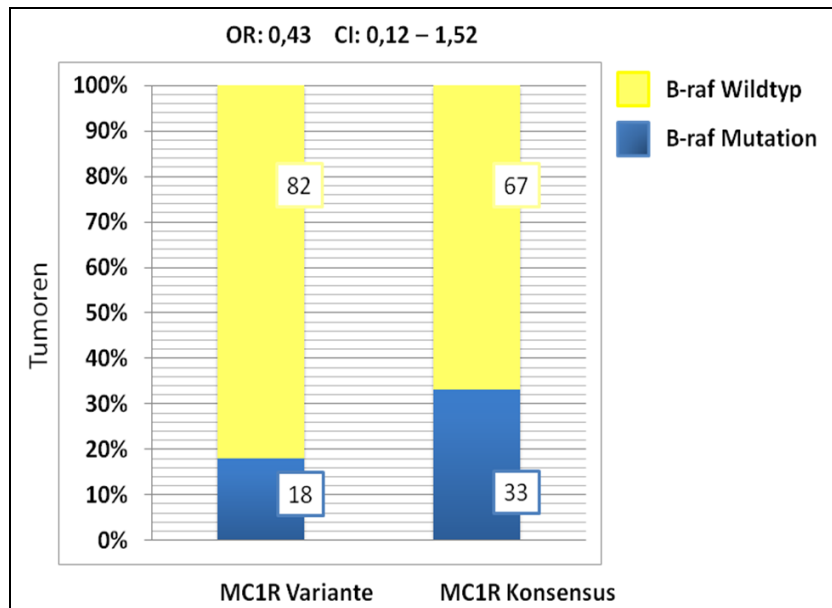
na = nicht amplifizierbar

Von den 57 Fällen, die mindestens einen oder mehrere MC1R-SNPs aufwiesen (≥ 1 Variante), trugen nur 10 Patienten gleichzeitig eine somatische Mutation im *B-raf* Gen. Damit zeigten beide Risikofaktoren, mutiertes *B-raf* Gen und *MC1R*-SNP, in 18% eine gemeinsame Präsenz. 47 Proben (82%) wiesen den Wildtyp (keine Mutation in *B-raf*) bei positivem Nachweis von mindestens einem SNP auf. Im Gegensatz dazu waren 15 Melanompatienten (20,83%), die als MC1R-Konsensussequenz analysiert wurden, in fünf Fällen (33%) Träger der B-raf Mutation. 67% (n=10) zeigten weder einen SNP noch eine Mutation (s. Tab. 20 & 21).

Die Patienten, die mindestens einen MC1R-SNP trugen, wiesen in 18% gleichzeitig eine Mutation im *B-raf* Gen auf. Dagegen wurde in 33% der Patienten, die keine MC1R Variante

trugen, eine Mutation in *B-raf* gefunden [Odds Ratio (OR): ~ 0,43; Konfidenzintervall (CI): 0,12-1,52; P-Wert = 0,18] (s. Abb. 16).

Abbildung 16: Graphische Darstellung der Verteilung der Mutationen im *B-raf* Gen von Trägern und Nicht-Trägern (Konsensus) der *MC1R* Varianten



OR: Odds Ratio, CI: Konfidenzintervall

3.5.2. Korrelation von *MC1R* und *N-raf*

In 73 Tumorproben konnten die kombinierten Genotypen von *MC1R*-SNPs und *N-ras* Mutationen untersucht werden. Es konnten nur die Proben miteinander in Korrelation gesetzt werden, die erfolgreich amplifiziert wurden. Für 17 Proben war die Korrelationsbestimmung nicht möglich (*MC1R*: 10 na, *N-ras*: 7 na, keine Überschneidung, na => 17) (s. Tab. 22).

Tabelle 22: Darstellung der Häufigkeit des Konsensustyps bzw. der SNPs in *MC1R* und der Häufigkeit des Wildtyps bzw. der Mutation in *N-ras* nach Ausschluss der nichtamplifizierbaren Proben

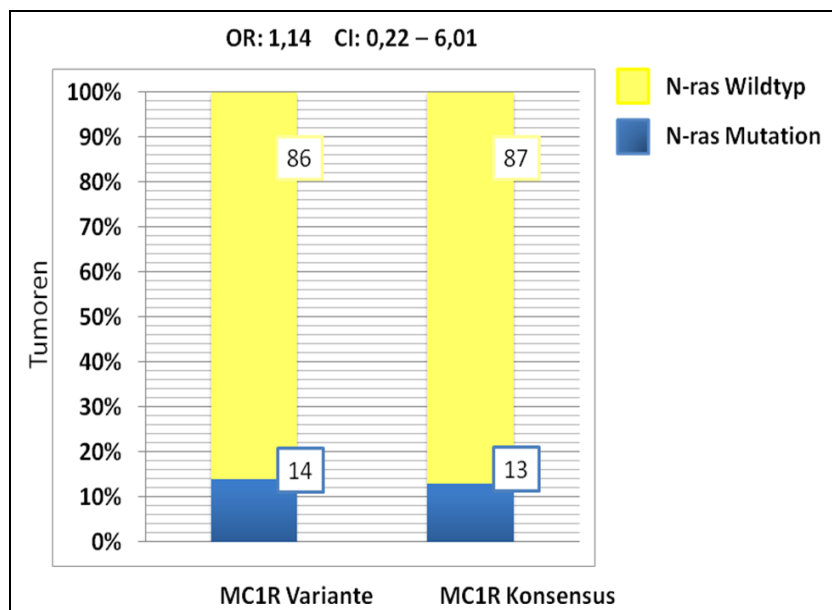
Gen	Varianten	Anzahl	Häufigkeit in %
<i>MC1R</i>	Konsensus	16	21,92
	1	42	57,53
	2	15	20,55
	≥ 1	57	78,08
<i>N-ras</i>	Wildtyp	63	86,30
	Mutation	10	13,70
Korrelationsbestimmung		73 (na: 17)	

na = nicht amplifizierbar

Von den 57 Fällen, die mindestens einen oder mehrere MC1R-SNPs aufwiesen (≥ 1 Variante), trugen acht Patienten (14%) gleichzeitig eine somatische Mutation im *N-ras* Gen. 49 Proben (86%) wiesen den Wildtyp bei positivem Nachweis von mindestens einem SNP auf. Im Gegensatz dazu waren 16 Melanompatienten (21,92%), die als Konsensussequenz analysiert wurden, in zwei Fällen (13%) Träger der *N-ras* Mutation. 14 Patienten (87%) zeigten weder einen SNP noch eine Mutation (s. Tab. 21 & 22).

Bei Patienten, die einen MC1R-SNP trugen, wurde in 14% gleichzeitig eine Mutation im *N-ras* Gen gefunden, während 13% der Nicht-Träger von MC1R-SNPs Mutationen im *N-ras* Gen aufwiesen (OR: $\sim 1,14$; CI: 0,22-6,01; P-Wert = 0,88) (s. Abb. 17).

Abbildung 17: Graphische Darstellung der Verteilung der Mutationen im *N-ras* Gen von Trägern und Nicht-Trägern (Konsensus) der *MC1R* Varianten



OR: Odds Ratio, CI: Konfidenzintervall

3.6. Korrelation zwischen den klinischen Daten und MC1R bzw. B-raf

Die Korrelationsbestimmung konnte in 80 Tumorproben für die Genotypen der MC1R-SNPs und die klinischen Daten (Geschlecht, Mortalität, Ulzerations- und Metastasenstatus) des Patientenkollektivs vorgenommen werden. 16 Patienten zeigten den Konsensustyp und 64 hatten mindestens einen SNP in *MC1R*. Für *B-raf* war die Bestimmung in 81 Fällen möglich. Bei 17 Proben wurden somatische Mutationen nachgewiesen und 64 hatten den Wildtyp. Es konnten nur Proben einbezogen werden, die erfolgreich amplifiziert wurden. Für das *MC1R*-Gen scheiterte die Amplifikation in 10 Proben und für *B-raf* in 9 Proben.

3.6.1. MC1R bzw. B-raf und die Geschlechtsverteilung

Durch die fehlende Amplifikation einiger Proben wurden bei der Korrelationsbestimmung für MC1R drei Frauen (n=34) und sieben Männer (n=46) ausgeschlossen. Bei B-raf waren es drei Frauen (n=34) und sechs Männer (n=47) (s. Tab. 23).

Tabelle 23: Darstellung der Häufigkeit des Konsensustyps bzw. der SNPs in *MC1R* und der Häufigkeit des Wildtyps bzw. der Mutation in *B-raf* sowie die Geschlechtsverteilung innerhalb des Patientenkollektivs nach Ausschluss der nichtamplifizierbaren Proben

Gen	Varianten	Anzahl	Häufigkeit in %
<i>MC1R</i>	Konsensus	16	20,00
	SNP (≥ 1)	64	80,00
Geschlecht	Frauen	34 (von 37)	42,50
	Männer	46 (von 53)	57,50
Korrelationsbestimmung		80 (na: 10)	
<i>B-raf</i>	Wildtyp	64	79,01
	Mutation	17	20,99
Geschlecht	Frauen	34 (von 37)	41,98
	Männer	47 (von 53)	58,02
Korrelationsbestimmung		81 (na: 9)	

na = nicht amplifizierbar

Von den 34 Frauen wiesen 27 mindestens einen oder mehrere MC1R-SNPs auf (≥ 1 Variante). Damit zeigten beide Faktoren, weibliches Geschlecht und das Auftreten von MC1R-SNPs in 79% eine gemeinsame Präsenz. Sieben Proben der Frauen (21 %) wiesen den Konsensustyp auf. Von 46 Männern waren 37 Träger (80%) mindestens eines MC1R-SNP. Neun Männer (20%) hatten den Konsensustyp (OR: $\sim 0,94$; CI: 0,31-2,83; P-Wert = 0,91) (s. Tab. 24).

Von den 34 Frauen wiesen sieben gleichzeitig eine somatische Mutation im *B-raf* Gen auf. Das entspricht einer gemeinsamen Präsenz von 21%. 27 Proben der Frauen (79%) zeigten den Wildtyp. Von 47 Männern waren 10 Träger (21%) einer Mutation im *B-raf* Gen. 37 Männer (79%) entsprachen dem Wildtyp (OR: $\sim 0,96$; CI: 0,32-2,84; P-Wert = 0,94) (s. Tab. 25).

3.6.2. MC1R bzw. B-raf und die Mortalität

Die fehlende Amplifikation der Gene hatte keine Auswirkung auf die Anzahl der am MM verstorbenen Patienten. Alle 29 Patienten wurden der Korrelationsbestimmung unterzogen. Jedoch konnten bei den Lebenden für *MC1R* nur 51 Patienten und für *B-raf* nur 52 Patienten miteinbezogen werden (s. Tab. 26).

Tabelle 26: Darstellung der Häufigkeit des Konsensustyps bzw. der SNPs in *MC1R* und der Häufigkeit des Wildtyps bzw. der Mutation in *B-raf* sowie die Verteilung des Mortalitätsstatus

Gen	Varianten	Anzahl	Häufigkeit in %
<i>MC1R</i>	Konsensus	16	20,00
	<i>SNP</i> (≥ 1)	64	80,00
Verstorben am MM	Ja	29	32,20
	Nein	51 (von 61)	67,80
nicht amplifizierbar		10	
<i>B-raf</i>	Wildtyp	64	79,01
	Mutation	17	20,99
Verstorben am MM	Ja	29	32,20
	Nein	52 (von 61)	67,80
nicht amplifizierbar		9	

Von 29 Patienten, die an einem MM verstarben, wiesen 23 (77%) gleichzeitig mindestens einen oder mehrere *MC1R*-SNPs auf (≥ 1 Variante) auf. Sechs Verstorbene (23%) zeigten den Konsensustyp. Von 51 Patienten, die zum Zeitpunkt der retrospektiven Datenerhebung noch lebten, waren 41 Patienten (80%) Träger mindestens eines *MC1R*-SNP. Die restlichen waren Konsensustyp (n=10, 20%) (OR: $\sim 0,82$; CI: 0,28-2,45; P-Wert = 0,72) (s. Tab. 24).

Von 29 Patienten, die am MM verstarben, hatten neun (31%) gleichzeitig eine somatische Mutation im *B-raf* Gen. 20 Proben der 29 Verstorbenen (69%) zeigten den Wildtyp. Von 52 Patienten, die zum Zeitpunkt der retrospektiven Datenerhebung noch lebten, waren acht Patienten (17%) Träger einer *B-raf* Mutation. Die restlichen 44 Erkrankten (83%) entsprachen dem Wildtyp (OR: $\sim 2,15$; CI: 0,74-6,24; P-Wert = 0,15) (s. Tab. 25).

3.6.3. *MC1R* bzw. *B-raf* und der Ulzerationsstatus

Durch die bereits erwähnte fehlende Amplifikation einiger Proben wurden bei der Korrelationsbestimmung zwischen Ulzeration und *MC1R* vier Patienten (n=31) mit Ulzeration und sechs Patienten (n=49) ohne Ulzeration ausgeschlossen. Bei *B-raf* waren es ein Patient mit Ulzeration (n=34) und acht Patienten ohne Ulzeration (n=47) (s. Tab. 27).

Tabelle 27: Darstellung der Häufigkeit des Konsensustyps bzw. der SNPs in *MC1R* und der Häufigkeit des Wildtyps bzw. der Mutation in *B-raf* sowie die Verteilung des Ulzerationsstatus

Gen	Varianten	Anzahl	Häufigkeit in %
<i>MC1R</i>	Konsensus	16	20
	SNP (≥ 1)	64	80
Ulzeration	Ja	31 (von 35)	38,80
	Nein	49 (von 55)	61,30
Korrelationsbestimmung		80 (na: 10)	
<i>B-raf</i>	Wildtyp	64	79,01
	Mutation	17	20,99
Ulzeration	Ja	34 (von 35)	41,98
	Nein	47 (von 55)	58,02
Korrelationsbestimmung		81 (na: 9)	

na = nicht amplifizierbar

Von 31 Fällen, die histopathologisch eine Ulzeration aufwiesen, zeigten 24 Patienten mindestens einen oder mehrere *MC1R*-SNPs (≥ 1 Variante). Damit zeigten beide Faktoren, positiver Ulzerationsstatus und Nachweis eines *MC1R*-SNP in 77% der Fälle eine gemeinsame Präsenz. Sieben Proben mit histopathologischem Nachweis einer Ulzeration (23%) hatten den Konsensustyp. Von den 49 Melanomen ohne Ulzeration wiesen 40 (82%) mindestens einen *MC1R*-SNP auf. Neun Patienten (18%) ohne Ulzeration waren Konsensustyp (OR: $\sim 0,77$; CI: 0,25-2,34; P-Wert = 0,65) (s. Tab. 24).

Von 34 Patienten, bei denen histopathologisch der Nachweis einer Ulzeration erfolgte, wiesen acht Patienten (24%) gleichzeitig eine somatische Mutation in *B-raf* auf. 26 Patienten mit positivem Ulzerationsstatus (76%) zeigten den Wildtyp. Von 47 Melanompatienten, die histopathologisch keine Ulzeration hatten, waren neun Proben (19%) Träger einer Mutation in *B-raf*. 38 Patienten (81%) ohne Ulzeration entsprachen dem Wildtyp (OR: $\sim 1,29$; CI: 0,44-3,81; P-Wert = 0,63) (s. Tab. 25).

3.6.4. *MC1R* bzw. *B-raf* und der Metastasenstatus

Durch die fehlende Amplifikation einiger Proben wurden bei der Korrelationsbestimmung für *MC1R* drei Patienten mit Nachweis von Fernmetastasen (n=25) und sieben ohne Nachweis von Fernmetastasen (n=55) ausgeschlossen. Bei *B-raf* waren es vier mit positivem Metastasenstatus (n=24) und fünf Patienten ohne Metastasen (n=57) (s. Tab. 28).

Tabelle 28: Darstellung der Häufigkeit des Konsensustyps bzw. der SNPs in *MC1R* und der Häufigkeit des Wildtyps bzw. der Mutation in *B-raf* sowie die Verteilung des Metastasenstatus (M1)

Gen	Varianten	Anzahl	Häufigkeit in %
<i>MC1R</i>	Konsensus	16	20
	SNP (≥ 1)	64	80
Metastasen (M1)	Ja	25 (von 28)	27,80
	Nein	55 (von 62)	61,10
Korrelationsbestimmung		80 (na: 10)	
<i>B-raf</i>	Wildtyp	64	79,01
	Mutation	17	20,99
Metastasen (M1)	Ja	24 (von 28)	26,70
	Nein	57 (von 62)	63,30
Korrelationsbestimmung		81 (na: 9)	

na = nicht amplifizierbar

Von 25 Patienten, die klinisch eine Metastase aufwiesen, zeigten 18 Patienten mindestens einen oder mehrere *MC1R*-SNPs (≥ 1 Variante). Damit zeigten beide Faktoren, positiver Nachweis einer Metastase und Nachweis eines *MC1R*-SNP in 72% eine gemeinsame Präsenz. Sieben Proben (28%) mit dem Nachweis einer Metastase hatten den Konsensustyp. Von 55 Melanompatienten ohne Metastasierung wiesen 46 (84%) mindestens einen *MC1R*-SNP auf. Neun Patienten (16%) ohne Metastasierung waren Konsensustyp (OR: $\sim 0,50$; CI: 0,16-1,55; P-Wert = 0,23) (s. Tab. 24).

Von den 24 Patienten, bei denen klinisch der Nachweis einer Metastasierung erfolgte, hatten neun Patienten (37%) gleichzeitig eine somatische Mutation in *B-raf*. 15 Patienten mit Metastasierung (63%) zeigten den Wildtyp. Von 57 Erkrankten, die keine Metastasierung aufwiesen, waren acht (14%) gleichzeitig Träger einer Mutation im *B-raf* Gen. 49 Patienten ohne klinischen Nachweis einer Metastasierung (86%) entsprachen dem Wildtyp (OR: $\sim 3,68$; CI: 1,21-11,19; P-Wert = 0,018) (s. Tab. 25).

4. Diskussion

Die vorgestellte Arbeit befasste sich zunächst mit der retrospektiven Auswertung der klinischen Daten von 90 Patienten mit einem malignen Melanom (MM). Anschließend wurde die mögliche Korrelation zwischen MC1R-Einzelstrangpolymorphismen (SNPs) und *B-raf* bzw. *N-ras* Mutationen der Patienten untersucht. Am Ende erfolgte die Korrelationsbestimmung der Ergebnisse der Genanalyse mit den klinischen Daten.

4.1. Klinische Patientencharakteristika

In dieser Studie weicht das Patientenalter bei Erstdiagnose des MM im Vergleich zu früheren epidemiologischen Daten geringfügig ab. Das Robert-Koch-Institut gibt für Frauen ein durchschnittliches Erkrankungsalter von 59 Jahren und für Männer von 61 Jahren an (Robert Koch Institut, 2004). Das saarländische Krebsregister gibt für den Zeitraum zwischen 1998 und 2002 ein mittleres Erkrankungsalter von 60 Jahren für Frauen und von 59 Jahren für Männer an (Hengge et al. 2006). In dem Patientenkollektiv dieser Studie erreichten beide Geschlechter ein höheres Durchschnittsalter. So lag der Mittelwert bei den weiblichen Patienten bei 68 Jahren und bei den Männern bei 64 Jahren. Es erkrankten zudem mehr Männer (58,9%) am MM als Frauen (41,1%), was nach den Angaben von GARBE und LEITER (2009) abweicht. Demnach erkranken in Europa häufiger Frauen.

Die höchste Erkrankungsrate an Melanomen findet sich in der Altersgruppe von 60 bis 69 Jahren. Nur ein einziger Patient erkrankte vor dem 40. Lebensjahr. Die Inzidenzraten nach GARBE *et al.* (2001) und LASITHIOTAKIS *et al.* (2006) wichen hiervon ab. Hier lag das Durchschnittsalter bei Erstdiagnose zwischen dem 50. und 60. Lebensjahr. 22% aller MM wurden vor dem 40. Lebensjahr entdeckt (Lasithiotakis et al., 2006).

Die häufigsten histologischen Subtypen des Primärtumors in diesem Patientenkollektiv waren das SSM und das NMM (87,8%). Der Anteil des NMM war hierbei deutlich höher (64,4%) als im üblichen Verteilungsmuster. Dies weicht von der klassischen Verteilung der histologischen Subtypen in der deutschsprachigen Bevölkerung ab, bei dem das SSM dominiert (57,4%) (Garbe et al., 1995b) (s. Tab. 2).

Die Lokalisation der untersuchten Primärtumoren verteilte sich entsprechend früherer Studienresultate. So manifestiert sich das MM bei Kaukasiern hauptsächlich auf der äußeren Haut aller möglichen Körperstellen (Kopf, Hals, Rumpf, obere und untere Extremität) (Garbe et al., 2005). In dieser Studie trat das MM bei ca. 54% der Frauen an der unteren Extremität und bei ca. 51% der Männer am Rumpf auf. Dieses klassische Verteilungsmuster der

Geschlechter entspricht dem typischen Lokalisationsmuster anderer Untersuchungen und wurde in zahlreichen Studien bestätigt (Garbe et al., 1995b, Katalinic et al., 2003).

Insgesamt wurde bei 48 Patienten des gesamten Kollektivs eine Wächterlymphknotenbiopsie (SLND) vorgenommen. Diese geringe Anzahl überrascht in Anbetracht der Tatsache, dass insgesamt 81 Personen eine Tumordicke von ≥ 1 mm aufwiesen. Internationale Publikationen empfehlen die Durchführung der SLND-Methode ab einer Tumordicke von 1mm (McMasters et al., 2001).

Bereits diagnostizierte Fernmetastasierungen könnten ursächlich für die geringe SLND-Anzahl dieser Studie sein, da eine Überprüfung des lokoregionären Lymphabflusses damit überflüssig wurde (n=4). Zudem gab es drei Patienten, die das Verfahren trotz ausführlicher Gespräche ablehnten. Ein weiterer Aspekt ergibt sich aus der Tatsache, dass zum damaligen Zeitpunkt eine Altersbegrenzung für das Verfahren der SLND in unserer Klinik bestand. Patienten über dem 75. Lebensjahr wurden bis 2007 keiner Lymphknotendisektion unterzogen (n=26).

Bei 25% der 48 SLN-Patienten konnte mindestens ein positiver Sentinel-Lymphknoten nachgewiesen werden. Dies entspricht den Angaben anderer Studien, in denen eine metastatische Absiedlung in ca. 20 bis 25% auftrat (pT1: 0%, pT2: 5,7%, pT3: 15,5% und pT4: 45,7%) (Gershenwald et al., 1999, Starz et al., 2001). Bei den anschließenden Lymphknotenausräumungen variieren die Angaben zum Nachweis von positiven Lymphknotenmetastasen erheblich. Es werden Angaben zwischen 2 bis 30% gemacht, die mit den Daten der hiesigen Arbeit (18,2%) übereinstimmen.

31% der untersuchten Patienten entwickelten Fernmetastastasen. Hauptabsiedlungsorte waren die Lunge, das Gehirn und die Leber. Das ist vergleichbar mit den Angaben von MEIER *et al.* (2002) und LEITER *et al.* (2004). Die Zeit von der Erstdiagnose des MM bis zur Entwicklung von Metastasen betrug für die Patienten dieser Studie im Median ein Jahr. Im Gegensatz dazu ermittelten FIFE *et al.* (2004), die von 1985 bis 2000 686 Melanompatienten in Sydney untersuchten, eine Zeitspanne von 3,7 Jahren im Median, wobei einschränkend anzumerken ist, dass die Autoren nur das Auftreten von zerebralen Metastasen untersuchten. Es muss bedacht werden, dass zerebrale Metastasen normalerweise bei Patienten mit einem MM nicht die ersten Fernabsiedlungen darstellen. Bei FIFE *et al.* (2004) könnte bereits eine extra-zerebrale Metastasierung stattgefunden haben, die in der Zeiterfassung nicht berücksichtigt wurde.

Das Gesamtüberleben mit Metastasierung betrug in unserem Kollektiv 10,5 Monate (Median). Es wurde keine Differenzierung zwischen viszeralen und nichtviszeralen Metastasen

vorgenommen. GARBE *et al.* (2005) geben eine mediane Überlebenszeit im Stadium IV von lediglich sechs bis neun Monaten an. Hingegen fanden BARTH *et al.* (1995) eine mediane Überlebenszeit bei nichtviszeralem Befall von 12,5 Monaten gegenüber viszeraler Metastasierung ohne Lungenbeteiligung von 4,4 Monaten. In diesen Studien wurden größere Patientengruppen untersucht (> 200 Personen).

Die genannten Abweichungen zur Literatur lassen sich im Wesentlichen durch die geringe Fallzahl (n=90) erklären. Außerdem kann das Einschlusskriterium einer Mindesttumordicke als ursächlich betrachtet werden. So wurden in dieser Studie Tumoren mit einem maximalen vertikalen Tumordurchmesser von ≥ 1 mm nach Breslow ausgewählt, die mit einem höheren Erkrankungsalter (fortgeschrittenes Stadium) einhergehen. Zudem weist das NMM bereits ein frühzeitiges Tiefenwachstum mit ggf. bereits stattgefundener Metastasierung und einer damit verbundenen schlechteren Prognose auf. Ein weiterer Aspekt stellt der deutlich kürzere Untersuchungszeitraum der vorliegenden Studie im Vergleich zu den anderen dar.

4.2. Molekulargenetische Tumorgenese

In den letzten Jahrzehnten wird versucht, die molekulargenetischen Zusammenhänge von Krebserkrankungen, wie z. B. die des MMs zu entschlüsseln, um effektive, kausale Therapiemöglichkeiten entwickeln zu können. Zahlreiche Bestrebungen beschäftigen sich mit der Identifikation krankheitsrelevanter Gene und ihrer DNA-Sequenzen mit möglichen Varianten. Der Nachweis einer angeborenen Prädisposition für eine Melanomerkrankung und die Beobachtung unterschiedlicher Krankheitsverläufe bei Patienten nach anfänglich gleichen Ausgangsstadien erhöhten das Interesse, genetische Varianten in Genen zu finden.

Die Idee zur Durchführung der genetischen Analyse des Primärmelanommaterials dieser Arbeit entstand aufgrund der Ergebnisse vorheriger Studien und Arbeitsgruppen. Diese genetischen Assoziationsstudien lieferten zum Teil widersprüchliche Aussagen zwischen der Häufigkeit von MC1R-Polymorphismen und somatischen Mutationen im *B-raf* und *N-ras* Gen von Tumorgewebe und Blutzellen. Sie lassen eine Heterogenität in der Melanogenese vermuten und werden anhand unserer Ergebnisse nachfolgend diskutiert.

In dieser Arbeit sollte eine mögliche Korrelation der SNPs des *MC1R* Gens bei gleichzeitigem Nachweis von *B-raf* Mutationen untersucht werden. Zusätzlich wurden der Einfluss und die mögliche Korrelation von *N-ras* zu *MC1R* untersucht.

4.2.1. Variabilität im menschlichen Genom durch SNPs

Eine wesentliche Grundlage zur systematischen Identifizierung von krankheitsrelevanten Genen bildete das 1990 begonnene internationale Human-Genom-Projekt (HGP), das 2001 mit der Celera Genomics Corporation nahezu alle DNA-Bausteine des menschlichen Genoms vollständig sequenziert hatte. Durch den Vergleich der Genome zweier beliebiger Individuen wurde die genetische Variabilität beschrieben (Chakravarti, 1999). Dazu zählen Basenaustausche, Insertionen (Einbau) und Deletionen (Verlust).

Polymorphismus leitet sich von dem griechischen Wort „Vielfältigkeit“ ab und bedeutet das Auftreten einer Genvariante innerhalb eines Allels in einer Population. Sie entstehen zu einem Teil durch einen einfachen Basenaustausch (SNP, single nucleotide polymorphism), von denen nach Schätzungen der internationalen „SNP-Map-Working-Group“ ungefähr 11 Millionen existieren. Definitionsgemäß treten Genvarianten in der menschlichen Population mit einer Allel-Frequenz von mindestens einem Prozent auf. Etwa 10 Millionen dieser SNPs sind bereits identifiziert (Sachidanandam et al., 2001, Hinds et al., 2005).

Während der Großteil der SNPs wahrscheinlich keinen Einfluss auf den Phänotypus nimmt, da sie häufig in nicht-kodierenden Regionen des Genoms (Introns) liegen, wirkt sich ein kleiner Teil hinsichtlich Krankheitsdispositionen phänotypisch aus. SNPs, die in der kodierenden Genregion lokalisiert sind und eine Änderung der Aminosäuresequenz hervorrufen, können die Struktur und damit die Funktion des kodierten Proteins verändern (den Dunnen and Antonarakis, 2001). Anzumerken ist, dass alle Aminosäuren von Basentriplets kodiert werden, so dass nicht jeder Basenaustausch in der DNA zwingend einen Aminosäureaustausch im Protein zur Folge hat.

Aufgrund der großen Anzahl vorhandener SNPs ist es besonders schwierig, diejenigen zu entschlüsseln, die bestimmte Erkrankungen kausal begünstigen. Zudem gibt es Vermutungen, dass sowohl bekannte SNPs als auch seltene Varianten Einfluss auf Phänotypen haben (Hinds et al., 2005).

4.2.2. Kutanes malignes Melanom und die Risikobeziehung zu *MC1R*

Der Zusammenhang zwischen Pigmentierungseigenschaften und Hautkrebsrisiko ist seit langem bekannt. Dennoch sind nicht alle genetischen Abweichungen, die zu einer Veränderung der Pigmentierung führen, automatisch mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko assoziiert. Die genetischen Veränderungen und das damit einhergehende Erkrankungsrisiko werden nicht nur über Pigmentierungseigenschaften vermittelt. Basierend auf verfügbaren Daten wurde versucht, diese Aussage zu bestätigen oder zu entkräften.

Das *MC1R*-Rezeptor Gen ist reich an Polymorphismen. Nach der Entdeckung unterschiedlicher Einzelnukleotidpolymorphismen in der kodierenden Region des humanen *MC1R* Gens, die einen Aminosäureaustausch induzieren, wurden unzählige SNPs in zahlreichen Studien auf ihre Eigenschaften untersucht (Garcia-Borron et al., 2005, Gerstenblith et al., 2007) und zeigten unterschiedliche funktionelle Auswirkungen.

Funktionelle Analysen von *MC1R* Varianten deckten eine ineffiziente Stimulation unterhalb des cAMP-Signalweges auf. Dabei reduzieren bestimmte SNPs die Aktivität des Rezeptors (Schioth et al., 1999, Beaumont et al., 2008).

Eine spezifische Subgruppeneinteilung der SNPs in die sogenannten „Rote-Haar-Farben-Varianten“ (RHC-Varianten, red hair colour) wurde deklariert. Diese Varianten sind entweder unfähig, den Liganden α -MSH zu binden oder die Adenylatzyklase zu aktivieren (Schioth et al., 1999). Phänotypisch resultieren daraus Veränderungen des Hautkolorits, der Haarfarbe (rote Haare), der Augenfarbe (blaue Augen), der Sensitivität gegenüber Sonne mit reduzierter Bräunungsfähigkeit und das Auftreten von Sommersprossen (Sulem et al., 2007, Beaumont et al., 2008). Die RHC-Varianten schließen folgende Polymorphismen ein: D84E, R142H, R151C, R160W und D294H und zeigten eine Odds Ratio für rotes Haar von mehr als 50 (Beaumont et al., 2007).

Die Assoziation von *MC1R* Varianten mit phänotypischen Eigenschaften und der Assoziation zum Melanomrisiko wurde in vielen, genomweiten Studien bestätigt (Fargnoli et al., 2006, Sulem et al., 2007, Han et al., 2008, Scherer et al., 2009).

In der deutschen Bevölkerung beträgt die Häufigkeit von *MC1R* Varianten ca. 60%. Unter deutschen Melanompatienten treten *MC1R* Varianten in 75% der Fälle auf (Scherer et al., 2009). In Übereinstimmung fand sich in dieser Studie eine ähnliche, leicht erhöhte Frequenz von *MC1R* Varianten. Es ließen sich in 80% der Melanome (n=64) SNPs in *MC1R* nachweisen. Das Vorliegen von multiplen *MC1R* Varianten konnte bei 20% der Patienten eruiert werden. Es wurden maximal zwei Varianten nachgewiesen.

Die Beteiligung der Varianten im *MC1R* Gen weist auf die sogenannte „Common Disease-Common Variant (Allel) Hypothese“ hin. Diese CD-CV Hypothese besagt, dass häufige Genvarianten (Frequenz > 1%), die in einer gesunden Population allein keine schädlichen Effekte oder klinischen Symptome hervorrufen, dennoch in der Lage sind, durch genetische Interaktionen oder durch Umwelteinflüsse Krebserkrankungen auszulösen oder deren Schwere zu beeinflussen (Becker, 2004, 2007).

Bei den 90 Patienten der hier vorliegenden Untersuchung zeigte sich eine Dominanz der R151C-RHC-Variante (39%, n=31), gefolgt von der RHC-Variante R160W (19%, n=15) und

dem nicht RHC-Polymorphismus V60L (15%, n=12). Der Anteil der RHC-Varianten betrug in der Studie insgesamt 64%.

MOSSNER *et al.* (2007) beschrieben eine signifikante Beziehung zwischen dem kutanen Melanomrisiko und den MC1R-RHC-Varianten R151C in einer deutschen Population. Zusätzlich zeigten sie eine Signifikanz zwischen dem Melanomrisiko und der MC1R-RHC-Variante D84E. Bei den Varianten R142H und R160W war das erhöhte Risiko nicht statistisch signifikant (Mossner *et al.*, 2007).

Nach HAN *et al.* (2006) wurde der R160W-Polymorphismus als Hauptrisikovariante des Melanoms in einer amerikanischen Population (n=219) beschrieben. Diese Studien könnten die Dominanz der Varianten R151C und R160W dieser Arbeit erklären. Von einem erhöhten Melanomrisiko aufgrund des Vorhandenseins bestimmter Varianten kann in dieser Arbeit nicht gesprochen werden, da der Vergleich zu einer Kontrollgruppe von Nicht-Erkrankten fehlt.

In Studien Südeuropas wurde unter Trägern der Nicht-RHC-Variante, V60L, ein erhöhtes Erkrankungsrisiko für ein MM nachgewiesen (Matichard *et al.*, 2004, Han *et al.*, 2006). Auch über eine stufenweise Reduktion der Häufigkeit von RHC-Varianten von Nord- nach Südeuropa wurde berichtet. Dabei zeigten Großbritannien und Irland das höchste und Griechenland das geringste Auftreten der RHC-Varianten (Gerstenblith *et al.*, 2007). SCHERER *et al.* (2009) zeigten einen signifikanten Unterschied mit erhöhtem Auftreten der RHC-SNPs in einer deutschen (n=512) im Vergleich zu einer spanischen (n=673) Population. Daher ist von einer Differenz der jeweiligen SNPs entsprechend der Länderzugehörigkeit auszugehen mit Zunahme der Nicht-RHC-Varianten und Abnahme der RHC-Varianten in Richtung des Äquators.

Da in dieser Arbeit die ursprüngliche Nationalität sowie phänotypische Erscheinungsbilder nicht berücksichtigt wurden, kann retrospektiv nicht geklärt werden, ob es sich um Patienten südeuropäischer Herkunft handelt oder der Phänotyp mit den RHC-Eigenschaften übereinstimmt.

Die berichteten Assoziationen von V60L-Varianten mit reduzierten Pigmentierungseigenschaften sind sehr gering. Dies lässt vermuten, dass die V60L-Nicht-RHC-Variante in die Rezeptor-Funktion unabhängig von der Pigmentierungseigenschaft eingreift und über andere Mechanismen zur Prädisposition des MMs führt.

Weitere Studien demonstrierten, dass die Assoziation zwischen MC1R Varianten und Hautkrebs nicht nur Folge des Funktionsverlustes des Rezeptors mit reduzierter

Hauptpigmentierung ist, sondern dass zusätzliche Prozesse durch die Varianten gestört sein müssen (Healy, 2004, Matichard et al., 2004).

Zusammenfassend muss davon ausgegangen werden, dass die Häufigkeit und die Art der Polymorphismen und damit das Risiko des Melanoms zwischen den Populationen erheblich variieren. Die Relevanz von *MC1R* und der Mechanismus, durch den seine Varianten das Erkrankungsrisiko beeinflussen, scheinen komplexer zu sein, als primär vermutet wurde. Wahrscheinlich spielen unzählige Interaktionen mit anderen genetischen und wirts-spezifischen Risikofaktoren eine Rolle. Dazu zählen vermutlich die Induktion der Signaltransduktion, das Auftreten einer verminderten Apoptose verbunden mit gesteigerter Proliferation, ineffektive DNA-Reparaturmechanismen, immunologische Prozesse sowie die Beeinflussung zusätzlicher Signalwege zum cAMP-Signalweg (Bohm et al., 2005). BOX *et al.* (2001) wiesen beispielsweise nach, dass bestimmte SNPs des *MC1R* Gens die Penetranz von CDKN2A-Mutationen positiv beeinflussen. Nach LANDI *et al.* (2006) und FARGNOLI *et al.* (2008) beeinflussen *MC1R*-SNPs auch die Penetranz von somatischen B-raf Mutationen. Dies untermauert die Wichtigkeit von *MC1R* als prädisponierendes Gen im MM über seine Pigmentationseigenschaften hinaus.

Trotz allem sollte das Konzept, dass der individuelle Genotyp (Pigmentationseigenschaften) hinweisend auf die Prädisposition sein könnte, nicht außer acht gelassen werden. Die Einschätzung des individuellen Risikos ist letztendlich abhängig von komplexen Interaktionen zwischen bekannten und unbekanntem Faktoren.

Das Mitwirken des Melanocortin-1-Rezeptors als Hauptgen für die Vielfalt der menschlichen Pigmentierung (Sturm, 2002) bleibt ein signifikanter Faktor in der Ätiologie des Melanoms.

4.2.3. Zusammenhang zwischen *MC1R*-Polymorphismen und Mutationen in *B-raf* und *N-ras* Genen

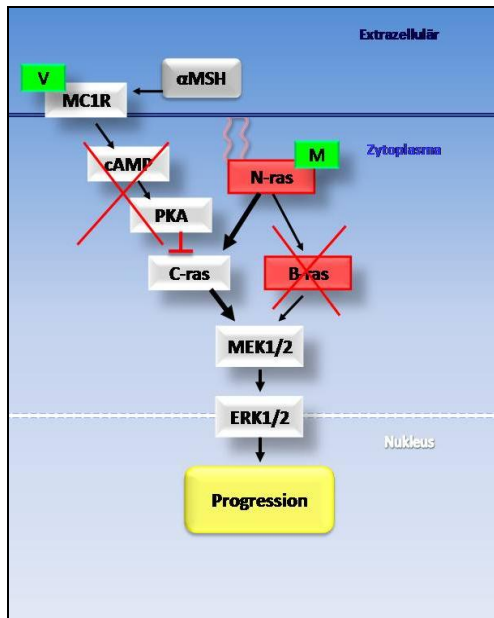
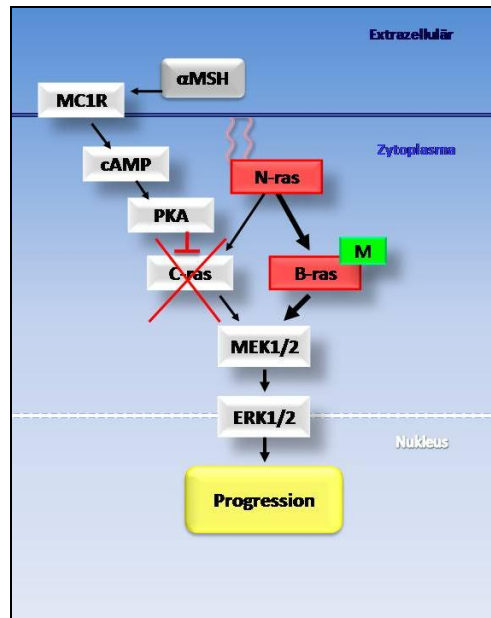
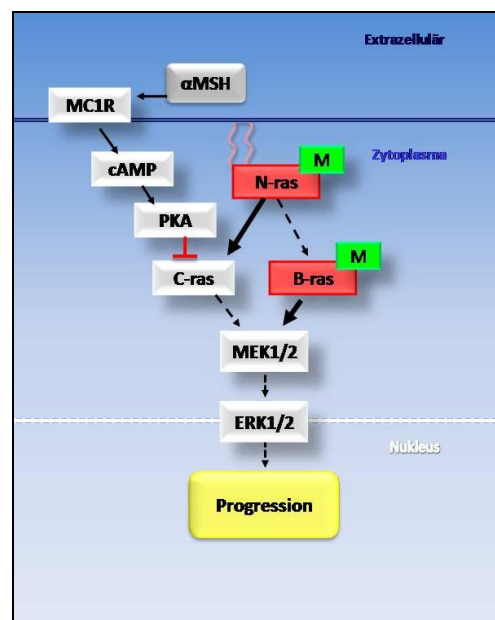
Die Signalwege, die beim Zellüberleben, bei der Proliferation und der Pigmentierung in Melanozyten involviert sind, sind sehr komplex miteinander verknüpft.

Die Wichtigkeit des RAS-RAF-MEK-ERK-Signalwegs in der Pathogenese des MMs zeigt sich durch häufige Unterbrechungen oder Änderungen innerhalb der Kaskade bedingt durch somatische Mutationen entweder in *N-ras* oder *B-raf* (Fecher et al., 2008).

In normalen Melanozyten ist der N-ras-Signalweg gewöhnlich über B-raf gerichtet. Der Weg läuft darüber, da B-raf ein stärkerer Aktivator der nachfolgenden Kaskade ist und es nur zwei Ras-abhängige Phosphorylierungsstellen zur Aktivierung im Vergleich zu C-raf besitzt (Marais et al., 1997, Chong et al., 2003).

In Melanomzellen, die eine N-ras Mutation beherbergen, wechselt die RAS-RAF-MEK-ERK-Kaskade vom Signalisieren über B-raf zu C-raf (Dumaz et al., 2006). C-raf wird normalerweise durch die Proteinkinase A (PKA) in normalen Melanozyten inaktiviert (Michaloglou et al., 2008). Der Wechsel des Signalisierens über C-raf kann demnach nur durch niedrige cAMP-Spiegel bewerkstelligt werden, um die durch die PKA vermittelte Inhibition von C-raf im Rahmen des MC1R-Signalwegs zu verhindern. An dieser C-raf-Anschlussstelle sind der RAS-RAF-MEK-ERK-Signalweg und der MC1R-Pigmentierungssignalweg über cAMP miteinander verbunden (Michaloglou et al., 2008). Als Konsequenz benötigen N-ras Mutationen eine simultane Unterbrechung des cAMP Signalweges unterhalb von MC1R. Die meisten MC1R-Polymorphismen sind mit reduziertem cAMP-Spiegel assoziiert. Folglich würden in Gegenwart von MC1R-SNPs die Unterdrückung von C-raf vermindert und das Signalisieren durch mutiertes N-ras erleichtert werden. Dies führt wahrscheinlich zur signifikant erhöhten Aktivität des RAS-(C)RAF-MEK-ERK-Signalweges (s. Abb. 2 & 18a). Schlussfolgernd ergibt sich daraus, dass die Gegenwart von MC1R-Polymorphismen zur Selektion von N-ras Mutationen beitragen. B-raf Mutationen scheinen dagegen unabhängig vom Vorhandensein von MC1R-Polymorphismen mit nachfolgender Unterbrechung des cAMP-Signalwegs zu sein und führen zu keinem Selektionsvorteil (Dumaz et al., 2006, Dhomen and Marais, 2007) (s. Abb. 18b).

Bemerkenswert ist die Vorstellung, dass das Auftreten von Mutationen in beiden Genen, *N-ras* und *B-raf*, gleichzeitig nicht möglich erscheint und wahrscheinlich zum gegenseitigen Ausschluss dieser Mutationen führt (s. Abb. 18c). GRAY-SCHOPFER *et al.* (2005) suggerieren diese Hypothese. Sie konstatieren, dass die Hyperaktivität des RAS-RAF-MEK-ERK-Signalweges durch N-ras Mutationen in Kombination mit dem Signalisieren über B-raf eher ein Zellzyklusarrest als eine Tumorprogression hervorrufen würde (Gray-Schopfer et al., 2005).

Abbildung 18: RAS-RAF-MEK-ERK-Signalkaskade in Melanomen**a) mit N-Ras Mutation****b) mit B-raf Mutation****c) mit B-raf und N-ras Mutation als Hypothese**

a) In Anwesenheit einer N-ras Mutation kommt es zu einem Wechsel des Sendens anstatt über B-raf über C-raf. Da MC1R Varianten mit einem niedrigen cAMP-Spiegel verbunden sind und somit mit einer geringeren PKA Aktivität einhergehen, würde eine C-raf Hemmung mittels PKA ausfallen und die Signalkaskade könnte ungehindert über C-raf ihren Lauf nehmen.

b) Beherbergung der B-raf Mutation in normalen Melanozyten genauso wie in MM. Die MEK Aktivierung wird von N-ras über B-raf aktiviert, während C-raf von der PKA gehemmt wird. In diesem Szenario würden die MC1R Varianten die Kaskade nicht beeinflussen, da N-ras primär über B-raf signalisiert (also fehlende Hemmung von C-raf über PKA ist unwesentlich).

c) Als Hypothese: In Gegenwart von N-ras und B-raf Mutationen würde es zum gegenseitigen Ausschluss kommen, da bei der B-raf Mutation die MEK-Aktivierung über B-raf erfolgt, bei N-ras Mutation jedoch die MEK Aktivierung über C-raf gelenkt wird, das von der PKA inhibiert wird.

Modifiziert nach Dhome, N. & Marais, R. aus der Zeitschrift *Curr Opin Genet Dev*, 2007 (17, 31-9)

4.2.4. MC1R-Polymorphismen und das Auftreten von somatischen Mutationen in *B-raf* und *N-ras* Genen

Die Ergebnisse der Genotyp-Verteilung in dieser Arbeit haben ein kontrastreiches Korrelationsmuster zwischen den Polymorphismen im *MC1R* Gen und Mutationen im *B-raf* und *N-ras* Gen aufgedeckt.

Die Ergebnisse der Arbeit stimmen teilweise mit den Zusammenhängen und Selektionsüberlegungen unter Kapitel 4.2.3 überein.

So lässt sich bei der Korrelationsanalyse zwischen *MC1R* und *B-raf* die These ableiten, dass bei Präsenz von mindestens einem MC1R-SNP (positiver Variantenträger) die Frequenz der somatischen *B-raf* Mutationen abnimmt, aber somatische *B-raf* Mutationen häufiger in erkrankten Individuen erscheinen, die die MC1R-Konsensussequenz tragen. Allgemein haben Melanompatienten, die MC1R Variantenträger sind, eine geringere Wahrscheinlichkeit eine *B-raf* Mutation zu bekommen. Diese Korrelationsaussage war jedoch statistisch nicht signifikant. Sie stellen lediglich eine richtungsweisende Tendenz dar. Eine Ursache könnte in der relativ kleinen Fallzahl und teilweise an nicht amplifizierbarem Tumorgewebsmaterial liegen.

Im Gegensatz dazu sollte sich nach den geschilderten Zusammenhängen ein gegenteiliger Effekt zwischen *N-ras* und *MC1R* ergeben. Diese Korrelation, dass bei Melanompatienten *N-ras* Mutationen bei MC1R Variantenträger häufiger erscheinen als bei jenen ohne einen MC1R-Polymorphismus, konnte nicht bestätigt werden. Es wurde kein Zusammenhang beobachtet.

In einer früheren Arbeit der Forschungsgruppen des DKFZ wurde eine Assoziation zwischen der Häufigkeit von MC1R Varianten und Mutationen in *B-raf* und *N-ras* Gen beobachtet. Diese Beobachtungen basierten lediglich auf Untersuchungen in Melanomzelllinien und wurden nicht separat für *B-raf* und *N-ras* durchgeführt (persönliche Mitteilung, Prof. Dr. Rajiv Kumar, 2007 DKFZ C050).

In dieser Arbeit wurde die Untersuchung auf Tumorgewebe ausgeweitet, welches in Paraffin eingebettet war. Dieses Gewebematerial reflektiert eine wesentlich realistischere Situation. Außerdem wurden in der jetzigen Analyse die kombinierten Genotypen der Individuen mit somatischen Mutationen im *N-ras* Gen und der Individuen mit somatischen Mutationen im *B-raf* Gen getrennt untersucht.

Auf mögliche Wirtsfaktoren wurde nicht eingegangen. Es fehlt die Differenzierung des Melanoms nach histologischen Subtypen. Ebenso wurde die Art der Sonnenschädigung (chronisch vs. intermittierend) nicht berücksichtigt.

Jüngste Studien konzentrierten sich auf die Analyse der Verbindung zwischen Keimbahn MC1R-Polymorphismen und der Häufigkeit von somatischen B-raf Mutationen in MM.

SCHERER *et. al.* (2010) führten parallel zur hiesigen Studie ebenfalls Korrelationsbestimmungen an Tumorgeweben von Melanompatien mit größeren Fallzahlen (n=220) durch. Dabei waren Patienten aus unserem Kollektiv, die erfolgreich genotypisiert wurden (MC1R/B-raf n=69, MC1R/N-ras n=71) mit eingeschlossen. Die Tendenz der Korrelationsbeziehung unserer Arbeit wurde statistisch signifikant für *MC1R* und *B-raf* bestätigt: MC1R-Polymorphismen verringern die Wahrscheinlichkeit der somatischen B-raf Mutationen bei Melanompatien im Gegensatz zu denjenigen, die keine MC1R Variante tragen. SCHERER konnte jedoch die von DUMAZ *et. al.* (2006) aufgestellte Schlussfolgerung nicht bestätigen, dass es in Gegenwart von MC1R-Polymorphismen zur Selektion von N-ras Mutationen kommt. Die Arbeitsgruppe zeigte lediglich Tendenzen, dass die Wahrscheinlichkeit der N-ras Mutationen in Anwesenheit eines MC1R-SNP in Melanomen steigt (Scherer *et al.*, 2010).

In anderen Studien, die sich ebenfalls auf die Analyse der Verbindung zwischen MC1R Varianten und *B-raf* konzentrierten, wurde von einem gegensätzlichen Effekt berichtet. Patienten, die mindestens einen MC1R-Polymorphismus trugen, hatten ein signifikant erhöhtes Risiko ein sporadisches Melanom zu entwickeln bei gleichzeitiger B-raf Mutation (Landi *et al.*, 2006).

LANDI *et al.* (2006) beobachteten eine starke Beziehung zwischen somatischen B-raf Mutationen und MC1R Varianten, die mit jungem Erkrankungsalter und nicht chronisch, sonnenexponierter Haut korreliert. Hier wurde in einer amerikanischen Patientengruppe, bestehend aus 92 Patienten, das Tumorgewebe von Lokalisation an nicht chronisch sonnenexponierter Haut auf genannte Mutationen lediglich in *B-raf* und SNPs untersucht (Landi *et al.*, 2006). Auf Untersuchungen der Prävalenz von N-ras Mutationen wurde in dieser Arbeit verzichtet.

Die gleiche Arbeitsgruppe untersuchte und bestätigte zwei Jahre später die Gemeinsamkeit zwischen MC1R-Polymorphismen und somatischen B-raf Mutationen an einer italienischen Population. Die Studie von 2008 bezog sich auf eine größere Fallzahl (n=257). Der Korrelationseffekt wurde hier unabhängig von Sonnenschäden, d.h. sowohl in Melanomen an chronisch sonnenexponierter als auch an nicht chronisch sonnenexponierter Haut gesehen (Fargnoli *et al.*, 2008).

Dieser Effekt wird dadurch erklärt, dass MC1R-Polymorphismen über die vermehrte Bildung von Phaeomelanin eine höhere Generation von Sauerstoffradikalen hervorrufen. Die Sauerstoffradikale induzieren DNA-Schäden, z.B. eine direkte Transversion von Thymin zu

Adenin. Dies entspricht der B-raf V600E Mutation (Basenaustausch von Thymin durch Adenin) und erklärt die positive Korrelation zwischen B-raf Mutationen und MC1R Varianten dieser Studie (Hacker and Hayward, 2008).

Weitere Studien versuchten auch eine Verbindung zwischen den Keimbahn-Polymorphismen in *MC1R* und den B-raf Mutationen herauszuarbeiten. HACKER *et al.* (2009) beobachteten keinen Zusammenhang zwischen dem MC1R-Status und der somatischen B-raf Mutation bzw. N-ras Mutation. Die Arbeitsgruppe analysierte die Gene an Primärtumormaterial des MM von 123 Australiern (Hacker et al., 2009). Zu identischen Ergebnissen kam eine Studie in North Carolina, USA. Die Untersuchungsgruppe umfasste 219 Patienten, deren Melanome wie in der Arbeit von LANDI *et al.* (2006) in solche an chronisch sonnenexponierter und in solche an nicht chronisch sonnenexponierter Haut eingeteilt wurden (Thomas et al., 2009).

Es gibt aktuell keine publizierte Studie, die sich ausschließlich mit der Untersuchung und dem Assoziationsnachweis von N-ras Mutationen und MC1R-SNPs in Tumorgewebe von MM beschäftigt.

Die Diskrepanz zwischen unseren und anderen Studienergebnissen spiegelt die Heterogenität des MM und seiner Pathogenese wieder. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Studien erklären sich möglicherweise dadurch, dass der risikomodifizierende Effekt der MC1R Varianten zwischen Populationen variiert, was auf Unkenntnis nicht identifizierter genetischer Faktoren basiert. Klimatische Unterschiede, z.B. die Sonnenexposition könnten auch die Verbindung zwischen dem MC1R- und dem B-raf-Status beeinflussen (Thomas et al., 2009).

Daher sind weitere Untersuchungen notwendig, um die Verbindung von MC1R-Polymorphismen und somatischen B-raf bzw. N-ras Mutationen an unterschiedlichen Populationen aufzuklären.

Tumoren verschiedener, histologischer Subtypen mit unterschiedlichem Sonnenexpositionsstatus, mit differentem Ulzerationsstatus oder mit anderen Merkmalen tragen möglicherweise eindeutige genetische Handschriften („Tumorsignatur“).

Ziel sollte es sein, diese in naher Zukunft zu identifizieren. Dies wäre ein wichtiger Meilenstein für die Entwicklung neuer Therapieansätze und -strategien bei der Bekämpfung einer Krebsart, die bis heute trotz eines modernen Therapieregimes das Langzeitüberleben der Betroffenen nicht signifikant zu verlängern vermag.

4.2.5. Einflüsse der MC1R Varianten bzw. B-raf Mutationen auf klinische Faktoren

Es konnte in unserem Patientenkollektiv kein statistischer Zusammenhang bezüglich der klinischen Daten und dem Nachweis von MC1R Varianten festgestellt werden. Die MC1R Varianten korrelierten weder mit dem Geschlecht oder der Mortalität noch mit dem Ulzerations- bzw. dem Metastasenstatus statistisch signifikant.

Bei der Korrelationsbestimmung zwischen den klinischen Faktoren und der somatischen B-raf Mutation konnte lediglich ein einziger statistisch signifikanter Zusammenhang nachgewiesen werden. Der Nachweis einer Fernmetastasierung zeigte eine Assoziation zur B-raf Mutation. So finden sich Metastasen signifikant häufiger beim Nachweis von B-raf Mutationen als beim Wildtyp. Alle weiteren Parameter waren statistisch nicht signifikant.

Nach DANKORT *et al.* (2009) stellen die aktivierende B-raf Mutation eine der frühesten genetischen Veränderungen im menschlichen Melanom dar. In zahlreichen Studien wurden B-raf Mutationen in ca. 80% sowohl in kongenitalen als auch erworbenen, benignen Nävi nachgewiesen. Aber auch in primären und fortgeschrittenen, metastasierten Melanomen treten sie annähernd mit der gleichen Häufigkeit (50-70%) auf (Edlundh-Rose *et al.*, 2006, Poynter *et al.*, 2006, Hoeflich *et al.*, 2008).

Die Nävi, die B-raf Mutationen beherbergen, entwickeln keine Proliferation und verharren im gleichen benignen Zustand (Pollock *et al.*, 2003). Aus dieser Tatsache resultiert die Hypothese, dass B-raf Mutationen mit der Hyperaktivität des RAS-RAF-MEK-ERK-Signalweges eine notwendige Voraussetzung für die Melanomentstehung darstellen, da sie schon in der frühen Phase der Pathogenese auftreten. Es wird vermutet, dass diese Mutationen zusätzliche molekulare Veränderungen (Läsionen im Genom) benötigen, um zu einer suffizienten Progression des Melanoms ggf. mit Metastasierung zu führen. So scheint die alleinige Mutation insuffizient für das Vorantreiben der malignen Transformation zu sein (Omholt *et al.*, 2003, Pollock *et al.*, 2003, Poynter *et al.*, 2006, Hoeflich *et al.*, 2008).

Zusammenfassend erklärt sich dadurch die Korrelation von somatischen B-raf Mutationen in metastasierten Melanomen. Die B-raf Mutation stellt ein Risikofaktor dar, der früh in der Pathogenese erscheint, später durch zusätzliche Faktoren (z.B. Mutationen) in einem fortgeschrittenen Melanom weiter persistiert und sich nachweisen lässt.

Tierexperimentelle Studien bestätigen diese Vermutungen. Dabei wurden Mäuse mit der klassischen B-raf Mutation (V600E) erzeugt. Diese Mäuse entwickelten lediglich benigne, melanozytäre Hyperplasien ohne Progression zum MM innerhalb von 20 Monaten. Wurden den Mäusen zur B-raf Mutation zusätzlich eine weitere Mutation in einem Tumorsuppressorgen (PTEN) zugeführt, entwickelten sie mit 100%iger Penetranz nach kurzer

Latenzzeit ein Melanom und zusätzlich Metastasen (untersucht in Lunge und Lymphknoten) (Dankort et al., 2009).

In Experimenten mit Zebrafischen wurde ebenfalls gezeigt, dass die alleinige Expression von B-raf (V600E) lediglich die Entstehung eines Nävus induziert. In Kombination mit einer weiteren Genveränderung (p53-Mutation) führte es jedoch zur Progression mit hyperplastischem Wachstum und später zu invasiver Melanom-Transformation (Patton et al., 2005).

Bei Mäusen mit Melanomwachstum unter B-raf Mutationen führte die Blockade des MEK-Enzyms, welches direkt unterhalb von B-raf ansetzt, zu einem verminderten Tumorwachstum (Solit et al., 2006). Genauso zeigten DANKORT *et al.* (2009), dass die kombinierte Therapie mit Rapamycin und dem MEK-Enzym-Inhibitor (PD 325901) bei Tumoren mit kombinierten B-raf und PTEN-Mutationen in Mäusen zur Reduktion eines bereits etablierten Melanoms führte.

Diese Daten stellen eine wichtige Grundlage für zukünftige Angriffspunkte (spezifische Inhibitoren, z.B. U0126-Inhibitor, Sorafenib, Rapamycin oder PD 325901) in der Therapie (sogenannte „targeted therapy“ bzw. „biologicals“) des MMs dar (Favata et al., 1998, Davies et al., 2002, Hingorani et al., 2003, Solit et al., 2006, Dankort et al., 2009).

5. Zusammenfassung

Maligne Melanome stellen den bedeutsamsten Tumor in der Dermato-Onkologie dar.

In den vergangenen Jahren konnten die Pathomechanismen der Melanomentstehung und -progression zunehmend gut dargestellt werden durch die Beschreibung von spezifischen Genmutationen in Primärtumoren maligner Melanome. Als Zielstrukturen - durchaus auch für therapeutische Ansätze - wurden insbesondere Mutationen im *B-raf* und *N-ras* Gen beschrieben. Dabei treten B-raf Mutationen insbesondere bei Melanomen auf, die einer intermittierenden UV-Exposition ausgesetzt waren, N-ras Mutationen dagegen bei chronischer Exposition.

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob ein Zusammenhang zwischen dem Melanocortin-1-Rezeptor (MC1R) und Mutationen in B-raf und N-ras besteht. *MC1R* stellt ein zentrales Gen in der Regulierung der Hautpigmentierung dar. Einige relevante Polymorphismen führen zur Inaktivierung von MC1R bzw. seinem Signalweg und bedingen so eine verminderte Synthese des Eumelanin-Pigments mit reduziertem Schutz vor schädlichen UV-Strahlen. Somit führt ein MC1R-Funktionsverlust mutmaßlich zu einem erhöhten Hautkrebsrisiko.

Anhand von insgesamt 90 Melanom-Primärtumoren aus dem histologischen Archiv der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, wurden in Zusammenarbeit mit der Dermato-Onkologischen Kooperationseinheit des Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg und der Hautklinik Mannheim eine Genotypisierung des Tumorgewebes im Hinblick auf Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs) im Gen des *Melanocortin-1-Rezeptors* sowie der häufigsten somatischen Mutationen im *B-raf* und *N-ras* Gen durchgeführt.

Zur Genotypisierung von *MC1R* wurde die Methode des direkten Sequenzierens angewandt, indem es in drei Fragmenten analysiert wurde. *B-raf* und *N-ras* wurden mit der Einzelstrangkonnformationspolymorphismus-Analyse (Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis, SSCP) und durch direktes Sequenzieren untersucht.

An den insgesamt 90 Tumorproben konnte in 80 Fällen die DNA für MC1R erfolgreich isoliert, amplifiziert und sequenziert werden. 80% zeigten mindestens einen MC1R-Polymorphismus. Ein Vergleich zu möglichen Prognoseunterschieden zu einer Kontrollgruppe von Nicht-Melanom-Erkrankten wurde zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht durchgeführt.

Die Analyse der Onkogene *B-raf* und *N-ras*, die als Schlüssel-moleküle des sogenannten RAS-RAF-MEK-ERK-Signaltransduktionswegs beim Melanom bekannt sind und entscheidend zur

Proliferation von Tumorzellen und Inhibition der Apoptose beitragen, war in 81 bzw. 83 der 90 Tumorproben erfolgreich. In 21% der Fälle zeigte sich eine Mutation in *B-raf* (Exon 15, Codon 600, V600E-Mutation). Lediglich in 12% der untersuchten Tumorproben fand sich eine N-ras Mutation (Exon 2, Codon 61).

Bei den Korrelationsbestimmungen zwischen MC1R- und B-raf/N-ras Mutationen zeigten sich Hinweise dafür, dass MC1R-Polymorphismen das Vorkommen von somatischen Mutationen im *B-raf* Gen beeinflussen. Träger von MC1R-SNPs haben eine geringere Wahrscheinlichkeit für somatische B-raf Mutationen. Häufiger treten B-raf Mutationen hingegen bei Melanomprimärtumoren auf, die die sogenannte MC1R-Konsensussequenz tragen. Zwischen MC1R und N-ras konnte kein signifikanter Zusammenhang beschrieben werden.

Bei einer anschließenden Assoziationsbestimmung zwischen den klinischen Daten und insbesondere dem Verlauf der Erkrankung der Melanompatienten und den Ergebnissen der Genanalysen zeigte sich eine Korrelation zwischen einem Tumorprogress im Sinne einer Metastasierung und B-raf Mutationen im Primärtumor.

Diese Ergebnisse sind gerade im Jahr 2010 von besonderem Interesse, weil jetzt erstmals sogenannte B-raf-Inhibitoren mit bisher schon eindrucksvollen Erfolgen in allerdings noch frühen klinischen Studien eingesetzt werden. Diese wirken offensichtlich nur in Patienten mit einer V600E-Mutation im *B-raf* Gen, so dass der „Traum“ von zielgerichteten Therapien („targeted therapies“) beim malignen Melanom vielleicht schon bald der Realität angehören könnte.

6. Literaturverzeichnis

- ALBINO, A. P., NANUS, D. M., MENTLE, I. R., CORDON-CARDO, C., MCNUTT, N. S., BRESSLER, J. & ANDREEFF, M. (1989) Analysis of ras oncogenes in malignant melanoma and precursor lesions: correlation of point mutations with differentiation phenotype. *Oncogene*, 4, 1363-74.
- ALBINO, A. P., VIDAL, M. J., MCNUTT, N. S., SHEA, C. R., PRIETO, V. G., NANUS, D. M., PALMER, J. M. & HAYWARD, N. K. (1994) Mutation and expression of the p53 gene in human malignant melanoma. *Melanoma Res*, 4, 35-45.
- BALCH, C. M., SOONG, S. J., ATKINS, M. B., BUZAID, A. C., CASCINELLI, N., COIT, D. G., FLEMING, I. D., GERSHENWALD, J. E., HOUGHTON, A., JR., KIRKWOOD, J. M., MCMASTERS, K. M., MIHM, M. F., MORTON, D. L., REINTGEN, D. S., ROSS, M. I., SOBER, A., THOMPSON, J. A. & THOMPSON, J. F. (2004) An evidence-based staging system for cutaneous melanoma. *CA Cancer J Clin*, 54, 131-49; quiz 182-4.
- BALCH, C. M., SOONG, S. J., GERSHENWALD, J. E., THOMPSON, J. F., REINTGEN, D. S., CASCINELLI, N., URIST, M., MCMASTERS, K. M., ROSS, M. I., KIRKWOOD, J. M., ATKINS, M. B., THOMPSON, J. A., COIT, D. G., BYRD, D., DESMOND, R., ZHANG, Y., LIU, P. Y., LYMAN, G. H. & MORABITO, A. (2001) Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. *J Clin Oncol*, 19, 3622-34.
- BALL, N. J., YOHN, J. J., MORELLI, J. G., NORRIS, D. A., GOLITZ, L. E. & HOFFFLER, J. P. (1994) Ras mutations in human melanoma: a marker of malignant progression. *J Invest Dermatol*, 102, 285-90.
- BARBACID, M. (1987) Ras genes. *Annu Rev Biochem*, 56, 779-827.
- BARNIER, J. V., PAPIN, C., EYCHENE, A., LECOQ, O. & CALOTHY, G. (1995) The mouse B-raf gene encodes multiple protein isoforms with tissue-specific expression. *J Biol Chem*, 270, 23381-9.
- BARSH, G. S. (2003) What controls variation in human skin color? *PLoS Biol*, 1, E27.
- BARTH, A., WANEK, L. A. & MORTON, D. L. (1995) Prognostic factors in 1,521 melanoma patients with distant metastases. *J Am Coll Surg*, 181, 193-201.
- BASSET-SEGUIN, N., MOLES, J. P., MILS, V., DEREURE, O. & GUILHOU, J. J. (1993) TP53 tumor-suppressor gene and human carcinogenesis. *Exp Dermatol*, 2, 99-105.
- BAUER, J. & GARBE, C. (2003) Acquired melanocytic nevi as risk factor for melanoma development. A comprehensive review of epidemiological data. *Pigment Cell Res*, 16, 297-306.
- BEAUMONT, K. A., SHEKAR, S. N., COOK, A. L., DUFFY, D. L. & STURM, R. A. (2008) Red hair is the null phenotype of MC1R. *Hum Mutat*, 29, E88-E94.
- BEAUMONT, K. A., SHEKAR, S. N., NEWTON, R. A., JAMES, M. R., STOW, J. L., DUFFY, D. L. & STURM, R. A. (2007) Receptor function, dominant negative activity and phenotype correlations for MC1R variant alleles. *Hum Mol Genet*, 16, 2249-60.
- BECKER, K. G. (2004) The common variants/multiple disease hypothesis of common complex genetic disorders. *Med Hypotheses*, 62, 309-17.
- BISHOP, J. M. (1991) Molecular themes in oncogenesis. *Cell*, 64, 235-48.

- BOHM, M., WOLFF, I., SCHOLZEN, T. E., ROBINSON, S. J., HEALY, E., LUGER, T. A., SCHWARZ, T. & SCHWARZ, A. (2005) alpha-Melanocyte-stimulating hormone protects from ultraviolet radiation-induced apoptosis and DNA damage. *J Biol Chem*, 280, 5795-802.
- BOS, J. L. (1989) ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res*, 49, 4682-9.
- BOX, N. F., DUFFY, D. L., CHEN, W., STARK, M., MARTIN, N. G., STURM, R. A. & HAYWARD, N. K. (2001) MC1R genotype modifies risk of melanoma in families segregating CDKN2A mutations. *Am J Hum Genet*, 69, 765-73.
- BRESLOW, A. (1970) Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg*, 172, 902-8.
- BROCKER, E. B. & BECKER, J. C. (1995) [Immunology of melanoma]. *Hautarzt*, 46, 818-28.
- BUSCA, R., ABBE, P., MANTOUX, F., ABERDAM, E., PEYSSONNAUX, C., EYCHENE, A., ORTONNE, J. P. & BALLOTTI, R. (2000) Ras mediates the cAMP-dependent activation of extracellular signal-regulated kinases (ERKs) in melanocytes. *Embo J*, 19, 2900-10.
- CACHIA, A. R., INDSTO, J. O., MCLAREN, K. M., MANN, G. J. & ARENDS, M. J. (2000) CDKN2A mutation and deletion status in thin and thick primary melanoma. *Clin Cancer Res*, 6, 3511-5.
- CHAKRAVARTI, A. (1999) Population genetics--making sense out of sequence. *Nat Genet*, 21, 56-60.
- CHIN, L., GARRAWAY, L. A. & FISHER, D. E. (2006) Malignant melanoma: genetics and therapeutics in the genomic era. *Genes Dev*, 20, 2149-82.
- CHONG, H., VIKIS, H. G. & GUAN, K. L. (2003) Mechanisms of regulating the Raf kinase family. *Cell Signal*, 15, 463-9.
- CLARK, W. H., JR., FROM, L., BERNARDINO, E. A. & MIHM, M. C. (1969) The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res*, 29, 705-27.
- COHEN, G. B., REN, R. & BALTIMORE, D. (1995) Modular binding domains in signal transduction proteins. *Cell*, 80, 237-48.
- CRYER, D. R., ECCLESHALL, R. & MARMUR, J. (1975) Isolation of yeast DNA. *Methods Cell Biol*, 12, 39-44.
- CURTIN, J. A., FRIDLYAND, J., KAGESHITA, T., PATEL, H. N., BUSAM, K. J., KUTZNER, H., CHO, K. H., AIBA, S., BROCKER, E. B., LEBOIT, P. E., PINKEL, D. & BASTIAN, B. C. (2005) Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med*, 353, 2135-47.
- DAHL, C. & GULDBERG, P. (2007) The genome and epigenome of malignant melanoma. *Apmis*, 115, 1161-76.
- DANKORT, D., CURLEY, D. P., CARTLIDGE, R. A., NELSON, B., KARNEZIS, A. N., DAMSKY, W. E., JR., YOU, M. J., DEPINHO, R. A., MCMAHON, M. & BOSENBERG, M. (2009) Braf(V600E) cooperates with Pten loss to induce metastatic melanoma. *Nat Genet*, 41, 544-52.

- DAVIES, H., BIGNELL, G. R., COX, C., STEPHENS, P., EDKINS, S., CLEGG, S., TEAGUE, J., WOFFENDIN, H., GARNETT, M. J., BOTTOMLEY, W., DAVIS, N., DICKS, E., EWING, R., FLOYD, Y., GRAY, K., HALL, S., HAWES, R., HUGHES, J., KOSMIDOU, V., MENZIES, A., MOULD, C., PARKER, A., STEVENS, C., WATT, S., HOOPER, S., WILSON, R., JAYATILAKE, H., GUSTERSON, B. A., COOPER, C., SHIPLEY, J., HARGRAVE, D., PRITCHARD-JONES, K., MAITLAND, N., CHENEVIX-TRENCH, G., RIGGINS, G. J., BIGNER, D. D., PALMIERI, G., COSSU, A., FLANAGAN, A., NICHOLSON, A., HO, J. W., LEUNG, S. Y., YUEN, S. T., WEBER, B. L., SEIGLER, H. F., DARROW, T. L., PATERSON, H., MARAIS, R., MARSHALL, C. J., WOOSTER, R., STRATTON, M. R. & FUTREAL, P. A. (2002) Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, 417, 949-54.
- DEMUNTER, A., STAS, M., DEGREEF, H., DE WOLF-PEETERS, C. & VAN DEN OORD, J. J. (2001) Analysis of N- and K-ras mutations in the distinctive tumor progression phases of melanoma. *J Invest Dermatol*, 117, 1483-9.
- DEN DUNNEN, J. T. & ANTONARAKIS, S. E. (2001) Nomenclature for the description of human sequence variations. *Hum Genet*, 109, 121-4.
- DESMOND, R. A. & SOONG, S. J. (2003) Epidemiology of malignant melanoma. *Surg Clin North Am*, 83, 1-29.
- DHOMEN, N. & MARAIS, R. (2007) New insight into BRAF mutations in cancer. *Curr Opin Genet Dev*, 17, 31-9.
- DUMAZ, N., HAYWARD, R., MARTIN, J., OGILVIE, L., HEDLEY, D., CURTIN, J. A., BASTIAN, B. C., SPRINGER, C. & MARAIS, R. (2006) In melanoma, RAS mutations are accompanied by switching signaling from BRAF to CRAF and disrupted cyclic AMP signaling. *Cancer Res*, 66, 9483-91.
- EDLUNDH-ROSE, E., EGYHAZI, S., OMHOLT, K., MANSSON-BRAHME, E., PLATZ, A., HANSSON, J. & LUNDEBERG, J. (2006) NRAS and BRAF mutations in melanoma tumours in relation to clinical characteristics: a study based on mutation screening by pyrosequencing. *Melanoma Res*, 16, 471-8.
- EDWARDS, B. K., BROWN, M. L., WINGO, P. A., HOWE, H. L., WARD, E., RIES, L. A., SCHRAG, D., JAMISON, P. M., JEMAL, A., WU, X. C., FRIEDMAN, C., HARLAN, L., WARREN, J., ANDERSON, R. N. & PICKLE, L. W. (2005) Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2002, featuring population-based trends in cancer treatment. *J Natl Cancer Inst*, 97, 1407-27.
- EFEYAN, A. & SERRANO, M. (2007) p53: guardian of the genome and policeman of the oncogenes. *Cell Cycle*, 6, 1006-10.
- EIGENTLER, T. K., CAROLI, U. M., RADNY, P. & GARBE, C. (2003) Palliative therapy of disseminated malignant melanoma: a systematic review of 41 randomised clinical trials. *Lancet Oncol*, 4, 748-59.
- ELWOOD, J. M. (1996) Melanoma and sun exposure. *Semin Oncol*, 23, 650-66.
- EVAN, G. I. & VOUSDEN, K. H. (2001) Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*, 411, 342-8.

- FARGNOLI, M. C., ALTOBELLI, E., KELLER, G., CHIMENTI, S., HOFLE, H. & PERIS, K. (2006) Contribution of melanocortin-1 receptor gene variants to sporadic cutaneous melanoma risk in a population in central Italy: a case-control study. *Melanoma Res*, 16, 175-82.
- FARGNOLI, M. C., PIKE, K., PFEIFFER, R. M., TSANG, S., ROZENBLUM, E., MUNROE, D. J., GOLUBEVA, Y., CALISTA, D., SEIDENARI, S., MASSI, D., CARLI, P., BAUER, J., ELDER, D. E., BASTIAN, B. C., PERIS, K. & LANDI, M. T. (2008) MC1R variants increase risk of melanomas harboring BRAF mutations. *J Invest Dermatol*, 128, 2485-90.
- FAVATA, M. F., HORIUCHI, K. Y., MANOS, E. J., DAULERIO, A. J., STRADLEY, D. A., FEESER, W. S., VAN DYK, D. E., PITTS, W. J., EARL, R. A., HOBBS, F., COPELAND, R. A., MAGOLDA, R. L., SCHERLE, P. A. & TRZASKOS, J. M. (1998) Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem*, 273, 18623-32.
- FECHER, L. A., AMARAVADI, R. K. & FLAHERTY, K. T. (2008) The MAPK pathway in melanoma. *Curr Opin Oncol*, 20, 183-9.
- FIFE, K. M., COLMAN, M. H., STEVENS, G. N., FIRTH, I. C., MOON, D., SHANNON, K. F., HARMAN, R., PETERSEN-SCHAEFER, K., ZACEST, A. C., BESSER, M., MILTON, G. W., MCCARTHY, W. H. & THOMPSON, J. F. (2004) Determinants of outcome in melanoma patients with cerebral metastases. *J Clin Oncol*, 22, 1293-300.
- FLOREZ, A. & CRUCES, M. (2004) Melanoma epidemic: true or false? *Int J Dermatol*, 43, 405-7.
- GARBE, C. & BLUM, A. (2001) Epidemiology of cutaneous melanoma in Germany and worldwide. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*, 14, 280-90.
- GARBE, C., BUTTNER, P., BERTZ, J., BURG, G., D'HOEDT, B., DREPPER, H., GUGGENMOOS-HOLZMANN, I., LECHNER, W., LIPPOLD, A., ORFANOS, C. E. & ET AL. (1995a) Primary cutaneous melanoma. Identification of prognostic groups and estimation of individual prognosis for 5093 patients. *Cancer*, 75, 2484-91.
- GARBE, C., BUTTNER, P., BERTZ, J., BURG, G., D'HOEDT, B., DREPPER, H., GUGGENMOOS-HOLZMANN, I., LECHNER, W., LIPPOLD, A., ORFANOS, C. E. & ET AL. (1995b) Primary cutaneous melanoma. Prognostic classification of anatomic location. *Cancer*, 75, 2492-8.
- GARBE, C., HAUSCHILD, A., VOLKENANDT, M., SCHADENDORF, D., STOLZ, W., REINHOLD, U., KORTMANN, R.D., KETTELHACK, C., FRERICH, B., KEILHOLZ, U., DUMMER, R., SEBASTIAN, G., TILGEN, W., SCHULER, G., MACKENSEN, A. & KAUFFMANN, R. (2005) Malignes Melanom. *Leitlinie*, 15, 1-55.
- GARBE, C. & LEITER, U. (2009) Melanoma epidemiology and trends. *Clin Dermatol*, 27, 3-9.
- GARBE, C., SCHADENDORF, D., STOLZ, W., VOLKENANDT, M., REINHOLD, U., KORTMANN, R. D., KETTELHACK, C., FRERICH, B., KEILHOLZ, U., DUMMER, R., SEBASTIAN, G., TILGEN, W., SCHULER, G., MACKENSEN, A., KAUFFMANN, R. & HAUSCHILD, A. (2008) Short German guidelines: malignant melanoma. *J Dtsch Dermatol Ges*, 6 Suppl 1, S9-S14.

- GARCIA-BORRON, J. C., SANCHEZ-LAORDEN, B. L. & JIMENEZ-CERVANTES, C. (2005) Melanocortin-1 receptor structure and functional regulation. *Pigment Cell Res*, 18, 393-410.
- GARTEL, A. L., SERFAS, M. S. & TYNER, A. L. (1996) p21--negative regulator of the cell cycle. *Proc Soc Exp Biol Med*, 213, 138-49.
- GEILEN, C. C., WIEDER, T. & ORFANOS, C. E. (1997) Ceramide signalling: regulatory role in cell proliferation, differentiation and apoptosis in human epidermis. *Arch Dermatol Res*, 289, 559-66.
- GERSHENWALD, J. E., THOMPSON, W., MANSFIELD, P. F., LEE, J. E., COLOME, M. I., TSENG, C. H., LEE, J. J., BALCH, C. M., REINTGEN, D. S. & ROSS, M. I. (1999) Multi-institutional melanoma lymphatic mapping experience: the prognostic value of sentinel lymph node status in 612 stage I or II melanoma patients. *J Clin Oncol*, 17, 976-83.
- GERSTENBLITH, M. R., GOLDSTEIN, A. M., FARGNOLI, M. C., PERIS, K. & LANDI, M. T. (2007) Comprehensive evaluation of allele frequency differences of MC1R variants across populations. *Hum Mutat*, 28, 495-505.
- GIBBS, P., BRADY, B. M. & ROBINSON, W. A. (2002) The genes and genetics of malignant melanoma. *J Cutan Med Surg*, 6, 229-35.
- GILCHREST, B. A., ELLER, M. S., GELLER, A. C. & YAAR, M. (1999) The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. *N Engl J Med*, 340, 1341-8.
- GODING, C. R. (2000) Mitf from neural crest to melanoma: signal transduction and transcription in the melanocyte lineage. *Genes Dev*, 14, 1712-28.
- GOLDSTEIN, A. M. (2004) Familial melanoma, pancreatic cancer and germline CDKN2A mutations. *Hum Mutat*, 23, 630.
- GOLDSTEIN, A. M., CHAN, M., HARLAND, M., HAYWARD, N. K., DEMENAIS, F., BISHOP, D. T., AZIZI, E., BERGMAN, W., BIANCHI-SCARRA, G., BRUNO, W., CALISTA, D., ALBRIGHT, L. A., CHAUDRU, V., CHOMPRET, A., CUELLAR, F., ELDER, D. E., GHIORZO, P., GILLANDERS, E. M., GRUIS, N. A., HANSSON, J., HOGG, D., HOLLAND, E. A., KANETSKY, P. A., KEFFORD, R. F., LANDI, M. T., LANG, J., LEACHMAN, S. A., MACKIE, R. M., MAGNUSSON, V., MANN, G. J., BISHOP, J. N., PALMER, J. M., PUIG, S., PUIG-BUTILLE, J. A., STARK, M., TSAO, H., TUCKER, M. A., WHITAKER, L. & YAKOBSON, E. (2007) Features associated with germline CDKN2A mutations: a GenoMEL study of melanoma-prone families from three continents. *J Med Genet*, 44, 99-106.
- GORDEN, A., OSMAN, I., GAI, W., HE, D., HUANG, W., DAVIDSON, A., HOUGHTON, A. N., BUSAM, K. & POLSKY, D. (2003) Analysis of BRAF and N-RAS mutations in metastatic melanoma tissues. *Cancer Res*, 63, 3955-7.
- GRAEBER, T. G., OSMANIAN, C., JACKS, T., HOUSMAN, D. E., KOCH, C. J., LOWE, S. W. & GIACCIA, A. J. (1996) Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature*, 379, 88-91.
- GRAY-SCHOPFER, V. C., DA ROCHA DIAS, S. & MARAIS, R. (2005) The role of B-RAF in melanoma. *Cancer Metastasis Rev*, 24, 165-83.
- GREENE, M. H., CLARK, W. H., JR., TUCKER, M. A., KRAEMER, K. H., ELDER, D. E. & FRASER, M. C. (1985) High risk of malignant melanoma in melanoma-prone families with dysplastic nevi. *Ann Intern Med*, 102, 458-65.

- HACKER, E. & HAYWARD, N. K. (2008) Germline MC1R variants and BRAF mutant melanoma. *J Invest Dermatol*, 128, 2354-6.
- HACKER, E., HAYWARD, N. K., DUMENIL, T., JAMES, M. R. & WHITEMAN, D. C. (2009) The association between MC1R genotype and BRAF mutation status in cutaneous melanoma: findings from an Australian population. *J Invest Dermatol*, 130, 241-8.
- HAN, J., KRAFT, P., COLDITZ, G. A., WONG, J. & HUNTER, D. J. (2006) Melanocortin 1 receptor variants and skin cancer risk. *Int J Cancer*, 119, 1976-84.
- HAN, J., KRAFT, P., NAN, H., GUO, Q., CHEN, C., QURESHI, A., HANKINSON, S. E., HU, F. B., DUFFY, D. L., ZHAO, Z. Z., MARTIN, N. G., MONTGOMERY, G. W., HAYWARD, N. K., THOMAS, G., HOOVER, R. N., CHANOCK, S. & HUNTER, D. J. (2008) A genome-wide association study identifies novel alleles associated with hair color and skin pigmentation. *PLoS Genet*, 4, e1000074.
- HARRIS, S. L. & LEVINE, A. J. (2005) The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene*, 24, 2899-908.
- HAUSCHILD, A., DUMMER, R., GARBE, C. (2003) Evidenzbasierte Diagnostik und Therapie kutaner Neoplasien. *Deutsches Ärzteblatt* 26, 1813- 1815.
- HAYASHI, K. & YANDELL, D. W. (1993) How sensitive is PCR-SSCP? *Hum Mutat*, 2, 338-46.
- HEALY, E. (2004) Melanocortin 1 receptor variants, pigmentation, and skin cancer susceptibility. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 20, 283-8.
- HENGGE, U. R./DUMMER, R. (Hrsg.), BECKER, J. C., BEYELER, M., BRAUN, R. P., BRÖCKER, E.-B., EBERLE, J., ENK, A., FISTAROL, S. K., GEILEN, C. C., GEORGII, S., GUSTRAU, A., HASSAN, M., HAUSCHILD, A., ITIN, P., KERSTAN, A., LAETSCH, B., MARINI, A., MEGAHED, M., MIRMOHAMMADSADEGH, A., MNICH, C. D., NÄHER, H., NAMBIAR, S., PFÖHLER, C., REIFENBERGER, J., SCHARTL, M., SCHULER, G., SCHULTER, K.-W., STADLER, R., STUSCHKE, M., TILGEN, W., UGUREL, S. (2006) Malignes Melanom: Standards und Innovation in Diagnostik und Therapie. 1.Auflage, Deutscher Ärzte-Verlag, Köln.
- HINDS, D. A., STUVE, L. L., NILSEN, G. B., HALPERIN, E., ESKIN, E., BALLINGER, D. G., FRAZER, K. A. & COX, D. R. (2005) Whole-genome patterns of common DNA variation in three human populations. *Science*, 307, 1072-9.
- HINDS, P. W. & WEINBERG, R. A. (1994) Tumor suppressor genes. *Curr Opin Genet Dev*, 4, 135-41.
- HINGORANI, S. R., JACOBETZ, M. A., ROBERTSON, G. P., HERLYN, M. & TUVESON, D. A. (2003) Suppression of BRAF(V599E) in human melanoma abrogates transformation. *Cancer Res*, 63, 5198-202.
- HOEFLICH, K. P., JAISWAL, B., DAVIS, D. P. & SESHAGIRI, S. (2008) Inducible BRAF suppression models for melanoma tumorigenesis. *Methods Enzymol*, 439, 25-38.
- KAMB, A., GRUIS, N. A., WEAVER-FELDHAUS, J., LIU, Q., HARSHMAN, K., TAVTIGIAN, S. V., STOCKERT, E., DAY, R. S., 3RD, JOHNSON, B. E. & SKOLNICK, M. H. (1994) A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science*, 264, 436-40.

- KATALINIC, A., KUNZE, U. & SCHAFER, T. (2003) Epidemiology of cutaneous melanoma and non-melanoma skin cancer in Schleswig-Holstein, Germany: incidence, clinical subtypes, tumour stages and localization (epidemiology of skin cancer). *Br J Dermatol*, 149, 1200-6.
- KENNEDY, C., TER HUURNE, J., BERKHOUT, M., GRUIS, N., BASTIAENS, M., BERGMAN, W., WILLEMZE, R. & BAVINCK, J. N. (2001) Melanocortin 1 receptor (MC1R) gene variants are associated with an increased risk for cutaneous melanoma which is largely independent of skin type and hair color. *J Invest Dermatol*, 117, 294-300.
- KERKHOFF, E. & RAPP, U. R. (2001) The Ras-Raf relationship: an unfinished puzzle. *Adv Enzyme Regul*, 41, 261-7.
- KLINT, P. & CLAESSION-WELSH, L. (1999) Signal transduction by fibroblast growth factor receptors. *Front Biosci*, 4, D165-77.
- KNUDSON, A. G., JR. (1971) Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 68, 820-3.
- KOLCH, W. (2000) Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J*, 351 Pt 2, 289-305.
- LANDI, M. T., BAUER, J., PFEIFFER, R. M., ELDER, D. E., HULLEY, B., MINGHETTI, P., CALISTA, D., KANETSKY, P. A., PINKEL, D. & BASTIAN, B. C. (2006) MC1R germline variants confer risk for BRAF-mutant melanoma. *Science*, 313, 521-2.
- LASITHIOTAKIS, K. G., LEITER, U., GORKIEVICZ, R., EIGENTLER, T., BREUNINGER, H., METZLER, G., STROBEL, W. & GARBE, C. (2006) The incidence and mortality of cutaneous melanoma in Southern Germany: trends by anatomic site and pathologic characteristics, 1976 to 2003. *Cancer*, 107, 1331-9.
- LEITER, U., MEIER, F., SCHITTEK, B. & GARBE, C. (2004) The natural course of cutaneous melanoma. *J Surg Oncol*, 86, 172-8.
- LIN, A. W., BARRADAS, M., STONE, J. C., VAN AELST, L., SERRANO, M. & LOWE, S. W. (1998) Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. *Genes Dev*, 12, 3008-19.
- LIN, J., HOCKER, T. L., SINGH, M. & TSAO, H. (2008) Genetics of melanoma predisposition. *Br J Dermatol*, 159, 286-91.
- LODISH, H & DARNELL, J. (1996) Molekulare Zellbiologie 2. Auflage. *Walter de Gruyter*.
- MACALUSO, M., RUSSO, G., CINTI, C., BAZAN, V., GEBBIA, N. & RUSSO, A. (2002) Ras family genes: an interesting link between cell cycle and cancer. *J Cell Physiol*, 192, 125-30.
- MALUMBRES, M. & BARBACID, M. (2003) RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer*, 3, 459-65.
- MARAIS, R., LIGHT, Y., PATERSON, H. F., MASON, C. S. & MARSHALL, C. J. (1997) Differential regulation of Raf-1, A-Raf, and B-Raf by oncogenic ras and tyrosine kinases. *J Biol Chem*, 272, 4378-83.
- MARSHALL, C. J. (1991) Tumor suppressor genes. *Cell*, 64, 313-26.

- MATICHARD, E., VERPILLAT, P., MEZIANI, R., GERARD, B., DESCAMPS, V., LEGROUX, E., BURNOUF, M., BERTRAND, G., BOUSCARAT, F., ARCHIMBAUD, A., PICARD, C., OLLIVAUD, L., BASSET-SEGUIN, N., KEROB, D., LANTERNIER, G., LEBBE, C., CRICKX, B., GRANDCHAMP, B. & SOUFIR, N. (2004) Melanocortin 1 receptor (MC1R) gene variants may increase the risk of melanoma in France independently of clinical risk factors and UV exposure. *J Med Genet*, 41, e13.
- MCMASTERS, K. M., REINTGEN, D. S., ROSS, M. I., GERSHENWALD, J. E., EDWARDS, M. J., SOBER, A., FENSKE, N., GLASS, F., BALCH, C. M. & COIT, D. G. (2001) Sentinel lymph node biopsy for melanoma: controversy despite widespread agreement. *J Clin Oncol*, 19, 2851-5.
- MEIER, F., WILL, S., ELLWANGER, U., SCHLAGENHAUFF, B., SCHITTEK, B., RASSNER, G. & GARBE, C. (2002) Metastatic pathways and time courses in the orderly progression of cutaneous melanoma. *Br J Dermatol*, 147, 62-70.
- MICHALOGLOU, C., VREDEVELD, L. C., MOOI, W. J. & PEEPER, D. S. (2008) BRAF (E600) in benign and malignant human tumours. *Oncogene*, 27, 877-95.
- MILLER, A. J. & MIHM, M. C., JR. (2006) Melanoma. *N Engl J Med*, 355, 51-65.
- MIYASHITA, T. & REED, J. C. (1995) Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell*, 80, 293-9.
- MONZON, J., LIU, L., BRILL, H., GOLDSTEIN, A. M., TUCKER, M. A., FROM, L., MCLAUGHLIN, J., HOGG, D. & LASSAM, N. J. (1998) CDKN2A mutations in multiple primary melanomas. *N Engl J Med*, 338, 879-87.
- MOSSNER, R., ANDERS, N., KONIG, I. R., KRUGER, U., SCHMIDT, D., BERKING, C., ZIEGLER, A., BROCKMOLLER, J., KAISER, R., VOLKENANDT, M., WESTPHAL, G. A. & REICH, K. (2007) Variations of the melanocortin-1 receptor and the glutathione-S transferase T1 and M1 genes in cutaneous malignant melanoma. *Arch Dermatol Res*, 298, 371-9.
- MÜLHARDT, C. (2006) Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics. Elsevier Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 5. Auflage, 41- 45, 80- 92, 196- 198.
- MÜNCH, H. (2002) Einführung in die Molekularbiologie, Molekularbiologische Methoden, 1. Auflage, Manuskript der Biologielaboranten, DKFZ Heidelberg.
- NAYSMITH, L., WATERSTON, K., HA, T., FLANAGAN, N., BISSET, Y., RAY, A., WAKAMATSU, K., ITO, S. & REES, J. L. (2004) Quantitative measures of the effect of the melanocortin 1 receptor on human pigmentary status. *J Invest Dermatol*, 122, 423-8.
- NOBORI, T., MIURA, K., WU, D. J., LOIS, A., TAKABAYASHI, K. & CARSON, D. A. (1994) Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature*, 368, 753-6.
- OMHOLT, K., KARSBERG, S., PLATZ, A., KANTER, L., RINGBORG, U. & HANSSON, J. (2002) Screening of N-ras codon 61 mutations in paired primary and metastatic cutaneous melanomas: mutations occur early and persist throughout tumor progression. *Clin Cancer Res*, 8, 3468-74.

- OMHOLT, K., PLATZ, A., KANTER, L., RINGBORG, U. & HANSSON, J. (2003) NRAS and BRAF mutations arise early during melanoma pathogenesis and are preserved throughout tumor progression. *Clin Cancer Res*, 9, 6483-8.
- ORITA, M., IWAHANA, H., KANAZAWA, H., HAYASHI, K. & SEKIYA, T. (1989a) Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 2766-70.
- ORITA, M., SUZUKI, Y., SEKIYA, T. & HAYASHI, K. (1989b) Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics*, 5, 874-9.
- PATTON, E. E., WIDLUND, H. R., KUTOK, J. L., KOPANI, K. R., AMATRUDA, J. F., MURPHEY, R. D., BERGHMANS, S., MAYHALL, E. A., TRAVER, D., FLETCHER, C. D., ASTER, J. C., GRANTER, S. R., LOOK, A. T., LEE, C., FISHER, D. E. & ZON, L. I. (2005) BRAF mutations are sufficient to promote nevi formation and cooperate with p53 in the genesis of melanoma. *Curr Biol*, 15, 249-54.
- PAVEY, S. J., CUMMINGS, M. C., WHITEMAN, D. C., CASTELLANO, M., WALSH, M. D., GABRIELLI, B. G., GREEN, A. & HAYWARD, N. K. (2002) Loss of p16 expression is associated with histological features of melanoma invasion. *Melanoma Res*, 12, 539-47.
- PLATZ, A., RINGBORG, U., BRAHME, E. M. & LAGERLOF, B. (1994) Melanoma metastases from patients with hereditary cutaneous malignant melanoma contain a high frequency of N-ras activating mutations. *Melanoma Res*, 4, 169-77.
- POLLOCK, P. M., HARPER, U. L., HANSEN, K. S., YUDT, L. M., STARK, M., ROBBINS, C. M., MOSES, T. Y., HOSTETTER, G., WAGNER, U., KAKAREKA, J., SALEM, G., POHIDA, T., HEENAN, P., DURAY, P., KALLIONIEMI, O., HAYWARD, N. K., TRENT, J. M. & MELTZER, P. S. (2003) High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet*, 33, 19-20.
- POMERANTZ, J., SCHREIBER-AGUS, N., LIEGEOIS, N. J., SILVERMAN, A., ALLAND, L., CHIN, L., POTES, J., CHEN, K., ORLOW, I., LEE, H. W., CORDON-CARDO, C. & DEPINHO, R. A. (1998) The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell*, 92, 713-23.
- POYNTER, J. N., ELDER, J. T., FULLEN, D. R., NAIR, R. P., SOENGAS, M. S., JOHNSON, T. M., REDMAN, B., THOMAS, N. E. & GRUBER, S. B. (2006) BRAF and NRAS mutations in melanoma and melanocytic nevi. *Melanoma Res*, 16, 267-73.
- QUEVEDO, W. C., FITZPATRICK, T. B., PATHAK, M. A. & JIMBOW, K. (1975) Role of light in human skin color variation. *Am J Phys Anthropol*, 43, 393-408.
- ROBERT KOCH INSTITUT (2004) Statistisches Bundesamt. Hautkrebs. *Gesundheitsberichterstattung des Bundes Themenheft*, 22.
- ROUZAUD, F., KADEKARO, A. L., ABDEL-MALEK, Z. A. & HEARING, V. J. (2005) MC1R and the response of melanocytes to ultraviolet radiation. *Mutat Res*, 571, 133-52.

- SACHIDANANDAM, R., WEISSMAN, D., SCHMIDT, S. C., KAKOL, J. M., STEIN, L. D., MARTH, G., SHERRY, S., MULLIKIN, J. C., MORTIMORE, B. J., WILLEY, D. L., HUNT, S. E., COLE, C. G., COGGILL, P. C., RICE, C. M., NING, Z., ROGERS, J., BENTLEY, D. R., KWOK, P. Y., MARDIS, E. R., YEH, R. T., SCHULTZ, B., COOK, L., DAVENPORT, R., DANTE, M., FULTON, L., HILLIER, L., WATERSTON, R. H., MCPHERSON, J. D., GILMAN, B., SCHAFFNER, S., VAN ETEN, W. J., REICH, D., HIGGINS, J., DALY, M. J., BLUMENSTIEL, B., BALDWIN, J., STANGE-THOMANN, N., ZODY, M. C., LINTON, L., LANDER, E. S. & ALTSHULER, D. (2001) A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*, 409, 928-33.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. (1989) Gel Electrophoresis of DNA. Molecular cloning. A laboratory manual 2nd edition, Cold spring harbor laboratory press, *Cold spring harbor*, NY. 31- 58.
- SANGER, F., NICKLEN, S. & COULSON, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74, 5463-7.
- SATYAMOORTHY, K., LI, G., GERRERO, M. R., BROSE, M. S., VOLPE, P., WEBER, B. L., VAN BELLE, P., ELDER, D. E. & HERLYN, M. (2003) Constitutive mitogen-activated protein kinase activation in melanoma is mediated by both BRAF mutations and autocrine growth factor stimulation. *Cancer Res*, 63, 756-9.
- SCHERER, D., NAGORE, E., BERMEJO, J. L., FIGL, A., BOTELLA-ESTRADA, R., THIRUMARAN, R. K., ANGELINI, S., HEMMINKI, K., SCHADENDORF, D. & KUMAR, R. (2009) Melanocortin receptor 1 variants and melanoma risk: a study of 2 European populations. *Int J Cancer*, 125, 1868-75.
- SCHERER, D., RACHAKONDA, K., ANGELINI, S., MEHNERT, F., SUCKER, A., EGBERTS, F., HAUSCHILD, A., HEMMINIKI, K., SCHADENDORF, D., KUMAR, R. (2010) Association between the presence of MC1R variants and somatic BRAF/NRAS mutations in melanoma tumours. *Journal of Investigative Dermatology*, 130(12), 2844-8.
- SCHIOTH, H. B., PHILLIPS, S. R., RUDZISH, R., BIRCH-MACHIN, M. A., WIKBERG, J. E. & REES, J. L. (1999) Loss of function mutations of the human melanocortin 1 receptor are common and are associated with red hair. *Biochem Biophys Res Commun*, 260, 488-91.
- SCHUBBERT, S., BOLLAG, G. & SHANNON, K. (2007) Deregulated Ras signaling in developmental disorders: new tricks for an old dog. *Curr Opin Genet Dev*, 17, 15-22.
- SHARPLESS, E. & CHIN, L. (2003) The INK4a/ARF locus and melanoma. *Oncogene*, 22, 3092-8.
- SHEFFIELD, V. C., BECK, J. S., KWITEK, A. E., SANDSTROM, D. W. & STONE, E. M. (1993) The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics*, 16, 325-32.
- SOLIT, D. B., GARRAWAY, L. A., PRATILAS, C. A., SAWAI, A., GETZ, G., BASSO, A., YE, Q., LOBO, J. M., SHE, Y., OSMAN, I., GOLUB, T. R., SEBOLT-LEOPOLD, J., SELLERS, W. R. & ROSEN, N. (2006) BRAF mutation predicts sensitivity to MEK inhibition. *Nature*, 439, 358-62.
- SPARROW, L. E., SOONG, R., DAWKINS, H. J., IACOPETTA, B. J. & HEENAN, P. J. (1995) p53 gene mutation and expression in naevi and melanomas. *Melanoma Res*, 5, 93-100.

- STARZ, H., BALDA, B. R., KRAMER, K. U., BUCHELS, H. & WANG, H. (2001) A micromorphometry-based concept for routine classification of sentinel lymph node metastases and its clinical relevance for patients with melanoma. *Cancer*, 91, 2110-21.
- STRAUME, O., SMEDS, J., KUMAR, R., HEMMINKI, K. & AKSLEN, L. A. (2002) Significant impact of promoter hypermethylation and the 540 C>T polymorphism of CDKN2A in cutaneous melanoma of the vertical growth phase. *Am J Pathol*, 161, 229-37.
- STRAUME, O., SVILAND, L. & AKSLEN, L. A. (2000) Loss of nuclear p16 protein expression correlates with increased tumor cell proliferation (Ki-67) and poor prognosis in patients with vertical growth phase melanoma. *Clin Cancer Res*, 6, 1845-53.
- STRETCH, J. R., GATTER, K. C., RALFKIAER, E., LANE, D. P. & HARRIS, A. L. (1991) Expression of mutant p53 in melanoma. *Cancer Res*, 51, 5976-9.
- STURM, R. A. (2002) Skin colour and skin cancer - MC1R, the genetic link. *Melanoma Res*, 12, 405-16.
- SULEM, P., GUDBJARTSSON, D. F., STACEY, S. N., HELGASON, A., RAFNAR, T., MAGNUSSON, K. P., MANOLESCU, A., KARASON, A., PALSSON, A., THORLEIFSSON, G., JAKOBSDOTTIR, M., STEINBERG, S., PALSSON, S., JONASSON, F., SIGURGEIRSSON, B., THORISDOTTIR, K., RAGNARSSON, R., BENEDIKTSDOTTIR, K. R., ABEN, K. K., KIEMENEY, L. A., OLAFSSON, J. H., GULCHER, J., KONG, A., THORSTEINSDOTTIR, U. & STEFANSSON, K. (2007) Genetic determinants of hair, eye and skin pigmentation in Europeans. *Nat Genet*, 39, 1443-52.
- THOMAS, C. & ABELSON, J. (1967) The isolation and characterization of DNA from bacteriophage. *Procedures in Nucleic Acid Research* (Cantoni C., Davis G. eds). *Harper & Row*, NY. 553- 561.
- THOMAS, N. E., KANETSKY, P. A., EDMISTON, S. N., ALEXANDER, A., BEGG, C. B., GROBEN, P. A., HAO, H., BUSAM, K., OLLILA, D. W., BERWICK, M. & CONWAY, K. (2009) Relationship between Germline MC1R Variants and BRAF-Mutant Melanoma in a North Carolina Population-Based Study. *J Invest Dermatol*.
- TOLEDO, F. & WAHL, G. M. (2006) Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nat Rev Cancer*, 6, 909-23.
- ULLRICH, A. & SCHLESSINGER, J. (1990) Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell*, 61, 203-12.
- VAN DER LUBBE, J. L., ROSDORFF, H. J., BOS, J. L. & VAN DER EB, A. J. (1988) Activation of N-ras induced by ultraviolet irradiation in vitro. *Oncogene Res*, 3, 9-20.
- WAN, P. T., GARNETT, M. J., ROE, S. M., LEE, S., NICULESCU-DUVAZ, D., GOOD, V. M., JONES, C. M., MARSHALL, C. J., SPRINGER, C. J., BARFORD, D. & MARAIS, R. (2004) Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell*, 116, 855-67.
- WANG, X. W. & HARRIS, C. C. (1996) TP53 tumour suppressor gene: clues to molecular carcinogenesis and cancer therapy. *Cancer Surv*, 28, 169-96.

- WEISS, J., HEINE, M., ARDEN, K. C., KORNER, B., PILCH, H., HERBST, R. A. & JUNG, E. G. (1995) Mutation and expression of TP53 in malignant melanomas. *Recent Results Cancer Res*, 139, 137-54.
- WIECKER, T. S., LUTHER, H., BUETTNER, P., BAUER, J. & GARBE, C. (2003) Moderate sun exposure and nevus counts in parents are associated with development of melanocytic nevi in childhood: a risk factor study in 1,812 kindergarten children. *Cancer*, 97, 628-38.
- WILFINGER, W. W., MACKEY, K. & CHOMCZYNSKI, P. (1997) Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques*, 22, 474-6, 478-81.
- YASUMOTO, K., YOKOYAMA, K., TAKAHASHI, K., TOMITA, Y. & SHIBAHARA, S. (1997) Functional analysis of microphthalmia-associated transcription factor in pigment cell-specific transcription of the human tyrosinase family genes. *J Biol Chem*, 272, 503-9.
- ZIEGLER, A., JONASON, A. S., LEFFELL, D. J., SIMON, J. A., SHARMA, H. W., KIMMELMAN, J., REMINGTON, L., JACKS, T. & BRASH, D. E. (1994) Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. *Nature*, 372, 773-6.
- (2007) Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature*, 447, 661-78.

7. Anhang

7.1. Tabellen

Tabelle 1a: TNM-Klassifikation des malignen Melanoms nach AJCC (2002)

T-Klassifikation	Tumordicke	Ulzerationsstatus
T1	≤ 1,0mm	a: ohne Ulzeration und Level II/III b: mit Ulzeration oder Level III/IV
T2	1,01-2,0mm	a: ohne Ulzeration b: mit Ulzeration
T3	2,01-4,0mm	a: ohne Ulzeration b: mit Ulzeration
T4	> 4,0mm	a: ohne Ulzeration b: mit Ulzeration
N-Klassifikation	Anzahl metastasierter LK	Art der LK-Metastasen
N1	1 Knoten	a: Mikrometastase(n)* b: Makrometastase(n)**
N2	2-3 Knoten	a: Mikrometastase(n)* b: Makrometastase(n)** c: In-transit-Metastase(n)/Satelliten-Metastase(n) ohne metastasierte Knoten
N3	4 oder mehrere Knoten oder zusammen-gewachsene Knoten oder In-transit-/Satellitenmetastase(n) mit metastasierten Knoten	
M- Klassifikation	Lokalisation	Serum-LDH
M1a	entfernte Hautlokalisierung, subkutan oder knotige Metastase(n)	Normal
M1b	Lungenmetastase(n)	Normal
M1c	alle anderen viszeralen Metastasen jede Fernmetastase	Normal Erhöht

American Joint Committee on Cancer Staging System aus Hengge et al., 2006

* Mikrometastasen: nach elektiver oder Sentinel-LK-Biopsie.

** Makrometastasen: klin. festgestellte LK-Metastasen durch therapeutisch Lymphadenektomie bestätigt oder LK-Metastasen mit großer extrakapsulärer Ausdehnung

Tabelle 1b: Stadieneinteilung beim malignen Melanom (AJCC 2002), klinisch und pathologisch

Stadium	Klinisches Staging			Pathologisches Staging		
	T	N	M	T	N	M
0	Tis	N0	M0	Tis	N0	M0
IA	T1a	N0	M0	T1a	N0	M0
IB	T1b	N0	M0	T1b	N0	M0
	T2a	N0	M0	T2a	N0	M0
IIA	T2b	N0	M0	T2b	N0	M0
	T3a	N0	M0	T3a	N0	M0
IIB	T3b	N0	M0	T3b	N0	M0
	T4a	N0	M0	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0	T4b	N0	M0
III*	jedes T	N1-N3	M0			
IIIA				T1-4a	N1a N2a	M0 M0
				T1-4b	N1a N2a	M0 M0
IIIB				T1-4a	N1b N2b	M0 M0
				T1-4a/b	N2c	M0
				T1-4b	N1b N2b	M0 M0
IIIC				jedes T	N3	M0
IV	jedes T	jedes N	jedes M	jedes T	jedes N	jedes M

American Joint Committee on Cancer Staging System aus Hengge et al., 2006

* bei der klinischen Stadieneinteilung gibt es keine Subgruppen für das Stadium III.

Tabelle 2: Subtypen des Melanoms

Subtyp	Abkürzung	Anteil in %	Medianes Alter
Superfiziell-spreitendes Melanom	SSM	57,4	51 Jahre
Noduläres Melanom	NMM	21,4	56 Jahre
Lentigo-maligna Melanom	LMM	8,8	68 Jahre
Akral-lentiginöses Melanom	ALM	4,0	63 Jahre
Nicht klassifizierbares Melanom	UCM	3,5	54 Jahre
Sonstiges		4,9	54 Jahre

Klinisch-histologische Subtypen kutaner Melanome im deutschsprachigen Raum. Ergebnisse des Zentralregisters Malignes Melanom 1983-1995 (n= 30.015) nach Garbe et al., 1995 aus Hengge et al., 2006.

Tabelle 4a: Reaktionsansatz für MC1R, Fragment I

Komponente	Name	Lösung		Zugeführte Menge in μl	Konz. in PCR	
Other comp.	DMSO	1	X	0	0,00	X
dH₂O		1	X	66,1	0,62	X
10x buffer		10	X	10,6	1,00	X
MgCl₂		25	mM	5,3	2,50	mM
dNTP		10	mM	1,2	0,11	mM
Primer F		10	μM	2,1	0,20	μM
Primer R		10	μM	2,1	0,20	μM
DNA Polymerase	Taq	5	U/ μl	8,0	0,40	U/ μl
Gewünschter <i>Master Mix</i>				95,4		
Verwendung in PCR				90,0		
<i>Sample</i> Volumen μl (10ng/ μl)				1,0	<i>Sample</i> Anzahl 10	
Zugeführter <i>Master Mix</i>				9,0		
Gesamt Vol. der PCR Reaktion (μl)				10,0		

Tabelle 4b: Reaktionsansatz für MC1R, Fragment II

Komponente	Name	Lösung		Zugeführte Menge in μl	Konz. in PCR	
Other comp.	DMSO	1	X	5,3	0,05	X
dH₂O		1	X	62,9	0,59	X
10x buffer		10	X	10,6	1,00	X
MgCl₂		25	mM	4,2	2,00	mM
dNTP		10	mM	1,2	0,11	mM
Primer F		10	μM	1,6	0,15	μM
Primer R		10	μM	1,6	0,15	μM
DNA Polymerase	Taq	5	U/ μl	8,0	0,40	U/ μl
Gewünschter <i>Master Mix</i>				95,4		
Verwendung in PCR				90,0		
<i>Sample</i> Volumen μl (10ng/ μl)				1,0	<i>Sample</i> Anzahl 10	
Zugeführter <i>Master Mix</i>				9,0		
Gesamt Vol. der PCR Reaktion (μl)				10,0		


Tabelle 4c: Reaktionsansatz für MC1R, Fragment III

Komponente	Name	Lösung		Zugeführte Menge in μl	Konz. in PCR	
Other comp.	DMSO	1	X	5,3	0,05	X
dH₂O		1	X	58,7	0,55	X
10x buffer		10	X	10,6	1,00	X
MgCl₂		25	mM	5,3	2,50	mM
dNTP		10	mM	1,2	0,11	mM
Primer F		10	μM	3,2	0,30	μM
Primer R		10	μM	3,2	0,30	μM
DNA Polymerase	Taq	5	U/ μl	8,0	0,40	U/ μl
Gewünschter <i>Master Mix</i>				95,4		
Verwendung in PCR				90,0		

Sample Volumen μl (10ng/ μl)	1,0	Sample Anzahl 10
Zugeführter Master Mix	9,0	
Gesamt Vol. der PCR Reaktion (μl)	10,0	

Tabelle 6: PCR-Standard-Programme für MC1R

Temp. In $^{\circ}\text{C}$	Zeit
4	2 min
94	25 sek
X	20 sek
72	30 sek
72	5 min
16	∞ (bis Entnahme)

 37x

Ablauf der Temperaturschritte und Zeiten mit den Zyklen bei der Polymerasenkettenreaktion;
X: Annealingtemperatur


Tabelle 7: ExoSAP-Verdau

Temp. In $^{\circ}\text{C}$	Zeit
37	40 min
85	15 min
16	∞ (bis Entnahme)

Ablauf der Temperaturschritte und Zeiten

Tabelle 8: Cycle Sequencing

Temp. In $^{\circ}\text{C}$	Zeit
94	2 min
96	30 sek
54	10 sek
60	4 min
16	∞ (bis Entnahme)

 27x

Ablauf der Temperaturschritte und Zeiten

Tabelle 9a: Reaktionsansatz für B-raf, Exon 15 und N-ras, Exon 2



Komponente	Name	Lösung		Zugeführte Menge in μl	Konz. in PCR	
Other comp.	DMSO	1	X	0	0,00	X
dH₂O		1	X	67,1	0,62	X
10x buffer		10	X	10,6	1,00	X
MgCl₂		25	mM	4,2	2,00	mM
dNTP		10	mM	1,2	0,11	mM
Primer F		10	μM	2,1	0,20	μM
Primer R		10	μM	2,1	0,20	μM
dCTP	EasyTide	10	mM	0,1	0,10	mM
DNA Polymerase	Taq	5	U/ μl	8,0	0,40	U/ μl
Gewünschter Master Mix				95,4		

Verwendung in PCR	90,0	
Sample Volumen μl (10ng/ μl)	1,0	Sample Anzahl 10
Zugeführter Master Mix	9,0	
Gesamt Vol. der PCR Reaktion (μl)	10,0	

Tabelle 9b: Reaktionsansatz für *B-raf* und *N-ras*, Sequenzierreaktion

Komponente	Name	Lösung		Zugeführte Menge in μl	Konz. in PCR	
Other comp.	DMSO	1	X	0	0,00	X
dH₂O		1	X	67,2	0,63	X
10x buffer		10	X	10,6	1,00	X
MgCl₂		25	mM	4,2	2,00	mM
dNTP		10	mM	1,2	0,11	mM
Primer F		10	μM	2,1	0,20	μM
Primer R		10	μM	2,1	0,20	μM
DNA Polymerase	Taq	5	U/ μl	8,0	0,40	U/ μl
Gewünschter Master Mix				95,4		
Verwendung in PCR				90,0		
Sample Volumen μl (10ng/ μl)				1,0	Sample Anzahl 10	
Zugeführter Master Mix				9,0		
Gesamt Vol. der PCR Reaktion (μl)				10,0		

Tabelle 10: SSCP-PCR-Standart-Programme für *B-raf* bzw. *N-ras*

Temp. in $^{\circ}\text{C}$		Zeit	
<i>B-raf</i>	<i>N-ras</i>		
94		2 min	
94		30 sek	
50	49	30 sek	 3x
72		30 sek	
94		45 sek	
51	50	45 sek	 37x
72		45 sek	
72		7 min	
16		∞ (bis Entnahme)	

Ablauf der Temperaturschritte und Zeiten mit den Zyklen bei der radioaktiven SSCP-Polymerasenkettenreaktion.

Tabelle 11: Patientencharakteristika

Patientencharakteristika		n =	in %	Mittelwert in Jahren (Mon)	Median in Jahren (Mon)
Geschlecht	Frauen	37	41,1	-	-
	Männer	53	58,9		
Alter	Frauen	37	41,1	68,1	68,0
	Männer	53	58,9	64,0	64,0
	Gesamt	90	100,0	65,7	65,0
Histologie	SSM	21	23,3	-	-
	NMM	58	64,4		
	ALM	5	5,6		
	LMM	4	4,4		
	Sonstige	2	2,2		
Tumordurchmesser nach Breslow	≤ 1mm	9	10,0	3,2 in mm	2,5mm
	> 1,01-2mm	37	41,1		
	> 2,01-4mm	26	28,9		
	> 4,01mm	18	20,0		
Clark-Level	I	0	0	-	-
	II	1	1,1		
	III	30	33,3		
	IV	53	58,9		
	V	6	6,7		
Ulzeration	Ja	35	38,9	-	-
	Nein	55	61,1		
AJCC bei Diagnose	I	33	36,7	-	-
	II	40	44,4		
	III	16	17,8		
	IV	1	1,1		
SLND (Mikrometastasen)	Gesamt	48	53,3	-	-
	Nachweis	12	25,0		
Metastasen (M1, St. IV)	Ja	28	31,1	-	-
	Nein	57	63,3		
	Kein Staging	5	5,6		

Tabelle 12: Überleben

Überleben		n =	in %	Mittelwert in Jahren (Mon)	Median in Jahren (Mon)
Mortalität	Lebend	56	62,2	-	-
	Tod	34	37,8		
	Andere Ursachen	5	5,6		
Mittlere Überlebenszeit	Tod durch MM	29	32,2	2,2 (32,3)	2,0 (32,0)
OS	-	90	-	3,6 (48,3)	3,5 (45,5)
RFS	-	90	100,0	3,5 (48,1)	3,5 (47,5)
DMFS	-	28	31,1	1,2 (19,5)	1,0 (21,5)
SFM1	-	28	31,1	1,1 (18,4)	0,5 (10,5)
SFM2	-	21	23,3	0,5 (10,9)	0 (9,0)

OS: overall survival, Gesamtüberleben (Diag. MM-Tod/28.02.09)

RFS: relapse-free survival, Rezidivfreies Überleben (Diag. MM-Progression/28.02.09)

DMFS: distant metastases free survival, Fernmetastasenfreies Überleben (Diag. MM-M1)

SFM1 survival following the 1st metastasis, Gesamtüberleben mit Metastase (Diag M1-Tod/28.02.09)

SFM2: survival following the 1st metastasis, Mittleres Metastasenüberleben (Diag. M1-Tod)

Tabelle 15: Zusammenfassung der Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der DNA-Präparate

Nr.	Konzentration (ng/µl)	ΔE 260/ ΔE280	Nr.	Konzentration (ng/µl)	ΔE 260/ ΔE280
1	273,5	1,62	46	136	1,54
2	208	1,67	47	185,5	1,54
3	16,5	1,9	48	5 -	
4	51,5	1,9	49	81,5	1,52
5	19,5	1,55	50	173	1,51
6	50	1,95	51	188,5	1,97
7	75	1,92	52	31,5	1,7
8	27	1,9	53	74	1,52
9	95,5	1,98	54	124	1,62
10	45	1,9	55	23,5	1,6
11	14	1,7	56	41	1,5
12	52	2,05	57	23,5	1,5
13	112	1,86	58	196,5	1,53
14	287,5	1,6	59	51,5	1,5
15	158	2	60	47,5	1,52
16	35,5	1,8	61	48	1,5
17	183,5	1,63	62	173,5	1,51
18	228	1,55	63	133	1,5
19	43,5	1,4	64	90	1,6
20	159,5	1,56	65	27,5	1,55
21	139	1,53	66	39	1,55
22	38,5	2,1	67	23	1,5
23	43	1,54	68	294,5	1,63
24	215,5	1,59	69	69,5	1,6
25	70,5	1,52	70	47,5	1,5

26	103	1,56	71	10,5	1,5
27	148	1,97	72	37	1,5
28	43	2,05	73	27	1,75
29	54	1,5	74	56,5	1,54
30	1,5 -		75	157,5	1,52
31	60,5	1,82	76	20	1,5
32	64,5	1,6	77	72	1,52
33	47,5	2,0	78	86,5	1,52
34	124	1,5	79	54	1,5
35	146,5	2	80	87	1,5
36	45	1,9	81	121,5	1,58
37	112,5	1,96	82	16,5	1,5
38	22,5	1,55	83	247	1,74
39	109,5	1,52	84	35,5	1,5
40	21	1,5	85	33,5	2,05
41	153	1,95	86	24	1,5
42	39	1,55	87	36,5	1,55
43	125	1,54	88	164,5	1,54
44	58	1,94	89	70,5	1,6
45	34	1,6	90	79	1,5

= Verunreinigung der Nukleinlösung
 = keine Bestimmung mgl.

Tabelle 21: Verteilung der Mutations- und Polymorphismenhäufigkeiten

<i>MCIR</i>		Mind. 1 Variante (≥ 1)	Konsensus	n =	P-Wert	OR	95%-CI
<i>B-raf</i>	Mutation	10 (18 %)	5 (33 %)	15	n.s.	0,43	0,12-1,52
	Wildtyp	47 (82 %)	10 (67 %)	57			
<i>N-ras</i>	Mutation	8 (14 %)	2 (13 %)	10	n.s.	1,14	0,22-6,01
	Wildtyp	49 (86 %)	14 (87 %)	63			

OR: Odds Ratio, **CI:** Konfidenzintervall

Tabelle 24: Verteilung der Polymorphismen in *MC1R* und der klinischen Daten

<i>MC1R</i>		Mind. 1 Variante (≥ 1)	Konsensus	n =	P-Wert	OR	95%-CI
Geschlecht	Frauen	27 (79 %)	7 (21 %)	34	n.s.	0,94	0,31-2,83
	Männer	37 (80 %)	9 (20 %)	46			
Mortalität	Tod	23 (77 %)	6 (23 %)	29	n.s.	0,82	0,28-2,45
	Lebend	41 (80 %)	10 (20 %)	51			
Ulzeration	Ja	24 (77 %)	7 (23 %)	31	n.s.	0,77	0,25-2,34
	Nein	40 (82 %)	9 (18 %)	49			
Metastasen	Ja	18 (72 %)	7 (28 %)	25	n.s.	0,50	0,16-1,55
	Nein	46 (84 %)	9 (16 %)	55			

OR: Odds Ratio, CI: Konfidenzintervall


Tabelle 25: Verteilung der Mutationen in *B-raf* und der klinischen Daten

<i>B-raf</i>		Mutation	Wildtyp	n =	P-Wert	OR	95%-CI
Geschlecht	Frauen	7 (21 %)	27 (79 %)	34	n.s.	0,96	0,32-2,84
	Männer	10 (21 %)	37 (79 %)	47			
Mortalität	Tod	9 (31 %)	20 (69 %)	29	n.s.	2,15	0,74-6,24
	Lebend	8 (17 %)	44 (83 %)	52			
Ulzeration	Ja	8 (24 %)	26 (76 %)	34	n.s.	1,29	0,44-3,81
	Nein	9 (19 %)	38 (81 %)	47			
Metastasen	Ja	9 (37 %)	15 (63 %)	24	P= 0,018	3,68	1,21-11,19
	Nein	8 (14 %)	49 (86 %)	57			

OR: Odds Ratio, CI: Konfidenzintervall

7.2. Fragebogen, Case Report Form

Mannheim - Kiel



Case Report Form
CRF

Department of Dermatology, University of Kiel

Pt. No.: _____

Investigator: Name: Franziska Mehnert
E-mail: franz_mehmert@hotmail.com


Center: _____

Universitätsklinikum Schleswig Holstein
Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie

Prof. Dr. med. A. Hauschild / Project Manager
Schittenhelmstr. 7
D-24105 Kiel, Germany

Phone: ++49-431-597-1613
Fax: ++49-431-597-1653
franziska@dermatology.uni-kiel.de

page 1



Pt. No.: _____

Baseline Record

Patient data:

Initials: DOB: Gender: m f

Primary tumor data:

unknown primary tumor:

Primary tumor:
 SSM NBSM
 ALM LMM unknown

First diagnosis:

Primary tumor site: _____

Tumor thickness (Breslow): mm Clark Level:


Ulceration: Yes No

Histology No.: _____

Department of Dermatology, University of Kiel

External address: _____
phone: _____
fax: _____

page 2



Pt. No.: _____

Primary surgical therapy:

Date:

Lymph node dissection:

SLND / ELND None
 SLND Sentinel pos. (no.)
 ELND Sentinel neg. (no.)

Histology No.: _____

CLND
 Involved LNs: of

Histology No.: _____

Department of Dermatology, University of Kiel

External address: ...Prof. Dr. G. Köppel, Pathology, Michaelistr. 11, 24105 Kiel.....
phone: ...(+49) 0431-597 / 3420.....
fax:


Skin metastases prior to biopsy:

None

Date:

superficial cutaneous metastasis
 subcutaneous metastasis

page 3



Pt. No.: _____

Tissue biopsy

Tissue	Localisation	Date of biopsy DD MONTH YY	AJCC Stage at biopsy
1			
2			
3			
4			
5			
6			

page 4

Pt. No.: _____

Systemic treatments:

start (dd/mm/yyyy) end (dd/mm/yyyy) AJCC-stage at initiation:

None

Immunotherapy:

IFN α 2a (RoferonA8) low dose _____

IFN α 2b (IntronA8) low dose _____

IFN α 2b (IntronA8) high dose _____

Peg IFN α 2a (Pegasy8) _____

Peg IFN α 2b (Pegintron8) _____

Monochemotherapy:

DTIC (Dacarbazin) _____

Vinorelbine _____

Fotemustin _____

Temozolomid (Temodal8) _____

others: _____

Polychemotherapy:

DVP(CVD) _____

BOLD _____

others _____

Chemioimmunotherapy:

DTIC + IFN α 2b (IntronA8) _____

DTIC + Peg IFN α 2a (Pegasy8) _____

DTIC + IL2 (Interleukin-2) + IFN α 2b (IntronA8) _____

DTIC + IFN α 2a (RoferonA8) + Thymosin _____

experimental treatments (studies) _____

(name of study / drugs: _____)

page 5

Pt. No.: _____

Tissue biopsy localisation:

Indicate all biopsied regions in the following drawing:

Number of metastasis: _____

Target lesions (please indicate by number in the figure and chronologically)

Lesion No.	Metastoma-prim. tumor	LN-metastases	LN-metastases	cut. metastases	cut. metastases	others
1	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
6	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

page 6

Pt. No.: _____

Follow-up status report post biopsy:

Status date: _____

Patient status:

Disease - free present AJCC - stage: _____

Progressive disease

Date of first progression: _____

Date of blood sampling: _____

LDH value: _____ (norm: _____)

S-100 value: _____ (norm: _____)

Skin (in-transit/satellite)

Lymph node

Distant metastases (stage IV):

Detection of stage IV: date _____

Skin LN Lung Liver

Bone Brain Adrenal Others

Date of blood sampling: _____

LDH value: _____ (norm: _____)

S-100 value: _____ (norm: _____)

Death _____ caused by Melanoma

Other causes: _____

Follow-up contact person:

Department of Dermatology, University of Kiel

External address: _____

phone: _____

Lost to follow-up

page 7

AJCC Classification

Stadium	Clinical Staging			Pathological Staging		
	T	N	M	T	N	M
IA	T1a	N0	M0	T1a	N0	M0
IB	T1b	N0	M0	T1b	N0	M0
	T2a	N0	M0	T2a	N0	M0
IIA	T2b	N0	M0	T2b	N0	M0
	T3a	N0	M0	T3a	N0	M0
IIB	T3b	N0	M0	T3b	N0	M0
	T4a	N0	M0	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0	T4b	N0	M0
	every T	N1-N3	M0			
IIIA				T1-4a	N1a	M0
				T1-4a	N2a	M0
				T1-4b	N1a	M0
				T1-4b	N2a	M0
IIIB				T1-4a	N1b	M0
				T1-4a	N2b	M0
				T1-4a/b	N2c	M0
				T1-4b	N1b	M0
IIIC				T1-4b	N2b	M0
				Every T	N3	M0
IV	every T	every N	Every M1	Every T	every N	every M1

page 8

8. Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand im Institut für Dermatologie, Venerologie und Allergologie am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, sowie in Zusammenarbeit mit der Klinischen Kooperationseinheit Dermato-Onkologie, Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie am Universitätsklinikum Mannheim und der Abteilung, Molekulare Genetische Epidemiologie am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ), in Heidelberg. Ich bedanke mich sehr herzlich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Axel Hauschild für die Überlassung des Themas, die großzügige Unterstützung und stete Hilfsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. med. Thomas Schwarz, Direktor der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie der Tumorpräparate.

Zu besonderem Dank bin ich Herrn Prof. Dr. med. Dirk Schadendorf, Direktor der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie am Universitätsklinikum Essen, Herrn Prof. Dr. Kari Hemminki und Herrn Prof. Dr. Rajiv Kumar, Leiter der Abteilung, Molekulare Genetische Epidemiologie im Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) Heidelberg, verpflichtet, die es mir ermöglicht haben, den praktischen Teil dieser Arbeit an ihren Instituten in einer freundlichen Atmosphäre unter Nutzung sämtlicher Gerätschaften durchzuführen.

Bei Frau Dr. sc.hum. Dominique Scherer möchte ich mich besonders für die ausgezeichnete Einarbeitung und die große Unterstützung im und außerhalb des Labors bedanken.

Dominique, ohne deine vielen Anregungen, die kompetente, geduldige und umfassende Hilfe, wäre das Verfassen dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Außerdem bedanke ich mich bei Frau Dr. med. Friederike Egberts für die intensive Betreuung mit der Beantwortung meiner zahlreicher Fragen. Durch das sorgfältige und zeitnahe Korrekturlesen des Manuskriptes hast du bei der Gestaltung der Arbeit sehr geholfen.

Bei den alltäglich praktischen sowie technischen Problemen standen mir Dr. med. Adina Figl, Dr. sc.hum. Andreas Gast, Antje Sucker mit ihrem Team der Dermato-Onkologischen Kooperationseinheit der Hautklinik Mannheim und Elke Dickes zur Seite, wofür ich ihnen herzlich danke.

Mein Dank gilt auch allen anderen Mitarbeitern der Kliniken und Institute in Kiel, in Heidelberg und in Mannheim für die allgemeine Unterstützung und die gute Zusammenarbeit. Meiner Mutter und meiner Schwester, Juliane danke ich vielmals für die tatkräftige Hilfe beim umfangreichen Korrekturlesen sowie die ständige und unerlässliche Motivation.

Schließlich möchte ich meinen Eltern für ihre Unterstützung und Fürsorge in jeder Hinsicht während des Studiums und der Promotion danken. Ihr habt mir ermöglicht diesen Weg zu gehen!

Abschließend möchte ich meinem Mann Johan für seine aufbauenden Worte und seinen unerschütterlichen Glauben an mich bedanken.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Franziska Ulrike Nordström (geb. Mehnert)
Geburtsdatum	18.09.1982
Geburtsort	Schwedt
Eltern	Dr. med. Manuel Mehnert Dr. med. Ute Mehnert (geb. Karbe)
Geschwister	Dr. med. dent. Juliane Mehnert

Schulbildung

1989 - 1991	Grundschule: Hannover Wettbergen
1991 - 1993	Grundschule: Ostendorf Helmstedt
1993 - 1995	Orientierungsstufe: Amtsgasse Helmstedt
1995 - 2002	Gymnasium: Helmstedter Julianum
1999 - 2000	Redlands East Valley Highschool, Cali., USA,
2000 - 2002	Abitur am Julianum-Gymnasium Helmstedt

Studium und Beruf

10/2002	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Christian Albrechtsuniversität zu Kiel
08/2004	ärztliche Vorprüfung/Physikum
10/2004	Studentische Hilfskraft im Institut der Anatomie, Christian Albrechtsuniversität zu Kiel
12/2005	Aufnahme der wissenschaftlichen Arbeit zum Thema: Korrelationsbestimmung zwischen Polymorphismen im MC1-Rezeptor Gen und somatischen B-raf und N-ras Mutationen an Primärtumorgewebe des malignen Melanoms, an der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie am Universitätsklinikum Schleswig Holstein, Campus Kiel.
03/2007	Beginn der Zusammenarbeit mit der klinischen Kooperationseinheit Dermato-Onkologie, Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie Universitätsklinikum Mannheim und dem Department, Molekulare Genetische Epidemiologie im Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ), Heidelberg.
12/2008	Approbation
Seit 04/2009	Assistenzärztin der Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Städtisches Klinikum Karlsruhe

Praktisches Jahr

08/2007 - 12/2007	Innere Medizin, Westküstenklinikum, Heide
12/2007 - 04/2008	HNO, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
04/2008 - 07/2008	Chirurgie, Kantonsspital St. Gallen, Schweiz