

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie

Direktor: Prof. Dr. med. habil. Wolfgang Ch. Marsch



Expression von Ki-67, p53 und bcl-2 beim Malignen Melanom

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr.med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Maria V. Faßhauer

geboren am 18.04.1974 in Halle

Gutachter:

1. Prof. Marsch
2. Prof. Holzhausen
3. Prof. Worret, München

Verteidigung: 15.04.02

urn:nbn:de:gbv:3-000003395

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000003395>]

Das maligne Melanom ist der bösartigste Tumor der Haut und eines der am schnellsten zunehmenden Malignome weltweit.

Bei verschiedenen Tumoren konnte gezeigt werden, dass die Expression von Ki-67, p53 und bcl-2 von prognostischer Bedeutung ist. Ziel dieser Arbeit war es daher, die Expression dieser drei Proteine beim malignen Melanom zu untersuchen und mit verschiedenen klinischen und histologischen Parametern in Zusammenhang zu setzen. Hierzu wurden 26 maligne Melanome immunhistochemisch mit spezifischen primären Antikörpern untersucht und der Anteil positiver Tumorzellen wurde als Index in Prozent angegeben.

Alle untersuchten Schnitte zeigten eine positive Anfärbarkeit für Ki-67, p53 und bcl-2. In der untersuchten Patientenpopulation bestand ein Trend ($p=0,08$) zu einem erhöhten Ki-67-Index in aneuploiden verglichen zu diploiden Tumoren. Des Weiteren war der mittlere p53-Index signifikant größer in Melanomen dünner 1,5 mm sowie in superfiziell spreitenden Melanomen verglichen zu nodulären Melanomen, jedoch traten innerhalb einer Gruppe erhebliche Streuungen auf. Alle anderen Kriterien wiesen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich ihrer Anfärbarkeit auf.

Die Ergebnisse zeigen, dass der immunhistochemische Nachweis von Ki-67, p53 und bcl-2 wahrscheinlich nur eingeschränkt nutzbar ist, um die Prognose und Therapie des malignen Melanoms im Einzelfall festzulegen. Weitere Marker sollten hinsichtlich ihrer Aussagekraft bezüglich Prognose und Therapie getestet werden.

Faßhauer, Maria V.: **Expression von Ki-67, p53 und bcl-2 beim Malignen Melanom.** Halle (S.), Univ., Med. Fak., Diss. A, 60 Seiten, 2001

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung und Zielstellung	1
1.1	Einleitung	1
1.2	Zielstellung	8
2	Materialien und Methodik	9
2.1	Geräte	9
2.2	Chemikalien.....	9
2.3	Lösungen und Puffer	10
2.4	Untersuchungsmaterial	10
2.5	Bestimmung der Ploidie durch Bildzytometrie	11
2.6	Immunhistochemischer Nachweis von Ki-67, p53 und bcl-2	12
2.7	Kontrollen.....	13
2.8	Quantitative Auswertung von Ki-67, p53 und bcl-2	13
2.9	Statistische Auswertung der Daten.....	13
3	Ergebnisse	15
3.1	Charakterisierung der untersuchten Melanome	15
3.2	Nachweis von Ki-67	20
3.3	Nachweis von p53	24
3.4	Nachweis von bcl-2	28
4	Diskussion	31
4.1	Zellzyklus und Tumorentstehung	31
4.2	Ki-67 beim malignen Melanom.....	33
4.3	P53 beim malignen Melanom.....	36
4.4	Bcl-2 beim malignen Melanom	39
4.5	Andere beim malignen Melanom dysregulierten Proteine	41
4.6	Schlussfolgerung	43

5	Zusammenfassung	45
6	Literaturverzeichnis	47
7	Stammdaten der untersuchten Melanome	57
8	Thesen	58

Lebenslauf

Erklärungen

Danksagung

VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

A.d.	=	Destilliertes Wasser (<i>Aqua destillata</i>)
AEC	=	3-Amino-9-Ethylcarbazol
ALM	=	Akrolentiginöses malignes Melanom
AP	=	Alkalische Phosphatase
APAAP	=	Alkalische Phosphatase-Maus anti-alkalische Phosphatase
BCG	=	Bacillus Clamette-Guerin
Bcl-2	=	Ursprünglich als in B-Zell-Lymphomen (<i>B-cell lymphoma</i>) überexprimiertes Protein beschrieben
CDK	=	Cyclin-abhängige Kinase (<i>cyclin dependent kinase</i>)
DAB	=	3'-3'-Diaminobenzidin
ELND	=	Elektive Lymphknotendisektion (<i>elective lymph node dissection</i>)
Ki-67	=	Proliferationsantigen, welches nur in der G ₁ -, S-, G ₂ - und M-Phase des Zellzyklus exprimiert wird
LMM	=	Lentigo maligna Melanom
NM	=	Noduläres malignes Melanom
p53	=	Tumor-Suppressor-Genprodukt mit molarer Masse von 53 Kilodalton
pRb	=	Retinoblastoma-Tumor-Suppressor-Protein
SD	=	Standardabweichung (<i>standard deviation</i>)
SN	=	Schildwächterlymphknoten (<i>sentinel [lymph]node</i>)
SSM	=	Superfiziell spreitendes malignes Melanom
TBS	=	Trisgepufferte Salzlösung
TLND	=	Therapeutische Lymphknotendisektion (<i>therapeutic lymph node dissection</i>)
Tris	=	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UCM	=	Unklassifizierbares Melanom (<i>unclassified melanoma</i>)

1 Einleitung und Zielstellung

1.1 Einleitung

Das maligne Melanom ist der bösartigste Tumor der Haut. Seine Inzidenz bei hellhäutigen Personen hat in den letzten 20 Jahren in Europa mit einer Steigerungsrate von 3-7 % zugenommen. Anfang der 90er Jahre betrug die jährliche Inzidenz in Europa 10-12 je 100000 Einwohner. Das maligne Melanom hat somit die höchste Inzidenzsteigerung aller Krebsarten, es ist bei Männern der am schnellsten zunehmende maligne Tumor weltweit und hat die zwischenzeitlich höhere Inzidenzsteigerung des Lungenkarzinoms bei Frauen wieder überholt (BACCARD et al., 1997; MACKIE et al., 1997; PISANI et al., 1999).

Es wird vermutet, dass maligne Melanome in 70 % der Fälle von epidermalen Melanozyten und in 30 % von dermalen Nävomelanozyten ausgehen, nicht jedoch von follikulären Melanozyten. Entwicklungsgeschichtlich differenzieren vom Neuralrohr abgeleitete Zellen zu Melanoblasten, welche in die Haut einwandern. Nach Erreichen der Dermis können die Melanoblasten entweder in die Epidermis und Haarfollikel einwandern und zu Melanozyten differenzieren oder sie verbleiben in der Dermis und entwickeln sich zu Nävomelanozyten. Als wichtige Funktion der epidermalen Melanozyten erscheint die Produktion und der Transfer von Melaninpartikeln in die umliegenden Keratinozyten. Des Weiteren wird angenommen, dass diese Zellen auch sensorische und regulatorische Funktionen besitzen. Epidermale Melanozyten sind unter normalen Umständen mitotisch inaktiv, können aber durch externe Reize, wie UV-Bestrahlung, zur Proliferation stimuliert werden. Follikuläre Melanozyten bestimmen durch eine interpersonell unterschiedliche zyklische Proliferation und Melaninproduktion die Haarfarbe. Die Funktion der dermalen Nävomelanozyten ist noch nicht geklärt (SLOMINSKI et al., 1995).

Histologisch werden fünf verschiedene Typen des malignen Melanoms unterschieden. Das superfiziell spreitende Melanom (SSM) ist mit 60 % der am häufigsten bei hellhäutigen Patienten auftretende Melanomtyp. Sein Altersgipfel liegt im Erwachsenenalter, es verfügt über die größte morphologische Vielfalt und kommt

besonders am Unterschenkel und am Stamm vor. Es wächst vergleichsweise rasch (Monate bis Jahre) und ist durch vorwiegend horizontales Wachstum gekennzeichnet. Das akrolentiginöse maligne Melanom (ALM) ist eine Sonderform des SSM, die durch ihre Lokalisation an den Akren (Handflächen und Fußsohlen, Finger- und Zehenendgliedern, aber auch subungual oder in der Nagelmatrix) gekennzeichnet ist. Das ALM ist mit 2-8 % relativ selten bei Hellhäutigen, jedoch die häufigste Melanomart bei negroiden Personen. Das Lentigo maligna Melanom (LMM) macht ca. 5 % aller Melanome hellhäutiger Patienten aus, ist eine Läsion des Alters (Inzidenz Gipfel im 7. und 8. Lebensjahrzehnt) und tritt fast ausschließlich an sonnenexponierten Hautarealen (Gesicht, Handrücken, Unterarme) auf. Etwa 15-20 % aller Melanome Hellhäutiger sind noduläre Melanome (NM). Diese aggressivste Variante des Melanoms ist durch fehlendes horizontales und sofortiges vertikales Wachstum gekennzeichnet. Das NM wächst sehr rasch (Monate), ist nicht selten erosiv oder exulzeriert, teilweise nekrotisch und tritt häufig am Stamm auf. Die fünfte Gruppe mit einer Auftretenshäufigkeit von ca. 5 % wird von den nicht klassifizierbaren Melanomen (UCM = „*unclassified melanoma*“) gebildet (ALTMAYER, 1998; FRITSCH, 1998).

Vereinfachend geht man davon aus, dass sich das maligne Melanom über drei Stufen entwickelt, der *in situ* radialen Wachstumsphase, der invasiven radialen Wachstumsphase und der vertikalen Wachstumsphase. In der *in situ* radialen Wachstumsphase breitet sich der Tumor seitlich aus. In diesem Stadium ist das Wachstum ausschließlich auf die Epidermis begrenzt. Treten kleinere Infiltrationen der dermalen Papillen auf, so ist das Melanom in die Phase des invasiven radialen Wachstums übergegangen. Die Tumorzellen in Epidermis und papillärer Dermis sind hierbei ähnlich in Größe, Anzahl und Zytologie. Tumorzellmitosen finden sich nur selten in der papillären Dermis. In der vertikalen Wachstumsphase wachsen Tumorzellknötchen infiltrierend in die Dermis ein, wobei ein Einbrechen in die retikuläre Dermis und das subkutane Fettgewebe möglich ist. Die Zahl der Tumorzellen in der papillären Dermis ist in dieser Phase größer verglichen zu den in der Epidermis liegenden Zellen. Häufig unterscheiden sich die Melanomzellen der Dermis zytologisch von denen der Epidermis. Auch sind Mitosen in den papillären

dermalen Tumorzellnestern in dieser Phase häufiger nachweisbar (SLOMINSKI et al., 1995).

Gemäß des Vorschlages des „American Joint Committee on Cancer“ (AJC), wird die Erkrankung in vier Stadien unterteilt (AHMED, 1997). In den Stadien I und II findet ein lokalisiertes Wachstum ohne Lymphknoten- und Fernmetastasen statt. Im Stadium III treten Satellitentumoren innerhalb von 2 cm vom Primärtumor oder regionale Lymphknotenmetastasen auf. Das Stadium IV ist durch das Auftreten von Fernmetastasen gekennzeichnet.

Verschiedene pathologische und klinische Kriterien sind etabliert, um die Prognose von malignen Melanomen zu bewerten.

Das wichtigste Kriterium, das durch zahlreiche Statistiken untermauert wurde, ist das vertikale Ausmaß, in dem das Melanom in das Gewebe eingedrungen ist.

Eine sehr genaue prognostische Beurteilung erlaubt die absolute Messung der maximalen Tumordicke nach Breslow (BRESLOW, 1970; BALCH et al., 1992). Hierbei wird die lokale Ausdehnung des Melanoms in Millimeter als Entfernung zwischen Granularzellschicht und der am tiefsten gelegenen Tumorzelle angegeben (BRESLOW, 1970). Melanome mit einer maximalen Tumordicke bis 0,75 mm sind prognostisch mit einer 5-Jahresüberlebensrate von 80 % günstig, Tumoren dicker als 1,5 mm hingegen sind mit einer Überlebensquote von < 30 % prognostisch schlecht (FRITSCH, 1998).

Die Einteilung des Melanoms nach Clark hingegen beruht auf einer relativen Beurteilungsmethode, bei der das Eindringen des Tumors an den vorliegenden anatomischen Strukturen der Haut gemessen wird. Bei einem Clark-Level von I ist der Tumor auf die Epidermis begrenzt (präinvasiv), die 5-Jahresüberlebensrate beträgt 100 %. Bei einem Level von II erfolgt bereits an einigen Stellen eine Infiltration der papillären Dermis, im Stadium III ist die papilläre Dermis mit Tumor ausgefüllt und im Stadium IV dringen Tumorzellen in die retikuläre Dermis ein. Ein Clark-Level V bezeichnet die Infiltration des Tumors in das subkutane Fettgewebe und weist eine 5-Jahresüberlebensrate von 20 % auf (FRITSCH, 1998).

Des Weiteren wird die Prognose vom histologischen Typ des Tumors beeinflusst. Die 10-Jahresüberlebensrate von LMM-Patienten ist mit 90 % höher als von

Personen mit SSM und NM, bei denen sie bei 65 % liegt. Patienten mit ALM haben mit einer 10-Jahresüberlebensrate von 50 % die schlechteste Prognose (BALCH et al., 1992).

Neben den oben genannten Faktoren beeinflusst auch das Geschlecht der Patienten die Prognose. So ist gezeigt worden, dass Frauen mit malignem Melanom insgesamt eine bessere Überlebensrate haben als Männer (CLARK et al., 1989; BALCH et al., 1992).

Der Einfluß des Alters auf die Prognose ist weniger eindeutig. Während Männer, die jünger als 50 Jahre sind, bei Lymphknotenmetastasierung des malignen Melanoms eine signifikant bessere 10-Jahresüberlebensrate als über 50-jährige Patienten aufweisen, ist dieser Alterszusammenhang bei Frauen nicht nachweisbar (BALCH et al., 1992).

Als weiterer Prognosefaktor ist der Anteil von Tumorzellen in der S-Phase etabliert. So wurde in einer Studie mit 369 Melanompatienten gezeigt, dass eine Erhöhung des S-Phase-Index mit einer schlechteren Prognose korreliert (KARJALAINEN et al., 1998).

Des Weiteren ist die Überlebenszeit abhängig von der Ploidie des Tumors. So konnte in einer umfangreichen Studie gezeigt werden, dass Aneuploidie ein signifikant die Prognose des malignen Melanoms negativ beeinflussender Faktor ist (KHEIR et al., 1988). In einer anderen Arbeit wurde demonstriert, dass Aneuploidie mit Metastasenbildung und Letalität korreliert (HERZBERG et al., 1991).

Daneben wird die Prognose des malignen Melanoms von einer Reihe weiterer pathologischer und klinischer Faktoren beeinflusst, wie der Abwehrlage des Patienten, der Lokalisation des Tumors, der Infiltration von Gefäßen, dem Auftreten von Ulzerationen und der Mitoserate (AHMED, 1997).

Die operative Entfernung ist die Standardtherapie der Behandlung des Primärtumors eines malignen Melanoms, eine präoperative sonographische Tumordickemessung ist empfehlenswert. Bei Melanomen im Stadium I und II wird der Primärtumor operativ weit exzidiert, wobei ein von der „Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Onkologie“ empfohlener Sicherheitsabstand von etwa 1 cm bei einer Melanomdicke bis 1 mm, ein Abstand von 2 cm bei Melanomen mit einem Breslow zwischen 1 und 4 mm und

ein Sicherheitsabstand von 3 cm bei Tumoren dicker als 4 mm eingehalten wird (ALTMAYER, 1998).

Die therapeutische Lymphknotendissektion (TLND), d.h. die operative Entfernung regionaler Lymphknotenmetastasen, ist als kurativer Therapieansatz anerkannt. Die 5-Jahresüberlebensrate beträgt zwischen 13 und 45 %. Die elektive Lymphknotendissektion (ELND) hingegen wird kontrovers diskutiert. Hierbei kann trotz fehlenden Verdachtes auf Lymphknotenmetastasierung bereits eine elektive regionäre Lymphadenektomie vorgenommen werden, um eventuell vorhandene okkulte Lymphknotenmetastasen zu entfernen, bevor sie an Größe zunehmen und verschleppt werden. Bei Patienten mit einem Melanom mittlerer Dicke (1,5-4 mm) ergibt sich durch die ELND gegebenenfalls ein therapeutischer Vorteil (BALCH et al., 1992). Seit dem Anfang der 90er Jahre durch Donald Morton das Konzept der Darstellung des „sentinel (lymph)node“ (SN = Schildwächter-Lymphknoten) mittels „lymphatic mapping“ eingeführt wurde, hat die elektive Lymphadenektomie weiter an Bedeutung verloren. Grundlage dieses Konzepts ist die Beobachtung, dass bestimmte kutane Areale die Lymphe in spezifische regionäre Lymphknoten drainieren, die sogenannten sentinel Lymphknoten. Die Funktion des SN entspricht der einer Kläranlage eines Flusses, neoplastische Zellen, die über die regionäre Lymphbahn in diesen ersten Lymphknoten gelangen, bleiben dort hängen. Diese SN können szintigraphisch mit Hilfe von radioaktiv markiertem Nanocolloid, das intrakutan in die unmittelbare Umgebung des primären Melanoms injiziert wird, dargestellt werden. Mit einer Gammakamera wird die Aktivität gemessen und das Punktum maximum mit Farbstift markiert. Nach Narkoseeinleitung erfolgt nochmals eine intrakutane Umspritzung des Tumors, diesmal mit Patentblau-5-Lösung, deren Anreicherung die visuelle Darstellung des SN intraoperativ ermöglicht. Nach Entnahme werden die sentinel Lymphknoten histologisch untersucht. Bei Fehlen von Melanomzellen ist die Wahrscheinlichkeit sehr hoch, dass keine regionären Lymphknotenmetastasen vorliegen. Bei histologischem Nachweis von Tumorzellen dagegen wird an die Biopsie eine radikale Lymphadenektomie angeschlossen (ROMPEL und PETRES, 1999).

Die Therapie des Melanoms im Stadium III besteht aus einer kompletten Entfernung von Primärtumor und regionären Lymphknoten. Bei Melanomen mit großer Eindringtiefe wird zusätzlich zur Exzision eine Immunprophylaxe durchgeführt,

zumeist in Form von BCG-Vakzinationen. Diese Immunisierung wurde vor etwa 15 Jahren eingeführt und begründet sich auf die Vorstellung, dass eine Antigenverwandtschaft zwischen Bacillus Calmette-Guerin (BCG) und Melanomzell-determinanten besteht, die kontinuierliche Vakzination bewirke somit eine starke Immunantwort gegen eventuell verbliebene Melanomzellen. Immunprophylaxe mit anderen Mitteln (Bacillus subtilis, Corynebacterium parvum, Levamisole) unterscheiden sich in ihrer Effektivität wenig von der BCG-Immunisierung. Anhänger dieses Verfahrens sind im Schwinden (FRITSCH, 1998).

Treten beim malignen Melanom Fernmetastasen auf, sind die operative Entfernung von Primärtumor und gegebenenfalls Lymphknoten- und Fernmetastasen in der Regel nur noch als palliative Maßnahme anzusehen. Systemische Therapien mit verschiedenen Chemotherapieprotokollen und Interleukin-2 haben bisher nur unbefriedigende Ergebnisse erbracht. Eine Hochdosistherapie mit Interferon- α -2b führt zur signifikanten Erhöhung der Überlebenszeit bei Patienten mit Melanomen dicker 4 mm, welche nach regionärer Lymphknotenentfernung adjuvant behandelt wurden. Melanome sind als relativ strahlenresistente Tumoren anzusehen. Dennoch kann im Stadium IV die Bestrahlung von Fernmetastasen, z.B. Knochenmetastasen, unter palliativen Gesichtspunkten erwogen werden (REEVES und COIT, 2000).

In den beiden letzten Jahrzehnten hat sich ein besseres Verständnis der Karzinogenese herausgebildet. Als Ursache vieler Tumoren konnten Mutationen nachgewiesen werden, die zur kontinuierlichen Aktivierung wachstumsfördernder oder zur Inaktivierung wachstumshemmender Faktoren führen.

Das am häufigsten von Mutationen betroffene Gen kodiert für das Tumor-Suppressor-Protein p53. Dieses Protein wird nach einer DNA-Schädigung induziert und führt zu einem Proliferationsarrest der Zellen in der G₁-Phase (SHERR, 2000). Ist eine Reparatur der geschädigten DNA nicht möglich, wird durch p53 der programmierte Zelltod, die Apoptose, induziert (MOLL und ZAIKA, 2001). Das Tumor-Suppressor-Protein p53 hat eine kurze Halbwertszeit und ist deswegen unter normalen Bedingungen immunhistochemisch schwer nachweisbar (STRETCH et al., 1991). Mutiertes p53 dagegen weist häufig eine verlängerte Halbwertszeit auf, akkumuliert in den Zellen und kann deshalb detektiert werden (FINLAY et al., 1988; IGGO et al., 1990). Die Überexpression von p53 kann in einer Vielzahl von Tumoren

immunohistochemisch nachgewiesen werden. Bei einer Reihe von malignen Tumoren, wie Kolon- (REMVIKOS et al., 1992), Mamma- (THOR et al., 1992) und Bronchialkarzinomen (EBINA et al., 1994) kann des Weiteren eine Abhängigkeit der Prognose von der p53 Überexpression demonstriert werden.

Antagonistisch zu p53 wirkt das Proto-Onkogen bcl-2, welches über noch nicht vollständig geklärte Mechanismen die Apoptose inhibiert. Die Überexpression dieses Proteins wurde zunächst in einer Gruppe von B-Zell-Lymphomen (*B-cell lymphoma*) beobachtet, bei denen eine Translokation des bcl-2 Gens von Chromosom 18 auf Chromosom 14 stattfindet. Durch diese Translokation wird das Gen unter Kontrolle des Promoters für die schwere Kette der Immunglobuline gebracht, was zur Überexpression des Proteins in B-Lymphozyten führt (ANTONSSON und MARTINOU, 2000). Der erhöhte bcl-2 Gehalt ermöglicht dann neoplastischen Zellen, der beispielsweise durch p53 induzierten Apoptose zu entgehen. In nachfolgenden Studien wurde in einer Reihe von Tumoren eine Überexpression von bcl-2 nachgewiesen (REED und ALBINO, 1999). Auch wurde ein Zusammenhang zwischen Überexpression von bcl-2 und schlechter Prognose bei Prostatakarzinomen beschrieben (MATSUSHIMA et al., 1996).

Ki-67 ist ein Zellkernprotein, welches während der G₁-, S-, G₂- und M-Phase, nicht jedoch in der G₀-Phase, nachgewiesen werden kann (ENDL und GERDES, 2000). Es ist damit als Marker für den Anteil proliferierender Zellen an der Gesamtpopulation etabliert. Bei einer Reihe von Tumoren, wie Prostata- und Mammakarzinomen, konnte nachgewiesen werden, dass der Anteil Ki-67-positiver Zellen an der Gesamtpopulation von prognostischer Relevanz ist (AALTOMAA et al., 1997; JANSEN et al., 1998).

1.2 Zielstellung

Melanome sind maligne Tumoren, welche nur in frühen Stadien durch chirurgische Maßnahmen kurativ behandelbar sind. Zur Festlegung der Prognose dieser Erkrankung werden eine Reihe pathologischer und klinischer Parameter verwandt, wie die Tumordicke bzw. -eindringtiefe nach Breslow und Clark. Eine Reihe von Karzinomen zeigt immunhistochemisch eine Überexpression von Ki-67, p53 und bcl-2. Bei einigen Tumoren ist diese als prognostisch ungünstiges Zeichen einzustufen.

In der vorliegenden Arbeit wird die Synthese von Ki-67, p53 und bcl-2 in Melanomen verschiedener Patienten immunhistochemisch nachgewiesen und der Anteil positiver Zellen an der Gesamttumorzellpopulation in Prozent angegeben. In einer zweiten Phase wird dann untersucht, ob die Expression dieser drei Proteine in Zusammenhang steht mit bereits etablierten, für die Prognose relevanten, klinischen und pathologischen Parametern. Ziel der vorliegenden Arbeit ist damit zu untersuchen, inwieweit die immunhistochemische Bestimmung der Expression von Ki-67, p53 und bcl-2 als Prognosekriterium beim malignen Melanom von Nutzen sein könnte.

2 Materialien und Methodik

2.1 Geräte

- Adhäsivobjektträger; MERCK, Darmstadt
- Brutschrank INCO 2; MEMMERT, Schwabach
- Cydok Bildanalysestystem; FIRMA C. H. HILGES, Königswinter
- Deckglas; TECHNISCHES GLAS ILMENAU
- Lichtmikroskop Olympus BX 50 F4; OLYMPUS OPTICAL CO., Tokio, Japan
- Microtom Jung RM 2035; LEICA INSTRUMENTS, Bensheim
- Mikrowelle; SIEMENS, Frankfurt/M.

2.2 Chemikalien

- Alkalische Phosphatase-Maus anti-alkalische Phosphatase (APAAP) Kit Omni Tags Plus; QUARTETT, Berlin
- Anti-bcl-2-Antikörper (clone 124); DAKO, Hamburg
- Anti-MIB-1 (Ki-67)-Antikörper (clone MIB 1); DIANOVA, Hamburg
- Anti-p53-Antikörper (clone DO7); DAKO, Hamburg
- Ethanol (unvergällt, 96 %ig); MERCK, Darmstadt
- Glycerolgelatine; SIGMA-ALDRICH, Deisenhofen
- Kaliummetabisulfat; MERCK, Darmstadt
- Mayer's Hämalun; MERCK, Darmstadt
- Natriumchlorid (NaCl); MERCK, Darmstadt
- Natriumcitrat; SIGMA-ALDRICH, Deisenhofen
- Natronlauge (NaOH); MERCK, Darmstadt
- Rotisol; ROTH, Karlsruhe
- Salzsäure (HCl); MERCK, Darmstadt
- Schiff'sches Reagenz; SIGMA-ALDRICH, Deisenhofen
- Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris); SIGMA-ALDRICH, Deisenhofen
- Xylol; MERCK, Darmstadt
- Zitronensäure; MERCK, Darmstadt

2.3 Lösungen und Puffer

- AP-Substratlösung: AP-Substrattablette (in APAAP Kit enthalten) in 2 ml Trispuffer (0,1 mol/l, pH 8,2, in APAAP Kit enthalten) lösen und unmittelbar vor Gebrauch filtern
- Citratpuffer (pH 6,0): Zitronensäure (1,8 mmol/l) - Natriumcitrat (8,2 mmol/l); 9 ml Stammlösung A und 41 ml Stammlösung B wurden mit 450 ml A.d. vermischt (Endvolumen: 500 ml) und mit 2N NaOH auf den pH=6,0 eingestellt
- Ethanol (unvergällt; 70 %ig und 50 %ig): unvergällter Ethanol (96 %ig) wurde durch Verdünnung mit A.d. auf die entsprechende Konzentration eingestellt
- Schwefeldioxid-Spülbad: 10 ml Kaliummetabisulfat (10 %) und 10 ml HCl (1N) wurden in A.d. gelöst (Endvolumen: 220 ml)
- Stammlösung A: Zitronensäure (0,1 mol/l): 21,01 g Zitronensäure wurde in A.d. gelöst (Endvolumen: 1 l)
- Stammlösung B: Natriumcitrat (0,1 mol/l): 29,41 g Natriumcitrat wurde in A.d. gelöst (Endvolumen: 1 l)
- Trisgepufferte Salzlösung (TBS, pH 7,6): Tris (50 mmol/l) - NaCl (150 mM); 6,1 g Tris und 8,8 g NaCl wurden in A.d. gelöst (Endvolumen: 1 l) und mit 1N HCl auf den pH=7,6 eingestellt

2.4 Untersuchungsmaterial

Von den in der Universitätsklinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg zwischen 1991 und 1997 operativ entfernten malignen Melanomen wurden insgesamt 26 Melanome (10 noduläre und 16 superfiziell spreitende Melanome) für die vorliegende Arbeit ausgewählt. Bei diesen Melanomen lagen neben den allgemeinen Patienteninformationen (Name, Vorname, Geburtsdatum und Geschlecht) folgende Angaben vollständig vor: Datum der Probenentnahme des Primärtumors, Histologienummer, histologischer Melanomtyp, Tumordicke bzw. -eindringtiefe nach Breslow und Clark und der bildanalytisch oder durchflußzytometrisch bestimmte Anteil der Zellen in der S-Phase (KLAPPERSTÜCK, 2001) vor. Auch war bei diesen 26 Melanomen genügend in Paraffin eingebettetes Material in ausreichender Qualität vorhanden, um die Bestimmung der Ploidie und die immunhistochemischen Färbungen vornehmen zu können.

2.5 Bestimmung der Ploidie durch Bildzytophotometrie

Mit einem Mikrotom wurden 4 µm dicke Schnitte der in Paraffin eingebetteten malignen Melanome angefertigt. Dann erfolgte die DNA-Färbung nach Feulgen gemäß folgendem Protokoll:

- Einlegen der Schnitte in Xylol für 10 Minuten bei 60°C
- Einlegen der Schnitte in Rotisol für 5 Minuten bei 60°C
- Einlegen der Schnitte in 96 %igen Ethanol für 5 Minuten bei 60°C
- Einlegen der Schnitte in 70 %igen Ethanol für 5 Minuten bei 60°C
- Einlegen der Schnitte in 50 %igen Ethanol für 5 Minuten bei 60°C
- Einlegen der Schnitte in A.d. für 1 Minute
- Einlegen der Schnitte in 5 mmol/l HCl für 45 Minuten bei 22°C
- Einlegen der Schnitte in A.d. für 30 Sekunden
- Färbung der Schnitte mit Schiff'schem Reagenz für 60 Minuten bei Zimmertemperatur
- 2 x Spülung der Schnitte mit Schwefeldioxid-Spülbad für 3 Minuten
- Spülung der Schnitte unter fließendem Leitungswasser für 30 Minuten
- Einlegen der Schnitte in 50 %igen Ethanol für 2 Minuten
- Einlegen der Schnitte in 70 %igen Ethanol für 2 Minuten
- Einlegen der Schnitte in 96 %igen Ethanol für 2 Minuten
- Einlegen der Schnitte in Rotisol für 2 Minuten
- Einlegen der Schnitte in Xylol für 2 Minuten

Der DNA-gebundene Farbstoff wurde nun mittels monochromatischem Licht bei 466 nm absorptionsphotometrisch unter Zuhilfenahme des Cydok Bildanalyse-Systems vermessen. Pro Präparat wurden 100 Tumorzellen ausgewählt. Zur Erzeugung eines diploiden DNA-Standard wurden desweiteren 30 Referenzzellen, überwiegend Bindegewebszellen, vermessen.. Nach Messung von Tumor- und Referenzzellen wurden DNA-Histogramme der untersuchten Tumoren durch das Bildanalysegerät automatisch erzeugt, aus welchen sich die Ploidie des Melanoms ableiten ließ (KLAPPERSTÜCK und WOHLRAB, 1996; KLAPPERSTÜCK, 2001).

2.6 Immunhistochemischer Nachweis von Ki-67, p53 und bcl-2

Mit einem Mikrotom wurden histologische Schnitte der in Paraffin eingebetteten malignen Melanome mit einer Dicke von 4 µm angefertigt. Diese Schnitte wurden auf einen Adhäsivobjektträger aufgebracht und über Nacht bei 48°C inkubiert.

Dann wurden die Schnitte folgendermaßen behandelt:

- 3 x Einlegen der Adhäsivobjektträger in Xylol für 10 Minuten
- 2 x Einlegen der Adhäsivobjektträger in 96 %igen Ethanol für 5 Minuten
- 1 x Einlegen der Adhäsivobjektträger in 70 %igen Ethanol für 5 Minuten
- 1 x Einlegen der Adhäsivobjektträger in 50 %igen Ethanol für 5 Minuten
- 1 x Einlegen der Adhäsivobjektträger in A.d. für 5 Minuten
- Einlegen der Schnitte in Citratpuffer und Mikrowellenbehandlung bei 600 W für 3 x 5 Minuten
- Abkühlung der Schnitte bei Raumtemperatur für 20 Minuten
- 2 x Spülung der Schnitte mit A.d. für 5 Minuten
- Vorsichtiges Entfernen von A.d. durch Tupfen mit Zellstoff
- Zugabe von Eiweißblocklösung (im APAAP-Kit enthalten) für 5 Minuten
- Abgießen der Eiweißblocklösung
- Zugabe von 100 µl – 200 µl (je nach Größe des Schnittes) anti-Ki-67- (1:5 verdünnt in TBS) anti-bcl-2- (1:10 verdünnt in TBS) oder anti-p53-Antikörperlösung (1:20 verdünnt in TBS)
- Inkubation für 1 h bei 37°C im Brutschrank
- 2 x Spülung der Schnitte mit TBS für 5 Minuten
- Zugabe von 100 µl – 200 µl Kaninchen-anti-Maus-Antikörperlösung (im APAAP-Kit gebrauchsfertig enthalten) für 30 Minuten
- 2 x Spülung der Schnitte mit TBS für 5 Minuten
- Zugabe von 100 µl – 200 µl APAAP (im APAAP-Kit gebrauchsfertig enthalten) für 30 Minuten
- 2 x Spülung der Schnitte mit TBS für 5 Minuten
- Vorsichtiges Entfernen von TBS durch Tupfen mit Zellstoff
- Zugabe von 100 µl – 200 µl der AP-Substratlösung „fast red“ für 5 Minuten
- Schnitte vorsichtig für 3 Minuten unter fließendem Leitungswasser spülen
- Gegenfärbung mit Mayer´s Hämalaun für 1 Minute
- Schnitte unter fließendem Leitungswasser vorsichtig abspülen

- Schnitte für 10 Minuten in Leitungswasser stellen
- Eindecken mit Glycerolgelatine
- Deckglas

2.7 Kontrollen

Bei allen immunhistochemischen Färbungen wurden parallel positive und negative Kontrollen mitgeführt, um die Qualität des Nachweises von Ki-67, p53 und bcl-2 zu überprüfen. Als Positivkontrollen dienten für p53 histologische Schnitte von Mammakarzinomen (LASSAM et al., 1993) und für bcl-2 lymphatisches Gewebe (JAY et al., 1996). Beide Gewebe wurden uns dankenswerterweise durch Herrn Dr. H. Bahn (Pathologisches Institut der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) zur Verfügung gestellt. Bei Ki-67-Färbungen wurden die Zellen des Stratum basale der Epidermis als interne Positivkontrolle verwandt (RAMSAY et al., 1995). Als negative Kontrollen dienten histologische Schnitte, welche ohne Primärantikörper, unter ansonsten gleichen Bedingungen, inkubiert wurden.

2.8 Quantitative Auswertung von Ki-67, p53 und bcl-2

Von jedem der untersuchten Melanome wurden acht Schnitte angefertigt und von diesen je zwei Schnitte mit spezifischem Ki-67-, p53- und bcl-2-Antikörper sowie ohne Primärantikörper als Negativkontrolle inkubiert. Nach immunhistochemischer Anfärbung der Präparate wurden zwei verschiedene repräsentative Felder pro Schnitt ausgewählt (entspricht vier Feldern insgesamt für jedes untersuchte Antigen) und in jedem Feld ca. 100 Tumorzellen lichtmikroskopisch ausgezählt. Der Anteil der Ki-67-, p53- und bcl-2-positiven Zellen an der Gesamttumorzellzahl wurde dann in Prozent als Ki-67-, p53- und bcl-2-Index angegeben. Die aufgeführte Methodik ist in einer Reihe von Publikationen beschrieben worden (GELSLEICHTER et al., 1995; KANTER et al., 1995; RAMSAY et al., 1995; KARLSSON et al., 1996; STRAUME et al., 2000).

2.9 Statistische Auswertung der Daten

Es war zu untersuchen, ob der jeweilige klinische oder pathologische prognostische Faktor Einfluß auf den Anteil von Ki-67-, p53- und bcl-2-exprimierenden Tumorzellen hat. Hierzu wurde zunächst der Mittelwert der Färbungsindices in den unterschiedlichen Gruppen, zusammen mit Standardabweichung sowie Minimum und

Maximum bestimmt. Mit Hilfe des t-Tests wurden dann die unabhängigen Gruppen miteinander verglichen und auf signifikante Unterschiede untersucht. Als statistisch signifikant wurde ein $p < 0,05$ angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der untersuchten Melanome

Untersucht wurden insgesamt 26 Melanome, die zwischen 1991 und 1997 in der Universitätsklinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg operativ entfernt wurden. Histologisch handelte es sich um 10 noduläre Melanome und 16 superfiziell spreitende Melanome (Abb. 1). 31 % der Patienten waren männlichen, 69 % weiblichen Geschlechts (Abb. 2). Das Alter der Patienten lag zwischen 20 und 84 Jahren, bei einem mittleren Alter von 58,3 Jahren (Abb. 3). Als klinische Prognosekriterien waren bei allen untersuchten Patienten die Tumordicke bzw. -eindringtiefe nach Breslow und Clark bestimmt worden. Clark-Level von I bis V waren im Patientengut vertreten (Abb. 4). Die Breslow-Werte lag zwischen 0,20 mm und 15,0 mm, der Mittelwert bei 2,9 mm (Abb. 5). Durchflußzytomotrisch oder bildanalytisch war bei allen Patienten der Anteil der Zellen in der S-Phase an der Gesamttumorzellpopulation ermittelt worden. Der Mittelwert lag bei 10,2 %, bei Werten zwischen minimal 4,3 % und maximal 19,7 % (Abb. 6). Von den 26 untersuchten Melanomen waren 58 % diploid und 42 % aneuploid (Abb. 7).

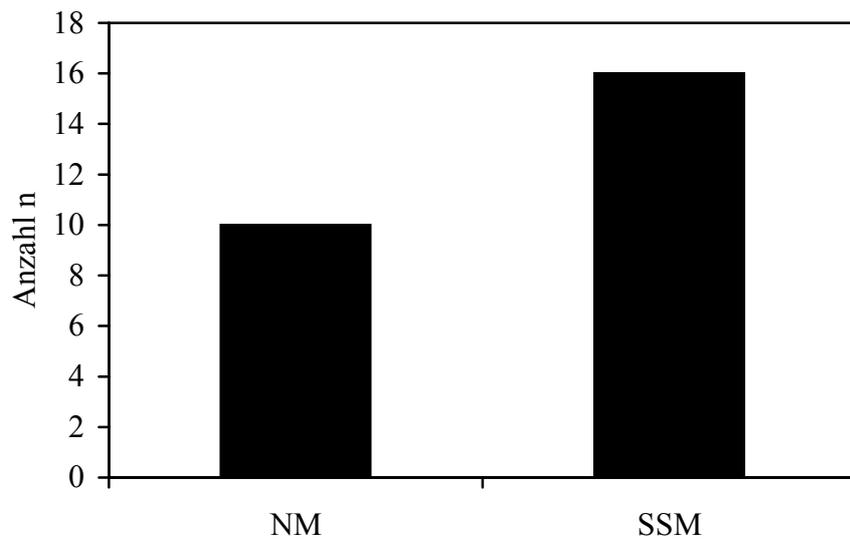


Abb. 1: Histologische Melanomtypen

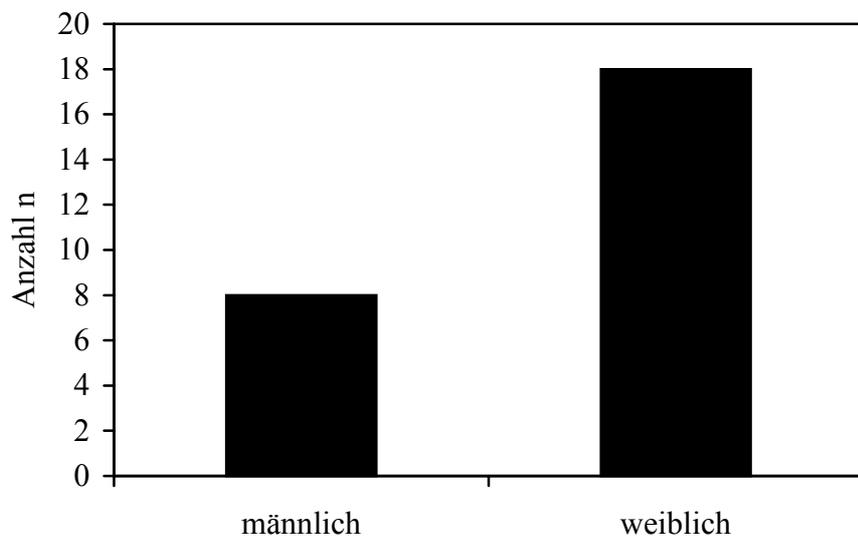


Abb. 2: Geschlechtsverteilung der Patienten

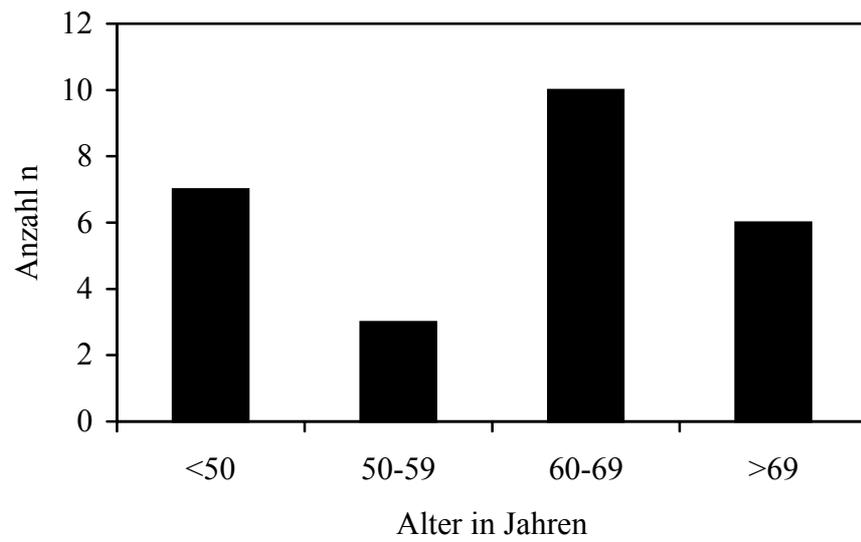


Abb. 3: Altersverteilung der Patienten

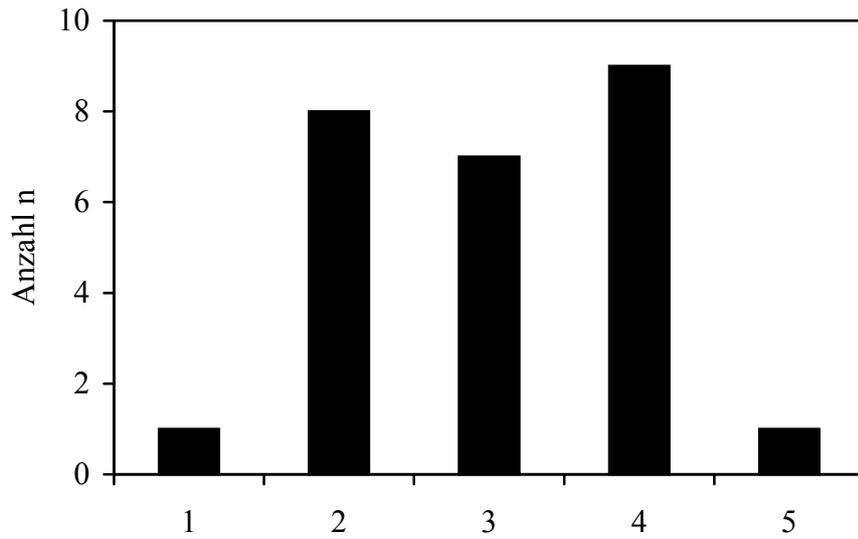


Abb. 4: Klinische Einteilung der Eindringtiefe nach Clark

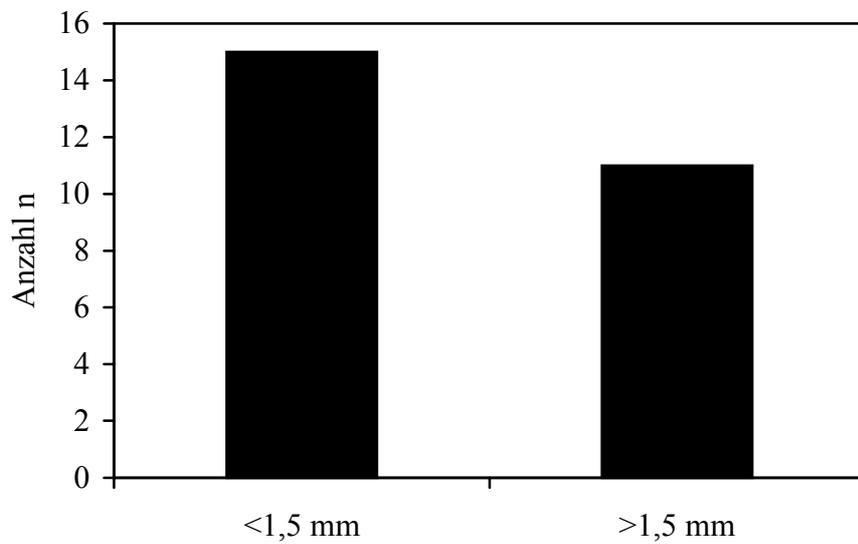


Abb. 5: Klinische Einteilung der Melanomdicke nach Breslow

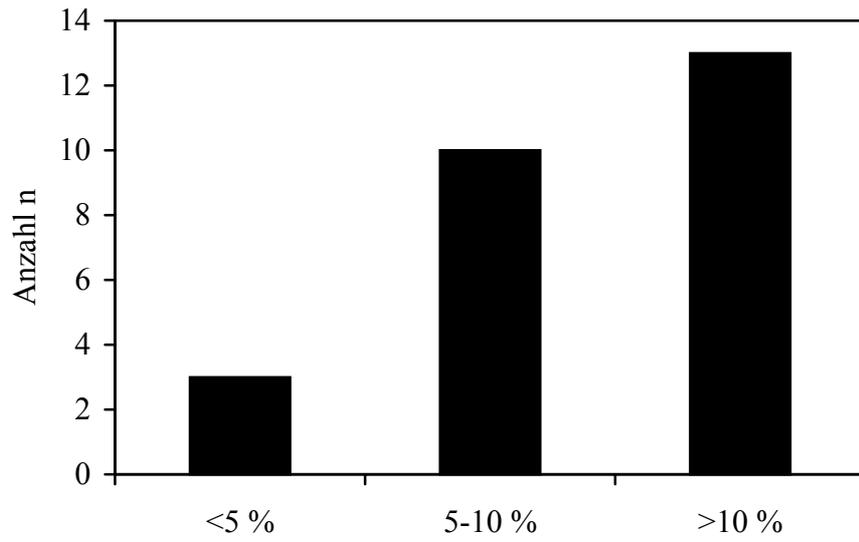


Abb. 6: Anteil der Zellen in der S-Phase (% S-Phase)

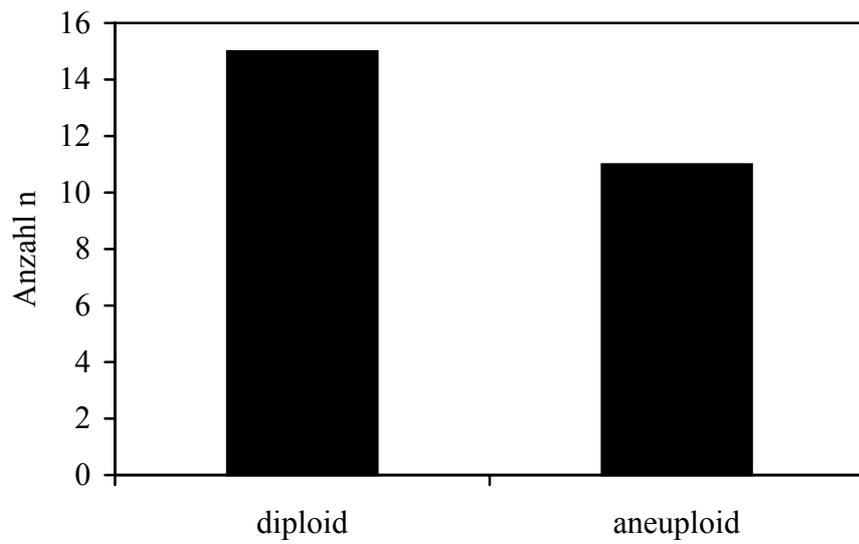


Abb. 7: Ploidie der untersuchten Melanome

3.2 Nachweis von Ki-67

In allen 26 untersuchten malignen Melanomen war Ki-67 nachweisbar. Die positive Immunreaktion war deutlich an der roten Färbung der Zellkerne zu erkennen (Abb. 8, Abb. 9.) Die Befunde wurden durch mitgeführte Positiv- und Negativkontrollen abgesichert. Der Anteil an Ki-67-positiven Tumorzellen bezogen auf die Gesamttumorzellpopulation, bezeichnet als Ki-67-Index, lag im Mittel bei 28,43 %, bei einer Standardabweichung von 17,13 % (Tab. 1). Der mittlere Ki-67-Index von Melanomen mit einem Breslow-Wert kleiner 1,5 mm war mit 27,90 % nicht signifikant verschieden zu 29,16 % bei einem Breslow-Wert größer 1,5 mm ($p=0,86$) (Tab. 1). Die Tumoren mit einem Clark-Level von I bis III zeigten im Mittel einen Ki-67-Index von 29,50 % verglichen zu 26,73 % im Stadium IV und V ($p=0,70$) (Tab. 1). Auch der histologische Typ des Tumors hatte keinen signifikanten Einfluß auf den Ki-67-Index, mit Mittelwerten von 28,89 % bei nodulären und 28,15 % bei superfiziell spreitenden Melanomen ($p=0,92$) (Tab. 1). Männer wiesen einen mittleren Ki-67-Index von 30,27 % auf verglichen zu 27,62 % bei Frauen ($p=0,72$) (Tab. 1). Der mittlere Ki-67-Index stieg mit zunehmenden Alter an, von einem durchschnittlichen Index von 24,12 % bei den unter 50jährigen auf 37,51 % bei den über 69jährigen Patienten ($p=0,22$) (Tab. 1). Der Ki-67-Index in Melanomen mit einem Anteil in der S-Phase befindlicher Zellen ≥ 10 % war mit 36,39 % größer verglichen zu 18,09 % in Melanomen mit einem Anteil DNA-synthetisierender Zellen ≤ 5 % (Tab. 1). Dieser Zusammenhang erreichte bei einem $p=0,12$ jedoch keine statistische Signifikanz (Tab. 1). Wurde der Ki-67-Index in Abhängigkeit von der Ploidie bestimmt, so war der mittlere Index in aneuploiden Melanomen mit 35,19 % höher verglichen zu diploiden Tumoren mit 23,48 % (Tab. 1). Dieser Zusammenhang verfehlte mit einem $p=0,08$ ebenfalls nur knapp die statistische Signifikanz (Tab. 1).

Zusammenfassende Bewertung:

Der Ki-67-Index wurde in den untersuchten Melanomen durch immunhistochemische Färbung bestimmt und in Beziehung zu bekannten prognostischen Kriterien des Tumors gesetzt. Hierbei konnte ein starker Trend ($p=0,07$) zu einem Anstieg des Index in aneuploiden im Vergleich zu diploiden Tumoren nachgewiesen werden. Auch gab es einen Trend ($p=0,12$) zu einem höheren

Ki-67-Index in Melanomen mit einem Anteil DNA-synthetisierender Zellen ≥ 10 % verglichen zu Melanomen mit einem Anteil ≤ 5 %. Dagegen konnten keine signifikanten Unterschiede des Anteils Ki-67-positiver Tumorzellen bei verschiedener Tumordicke bzw. Eindringtiefe nach Breslow und Clark sowie zwischen nodulären und superfiziell spreitenden Melanomen nachgewiesen werden. Auch änderte sich der Ki-67-Index nicht signifikant in Abhängigkeit von Geschlecht und Alter des Patienten.

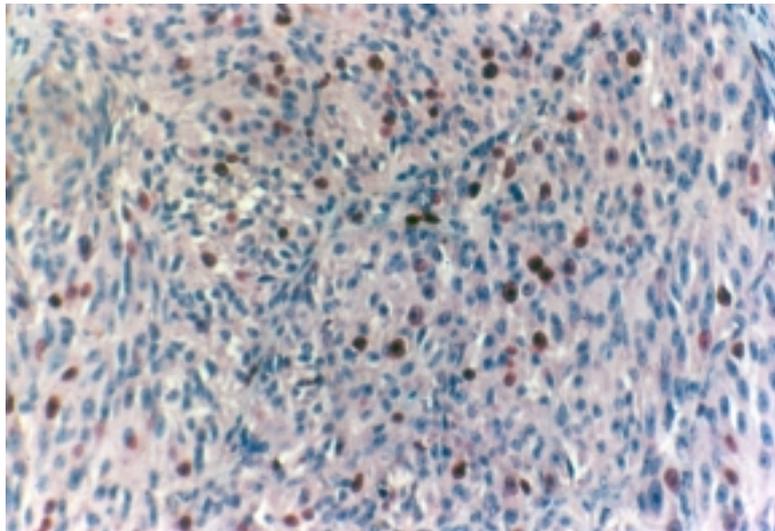


Abb. 8: Noduläres Melanom (Histologie-Nr.: 741b/94)
Immunhistochemische Ki-67-Färbung mit APAAP
Ki-67-positive Kerne färben sich rot, Ki-67-negative Kerne sind blau
angefärbt
Mikroskopische Vergrößerung 200fach

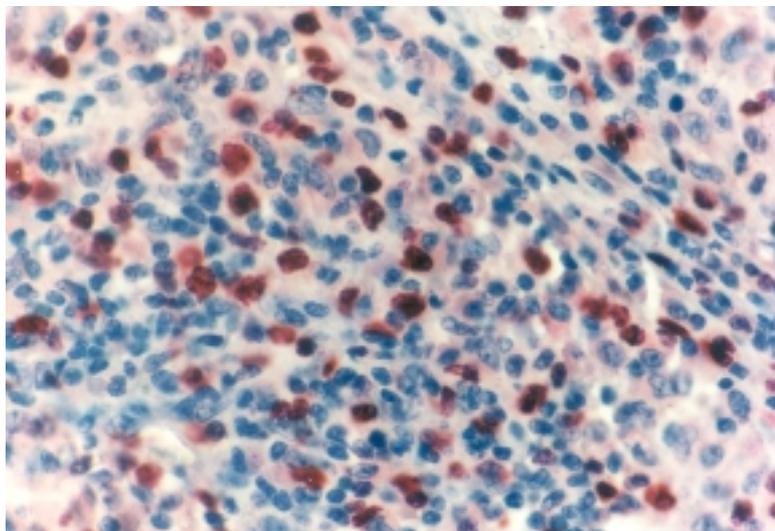


Abb. 9: Noduläres Melanom (Histologie-Nr.: 160b/92)
Immunhistochemische Ki-67-Färbung mit APAAP
Ki-67-positive Kerne färben sich rot, Ki-67-negative Kerne sind blau
angefärbt
Mikroskopische Vergrößerung 400fach

Parameter	n	Ki-67-Index (%)				P
		Mittelwert	Minimum	Maximum	SD	
Gesamt	26	28,43	4,65	63,99	17,13	
Breslow-Wert						
• < 1,5 mm	15	27,90	5,80	63,99	15,77	
• ≥ 1,5 mm	11	29,16	4,65	60,21	19,62	0,86
Clark-Level						
• I, II, III	16	29,50	5,80	63,99	17,48	
• IV, V	10	26,73	4,65	50,25	17,34	0,70
Histologie						
• NM	10	28,89	4,65	60,21	20,66	
• SSM	16	28,15	5,80	63,99	15,26	0,92
Geschlecht						
• Männlich	8	30,27	5,80	63,99	19,54	
• Weiblich	18	27,62	4,65	60,21	16,50	0,72
Alter						
• < 50 Jahre	7	24,12	4,65	63,99	20,52	
• 50-59 Jahre	3	24,06	23,33	25,29	1,07	0,99
• 60-69 Jahre	10	27,31	5,80	55,44	18,15	0,74
• > 69 Jahre	6	37,51	17,49	60,21	15,18	0,22
% S-Phase						
• ≤ 5 %	3	18,09	5,80	25,14	10,68	
• >5 %, <10 %	10	21,19	4,65	44,66	13,41	0,72
• ≥10 %	13	36,39	15,21	63,99	17,85	0,12
Ploidie						
• Diploid	15	23,48	4,65	55,44	15,97	
• Aneuploid	11	35,19	16,89	63,99	17,03	0,08

Tab. 1: Statistischer Vergleich zwischen Ki-67-Expression und klinischen bzw. histologischen Parametern

3.3 Nachweis von p53

In allen 26 untersuchten malignen Melanomen war p53 nachweisbar. Eine positive Immunreaktion war deutlich an der roten Färbung der Zellen zu erkennen (Abb. 10, Abb. 11). Bezogen auf alle untersuchten Melanome lag der mittlere p53-Index bei 61,48 % (Tab. 2). Die Standardabweichung der Gesamtpopulation betrug 18,61 % (Tab. 2). Bei Melanomen mit einem Breslow-Wert kleiner 1,5 mm war der mittlere p53-Index mit 69,38 % signifikant größer als bei Tumoren mit einem Breslow größer 1,5 mm, wo er 50,71 % betrug ($p=0,009$) (Tab. 2). Die Tumoren mit einem Clark-Level von I bis III wiesen einen Mittelwert des p53-Index von 66,72 % auf verglichen zu 53,11 % in den Stadien IV und V (Tab. 2). Dieser Unterschied verfehlte mit einem $p=0,07$ nur knapp die statistische Signifikanz (Tab. 2). Der p53-Index war in nodulären Melanomen mit einem Mittelwert von 46,96 % signifikant geringer verglichen zu 70,56 % in superfiziell spreitenden Melanomen ($p=0,0006$) (Tab. 2). Dagegen konnte keine Abhängigkeit des p53-Index vom Geschlecht demonstriert werden, mit Mittelwerten von 66,52 % bei Männern und 59,25 % bei Frauen ($p=0,37$) (Tab. 2). Auch war keine signifikante Änderung des Anteils p53-positiver Zellen in den verschiedenen Altersgruppen nachweisbar (Tab. 2). Ebenfalls keine statistisch signifikanten Unterschiede ließen sich nachweisen, wenn der p53-Index auf den Anteil der in der S-Phase befindlichen Zellen bezogen wurde (Tab. 2). Wurde der p53-Index in Abhängigkeit von der Ploidie bestimmt, so unterschied sich der mittlere Index in aneuploiden Melanomen mit 61,86 % statistisch nicht signifikant von 61,21 % in diploiden Tumoren ($p=0,93$) (Tab. 2).

Zusammenfassende Bewertung:

Durch immunhistochemische Anfärbung mit p53-spezifischem primären Antikörper wurde der p53-Index in den untersuchten Melanomen bestimmt und in Beziehung zu bekannten prognostischen Kriterien gesetzt. Hierbei konnte ein statistisch signifikanter Abfall des Index in Tumoren mit einem Breslow-Wert größer 1,5 mm verglichen zu einem Breslow kleiner 1,5 mm nachgewiesen werden. Ebenfalls war der p53-Index in superfiziell spreitenden Melanomen signifikant größer im Vergleich zu nodulären Melanomen. Auch gab es einen Trend ($p=0,07$) zu einer Verminderung des p53-Index bei Patienten mit einem Clark-Level von IV oder V. Es ließen sich keine signifikanten Unterschiede des Anteils p53-positiver Tumorzellen zwischen

Männern und Frauen und in verschiedenen Altersgruppen nachweisen. Auch änderte sich der p53-Index nicht signifikant in Abhängigkeit vom Anteil DNA-synthetisierender Zellen und von der Ploidie.

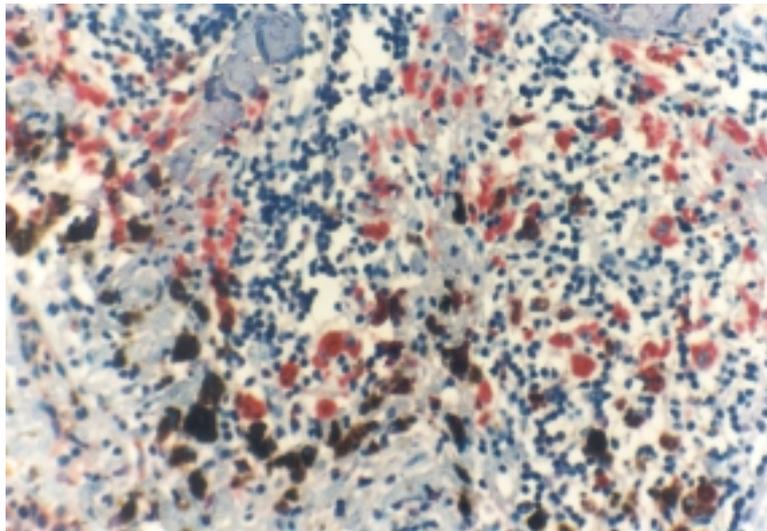


Abb. 10: Superfiziell spreitendes Melanom (Histologie-Nr.: 2900a/96)
Immunhistochemische p53-Färbung mit APAAP
p53-positive Zellen färben sich rot, p53-negative Zellen sind blau
angefärbt
Mikroskopische Vergrößerung 200fach

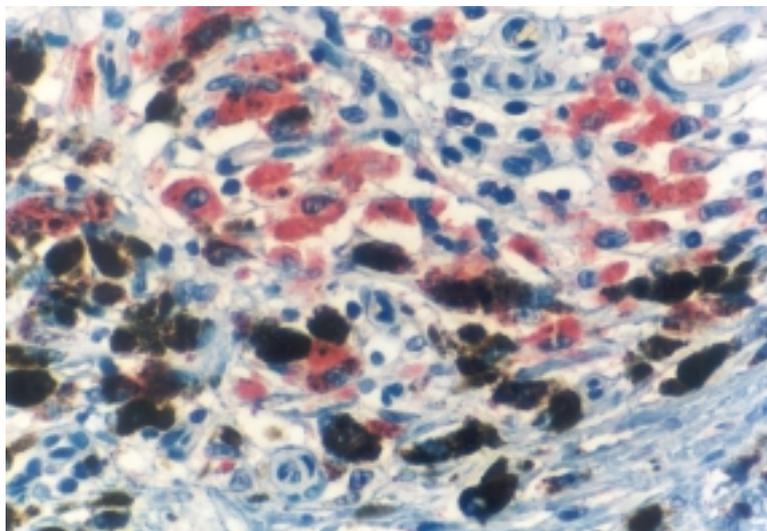


Abb. 11: Superfiziell spreitendes Melanom (Histologie-Nr.: 3373a/96)
Immunhistochemische p53-Färbung mit APAAP
p53-positive Zellen färben sich rot, p53-negative Zellen sind blau
angefärbt
Mikroskopische Vergrößerung 400fach

Parameter	n	p53-Index (%)				SD	P
		Mittelwert	Minimum	Maximum			
Gesamt	26	61,48	20,89	88,25	18,61		
Breslow-Wert							
• < 1,5 mm	15	69,38	54,13	84,98	9,24		
• ≥ 1,5 mm	11	50,71	20,89	88,25	22,92	0,009	
Clark-Level							
• I, II, III	16	66,72	20,89	84,98	14,88		
• IV, V	10	53,11	27,69	88,25	21,60	0,07	
Histologie							
• NM	10	46,96	20,89	76,69	20,29		
• SSM	16	70,56	54,13	88,25	10,09	0,0006	
Geschlecht							
• Männlich	8	66,52	20,89	84,98	20,49		
• Weiblich	18	59,25	27,69	88,25	17,87	0,37	
Alter							
• < 50 Jahre	7	60,31	31,42	84,98	20,59		
• 50-59 Jahre	3	68,88	57,03	81,10	12,04	0,53	
• 60-69 Jahre	10	60,71	20,89	88,25	23,38	0,97	
• > 69 Jahre	6	60,44	37,46	72,58	12,01	0,99	
% S-Phase							
• ≤ 5 %	3	76,41	68,52	84,98	8,25		
• >5 %, <10 %	10	55,76	27,69	88,25	21,34	0,14	
• ≥10 %	13	62,44	20,89	81,10	16,88	0,19	
Ploidie							
• Diploid	15	61,21	27,69	84,98	19,66		
• Aneuploid	11	61,86	20,89	88,25	18,02	0,93	

Tab. 2: Statistischer Vergleich zwischen p53-Expression und klinischen bzw. histologischen Parametern

3.4 Nachweis von bcl-2

Von den 26 untersuchten malignen Melanomen zeigten alle bcl-2-positive Bereiche, welche deutlich durch die rote Färbung der Zellen nachweisbar waren (Abb. 12, Abb. 13). Der mittlere bcl-2-Index lag bei allen untersuchten Melanomen bei 65,51 %, bei einer Standardabweichung von 18,27 % (Tab. 3). Melanome mit einem Breslow-Wert kleiner 1,5 mm hatten einen mittleren bcl-2-Index von 63,21 % verglichen zu 68,66 % mit einem Breslow größer 1,5 mm ($p=0,46$) (Tab. 3). Die Tumoren mit einem Clark-Level von I bis III wiesen mit einem mittleren bcl-2-Index von 61,55 % keinen signifikanten Unterschied zu Tumoren in den Stadien IV und V auf, bei denen der Mittelwert bei 71,86 % lag ($p=0,17$) (Tab. 3). Auch der histologische Typ des Tumors hatte keinen signifikanten Einfluss auf den bcl-2-Index (Tab. 3). In nodulären Melanomen betrug der Mittelwert des bcl-2-Index 67,47 % verglichen zu 64,29 % in superfiziell spreitenden Melanomen ($p=0,67$) (Tab. 3). Weiterhin konnte keine Abhängigkeit des bcl-2-Index vom Geschlecht demonstriert werden, mit Mittelwerten von 68,74 % bei Männern und 64,08 % bei Frauen ($p=0,56$) (Tab. 3). Auch war keine signifikante Änderung des bcl-2-Index in den verschiedenen Altersgruppen und in Abhängigkeit vom DNA-Syntheseindex nachzuweisen (Tab. 3). Des Weiteren konnte keine Abhängigkeit des bcl-2-Index von der Ploidie nachgewiesen werden, mit Mittelwerten von 67,37 % in diploiden Melanomen und 62,98 % in aneuploiden Tumoren ($p=0,56$) (Tab. 3).

Zusammenfassende Bewertung:

Unter Verwendung spezifischer Antikörper konnte bcl-2 in allen untersuchten Melanomen immunhistochemisch nachgewiesen und in Beziehung zu bekannten prognostischen Kriterien gesetzt werden. Hierbei konnten keine signifikanten Unterschiede des bcl-2-Index in Abhängigkeit von Tumordicke bzw. -eindringtiefe nach Breslow und Clark, histologischem Typ, Geschlecht, Alter, DNA-Syntheseindex und Tumorploidie nachgewiesen werden.

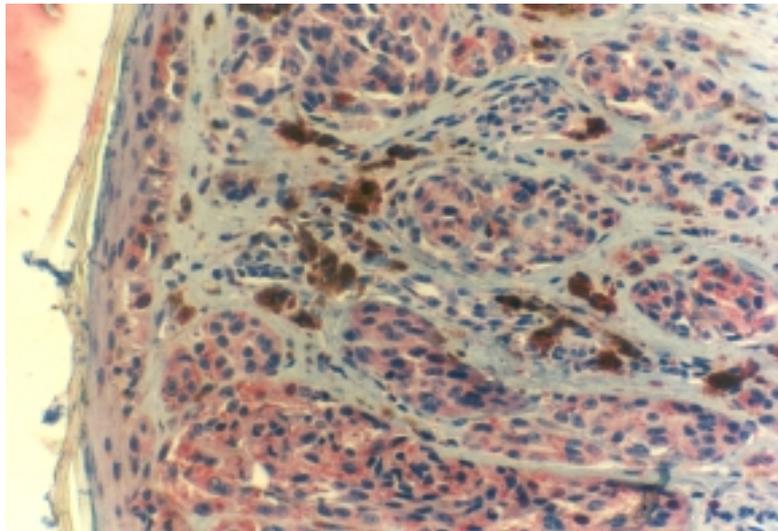


Abb. 12: Superfiziell spreitendes Melanom (Histologie-Nr.: 833a/91)
Immunhistochemische bcl-2-Färbung mit APAAP
bcl-2-positive Zellen färben sich rot, bcl-2-negative Zellen sind blau
angefärbt
Mikroskopische Vergrößerung 200fach

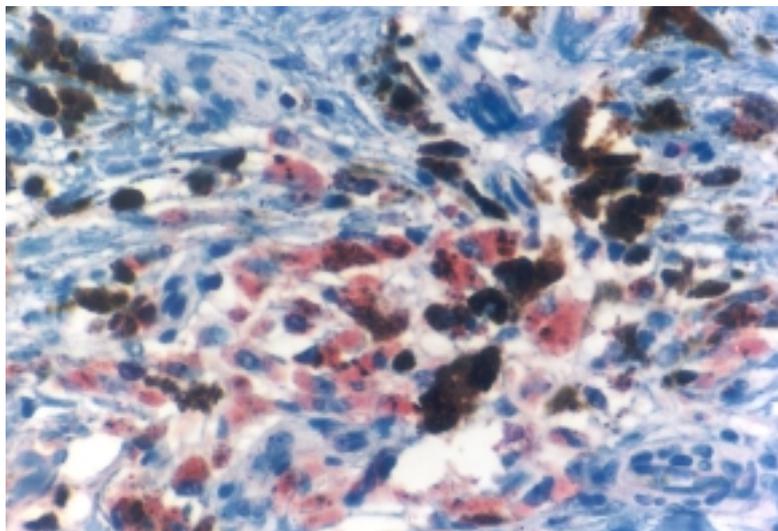


Abb. 13: Superfiziell spreitendes Melanom (Histologie-Nr.: 3373a/96)
Immunhistochemische bcl-2-Färbung mit APAAP
bcl-2-positive Zellen färben sich rot, bcl-2-negative Zellen sind blau
angefärbt
Mikroskopische Vergrößerung 400fach

Parameter	n	bcl-2-Index (%)				P
		Mittelwert	Minimum	Maximum	SD	
Gesamt	26	65,51	9,66	88,82	18,27	
Breslow-Wert						
• < 1,5 mm	15	63,21	9,66	86,06	19,06	
• ≥ 1,5 mm	11	68,66	37,44	88,82	17,52	0,46
Clark-Level						
• I, II, III	16	61,55	9,66	86,06	18,89	
• IV, V	10	71,86	37,44	88,82	16,12	0,17
Histologie						
• NM	10	67,47	37,44	88,82	18,00	
• SSM	16	64,29	9,66	86,06	18,91	0,67
Geschlecht						
• Männlich	8	68,74	56,05	86,06	10,42	
• Weiblich	18	64,08	9,66	88,82	20,95	0,56
Alter						
• < 50 Jahre	7	61,78	9,66	86,86	26,63	
• 50-59 Jahre	3	69,98	66,24	76,26	5,47	0,62
• 60-69 Jahre	10	71,01	37,44	88,82	15,69	0,38
• > 69 Jahre	6	58,49	41,24	80,76	14,53	0,79
% S-Phase						
• ≤5 %	3	71,80	61,91	86,06	12,65	
• >5 %, <10 %	10	59,24	9,66	86,86	24,11	0,41
• ≥10 %	13	68,89	46,82	88,82	13,33	0,74
Ploidie						
• Diploid	15	67,37	9,66	86,86	20,67	
• Aneuploid	11	62,98	41,24	88,82	14,98	0,56

Tab. 3: Statistischer Vergleich zwischen bcl-2-Expression und klinischen bzw. histologischen Parametern

4 Diskussion

4.1 Zellzyklus und Tumorentstehung

In den beiden letzten Jahrzehnten hat sich ein besseres Verständnis der Entstehung von Tumoren auf molekularer Ebene herausgebildet. Eine zentrale Stellung scheint hierbei die gestörte Kontrolle des Zellzyklus einzunehmen, die dazu führt, dass Zellen unkontrolliert proliferieren (SHERR, 2000). Der Zellzyklus wird in der Reihenfolge G₁-, S-, G₂-, M-Phase durchlaufen. Dabei kommt es in der S-Phase zur Verdopplung der DNA, der sogenannten DNA-Replikation, welche dann in der Mitose- oder M-Phase auf zwei Tochterzellen gleichmäßig verteilt wird. Die G-Phasen sind als Zwischenphasen anzusehen, in denen die nachfolgenden Prozesse vorbereitet bzw. die vorangegangenen Prozesse kontrolliert werden. Ruhende, nicht teilende Zellen befinden sich in der G₀-Phase (SHERR, 2000). Eine Reihe von Proteinen ist beschrieben worden, die als positive oder negative Regulatoren den Zellzyklus kontrollieren. So werden in der G₁-Phase nacheinander die Cycline D, E und A synthetisiert, welche sich mit von ihnen abhängigen Kinasen verbinden. Diese als CDKs (=cyclin dependent kinases) bezeichneten Enzyme werden durch diese Protein-Protein-Interaktion aktiviert, phosphorylieren eine Reihe von Zielproteinen wie das Retinoblastoma-Tumor-Suppressor-Protein (pRb) und treiben damit die G₁-Phase-Progression voran (SHERR, 1993). Auf der anderen Seite sind CDK-Inhibitoren wie p21^{Cip1}, p27^{Kip1} und p16^{Ink4a} beschrieben worden, die durch Hemmung der Cyclin/CDK-Komplexe die Zellzyklusprogression inhibieren (SHERR, 2000). Neben diesen Proteinen scheint das Tumor-Suppressor-Protein p53 eine überragende Rolle bei der Zellzykluskontrolle einzunehmen (NORTH und HAINAUT, 2000). Kommt es zu einer Schädigung der Zelle, so wird p53 induziert und der Zellzyklus unterbrochen. Ist eine Reparatur des Schadens nicht möglich, so wird durch p53 der programmierte Zelltod, die Apoptose, induziert, welche zum Absterben der geschädigten Zelle zugunsten der nichtgeschädigten Zellpopulation führt. Die durch p53 und andere Faktoren induzierte Apoptose kann durch bcl-2 wirkungsvoll gehemmt werden. Eine bcl-2-Überexpression verhindert also, dass geschädigte Zellen durch Apoptose eliminiert werden (ANTONSSON und MARTINOU, 2000).

Aus heutiger Sicht sind Störungen der ansonsten fein kontrollierten Balance zwischen wachstumsstimulierenden und -hemmenden Faktoren, beispielsweise durch Mutationen, ursächlich an der Tumorentstehung beteiligt. Es erscheint dabei wichtig, die bei verschiedenen Tumoren dysregulierten Proteine nachzuweisen. Diese können dann in einigen Fällen als unabhängige Prognosekriterien verwandt werden. Des Weiteren wird erwartet, dass ein besseres Verständnis der bei Tumorzellen veränderten Zellzykluskontrolle die Entwicklung gezielt in die Zellzyklusmaschinerie eingreifender Therapeutika erleichtern wird.

4.2 Ki-67 beim malignen Melanom

Das Ki-67 Protein wurde ursprünglich definiert durch einen monoklonalen Antikörper, welcher durch Immunisierung von Mäusen mit Kernen der Hodgkin-Lymphomzelllinie L428 erzeugt wurde. Der Name war dabei aus dem Ort der Erzeugung (Kiel) und der Nummer des Originalklones auf einer 96-well Platte zusammengesetzt worden. In den letzten Jahren sind eine Reihe von Daten zur Struktur und Regulation des Ki-67 Proteins publiziert worden, seine Funktion ist jedoch bis heute weitgehend ungeklärt (SCHOLZEN und GERDES, 2000). Das Protein kommt überwiegend in zwei hochmolekularen Splicevarianten von 320 kDa und 359 kDa vor. Eine Phosphorylierung von Ki-67 in der M-Phase ist nachgewiesen worden (MACCALLUM und HALL, 1999). Auch konnte gezeigt werden, dass nach Behandlung von Zellen mit antisense-Nukleotiden oder Antikörpern gegen Ki-67 ein Proliferationsstopp auftrat (ENDEL und GERDES, 2000).

Besondere Bedeutung hat dieses Protein erlangt, weil seine Expression alleinig in proliferierenden Zellen in der G₁-, S-, G₂- und M-Phase nicht jedoch in G₀ arretierten Zellen auftritt (GERDES et al., 1984). Aufgrund dieser Eigenschaft wird Ki-67 heute als wichtiger Proliferationsmarker genutzt. Zum Nachweis des Proteins werden verschiedene Antikörper verwendet, wobei am häufigsten der monoklonale Antikörper MIB-1 (*Molecular Immunology Borstel-1*) eingesetzt wird (SCHOLZEN und GERDES, 2000). Dieser 1992 erstmals beschriebene Antikörper hat den Vorteil, dass Ki-67 auch in Paraffinschnitten nachweisbar ist. Aus diesem Grund wurde dieser Antikörper in der vorliegenden Arbeit verwendet. Schon 1984 schlugen GERDES et al. vor, dass der Anteil Ki-67-positiver Zellen an der Gesamtzellzahl, der Ki-67-Index, als Prognosekriterium verschiedener Tumoren nutzbar sein könnte. Tatsächlich konnte in einer Reihe von Tumoren der Ki-67-Index als unabhängiger prognostischer Faktor etabliert werden. Hierzu gehören verschiedene Weichteilsarkome (UEDA et al., 1989), das Mammakarzinom (JANSEN et al., 1998) und Prostatakarzinom (AALTOMAA et al., 1997).

In der vorliegenden Arbeit konnte in allen 26 untersuchten Melanomen Ki-67 nachgewiesen werden, wobei der Mittelwert mit Werten zwischen 4,65 % und 63,99 % bei 28,43 % lag. Bei einer von STRAUME et al. (2000) untersuchten Melanompopulation ergaben sich ähnliche Werte mit dem Median bei 27 %, und Werten zwischen 1 % und 79 %. In anderen Studien wurden mittlere Ki-67-Indices

zwischen 17,3 % und 24,6 % angegeben (KANTER et al., 1995; TALVE et al., 1996b; TALVE et al., 1997). In der vorliegenden Arbeit konnte ein Trend ($p=0,08$) zu einem höheren Ki-67-Index in aneuploiden verglichen zu diploiden Melanomen nachgewiesen werden. Humane nicht teilende Zellen besitzen unter normalen Umständen 23 Chromosomenpaare. Sie werden dann als diploid oder euploid bezeichnet. Kommt es zu einer Änderung der Chromosomenzahl, spricht man von aneuploiden Zellen. Meistens handelt es sich hierbei um eine Erhöhung der Chromosomenzahl und damit des DNA-Gehaltes von Zellen. Es ist gezeigt worden, dass aneuploide Tumoren ein klinisch aggressiveres Wachstumsverhalten aufweisen (HERZBERG, 1992). Die Daten der vorliegenden Arbeit passen damit gut zu diesen Beobachtungen, da die Wachstumsfraktion der untersuchten aneuploiden Melanome im Vergleich zu diploiden Tumoren erhöht war. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit beschrieben KARLSSON et al. (1996) in uvealen Melanomen eine Erhöhung des Ki-67-Index in aneuploiden verglichen zu diploiden Tumoren, wobei dieser Zusammenhang mit einem $p=0,08$ ebenfalls keine statistische Signifikanz erreichte. Desweiteren konnte in der vorliegenden Arbeit eine Erhöhung des Ki-67-Index in Melanomen mit einem Anteil DNA-synthetisierender Zellen ≥ 10 % verglichen zu Tumoren mit einem S-Phase-Index ≤ 5 % nachgewiesen werden. Dieser Zusammenhang verfehlte jedoch mit einem $p=0,12$ die statistische Signifikanz. In Untersuchungen von KARLSSON et al., (1996) in uvealen Melanomen erhöhte sich in Übereinstimmung mit der vorliegenden Arbeit ebenfalls der Ki-67-Index in Abhängigkeit vom Anteil an Zellen in der S-Phase. In der hier vorliegenden Untersuchung konnte keine Abhängigkeit des Anteils Ki-67-positiver Zellen von der Tumordicke bzw. -eindringtiefe nach Breslow und Clark nachgewiesen werden. Auch in anderen Untersuchungen konnte kein Zusammenhang zwischen Tumorzellproliferation und Tumordicke festgestellt werden (RAMSAY et al., 1995; TALVE et al., 1996b; VOGT et al., 1997). In verschiedenen Arbeiten dagegen, konnte eine Beziehung zwischen Ki-67-Index und Tumordicke gezeigt werden (SMOLLE et al., 1989; KAUDEWITZ et al., 1989; GELSLEICHTER et al., 1995; KARLSSON et al., 1996; TRAN et al., 1998; STRAUME et al., 2000). Als mögliche Ursachen für diese Diskrepanz zwischen den verschiedenen Untersuchungen sind Unterschiede der verwendeten Antikörper, der Art der immunhistochemischen Aufarbeitung der Präparate sowie der Patientenpopulationen

zu nennen. So wurden die ersten Untersuchungen zur Bedeutung von Ki-67 bei malignen Melanomen an Gefrierschnitten unter Verwendung des Antikörpers Ki-67 durchgeführt (SMOLLE et al., 1989; KAUDEWITZ et al., 1989). Des Weiteren wurden in den verschiedenen Studien unterschiedlich große Populationen untersucht, wobei die Anzahl zwischen 17 (SMOLLE et al., 1989) und 187 (STRAUME et al., 2000) Patienten lag. Der Zusammenhang zwischen Ki-67-Index und Parametern wie Alter, Geschlecht und histologischem Typ, für welche in der vorliegenden Arbeit keine statistische Signifikanz bestand, ist nur in wenigen Arbeiten untersucht worden. KARLSSON et al. (1996) konnten in Übereinstimmung mit den hier beschriebenen Ergebnissen, keinen Zusammenhang zwischen Proliferationsindex und Alter bzw. Geschlecht der Patienten bei uvealen Melanomen herstellen. TRAN et al. (1998) beschrieben einen statistisch signifikant erhöhten Ki-67-Index in nodulären verglichen zu superfiziell spreitenden Melanomen. Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit erfolgte der Nachweis von Ki-67 jedoch nicht mit dem MIB-1- sondern dem MMI-Antikörper. Auch wurde zum Nachweis des Proteins ein sekundärer Peroxidase-gekoppelter Antikörper verwandt.

4.3 P53 beim malignen Melanom

P53 wurde 1979 ursprünglich als ein Protein beschrieben, welches das SV40 T-Antigen binden konnte. Erst später wurde es als Tumor-Suppressor-Protein beschrieben, welches bei ca. 50 % der menschlichen Tumoren funktionell inaktiviert ist (GRIMBERG, 2000). Als Ursache einer Inaktivierung von p53 sind erworbene Punktmutationen häufig. Des Weiteren kodieren verschiedenen Viren, wie Hepatitis B-, Epstein Bar- und Zytomegalievirus für Proteine, welche die p53-Funktion hemmen (SHERR und WEBER, 2000). Beim seltenen Li Fraumeni Syndrom liegt eine vererbte Mutation im p53 Protein vor, welches zur Entstehung verschiedenster Tumoren bei jungen Patienten führt (SRIVASTAVA et al., 1990). Des Weiteren sind Mäuse erzeugt worden, bei denen das p53-Gen inaktiviert wurde. Diese sogenannten p53 knockout Mäuse zeigen eine erhöhte Rate spontan auftretender Tumoren (DONEYHOWER et al., 1992).

P53 wird durch verschiedene Signale wie DNA-Schädigung, Hypoxie, Zytokine und metabolische Veränderungen induziert. Ein wichtiges von p53 induziertes Zielprotein ist der CDK-Inhibitor p21^{Cip1}, welcher verschiedene Cycline hemmt und dadurch den Zellzyklus stoppt. Ein weiteres durch p53 induziertes Signalmolekül ist mdm-2, das im Sinne einer negativen Rückkopplung zu einer verminderten Neusynthese sowie zu einem verstärkten Abbau von p53 führt (SHERR, 2000).

Im letzten Jahrzehnt sind eine Reihe von immunhistochemischen Untersuchungen zur Expression von p53 in verschiedenen Tumoren durchgeführt worden. Hintergrund all dieser Experimente ist die Beobachtung, dass p53 mit einer Halbwertszeit von ca. 15 Minuten unter physiologischen Bedingungen ein kurzlebiges, immunhistochemisch schwer nachweisbares Protein ist (STRETCH et al., 1991). Mutiertes p53 Protein dagegen weist eine Halbwertszeit von mehreren Stunden auf und wird damit durch immunhistochemische Färbungen detektierbar (FINLAY et al., 1988; IGGO et al., 1990). Tatsächlich konnte in einer Reihe von humanen Tumoren eine statistisch signifikant erhöhte Nachweisbarkeit von p53 gezeigt, sowie eine Korrelation zwischen p53-Färbbarkeit und Prognose hergestellt werden. Hierzu gehören Karzinome der Mamma (THOR et al., 1992), des Kolon (REMYKOS et al., 1992) und der Lunge (EBINA et al., 1994). Desweiteren wurde über eine Chemotherapieresistenz von Hodgkin-Lymphomen bei p53-Überexpression berichtet (SMOLEWSKI et al., 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurde p53 in allen untersuchten Schnitten immunhistochemisch unter Verwendung eines spezifischen anti-p53 Antikörpers (DO7) nachgewiesen. In verschiedenen Arbeiten war der Anteil von p53-positiven Melanomen mit 92 % (BARTEK et al., 1991), 85 % (STRETCH et al., 1991) und 97 % (AKSLEN et al., 1992) im Vergleich zu den hier vorliegenden Ergebnissen ähnlich hoch. Im Gegensatz hierzu war bei anderen Untersuchungen nur ein geringer Anteil von Melanomen p53-positiv (LASSAM et al., 1993; BARNHILL et al., 1994; SAENZ-SANTAMARIA et al., 1995a). So war in einer Arbeit von SAENZ-SANTAMARIA et al. (1995a) nur eines von 17 Melanomen färberisch positiv für das Tumor-Suppressor-Protein. Allerdings wurden in dieser Studie drei verschiedene Antikörper verwandt, und ein Melanom wurde nur dann als positiv eingestuft, wenn der Anteil von p53-positiven Zellen bei allen drei Antikörpern jeweils größer als 5 % war. Diese Arbeit zeigt sehr eindrücklich die großen Unterschiede bei Verwendung verschiedener, gegen dasselbe Protein gerichteter Antikörper. So waren nur 4 von 17 Melanomen p53-negativ mit dem auch in der vorliegenden Studie verwandten p53-Antikörper DO7. Wurden dagegen dieselben Melanome mit dem polyklonalen Antikörper Pab1801 angefärbt, welcher wie DO7 sowohl nichtmutiertes als auch mutiertes p53 Protein detektiert, so waren 12 von 17 Melanomen p53-negativ. Bei Nachweis des Tumor-Suppressor-Proteins mit dem polyklonalen Antikörper Pab240, welcher nur mutiertes p53 detektiert, waren 15 von 17 Melanomen p53-negativ.

In der vorliegenden Arbeit bestand ein inverses Verhältnis zwischen der Tumordicke und der Anfärbbarkeit für p53. So war der p53-Index in der untersuchten Patientenpopulation signifikant niedriger in Melanomen mit einem Breslow größer 1,5 mm, und es bestand ein Trend ($p=0,07$) zu einem höheren p53-Index bei Clark Levels zwischen I und III verglichen zu IV und V. Es ist jedoch festzuhalten, dass große Unterschiede des p53-Index innerhalb derselben Gruppe auftraten. So wies die Patientin mit dem maximalen p53-Index von 88,25 % einen Breslow größer 1,5 mm und einen Clark von IV auf. Des Weiteren stieg bei anderen Untersuchungen, im Gegensatz zur hier vorliegenden Arbeit, die p53-Expression signifikant in Abhängigkeit von der Tumordicke an (KORABIOWSKA et al., 1995; YAMAMOTO et al., 1995). Die Mehrzahl der publizierten Untersuchungen konnte allerdings keine signifikante Abhängigkeit der p53-Expression von der Melanomdicke demonstrieren (GELSLEICHTER et al., 1995; WEISS et al., 1995;

TALVE et al., 1996a; STRAUME und AKSLEN, 1997; VOGT et al., 1997; HIEKEN et al., 1999; KARJALAINEN et al., 1999; STRAUME et al., 2000). Als mögliche Ursache der Diskrepanz zwischen den verschiedenen Arbeiten sind Unterschiede der Patientenpopulationen, der verwendeten Antikörper und der Färbemethoden zu nennen. So lag die Zahl der untersuchten Melanompatienten zwischen 24 (VOGT et al., 1997) und 284 (KARJALAINEN et al., 1999). Als primäre Antikörper kamen DO7 (KORABIOWSKA et al., 1995; TALVE et al., 1996a; STRAUME und AKSLEN, 1997; HIEKEN et al., 1999; KARJALAINEN et al., 1999; STRAUME et al., 2000), Pab1801 (GELSLEICHTER et al., 1995), DO1 (WEISS et al., 1995) und CM1 (WEISS et al., 1995; YAMAMOTO et al., 1995; VOGT et al., 1997) zur Anwendung. Des Weiteren wurde der p53-Nachweis entweder über einen Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörper unter Verwendung von DAB (GELSLEICHTER et al., 1995; YAMAMOTO et al., 1995; TALVE et al., 1996a; KARJALAINEN et al., 1999) bzw. AEC (STRAUME et al., 2000) oder über eine APAAP-Reaktion (KORABIOWSKA et al., 1995; WEISS et al., 1995; VOGT et al., 1997) geführt.

Auch war der p53-Index in der vorliegenden Arbeit signifikant höher in superfiziell spreitenden verglichen zu nodulären Melanomen. Im Gegensatz hierzu konnte in anderen Untersuchungen keine Abhängigkeit der p53-Expression vom histologischen Melanomtyp nachgewiesen werden (YAMAMOTO et al., 1995; HIEKEN et al., 1999). Auch hier sind Unterschiede der Patientenpopulationen, der verwendeten Antikörper und der Färbemethoden als mögliche Ursache der Diskrepanz zwischen den verschiedenen Untersuchungen zu nennen.

In der vorliegenden Arbeit bestand keine Abhängigkeit des p53-Index von Geschlecht und Alter der Patienten sowie vom Anteil der Melanomzellen in der S-Phase des Zellzyklus und der Ploidie des Tumors. Eine Reihe früherer Untersuchungen konnte ebenfalls keine Abhängigkeit der p53-Expression von Geschlecht (ROSS et al., 1997), Alter (STRAUME und AKSLEN, 1997) und Ploidie des Tumors (AKSLEN et al., 1992; ROSS et al., 1997) nachweisen. Jedoch ist auch eine signifikante Abhängigkeit der p53-Expression vom Geschlecht (STRAUME und AKSLEN, 1997) und vom Alter (ROSS et al., 1997) der Patienten beschrieben worden.

4.4 Bcl-2 beim malignen Melanom

Bcl-2 wurde ursprünglich als ein bei B-Zell-Lymphomen von Chromosom 18 auf 14 transloziertes Proto-Onkogen beschrieben, welches eine Hemmung des programmierten Zelltodes, der Apoptose, verursacht (TSUJIMOTO und SHIMIZU, 2000). Später wurden eine Reihe von zu bcl-2 homologen Proteinen, wie bcl-X_L, bcl-w, bax und bad beschrieben, welche zusammen die bcl-2 Proteinfamilie bilden. Ein interessantes Merkmal dieser Familie ist, dass einige Mitglieder wie bcl-2, bcl-X_L und bcl-w die Apoptose inhibieren, während andere Mitglieder wie bax und bad die Apoptose stimulieren (ANTONSSON und MARTINOU, 2000). So konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von bcl-2 die p53-induzierte Apoptose, nicht jedoch den G₁-Arrest, wirkungsvoll unterdrückt (MARCHENKO et al., 2000). Die verschiedenen Proteine können untereinander Homo- oder Heterodimere bilden, was ihre Aktivität als pro- oder antiapoptotische Faktoren moduliert (TSUJIMOTO und SHIMIZU, 2000). Bcl-2 wird darüber hinaus durch Phosphorylierung an verschiedenen Serin- und Threoninresten, sowie durch Proteinspaltung funktionell inaktiviert. Auch das apoptosefördernde Protein bad wird durch Phosphorylierung von zwei Serinresten inaktiviert. (ANTONSSON und MARTINOU, 2000). Die Mechanismen der Apoptoseregulation durch die bcl-2 Proteinfamilie sind noch nicht vollständig klar. Es ist gezeigt worden, dass das proapoptotische bax mitochondriale Porenkomplexe bilden kann, durch welche Cytochrom C freigesetzt wird. Diese Freisetzung führt über eine Aktivierung von Caspasen zur Apoptoseinduktion. Bcl-2 kann die Porenöffnung wirkungsvoll inhibieren (ANTONSSON und MARTINOU, 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Expression von bcl-2 in allen untersuchten Melanomen nachgewiesen. Eine ähnlich starke bcl-2-Anfärbbarkeit beim kutanen malignen Melanom wurde auch in anderen Untersuchungen beschrieben (SAENZ-SANTAMARIA et al., 1994; COLLINS und WHITE, 1995; TANG et al., 1998). In der hier vorliegenden Arbeit bestand des Weiteren kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen bcl-2-Expression und Tumordicke, Histologie, Ploidie, Anteil von Zellen in der S-Phase sowie Alter und Geschlecht der Patienten. In der publizierten Literatur ist die bcl-2-Expression beim malignen Melanom nur selten in Abhängigkeit von klinischen und histologischen Parametern untersucht worden. In Übereinstimmung mit unserer Arbeit konnten auch SAENZ-SANTAMARIA et al.

(1994) keinen Zusammenhang zwischen bcl-2-Synthese und Breslow herstellen. Bei uvealen Melanomen konnte des Weiteren kein Zusammenhang zwischen Expression des Proto-Onkogens und der Prognose hergestellt werden (MOOY et al., 1995). Auch bei anderen Tumoren ist die bcl-2-Expression hinsichtlich ihrer prognostischen Relevanz mit verschiedenen Ergebnissen untersucht worden. So wurde bei Prostatakarzinomen eine Korrelation zwischen Überexpression dieses Proteins und schlechter Prognose beschrieben (MATSUSHIMA et al., 1996). Auch ist eine Chemotherapieresistenz von Hodgkin-Lymphomen (SMOLEWSKI et al., 2000) und Ovarialkarzinomen (MANO et al., 1999) bei erhöhter Anfärbbarkeit der Tumoren für bcl-2 beschrieben worden. Dagegen war die Überexpression von bcl-2 bei Kolon- (ÖFNER et al., 1995) und Bronchialkarzinomen (FONTANINI et al., 1995) ein prognostisch günstiger Faktor.

4.5 Andere beim malignen Melanom dysregulierten Proteine

Neben den in dieser Arbeit untersuchten Proteinen Ki-67, p53 und bcl-2 sind in den letzten Jahren eine Reihe von Signalmolekülen beim malignen Melanom beforscht worden, denen eine wichtige Funktion bei der Zellzykluskontrolle zuerkannt wird. Ziel dieser Arbeiten war es, neue, möglicherweise prognostisch relevante Faktoren zu untersuchen.

Eine Reihe von Arbeiten hat die Expression von Cyclinen, CDK- und CDK-Inhibitor-Proteinen bestimmt. So wurde eine Überexpression der Cycline D1, D3 und E in malignen Melanomen beschrieben (BALES et al., 1999; FLORENES et al., 2000). Die Überexpression von Cyclin D3 korrelierte hierbei signifikant mit einer schlechten Prognose bei superfiziell-spreitenden Melanomen (FLORENES et al., 2000). Im Gegensatz zu diesen Arbeiten konnten INOHARA et al. (1996) nur in einem von 10 untersuchten malignen Melanomen eine Überexpression von Cyclin D1 feststellen.

In mehreren Arbeiten wurde eine signifikante Korrelation zwischen Verlust der Expression des CDK-Inhibitor-Proteins p16^{Ink4a} und einer schlechten Prognose des malignen Melanoms hergestellt (REED et al., 1995; STRAUME und AKSLEN, 1997; TALVE et al., 1997; STRAUME et al., 2000). Des Weiteren wurde gezeigt, dass familiär gehäuft auftretende maligne Melanome häufig eine inaktivierende Mutation des p16^{Ink4a}-Gens aufweisen (HUSSUSSIAN et al., 1994). Bei sporadisch auftretenden Melanomen sind die publizierten Daten widersprüchlich: Während eine Arbeit Mutationen des p16^{Ink4a}-Gens als seltenes Ereignis beschrieb (HEALY et al., 1996), wurde die Häufigkeit von Mutationen durch GRUIS et al. (1995) mit 15 % und durch KUMAR et al. (1998) mit 26 % angegeben.

In einer Studie von KARJALAINEN et al. (1999) wurde demonstriert, dass die Synthese des CDK-Inhibitor-Proteins p21^{Cip1} mit der Tumordicke invers korrelierte, d.h. dickere Melanome wiesen einen signifikant niedrigeren p21^{Cip1}-Gehalt auf. Im Gegensatz hierzu wurde in zwei anderen Arbeiten beschrieben, dass p21^{Cip1} v.a. in fortgeschrittenen Melanomen überexprimiert wird (MAELANDSMO et al., 1996; BALES et al., 1999). Als mögliche Ursache für diesen überraschenden Befund diskutierten BALES et al. (1999), dass p21^{Cip1} möglicherweise neben einer anti-proliferativen auch eine anti-apoptische Funktion besitzt, eine Überexpression somit die gesteuerte Elimination von Tumorzellen durch Apoptose verhindern

könnte. In derselben Arbeit wurde auch eine erhöhte Expression des CDK-Inhibitors p27^{KIP1} bei fortgeschrittenen Melanomen beschrieben (BALES et al., 1999).

In einer Arbeit von SAENZ-SANTAMARIA et al. (1995b) wurde des Weiteren die Überexpression des Retinoblastoma-Antigens (pRb) bei malignen Melanomen beschrieben. Dieses Tumor-Suppressor-Protein ist ein wichtiges Signalmolekül unterhalb der Cyclin/CDK-Komplexe, welche es durch Phosphorylierung funktionell inaktivieren (SHERR, 2000).

4.6 Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Proteine Ki-67, p53 und bcl-2 in verschiedenen malignen Melanomen immunhistochemisch nachgewiesen und der Anteil positiver Zellen an der Gesamtumorzellzahl als Index angegeben. Durch diese Untersuchung sollte bestimmt werden, ob der immunhistochemische Nachweis der verschiedenen Proteine mit etablierten klinischen und histologischen Kriterien beim malignen Melanom im Zusammenhang steht und somit potentiell bei der Abschätzung von klinischem Verlauf und Prognose des malignen Melanoms einsetzbar sein könnte.

Es konnte statistisch signifikant eine Abhängigkeit des mittleren p53-Index von der Tumordicke und dem histologischen Typ beobachtet werden. Des Weiteren bestand ein Trend ($p=0,08$) zu einem niedrigeren Ki-67-Index in diploiden verglichen zu aneuploiden Tumoren. Alle anderen untersuchten histologischen und klinischen Parameter zeigten keine statistisch signifikante Abhängigkeit von den verschiedenen Indices. Einschränkend ist anzumerken, dass selbst in den statistisch signifikant unterschiedlichen Gruppen eine starke Überlappung der individuellen Indices bestand. In der publizierten Literatur fanden sich sowohl die vorliegende Arbeit bestätigende als auch abweichende Ergebnisse. Auch bestehen starke Unterschiede zwischen den publizierten Arbeiten hinsichtlich der Resultate und Schlußfolgerungen.

Es ist daher im Ergebnis dieser Arbeit in Zusammenschau mit der publizierten Literatur davon auszugehen, dass die immunhistochemische Anfärbung von Ki-67, p53 und bcl-2 nur von bedingtem Nutzen sein wird, um den klinischen Verlauf und die Prognose des malignen Melanoms im individuellen Fall abzuschätzen. Solange nicht spezifischere Marker gefunden werden, sind etablierte Kriterien wie Breslow und Clark weiterhin der Goldstandard, um den Verlauf der Melanomerkrankung klinisch einzuschätzen und die Therapie zu planen. Allerdings erscheint es wichtig, weiter nach Markern zu suchen, die eine verlässlichere Prognoseeinschätzung und Therapieempfehlung ermöglichen. Das Wissen zur Wachstumsregulation hat in den letzten Jahren rapide zugenommen, und es ist wahrscheinlich, dass dieses Wissen in

den nächsten Jahren helfen wird, neue und bessere histologische Tumormarker zu etablieren.

5 Zusammenfassung

Das maligne Melanom ist der bösartigste Tumor der Haut. Es ist weltweit der am schnellsten zunehmende maligne Tumor. Seine Inzidenz hat in den letzten 20 Jahren in Europa bei hellhäutigen Personen mit einer Steigerungsrate von 3-7 % zugenommen. Zur Prognoseabschätzung werden beim malignen Melanom verschiedene pathologische und klinische Kriterien verwandt. Von besonderer Wichtigkeit ist hierbei die Bestimmung der Tumordicke nach Breslow und der Eindringtiefe nach Clark. Nur die frühen Stadien der Tumorerkrankung können durch chirurgische Maßnahmen kurativ behandelt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen klinischen und pathologischen Kriterien der Melanomerkrankung einerseits und der Expression von Ki-67, p53 und bcl-2 andererseits untersucht. Eine Abhängigkeit der Prognose verschiedener Tumoren von der Expression dieser 3 Proteine ist beschrieben worden. Es wurden 26 maligne Melanome des Patientengutes der Universitätsklinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie Halle immunhistochemisch mit spezifischen primären Antikörpern untersucht. Der Anteil positiver Zellen an der Gesamttumorzellzahl wurde als Index in Prozent angegeben.

Alle 26 Melanome waren färberisch Ki-67-positiv. Es konnte ein Trend ($p=0,08$) zu einem erhöhten Ki-67-Index in aneuploiden verglichen zu diploiden Tumoren festgestellt werden. Daneben ließen sich keine signifikanten Unterschiede im Ki-67-Index in Abhängigkeit von der Dicke und Eindringtiefe des Tumors nach Breslow und Clark, dem histologischen Typ, dem Anteil der Zellen in der S-Phase sowie vom Alter und Geschlecht der Personen feststellen. Alle untersuchten Melanome zeigten eine positive Anfärbbarkeit für p53. Der p53-Index war signifikant höher in Melanomen dünner 1,5 mm. Auch war der Anteil p53-positiver Zellen signifikant größer in superfiziell spreitenden verglichen zu nodulären Melanomen. Alle anderen untersuchten Kriterien zeigten keine signifikanten Unterschiede. Auch bcl-2 war in allen Tumoren immunhistochemisch nachweisbar. Allerdings ließ sich kein Zusammenhang zwischen der Expression dieses Proteins und den untersuchten histologischen und klinischen Parametern nachweisen.

Die Proteine Ki-67, p53 und bcl-2 konnten somit in allen untersuchten Melanomen immunhistochemisch nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse in Zusammenschau mit der publizierten Literatur, welche sowohl die vorliegende Arbeit bestätigende als auch abweichende Resultate beinhaltet, weisen darauf hin, dass der immunhistochemische Nachweis der drei Proteine wahrscheinlich nur von eingeschränkter Bedeutung sein wird, um die Prognose und adäquate Therapie des malignen Melanoms festzulegen. Jedoch ist davon auszugehen, dass das weitere Wissen um die Kontrolle von Proliferation und Apoptose zur Beschreibung neuer Marker führen wird, deren Bestimmung zusätzlich zu den etablierten klinischen und pathologischen Kriterien beim malignen Melanom zukünftig von Bedeutung sein wird.

6 Literaturverzeichnis

1. **Aaltomaa S, Lipponen P, Vesalainen S, Ala-Opas M, Eskelinen M, Syrjanen K:** Value of Ki-67 immunolabelling as a prognostic factor in prostate cancer. *Eur Urol* 32 (1997) 410-415
2. **Ahmed I:** Malignant Melanoma: Prognostic Indicators. *Mayo Clin Proc* 72 (1997) 356-361
3. **Akslen LA, Morkve O:** Expression of p53 Protein in Cutaneous Melanoma. *Int J Cancer* 52 (1992) 13-16
4. **Altmeyer P:** Therapielexikon Dermatologie und Allergologie. Springer Verlag (1998)
5. **Antonsson B, Martinou JC:** The Bcl-2 protein family. *Exp Cell Res* 256 (2000) 50-57
6. **Baccard M, Havard S, Souques M:** Prospective study of the incidence of melanoma in the Paris region in 1994. The PETRI Melanoma Group. *Melanoma Res* 7 (1997) 335-338
7. **Balch CM, Soong SJ, Shaw HM, Urist MM, McCarthy WH:** An analysis of prognostic factors in 8500 patients with cutaneous melanoma. In: Balch CM, Houghton AN, Milton GW, Sober AJ, Soong SJ, editors. *Cutaneous Melanoma* 2nd ed. Philadelphia: Lippincott, (1992) 165-187
8. **Bales ES, Dietrich C, Bandyopadhyay D, Schwahn DJ, Xu W, Didenko V, Leiss P, Conrad N, Pereira-Smith O, Orengo I, Medrano EE:** High levels of expression of p27KIP1 and cyclin E in invasive primary malignant melanomas. *J Invest Dermatol* 113 (1999) 1039-1046
9. **Barnhill RL, Castresana JS, Rubio M-P, Martin MT, Idoate M, Vazquez JJ, Thor AD:** p53 Expression in Cutaneous Malignant Melanoma: An Immunohistochemical Study of 87 Cases of Primary, Recurrent, and Metastatic Melanoma. *Mod Pathol* 7 (1994) 533-535

10. **Bartek J, Bartkova J, Vojtesek B, Staskova Z, Lukas J, Rejthar A, Kovarik J, Midgley CA, Gannon JV, Lane DP:** Aberrant expression of the p53 oncoprotein is a common feature of a wide spectrum of human malignancies. *Oncogene* 6 (1991) 1699-1703
11. **Breslow A:** Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg* 172 (1970) 902-908
12. **Clark WH Jr, Elder DE, Guerry DP IV, Braitman LE, Trock BJ, Schultz D:** Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. *J Natl Cancer Inst* 81 (1989) 1893-1904
13. **Collins KA, White WL:** Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1) and bcl-2 Are Differentially Expressed in Early Evolving Malignant Melanoma. *Am J Dermatopathol* 17 (1995) 429-438
14. **Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA, Butel JS, Bradley A:** Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 356 (1992) 215-221
15. **Ebina M, Steinberg SM, Mulshine JL, Linnoila:** Relationship of p53 overexpression and up-regulation of proliferating cell nuclear antigen with the clinical course of non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 54 (1994) 2496-2503
16. **Endl E, Gerdes J:** The Ki-67 protein: fascinating forms and an unknown function. *Exp Cell Res* 257 (2000) 231-237
17. **Finlay CA, Hinds PW, Tan TH, Eliyahu D, Oren M, Levine AJ:** Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc70-p53 complex with an altered half-life. *Mol Cell Biol* 8 (1988) 531-539
18. **Florenes VA, Faye RS, Maelandsmo GM, Nesland JM, Holm R:** Levels of cyclin D1 and D3 in malignant melanoma: deregulated cyclin D3 expression is associated with poor clinical outcome in superficial melanoma. *Clin Cancer Res* 6 (2000) 3614-3620

19. **Fontanini G, Vignati S, Bigini D, Mussi A, Lucchi M, Angeletti CA, Basolo F, Bevilacqua G:** Bcl-2 protein: a prognostic factor inversely correlated to p53 in non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer* 71 (1995) 1003-1007
20. **Fritsch P:** *Dermatologie*. Springer Verlag (1998)
21. **Gelsleichter L, Gown AM, Zarbo RJ, Wang E, Coltrera MD:** p53 and mdm-2 Expression in Malignant Melanoma: An Immunocytochemical Study of Expression of p53, mdm-2, and Markers of Cell Proliferation in Primary Versus Metastatic Tumors. *Mod Pathol* 8 (1995) 530-535
22. **Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H:** Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 133 (1984) 1710-1715
23. **Grimberg A:** P53 and IGFBP-3: apoptosis and cancer protection. *Mol Genet Metab* 70 (2000) 85-98
24. **Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Frye C, Eeles R, Orlow I, Lacombe L, Ponce-Castaneda V, Lianes P, Latres E:** Genetic evidence in melanoma and bladder cancers that p16 and p53 function in separate pathways of tumor suppression. *Am J Pathol* 146 (1995) 1199-1206
25. **Healy E, Sikkink S, Rees JL:** Infrequent mutation of p16INK4 in sporadic melanoma. *J Invest Dermatol* 107 (1996) 318-321.
26. **Herzberg AJ, Kerns BJ, Borowitz MJ, Seigler HF, Kinney RB:** DNA ploidy of malignant melanoma determined by image cytometry of fresh frozen and paraffin-embedded tissue. *J Cutan Pathol* 18 (1991) 440-448
27. **Herzberg AJ:** Significance of DNA ploidy in cutaneous lesions. *Arch Dermatol* 128 (1992) 663-672
28. **Hieken TJ, Ronan SG, Farolan M, Shilkaitis AL, Das Gupta TK:** Molecular Prognostic Markers in Intermediate-Thickness Cutaneous Malignant Melanoma. *Cancer* 85 (1999) 375-382

29. **Hussussian CJ, Struewing JP, Goldstein AM, Higgins PA, Ally DS, Sheahan MD, Clark WH, Tucker MA, Dracopoli NC:** Germline p16 mutations in familial melanoma. *Nat Genet* 8 (1994) 15-21
30. **Iggo R, Gatter K, Bartek J, Lane D, Harris AL:** Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. *Lancet* 335 (1990) 675-679
31. **Inohara S, Kitagawa K, Kitano Y:** Expression of Cyclin D1 and p53 Protein in Various Malignant Skin Tumors 192 (1996) 94-98
32. **Jansen RL, Hupperets PS, Arends JW, Joosten-Achjanie SR, Volovics A, Schouten HC, Hillen HF:** MIB-1 labelling index is an independent prognostic marker in primary breast cancer. *Br J Cancer* 78 (1998) 460-465
33. **Jay V, Yi Q, Hunter WS, Zielenska M:** Expression of bcl-2 in uveal malignant melanoma. *Arch Pathol Lab Med* 120 (1996) 497-498
34. **Kanter L, Blegen H, Wejde J, Lagerlof B, Larsson O:** Utility of a proliferation marker in distinguishing between benign naevocellular naevi and naevocellular naevus-like lesions with malignant properties. *Melanoma Res* 5 (1995) 345-350
35. **Karjalainen JM, Eskelinen MJ, Kellokoski JK, Reinikainen M, Alhava EM, Kosma V-M:** p21^{WAF1/CIP1} expression in stage I cutaneous malignant melanoma: its relationship with p53, cell proliferation and survival. *Br J Cancer* 79 (1999) 895-902
36. **Karjalainen JM, Eskelinen MJ, Nordling S, Lipponen PK, Alhava EM, Kosma VM:** Mitotic rate and S-phase fraction as prognostic factors in stage I cutaneous malignant melanoma. *Br J Cancer* 77 (1998) 1917-1925
37. **Karlsson M, Boeryd B, Carstensen J, Franlund B, Gustafsson B, Kagedal B, Sun X-F, Wingren S:** Correlations of Ki-67 and PCNA to DNA ploidy, S-phase Fraction and Survival in Uveal Melanoma. *Eur J Cancer* 32A (1996) 357-362
38. **Kaudewitz P, Braun-Falco O, Ernst M, Landthaler M, Stolz W, Gerdes J:** Tumor Cell Growth Fractions in Human Malignant Melanomas and the

- Correlation to Histopathologic Tumor Grading. *Am J Pathol* 134 (1989) 1063-1068
39. **Kheir SM, Bines SD, Vonroenn JH, Soong SJ, Urist MM, Coon JS:** Prognostic significance of DNA aneuploidy in stage I cutaneous melanoma. *Ann Surg* 207 (1988) 455-461
 40. **Klapperstück T, Wohlrab W:** DNA image cytometry on sections as compared with image cytometry on smears and flow cytometry in melanoma. *Cytometry* 25 (1996) 82-89.
 41. **Klapperstück T:** Methodische Aspekte der DNA-Bildanalyse im Schnitt und Vergleich mit Ergebnissen im Ausstrich und der Durchflußzytometrie. Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg: Dissertationsschrift (2001)
 42. **Korabiowska M, Brinck U, Hoenig JF, Bartkowski SB, Kellner S, Marx D, Schauer A:** Significance of P-53 Antigen in Malignant Melanomas and Naevi of the Head and Neck Area. *Anticancer Res* 15 (1995) 885-890
 43. **Kumar R, Lundh Rozell B, Louhelainen J, Hemminki K:** Mutations in the CDKN2A (p16INK4a) gene in microdissected sporadic primary melanomas. *Int J Cancer* 75 (1998) 193-198
 44. **Lassam NJ, From L, Kahn HJ:** Overexpression of p53 Is a Late Event in the Development of Malignant Melanoma. *Cancer Res* 53 (1993) 2235-2238
 45. **MacCallum DE, Hall PA:** Biochemical characterization of pKi67 with the identification of a mitotic-specific form associated with hyperphosphorylation and altered DNA binding. *Exp Cell Res* 252 (1999) 186-198
 46. **Mackie RM, Hole D, Hunter JA, Rankin R, Evans A, McLaren K, Fallowfield M, Hutcheon A, Morris A:** Cutaneous malignant melanoma in Scotland: incidence, survival, and mortality, 1979-94. The Scottish Melanoma Group. *BMJ* 315 (1997) 1117-1121

47. **Maelandsmo GM, Holm R, Fodstad O, Kerbel RS, Florenes VA:** Cyclin kinase inhibitor p21WAF1/CIP1 in malignant melanoma: reduced expression in metastatic lesions. *Am J Pathol* 149 (1996) 1813-1822
48. **Mano Y, Kikuchi Y, Yamamoto K, Kita T, Hirata J, Tode T, Ishii K, Nagata I:** Bcl-2 as a predictor of chemosensitivity and prognosis in primary epithelial ovarian cancer. *Eur J Cancer* 35 (1999) 1214-1219
49. **Marchenko ND, Zaika A, Moll UM:** Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling. *J Biol Chem* 275 (2000) 16202-16212
50. **Matsushima H, Hosaka Y, Suzuki M, Mizutani T, Ishizuka H, Kawabe K:** bcl-2 Expression on prostate cancer and its relationship to cell cycle and prognosis. *Int J Urol* 3 (1996) 113-117
51. **Moll UM, Zaika A:** Nuclear and mitochondrial apoptotic pathways of p53. *FEBS Lett* 493 (2001) 65-69
52. **Mooy CM, Luyten GPM, de Jong PTVM, Luider TM, Stijnen T, van de Ham F, van Vroonhoven CCJ, Bosman FT:** Immunohistochemical and Prognostic Analysis of Apoptosis and Proliferation in Uveal Melanoma. *Am J Pathol* 147 (1995) 1097-1104
53. **North S, Hainaut P:** p53 and cell-cycle control: a finger in every pie. *Pathol Biol* 48 (2000): 255-270
54. **Öfner D, Riehemann K, Maier H, Riedmann B, Nehoda H, Totsch M, Bocker W, Jasani B, Schmid KW:** Immunohistochemically detectable bcl-2 expression in colorectal carcinoma: correlation with tumour stage and patient survival. *Br J Cancer* 72 (1995) 981-985
55. **Pisani P, Parkin DM, Bray F, Ferlay J:** Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. *Int J Cancer* 83 (1999) 18-29

56. **Ramsay JA, From L, Iscoe NA, Kahn HJ:** MIB-1 Proliferative Activity Is a Significant Prognostic Factor in Primary Thick Cutaneous Melanomas. *J Invest Dermatol* 105 (1995) 22-26
57. **Reed JA, Albino AP:** Update of diagnostic and prognostic markers in cutaneous malignant melanoma. *Dermatol Clin* 17 (1999) 631-643
58. **Reed JA, Loganzo FL Jr, Shea CR, Walker GJ, et al:** Loss of expression of the p16/cyclin-dependent kinase inhibitor 2 tumor suppressor gene in melanocytic lesions correlates with invasive stage of tumor progression. *Cancer Res* 55 (1995) 2713-2718
59. **Reeves ME, Coit DG:** Melanoma. A Multidisciplinary Approach for the General Surgeon. *Surg Clin North Am* 80 (2000) 581-601
60. **Remvikos Y, Tominaga O, Hammel P, Laurent-Puig P, Salmon RJ, Dutrillaux B, Thomas G:** Increased p53 protein content of colorectal tumours correlates with poor survival. *Br J Cancer* 66 (1992) 758-764
61. **Rompel R, Petres J:** Operative dermatologische Onkologie. Springer Verlag (1999)
62. **Ross DA, Wilson GD:** Flow cytometric analysis of p53 oncoprotein expression in cutaneous melanoma. *Br J Surg* 84 (1997) 803-807
63. **Saenz-Santamaria MC, McNutt NS, Bogdany JK, Shea CR:** p53 Expression Is Rare in Cutaneous Melanomas. *Am J Dermatopathol* 17 (1995a) 344-349
64. **Saenz-Santamaria MC, McNutt NS, Shea CR:** Immunohistochemical expression of retinoblastoma protein in cutaneous melanomas. *Br J Dermatol* 133 (1995b) 890-895
65. **Saenz-Santamaria MC, Reed JA, McNutt NS, Shea CR:** Immunohistochemical expression of BCL-2 in melanomas and intradermal nevi. *J Cutan Pathol* 21 (1994) 393-397

66. **Scholzen T, Gerdes J:** The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 182 (2000) 311-322
67. **Sherr CJ, Weber JD:** The ARF/p53 pathway. *Curr Opin Genet Dev* 10 (2000) 94-99
68. **Sherr CJ:** Mammalian G₁ cyclins. *Cell* 73 (1993) 1059-1065
69. **Sherr CJ:** The Pezcoller Lecture: Cancer Cell Cycles Revisited. *Cancer Res* 60 (2000) 3689-3695
70. **Slominski A, Ross J, Mihm MC :** Cutaneous melanoma : pathology, relevant prognostic indicators and progression. *Br Medical Bulletin* 51 (1995) 548-569
71. **Smolle J, Soyer H-P, Kerl H:** Proliferative Activity of Cutaneous Melanocytic Tumors Defined by Ki-67 Monoclonal Antibody. *Am J Dermatopathol* 11 (1989) 301-307
72. **Smolewski P, Robak T, Krykowski E, Blasinska-Morawiec M, Niewiadomska H, Pluzanska A, Chmielowska E, Zambrano O:** Prognostic factors in Hodgkin's disease: multivariate analysis of 327 patients from a single institution. *Clin Cancer Res* 6 (2000) 1150-1160
73. **Srivastava S, Zou ZQ, Pirollo K, Blattner W, Chang EH:** Germ-line transmission of a mutated p53 gene in a cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome. *Nature* 348 (1990) 747-749
74. **Straume O, Akslen LA:** Alterations And Prognostic Significance Of p16 and p53 Protein Expression In Subgroups Of Cutaneous Melanoma. *Int J Cancer* 74 (1997) 535-539
75. **Straume O, Sviland L, Akslen LA:** Loss of Nuclear p16 Protein Expression Correlates with Increased Tumor Cell Proliferation (Ki-67) and Poor Prognosis in Patients with Vertical Growth Phase Melanoma. *Clin Cancer Res* 6 (2000) 1845-1853

76. **Stretch JR, Gatter KC, Ralfkiaer E, Lane DP, Harris AL:** Expression of Mutant p53 in Melanoma. *Cancer Res* 51 (1991) 5976-5979
77. **Talve L, Kainu J, Collan Y, Ekfors T :** Immunohistochemical Expression of p53 Protein, Mitotic Index and Nuclear Morphometry in Primary Malignant Melanoma of the Skin. *Path Res Pract* 192 (1996a) 825-833
78. **Talve L, Sauroja I, Collan Y, Punnonen K, Ekfors T:** Loss of expression of the p16INK4/CDKN2 gene in cutaneous malignant melanoma correlates with tumor cell proliferation and invasive stage. *Int J Cancer* 74 (1997) 255-259
79. **Talve LAM, Collan YUI, Ekfors TO:** Nuclear morphometry, immunohistochemical staining with Ki-67 antibody and mitotic index in the assessment of proliferative activity and prognosis of primary malignant melanomas of the skin. *J Cutan Pathol* 23 (1996b) 335-343
80. **Tang L, Tron VA, Reed JC, Mah KJ, Krajewska M, Li G, Zhou X, Ho VC, Trotter MJ:** Expression of Apoptosis Regulators in Cutaneous Malignant Melanoma. *Clin Cancer Res* 4 (1998) 1865-1871
81. **Thor AD, Moore DH II, Edgerton SM, Kawasaki ES, Reihnsaus E, Lynch HT, Marcus JN, Schwartz L, Chen LC, Mayall BH:** Accumulation of p53 tumor suppressor gene protein: an independent marker of prognosis in breast cancers. *J Natl Cancer Inst* 84 (1992) 845-855
82. **Tran T-A, Ross JS, Carlson JA, Mihm MC Jr:** Mitotic Cyclins and Cyclin-Dependent Kinases in Melanocytic Lesions. *Hum Pathol* 29 (1998) 1085-1090
83. **Tsujimoto Y, Shimizu S:** Bcl-2 family: life-or-death switch. *FEBS Lett* 466 (2000) 6-10
84. **Ueda T, Aozasa K, Tsujimoto M, Ohsawa M, Uchida A, Aoki Y, Ono K, Matsumoto K:** Prognostic significance of Ki-67 reactivity in soft tissue sarcomas. *Cancer* 63 (1989) 1607-1611

85. **Vogt T, Zipperer K-H, Vogt A, Hölzel D, Landthaler M, Stolz W:** p53-protein and Ki-67-antigen expression are both reliable biomarkers of prognosis in thick stage I nodular melanomas of the skin. *Histopathol* 30 (1997) 57-63
86. **Weiss J, Heine M, Körner B, Pilch H, Jung EG:** Expression of p53 protein in malignant melanoma: clinicopathological and prognostic implications. *Br J Dermatol* 133 (1995) 23-31
87. **Yamamoto M, Takahashi H, Saitoh K, Horikoshi T, Takahashi M:** Expression of the p53 protein in malignant melanomas as a prognostic indicator. *Arch Dermatol Res* 287 (1995) 146-151

7 Stammdaten der untersuchten Melanome

Präp.-Nr.	Alter	♂/♀	Hist.	Clark	Breslow	Ploidie	% S	Ki-67	p53	Bcl-2
160b/92	67	w	NM	4	15,00	aneuploid	11,60	0,50	0,42	0,89
853a/92	70	w	NM	4	8,20	diploid	14,40	0,44	0,61	0,60
916b/91	20	w	NM	4	3,50	diploid	6,70	0,06	0,31	0,87
741b/94	71	w	NM	4	5,60	diploid	8,50	0,31	0,37	0,81
215a/91	68	w	NM	4	12,00	diploid	5,72	0,16	0,28	0,37
625/95	65	w	NM	4	3,40	diploid	8,50	0,11	0,75	0,70
683a/91	46	w	NM	5	4,70	diploid	8,80	0,05	0,34	0,61
555b/91	60	m	NM	3	2,50	aneuploid	16,40	0,17	0,21	0,56
3523/96	70	w	NM	3	3,20	aneuploid	10,60	0,60	0,63	0,47
533a/97	68	w	NM	4	4,00	diploid	19,70	0,49	0,77	0,86
934a/96	60	m	SSM	3	1,28	diploid	11,20	0,55	0,80	0,76
1523/95	36	w	SSM	2	0,50	diploid	6,70	0,13	0,64	0,10
275a/91	66	w	SSM	3	0,80	diploid	12,07	0,15	0,54	0,82
833a/91	71	m	SSM	2	0,78	diploid	12,34	0,28	0,66	0,68
2366a/96	51	w	SSM	3	1,20	diploid	12,40	0,25	0,81	0,76
3222b/96	44	m	SSM	2	0,76	aneuploid	18,70	0,64	0,68	0,58
501a/91	69	w	SSM	4	1,58	aneuploid	6,78	0,32	0,88	0,81
2137b/91	53	m	SSM	4	1,20	aneuploid	16,80	0,24	0,57	0,66
2407b/96	35	m	SSM	3	1,30	aneuploid	10,20	0,24	0,79	0,77
3373a/96	73	w	SSM	3	1,10	aneuploid	8,70	0,45	0,73	0,41
3372b/96	43	m	SSM	2	1,15	diploid	5,00	0,25	0,85	0,86
2992/96	44	w	SSM	2	0,20	aneuploid	8,80	0,33	0,61	0,53
1236/95	61	m	SSM	2	0,40	diploid	4,40	0,06	0,76	0,62
3524b/96	69	w	SSM	2	0,40	aneuploid	6,00	0,21	0,66	0,71
2803a/96	84	w	SSM	2	0,35	aneuploid	10,20	0,17	0,62	0,53
2900a/96	52	w	SSM	1	0,50	diploid	4,30	0,23	0,69	0,67

T H E S E N

zur

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr.med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Universitätsklinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie

von Maria V. Faßhauer

geboren am 18.04.1974 in Halle

1. Das maligne Melanom ist der bösartigste Tumor der Haut. Es ist eine der am schnellsten zunehmenden malignen Erkrankungen weltweit.
2. Zur Prognoseabschätzung und Therapiefestlegung werden beim malignen Melanom verschiedene pathologische und klinische Kriterien, wie die Bestimmung der Tumordicke nach Breslow und der Eindringtiefe nach Clark verwandt.
3. Die Proteine Ki-67, p53 und bcl-2 werden in einer Reihe von Tumoren überexprimiert. Auch ist gezeigt worden, dass die Synthese dieser Proteine in einer Reihe von Malignomen mit der Prognose korreliert.
4. Die immunhistochemische Anfärbung von Ki-67, p53 und bcl-2 ist eine geeignete Methode, um diese Proteine beim malignen Melanom nachzuweisen. Der Anteil von positiven Zellen an der Gesamttumorzellpopulation kann hierbei als Index in Prozent angegeben werden.
5. Ki-67 kann in allen 26 untersuchten malignen Melanomen immunhistochemisch nachgewiesen werden. Als Antikörper wird MIB-1 verwendet.
6. Es besteht ein Trend ($p=0,08$) zu einem erhöhten Ki-67-Index in aneuploiden Tumoren verglichen zu diploiden Melanomen. Des Weiteren lassen sich keine statistisch signifikanten Zusammenhänge zwischen Ki-67-Expression und Tumordicke, Eindringtiefe, histologischem Typ, Anteil der Zellen in der S-Phase, Alter und Geschlecht der Patienten herstellen.
7. Das Tumor-Suppressor-Protein p53 kann in allen untersuchten malignen Melanomen nachgewiesen werden, wobei der spezifische primäre Antikörper DO7 verwendet wird.
8. Der p53-Index ist in der untersuchten Patientenpopulation signifikant höher in Melanomen dünner 1,5 mm. Auch ist der Anteil p53-positiver Zellen signifikant größer in superfiziell spreitenden verglichen zu nodulären Melanomen. Dagegen besteht keine statistische Signifikanz zwischen p53-Index einerseits und Ploidie, Anteil der Zellen in der S-Phase, Alter und Geschlecht der Patienten andererseits.

9. Bcl-2 kann in allen untersuchten Melanomen nachgewiesen werden, unter Verwendung des primären Antikörpers bcl-2 (clone 124).
10. Es besteht keine statistische Signifikanz zwischen bcl-2-Expression und den untersuchten klinischen und histologischen Kriterien.
11. Die Ergebnisse von vergleichbaren Studien differieren untereinander sehr stark. Teilweise werden die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigt, teilweise sind sie konträr. Als mögliche Ursache der Diskrepanz zwischen den verschiedenen Arbeiten sind Unterschiede der Patientenpopulationen, der verwendeten Antikörper und der Färbemethoden zu nennen.
12. Die immunhistochemische Bestimmung von Ki-67, p53 und bcl-2 ist nur begrenzt zu gebrauchen, um eine Prognoseabschätzung sowie Therapieplanung beim malignen Melanom vorzunehmen.
13. Es ist wichtig, weitere Marker auf ihre Relevanz hinsichtlich Prognose und Therapieentscheidung beim malignen Melanom zu untersuchen.

Lebenslauf

Name: Maria Veronika Faßhauer geb. Müller
Geburtstag: 18.04.1974
Geburtsort: Halle (Saale)
Familienstand: verheiratet mit Dr. med. Mathias Faßhauer
Eltern: Prof. Dr. phil. Rosemarie E. B. Müller, Archäologin
Dr. phil. Detlef W. Müller, Archäologe
Geschwister: Agnes B. Linke (geb. Müller)
Kilian L. Müller
A. Hedwig Müller
Katharina T. Müller
Ausbildung: 1980-1988
Polytechnische Oberschule, Halle (S.)
1988-1993
Erweiterte Oberschule, Halle (S.) (Abitur)
1991-1992
Columbia Highschool, Lake City, Florida, USA
1993-2000
Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg
seit 03/2001
Ärztin i. P. an der Klinik und Poliklinik für Kinder und
Jugendliche der Universität Leipzig

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Leipzig, August 2001

Hiermit erkläre ich, dass nur dieser Antrag auf Eröffnung eines Promotionsverfahrens von mir eingereicht wurde.

Leipzig, August 2001

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. rer. nat. W. Wohlrab für die Überlassung des Themas, das sorgfältige Heranführen an die Problematik, seine geduldige Hilfe bei der Durchführung der Experimente und die Betreuung während der Erstellung der Arbeit.

Mein Dank gilt ebenfalls Frau Herfurth und Frau Lindhof, die mich sachkundig in die Methodik der immunhistochemischen Färbungen einführten und mir bei auftretenden Problemen stets hilfreich zur Seite standen.

Auch danke ich Herrn Dr. Klapperstück für die zahlreichen Hinweise und Ratschläge.

Herrn Dr. H. Bahn (Pathologisches Institut der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) danke ich für die Bereitstellung der Positivkontrollen für p53 und bcl-2.