

**Durchflusszytometrische Diagnostik von
Mikrometastasen im Wächterlymphknoten von
Patienten mit malignem Melanom**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Hellmich, Luisa Marie

2016

Dekan: Professor Dr. I.B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. A. Ulmer
2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. M. Ebinger

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VIII
Abbildungsverzeichnis	XI
Tabellenverzeichnis	XIII

1 Einleitung	1
1.1 Das maligne Melanom	1
1.1.1 Epidemiologie.....	1
1.1.2 Das Pigmentsystem der Haut.....	1
1.1.3 Ätiopathogenese des malignen Melanoms	2
1.1.4 Klassifizierung des malignen Melanoms.....	3
1.1.5 Diagnostik des malignen Melanoms.....	4
1.1.6 Therapie des malignen Melanoms	7
1.2 Wächterlymphknoten	8
1.2.1 Geschichte	8
1.2.2 Lymphoszintigraphie und Biopsie des Wächterlymphknotens	9
1.2.3 Untersuchung des Wächterlymphknotens auf Melanommetastasen	10
1.2.3.1 Vom Melanom exprimierte Antigene und ihre Antikörper.....	11
1.3 Studienziel	15
2 Proben und Materialien.....	16
2.1 Herkunft der Proben und Bestimmung der Melanomzelldichte	16
2.2 Materialien	17
2.2.1 Allgemeine Geräte	17

2.2.2	Verbrauchsmaterialien.....	18
2.2.3	Allgemeine Chemikalien.....	18
2.2.4	Stammlösungen.....	19
2.2.4.1	PBSA (Phosphat Buffered Saline (PBS) + Bovines Serum Albumin (BSA))	19
2.2.4.2	PFA (Paraformaldehyd).....	19
	4%ige PFA-Lösung:.....	19
	0,5%ige PFA-Lösung:.....	19
2.2.5	Konjugierte monoklonale Antikörper (mAB), Amine Reactive Dyes (ARD), Nucleic Acid Stains (NAS).....	19
2.2.6	Beads.....	20
2.2.7	EDV-Programme:.....	20
3	Methoden.....	20
3.1	Prinzip der Durchflusszytometrie.....	20
3.1.1	Aufbau des Messgerätes und Messtechnik.....	21
3.1.2	Auswertung.....	24
3.1.3	Kompensation.....	25
3.2	Untersuchung der im Lymphknoten enthaltenen Zellen.....	26
3.2.1	Färben der Zellen.....	27
3.2.1.1	Einfache, extrazelluläre Färbung.....	27
3.2.1.2	Intrazelluläre Färbung.....	28
3.2.1.3	Vergleich beider Färbestrategien.....	29
3.2.2	Messung am Durchflusszytometer.....	30
3.2.3	Auswertung der extrazellulären Färbung.....	30
3.2.4	Auswertung der intrazellulären Färbung.....	37
3.3	Statistik.....	41
3.3.1	Verteilung der Proben.....	41

3.3.2	Verwendete statistische Größen und Tests	42
3.3.3	Begriffserklärungen	44
4	Ergebnisse	45
4.1	Beschreibung der Daten	45
4.1.1	Patientenkollektiv: Lokalisierung, Seite, Geschlecht, Alter	45
4.1.2	Färbemethoden	46
4.1.3	Diagnose (LDI)	47
4.2	Extrazelluläre Färbung	48
4.2.1	Verteilung der Proben	48
4.2.2	Verteilung der Gesamtzellzahl im Durchflusszytometer	48
4.2.3	Einfluss der Konservierung mit PFA auf die Gesamtzellzahl im Durchflusszytometer	51
4.2.4	Einfluss der MZD auf die Gesamtzahl an lebenden und toten Lymphozyten im WLK	52
4.2.5	Vierfeldertafeln, Sensitivität und Spezifität	54
4.2.6	Korrelation von Durchflusszytometrie und LDI für Proben mit MZD > 0	56
4.2.7	Proben mit MZD > 100	57
4.2.8	Ausschluss unfixierter Proben	58
4.3	Intrazelluläre Färbung	59
4.3.1	Verteilung der Proben	59
4.3.2	Verteilung der Gesamtzellzahl im Durchflusszytometer	60
4.3.3	Konservierung mit PFA	62
4.3.4	Vierfeldertafeln, Sensitivität, Spezifität	62
4.3.4.1	Einfache Antikörper-Färbung	62
4.3.4.2	Antikörper-Kombination	63

4.3.5	Korrelation von Durchflusszytometrie und LDI für Proben mit MZD > 0 65	
4.3.5.1	Einfache Antikörper-Färbung	65
4.3.5.2	Antikörperkombination	67
4.3.5.3	Zusammenfassung.....	68
4.3.6	„Grundpositivität“ der Durchflusszytometrie.....	69
4.3.7	Vergleich MZD und Tumorzell-dichte bei Proben mit MZD > 100	71
4.3.8	Ausschluss unfixierter Proben.....	71
4.4	Vergleich extra- und intrazelluläre Färbung.....	72
4.4.1	Korrelation extra- versus der intrazellulären Tumorzell-dichte für Proben mit MZD \geq 0.....	72
4.4.2	Korrelation der Tumorzell-dichten beider Färbestrategien für Proben mit MZD>0	73
5	Diskussion.....	74
5.1	Zusammenfassung der Hauptergebnisse.....	74
5.1.1	Extrazelluläre Färbung	74
5.1.2	Intrazelluläre Färbung.....	75
5.1.3	Vergleich extra- und intrazelluläre Färbung.....	75
5.2	Methodenkritik.....	76
5.2.1	Selektion große WLK.....	76
5.2.2	Selektion Tumordicke	77
5.2.3	Probenvorbereitung und Zellzahlverlust	77
5.2.4	Accuri-Kritik	80
5.2.5	Verblindung.....	81
5.3	Diskussion der Ergebnisse	82
5.3.1	LDI als Goldstandard?.....	82
5.3.2	Einfluss der MZD auf die Gesamtzellzahl	82

5.3.3	Auswertung.....	83
5.3.3.1	Auswertestrategie der extrazellulären Färbung.....	84
5.3.3.1.1	Lebend-Tot-Färbung: Relevanz?.....	88
5.3.3.2	Auswertestrategie der intrazellulären Färbung	90
5.3.3.2.1	Grundpositivität.....	90
5.3.4	Diskussion der Ergebnisse für die Antikörperfärbungen	91
5.3.4.1	9.2.27-Färbung	91
5.3.4.2	Beteb-Färbung.....	92
5.3.4.3	C3-Färbung.....	93
5.3.4.4	Permeabilisierung als Ursache für die erhöhte Positivitätsrate?	93
5.3.4.5	Antikörper-Kombination.....	94
5.3.4.5.1	Kombination von jeweils zwei Antikörpern	94
5.3.4.5.2	Kombination aller drei Antikörper.....	94
5.3.4.6	Vergleich der Ergebnisse der extra- und intrazellulären Färbestrategie	95
5.3.5	Zusammenfassung und Ausblick.....	95
5.3.6	Durchflusszytometrie genauer bei Proben mit MZD > 100?	96
6	Zusammenfassung und Ausblick	97
7	Literaturverzeichnis.....	100
8	Erklärung zum Eigenanteil.....	108
9	Danksagung.....	108
10	Lebenslauf.....	109

Abkürzungsverzeichnis

A Area

ARD Amine Reactive Dye

Ax Alexa Fluor

BP Band Pass

BSA Bovines Serum Albumin

BSG Blutsenkungsgeschwindigkeit

CD Cluster of Differentiation

CT Computertomographie

CTLA Cytotoxic-T-Lymphocyte-Antigen

DCCD Disseminated Cancer Cells Density

FC Flow Cytometry/Flow Cytometer

FISH Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

FITC Fluoresceinisothiocyanat

FSC Forward Scatter

gp Glykoprotein

H Height

HBSS Hank's Balanced Salt Solution

HE Hematoxylin und Eosin

HEPES 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl]-Ethansulfonsäure

HMB-45 Human Melanoma Black 45

IFN Interferon

LDH Laktatdehydrogenase

LDI Lymphozyten-Disaggregations-Immunzytologie

LP Long Pass

mAB Monoklonaler Antikörper

MACS Magnetic Cell Separation

MART-1 Melanoma Antigen Recognized by T-cells 1

MCSP Melanoma-associated Chondroitin Sulfate Proteoglykan

MRT Magnetresonanztomographie

MZD Melanomzelldichte

NAS Nucleic Acid Stain

PBS Phosphat Buffered Saline

PBSA Phosphat Buffered Serum Albumin

PE Phycoerythrin

PerCP Peridinin-Chlorophyll-Protein

PET Positronen-Emissions-Tomographie

PFA Paraformaldehyd

RT-PCR Reverse-Transkriptase-Polymerase-Chain-Reaction

RZP Relative Zentripetalbeschleunigung

SHA Sicherheitsabstand

SLN Sentinel Lymph Node

SSC Side Scatter

UV Ultra Violett

WLK Wächterlymphknoten

ZNS zentrales Nervensystem

Abbildungsverzeichnis

Abb.1.1 Lymphabfluss.	Fehler! Textmarke nicht definiert.
Abb.1.2: Intraoperativ identifizierte WLK.....	9
Abb.1.3: Lymphozyten-Disaggregations-Immunzytologie.....	14
Abb.3.1 Laser und Detektoren des Accuri.	23
Abb.3.2 Contour plot.....	25
Abb. 3.3 Kontrollgate.....	31
Abb. 3.4 Acquisitionsgate.....	31
Abb. 3.5: Gating-Hierarchie extrazelluläre Färbung.....	32
Abb. 3.6: Time window.....	32
Abb.3.7: Time window cells.....	33
Abb.3.8 a: live cells und b: dead cells.....	33
Abb. 3.9 a und b: melanoma cells.....	34
Abb.3.10 a und b: 9.2.27 ⁺ cells.....	35
Abb.3.11 a-d: Forward-side-scatter plots.....	36
Abb.3.12: Debris control.....	37
Abb. 3.13: Gating-Hierarchie intrazelluläre Färbung.....	38
Abb. 3.14: all cells.....	39
Abb.3.15 a-c: Gating von Melanomzellen.....	39
Abb. 3.16 a-c: Prüfung der Mehrfachpositivität.....	40
Abb.4.1: Lokalisation.....	45
Abb.4.2: Altersverteilung in Boxplot-Darstellung.....	46
Abb.4.3: Aufteilung der Färbemethoden.....	46
Abb.4.4: Diagnose.....	47

Abb.4.5: Verteilung MZD	47
Abb.4.6: Extrazellulär gefärbte WLK	48
Abb.4.7: Verteilung der Gesamtzellzahl	49
Abb.4.8: Gesamtzellzahl einzelner MZD-Gruppen.....	50
Abb.4.9: Gesamtzellzahl versus PFA	51
Abb.4.10 Anzahl lebender und toter Lymphozyten in den jeweiligen MZD-Gruppen..	53
Abb.4.11 FC vs. LDI für Proben mit MZD >	56
Abb.4.12: MZD-Gruppen.....	60
Abb. 4.13: Verteilung der Gesamtzellzahl	60
Abb. 4.14: Gesamtzellzahl einzelner MZD-Gruppen.....	61
Abb.4.15 FC vs. LDI für Proben mit MZD > 0.....	66
Abb.4.16 FC vs. LDI für Proben mit MZD > 0.....	67
Abb. 4.17: Positives „Grundrauschen“ bei der intrazellulären Färbung	70
Abb. 4.18 Extra- vs. intrazelluläre Tumorzelldichte	72
Abb. 4.19 Extra- vs. intrazelluläre Tumorzelldichte für Proben mit MZD>0.....	73
Abb. 5.1: Zelldebris	79
Abb. 5.2 a-c Gating-Strategie zur Detektion von 9.2.27 ⁺ Melanomzellen:.....	84
Abb. 5.3 a und b: Beispielprobe 1	85
Abb. 5.4 a-c: Beispielprobe 2	86
Abb. 5.5 a-d: Beispielprobe 3	87
Abb. 5.6 a-d: Beispielprobe 4.....	88
Abb. 5.7 a und b: Probe mit MZD = 11586.....	89

Tabellenverzeichnis

Tab.1.1: TNM-Klassifikation des Melanoms	6
Tab.1.2: Vergleich diagnostischer Möglichkeiten.....	15
Tab.2.1: Allgemeine Geräte	17
Tab.2.2: Verbrauchsmaterialien	18
Tab.2.3: Allgemeine Chemikalien.....	18
Tab.2.4: Verwendete Antikörper und Fluorochrome	19
Tab.2.5: Verwendete Beads	20
Tab.2.6: Verwendete EDV-Programme	20
Tab.3.1: Blauer Laser	23
Tab.3.2: Roter Laser	24
Tab.3.3: Konjugation der Fluorochrome	29
Tab.3.4: Vierfeldertafel	43
Tab.3.5: Wichtige in unserer Arbeit verwendete Begriffe und Erklärungen.....	44
Tab.4.1: Verteilung der Gesamtzellzahl einzelner MZD-Gruppen	50
Tab.4.2: Gesamtzellzahl versus PFA.....	51
Tab.4.3 Anzahl lebender und toter Lymphozyten in den jeweiligen MZD-Gruppen	53
Tab.4.4: Vierfeldertafel live melanoma cells	54
Tab.4.5: Vierfeldertafel dead melanoma cells.....	54
Tab.4.6: Vierfeldertafel total melanoma cells	54
Tab.4.7: Vergleich	55
Tab.4.8: Proben mit MZD > 100	57
Tab.4.9: Sensitivität und Spezifität unter Ausschluss nicht fixierter Proben	58

Tab.4.10: Spearman's ρ für ausschließlich fixierte HMB45 ⁺ Proben	59
Tab.4.11: Verteilung der Gesamtzellzahl einzelner MZD-Gruppen	61
Tab.4.12: Vierfeldertafel 9.2.27	62
Tab.4.13: Vierfeldertafel beteb.....	62
Tab.4.14: Vierfeldertafel C3.....	63
Tab.4.15: Vierfeldertafel 9.2.27 ⁺ und beteb ⁺	63
Tab.4.16: Vierfeldertafel 9.2.27 ⁺ und C3 ⁺	63
Tab.4.17: Vierfeldertafel beteb ⁺ und C3 ⁺	64
Tab.4.18: Vierfeldertafel triple positive cells	64
Tab.4.19: Vergleich Antikörperkombinationen.....	65
Tab.4.20: Vergleich Spearman's ρ und Signifikanz p.....	68
Tab.4.21: „Grundpositivität“	69
Tab.4.22 Vergleich MZD und durchflusszytometrische Tumorzellichte.....	71
Tab.6.1: Vergleich LDI und FC.....	98

1 Einleitung

1.1 Das maligne Melanom

Das maligne Melanom, auch schwarzer Hautkrebs genannt, ist ein bösartiger Tumor der Haut, der aus entarteten Melanozyten entsteht.

In 90% der Fälle handelt es sich um kutane Melanome, seltenere Ursprungsregionen sind Schleimhäute (oral, gastrointestinal oder genital), das Auge (konjunktival, uveal) oder das ZNS.

1.1.1 Epidemiologie

Das Melanom ist nach Basalzell- und Plattenepithelkarzinom der dritthäufigste maligne Hauttumor und macht insgesamt nur 4% aller Hauttumore aus. Dennoch sind 90% aller Todesfälle durch Hautkrebs melanombedingt [1].

Das Melanom ist derzeit die maligne Erkrankung mit der am schnellsten ansteigenden Inzidenz [2]. Sie beträgt in Europa und Nordamerika 13-15 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner pro Jahr, mit einer Inzidenzsteigerung von 5-10% pro Jahr [3]. Schwarze und dunkel pigmentierte erkranken sehr viel seltener.

Bezüglich der Inzidenz im Vergleich mit allen Krebserkrankungen stand das Melanom im Jahre 2010 bei beiden Geschlechtern an fünfter Stelle [4].

Es ist besonders bösartig durch die frühzeitige Metastasierung und hat eine schlechte Heilungsrate. Da es eine Erkrankung des mittleren Lebensalters ist, haben Melanopatienten durch den Verlust an Lebensjahren und Lebensqualität einen erheblichen Krankheitswert.

In Deutschland gehörte es im Jahre 2010 mit 1,3% aller Krebstodesursachen zu den 20 häufigsten Krebstodesursachen überhaupt [5, 2].

1.1.2 Das Pigmentsystem der Haut

Das Pigmentsystem der Haut wird von den Melanozyten gebildet. Diese entwickeln sich in der Neuralleiste aus Melanoblasten. Während der Fetalperiode wandern die Melanoblasten dann aus und kolonisieren Haut und Haare, wobei sie zu den

melaninbildenden dendritischen, sekretorischen Melanozyten werden. Melanozytäre Zellen findet man außerdem in Schleimhäuten, Leptomeningen, im Innenohr und im Auge, weshalb sich auch dort Störungen der Melaninbildung auswirken können [3].

In der Haut sitzen die Melanozyten als dendritische Einzelzellen ohne desmosomale Verankerung im Stratum basale. Besonders hoch ist ihre Dichte im Gesicht und der Genitoanalregion. Im Laufe des Lebens nimmt die Melanozytenzahl ab.

Das von ihnen gebildete Melanin absorbiert Licht und fängt UV-induzierte freie Radikale ab. Es besteht aus drei Komponenten, dem braun-schwarzen Eumelanin, dem rot-gelben Phaeomelanin und dem roten Trichrom, deren jeweiliges Mischverhältnis zu unterschiedlicher Haut- und Haarfarbe führt.

Melanin wird mithilfe der Tyrosinase aus Tyrosin und Sauerstoff in speziellen Zellorganellen, den Melanosomen, synthetisiert. Diese werden mithilfe der dendritischen Ausläufer eines Melanozyten in die oberen Zellschichten der Haut transportiert und dort von Keratinozyten aufgenommen. In den oberen Epidermisschichten werden die Melanosomen dann abgebaut. Durchschnittlich versorgt ein Melanozyt 36 Keratinozyten mit melaninhaltigen Melanosomen.

Melanin- und Melanozytengehalt können sich durch Adaptation an die jeweilige UV-Belastung verändern [3].

1.1.3 Ätiopathogenese des malignen Melanoms

Ätiologie und Pathogenese des malignen Melanoms sind weitgehend unbekannt, es spielen sowohl genetische als auch epigenetische Faktoren eine Rolle [6].

Man geht von einem Mehrstufenmodell der Melanomentwicklung aus, wobei die kumulative Entwicklung von Genmutationen und chromosomale Veränderungen zur schrittweisen Malignisierung des Tumors führen. Genetische Instabilität (Entstehung neuer Tumorzellklone) und klonale Evolution (Selektion der jeweils stärker malignen Zellklone) lassen schließlich voll maligne Tumorzellen entstehen [3].

Etwa 40 % aller Melanome haben eine Mutation im B-RAF-Gen [7]. Der Austausch von Valin durch Glutaminsäure an Position 600 führt zu einer vermehrten Zellproliferation. Bei übermäßiger Lichtexposition kann es zu einer Daueraktivierung

dieses Gens kommen. Weitere melanomassoziierte Gene sind NRAS, KIT, NF1 und GAB [8,9,10, 11].

Risikofaktoren

Der Hauptrisikofaktor ist die UV-Exposition (v.a. UV-B). Hierbei ist besonders die akut-intermittierende Lichtexposition an Rumpf und Beinen wie bei häufigen Sonnenbränden in Kindheit und Jugend schädlich. Daher ist eine erhöhte individuelle Sonnenempfindlichkeit (Hauttyp I und II, Xeroderma pigmentosum) ein Risikofaktor.

Aber auch die chronisch-kumulative UV-Exposition an immer lichtexponierten Stellen (wie Gesicht und Handrücken) birgt durch Induktion der Bildung von Melanomvorläufern wie erworbenen melanozytären Nävi oder der Lentigo maligna ein (indirektes) Risiko. Obwohl die Mehrzahl der Melanome de novo entsteht, entwickeln sie sich bis zu 30% innerhalb melanozytärer Nävi. Daher gelten neben oben genannten Melanomvorläuferläsionen weiterhin erworbene dysplastische Nävi wie beim dysplastischen Nävussyndrom (>5 atypische melanozytäre Nävi und >50 "gewöhnliche" melanozytäre Nävi, hereditär: BK-Mole-Syndrom), über 100 gewöhnliche melanozytäre Nävi und kongenitale melanozytäre Nävi (besonders Riesennävi mit einem Entartungsrisiko von bis zu 15%!) als begünstigende Faktoren.

Auch bei dauerhaft Immunsupprimierten ist das Risiko für ein Melanom erhöht. In 5-10% der Fälle spielt familiäre Vererbung eine Rolle. Bei Frauen führt der SNP309-Polymorphismus zu einem höheren Risiko, an einem Melanom zu erkranken [12].

1.1.4 Klassifizierung des malignen Melanoms

Grundlage der Klassifizierung des malignen Melanoms sind Wachstumsverhalten, Entstehungsweg und Lokalisation [3].

Der mit 57% häufigste Melanomtyp ist das superfiziell spreitende Melanom (SSM). Es ist flach-erhaben und tastbar und wächst zunächst horizontal, später auch vertikal mit Knotenbildung und Ulzeration. Die Lokalisation ist geschlechtsabhängig, bei Männern meist am Oberkörper, bei Frauen an den Unterschenkeln. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 51 Jahren [3].

Zweithäufigster Melanomtyp ist das noduläre Melanom (NM) (21%). Die Oberfläche ist meist erosiv-krustös bis ulzeriert und es wächst mit schneller Geschwindigkeit (Monate), woraus eine relativ ungünstige Prognose resultiert. Im Mittel betrifft es 56-jährige Patienten.

Mit 9% gehört das Lentigo-Maligna-Melanom (LMM) zu den seltenen Melanomtypen. Es entsteht chronisch, nahezu schleichend und oft unbemerkt auf dem Boden der Lentigo maligna, des meist über Jahre bestehenden Melanoma in situ [2]. Der Erkrankungsgipfel liegt bei 68 Jahren, überwiegend sind Frauen betroffen. Lokalisiert ist es häufig im Gesicht.

An den Akren (Hände, Füße) lokalisiert ist das akrolentiginöse Melanom (ALM), das mit 4% aller Melanomtypen auch eher selten ist. Es wächst zunächst superfiziell, später dann auch vertikal mit Knotenbildung, Erosionen und Ulzerationen [2]. Eine Sonderform ist das Nagelbettmelanom. Das mittlere Erkrankungsalter beträgt 63 Jahre [3].

Daneben gibt es Sonderformen wie nävusassoziierte Melanome, primär dermale Melanome, amelanotische Melanome, Schleimhautmelanome oder nicht-klassifizierbare Melanome [2].

1.1.5 Diagnostik des malignen Melanoms

Für die Diagnose eines malignen Melanoms sind Anamnese, Klinik und Auflichtmikroskopie von Bedeutung. Anamnestisch finden sich meist neu aufgetretene melanozytäre Herde oder auffällige Veränderungen eines vorbestehenden, einzelnen Pigmentherdes [3].

Um klinisch benigne melanozytäre Nävi von dysplastischen Nävi oder Melanomen zu unterscheiden, wendet man die ABCDE-Regel an. Bei Asymmetrie (A), unscharfer Begrenzung (B), inhomogener Colorierung (C), einem Durchmesser (D) von über 6mm und Erhabenheit (E) sind Nävi malignitätsverdächtig [3].

Desweiteren sind ein schnelles Wachstum oder das sogenannte „*ugly duck*“ Phänomen (eine Gestalt, die nicht ins Gesamtbild passt) immer verdächtig auf entartete Zellen.

Zusätzlich wird der suspekter Herd auflichtmikroskopisch untersucht, dabei wird vor allem auf Atypien von Farbe, Pigmentverteilung und Gefäßmuster geachtet [3]. Im Zweifelsfall sollte immer eine Exzisionsbiopsie durchgeführt und nicht zugewartet werden.

Gesichert wird die Diagnose anhand bestimmter Kriterien wie z.B. atypische melanozytäre Mitosen mit Kernpolymorphismen, bestimmte Musterbildungen und Regressionsphänomene.

Mit HMB45- und S100-Färbung (s.u.) wird das Melanom auch immunhistologisch diagnostiziert und der histologische Tumortyp festgestellt.

Der wesentliche prognostische Faktor ist die Invasionstiefe des Tumors. Postoperativ wird histologisch das Tiefenwachstum des Primärtumors festgestellt, entweder absolut in Millimetern (Tumordicke nach Breslow) oder relativ in Bezug auf die Hautschichten (Clark-Level). Die Levelteilung ist jedoch weniger aussagekräftig und wird seit der grundlegenden Revision der Melanomklassifikation 2001 nur noch zur Unterscheidung zwischen T1 und T2 verwendet [13,3].

Zur Tumorausbreitungsdiagnostik gehören die Sonographie der unmittelbaren Tumorumgebung und des regionären Lymphabflussgebietes und weiterhin je nach Stadium auch Röntgen des Thorax, Sonographie des Abdomens, CT, MRT, PET, Labor (BSG, Blutbild, LDH, alkalische Phosphatase, Protein S100). Zur Verlaufskontrolle wird der Melanommarker S100 im Serum gemessen.

Ab einer Tumordicke von > 1mm wird in den aktuellen Leitlinien eine Biopsie des Wächterlymphknotens empfohlen (vgl. 1.2).

Ziel der Diagnostik ist es mögliche Metastasen zu finden. Dazu gehören Lokalrezidive (nach subtotaler Exzision oder als Metastase im Narbenbereich), Satelliten-Metastasen (in der Tumorumgebung bis 2 cm), In-Transitmetastasen (im Verlauf des Lymphabflusses), regionäre Lymphknotenmetastasen und Fernmetastasen. Letztere können sowohl lymphogen als auch hämatogen in Lunge, Leber, Gehirn, Knochen, Haut und Subkutis auftreten.

In 2/3 der Fälle handelt es sich um lokoregionäre/ lymphogene Metastasen, meist Lymphknotenmetastasen, 1/3 sind primäre Fernmetastasen [3].

Letzten Endes wird ein Staging nach der gültigen TNM-Klassifikation durchgeführt [14]. In die T-Klassifikation fließen Tumordicke nach Breslow, Mitoserate und Ulzerations-Status ein, bei der N-Klassifikation unterscheidet man zwischen Mikro- und Makrometastasen und bei der M-Klassifikation je nach Metastasenort (s. Tab.1.1).

T-Klassifikation	Tumordicke	Weitere prognostische Parameter	N-Klassifikation	Zahl metastatisch befallener LK	Ausmaß der Lymphknotenmetastasierung
Tis	Keine Angabe	Melanoma in situ, keine Tumorinvasion	N1	1 LK	a: Mikrometastasierung
					b: Makrometastasierung
Tx		Stadium nicht bestimmbar*	N2	2-3 LK	a: Mikrometastasierung
					b: Makrometastasierung
					c: Satelliten-oder In-Transit-Metastasen
T1	≤ 1,0 mm	a: ohne Ulzeration, keine Mitosen	N3		≥ 4 LK, Satelliten-oder In-Transit-Metastasen plus Lymphknotenbeteiligung
		b: mit Ulzeration oder Mitoserate ≤1/mm ²			M-Klassifikation
T2	1,01 – 2,0 mm	a: ohne Ulzeration	M1a	Haut, subkutan oder Lymphknoten	normal
		b: mit Ulzeration	M1b	Lunge	normal
T3	2,01 – 4,0 mm	a: ohne Ulzeration	M1c	alle anderen Organmetastasen, jede Art von Fernmetastasierung	normal/erhöht
		b: mit Ulzeration			
T4	> 4 mm	a: ohne Ulzeration			
		b: mit Ulzeration			

Tab.1.1: TNM-Klassifikation des Melanoms

*Fehlen einer Bestimmung der Tumordicke und/oder Ulzeration oder unbekannter Primärtumor

1.1.6 Therapie des malignen Melanoms

Zunächst wird der Primärtumor exzidiert, wobei auf Sicherheitsabstände (SHA) geachtet werden muss: Melanoma in situ $\rightarrow 0,5\text{ cm}$ SHA; Tumordicke $< 2\text{mm}$ $\rightarrow 1\text{ cm}$ SHA; Tumordicke $\geq 2\text{mm}$ $\rightarrow 2\text{cm}$ SHA. Eine knappere Exzision mit mikroskopisch kontrollierter Chirurgie ist bei Melanomen besonderer Lokalisation (Gesicht, Akren, Schleimhaut) möglich. Ein Lentigo-maligna-Melanom kann auch primär mit Strahlentherapie behandelt werden.

Makrometastasen im Wächterlymphknoten haben die komplette Ausräumung der Lymphknotenstation und eventuelle Nachbestrahlung bei R1/R2-Resektion zur Folge [3]. Auch beim Nachweis von Mikrometastasen wurde bisher die komplette Lymphknotendisektion empfohlen [15]. Aufgrund neuerer Studien, die hiernach keinen Überlebensvorteil zeigten [16, 17], empfiehlt man in den aktuellen Leitlinien eine kritische Abwägung der radikalen Lymphknotendisektion gegenüber beobachtendem Zuwarten zumindest bei kleiner Tumorlast im Wächterlymphknoten [11].

Hautmetastasen werden exzidiert oder bestrahlt. Umschriebene, organbeschränkte Fernmetastasen werden exzidiert, Hirn- und Knochenmetastasen bestrahlt und Lebermetastasen operiert, ablativ-medikamentös oder embolisierend behandelt [3].

Neben Chirurgie und Strahlentherapie gibt es auch medikamentös-systemische Therapieoptionen. Dacarbazin (DTIC) als Monotherapie hat eine Ansprechrate von 18%, in Kombination mit Interferon- α liegt diese bei 28%. Weitere Kombinationspräparate sind Zytostatika wie das liquorgängige Temozolomid oder Vinblastin [3]. Neueste immunstimulierende Therapien mit anti-CTLA-4-Antagonisten (Ipilimumab) scheinen bei einer Ansprechrate von 10-20% eine Langzeitstabilisierung zu erzielen [18,19,20]. Der Proteinkinaseinhibitor Dabrafenib ist seit August 2013 zur lebensverlängernden Therapie von Patienten mit BRAF-V600-Mutation und nicht resezierbarem, therapieresistentem metastasiertem Melanom zugelassen [21,22]. Seit Juni 2015 werden in Deutschland die PD1-Inhibitoren Pembrolizumab und Nivolumab eingesetzt. Sie führen zu einer längeren progressionsfreien Überlebenszeit von Melanompatienten in Stadium III oder IV als Ipilimumab [23,24].

1.2 Wächterlymphknoten

1.2.1 Geschichte

Bei verschiedenen malignen Erkrankungen, die lymphogen metastasieren, spricht man vom Wächterlymphknoten (WLK) oder Sentinel Lymph Node (SLN) als dem ersten drainierenden Lymphknoten des Tumor-Lymphabflussgebietes. Damit stellt dieser auch die wahrscheinlichste Lokalisation einer beginnenden Metastasierung dar [25].

Bereits 1892 beobachtete der Londoner Chirurg Herbert Snow die „Infektion“ regionaler Lymphknoten durch den melanotischen Primärtumor und befürwortete deren elektive radikale Dissektion als therapeutische Maßnahme [26,27,28]. Seitdem wurden die Lymphknotendissektion im Allgemeinen, ihre Radikalität und ihr Zeitpunkt immer wieder diskutiert [27,29,30,31,32]. Hundert Jahre später, 1992, beschrieben Morton et al erstmals die Lymphoszintigraphie und WLK-Biopsie als Aufdeckungsmethode klinisch inapparenter Melanommetastasen und Alternative zur radikalen elektiven Lymphknotendissektion [33].

Mithilfe der Lymphoszintigraphie kann der Chirurg den Lymphweg ausgehend vom Primärtumor bis zum regionalen Lymphabflussgebiet darstellen, den WLK identifizieren und entfernen, sodass dieser auf Metastasen untersucht werden kann (vgl. 1.2.2.).

Die WLK-Biopsie ist somit eine sehr präzise und risikoarme Staging-Methode und dient weniger therapeutischen als diagnostischen Zwecken. Ausgehend von diesen Untersuchungen kann dann therapeutisch zwischen einer radikalen Dissektion aller Lymphknoten im regionalen Lymphabflussgebiet oder einem diese Lymphknoten beobachtenden Zuwarten entschieden werden. Erstere wird derzeit Patienten mit bereits befallenen LK empfohlen [15] und verhilft ihnen zu einem besseren klinischen Outcome [34,35], der DeCOG-SLT-Studie nach aber nicht unbedingt zu einem Überlebensvorteil [16]. Weitere Forschungen bezüglich eines möglichen Überlebensvorteils dieser Patienten werden derzeit durch den Multicenter Selective Lymphadenectomy Trial II (MSLT-II) durchgeführt. Patienten mit Melanomzellen-negativem WLK bleiben Operationsrisiko, Morbidität (wie ein chronisches sekundäres

Lymphödem) und Kosten einer radikalen Lymphknotendissektion momentan erspart [15,25,32,36].

1.2.2 Lymphoszintigraphie und Biopsie des Wächterlymphknotens

Bei der kutanen Lymphoszintigraphie wird ein radioaktiv markiertes Nanokolloid (^{99m}Tc) in den Primärtumor bzw. die unmittelbare Umgebung gespritzt [25,33]. Dieses breitet sich von dort dann wie potenzielle Metastasen über den regionalen Lymphabflussweg aus und reichert sich im ersten drainierenden Lymphknoten, dem Wächterlymphknoten, an. Mithilfe eines Szintillationszählers kann dieser LK dann intraoperativ identifiziert und entfernt werden. Zur besseren intraoperativen Orientierung werden meist zusätzlich zum Nanokolloid 1-2 ml Patentblau gespritzt, welches den WLK innerhalb von Minuten sichtbar blau anfärbt und ihn optisch identifizierbar macht (vgl. Abb.1.1, [37]). So kann man ihn zur Diagnostik entnehmen (vgl. Abb.1.2, [38]).

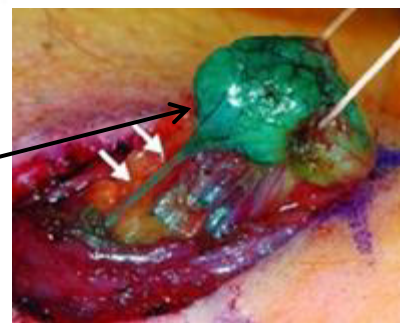
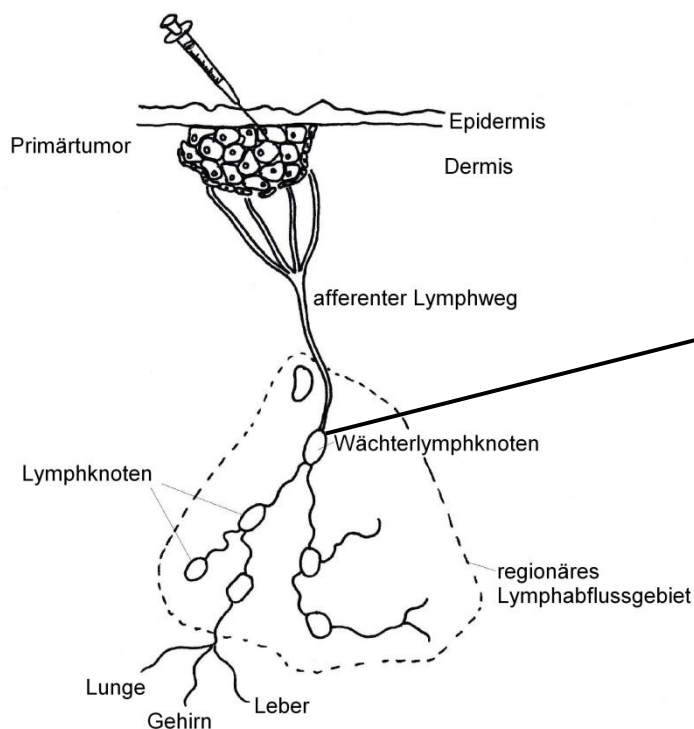


Abb.1.2: Lymphabfluss. Der Primärtumor ist in die Dermis vorgedrungen. Vom ersten drainierenden Lymphknoten (WLK) ausgehend metastasiert er in der Folgezeit lymphatisch über das regionale Lymphabflussgebiet und später auch hämatogen in Lunge, Gehirn und Leber [37].

Abb.1.1: Intraoperativ identifizierter WLK (blau) mit zuführenden Lymphgefäßen (weiße Pfeile). (Quelle: frei verändert nach [38])

Nach den heutigen Richtlinien wird eine WLK-Biopsie zum einen allen Patienten mit einer Primärtumordicke von $> 1\text{mm}$ empfohlen, zum anderen auch Patienten mit dünneren Primärtumoren ($\geq 0,75\text{-}1\text{mm}$) und zusätzlichen ungünstigen prognostischen Faktoren (Ulzeration des Primärtumors, erhöhte Mitoserate, Alter unter 40 Jahre). Sie wird nur bei Patienten durchgeführt, die weder klinisch noch in der Bildgebung Hinweise auf lokoregionäre Metastasen oder Fernmetastasen haben [14,15,39].

Allgemein wird angenommen, dass bei primären Tumoren die Tumordicke und der Nachweis einer Mikrometastasierung in der WLK-Biopsie die wichtigsten prognostischen Faktoren sind [14,36], daher ist eine möglichst genaue Detektion von Metastasen für die Patienten essentiell.

1.2.3 Untersuchung des Wächterlymphknotens auf Melanommetastasen

Man unterscheidet zwischen makroskopischem und mikroskopischem Befall des WLK.

Eine Makrometastase ist eine durch körperliche Untersuchung und/oder Sonographie und mikroskopisch-pathologisch nachweisbare Tochtergeschwulst, während eine klinisch und radiologisch okkulte, ausschließlich mikroskopisch detektierbare Metastasierung als Mikrometastase bezeichnet wird [15].

Hiervon spalten sich die sog. „Submikrometastasen“ oder isolierte Tumorzellen (ITC) ab, d.h. vereinzelte Tumorzellen, die zumeist nur mit Immunhistochemie nachgewiesen werden können und deren Ausdehnung $0,1\text{ mm}$ unterschreitet [40].

Seit 2009 werden Patienten mit Mikrometastasierung in Stadium III (Lymphknoten positiv) eingestuft [14]. Hierfür reicht bereits der Nachweis einer einzigen Tumorzelle in der WLK-Biopsie aus. Grund dieser strikten Höherstufung von Patienten mit isolierten Tumorzellen sind verschiedene Studien, die auch für ITC eine prognostische Bedeutung nachwiesen [29,32,41,42,43].

Die Überlebensraten von Patienten mit Makrometastasen unterscheiden sich signifikant von denen mit Mikrometastasen [14]. Aufgrund bislang fehlender routinemäßiger Erfassung ist derzeit jedoch unklar, ob jede nachweisbare disseminierte Melanomzelle prognostisch relevant ist oder ob es eine kritische Tumorlast gibt, ab der eine Disseminierung bedeutsam wird. Einige Studien konnten nachweisen, dass Patienten mit Submikrometastasen ähnliche Überlebensraten wie Patienten mit negativen WLK

haben [30,36,44], andere zeigten einen signifikanten Unterschied [29,41,45]. Insgesamt ist die Bedeutung letzterer Studien allerdings stärker zu gewichten, da diese die Patienten über einen viel längeren Zeitraum beobachteten als erstere Studien (13 Jahre bei Scheri et al [29] versus ca. 3 Jahre bei Satzger et al [44]).

Klar ist, dass Patienten mit ausgedehntem mikroskopischem Befall des WLK häufiger Metastasen in den nachgeschalteten Lymphknoten haben als Patienten mit kleinerer Tumorlast [46,47,48,49].

Zur quantitativen Dokumentation einer Mikrometastasierung gibt es zwar Forschungsansätze [41,50], bislang besteht allerdings kein einheitliches Konzept hierfür.

Strategien zur Erfassung des Wächterlymphknotenstatus

Neben der konventionellen Hematoxylin- und Eosin (HE)-Färbung der Lymphknotenschnitte wird wegen der verbesserten Detektionsrate [33,51,52] in den meisten Zentren der WLK auch immunhistologisch untersucht.

Hierbei werden verschiedene Antikörper verwendet, die gegen Antigene auf Melanomzellen gerichtet sind.

1.2.3.1 Vom Melanom exprimierte Antigene und ihre Antikörper

S100

Das Protein S100 ist ein saures, Kalzium-bindendes Protein, welches sich außer in Melanomzellen auch in Gliazellen befindet. In Melanomzellen ist S100 im Kern und im Zytoplasma vorhanden [53]. Sein Antikörper hat eine Sensitivität von 97% [54] bei begrenzter Spezifität: er bindet auch an Gliazellen, myoepithelialen Zellen, Langerhans-Zellen, Chondrozyten und Adipozyten [55,56] sowie benigne Nävi [54].

Glykoprotein gp100

Das zytoplasmatische Glykoprotein gp100 ist ein Teil des Melanosomenkomplexes der Melanomzelle [53,57]. Der anti-gp100-Antikörper nennt sich je nach Klon HMB45 oder beteb und färbt die oberflächliche dermale und intraepidermale Komponente aller kutanen melanozytischen Nävi. Bei mäßiger Sensitivität (75% bei Karimipour et al [54]) ist er sehr spezifisch für Melanommetastasen [54], färbt keine intranodalen Nävi und

auch keine Histiozyten [58] und färbte keinen einzigen Kontrolllymphknoten bei Ulmer et al [41,59].

MART-1 (melanoma antigen recognized by T-cells-1) oder Melan A

MART-1 oder Melan A ist ein zytoplasmatisches Protein von Melanomzellen, welches für die Differenzierung ihrer Melanosomen zuständig ist und von T-Zellen erkannt wird [56]. Der anti-Melan-A-Antikörper ist in Sensitivität und Spezifität dem HMB45 sehr ähnlich [53], färbt allerdings im Gegensatz zum HMB45 oft benigne Nävi an [54].

Human melanoma-associated chondroitin sulfate Proteoglykan (MCSP)

Das humane melanomassoziierte Chondroitinsulfat-Proteoglykan (MCSP) wird auf 85-90% kutaner Melanomzellen exprimiert [60,61,62] und spielt eine Rolle bei ihrer Wachstumskontrolle [62]. Außer auf Melanomzellen wird MCSP außerdem auf benignen dysplastischen Nävuszellen, basalen Epidermiszellen, Haarfollikeln, Chondrozyten und glatten Muskelzellen exprimiert [61].

Den an MCSP bindenden Antikörper nennen wir im Folgenden nach seinem Klon 9.2.27. Ulmer et al zeigten 2004 eine starke Färbung von im peripheren Blut zirkulierenden Melanomzellen durch den 9.2.27-Antikörper. Färbemethode war die magnetische Zellseparation (MACS) [63]. Den 9.2.27-positiven Zellen wurde mittels komparativer genomischer Hybridisierung (s. u.) der maligne Ursprung nachgewiesen. Bei der Nachbeobachtung dieser Patienten zeigte sich außerdem ein erhöhtes Sterberisiko der Patienten mit 9.2.27-positiven Zellen [63].

Eine induzierte humorale anti-MCSP-Immunität löst einen apoptotischen Zelltod von MCSP-exprimierenden Zellen aus [61] und verlängerte die Überlebenszeit der Patienten bei Pluschke et al [62].

CD 63-Antigen

CD63 ist ein zytoplasmatisches Antigen u.a. von Melanomzellen und wird mit dem Antikörper NK1/C3 (im Folgenden „C3“ genannt“) angefärbt. C3 ist mit 86-100% sehr sensitiv [53,58] aber wenig spezifisch. Er färbt auch Histiozyten, dendritische Zellen, Mastzellen und Eosinophile [53] sowie Nävi [54,58,64], unterscheidet also nicht zwischen benignen und malignen melanozytären Läsionen.

Derzeit werden vor allem S100, HMB45 und Melan A verwendet und aufgrund ihrer unterschiedlichen Spezifitäten und Sensitivitäten miteinander kombiniert, um die Detektionsrate von Melanomzellen zu erhöhen.

Aufarbeitung des Lymphknotens

Verschiedene Studien zeigten, dass die Detektionsrate einer Mikrometastasierung im WLK mit der Zahl der untersuchten Schnittstufen und Schnitte zunimmt [31,52,65]. Gerade bei vorhandenen Submikrometastasen ist vorstellbar, dass vielleicht zufällig genau die Ausschnitte des WLK unter das Mikroskop gelangen, die keine Tumorzellen enthalten. So zeigten z.B. van Diest et al [52], dass, um eine Ansammlung von 10 Tumorzellen sicher zu diagnostizieren, 139 Schnitte durch einen durchschnittlich großen Lymphknoten erforderlich sind. Dies ist aus Zeit- und Kostengründen in der Praxis nicht realisierbar, sodass letzten Endes ein Kompromiss gefunden werden muss. So haben verschiedene Arbeitsgruppen Techniken zur Aufarbeitung des Wächterlymphknotens getestet und befundet [31,32,51,65]. Scoyler et al von der *Sydney Melanoma Unit* beschreiben z.B. ein Verfahren, in dem vier Gewebescheiben entnommen werden und von jeder Gewebescheibe jeweils vier Schnitte angefertigt wurden. Schnitt 1 und 4 wurden jeweils mit HE gefärbt, Schnitt 2 mit anti-S100 und Schnitt 3 mit HMB45 [32]. Dies könnte als tragbarer Kompromiss in der Klärung der „Schnittzahl“-Frage angesehen werden [40].

In anderen Zentren wurde der WLK halbiert und die eine Hälfte histopathologisch untersucht, während man an der anderen Hälfte Untersuchungen wie eine RT-PCR [50,66,67,68] durchführte. Hierbei können aus einem homogenisierten WLK mRNA-Sequenzen von Melan A/MART-1 und gp100 nachgewiesen werden. Diese Methode ist sehr sensitiv, so kann eine einzelne Tumorzelle zwischen 10^6 bis 10^7 Zellen identifiziert werden. Großer Nachteil ist jedoch die mangelnde Spezifität (zum einen durch Kontamination, zum anderen können außer Melanomzellen auch Melanophagen, intranodale Nerven und benigne Nävuszellen die entsprechenden Markergene exprimieren [31,52,58,59,69]. Des Weiteren ist die Methode zwar quantitativ, sie zählt aber nicht, wie gewünscht, Zellen, sondern Transkriptzahlen/Nukleinsäuren, die entweder durch einige wenige hochexprimierende Zellen oder ganz viele niedrigexprimierende Zellen verursacht werden können [41].

Seit einiger Zeit steht ein neuer immunzytologischer Ansatz zur Detektion okkult disseminierter Melanomzellen zur Verfügung, die Lymphozyten-Disaggregations-Immunzytologie (LDI) [41,59]. Bei dieser Methode wird die zweite, unfixierte Hälfte des WLK durch standardisierte mechanische Disaggregation in eine Einzelzellsuspension überführt. Nach einer Dichtegradientenzentrifugation zur Anreicherung der Tumorzellfraktion wird die Zellsuspension auf beschichtete Objektträger aufgetragen (2 Mio. Zellen pro Objektträger). Anschließend führt man eine immunzytologische Färbung mit HMB45 und Melan A durch (vgl. Abb.1.3 [70]).

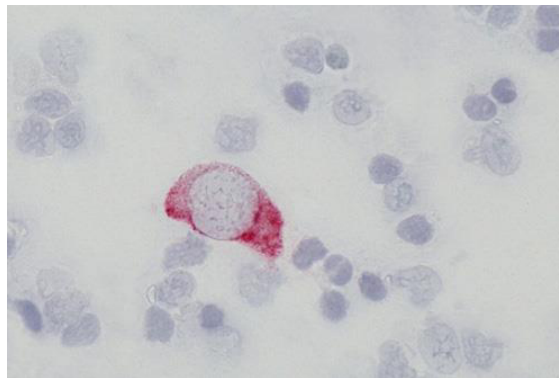


Abb.1.3: Lymphozyten-Disaggregations-Immunzytologie. Zu sehen ist eine große, rote HMB45⁺ Zelle im Vergleich zu den restlichen in der Probe enthaltenen (blauen) kleineren Lymphozyten [70].

Durch die Angabe positiver Zellen pro 1 Mio. Lymphozyten (MZD= Melanomzellendichte oder DCCD= *disseminated cancer cells density*) kann so erstmals ganz einfach die Tumorlast quantifiziert werden. Die Sensitivität dieser Methode wird zum einen dadurch unterstützt, dass die Anzahl HMB45-positiver Zellen mit dem histopathologischen Ergebnis, der Tumordicke und dem Ulzerationsstatus des Primärtumors sowie dem Todesrisiko korrelierte [41]. Zum anderen wurden die HMB45-positiven Zellen anschließend mittels komparativer genomischer Hybridisierung genomisch analysiert. Diese auf der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) beruhende Methode kann Depletionen (DNA-Verlust) oder Amplifikationen (DNA-Gewinn) von Tumoren mithilfe von Fluoreszenzsignalen sichtbar machen [71]. Beim Großteil der HMB45-positiven Proben konnten genomische Aberrationen nachgewiesen werden, die typischerweise beim Primärmelanom beschrieben wurden (z.B. Amplifikation von Chromosom 1q und 6p) [41,59,58].

Nachteile der LDI sind die eingeschränkte morphologische Beurteilbarkeit der Zellen und die Unmöglichkeit ihrer Lokalisierung im Lymphknoten, Vorteile hingegen die hohe Sensitivität bei relativ geringem Arbeitsaufwand und vor allem die Möglichkeit der einfachen Quantifizierung der Tumorlast und der genomischen Charakterisierung der Zellen. Tab.1.2 fasst die Vor- und Nachteile der jeweiligen Methoden zusammen.

	Vorteile	Nachteile
Histologie (Histopathologie/ Immunhistologie)	hohe Spezifität morphologisches Korrelat	hohe Sensitivität nur bei sehr hohem Arbeits- und Zeitaufwand (Anzahl der Schnitte) keine Quantifizierung der Tumorlast subjektive Methode
PCR-basierte Methoden	hohe Sensitivität	mangelnde Spezifität es werden nicht Zellen, sondern Transkriptprodukte quantifiziert
Immunzytologie (LDI)	hohe Sensitivität bei relativ geringem Zeitaufwand einfache Quantifizierung der Tumorlast (MZD=DCCD) genomische Charakterisierung der Zellen möglich	eingeschränkte morphologische Beurteilbarkeit der Zellen keine Lokalisationsangabe innerhalb des Lymphknotens möglich subjektive Methode

Tab.1.2: Vergleich diagnostischer Möglichkeiten

1.3 Studienziel

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, den o.g. Ansprüchen zu genügen und eine Methode zu entwickeln, die in Kombination mit histopathologischen/immunhistologischen und immunzytologischen Untersuchungen eine optimale Diagnostik des WLK ermöglicht. Die Grundidee bestand darin, den WLK als Einzelzellsuspension wie bei der LDI mit verschiedenen Antikörpern zu färben und anschließend mittels Durchflusszytometrie auf das Vorhandensein von Melanomzellen

zu untersuchen. Die Durchflusszytometrie als schnelle, wenig arbeitsaufwändige und objektive Messmethode war dabei ausschlaggebend.

Erstes Ziel war die Etablierung einer möglichst einfachen Färbung mit einem bisher nicht zur Diagnostik verwendeten melanomzellspezifischen Antikörper (MCSP bzw. 9.2.27) und einer Auswertestrategie im Durchflusszytometer. Hierbei sollte die Anzahl 9.2.27⁺ Melanomzellen pro Million Lymphozyten ermittelt und mit der MZD der von Ulmer et al durchgeführten Immunzytologie mit dem HMB45 [41] verglichen werden. Im zweiten Schritt sollte das Färbeprotokoll um zwei weitere melanomzellspezifische Antikörper ergänzt werden (beteb, C3), um Spezifität und Sensitivität der Methode zu verbessern. Schlussendlich stellte sich die Frage, ob die Durchflusszytometrie als diagnostische Möglichkeit zur Detektion von Mikrometastasen im WLK praktikabel ist und welche Auswertestrategie und Antikörper-Wahl (in Bezug auf Ulmers LDI) das genaueste Ergebnis bringt.

2 Proben und Materialien

2.1 Herkunft der Proben und Bestimmung der Melanomzelldichte

Bei den untersuchten Proben handelt es sich um WLK von volljährigen Patienten mit malignem Melanom aller Melanomtypen, die an der Universitätshautklinik Tübingen operiert wurden. Präoperativ wurden bei allen Patienten mittels körperlicher und sonographischer Untersuchung der regionalen Lymphknoten und des Abdomens, Röntgen des Thorax und Computertomographie des Schädels Makrometastasen ausgeschlossen. Das positive Votum der Ethikkommission lag vor und die Patienten waren über den Eingriff und die Verwendung des Materials zu Forschungszwecken aufgeklärt und damit einverstanden. Zur Entwicklung der Färb- und Messmethode wurden von März bis Juli 2012 16 Patientenproben verwendet. Im Zeitraum von Juli 2012 bis Januar 2014 wurden insgesamt 138 Lymphknoten von 109 Patienten untersucht. Die Wächterlymphknoten werden routinediagnostisch bei allen Patienten mit Primärtumoren der Dicke ≥ 1 mm entnommen und auf Metastasen hin untersucht. Dazu wird die eine Hälfte des WLK nach der Standard-Histopathologie in HE-Färbung und immunhistochemischer Schnittfärbung mikroskopisch auf Tumorzellen untersucht.

Die andere Hälfte wird mechanisch disaggregiert, mit dem HMB45 gefärbt und mikroskopisch auf Tumorzellen untersucht [41,59]. Es werden immer zwei Millionen Zellen ausgezählt. Dies geschieht ohne Wissen des klinischen Stadiums der Patienten. Ob eine Zelle Tumorzelle ist, wird nach verschiedenen Kriterien entschieden (u.a. HMB45-Positivität, Größe, Granularität). Man unterscheidet zwischen sicheren und wahrscheinlichen Tumorzellen. Nur wenn mindestens eine sichere Tumorzelle dabei ist, werden auch die wahrscheinlichen als positiv bewertet. Festgehalten wird am Ende die MZD, d.h. die Anzahl der Melanomzellen pro Million ausgezählter Zellen.

Wenn nach der Routineuntersuchung noch disaggregiertes, ungefärbtes Material übrig war, wurde es für die vorliegende wissenschaftliche Arbeit verwendet. Dies geschah im Unwissen über den klinischen Status des Patienten, den histopathologischen Status und die ausgezählte MZD der Probe.

2.2 Materialien

2.2.1 Allgemeine Geräte

Gerät	Hersteller
Durchflusszytometer C6 Accuri	Becton Dickinson
Gefrierschrank (-20°C)	Liebherr
Kühlschrank (+4°C)	Liebherr
Verstellbare Pipetten (10, 20, 100, 200, 1000µl)	Eppendorf
Accujet Pipette „accujet pro“	Brand
Zentrifuge Multifuge 3 S-6	Heraeus
Vortexer: REAX top	Heidolph

Tab.2.1: Allgemeine Geräte

2.2.2 Verbrauchsmaterialien

Gerät	Hersteller
Rundboden-Röhrchen, 5ml	Becton Dickinson
Falcons cellstar Tubes 15ml, 50ml	Greiner Bio-One
Pipettenspitzen blau 1000µl	Eppendorf
Pipettenspitzen gelb 100µl	Eppendorf
Pipettenspitzen weiß 10µl	Eppendorf
Safe-Lock-Tubes 0,5ml	Eppendorf
Accujet-Pipettenspitzen 5ml, 10ml	Costar
Filter: Filcons non sterile 200 µm	BD
Spritzen 20ml	Braun

Tab.2.2: Verbrauchsmaterialien

2.2.3 Allgemeine Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Phosphat Buffered Saline (PBS)	PAA
Paraformaldehyd, Pulver	SIGMA
Bovines Serum Albumin (BSA)	SIGMA
Dulbecco's Phosphat Buffered Saline (DPBS)	Lonza
Rabbit serum Cat: 10510	Invitrogen
Cleaning solution	Becton Dickinson
Extended cell flow clean	Becton Dickinson
Decontamination fluid	Becton Dickinson
8E Permeabilisierungsgenz	Zur Verfügung gestellt von Elaine Coustan-Smith, Dept.of Pediatrics, National University of Singapore
Aqua dest.	

Tab.2.3: Allgemeine Chemikalien

2.2.4 Stammlösungen

2.2.4.1 PBSA (Phosphat Buffered Saline (PBS) + Bovines Serum Albumin (BSA))

1,76 l Aqua dest.

+ 40 ml Na⁺-Azid 10% (in Aqua dest.)

+ 4 g BSA

+ 200ml 10 x DPBS

Ca. 3 h bei Raumtemperatur rühren. Lagerung: lichtgeschützt bei Raumtemperatur

2.2.4.2 PFA (Paraformaldehyd)

4%ige PFA-Lösung:

2g pulverisiertes PFA in 50 ml PBS gelöst bei 65°C

0,5%ige PFA-Lösung:

35 ml PBS + 4 ml 4%iges PFA → 0,5%ige PFA-Lösung

Lagerung: bei +4°C im Kühlschrank

2.2.5 Konjugierte monoklonale Antikörper (mAB), Amine Reactive Dyes (ARD), Nucleic Acid Stains (NAS)

Fluoreszenzmarkierte Antikörper	Hersteller	Material-Nr. (Charge-Nr.) [Cat.No.]	Klon
CD45-FITC	Becton Dickinson	345808 (3213924)	2D1
MCSP-PE	Becton Dickinson	562415 (3144834)	9.2.27
MCSP-Ax647	Becton Dickinson	562414 (3228944)	9.2.27
Beteb-PE	Becton Dickinson	*	Beteb
NK1/C3-PerCP	Becton Dickinson	*	NK1/C3
Alexa Fluor®680-ARD	Life Technologies	[A-20008]	
SYTO®16-NAS	Life Technologies	[S7578]	

Tab.2.4: Verwendete Antikörper und Fluorochrome

* dieser Antikörper wurde extra von BD für unser Projekt konjugiert und ist bisher nicht im Handel erhältlich

2.2.6 Beads

Name	Hersteller	Material-Nr. (Cat.No.)
Anti-Mouse Ig, κ /Negative Control	Becton Dickinson	552843
Compensation Particles Set		
ArC™Amine Reactive Compensation	Life Technologies	(A-10346)
Bead Kit (für Ax680)		

Tab.2.5: Verwendete Beads

2.2.7 EDV-Programme:

Programm	Hersteller
FCS Express	De Novo
BD Accuri™ C6 Software	Becton Dickinson
JMP 11.1.1	SAS Institute

Tab.2.6: Verwendete EDV-Programme

3 Methoden

3.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie (*flow cytometry*, FC) untersucht man Zellen bzw. andere Partikel auf Größe, Granularität, die Expression von Antigenen und andere Zelleigenschaften [72,73]. Grundlage der Untersuchung sind Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften von Zellen.

Aus einer B-Zelle kann man einen definierten monoklonalen Antikörperklon ableiten, der eine hoch spezifische Affinität zu einem Antigen an der Zelloberfläche oder im Zellinneren hat [74]. Für die durchflusszytometrische Analyse konjugiert man diese monoklonalen Antikörper mit Fluoreszenzfarbstoffen. Werden diese nun zu einer Zellsuspension gegeben, korreliert bei der späteren Messung die Intensität des Farbstoffes pro Zelle mit der Expression des Antigens auf dieser Zelle [75].

Vorteile gegenüber einem Fluoreszenzmikroskop sind die Analysegeschwindigkeit, objektive Quantifizierung, hohe Empfindlichkeit und die Möglichkeit der Bildung von multiparametrischen Korrelationen [72].

3.1.1 Aufbau des Messgerätes und Messtechnik

Die in einem Röhrchen als Einzelzellsuspension vorliegende gefärbte Probe wird über eine Stahlkapillare durch Überdruck in die Messküvette eingeführt. Beim Eintreten in diese werden die Zellen durch die sie umgebende Trägerflüssigkeit stark beschleunigt, wodurch sich Aggregate auftrennen und die Zellen aneinandergereiht sequentiell den Analysepunkt erreichen (hydrodynamische Fokussierung). Am Analysepunkt werden Streulicht und Fluoreszenz jedes einzelnen Partikels (jeder einzelnen Zelle) gemessen [72].

Als Lichtstreuung bezeichnet man einen physikalischen Prozess, bei dem ein Partikel (eine Zelle) mit einem einfallenden Lichtstrahl (Laserstrahl) reagiert. Dabei wird nur die Richtung, nicht die Wellenlänge des einfallenden Lichts verändert. Die Lichtstreuung wird durch die Größe der Zelle, die Struktur der Zellmembran und durch intrazelluläre Bestandteile beeinflusst. Der größte Teil des Lichts wird nur um wenige Grad abgelenkt und kann somit in der Achse des einfallenden Lichtstrahls gemessen werden. Daher nennt man es Vorwärtsstreulicht (*forward light scatter* = FSC). Es ist ein Maß für die Zellgröße und den Brechungsindex [72]. Das im rechten Winkel zum einfallenden Lichtstrahl gestreute Licht nennt man Seitwärtsstreulicht (*side scatter* = SSC), es ist im Wesentlichen ein Maß für die Größe, Absorption und Granularität einer Zelle, d.h. die Menge an Strukturen (z.B. Melanin, Lysosomen) innerhalb einer Zelle. Mithilfe der Lichtstreuung (FSC, SSC) können also Größe und Granularität der Zelle bestimmt werden und so z.B. „echte Zellen“ (in unserem Fall z.B. Lymphozyten, Melanomzellen) von Erythrozyten und „Debris“ unterschieden werden (Zellreste, Schmutzpartikel).

Weitere Eigenschaften der Zelle kann man mithilfe ihrer Fluoreszenz bestimmen. Unter Fluoreszenz versteht man das durch Strahlung angeregte sofortige Leuchten eines Stoffes. Eine fluoreszierende Verbindung kann über einen für sie charakteristischen Wellenlängenbereich angeregt werden, d.h. Lichtenergie absorbieren. Dieser Wellenlängenbereich ergibt das Absorptionsspektrum. Bei der Aufnahme der Lichtenergie werden die Elektronen in ein höheres Energieniveau angehoben und

emittieren beim Rücksprung zum Grundniveau ein Photon. Dieser Strahlungsübergang wird als Fluoreszenz bezeichnet. Das abgestrahlte Licht ist langwelliger (energetisch niedriger) als das absorbierte Licht. Es bildet das Emissionsspektrum [72]. Somit hat jeder fluoreszierende Antikörper ein Absorptions- und ein Emissionsspektrum.

Um die Fluoreszenzfarbstoffe (Fluorochrome) anzuregen, werden in der vorliegenden Arbeit zwei Laser verwendet: rot (640 nm) und blau (488 nm). Für Fluoreszenzmarkierungen sind also alle Farbstoffe geeignet, die von Wellenlängen = 640 nm oder 488 nm angeregt werden. Ihre Absorptionsmaxima sollten, müssen aber nicht bei diesen Werten liegen. Wird ein Farbstoff außerhalb seines Absorptionsmaximums, aber noch innerhalb seines Absorptionsspektrums angeregt, so äußert sich das nicht in einer Änderung der Fluoreszenzfarbe, sondern nur in einer Verminderung der Fluoreszenzintensität [72].

Jede Zelle wird durch beide Laser angeregt. Je nachdem, wieviele mit Fluorochromen konjugierte Antikörper an eine Zelle gebunden sind, strahlt diese mehr oder weniger Licht einer bestimmten Wellenlänge aus. Dieses Licht wird im Gerät durch halbdurchlässige Filter geleitet. Zunächst gelangt es zu einem *longpass*-Filter (LP), der nur Licht ab einer bestimmten Wellenlänge durchlässt (z.B. LP >670nm). Licht mit kleinerer Wellenlänge wird vom Filter reflektiert und zu den *bandpass*-Filtern (BP) weitergeleitet, die nur Licht einer bestimmten Wellenlänge λ durchlassen (z.B. BP 533/30 nm, d.h. 533 ± 15 nm, also $\lambda = 518-548$ nm).

Dieses Licht wird anschließend detektiert und in elektronische Signale umgewandelt, die dann an den an das Gerät angeschlossenen Computer zur Verarbeitung weitergeleitet werden. Mit dem C6 Accuri von BD (im Folgenden Accuri genannt) können gleichzeitig vier verschiedene Fluorochrome gemessen werden (vgl. Abb.3.1 [76]).

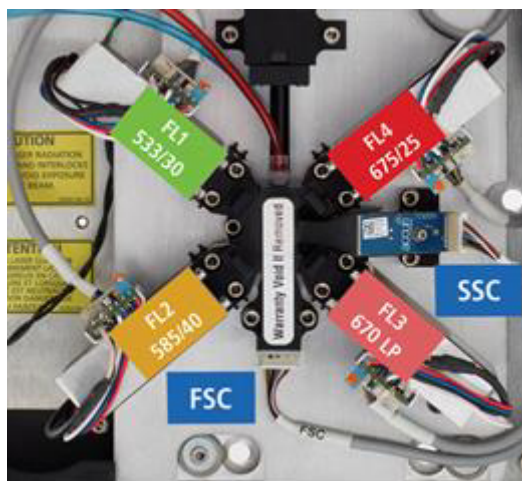


Abb.3.1 Laser und Detektoren des Accuri. Je ein Detektor (FL1, FL2, FL3, FL4) detektiert Licht unterschiedlicher Wellenlängen. FL1, 2 und 4 sind *bandpass*-Filter, FL3 ist ein *longpass*-Filter vorgeschaltet, der Licht mit einer Wellenlänge $\lambda > 670$ nm durchlässt [76].

Die von uns verwendeten Fluorochrome werden also je nach Absorptionsspektrum entweder vom blauen oder vom roten Laser angeregt, emittieren Licht einer bestimmten Wellenlänge und werden dann vom jeweiligen Detektor erfasst. Eine Übersicht der verwendeten Fluorochrome und ihrer Absorptions- und Emissionsmaxima bieten folgende Tabellen:

Blauer Laser (488 nm)

Fluorochrom	Absorptionsmaximum	Emissionsmaximum	Detektor
FITC (Fluoresceinisothyocyanat)	494 nm	520 nm	FL1
PE (Phycoerythrin)	496 nm	578 nm	FL2
PerCP (Peridinin-Chlorophyll-Protein)	490 nm	675 nm	FL3

Tab.3.1: Blauer Laser

Roter Laser (640 nm)

Fluorochrom	Absorptionsmaximum	Emissionsmaximum	Detektor
Alexa Fluor 647 (Ax647)	650 nm	668 nm	FL4
Alexa Fluor 680 (Ax680)	684 nm	707 nm	FL4

Tab.3.2: Roter Laser

3.1.2 Auswertung

Neben beiden Scatterparametern (FSC, SSC) werden von jedem „event“ (= Zelle, Partikel) Werte für Fluoreszenzen in verschiedenen Kanälen gemessen. Die Auswertung der vom Accuri gemessenen Daten erfolgte am Computer mit dem Programm FCS Express. In diesem lassen wir uns die gemessenen Zellen in zweidimensionalen Diagrammen anzeigen, mit je einem Parameter auf der x- bzw. y-Achse. Eine im Durchflusszytometer gemessene Zelle ist also entweder positiv oder negativ für den jeweiligen Parameter auf der x- und auf der y-Achse, man kann sich das Schaubild grob in Quadranten aufgeteilt vorstellen. Der obere rechte Quadrant enthält für beide Eigenschaften positive Zellen, der untere linke Quadrant für beide Eigenschaften negative Zellen. Die Überschrift des jeweiligen Diagrammes zeigt an, welche Population in diesem abgebildet ist. So lassen sich graphisch verschiedene Populationen abgrenzen, die man einzeln markieren und gesondert anhand weiterer Parameter charakterisieren kann. Diesen Vorgang bezeichnet man als „gating“, nach und nach entsteht die sog. Gating-Hierarchie [77,78] (s.Abb. 3.5). Ausgewertet wird dann die Anzahl der Zellen in diesen Subpopulationen in Prozent der Gesamtzellzahl oder einer in der Hierarchie höher gelegenen Zellpopulation. Ebenfalls möglich ist die Angabe der absoluten Zellzahl.

Bei der Darstellung der einzelnen Populationen kann man zwischen verschiedenen „plot types“ wählen. In unserer Arbeit verwendeten wir wegen der guten Übersichtlichkeit und Abgrenzbarkeit von Populationen den „contour plot“. Dieser stellt die Daten als Linien dar, ähnlich wie in topographischen Landkarten. Die Struktur bzw. Farbe der Linien korreliert mit der Verteilung und Dichte an Zellen oder Partikeln (Dichte je nach Farbe der Linien: lila = höchste Dichte > blau > grün > gelb > rot > einzelne schwarze Punkte = niedrigste Dichte).

Stellt man sich eine Zellpopulation als „Berg“ vor, sind die zentral liegenden, in unserer Auswertung lilafarbenen und blauen Linien gleichzusetzen mit einer hohen Dichte an Zellen oder eben der „Spitze des Berges“, während weiter außen liegende grüne, dann gelbe und rote Konturen immer „tiefer“ liegende Strukturen des „Berges“ darstellen, d.h. die Dichte an Zellen nicht so hoch ist (vgl. Abb.3.2).

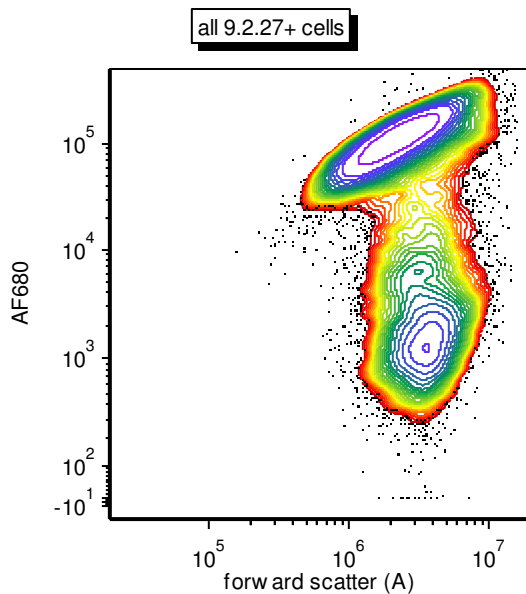


Abb.3.2 Contour plot. So sind in diesem Schaubild zwei „Berge“ (Zellpopulationen) aller 9.2.27⁺ events zu sehen, einerseits die Ax680⁺ (rechter oberer Quadrant) und andererseits die Ax680⁻ (rechter unterer Quadrant) events. Die höchste Dichte an Ax680⁺ events findet man hier innerhalb der blauen Kontur.

3.1.3 Kompensation

Bei der Wahl der verschiedenen Fluorochrome ist darauf zu achten, dass die Emissionsspektren der einzelnen Farbstoffe möglichst klar voneinander getrennt sind. Dennoch ist es möglich, dass sich die Emissionsspektren der verschiedenen Fluorochrome teilweise überschneiden, da das Emissionsmaximum des einen in das Emissionsspektrum eines anderen Fluorochroms hineinragen kann. Dieses primäre Messergebnis ergibt daher einen zu hohen Wert und muss durch eine Kompensation ausgeglichen werden [79]. Dazu benutzt man sog. *beads*, Kunststoffpartikel, die im Vergleich zu normalen Zellen konstantere Eigenschaften bieten, z.B. hinsichtlich der Fluoreszenzintensität [75,80] (vgl. 2.2.6). Die *beads* werden jeweils mit nur einem Farbstoff gefärbt und gemessen. Jeder Farbstoff ist nicht nur in dem eigentlich für ihn vorgesehenen Kanal messbar (z.B. FITC in FL1), sondern zu gewissen Anteilen auch in den anderen Kanälen. Mithilfe der *beads* weiß man, wie stark jeder Farbstoff in die anderen Kanäle strahlt [79]. Dies kann in Prozent des gesamt gemessenen Signals

ausgerechnet und vom Gesamtsignal abgezogen werden. Die so erstellte Matrix wendet man dann auf alle Messungen an und kann so den Messfehler ausgleichen [78].

3.2 Untersuchung der im Lymphknoten enthaltenen Zellen

Das nach der Routinediagnostik als Zellsuspension übrig gebliebene Material (Lagerung in PBS: 1 Million Zellen pro ml PBS) wurde mithilfe des Durchflusszytometers ebenfalls auf Melanomzellen untersucht.

Zu Beginn des Projektes bestand das Problem, dass das übrig gebliebene Material in den Falcon-Tubes stark ausflockte und filtriert werden musste. Bei dieser Prozedur gingen sehr viele Zellen verloren, sodass wir nach einigen Versuchen dazu übergingen, das übrige Material direkt nach der Routinediagnostik (LDI) mit 0,5%iger PFA-Lösung zu fixieren. Danach wurde es bis zur Weiterverwendung im Kühlschrank gelagert. Die Fixierung verbesserte die Verklumpung deutlich und schenkte uns die Möglichkeit einer größeren Zeitspanne bis zum Beginn der Färbung. Es wurde dazu immer genau die doppelte Menge PFA der Menge der Zellsuspension genommen (d.h. z.B. 2 ml 0,5%iges PFA auf 1 ml Zellsuspension). Zur Färbung wäscht man zunächst das PFA folgendermaßen hinaus: Probe einmal zentrifugieren (Modus: relative Zentrifugalbeschleunigung (RZB) 450, Bremse 9; Dauer: je nach Größe der Probe: Rundboden-Röhrchen: drei Minuten; 15 ml-Falcon-Tube: fünf Minuten, 50 ml-Falcon-Tube: zehn Minuten), den Überstand abkippen, resuspendieren und die Suspension je nach Anzahl der geplanten Färbungen auf verschiedene Rundboden-Röhrchen aufteilen, jedes Röhrchen mit PBSA auffüllen, drei Minuten zentrifugieren und den Überstand abkippen. Resuspendieren, mit PBSA auffüllen und erneut zentrifugieren, den Überstand abkippen und resuspendieren. Diese Prozedur noch zweimal wiederholen, bis die Zellen so vorliegen, wie man sie für die Färbung benötigt. Ist es nicht möglich, die Zellen am selben Tag zu färben, kann man die Probe nach 2-4h Fixation im Kühlschrank einmal zentrifugieren (Modus und Dauer wie oben), den Überstand abkippen, resuspendieren und die Probe für mindestens 1-2 Tage im Kühlschrank aufbewahren, bis man nach den o.g. Waschsritten die Färbung durchführen kann.

3.2.1 Färben der Zellen

3.2.1.1 Einfache, extrazelluläre Färbung

Zu Beginn des Projekts führten wir eine einfache Färbung durch, bei der die Probe nur mit zwei Antikörpern und einem *amine reactive dye* (ARD) gefärbt wurde:

- sCD45: färbt Lymphozyten
- s9.2.27: färbt Melanomzellen
- sAx680-ARD: färbt tote Zellen

Das „s“ vor dem jeweiligen Antikörpernamen steht für „*surface*“ = Oberfläche, da der Antikörper gegen ein Antigen auf der Zelloberfläche gerichtet ist.

Vor der Färbung entnimmt man jeder Probe ein Aliquot, welches ungefärbt bleibt und als Negativkontrolle benutzt wird.

Lebend-Tot-Färbung

Sie wird mit dem ARD Ax680 durchgeführt. Dies ist ein Farbstoff, der nicht, wie sonst, an einen monoklonalen Antikörper gebunden ist, sondern an eine reaktive Succinimidyl-Gruppe, welche mit freien NH₂-Gruppen auf der Zelloberfläche Bindungen eingeht. Ist eine Zelle vital, wird ihre Oberfläche durch Ax680 markiert. Tote Zellen haben eine permeable Zellwand, sodass Ax680 auch intrazellulär an viele Moleküle bindet. Im Durchflusszytometer sind diese Zellen also deutlicher Ax680⁺ und können so von den anderen, vitalen Zellen abgegrenzt werden [81]. Die Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen ist insofern wichtig, als dass tote Zellen unspezifische Bindungen eingehen und daher auch zu falsch positiven Ergebnissen führen können [81].

Die Lebend-Tot-Färbung wird folgendermaßen pipettiert:

1000 µl PBS

+ 0,1 µl Ax680- Succinimidylester (Konzentration 1:2) auf die Probe

Sofort stark mischen, da die Färbung nahezu exponentiell verläuft. Daraufhin 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren und dreimal nach folgendem Schema waschen:

- Auffüllen des Rundboden-Röhrchens mit PBSA
- 3 Minuten abzentrifugieren mit RZB 450
- Überstand vorsichtig abkippen

Färbung mit CD45 und 9.2.27

Anschließend wird *rabbit serum* zu allen Proben pipettiert. Das IgG im Serum geht unspezifische Bindungen mit Antigenen auf den Zellen ein. So kann verhindert werden, dass hinzugegebene markierte Antikörper unspezifisch an die Zellen binden [82,83]. Man pipettiert 10µl *rabbit serum* auf jedes Rundboden-Röhrchen, inkubiert für 10 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur und gibt dann die anderen extrazellulären Antikörper zur Unterscheidung zwischen Lymphozyten und möglichen Melanomzellen hinzu: 10µl CD45 und 2,5µl 9.2.27.

CD45 wird auch als Leukocyte Common Antigen bezeichnet und ist ein Mitglied der Protein Tyrosin-Phosphatase-Familie. Es wird auf allen humanen Leukozyten inklusive Lymphozyten exprimiert [84]. Der Anti-CD45-Antikörper (im Folgenden der Einfachheit halber CD45 genannt) färbt in unseren Proben die Lymphozyten zur Differenzierung von möglichen Melanomzellen an.

Nach 10 Minuten Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur wird wieder nach o.g. Schema gewaschen (s. Lebend-Tot-Färbung) und die Zellen sind messbereit.

Je nachdem, wie lange es dauert, bis man die Probe dann tatsächlich am Durchflusszytometer misst, kann auf unfixierte Proben noch bis zu 1000µl 0,5%iges PFA pipettiert werden, was ein erneutes Ausflocken verhindert.

3.2.1.2 Intrazelluläre Färbung

Später wurde parallel zur einfachen extrazellulären Färbung noch eine komplexere Färbung mit insgesamt vier verschiedenen Antikörpern durchgeführt: sCD45 (färbt Lymphozyten), s9.2.27, cbeteb und cC3 (färben Melanomzellen). Diese zweite, komplexere Färbung wird im Folgenden der Einfachheit halber „intrazelluläre Färbung“ genannt (auch wenn auch zwei extrazellulär bindende Antikörper Teil der Färbung sind), da beteb und C3 intrazellulär („c“ für „*cytoplasmatic*“) binden. Die einfache Färbung des Anfangs nennen wir „extrazelluläre Färbung“.

Färbung mit CD45 und 9.2.27

Man beginnt wieder mit der Gabe von 10µl *rabbit serum* und inkubiert die Probe für 10 Minuten. Anschließend gibt man wieder 10µl CD45 und 2,5µl 9.2.27 hinzu. Nach 10 Minuten Inkubation wird dreimal nach o.g. Schema gewaschen.

Färbung mit beteb und C3

Für die intrazelluläre Färbung mit beteb und C3 müssen die Zellen zunächst permeabilisiert werden. Dazu gibt man das Permeabilisierungsreagenz 8E zur Probe und lässt 40 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubieren. Anschließend wird einmal mit PBSA gewaschen und ein Aliquot für die Intrazellulär-Negativ-Kontrolle (noch nicht mit beteb und C3, aber bereits mit CD45 und 9.2.27 gefärbt) abgenommen. Zum Rest der Probe gibt man 10µl *rabbit serum*, inkubiert für 10 Minuten und pipettiert anschließend 10µl C3 und 5µl beteb hinzu. Nach 10 Minuten erneuter Inkubation wird die Probe wieder dreimal mit PBSA gewaschen und ist dann messbereit. Die unterschiedlichen Mengenangaben der jeweiligen Antikörper wurden zu Beginn des Projektes mithilfe von Titrationsreihen an Melanomzellkulturen ermittelt und stellen jeweils die mindestens benötigte Menge des Antikörpers für eine im Durchflusszytometer gut sichtbare Färbung dar.

3.2.1.3 Vergleich beider Färbestrategien

Zum einen werden die Antikörper je nach Färbestrategie mit unterschiedlichen Fluorchromen konjugiert (vgl. Tab.3.3):

Detektor	Extrazelluläre Färbung	Intrazelluläre Färbung
FL1	sCD45-FITC	<ul style="list-style-type: none">• sCD45-FITC• (Syto16® s. u.)
FL2	s9.2.27-PE	cbeteb-PE
FL3	Frei	cC3-PerCP
FL4	<i>live-dead-sAx 680®</i>	s9.2.27-Ax647

Tab.3.3: Konjugation der Fluorochrome

Zum anderen kann aufgrund der begrenzten Kapazität des Accuri bei der intrazellulären Färbestrategie keine Lebend-Tot-Färbung in einem eigenen, fünften Kanal erfolgen,

sodass wir lediglich eine Debris-Ausschluss-Färbung mit dem Nukleinsäure-Farbstoff Syto16 machen. Dieser wird ebenfalls im FL1-Kanal detektiert (s. 3.2.4).

Die zusätzliche intrazelluläre Färbung erfordert einen höheren Zeitaufwand, da die Probe zunächst 40 Minuten permeabilisiert werden muss, bevor sie mit den intrazellulären Antikörpern gefärbt werden kann.

3.2.2 Messung am Durchflusszytometer

Vor jeder Messung müssen die Rundboden-Röhrchen einmal gevortext oder kräftig resuspendiert werden, um Verklumpungen zu lösen, die durch das Stehen der Probe entstehen können. Bei starker Verklumpung kann die Suspension auch in ein neues Rundboden-Röhrchen filtriert werden.

Für eine optimale Messgenauigkeit darf die Akquisitionsgeschwindigkeit der Probe nicht zu hoch sein. Empfohlen wird eine Höchstgeschwindigkeit von 2.500 *events* pro Sekunde.

Jede fertige Messung wird in einer eigenen *.fcs*-Datei exportiert und mit dem Programm FCS-Express ausgewertet.

3.2.3 Auswertung der extrazellulären Färbung

Das Roh-Diagramm (*plot*) einer jeden Messung besteht aus dem *forward-scatter* (FSC) auf der x-Achse und CD45 auf der y-Achse (s. Abb. 3.3).

Um unbrauchbare Zellen gar nicht erst zu akquirieren, setzen wir auf beiden Achsen Schwellenwerte (*thresholds*). Im *forward-scatter* lag dieser *threshold* bei 30.000, ab dem dann also *events* (= Zellen, Partikel oder Debris) überhaupt erst als gemessene Daten gespeichert werden. *Events*, die direkt an der y-Achse liegen, sind hauptsächlich tote Zellen und deren Zerfallsprodukte oder andere uninteressante kleine Partikel, die nicht in unsere Auswertung mit einfließen sollen.

Zum anderen wurden auf der y-Achse stark CD45⁺ Zellen (= Lymphozyten) nicht mit akquiriert (*threshold* 50.000), da auch diese für die Detektion von Melanomzellen uninteressant sind und der Software des Accuri riesige Datenmengen ersparen. Da davon auszugehen ist, dass der größte Teil in jeder Probe sowieso Lymphozyten sind und somit für unsere Auswertung unerheblich, konnte die Datenmenge durch Setzen der

thresholds für CD45⁺ Lymphozyten reduziert werden. So enthielt jedes Roh-Diagramm ein Akquisitionsgate, in welches jede Probe „hineingemessen“ wurde (s. Abb. 3.4). Mit den darin enthaltenen events rechneten wir weiter und erstellten die Gating-Hierarchie (s. Abb. 3.5).

Um dennoch Rückschlüsse auf die tatsächlich ursprünglich in der Probe enthaltene Zellzahl ziehen zu können, wurden am Ende jeder Messung noch einmal ca. 100.000 *events* ohne dieses Akquisitionsgate gemessen (s. Abb. 3.3) und es konnte so mittels eines Faktors die tatsächliche Zellzahl berechnet werden.

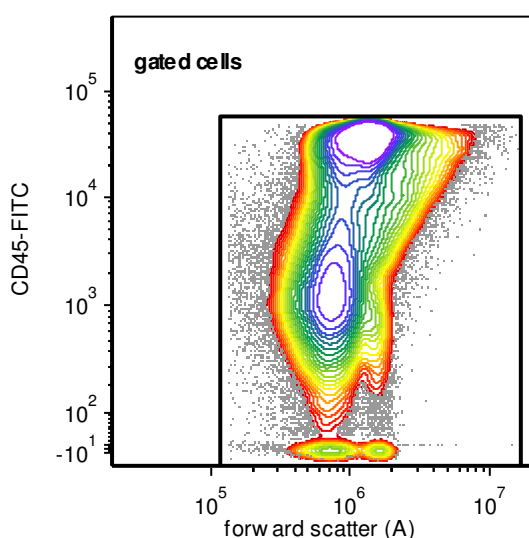


Abb. 3.4 Acquisitions-gate. Bei der Messung der Probe wurden alle außerhalb des rechteckigen Akquisitionsgates liegenden *events* nicht mit aufgezeichnet.

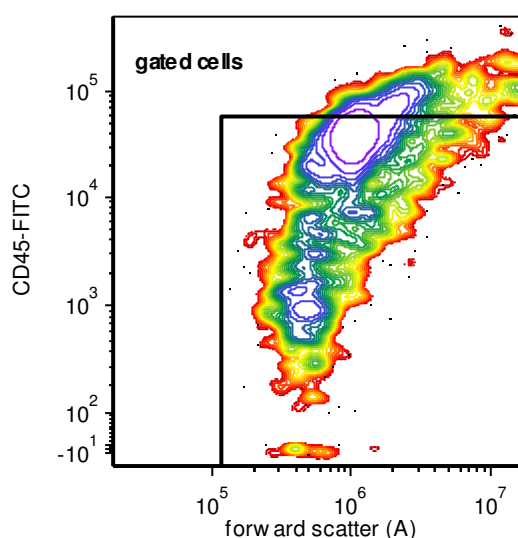


Abb. 3.3 Kontrollgate. Man sieht nun die Messung von 100.000 *events* derselben Probe ohne Berücksichtigung des *Gates*. Ein Teil liegt außerhalb (bei dieser Probe v.a. stark FITC⁺ *events*). Der Anteil aller gemessenen Zellen an den nur im Akquisitionsgate enthaltenen Zellen (stets ≥ 1) ist der sog. correction factor, mit dem die tatsächliche absolute Zellzahl der links gemessenen Probe ermittelt wird (hier 1,149).

Die Auswertung der durchflusszytometrischen Messungen der extrazellulären Färbung erfolgt nach folgender Gating-Hierarchie:

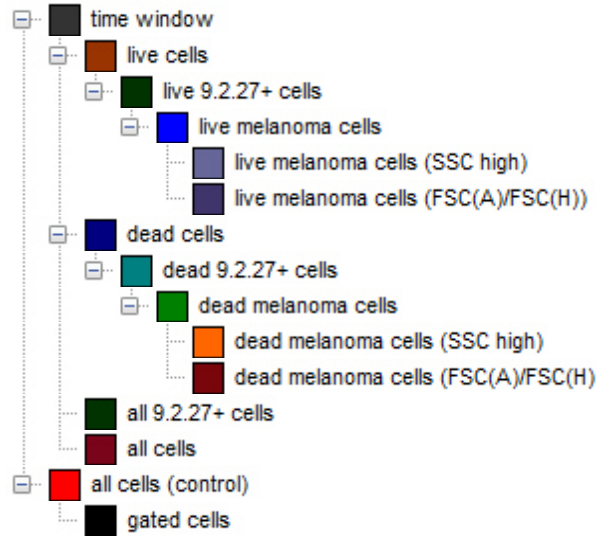


Abb. 3.5: Gating-Hierarchie extrazelluläre Färbung

Zunächst werden im *time window* (Abb. 3.6), das alle in einer bestimmten Zeitspanne gemessenen *events* anzeigt, die Zellen gegatet (= mit eingeschlossen), die regelrecht gemessen wurden. Hier kann man zum Beispiel Zellen, bei deren Messung es zu Laserschwankungen kam, oder Zeitperioden ausschließen, in denen zum Beispiel aufgrund von Verklumpung kein *event* gemessen werden konnte.

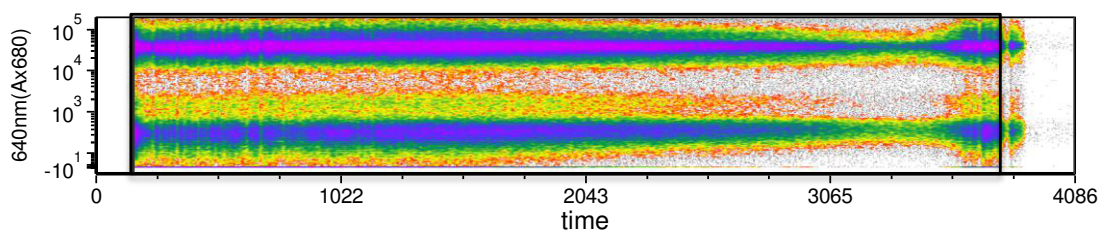


Abb. 3.6: *Time window*: dargestellt sind alle gemessenen Zellen aufgetragen nach einem beliebigen Wert (hier Ax680) gegen die Zeit. Das rechteckige Gate wird um alle regelrecht gemessenen *events* gelegt (*time window cells*).

Im nächsten Schritt gatet man unter den *time window cells* alle „echten“ Zellen und trifft mithilfe der Lebend-Tot-Färbung die Unterscheidung zwischen lebenden und toten. Alle richtigen Zellen (*all cells*) liegen im *forward-scatter* (FSC) auf der x-Achse eher rechts und bilden eine/mehrere weitgehend homogene Population/en. Unter diesen gatet man nun *live cells* und *dead cells* (s. Abb.3.7).

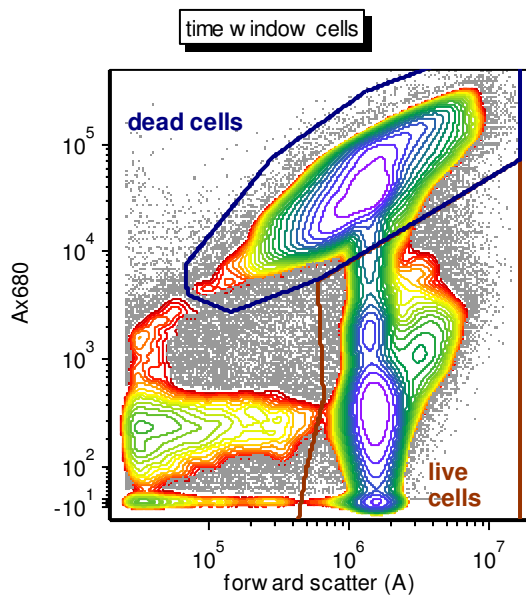


Abb.3.7: Time window cells. Im Schaubild innerhalb der *gates* sind „echte Zellen“ (*all cells*, eher rechts) zu sehen (links davon findet sich Debris).

Die oben liegende Population ist Ax680⁺ (*dead cells*) und die unten liegenden Ax680⁻ (*live cells*).

Beide Populationen lässt man sich dann in je einem *plot* anzeigen, in welchem auf der x-Achse 9.2.27⁺ und auf der y-Achse CD45⁺ Zellen dargestellt sind:

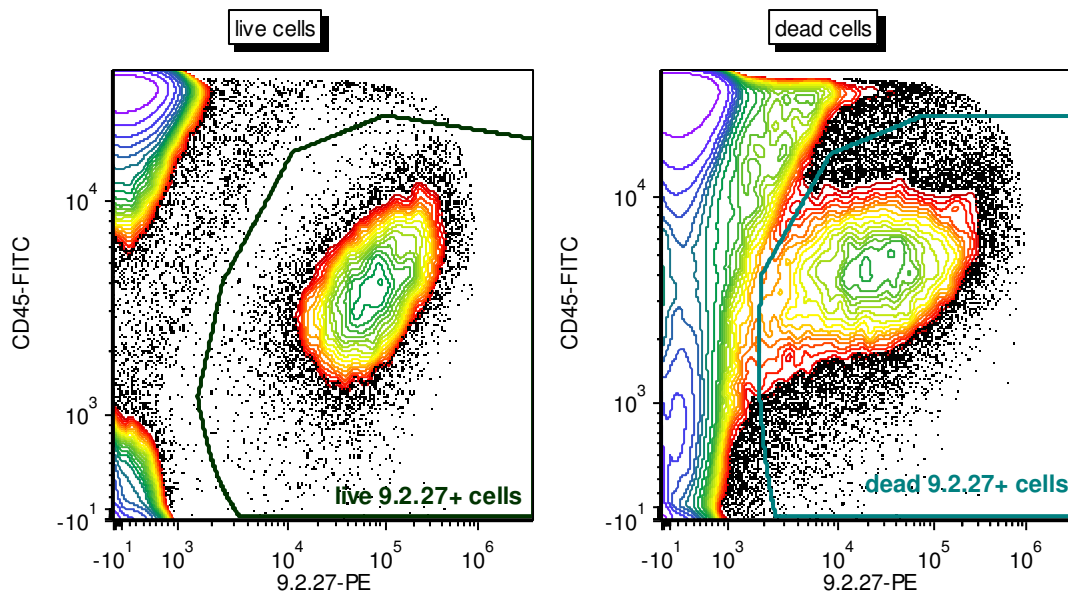


Abb.3.8 a: live cells und b: dead cells. Alle innerhalb der *gates* liegenden *events* sind 9.2.27⁺ und wahrscheinliche Melanomzellen. Die außerhalb der *gates* liegenden Zellen sind größtenteils CD45⁺ und 9.2.27⁻ und somit als Lymphozyten zu bewerten.

Nun lässt man sich alle lebenden und alle toten Zellen in einem Schaubild mit 9.2.27 auf der x- und dem side scatter (SSC) auf der y-Achse anzeigen. Da Melanomzellen eine starke Granularität aufweisen [85], werden nun alle 9.2.27⁺ und stark granulären, d.h. im rechten oberen Quadranten liegenden Zellen als *melanoma cells* gegatet.

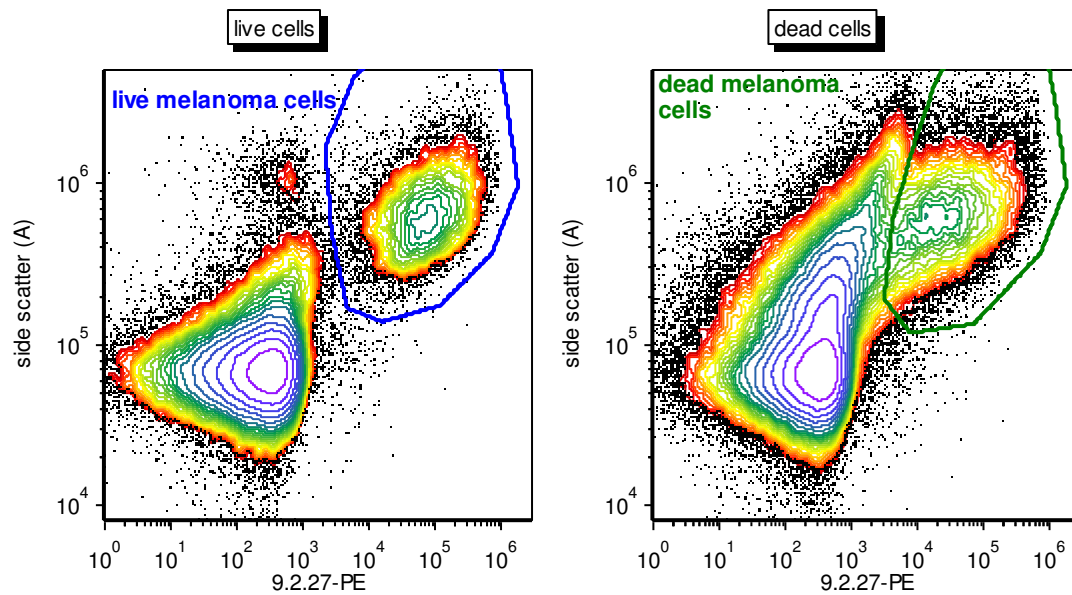


Abb. 3.9 a und b: melanoma cells Sowohl die *live melanoma cells* (links [a]) als auch die *dead melanoma cells* (rechts [b]) lassen sich in dieser Probe als eindeutige Populationen deutlich vom Rest der Probe abgrenzen. Sie sind 9.2.27⁺ und im *side scatter* „granulärer“, liegen also in etwa im oberen rechten Quadranten des Schaubildes.

Im nächsten Schritt lässt man sich nun in demselben Schaubild (wie in Abb. 3.9) als Kontrolle nur die in Abb.3.8 gegateten *live* bzw. *dead* 9.2.27⁺ cells anzeigen.

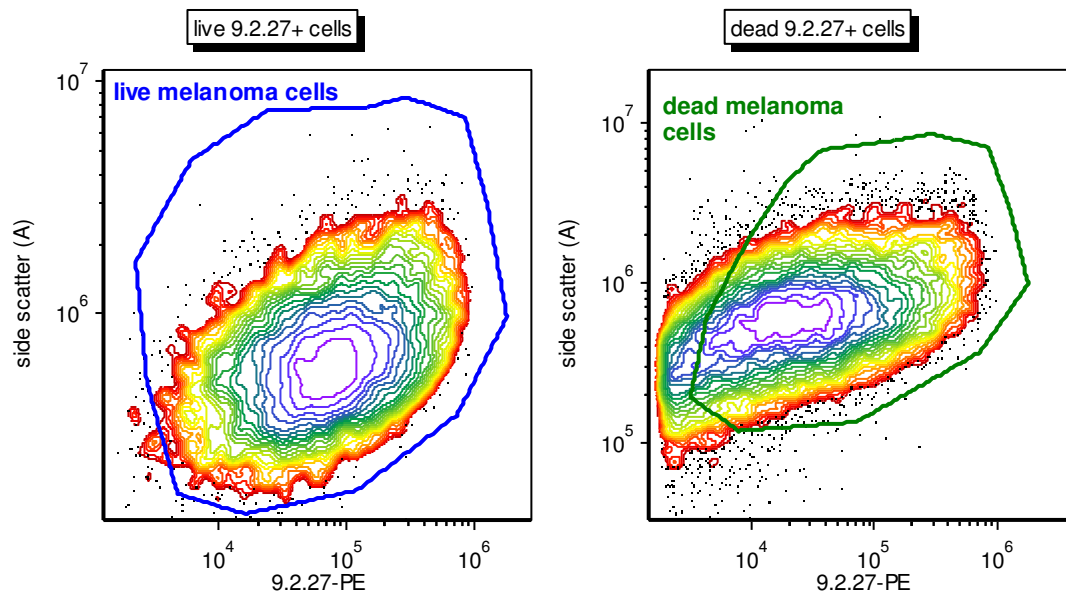


Abb.3.10 a und b: 9.2.27⁺ cells. Man erkennt, dass die lebenden (links [a]) und insbesondere die toten (rechts [b]) 9.2.27⁺ Zellen zum Teil außerhalb der restriktiveren *melanoma cells-gates* (*live melanoma cells*, *dead melanoma cells*) liegen. Insbesondere bei der toten 9.2.27⁺ - Population (s. Abb.3.8b) muss man mit falsch von links ins *gate* „hineinrutschenden“ Zellen rechnen, die hier in [b] außerhalb des *gates* liegen und als Melanomzellen ausgeschlossen werden.

Alle innerhalb dieser *gates* liegenden *events* sind also in zwei voneinander unabhängigen Schaubildern als 9.2.27⁺ gegatet worden und zusätzlich stark granulär, sie werden als *melanoma cells* bezeichnet. Die außerhalb des *gates* liegenden Zellen sind schwächer 9.2.27⁺ und/oder weniger granulär, werden also nicht als Melanomzellen bewertet. Um die so herausgegateten Melanomzellen hinsichtlich ihrer Größe und Granularität im Vergleich zu den restlichen Zellen der Probe bewerten zu können, lässt man sich ihre *gates* im *forward-side-scatter* (= Schaubild mit FSC auf der x- und SSC auf der y-Achse) der *live cells* und *dead cells* anzeigen. So kann man eventuelle Ausreißer“ bewerten und ggf. ausschließen (vgl. Abb.3.11a-d).

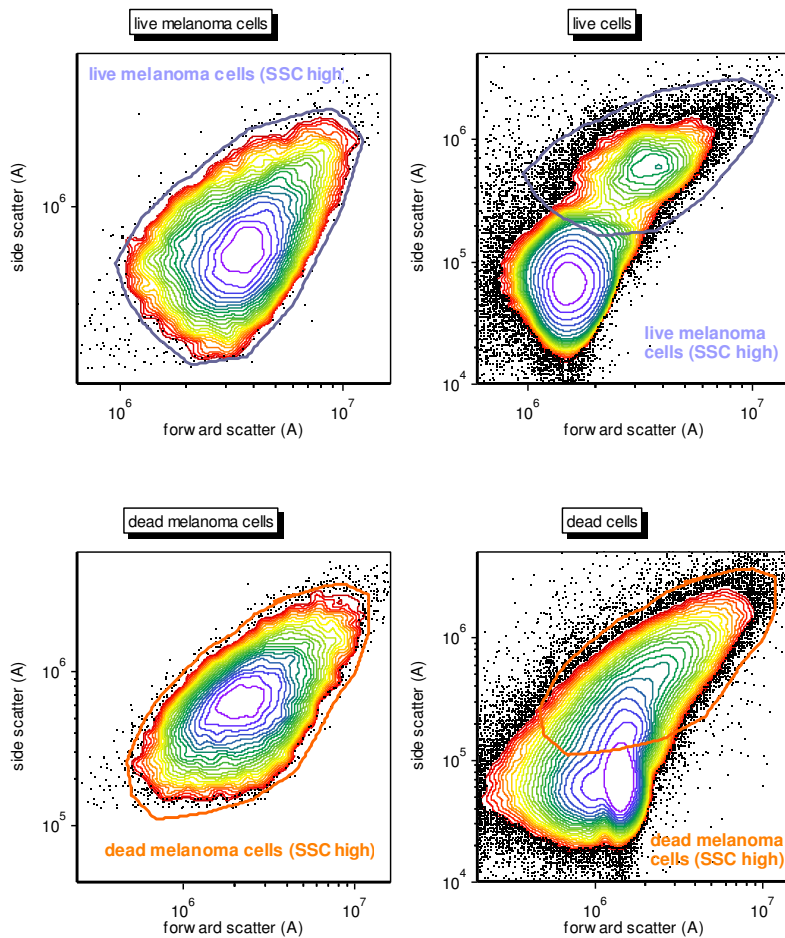


Abb.3.11 a-d: Forward-side-scatter plots. Auf den linken Graphiken [a und c] hat man *gates* um die *live melanoma cells* bzw. *dead melanoma cells* im *forward-side-scatter plot* gelegt. Diese *gates* lässt man sich dann im *forward-side-scatter* ihrer jeweils übergeordneten Population (*live cells* bzw. *dead cells*, rechte Graphiken [b und d] anzeigen, um zu beurteilen, wo die Melanomzellen im Vergleich zu dieser liegen. Hier sind besonders die *live melanoma cells* als vom Rest der *live cells* abgetrennte Population eher oben rechts zu erkennen, während die *dead melanoma cells* nicht so deutlich abgrenzbar sind.

Nach diesen Gating-Schritten liegt also am Ende eine bestimmte Anzahl an *live* und *dead melanoma cells* vor. Diese rechnen wir auf eine Anzahl pro Million Zellen um und erhalten so Messergebnisse, die mit der MZD verglichen werden können.

Die in einer beispielhaften eindeutig positiven Probe gelegten *gates* (vgl. Abb.3.8-Abb.3.10) übernahmen wir als grobe „Vorlage“ für die Auswertung der anderen Proben. Als *threshold* für 9.2.27-Positivität wurde ein Wert von ca. 2.000-10.000 festgelegt und für große Granularität ein Wert von ca. 100-150.000 (vgl. Abb. 3.9).

3.2.4 Auswertung der intrazellulären Färbung

Die Auswertung der intrazellulären Färbung folgt einer anderen Strategie. Wie oben bereits erwähnt, fällt die Lebend-Tot-Färbung mit dem Ax680 weg, da der Kanal bereits mit dem 9.2.27-Ax647 besetzt ist.

Um dennoch eine sogenannte Debris-Korrektur durchzuführen, färben wir kurz vor der Messung ein Aliquot der fertig gefärbten Probe mit dem Nukleinsäure-Farbstoff Syto16. Dieser kann die Zellmembran durchdringen und färbt Nukleinsäuren (DNA/RNA) innerhalb der Zelle. Da vitale Zellen mehr intakte Nukleinsäuren in sich tragen, werden sie stärker angefärbt. Der Farbstoff hat ähnliche Absorptions- und Emissionsmaxima wie FITC und wird ebenfalls im FL1-Kanal detektiert. Er strahlt allerdings viel stärker in diesen hinein. Mit ihm angefärbte Zellen sieht man also „FL-1-positiver“ als ausschließlich mit FITC-gefärbte (s. Abb.3.12).

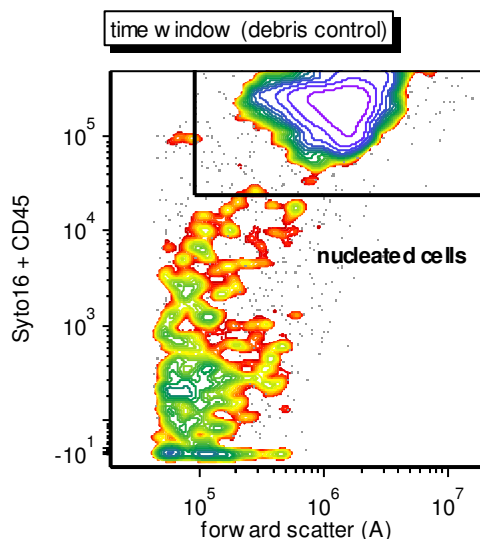


Abb.3.12: Debris control. Vitale Zellen (*nucleated cells*) haben einen höheren forward scatter und eine intensivere Syto16- Färbung (*threshold 25.000*).

Nun lässt sich berechnen, wie hoch der Anteil der *nucleated cells* an allen gemessenen *events* ist. Dieser Faktor, der meistens um die 90% liegt, wird mit der kompletten Probe verrechnet. So kann zumindest näherungsweise prozentual Debris ausgeschlossen werden.

In Abb. 3.13 ist die Gating-Hierarchie bei der intrazellulären Färbung zu sehen.

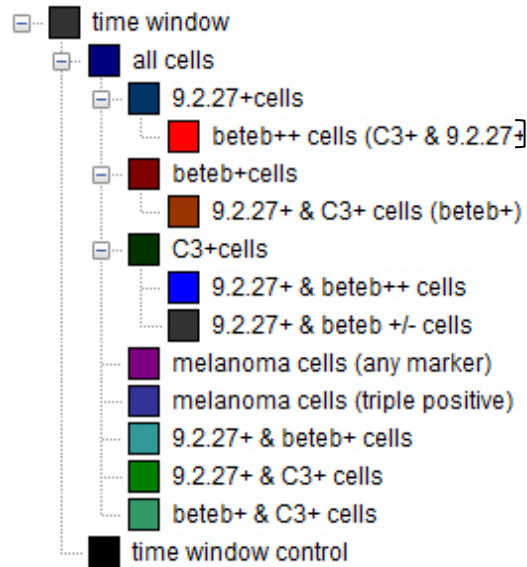


Abb. 3.13: Gating-Hierarchie intrazelluläre Färbung

Man sieht, dass bei der Färbung mit drei verschiedenen Melanom-Antikörpern für die Auswertung sehr viele verschiedene Kombinationen von *gates* möglich sind. Für unsere Ergebnisse waren jedoch nur Einzel- und Kombinationsfärbungen von zwei oder allen drei Antikörpern relevant (s.u.).

Im *time window* werden wieder alle unter stabilen Messbedingungen acquirierten *events* gegatet und im *forward-side-scatter* angezeigt. Hier gatet man große, stark granuläre Populationen (=all cells) (Abb. 3.14).

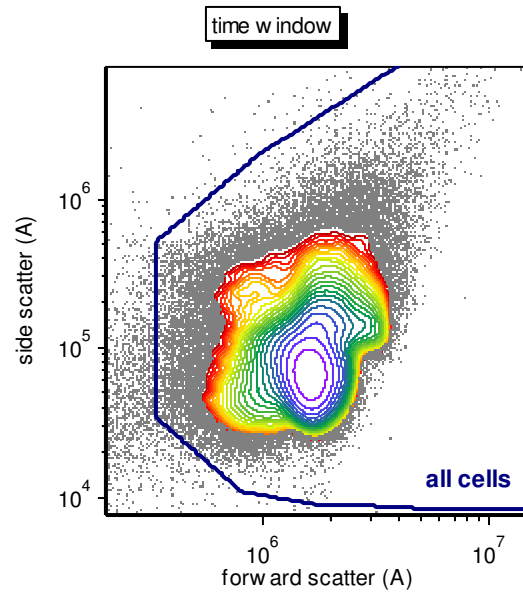


Abb. 3.14: all cells

All cells werden nun in drei verschiedenen *plots* dargestellt, in denen CD45 auf der y-Achse je einem der melanomzellspezifischen Antikörper auf der x-Achse gegenüber gestellt wird. Jeder *plot* wird auf das Vorhandensein von möglichen Melanomzellen geprüft (Abb.3.15a-c).

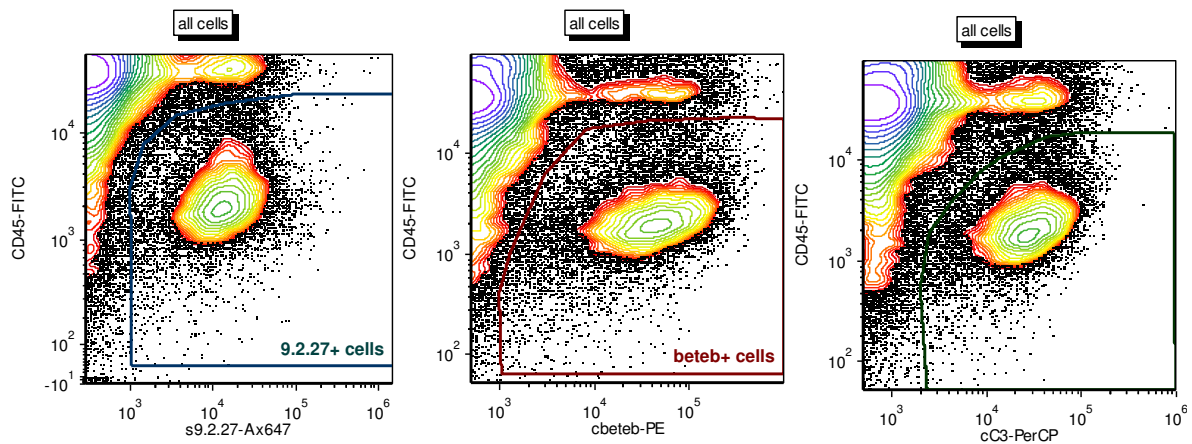


Abb.3.15 a-c: Gating von Melanomzellen. In [a] (links) werden 9.2.27⁺ Zellen gegatet, in [b] (Mitte) beteb⁺ und in [c] (rechts) C3⁺ Zellen. Die außerhalb der *gates* liegenden Zellen sind entweder für den jeweiligen melanomzellspezifischen Antikörper negativ oder stark CD45⁺.

So gatet man drei Populationen: 9.2.27⁺ cells, beteb⁺ cells und C3⁺ cells.

Jede dieser Populationen lässt man sich anschließend in *plots* anzeigen, welche auf der y-Achse CD45 und auf der x-Achse jeweils einen der anderen beiden Antikörper zeigen. So kann man prüfen, ob eine für einen der melanomzellspezifischen Antikörper positive Zelle/Zellpopulation (z.B. beteb) auch für einen der anderen beiden oder beide positiv ist (s. Abb. 3.16a-c).

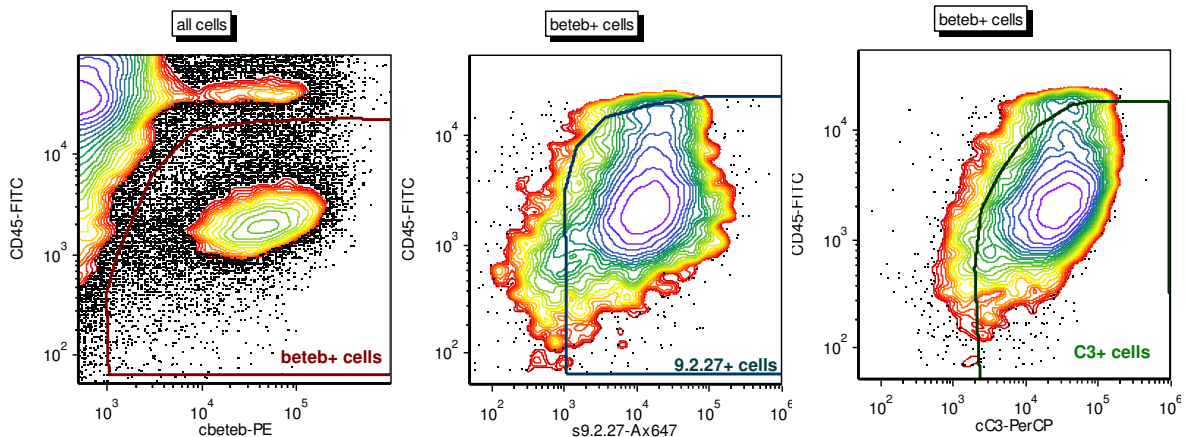


Abb. 3.16 a-c: Prüfung der Mehrfachpositivität. Links [a] sind *all cells* zu sehen, aus denen die *beteb⁺* Population gegatet wird. Diese wird nun in den beiden anderen Schaubildern [b und c] angezeigt und auf ihre C3- bzw. 9.2.27-Positivität hin geprüft. In diesem Fall sieht man, dass der Großteil der *beteb⁺* Population auch C3⁺ und 9.2.27⁺ ist.

Diese Kombination von verschiedenen melanomzellspezifischen Antikörpern ermöglicht natürlich eine genauere Aussage zur einzelnen Zelle/Zellpopulation als die Färbung mit nur einem Antikörper [86]. Eine für *beteb*, C3 und 9.2.27 positive Zelle ist demnach wahrscheinlicher eine Melanomzelle als eine ausschließlich für 9.2.27 positive, aber für *beteb* und C3 negative Zelle.

Man kann nun alle möglichen *gates* um die Populationen legen und sich auch Kombinationsgates von den verschiedenen Antikörpern anzeigen lassen (vgl. die Subpopulationen der für je einen Antikörper positiven Populationen in Abb. 3.13).

Wir haben letztendlich bei der Auswertung die Zahlenwerte für folgende Populationen berücksichtigt:

- 9.2.27⁺ cells
- beteb⁺ cells
- C3⁺ cells
- 9.2.27+beteb⁺ cells

- 9.2.27+C3⁺ cells
- beteb+C3⁺ cells
- melanoma cells (triple positive)

3.3 Statistik

3.3.1 Verteilung der Proben

Insgesamt konnten 138 WLK von 109 Patienten untersucht werden. Die Differenz zwischen der Anzahl der WLK und der Anzahl der Patienten entsteht daraus, dass bei einigen Patienten der WLK intraoperativ nicht sicher identifiziert werden konnte. Hier wurden dann mehrere Lymphknoten entfernt und untersucht. Um Patienten, denen mehr als ein Lymphknoten entnommen wurde, nicht stärker zu gewichten als andere, wurden insgesamt 29 Proben aus der Auswertung ausgeschlossen, sodass nur eine Probe pro Patient berücksichtigt wurde. Welche Probe wir in die Auswertung einschlossen, entschied jeweils das Los. Somit standen letzten Endes 109 Lymphknoten für die statistische Auswertung zur Verfügung.

Je nach ihrer MZD (Anzahl HMB45⁺ Zellen pro Million Zellen) teilten wir die Proben für die Auswertung nochmals (wie Ulmer [41]) in drei Gruppen auf. Gruppe 1 bilden Proben ohne HMB45⁺ Zellen im WLK (MZD = 0). In der Gruppe 2 befinden sich Proben mit einer MZD > 0 und ≤ 100 und in der Gruppe 3 alle WLK mit MZD > 100.

Im Folgenden bezieht sich der Begriff MZD ausschließlich auf die Anzahl HMB45⁺ Zellen pro Million Zellen nach Ulmer. Die Anzahl der im Durchflusszytometer gemessenen Melanomzellen pro Million Zellen werden wir bei der Beschreibung der Ergebnisse überbegrifflich als durchflusszytometrische Tumorzellendichte bzw. bei der extrazellulären Färbung mit dem 9.2.27-Antikörper als *live/dead/total melanoma cells/Mio* und bei der Beschreibung der intrazellulären Färbung nach dem jeweiligen Antikörper (9.2.27⁺ cells/Mio; beteb⁺ cells/Mio, C3⁺ cells/Mio, *triple positive cells/Mio*) benennen.

Analog der drei MZD-Gruppen (s.o.) werden wir die Proben allgemein auch nach der Anzahl an Antikörper⁺ Zellen/Mio als Gruppe 1, 2 und 3 bezeichnen.

Bei den im Durchflusszytometer gemessenen Daten handelt es sich um stetige (metrische) Merkmale. Um ihre Verteilung zu beurteilen, werden sowohl Histogramme als auch Boxplot-Darstellungen verwendet. Da keine der Populationen eine Normalverteilung aufweist, werden wir sie mit den Werten Median und Quantile sowie Minimum und Maximum beschreiben und grundsätzlich nur nichtparametrische Tests verwenden.

3.3.2 Verwendete statistische Größen und Tests

Wir verwenden Quantile und Median zur Beschreibung der Häufigkeitsverteilung unserer Messdaten. Quantile beschreiben die Streuung von Werten und informieren so über die Unterschiedlichkeit ihrer Verteilung. Die Differenz zwischen Maximum und Minimum einer Häufigkeitsverteilung bezeichnet man als *range* oder Variationsbreite.

Eine Verteilung kann man in vier Quartile mit den Grenzen 25%-, 50%- und 75%-Quantile einteilen. Das 50%-Quantil bezeichnet man auch als Median, es ist ein Lagemaß. Vom Median weichen alle übrigen Werte einer Häufigkeitsverteilung im Durchschnitt am wenigsten ab, er teilt sie in zwei gleich große Teile. Der Median ist im Vergleich zum arithmetischen Mittel (Mittelwert) deutlich robuster gegenüber Ausreißern [87].

Zur graphischen Darstellung dieser fünf Maße verwenden wir Boxplots. Diese zeigen auf der y-Achse in linearer Darstellung die Anzahl der Zellen einer bestimmten Zellpopulation und bestehen aus einem Rechteck (Box) und zwei Antennen. Die Box entspricht dem Interquartilbereich, d.h. dem Bereich zwischen der 25. und der 75. Quantile, mit dem Median als Linie innerhalb der Box. Für die Längen der Antennen der Box gibt es verschiedene Definitionen. Wir verwenden die Ausreißer-Darstellung (nach J.W.Tukey), bei der die Antennen so lang wie das 1,5-fache des Interquartilbereichs sind. Sie enden allerdings nicht genau bei diesem Abstand, sondern bei dem Wert aus den Daten, der noch innerhalb dieser Grenze liegt. Ausreißer liegen außerhalb der Antennen. Gibt es keine Ausreißer, enden die Antennen jeweils am Minimum bzw. Maximum der Gesamtverteilung. Jeder Punkt im Hintergrund des Boxplots entspricht einem untersuchten WLK.

Weiterhin untersuchen wir, inwieweit eine Korrelation zwischen der MZD (Anzahl HMB45⁺ Zellen pro Million Zellen) und der Anzahl der durchflusszytometrisch gemessenen Melanomzellen pro Million Zellen besteht. Zur Quantifizierung bestimmen wir Spearmans ρ als Korrelationskoeffizienten. Dieser bestimmt den Zusammenhang zweier mindestens ordinalskalierten, metrischer Merkmale, die nicht normalverteilt sind. Er ist ebenfalls robust gegenüber Ausreißern [87] und wird angegeben in $-1 \leq \rho \leq +1$, wobei 1 maximal positive, 0 keine und -1 maximal negative Korrelation bedeutet. Die Korrelation stellen wir in Graphen dar, die auf der x-Achse die Anzahl an HMB45⁺ Zellen und auf der y-Achse die Anzahl der durchflusszytometrisch positiven Zellen der jeweiligen Probe zeigen. Wegen der großen Spannweite unserer Messwerte verwenden wir hier zur besseren Visualisierung die logarithmische Darstellung der Achsen.

Um Sensitivität und Spezifität der einzelnen Antikörper bzw. Färbemethoden darzustellen, verwenden wir Vierfeldertafeln, in denen wir das Ergebnis unserer Färbung (FC⁺ oder FC⁻) der letztendlichen Diagnose (positiv oder negativ für HMB45⁺ Zellen) gegenüber stellen. Sensitivität im engeren Sinne ist hierbei die Richtig-Positiv-Rate oder Trefferquote, also die Fähigkeit der durchflusszytometrischen Analyse, tatsächlich positive Lymphknoten als positiv zu erkennen (Anzahl richtig positiver Proben/(Anzahl richtig positiver + falsch positiver Proben)). Spezifität ist die Richtig-Negativ-Rate, d.h. die Fähigkeit der durchflusszytometrischen Analyse, tatsächlich negative Lymphknoten auch als negativ zu erkennen (Anzahl richtig negativer Proben/(Anzahl falsch negativer + richtig negativer Proben)) (vgl. Tab.3.4).

	FC ⁺	FC ⁻	
HMB45⁺	A (richtig positiv)	B (falsch negativ)	$A/(A+B)$ = positiver prädiktiver Wert
HMB45⁻	C (falsch positiv)	D (richtig negativ)	$C/(C+D)$ = negativer prädiktiver Wert
	$A/(A+C)$ = Sensitivität	$D/(D+B)$ = Spezifität	

Tab.3.4: Vierfeldertafel

In dieser Arbeit gehen wir davon aus, dass die immunzytologische Diagnose (HMB45⁺ oder HMB45⁻) der wahren Diagnose und somit dem Goldstandard entspricht, auch wenn es im eigentlichen Sinne noch keinen Goldstandard in der Quantifizierung der Tumorlast im WLK von malignen Melanomen gibt. Zur kritischen Beurteilung dieses Vorgehens siehe auch 5.3.

3.3.3 Begriffserklärungen

Im Folgenden möchten wir kurz einige im Ergebnis- und Diskussionssteil verwendete Begriffe und Synonyme erklären, die dem besseren Verständnis dienen. Die beiden miteinander verglichenen Methoden sind die LDI (Lymphozyten-Disaggregations-Immunzytologie) und die Durchflusszytometrie. Möchten wir die Methoden mit einem Adjektiv beschreiben, verwenden wir die Begriffe immunzytologisch (für LDI) und durchflusszytometrisch (für FC bzw. Durchflusszytometrie). Der bei der LDI verwendete melanomspezifische Antikörper ist HMB45, die im Durchflusszytometer verwendeten melanomspezifischen Antikörper sind 9.2.27, beteb und C3 (einfach oder in Kombination). Die Anzahl HMB45⁺ Zellen pro Million Zellen ist die MZD, die Anzahl 9.2.27⁻, beteb⁻, C3⁺ Zellen pro Million Zellen bezeichnen wir als 9.2.27⁻, beteb⁻, C3⁺-usw. „Rate“ bzw. Tumorzelldichte. Tab.3.5 stellt die Begriffe noch einmal gegenüber.

Methode	LDI=Immunzytologie	Durchflusszytometrie=FC
Adjektiv	immunzytologisch	durchflusszytometrisch
Antikörper	HMB45	9.2.27 (<i>live melanoma cells, dead melanoma cells, total melanoma cells</i>), 9.2.27, beteb, C3, Kombinationen (9.2.27+beteb, 9.2.27+C3, beteb+C3, <i>triple positive</i>)
Anzahl an positiven Zellen pro Million Zellen	MZD	<i>dead melanoma cells-</i> , <i>live melanoma cells-</i> , <i>total melanoma cells-</i> , 9.2.27 ⁻ , beteb ⁻ , C3 ⁻ , 9.2.27+beteb ⁻ , 9.2.27+C3 ⁻ , beteb+C3 ⁻ , <i>triple positive</i> -Rate oder durchflusszytometrische Tumorzelldichte

Tab.3.5: Wichtige in unserer Arbeit verwendete Begriffe und Erklärungen

4 Ergebnisse

4.1 Beschreibung der Daten

4.1.1 Patientenkollektiv: Lokalisierung, Seite, Geschlecht, Alter

40 der 109 Lymphknoten (36,70%) wurden aus der Leiste entnommen, 64 Lymphknoten (58,72%) aus der Axilla und 5 (4,59%) aus einer der Lymphknotenstationen am Hals (vgl. Abb.4.1).

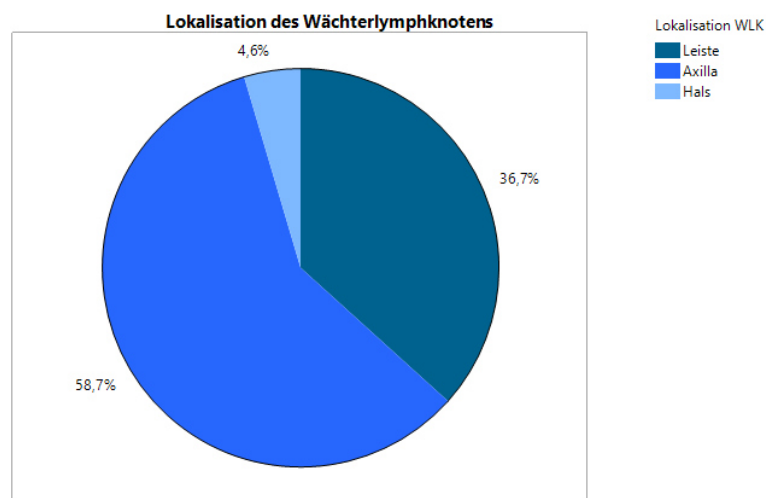


Abb.4.1: Lokalisation

Bei zwei Lymphknoten (1,83%) war die Seite der Lokalisierung des Wächterlymphknotens unbekannt, während sich von den übrigen 107 Lymphknoten 51 (46,79%) rechts und 56 (51,38%) links befanden.

58 Patienten (53,21%) waren männlich und 50 (45,87%) weiblich, während das Geschlecht bei einem Patienten (0,92%) unbekannt blieb.

Direkt nach der Disaggregation wurden 75 WLK (68,81%) in PFA konserviert und 34 (31,29%) unkonserviert gelassen.

Da das Alter der Patienten nicht normalverteilt, sondern zu einem höheren Alter hin verschoben ist, lässt es sich gut in einem Boxplot darstellen (vgl. Abb.4.2):

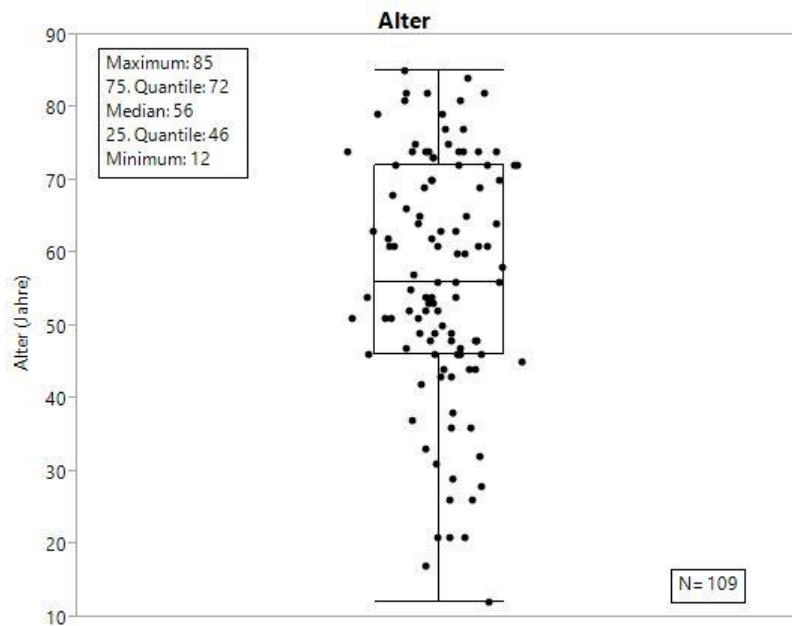


Abb.4.2: Altersverteilung in Boxplot-Darstellung. Der jüngste Patient war 12 Jahre alt, der älteste 85 Jahre. Der Median betrug 56 Jahre, 25 % der Patienten waren 46 Jahre oder jünger und 75% der Patienten 72 Jahre oder jünger.

4.1.2 Färbemethoden

Von den 109 WLK wurden 56 (51,38%) nur mit der extrazellulären Färbestrategie gefärbt, 4 WLK (3,67%) nur mit der intrazellulären und 49 WLK (44,95%) mit beiden Färbestrategien. Insgesamt wurden also 105 (96,33% von allen Proben) mit der extrazellulären und 53 (48,62% von allen Proben) mit der intrazellulären Färbestrategie gefärbt (vgl. Abb.4.3).

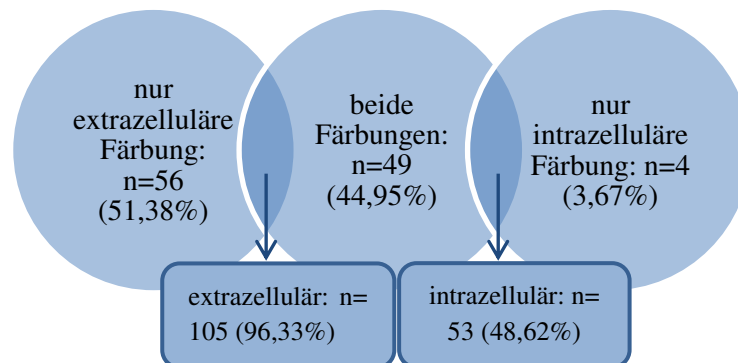


Abb.4.3: Aufteilung der Färbemethoden

4.1.3 Diagnose (LDI)

Von den 109 Lymphknoten wurden 28 (25,69%) in der LDI als HMB45⁺ diagnostiziert (MZD ≥ 1), während 81 Lymphknoten (74,31%) negativ waren (MZD= 0) (vgl. Abb.4.4).

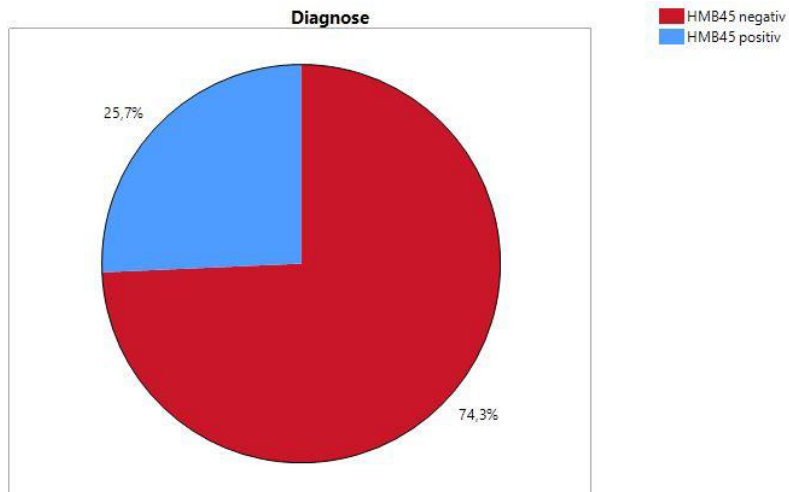


Abb.4.4: Diagnose

Auf die drei MZD-Gruppen verteilen sich die 109 Proben wie in Abb.4.5 zu entnehmen.

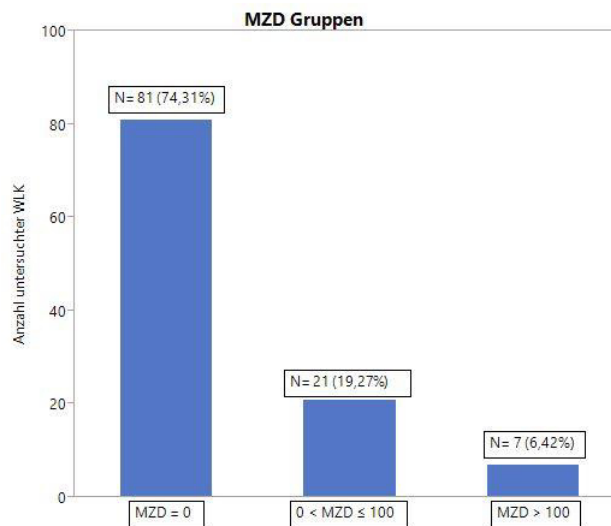


Abb.4.5: Verteilung MZD

4.2 Extrazelluläre Färbung

4.2.1 Verteilung der Proben

Mit der extrazellulären Färbung wurden insgesamt 105 Lymphknoten gefärbt. Davon waren 79 WLK (75,24%) immunzytologisch negativ (MZD=0) und 26 WLK positiv (24,76%) (MZD ≥ 1). Von den positiven WLK hatten 20 (19,05%) eine MZD von ≥ 1 bis ≤ 100 und 6 (5,71%) eine MZD von > 100 (vgl. Abb.4.6).

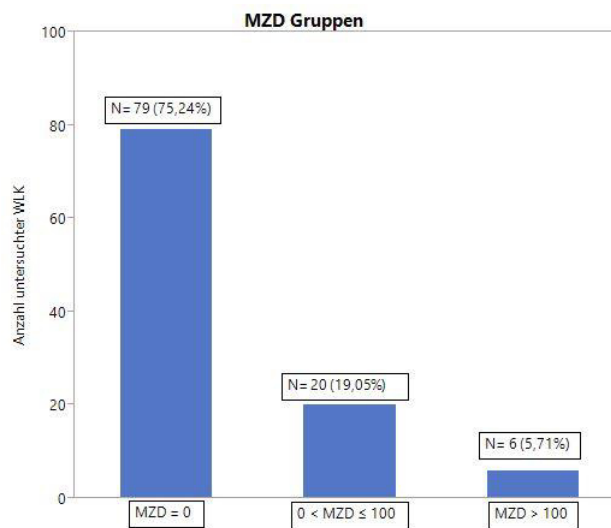


Abb.4.6: Extrazellulär gefärbte WLK

4.2.2 Verteilung der Gesamtzellzahl im Durchflusszytometer

Betrachtet man die von uns im Durchflusszytometer gemessene Gesamtzellzahl (= *total cells*, d.h. die Anzahl der Zellen, die in jedem einzelnen WLK enthalten und messbar waren) jeder einzelnen der 105 extrazellulär gefärbten Proben, ergibt sich folgender Boxplot (Abb.4.7).

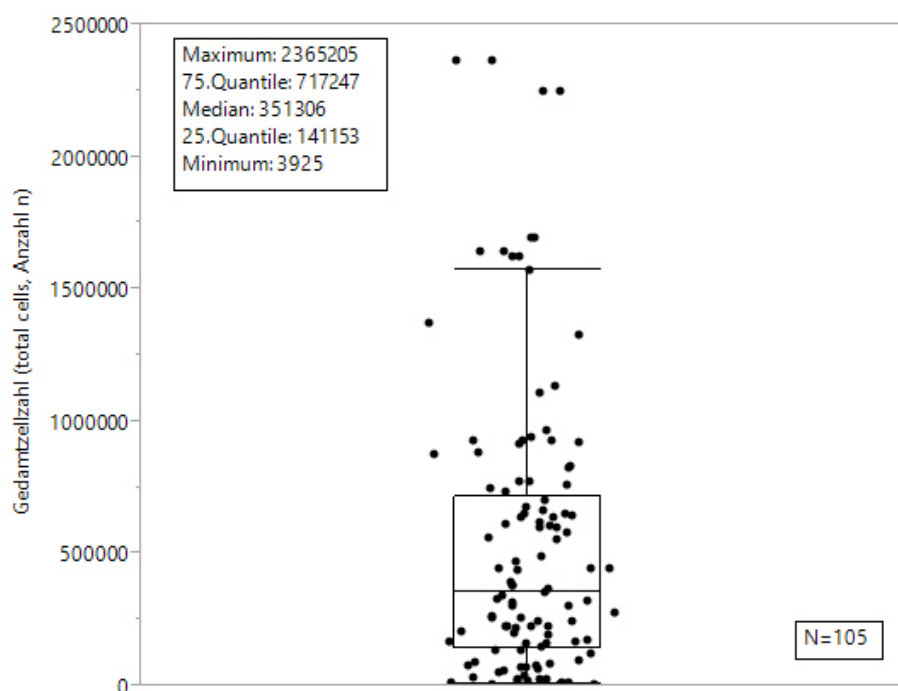


Abb.4.7: Verteilung der Gesamtzellzahl

Die Bandbreite an messbaren Gesamtzellzahlen reicht also von knapp 4000 bis über 2 Millionen. Bezogen auf die in Abb.4.5 dargestellten einzelnen MZD-Gruppen stellte sich die Frage, ob die jeweilige MZD Einfluss auf die Gesamtzellzahl der im Durchflusszytometer gemessenen Proben hatte, d.h. ob die Proben z.B. insgesamt auch mehr Zellen enthielten, wenn sie HMB45⁺ waren. In Abb.4.8 und Tab.4.1 ist die Verteilung der Gesamtzellzahlen auf die einzelnen MZD-Gruppen zu sehen.

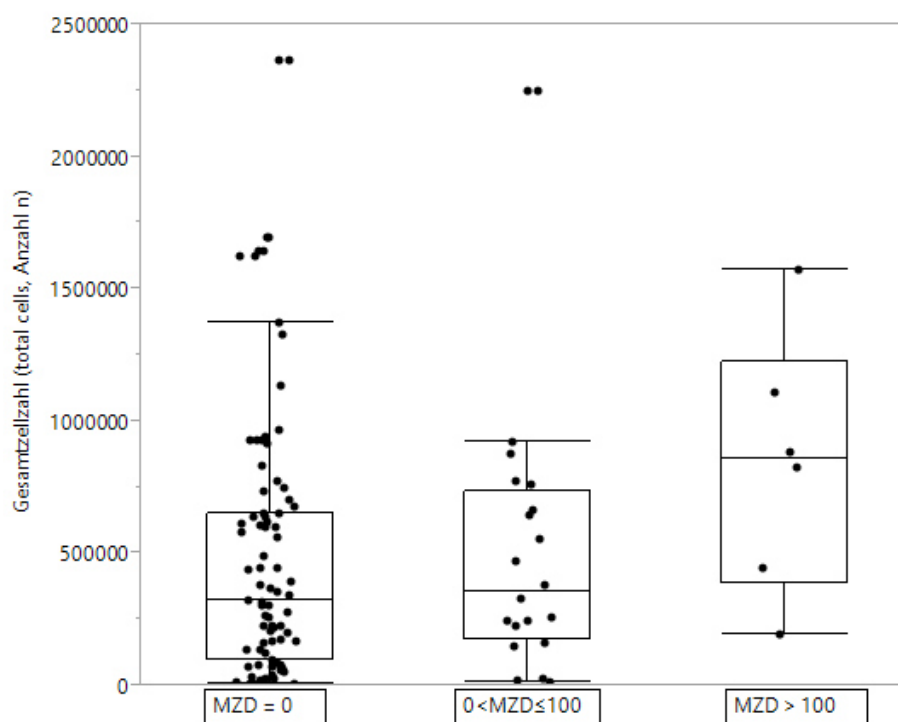


Abb.4.8: Gesamtzellzahl einzelner MZD-Gruppen

	MZD Gruppe 1 (MZD=0)	MZD Gruppe 2 (0<MZD≤100)	MZD Gruppe 3 (MZD >100)
Anzahl N	79	20	6
Minimum	3925	10696	194389
25. Quantile	94180	175874	383612
Median	319769	354574	855630
75.Quantile	653600	735698	1223452
Maximum	2365205	2246089	1575198

Tab.4.1: Verteilung der Gesamtzellzahl einzelner MZD-Gruppen

Vergleicht man lediglich die drei Mediane, könnte man sagen, dass dieser umso höher ist, je größer die MZD ist. Auch das Minimum, die 25. und die 75. Quantile lassen diesen Rückschluss zu. Dennoch ist eine endgültige Aussage nicht machbar, da die Fallzahlen N in den einzelnen Gruppen zu unterschiedlich (79 vs. 26 bzw. 20 und 6) und die Proben somit untereinander nicht vergleichbar sind. Für eine Interpretation dieser Ergebnisse vgl. 5.3.2.

4.2.3 Einfluss der Konservierung mit PFA auf die Gesamtzellzahl im Durchflusszytometer

Von den 105 extrazellulär gefärbten WLK wurden vor der Färbung 71 (67, 62%) in PFA konserviert und 34 (32,38%) unkonserviert gelassen. Um den Einfluss dieser Konservierung auf die im Durchflusszytometer zur Verfügung stehende Gesamtzellzahl zu betrachten, vergleichen wir beide Populationen bezüglich ihrer Verteilung (Abb.4.9 und Tab.4.2).

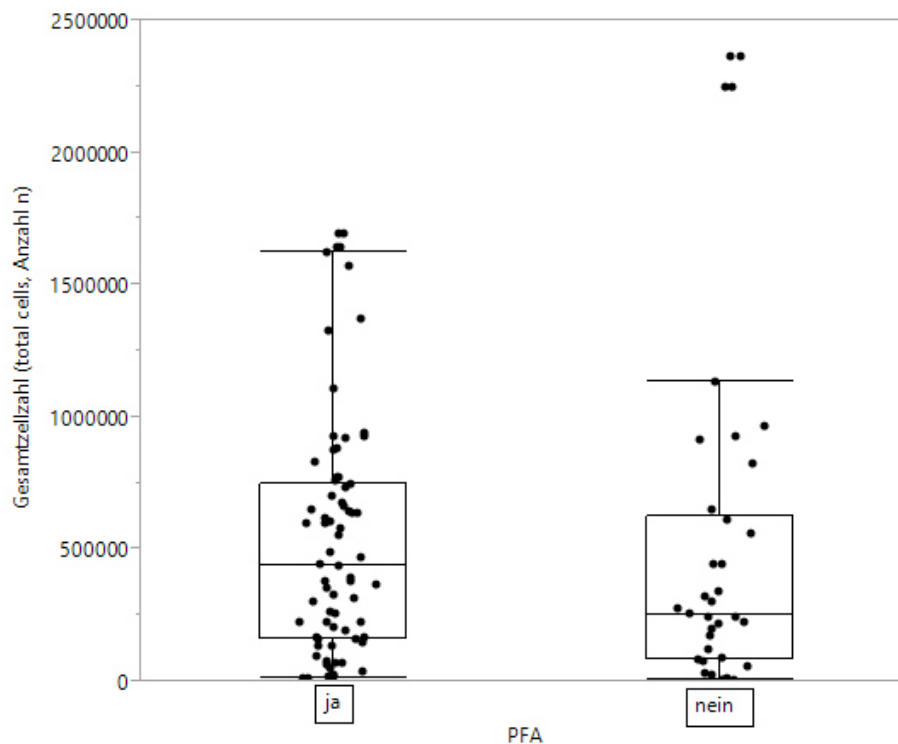


Abb.4.9: Gesamtzellzahl versus PFA

	PFA ja	PFA nein
Anzahl N	71	34
Minimum	10696	3925
25. Quantile	162472	83262
Median	441036	252354
75.Quantile	747615	623082
Maximum	1693742	2365205

Tab.4.2: Gesamtzellzahl versus PFA

Es zeigt sich, dass Minimum, 25. Quantile, Median und 75. Quantile der in PFA konservierten Zellen („PFA ja“) größer sind als die Werte der nicht konservierten Zellen („PFA nein“). Lediglich beim Maximum zeigt sich dort eine Ausnahme. Die Ausbeute von 2365205 Zellen ist aber einer von zwei Ausreißern (*total cells* > 2 Mio. Zellen) aller Messwerte. Bei Ausschluss dieser beiden Proben präsentiert sich die Verteilung der nicht konservierten Zellen (= PFA nein) durch die Reihe hinweg mit kleineren Werten als die konservierten Zellen (= PFA ja).

Es ist somit davon auszugehen, dass (trotz der Unterschiedlichkeit der Fallzahlen dieser beiden Gruppen) grundsätzlich eine Konservierung der Zellen mit PFA sinnvoll ist, da sie die Zellausbeute erhöht und auch makroskopisch zu einer deutlich verminderten Verklumpung der Zellsuspension führt (vgl. 3.2 und 5.2.3).

4.2.4 Einfluss der MZD auf die Gesamtzahl an lebenden und toten Lymphozyten im WLK

Geht man davon aus, dass eine WLK-Probe aus Lymphozyten und, wenn vorhanden, Melanomzellen besteht, kann man sagen, dass die Gesamtzahl an *live cells* (*dead cells*) minus die *live melanoma cells* (*dead melanoma cells*) die Anzahl an lebenden Lymphozyten (toten Lymphozyten) repräsentiert.

Betrachtet man nun die Gesamtzahl an lebenden und toten Lymphozyten je nach MZD, ergeben sich folgende Boxplot-Grafiken und Zahlen:

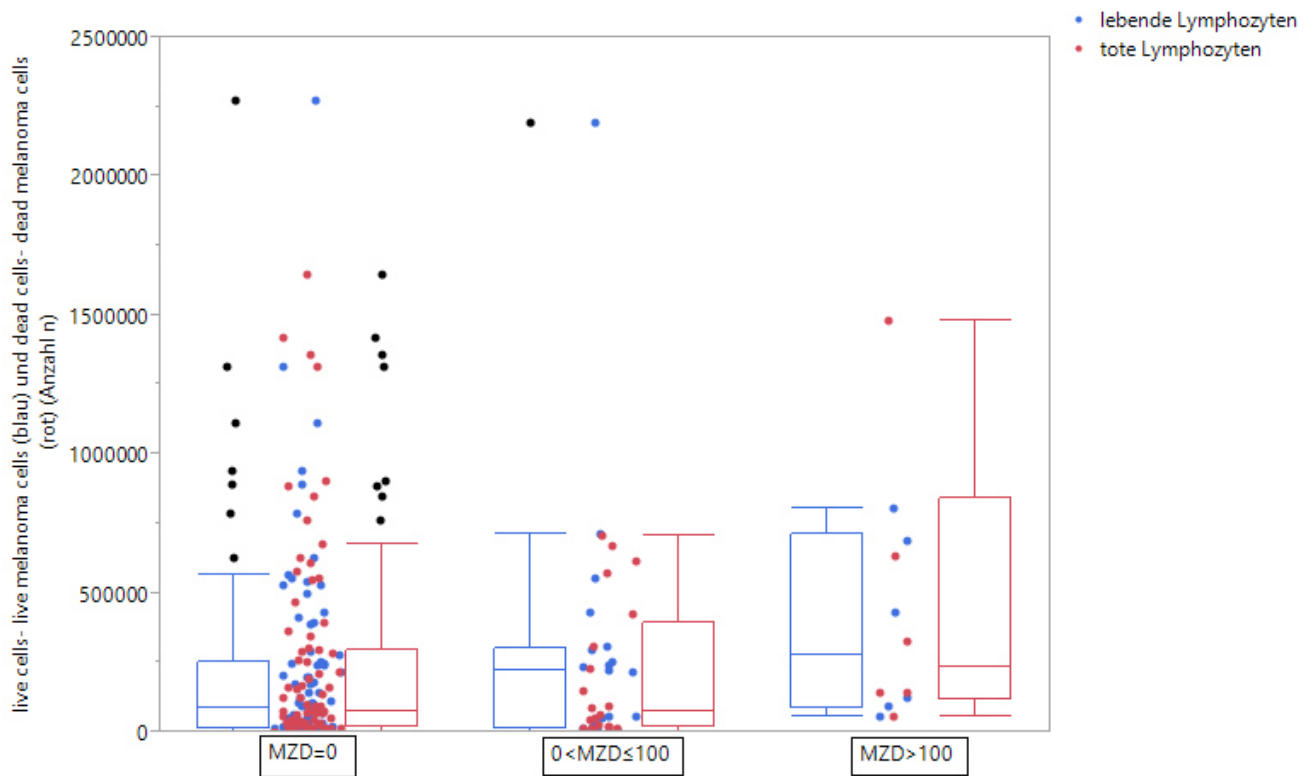


Abb.4.10 Anzahl lebender und toter Lymphozyten in den jeweiligen MZD-Gruppen

	MZD Gruppe 1 (MZD=0)		MZD Gruppe 2 (0<MZD≤100)		MZD Gruppe 3 (MZD>100)	
	live	dead	live	dead	live	dead
Anzahl N	79	79	20	20	6	6
Minimum	456	136	467	543	55013	58186
25. Quantile	15006	20983	13906	18943	83587	118842
Median	86258	74226	219075	72614	274721	233671
75. Quantile	249837	292303	303205	395600	715300	843834
Maximum	2273668	1644471	2195419	707623	805687	1479558

Tab.4.3 Anzahl lebender und toter Lymphozyten in den jeweiligen MZD-Gruppen

Man sieht, dass in MZD Gruppe 1 die Anzahl an lebenden Lymphozyten in fast allen Werten des Boxplots (außer der 25. und der 75. Quantile) etwas höher ist als die Anzahl der toten Lymphozyten. In MZD Gruppe 2 verhalten sich die Zahlen indifferent. Der Median der lebenden und das Maximum sind hier deutlich höher als die Werte der toten Lymphozyten, während Minimum, 25. und 75. Quantile bei den toten Lymphozyten höher sind. In MZD Gruppe 3 sind die toten Lymphozyten in allen Boxplot-Werten

außer dem Median höher. Insgesamt sind die Werte höher, je höher die MZD ist, was den Ergebnissen in 4.2.2. entspricht. In keiner der Gruppen sind die Ergebnisse so eindeutig, dass man von einem Einfluss der MZD auf die Zahl weder der lebenden noch der toten Lymphozyten sprechen könnte.

4.2.5 Vierfeldertafeln, Sensitivität und Spezifität

Vergleichen wir zunächst die Anzahl der im Durchflusszytometer positiv (FC⁺) bzw. negativ (FC⁻) bewerteten Lymphknoten mit der Anzahl der immunzytologisch positiven bzw. negativen Lymphknoten (HMB45^{+/-}), ergeben sich folgende Vierfeldertafeln:

	FC ⁺	FC ⁻	Summe
HMB45 ⁺	16	10	26
HMB45 ⁻	10	69	79
Summe	26	79	105

Tab.4.4: Vierfeldertafel live melanoma cells

	FC ⁺	FC ⁻	Summe
HMB45 ⁺	19	7	26
HMB45 ⁻	18	61	79
Summe	37	68	105

Tab.4.5: Vierfeldertafel dead melanoma cells

	FC ⁺	FC ⁻	Summe
HMB45 ⁺	21	5	26
HMB45 ⁻	22	57	79
Summe	43	62	105

Tab.4.6: Vierfeldertafel total melanoma cells

In der linken Spalte der Tabellen finden sich alle im Durchflusszytometer positiven Proben, in der rechten alle im Durchflusszytometer negativen Proben. Diese teilen sich jeweils noch einmal in HMB45⁺ (obere Zeile) und HMB45⁻ (untere Zeile) Proben auf. Von den *total melanoma cells* (Tab.4.6) sind beispielsweise 43 WLK im Durchflusszytometer positiv gewesen, davon waren nur 21 auch HMB45⁺. Dies ergibt eine Richtig-Positiv-Rate (Sensitivität) von $21/43 = 48,84\%$. Im Durchflusszytometer negativ waren insgesamt 62 WLK, davon waren 57 auch HMB45⁻. Dies ergibt eine Richtig-Negativ-Rate (Spezifität) von $57/62 = 91,94\%$.

Zusammenfassung und Vergleich

Es ergeben sich die in Tab.4.7 aufgeführten Sensitivitäten und Spezifitäten für *live*, *dead* und *total melanoma cells*:

	Sensitivität in %	Spezifität in %
live melanoma cells	61,50	87,34
dead melanoma cells	51,35	89,71
total melanoma cells	48,84	91,94

Tab.4.7: Vergleich

Während also die Sensitivitäten und Spezifitäten im Durchflusszytometer für die *dead melanoma cells* und die *total melanoma cells* relativ ähnlich sind, ist die Sensitivität für die *live melanoma cells* um die 10% höher, während die Spezifität geringfügig niedriger ist.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die Sensitivität am höchsten ist, wenn man nur die *live melanoma cells* als „wahre Melanomzellen“ wertet. Dennoch ist sie mit 61,5% nicht zufriedenstellend. Die Spezifität ist mit knapp 90% für alle drei Zellgruppen relativ hoch.

4.2.6 Korrelation von Durchflusszytometrie und LDI für Proben mit MZD > 0

Stellt man nun die MZD der HMB45⁺ Proben (n=26) den jeweiligen Werten für *live melanoma cells*/Mio, *dead melanoma cells*/Mio, *total melanoma cells*/Mio graphisch gegenüber und ermittelt den Korrelationskoeffizienten der beiden Parameter, ergibt sich folgendes Schaubild (s. Abb.4.11):

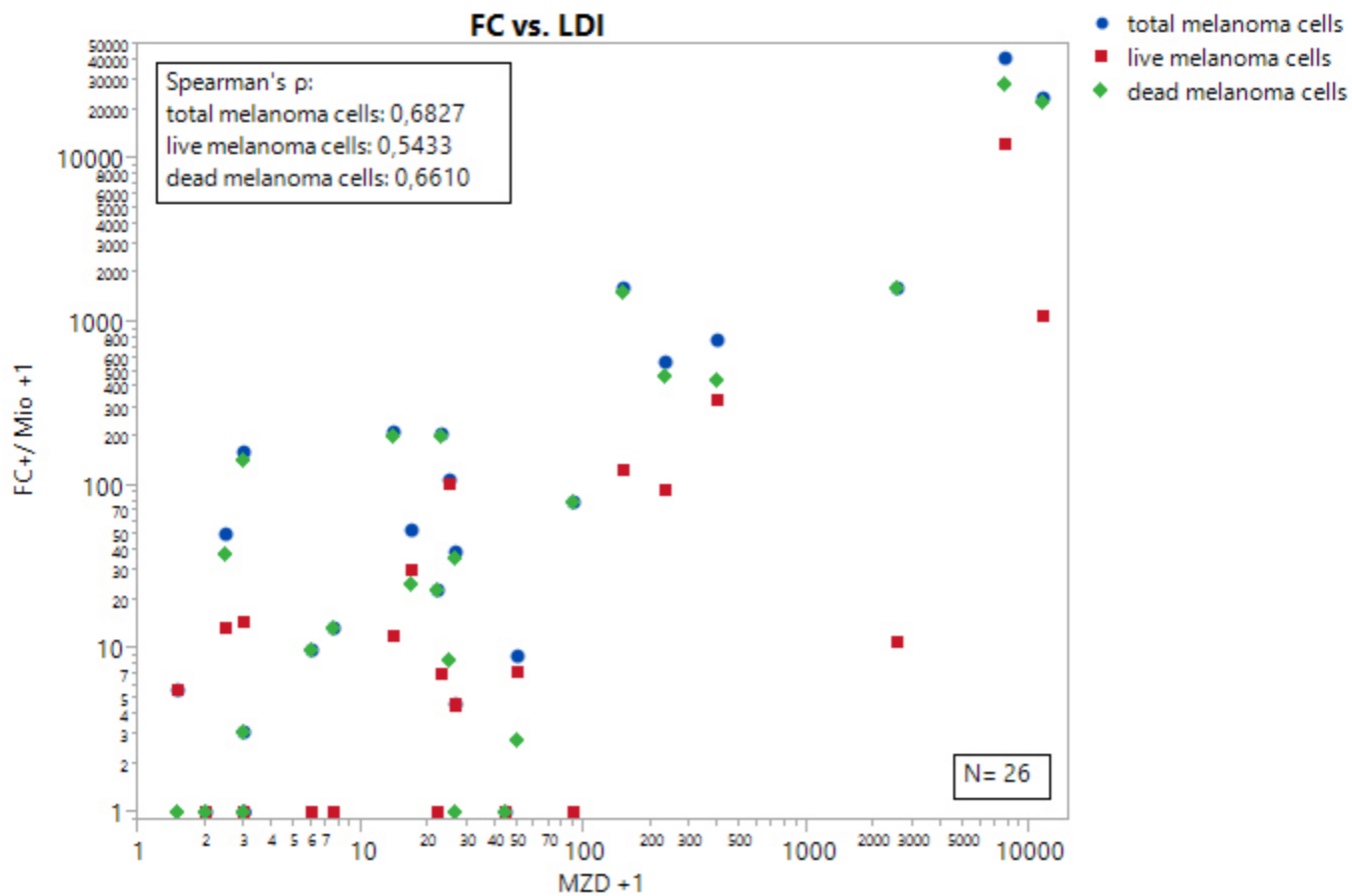


Abb.4.11 FC vs. LDI für Proben mit MZD > 0: blau: *total melanoma cells*, rot: *live melanoma cells*, grün: *dead melanoma cells*, Graph in logarithmischer Skala, Werte immer n+1, da andernfalls Werte für n=0 in der logarithmischen Skala nicht darstellbar sind

Der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman beträgt für die *live melanoma cells* $\rho=0,5433$ (Signifikanz $p=0,0041$), für die *dead melanoma cells* $\rho=0,6610$ (Signifikanz $p=0,0002$) und für die *total melanoma cells* $\rho=0,6827$ (Signifikanz $p=0,0001$). Es besteht also für alle drei im Durchflusszytometer gemessenen Tumorzellichten eine positive Korrelation mit den HMB45-Werten der LDI. Die höchste und signifikanteste

Korrelation ergibt sich, wenn man alle FC⁺ Zellen, egal ob *live* oder *dead*, mit einbezieht: *total melanoma cells*: $\rho=0,6827$.

Man erkennt außerdem einige Proben, die in der LDI positiv waren, im Durchflusszytometer allerdings negativ (die Proben, die direkt an der x-Achse liegen). Die in der LDI negativen Proben (MZD = 0) sind in dieser Graphik nicht zu sehen.

4.2.7 Proben mit MZD > 100

In Tab.4.8 sind wichtige vergleichende Zahlenwerte der sechs Proben mit MZD > 100 aufgeführt:

	MZD	<i>total melanoma cells/Mio</i> (in % der <i>total cells</i>)	<i>live melanoma cells/Mio</i> (in % der <i>total cells</i>)	<i>dead melanoma cells/Mio</i> (in % der <i>total cells</i>)	<i>live cells</i> (in % der <i>total cells</i>)	<i>dead cells</i> (in % der <i>total cells</i>)	<i>live melano ma cells/ live cells</i> in %	<i>dead melano ma cells/ dead cells</i> in%	Quo tient total mel ano ma cells /Mi o:M ZD
1	149	1625,61 (0,83%)	123,46 (0,06%)	1502,15 (0,77%)	55037 (28,3%)	139352 (71,7%)	0,04%	0,21%	10,9
2	233	564,81 (0,07%)	93,13 (0,011%)	471,68 (0,06%)	685248 (82,9%)	141580 (17,1%)	0,01%	0,28%	2,4
3	395	765,64 (0,17%)	329,09 (0,07%)	436,55 (0,10%)	120339 (26,9%)	326347 (73,1%)	0,12%	0,06%	1,9
4	2533	1604,88 (0,10%)	10,16 (0,0006%)	1594,72 (0,10%)	93128 (5,9%)	1482070 (94,1%)	0,02%	0,17%	0,63
5	7771	40697,77 (3,67%)	12348,54 (1,12%)	28349,23 (2,56%)	44280 (40%)	663352 (60%)	3,07%	4,72%	5,2
6	11586	23245,43 (2,62%)	1084,31 (0,12%)	22161,12 (2,51%)	806646 (91,2%)	77786 (8,8%)	0,12%	25,2%	2,00

Tab.4.8: Proben mit MZD > 100

Die Rate an *total melanoma cells/Mio* liegt bei allen Proben außer bei Nr. 4 höher als die MZD (Quotient *total melanoma cells/Mio*:MZD >1, siehe letzte Spalte) und macht einen Anteil von 0,07-3,67% der *total cells* aus. Die Rate an *live melanoma cells/Mio* ist außer bei Nr. 5 immer niedriger als die MZD und als die Rate an *dead melanoma cells/Mio*. Die durchflusszytometrischen Ergebnisse stimmen außer bei Nr.1 (eine Probe mit niedrigerer Gesamtzellzahl) und Nr. 5 besser mit der MZD überein, wenn man auch die toten Melanomzellen miteinbezieht. Dies passt zu den Ergebnissen für die gesamte

Probenpopulation (vgl. 4.2.6). Außer bei Nr. 2 und Nr. 6 sind anteilig immer weit mehr *dead cells* in der Probe enthalten als *live cells*.

Zwei Proben weisen außerdem weitere Besonderheiten auf: Nr. 6 besteht aus 91,2% *live cells* und 8,8% *dead cells*. Von letzteren sind ganze 25,2% allein als Melanomzellen detektiert worden, während von den *live cells* nur 0,12% Melanomzellen sind. Bei Nr. 5 finden wir durchflusszytometrisch mehr als fünfmal so viele Melanomzellen, als uns die MZD anzeigt (knapp 4% der gesamten Probe), und bei Nr. 6 doppelt so viele Melanomzellen (2,6% der gesamten Probe). Zur Interpretation dieser Beobachtungen vgl. 5.3.3.1.1.

4.2.8 Ausschluss unfixierter Proben

Unter der Hypothese, dass die Nicht-Konservierung nicht nur die Gesamtzellzahl, sondern auch Sensitivität und Spezifität beeinflusst, zeigen sich nach Ausschluss der 34 nicht in PFA konservierten Proben für die verbleibenden 71 Proben folgende Ergebnisse:

	Sensitivität in %	Spezifität in %
live melanoma cells	59,10	83,67
dead melanoma cells	77,27	73,47
total melanoma cells	100	73,47

Tab.4.9: Sensitivität und Spezifität unter Ausschluss nicht fixierter Proben

Im Vergleich mit den Ergebnissen für alle 105 Proben (s.a. Tab.4.7) sinkt die Sensitivität der *live melanoma cells*- Färbung um 2,4%, während die Sensitivitäten für die *dead* und die *total melanoma cells* um über 20 bzw. 50% auf 100% für *total melanoma cells* steigen. Die Spezifität sinkt für die *live melanoma cells* um 4, für die *dead melanoma cells* um 16 und die *total melanoma cells* um 18%.

Vergleicht man Spearman's ρ für die 21 in PFA fixierten HMB45⁺ Proben mit Spearman's ρ für alle HMB45⁺ Proben (n=26, inkl. nicht fixierter Proben) (vgl. 4.2.6 und Abb.4.11*), zeigen sich folgende Unterschiede:

	Spearman's ρ für fixierte Proben (n=21) (Spearman's ρ für n=26*)	Signifikanz p
live melanoma cells	0,5124↓ (0,5433)	0,0176
dead melanoma cells	0,7543↑ (0,6610)	< 0,0001
total melanoma cells	0,7602↑ (0,6827)	< 0,0001

Tab.4.10: Spearman's ρ für ausschließlich fixierte HMB45⁺ Proben

Der Korrelationskoeffizient für die *live melanoma cells* sinkt leicht, während er für die *dead* und die *total melanoma cells* um knapp 0,1 steigt. So lässt sich sagen, dass bei HMB45⁺ Proben die Korrelation der MZD mit der durchflusszytometrischen Tumorzellichte durch den Ausschluss nicht fixierter Proben nur wenig beeinflusst wird, die Sensitivitäten und Spezifitäten unserer Methode für alle Proben jedoch schon.

Dennoch sind die Ergebnisse aufgrund der verkleinerten Fallzahl vorsichtig zu beurteilen (vgl. 5.2.3).

4.3 Intrazelluläre Färbung

4.3.1 Verteilung der Proben

Mit der intrazellulären Färbung wurden insgesamt 53 WLK gefärbt. Davon waren 34 WLK (64,15%) immunzytologisch negativ (MZD=0) und 19 WLK positiv (35,85%) (MZD \geq 1). Von den positiven Lymphknoten hatten 12 (22,64%) eine MZD von \geq 1 bis \leq 100 und 7 (13,21,%) eine MZD von $>$ 100 (s. Abb.4.12).

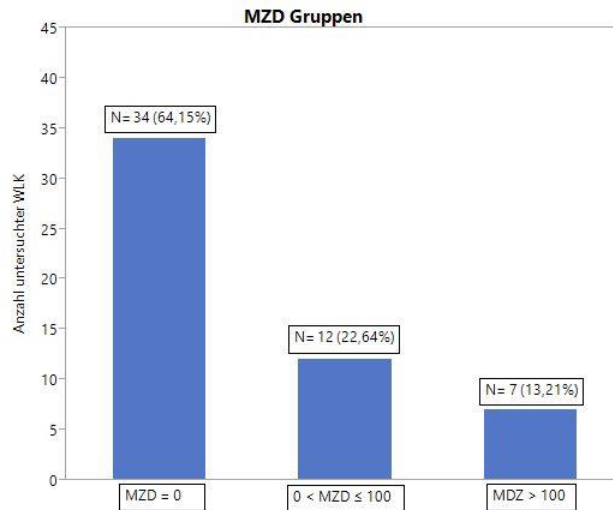


Abb.4.12: MZD-Gruppen

4.3.2 Verteilung der Gesamtzellzahl im Durchflusszytometer

Die Verteilung der von uns im Durchflusszytometer gemessenen Gesamtzellzahl (*total cells*) dieser 53 Proben ist durch den Boxplot in Abb. 4.13 veranschaulicht:

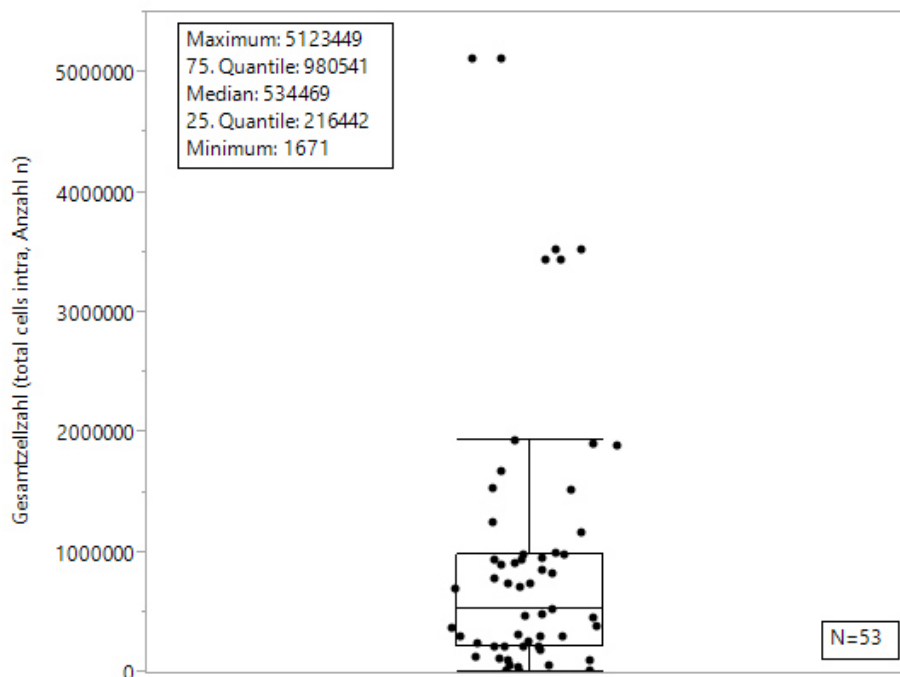


Abb. 4.13: Verteilung der Gesamtzellzahl

Die Bandbreite der gemessenen Zellen reicht also von 1671 bis über 5 Millionen.

Auf die drei MZD-Gruppen verteilen sich die Gesamtzellzahlen wie in Abb. 4.14 und Tab.4.11 ersichtlich:

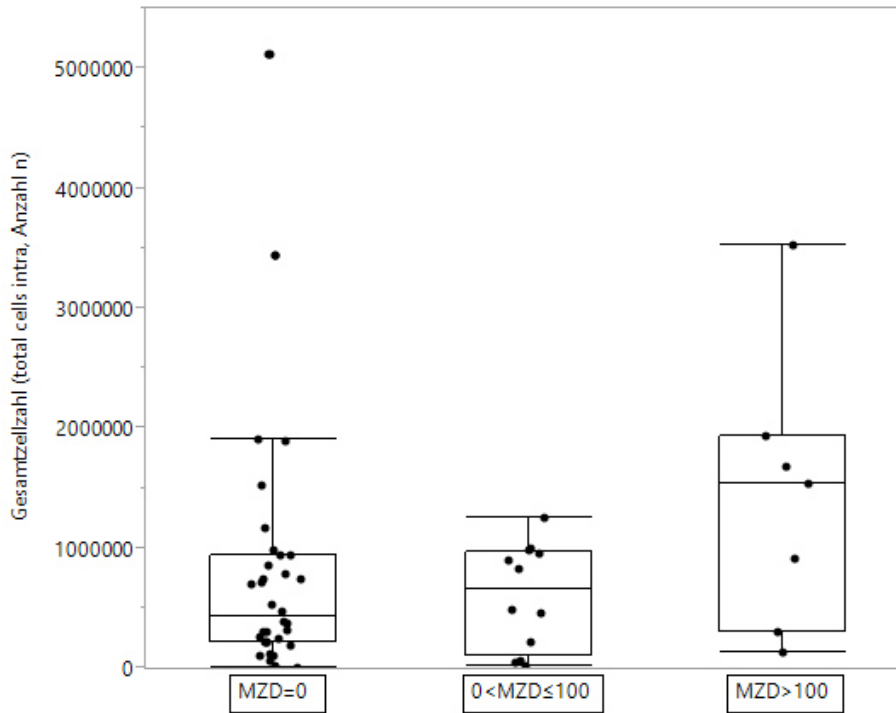


Abb. 4.14: Gesamtzellzahl einzelner MZD-Gruppen

	MZD Gruppe 1 (MZD =0)	MZD Gruppe 2 (0<MZD≤100)	MZD Gruppe 3 (MZD >100)
Anzahl N	34	12	7
Minimum	1671	13465	131858
25. Quantile	215600	99877	295372
Median	431224	662387	1536991
75.Quantile	938482	973389	1937600
Maximum	5123449	1247591	3522244

Tab.4.11: Verteilung der Gesamtzellzahl einzelner MZD-Gruppen

Auch hier ist, wie bei der extrazellulären Färbung (vgl. 4.2.2), der Median in Gruppe 3 höher als in Gruppe 1 und 2, was dafür sprechen könnte, dass eine HMB45-Positivität

Einfluss auf die Gesamtzellzahl hat. Aufgrund der zu unterschiedlichen Fallzahlen in den einzelnen Gruppen sehen wir aber von einem derartigen Rückschluss ab.

4.3.3 Konservierung mit PFA

Von 53 Lymphknoten wurden aufgrund der Erkenntnisse aus der extrazellulären Färbereihe (vgl. 3.2. und 4.1.2) 49 Proben (92,45%) in PFA konserviert und nur vier unkonserviert gelassen, weswegen wir hier die Gesamtzellzahlen nicht vergleichen.

4.3.4 Vierfeldertafeln, Sensitivität, Spezifität

Vergleichen wir zunächst die Anzahl der im Durchflusszytometer positiv (FC⁺) bzw. negativ (FC⁻) bewerteten Lymphknoten mit der Anzahl der immunzytologisch positiven bzw. negativen Lymphknoten (HMB45^{+/-}), zeigen sich je nach verwendetem Antikörper folgende Vierfeldertafeln:

4.3.4.1 Einfache Antikörper-Färbung

	FC ⁺	FC ⁻	Summe
HMB45 ⁺	19	0	19
HMB45 ⁻	34	0	34
Summe	53	0	53

Tab.4.12: Vierfeldertafel 9.2.27

	FC ⁺	FC ⁻	Summe
HMB45 ⁺	19	0	19
HMB45 ⁻	33	1	34
Summe	52	1	53

Tab.4.13: Vierfeldertafel beteb

	FC ⁺	FC ⁻	Summe
HMB45⁺	19	0	19
HMB45⁻	34	0	34
Summe	53	0	53

Tab.4.14: Vierfeldertafel C3

Für alle Antikörper-Färbungen ist auffällig, dass (mit einer Ausnahme bei der Färbung mit beteb) alle WLK im Durchflusszytometer positiv waren (0 FC⁻Lymphknoten). Dies bedeutet, dass jeder WLK für den jeweiligen Antikörper mindestens eine positive Zelle enthielt. Somit sind Rückschlüsse auf die Spezifität (die bei beteb aufgrund des einen negativen Lymphknotens 100% und bei 9.2.27 und C3 0% beträge) eigentlich nicht zu treffen.

Die Richtig-Positiv-Rate ist mit ca. 35% bei allen drei Antikörpern sehr niedrig, die Falsch-Positiv-Rate somit sehr hoch (63-64%).

4.3.4.2 Antikörper-Kombination

Die folgenden Tabellen zeigen die Vierfeldertafeln für die Färbung mit der Kombinationsfärbung:

	FC ⁺	FC ⁻	Summe
HMB45⁺	15	4	19
HMB45⁻	10	24	34
Summe	25	28	53

Tab.4.15: Vierfeldertafel 9.2.27⁺ und beteb⁺

	FC ⁺	FC ⁻	Summe
HMB45⁺	17	2	19
HMB45⁻	34	0	34
Summe	51	2	53

Tab.4.16: Vierfeldertafel 9.2.27⁺ und C3⁺

	FC ⁺	FC ⁻	Summe
HMB45⁺	14	5	19
HMB45⁻	13	21	34
Summe	27	26	53

Tab.4.17: Vierfeldertafel beteb⁺ und C3⁺

	FC ⁺	FC ⁻	Summe
HMB45⁺	14	5	19
HMB45⁻	4	30	34
Summe	18	35	53

Tab.4.18: Vierfeldertafel triple positive cells

Bei der Kombination von Antikörpern waren nicht alle WLK durchflusszytometrisch positiv. Stellt man nun die durchflusszytometrischen Ergebnisse bei der Färbung mit einer Antikörperkombination den Ergebnissen der LDI entgegen, ergeben sich zum großen Teil höhere Sensitivitäten und Spezifitäten als bei der einfachen Antikörperfärbung. Die höchste Sensitivität erreichen wir bei der Dreifachkombination von 9.2.27, beteb und C3 mit $14/18=77,78\%$. Die Kombination von 9.2.27+beteb erreicht eine Sensitivität von 60%, während bei der Kombination von beteb+C3 nur etwas mehr als die Hälfte der untersuchten WLK richtig positiv ist (51,85%). Die Kombination von 9.2.27+C3 erreicht eine ähnlich niedrige Sensitivität wie die der Einfachfärbungen. Ihre Spezifität ist mit 0 nicht verwertbar. Nur zwei WLK waren durchflusszytometrisch negativ, die allerdings immunzytologisch beide positiv waren.

Die Zweifachkombination 9.2.27+beteb hat mit 85,71% eine gleich hohe Richtig-Negativ-Rate wie die Dreifachkombination, während die Kombination beteb+C3 eine Spezifität von 80,75% erreicht.

Zusammenfassung und Vergleich

In Tab.4.19 ist ein Vergleich der Sensitivitäten und Spezifitäten für die einzelnen Antikörper bzw. ihre Kombinationen zu sehen:

	Sensitivität in %	Spezifität in %
9.2.27	35,85%	0
beteb	36,53%	100
C3	35,85%	0
9.2.27+beteb	60%	85,71%
9.2.27+C3	33,33%	0
beteb+C3	51,85%	80,76%
triple positive cells	77,78%	85,71%

Tab.4.19: Vergleich Antikörperkombinationen

Die nicht verwertbaren Zahlen für Spezifität sind in der Tabelle grau hinterlegt. Die besten Ergebnisse für Sensitivität und Spezifität im Durchflusszytometer zeigen die dreifachkombinierten *triple positive cells*. Die gleiche Spezifität hat die Kombination von 9.2.27 und beteb, während die Sensitivität mit 60% jedoch geringer ist als die der Dreifachkombination. Zur Diskussion dieser Ergebnisse siehe 5.3.4ff.

4.3.5 Korrelation von Durchflusszytometrie und LDI für Proben mit MZD > 0

4.3.5.1 Einfache Antikörper-Färbung

Stellt man nun die MZD der HMB45⁺ Proben (n=19) den jeweiligen Antikörperraten (9.2.27⁺ Zellen/Mio, beteb⁺ Zellen/Mio, C3⁺ Zellen/Mio) graphisch gegenüber und ermittelt den Korrelationskoeffizienten der beiden Parameter, ergibt sich folgendes

Schaubild:

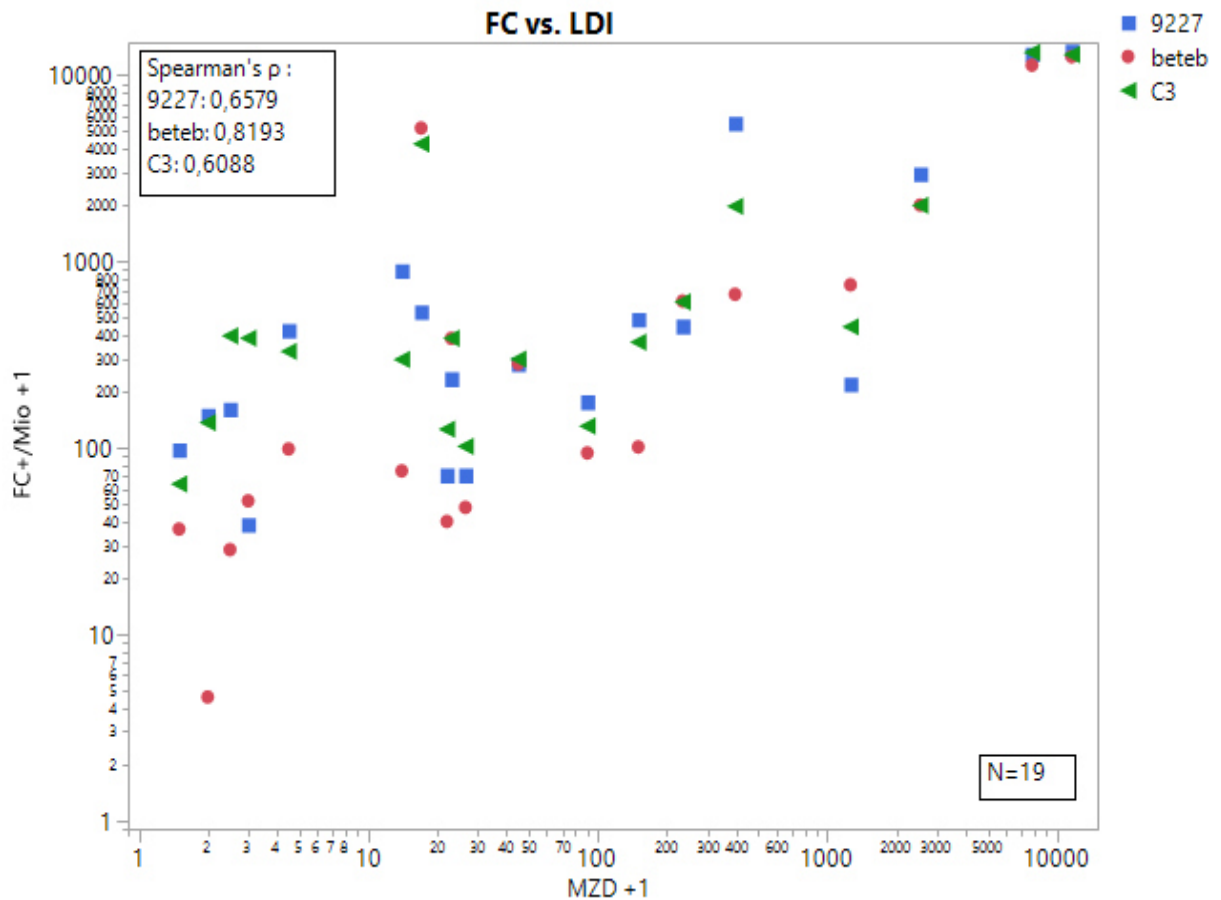


Abb.4.15 FC vs. LDI für Proben mit MZD > 0: blau: 9.2.27, rot: beteb, grün: C3, Graph in logarithmischer Skala; Werte immer n+1, da andernfalls Werte für n=0 in der logarithmischen Skala nicht darstellbar sind

Betrachtet man die Graphik und vergleicht schließlich den Korrelationskoeffizienten Spearman's ρ , so sieht man zunächst, dass alle drei Antikörper positiv mit der MZD korrelieren ($\rho > 0$). Den höchsten Korrelationskoeffizienten hat hierbei die Anzahl von beteb⁺ Zellen pro Million (Spearman's $\rho=0,8193$, $p<0,0001$), d.h. die durchflusszytometrische beteb-Rate korreliert am besten mit der MZD.

4.3.5.2 Antikörperkombination

Stellt man nun die MZD den Ergebnissen der Kombination von Antikörpern (Zwei- oder Dreifachkombination, d.h. 9.2.27+beteb/Mio, 9.2.27+C3/Mio, beteb+C3/Mio, *triple positive cells*/Mio) gegenüber, ergibt sich folgende Graphik:

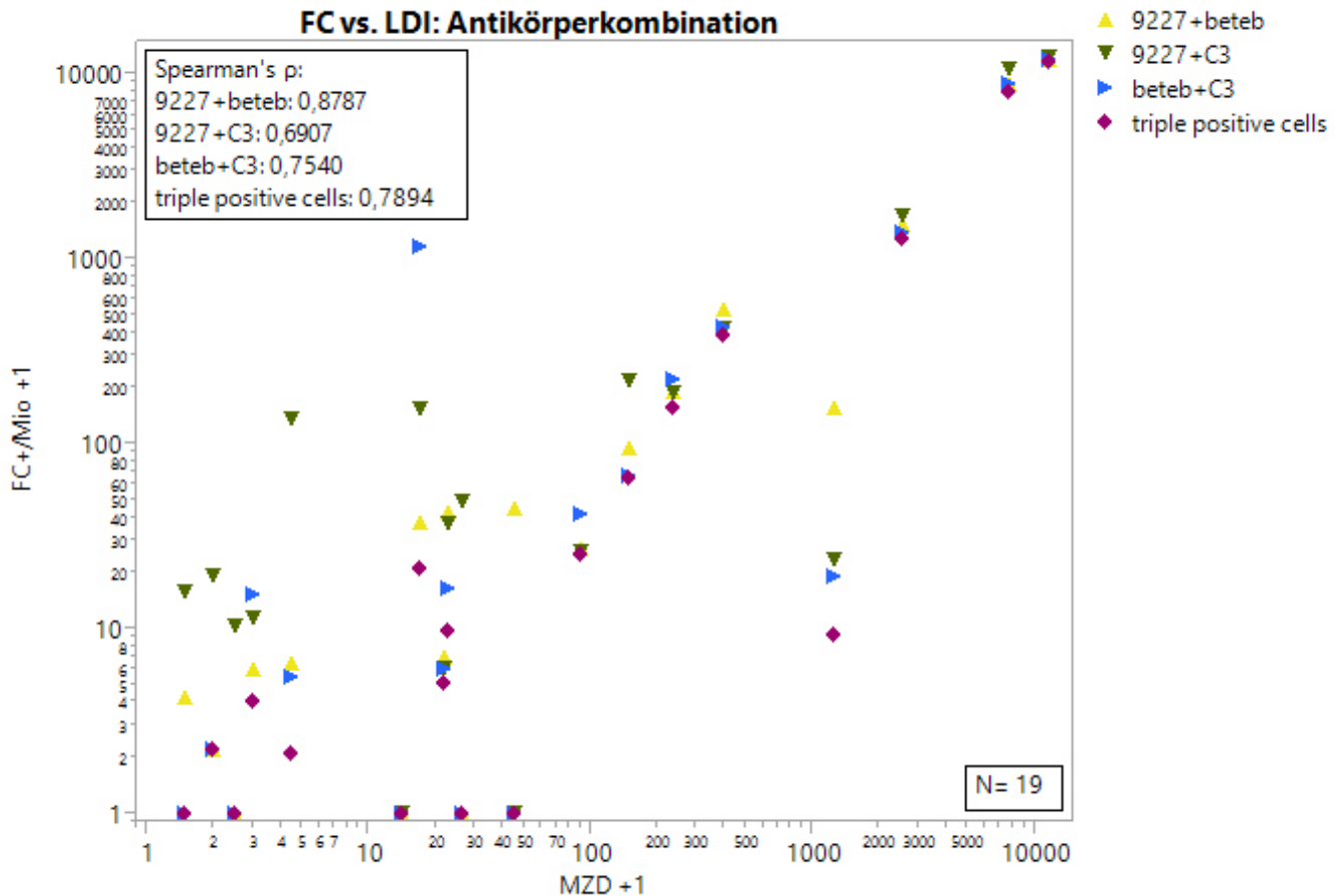


Abb.4.16 FC vs. LDI für Proben mit MZD > 0: gelb: 9.2.27+beteb, olivgrün: 9.2.27+C3, hellblau: beteb+C3, lila: *triple positive cells*. Graph in logarithmischer Skala, Werte immer n+1, da andernfalls Werte für n=0 in der logarithmischen Skala nicht darstellbar sind

Auch hier sieht man graphisch und am Korrelationskoeffizienten Spearman's ρ , dass alle Antikörperkombinationsraten positiv mit der MZD korrelieren. Den höchsten Korrelationskoeffizienten hat hierbei die Rate an Zellen, die gleichzeitig für 9.2.27 und beteb positiv sind (9.2.27+beteb) mit $\rho=0,8787$ ($p < 0,0001$).

In der Graphik sind außerdem fünf Proben zu sehen, die in der LDI positiv sind, durchflusszytometrisch aber negativ (die Proben, die unten an der x-Achse liegen).

4.3.5.3 Zusammenfassung

In Tab.4.20 vergleichen wir die Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman und ihre Signifikanzen für die einzelnen Antikörper und -kombinationen in aufsteigender Reihenfolge:

	Spearman's ρ	Signifikanz p
C3	0,6088	0,0057
9.2.27	0,6579	0,0022
9.2.27+C3	0,6907	0,0011
beteb+C3	0,7540	0,0002
triple positive cells	0,7894	< 0,0001
beteb	0,8193	< 0,0001
9.2.27+beteb	0,8787	< 0,0001

Tab.4.20: Vergleich Spearman's ρ und Signifikanz p

Es lässt sich somit zeigen, dass eine positive Korrelation aller durchflusszytometrischen Tumorzellichten mit der MZD besteht. Die niedrigste Korrelation gibt es bei der Einzelfärbung mit C3 und die höchste Korrelation bei der Einzelfärbung mit beteb und der Kombination aus 9.2.27+beteb.

4.3.6 „Grundpositivität“ der Durchflusszytometrie

In Tab.4.21 ist die Verteilung der Werte (Anzahl n/Mio) für die einzelnen Antikörper und im Vergleich mit dem HMB45 bei der LDI (letzte Spalte) zu sehen:

	9.2.27	beteb	C3	9.2.27+ beteb	9.2.27+C3	beteb+C3	triple positive cells	HMB45
Minimum	20	0	13	0	0	0	0	0
25.Quantile	98	24	122	0	9	0	0	0
Median	234	47	298	0	27	0	0	0
75.Quantile	627	159	584	8	142	8	4	15
Maximum	13483	12588	13256	11926	12160	12005	11639	11586

Tab.4.21: „Grundpositivität“

Betrachtet man die Minima der einzelnen Antikörper (Spalte 1-3 der Tabelle), fällt auf, dass kein einziger Lymphknoten für 9.2.27 und C3 negativ war, d.h. dass eine Art „positives Grundrauschen“ besteht. Bei der 9.2.27-Färbung hatten also alle Lymphknoten 20 oder mehr positive Zellen pro Million, bei der C3-Färbung 13 oder mehr positive Zellen pro Million. Weiterhin gab es nur einen einzigen Lymphknoten, der für beteb negativ war (Minimum=0). Ließe man diesen einen Lymphknoten weg, könnte man für die Einfachfärbung mit beteb ebenfalls von dieser „Grundpositivität“ ausgehen. Im Vergleich dazu betrug die MZD der LDI bei insgesamt 34 Lymphknoten 0 (s.a. 4.3.2).

Vergleicht man die Boxplot-Verteilungen für die einzelnen Antikörper mit der Verteilung der MZD (letzte Spalte), sieht man, dass nicht nur das Minimum, sondern auch alle anderen durchflusszytometrischen Werte durchweg höher sind als bei der LDI. Dies ist auch in folgender Abbildung veranschaulicht:

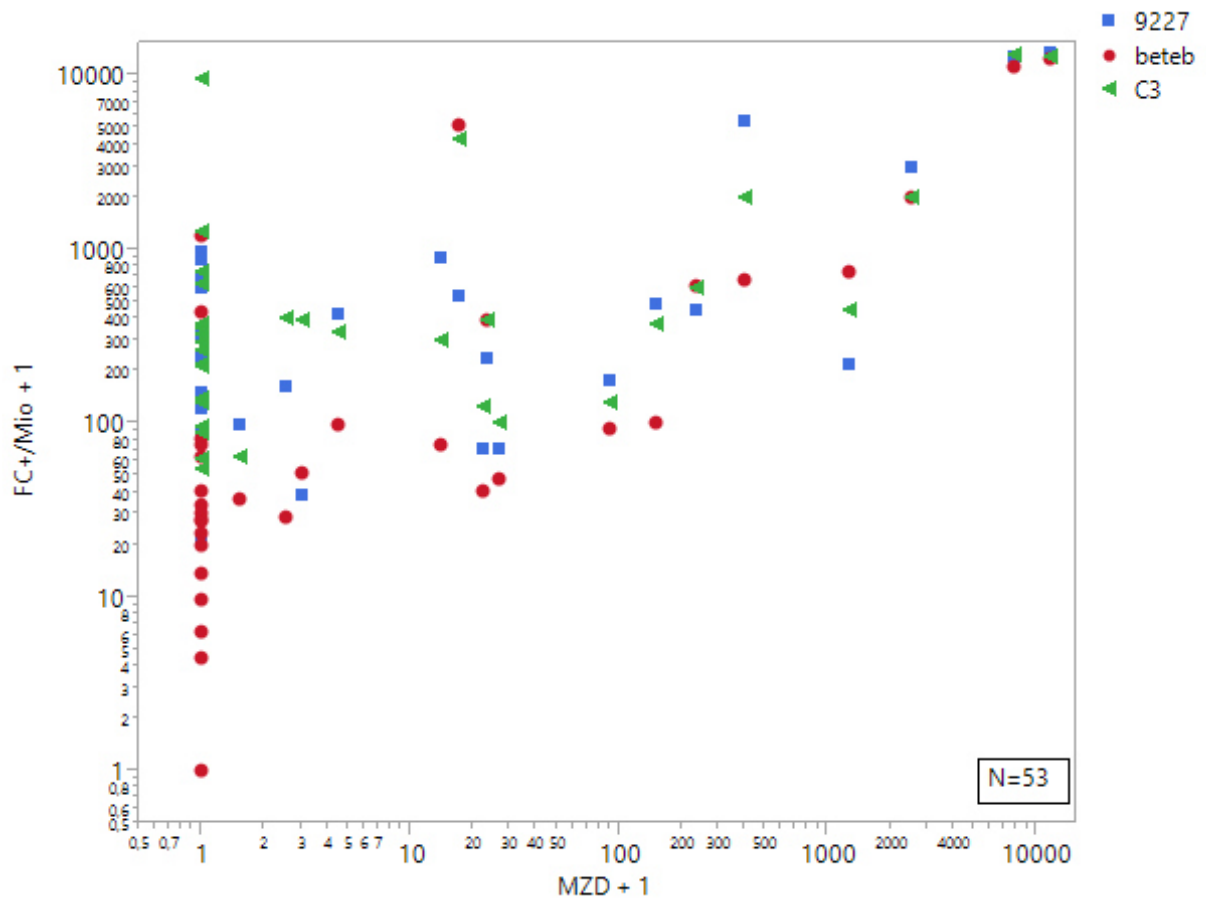


Abb. 4.17: Positives „Grundrauschen“ bei der intrazellulären Färbung: blau: 9.2.27, rot: beteb, grün: C3. Graph in logarithmischer Skala, Werte immer $n+1$, da andernfalls Werte für $n=0$ in der logarithmischen Skala nicht darstellbar sind. Aufgetragen ist die MZD gegenüber der durchflusszytometrischen Tumorzellichte der Einfachfärbung aller 53 intrazellulär gefärbten Proben. Es ist zu sehen, dass die durchflusszytometrischen Werte zum größten Teil höher als die der LDI sind und es nur eine einzige MZD-negative Probe gab, die durchflusszytometrisch ebenfalls eine Tumorzellichte von 0/Mio hatte.

Diese Grundpositivität der einfachen Antikörper-Färbung ist auch verantwortlich für die nicht verwertbaren Spezifitäts-Werte (vgl. Tab.4.19).

Am ehesten ähneln der Verteilung der HMB45-Werte aus Tab.4.21 die 9.2.27+beteb-, beteb+C3-sowie die *triple positive cells*-Rate (vierte, sechste und vorletzte Spalte von Tab.4.21). Zur kritischen Beurteilung dieser Ergebnisse siehe auch 5.3.5.2.

4.3.7 Vergleich MZD und Tumorzellichte bei Proben mit MZD > 100

Bei den Proben mit einer MZD > 100 sehen wir teilweise große Unterschiede zwischen der MZD und der von uns im Durchflusszytometer berechneten Tumorzellichte. Vgl. dazu folgende Tabelle:

		EXTRA	INTRA			
WLK-Nr.	MZD	<i>total melanoma cells/Mio (Quotient total melanoma cells/Mio:MZD)</i>	<i>9.2.27⁺/Mio (Quotient 9.2.27⁺/Mio:MZD)</i>	<i>beteb⁺/Mio (Quotient beteb⁺/Mio:MZD)</i>	<i>9.2.27+beteb/Mio (Quotient 9.2.27+beteb⁺/Mio:MZD)</i>	<i>triple positive cells/Mio (Quotient triple positive cells/Mio:MZD)</i>
1	149	1625,61 (10,9)	489,27 (3,3)	100,2 (0,7)	94,34 (0,6)	63,76 (0,4)
2	233	564,81 (2,4)	449,34 (2,00)	613,05 (2,6)	192,26 (0,8)	157,11 (0,7)
3	395	765,64 (1,9)	5532,00 (14)	666,96 (1,7)	531,53 (1,3)	389,34 (0,98)
4	1259	-	218,83 (1,2)	749,38 (0,6)	154,83 (0,1)	8,26 (0,006)
5	2533	1604,88 (0,6)	2957,73 (1,2)	2009,74 (0,8)	1531,95 (0,6)	1281,68 (0,5)
6	7771	40697,77 (5,2)	13016,02 (1,7)	11333,3 (1,5)	8964,43 (1,2)	8113,23 (1,04)
7	11586	23245,43 (2,0)	13483,17 (1,2)	12588,28 (1,1)	11926,49 (1,03)	11638,89 (1,00)

Tab.4.22 Vergleich MZD und durchflusszytometrische Tumorzellichte, je nach Färbestrategie und Antikörper. Zur Vereinfachung sind hier in den einzelnen Spalten nur die Antikörper (-Kombinationen) aufgeführt, die die besten Ergebnisse zeigten. Die schwarz gedruckte Zahl entspricht jeweils der durchflusszytometrischen Tumorzellichte, während die blau gedruckte den Quotienten Tumorzellichte/MZD und so einen Vergleich beider Werte zeigt

Insbesondere bei der extrazellulären Färbestrategie ist die durchflusszytometrische Tumorzellichte ist bis zu 10,9-mal so groß wie die MZD, während bei der intrazellulären Färbestrategie der Quotient bei 0,006-3,3 liegt. Zur Interpretation dieser Beobachtung vgl. 5.3.6.

4.3.8 Ausschluss unfixierter Proben

Für die intrazelluläre Färbung ergab der Ausschluss von nur 4 nicht konservierten Proben keinen nennenswerten Unterschied weder für die Sensitivität und Spezifität noch für Spearman's ρ .

4.4 Vergleich extra- und intrazelluläre Färbung

4.4.1 Korrelation extra- versus der intrazellulären Tumorzellichte für Proben mit $MZD \geq 0$

Trägt man die durchflusszytometrische Tumorzellichte der extrazellulären 9.2.27-Färbung (*total melanoma cells*) gegen die Ergebnisse der intrazellulären Färbung (9.2.27 alleine, 9.2.27+beteb und *triple positive cells*) auf, ergibt sich folgende Graphik:

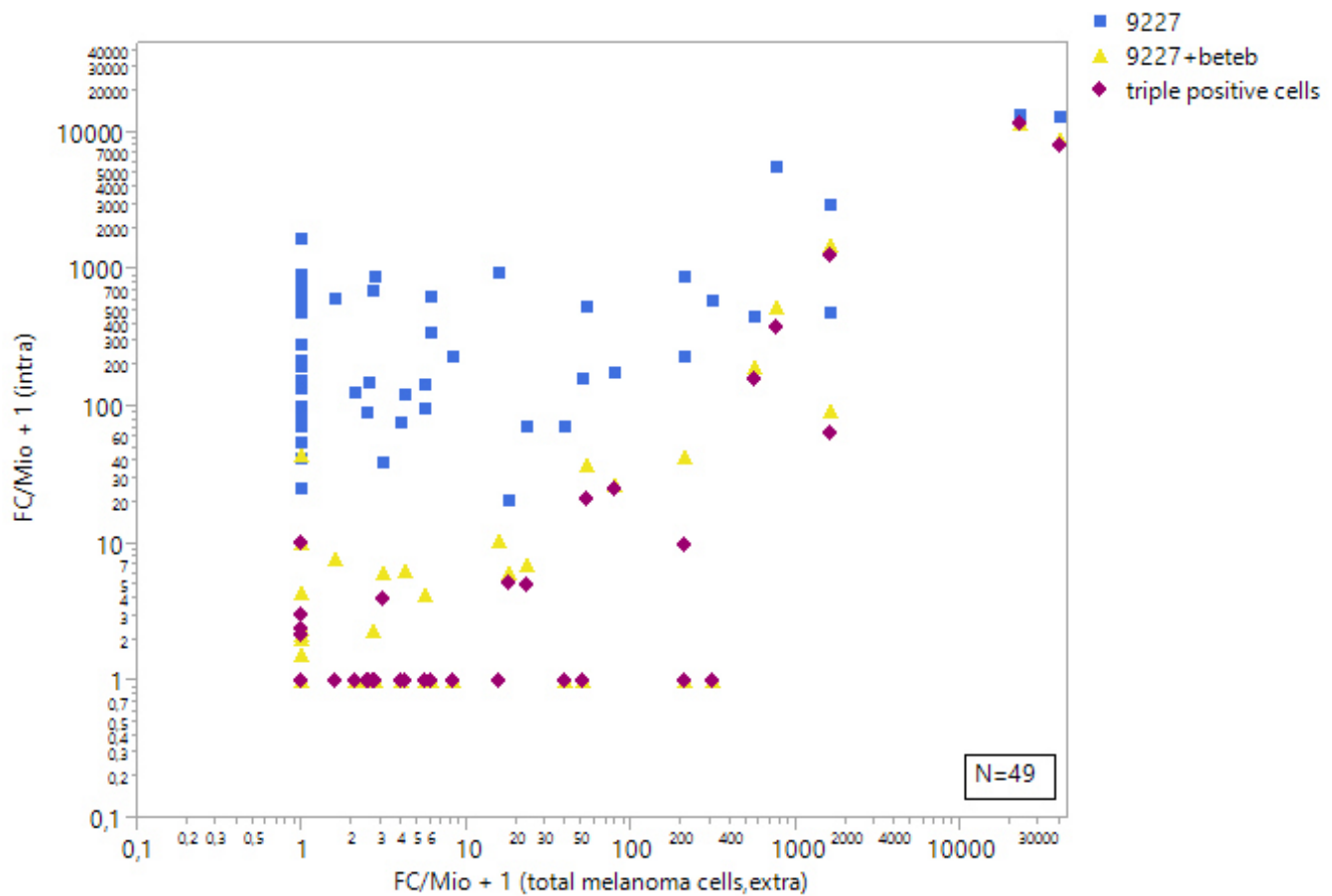


Abb. 4.18 Extra- vs. intrazelluläre Tumorzellichte. blau: 9.2.27, gelb: 9.2.27+beteb, lila: *triple positive cells*. Graph in logarithmischer Skala, Werte immer $n+1$, da andernfalls Werte für $n=0$ in der logarithmischen Skala nicht darstellbar sind.

Es ist zu sehen, dass die insgesamt 19 bei der extrazellulären Färbung als negativ befundenen Lymphknoten (*total melanoma cells*/Mio = 1 ($\cong 0$)) bei der intrazellulären Färbestrategie (vor allem der alleinigen 9.2.27-Färbung, blaue Quadrate) viel höhere Tumorzellichten zeigen (bis hin zu 1707/Mio vs. 0/Mio bei der extrazellulären Färbung). Diese Proben sieht man nah an der y-Achse. Auch umgekehrt ist dies der

Fall. Hier enthalten ebenfalls einige Proben, die bei der intrazellulären Färbung (9.2.27+beteb oder triple positive cells = 1, ganz unten an der x-Achse) keine Melanomzellen enthielten, bis zu 312 total melanoma cells/Mio (lilafarbene Rauten, gelbe Dreiecke). Die Tumorzellichten sind also je nach Antikörper bzw. Färbestrategie für alle 49 gemessenen negativen und positiven Proben sehr unterschiedlich.

4.4.2 Korrelation der Tumorzellichten beider Färbestrategien für Proben mit MZD>0

Betrachtet man nun ausschließlich die positiven Proben (MZD>0, n=17) und vergleicht die Tumorzellichten der extra- mit denen der intrazellulären Färbung, ergibt sich folgende Grafik mit folgenden Korrelationskoeffizienten:

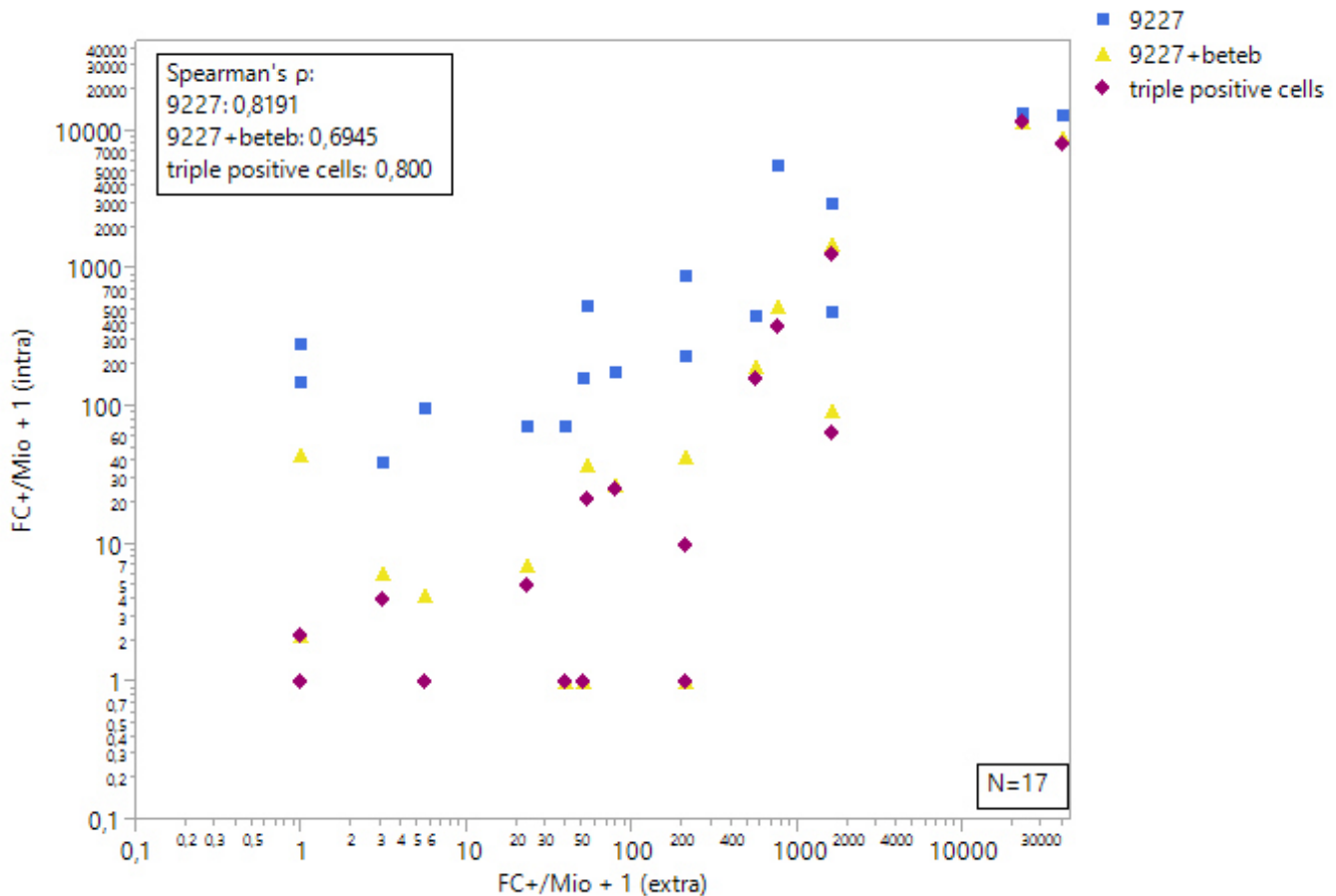


Abb. 4.19 Extra- vs. intrazelluläre Tumorzellichten für Proben mit MZD>0. blau: 9.2.27, gelb: 9.2.27+beteb, lila: triple positive cells. Graph in logarithmischer Skala, Werte immer n+1, da andernfalls Werte für n=0 in der logarithmischen Skala nicht darstellbar sind. Signifikanz für Spearman's ρ : p=0,0020 (9.2.27+beteb) bzw. <0,0001 (9.2.27, triple positive).

In Abb. 4.19 ist zunächst sehen, dass bei den 17 positiven Proben die Tumorzellichten der extra- mit denen der intrazellulären Färbestrategie positiv korrelieren. Die Ergebnisse der alleinigen 9.2.27-Rate (9.2.27-PE bei der extra- und 9.2.27-Ax647 bei der intrazellulären Färbestrategie, blaue Quadrate) korrelieren hierbei wie erwartet am besten miteinander (Spearman's $\rho=0,8191$). Schließt man die zwei nicht fixierten Proben aus, ergibt sich für die verbleibenden 15 positiven Proben ein Korrelationskoeffizient von 0,8893 für die alleinige 9.2.27- Färbung (Signifikanz $p<0,0001$). Spearman's ρ für 9.2.27+beteb betrug dann 0,7491 ($p=0,0013$) und für triple positive cells=0,7601 ($p=0,0010$).

So lässt sich insgesamt zeigen, dass bei den 17 (bzw. 15) positiven Proben die jeweilige Tumorzellichte beider Färbestrategien positiv bis hin zu knapp 90% miteinander korreliert.

5 Diskussion

5.1 Zusammenfassung der Hauptergebnisse

In unserer Arbeit wurden insgesamt 105 WLK extrazellulär und 53 WLK intrazellulär durchflusszytometrisch gefärbt. Die WLK stammten alle von Melanompatienten der Universitäts-Hautklinik Tübingen, die eine Tumordicke von mindestens 1,0 mm, keine lymphogenen oder hämatogenen Makrometastasen hatten und bei denen mittels Lymphoszintigraphie einer oder mehrere WLK identifiziert und exzidiert wurden.

5.1.1 Extrazelluläre Färbung

Es ergab sich zum einen, dass die MZD möglicherweise einen Einfluss auf die durchflusszytometrisch messbare Gesamtzellzahl hat. Zum anderen zeigen unsere Ergebnisse, dass eine vorherige Konservierung der Proben mit PFA die Zahl der im Durchflusszytometer zur Verfügung stehenden Zellzahlen erhöht. Die Sensitivität der extrazellulären Färbung mit dem 9.2.27 war mit 61,5% für *live melanoma cells* am höchsten, während deren Spezifität mit 87,34% geringfügig niedriger war als diejenige für *total melanoma cells* (91,91%). Alle drei im Durchflusszytometer gemessenen

Tumorzelldichten (*live melanoma cells*, *dead melanoma cells*, *total melanoma cells*) der Proben mit $MZD > 0$ korrelierten positiv mit der LDI von Ulmer, den höchsten Korrelationskoeffizienten hatten hierbei die *total melanoma cells* mit $\rho=0,6827$.

Schließt man die 34 unfixierten Proben aus, steigt bei den 71 verbleibenden Proben die Sensitivität der 9.2.27- Färbung für *dead* und *total melanoma cells* um 20%, während diejenige für *live melanoma cells* leicht sinkt. Die Spezifität für alle drei Tumorzelldichten sinkt um 4 (*live melanoma cells*) bis 18% (*total melanoma cells*).

Die Korrelation der MZD mit der durchflusszytometrischen Tumorzelldichte bei Proben mit einer $MZD > 0$ wird durch den Ausschluss nicht fixierter Proben nur wenig beeinflusst.

5.1.2 Intrazelluläre Färbung

Wieder ergab sich, dass die MZD wahrscheinlich einen Einfluss auf die durchflusszytometrisch gemessene Gesamtzellzahl hat. Am höchsten waren Sensitivität und Spezifität für die Dreifachkombination der Antikörper (*triple positive cells*) mit einer Richtig-Positiv-Rate von 77,78% und einer Richtig-Negativ-Rate von 85,71%. Die höchste Korrelation der durchflusszytometrische Tumorzelldichte mit der MZD bei Proben mit $MZD > 100$ zeigten die Kombinationsfärbung von 9.2.27+beteb mit $\rho=0,8787$ und die Einfachfärbung mit beteb ($\rho=0,8193$). Insgesamt zeigte sich bei der Einfachfärbung mit 9.2.27, beteb oder C3 eine „Grundpositivität“ der Proben, d.h. kaum oder keine negativen Proben. Aus diesen Gründen war die Spezifität nicht auswertbar.

5.1.3 Vergleich extra- und intrazelluläre Färbung

Für die 49 mit beiden Färbestrategien gemessenen Proben sind je nach Antikörper die Tumorzelldichten z.T. sehr unterschiedlich, was zum großen Teil auf die o.g. „Grundpositivität“ der intrazellulären Färbung zurückzuführen ist. Aber auch umgekehrt gab es einige Proben, die intrazellulär negativ und extrazellulär stark positiv waren. Bei den 17 positiven Proben korreliert die jeweilige Tumorzelldichte beider Färbestrategien mit einem Korrelationskoeffizienten von $\rho=0,6945-0,8191$.

5.2 Methodenkritik

In dieser Arbeit ging es grundsätzlich darum, die durchflusszytometrische Analyse von WLK von Melanompatienten zu etablieren sowie die Messergebnisse dieser neuen Diagnosemethode mit denen der LDI von Ulmer 2014 [41] zu vergleichen.

Die Durchflusszytometrie als Methode wurde aufgrund der Möglichkeit der genauen Quantifizierung von Melanomzellen im WLK durch Analyse jeder einzelnen Zelle, der hohen Analysegeschwindigkeit und der Objektivität bei der Auswertung gewählt.

Zur Etablierung der Methode begannen wir zunächst mit einer Messreihe, die nur mit einem melanomzellspezifischen Antikörper gefärbt wurde. In der zweiten Messreihe verwendeten wir dann insgesamt drei melanomzellspezifische Antikörper, um Sensitivität und Spezifität der Durchflusszytometrie zu erhöhen. Da die Etablierung der beiden Messreihen Lymphknotenproben und Zeit in Anspruch nahm, konnten letztlich nicht alle 154 Proben in die Auswertung mit einbezogen werden. Zudem wurden insgesamt 29 Proben aus der Auswertung ausgeschlossen, da mehrere Proben von einem Patienten stammten. Für die erste Messreihe standen am Ende 109 und für die zweite Messreihe 53 WLK zur Verfügung (s. Abb.4.3). Dies macht die Auswertung natürlich uneinheitlich, beide Messreihen lassen sich nur bedingt miteinander vergleichen.

5.2.1 Selektion große WLK

Es ist zu erwähnen, dass eine Selektion der Patienten durchgeführt wurde, indem nur WLK durchflusszytometrisch untersucht wurden, bei denen nach der LDI noch genügend Material übrig war, d.h. vor allem größere Lymphknoten mit größerer Zellzahl. Es lässt sich diskutieren, ob dies einen Einfluss auf unsere Statistik hat, d.h. ob zum Beispiel weniger Lymphknoten mit kleinerem melanozytären Befall untersucht wurden. Dies hätte die Hypothese zur Voraussetzung, dass Proben mit kleiner Zellzahl grundsätzlich eher eine geringe MZD haben bzw. dass Proben mit geringer MZD insgesamt kleiner sind. Wie in 4.2.2 zu sehen, lässt sich dies allerdings nicht eindeutig zeigen.

5.2.2 Selektion Tumordicke

Die zweite Selektion, die gemacht wurde, geschah schon von vornherein, indem nur bei einer Tumordicke von $\geq 1,0$ mm der WLK herausoperiert und auf Metastasen untersucht wurde. Vielleicht hätte unsere Methode auch bei dünneren Melanomen Metastasen im WLK gefunden? Allerdings muss bei dünneren Melanomen nicht von einer Metastasierung ausgegangen werden. Auch in unserer Arbeit hatte die Mehrheit der Patienten (74,31%) keine Mikrometastasen (MZD=0). Somit dürfte diese Selektion nicht zu einer Verfälschung der Ergebnisse geführt haben.

Insgesamt muss man also betonen, dass unsere Ergebnisse auf einem selektierten Patientenkollektiv (1 WLK pro Patient, Patienten mit Tumordicke $\geq 1,0$ mm und WLK mit großen Zellzahlen) beruht. Da das Ziel in unserer Arbeit aber in erster Linie der Vergleich durchflusszytometrischer mit immunzytologischen Ergebnissen von Ulmer war und so jede verwendete Probe „mit sich selbst“ verglichen wurde, ist diese Selektion zunächst als unproblematisch zu betrachten.

5.2.3 Probenvorbereitung und Zellzahlverlust

Je nach Größe, Anzahl und Beschaffenheit der WLK-Proben ergaben sich während der LDI unterschiedliche Zubereitungs-, Inkubations- und Zentrifugationszeiten (vgl. 1.2.3 „Aufarbeitung des Lymphknotens“). So wurden jeden Tag zu unterschiedlichen Zeiten Proben mit unterschiedlichen Zellmengen für die Durchflusszytometrie bereitgestellt. Die extrazelluläre Färbeprozedur und Messung eines WLK dauerte durchschnittlich ca. 1,5-2 Stunden, die aufwändigere intrazelluläre Färbung ungefähr doppelt so lang. So mussten Färbung und Messung jeden Tag je nach Anzahl und der jeweiligen Zellmenge pro WLK neu terminiert werden. Reichte ein ganzer Tag nicht aus, mussten Färbung und/oder Messung auf den nächsten Tag verschoben werden. So gingen die ohnehin verschieden beschaffenen Proben alle in unterschiedlichen „Ausgangspositionen“ in die Messung.

Zu erwähnen ist weiterhin, dass die durchflusszytometrische Methode während ihrer Durchführung (Waschen, Färben, Messen) einen sehr hohen Zellzahlverlust mit sich bringt. Im Mittel standen nach der LDI für die Durchflusszytometrie der extrazellulären Färbung ca. 12 Millionen Zellen (Median, gemessen in der Neubauer-Zählkammer) pro

WLK zur Verfügung. Nach Waschen, Färben und erneutem Waschen wurden dann aber im Mittel nur 331.039 echte Zellen (Median) pro WLK im Durchflusszytometer gemessen. Ähnlich ist dies bei der intrazellulären Färbung: es standen im Mittel 10 Millionen (Median) Zellen pro WLK zur Verfügung, gemessen wurden am Ende aber nur 534.469 Zellen (Median). Zwischen Messung der Vitalität und Beginn unserer Methode vergingen oftmals Stunden bis Tage, sodass davon ausgegangen werden muss, dass die Vitalität und somit die Anzahl intakter, durchflusszytometrisch messbarer Zellen immer weiter sinken.

Gründe hierfür waren zum einen die Notwendigkeit einer Filtration wegen der teilweise starken Verklumpung und die 10-11 Waschschritte (vgl. 3.2), bei denen durch das Abkippen nach der Zentrifugation immer einige Zellen verloren gehen. Auch das Aufteilen der Probe in Aliquots für die Negativkontrolle und Hochrechnung der Gesamtzellzahl führt zu einem gewissen Verlust an Zellen.

Zum anderen könnte der Zellzahlverlust durch die Aufbewahrung der Proben in purem PBS zu erklären sein (vgl. 3.2 und 5.3.3.1.1). PBS enthält weder Proteine noch Zuckermoleküle [88]. In verschiedenen Studien ist erwiesen, dass ein Protein- und Glucoseentzug zu einer Induktion der Apoptose einer Zelle führt [89,90]. Einen indirekten Hinweis darauf, dass PBS nicht das geeignete Medium für durchflusszytometrisch zu messende Zellen ist, geben andere Studien, in denen die Zellen nicht in PBS, sondern in RPMI mit Zusätzen wie z.B. fetalem Kälberserum oder Aminosäuren aufbewahrt wurden [83,86,91].

So stand für die eigentliche durchflusszytometrische Messung nur ein Teil der ursprünglichen Zellmenge zur Verfügung. Dieser Bruchteil wiederum enthielt zum Teil Debris, welcher bei der Auswertung ebenfalls ausgeschlossen werden musste (vgl. Abb. 5.1).

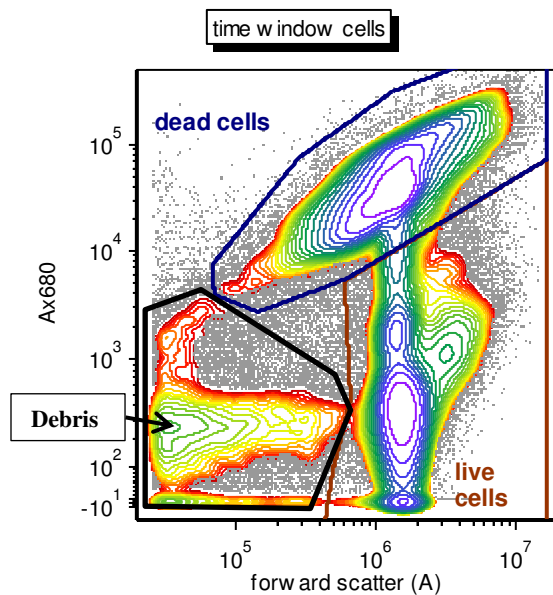


Abb. 5.1: Zelldebris. Die im unteren linken Quadranten liegende Zellpopulation außerhalb der *gates* für *dead* und *live cells* ist Zelldebris, das aus der Auswertung ausgeschlossen wird.

Aufgrund der hohen Zellverluste wird schließlich nur ein kleiner Teil des WLK überhaupt auf Metastasen untersucht. Die Durchflusszytometrie im von uns verwendeten Protokoll ist also nur bei sehr hohen Zellzahlen anwendbar, da hier nach der Wasch- und Färbeprozedur zumindest noch ein erschwinglicher Anteil für die Messung zur Verfügung steht.

Zum Teil konnte der Verlust an Zellen durch die vorherige Fixierung in PFA verbessert werden. Die Fixierung mit PFA und das Filtrieren der Suspension ins Rundboden-Röhrchen verminderte nicht nur makroskopisch die Verklumpung und die Verstopfung der Messnadel durch das Durchflusszytometer, sondern führte auch zu einer höheren Gesamtzellzahl im Durchflusszytometer (siehe 4.2.3).

PFA in niedriger Konzentration sorgt dafür, dass die Antigen-Eigenschaften und *scatter*-Kriterien der Zellen weitgehend erhalten bleiben [82]. Je nach Konzentration und Einwirkdauer des PFA wird die Zellmembran aber auch durchlässig und die Wahrscheinlichkeit für unspezifische Bindungen der extrazellulären Antikörper im Zellinneren und für Autofluoreszenz steigt [82,83,92]. Unter Ausschluss nicht fixierter Proben beobachten wir jedoch eher eine Verbesserung (*dead und total melanoma cells*) bis Gleichbleiben (*live melanoma cells*) (vgl. 4.2.8) der Sensitivität. Dennoch ist diese Beobachtung aufgrund der eher kleinen Fallzahl von 74 Proben vorsichtig zu beurteilen.

Weiterhin wäre es denkbar, dass es durch die Fixierung über freie Aldehyd-Gruppen (PFA= Paraformaldehyd) zu einer vermehrten zusätzlichen Bindung von Antikörpern kommt. Dies würde zu einem erhöhten „Background“, d.h. einer erhöhten Grundpositivität der (eigentlich negativen) Zellen führen. Diese Grundpositivität beobachten wir tatsächlich bei unserer intrazellulären Färbung (vgl. 4.4.), nicht aber bei der extrazellulären Färbung. Da bei beiden Färbestrategien PFA als Fixierung verwendet wurde (anteilmäßig mehr bei der intrazellulären Färbung), kann diese Grundpositivität nicht ausschließlich durch PFA erklärt werden (s.5.3.4.4). Des Weiteren kommen auch alle anderen vor der eigentlichen Antikörper-Färbung hinzugegebenen Proteine (*rabbit serum*, Serum Albumin in PBSA, vgl. 2.2.3 und 3.2ff.) als Reaktionspartner infrage.

Zuletzt wäre möglich, dass PFA zur Veränderung von Antigen-Epitopen auf oder in der Zelle und damit zu verfälschter Färbung (insbesondere zu hohen Falsch-Negativ-Raten) führt. Dies lässt sich bei zwar geringerer Spezifität unter Ausschluss nicht fixierter Proben jedoch nicht eindeutig zeigen.

So halten wir PFA insgesamt trotz der eventuellen vermehrten Wahrscheinlichkeit für unspezifische Antikörper- Bindungen besonders bei toten Zellen für ein gutes und notwendiges Medium zur Fixierung der Zellen, da es die Verklumpung deutlich verbesserte und zu erhöhten Gesamtzellzahlen führte.

Weitere Strategien zur Verbesserung des Verlustes an Zellen wären längere Zentrifugationszeiten (um stabilere Sedimente zu erhalten) und die Aufbewahrung in einem geeigneteren Medium als PBS. Dieses sollte eine Salzlösung (z.B. HBSS), Proteine (z.B. Serumalbumin oder fetales Kälberserum) sowie pH- Wert- Stabilisatoren (z.B. HEPES) enthalten.

5.2.4 Accuri-Kritik

Zu dem in dieser Studie verwendeten Durchflusszytometer, dem C6 Accuri von BD, lassen sich drei wesentliche Kritikpunkte anführen:

Das Gerät misst zwar beliebig viele Zellen, jedoch lässt sich immer nur eine Messung von maximal einer Million Zellen in einem File darstellen und dort analysieren. Es kam vor, dass wir von einer Probe mit mehreren Millionen Zellen am Ende mehrere einzelne

Files zur Darstellung und Auswertung zur Verfügung hatten. Diese waren in der Accuri-Software nicht zusammenführbar. Man hätte also jedes einzelne File für sich auswerten und am Ende die Ergebnisse zusammen zählen müssen. Dies hätte zu erheblich erhöhtem Arbeitsaufwand und mangelnder Darstellbarkeit geführt. So mussten die Files in eine separate Software exportiert werden, in der alle Zellen eines Lymphknotens in einem Schaubild dargestellt und analysiert werden konnten. FCS Express als intuitive, im Wesentlichen wie Microsoft Word aufgebaute Software erleichterte die Analyse sehr.

Den zweiten Abstrich, den wir beim Accuri machen mussten, betraf die geringe Anzahl von nur vier gleichzeitig messbaren Fluorochromen. So war es beispielsweise bei der intrazellulären Färbung, bei der wir drei melanomspezifische Antikörper einsetzen wollten, nicht möglich, zusätzlich zu CD45 noch einen Lebend-Tot-Farbstoff zu verwenden, was die Auswertqualität erhöht hätte.

Drittens muss der Probenstrom im Accuri einen relativ kleinen Durchmesser passieren, wodurch das Risiko steigt, dass große und/oder verklumpte Zellen steckenbleiben und die Acquire der Zellen beeinträchtigen.

Vorteile des Accuri von BD sind hingegen die platzsparende Größe des Gerätes, die einfache Wartung und die intuitive Bedienung, die keine komplizierten Voreinstellungen oder Laserauswahl voraussetzt.

5.2.5 Verblindung

Bezüglich der Verblindung unserer Studie ist festzustellen, dass jeder Lymphknoten eine Nummer erhielt und uns außer dieser Nummer während der gesamten Färbung, Messung und Auswertung der durchflusszytometrischen Methode keine weitere Information (auch nicht die MZD) bekannt war.

5.3 Diskussion der Ergebnisse

5.3.1 LDI als Goldstandard?

Wie schon in 3.3.2 erwähnt, gehen wir in unserer Arbeit davon aus, dass die LDI der Wahrheit entspricht und beziehen unsere Sensitivität und Spezifität auf diese, auch wenn die immunzytologische Diagnose im eigentlichen Sinne (noch) kein Goldstandard zur Quantifizierung der Tumorlast im WLK ist. Es könnte ja theoretisch auch möglich sein, dass unsere durchflusszytometrische Methode die genauere ist oder dem Goldstandard näher kommt als die LDI. Dies lässt sich aber nicht nachweisen ohne tatsächlich vorhandenen Goldstandard zur Quantifizierung der Tumorlast. Da die Methode die einzige derzeit vorhandene diagnostische Möglichkeit zur Quantifizierung von Tumorzellen im WLK ist, an der Universitäts-Hautklinik Tübingen akkreditiert ist und ihre MZD sogar ein stärkerer prognostischer Faktor als Ulzerationsstatus und Dicke des Tumors ist [41], kann die Methode mindestens als dem Goldstandard sehr nahe angesehen werden.

5.3.2 Einfluss der MZD auf die Gesamtzellzahl

Vergleicht man alle Boxplot-Werte der Verteilung der Gesamtzellzahl außer dem Maximum, ist bei erhöhter MZD auch eine Erhöhung der Gesamtzellzahl zu verzeichnen (vgl. 4.2.2 und 4.3.2). Es stellt sich die Frage, ob eine hohe MZD, d.h. die vermehrte Infiltration des WLK durch Melanomzellen, zu einer erhöht messbaren Gesamtzellzahl im Durchflusszytometer führt. Dies wäre logisch, da ja größere Metastasen auch mehr Zellen enthalten als kleinere Metastasen und somit der WLK als Ganzes aus mehr Zellen besteht. Zum anderen könnte eine vermehrte Tumordinfiltration auch zu einer Stimulation von Lymphozyten (Proliferation, Einwanderung), z.B. zur Immunabwehr des Tumors oder Immunsuppression des Organismus, führen. Beispielsweise berichten Neagu et al. von einer erhöhten B-Zellzahl unter tumorinfiltrierenden Lymphozyten in Melanomen mit einer Tumordicke von > 4mm sowie im peripheren Blut von diesen Melanompatienten [93]. Berger zeigt eine erhöhte B-Zell-Anzahl in WLK mit erhöhter MZD [37] und laut Farzad et al. enthalten Lymphknoten, die sich näher am Primärtumor befinden und daher eher von Mikrometastasen befallen sind, mehr B-Zellen [94]. T-Zellen in Lymphknoten, die eine

Rolle bei der körpereigenen Abwehr von Malignomen spielen, scheinen bei hohem melanozytärem Befall des WLK allerdings eher stark reduziert zu werden [37]. Unter anderem dafür verantwortlich sind von Melanomzellen freigesetzte Substanzen, die als Liganden an den PD1-Rezeptor von T-Lymphozyten binden und so ihre Apoptose auslösen [23]. Die Gesamtzahl der Lymphozyten im metastasierten WLK scheint jedoch gleich zu bleiben. Bei Berger zeigt sich mit Zunahme der MZD innerhalb des WLK eine Verschiebung des Verhältnisses der B- zu den T-Zellen, aber eine gleich bleibende Gesamtzahl der Lymphozyten [37].

Eine erhöhte Gesamtzellzahl bei WLK mit erhöhter MZD wäre also durch die erhöhte MZD an sich und durch die eventuell bestehende Proliferation von Lymphozyten innerhalb des WLK zu erklären. Da die Fallzahlen in den drei MZD-Gruppen allerdings zu unterschiedlich und ihre Boxplot-Werte somit nicht gut miteinander vergleichbar sind, kann diese Vermutung bei uns nicht sicher bestätigt werden. Des Weiteren bilden die Maxima bei beiden Färbestrategien Ausnahmen (vgl. Tab.4.1 und Tab.4.11). Und es ist nicht klar, ob die Gesamtzellzahl nicht stärker durch die Fixierung mit PFA als durch die MZD beeinflusst wird (vgl. 4.2.3). Um die Vermutung, dass eine erhöhte MZD zu einer erhöhten Gesamtzellzahl führt, eindeutig zu bestätigen, müsste man eine Messreihe mit einer einheitlichen Fixierung aller Proben und mit gleich großen MZD-Gruppen durchführen.

5.3.3 Auswertung

Anfangs gestaltete sich die Auswertung der Proben im Durchflusszytometer als schwierig. Insbesondere bei sehr kleiner Tumorlast des Patienten war nicht klar, wo genau im Schaubild Melanomzellen zu sehen sein würden. Die im WLK enthaltenen Zellen stellten sich nicht, wie gewünscht, als homogene Populationen dar. Zudem scheint FITC, mit welchem CD45 konjugiert war, zum Teil in die anderen Kanäle (insbesondere in den PE-Kanal) hineinzustrahlen, was die Abgrenzung zusätzlich erschwerte. Schließlich diente eine Probe mit hoher durchflusszytometrischer Tumorzell-dichte (vgl. 3.2.3) als „Schablone“ für die Auswertung. Die Auswertung dieser einen Probe wurde als „Vorlage“ für die Auswertung der anderen Proben genommen. So konnte eine annähernd standardisierte Auswertung erreicht werden, die auch Vergleiche zwischen den Proben zuließ.

Im Vergleich zur LDI ist die „Entscheidung“ Tumorzelle - ja oder nein - im Durchflusszytometer schwieriger zu treffen. Zwar wendet man die gleichen Kriterien (Positivität für einen oder mehrere melanomspezifische Antikörper, Größe und Granularität) an. Aber besonders Größe und Granularität sind in der LDI morphologisch leichter zu beurteilen. Man kann so z.B. eine schwach HMB45⁺ Zelle, die morphologisch eher wie ein Lymphozyt aussieht, als sichere Tumorzelle ausschließen.

Da sich durchflusszytometrisch jede Probe etwas anders darstellt (vgl. 5.2.3 und 5.3.3.1), ist es schwierig, exakte *thresholds* für die Analyse der drei Kriterien festzulegen.

5.3.3.1 Auswertestrategie der extrazellulären Färbung

Die Entscheidung, ob eine Zelle Melanomzelle ist oder nicht, erfolgte mit drei Auswerteschritten (s. Abb. 5.2, vgl. dazu auch 3.2.3ff.):

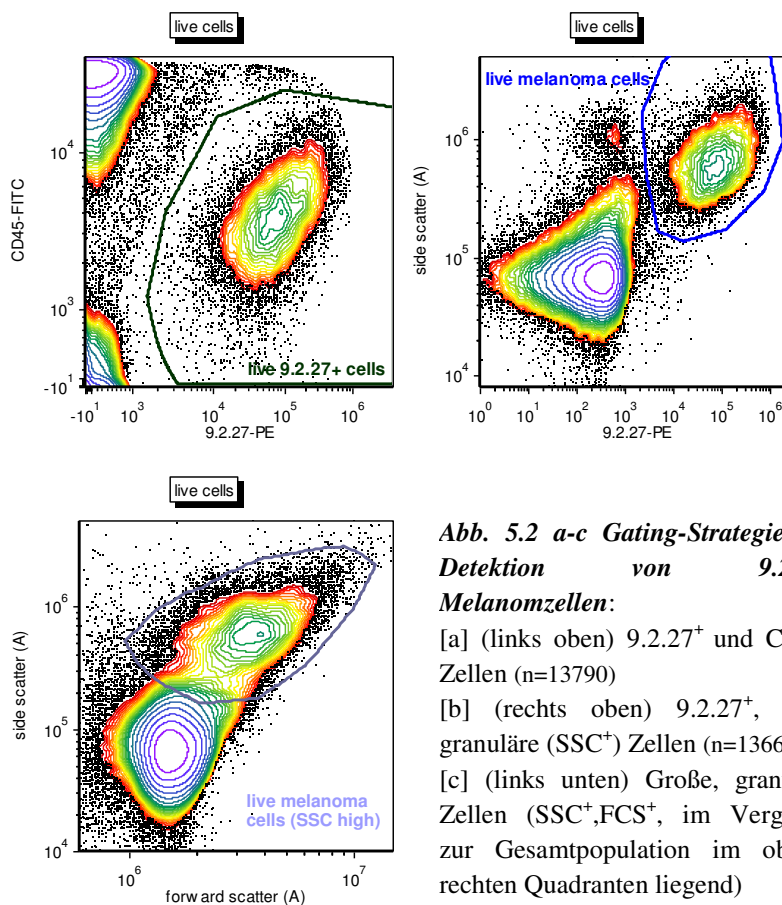


Abb. 5.2 a-c Gating-Strategie zur Detektion von 9.2.27⁺ Melanomzellen:

- [a] (links oben) 9.2.27⁺ und CD45⁻ Zellen (n=13790)
- [b] (rechts oben) 9.2.27⁺, stark granuläre (SSC⁺) Zellen (n=13660)
- [c] (links unten) Große, granuläre Zellen (SSC⁺,FCS⁺, im Vergleich zur Gesamtpopulation im oberen rechten Quadranten liegend)

(Tumorzellichte=12348 *live melanoma cells*/Mio vs. MZD=7771/Mio)

Schon bei dieser eindeutig positiven Beispielprobe wird deutlich, dass das Ausfindigmachen von homogenen Populationen und die Abgrenzung von anderen Populationen nicht immer einfach ist, da von allen Seiten „Ausreißer“-events (=schwarze Punkte) innerhalb die *gates* „rutschen“ können.

Bei einigen WLK waren eindeutig keine 9.2.27⁺ *events* nachzuweisen, sodass hier von einer negativen Probe ausgegangen werden konnte. Granularität und Größe der Zellen musste nicht weiter auf die Kriterien einer Melanomzelle beurteilt werden (vgl. Abb. 5.3):

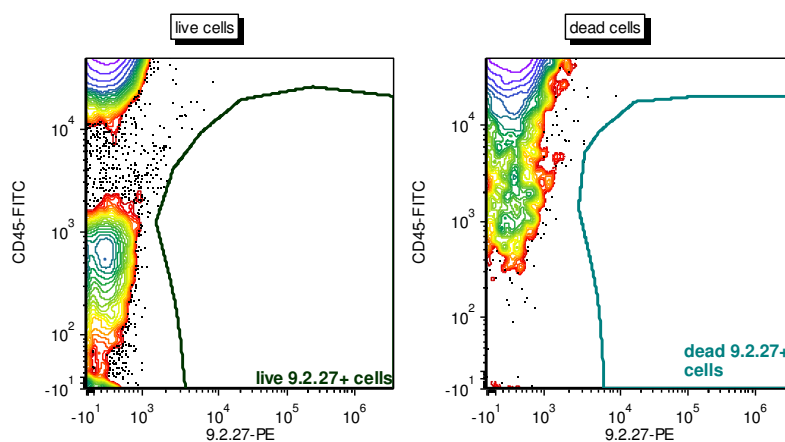


Abb. 5.3 a und b: **Beispielprobe 1.** Die *gates* für *live* und *dead* 9.2.27⁺ *cells* enthalten bei dieser Probe keine Zellen. Ein weiteres Gating erübrigt sich hier.

Bei den meisten Proben jedoch war keine eindeutige Entscheidung allein über die 9.2.27-Färbung zu treffen. Die Beurteilung im *side*-bzw. *forward-side-scatter* musste herangezogen werden. Es ergaben sich verschiedene Szenarien (s. Abb. 5.4-Abb. 5.6).

Folgende Probe schien zunächst durchflusszytometrisch positiv zu sein, aufgrund der verminderten Größe und Granularität wurden die 9.2.27⁺ events am Ende aber nicht als Melanomzellen gewertet:

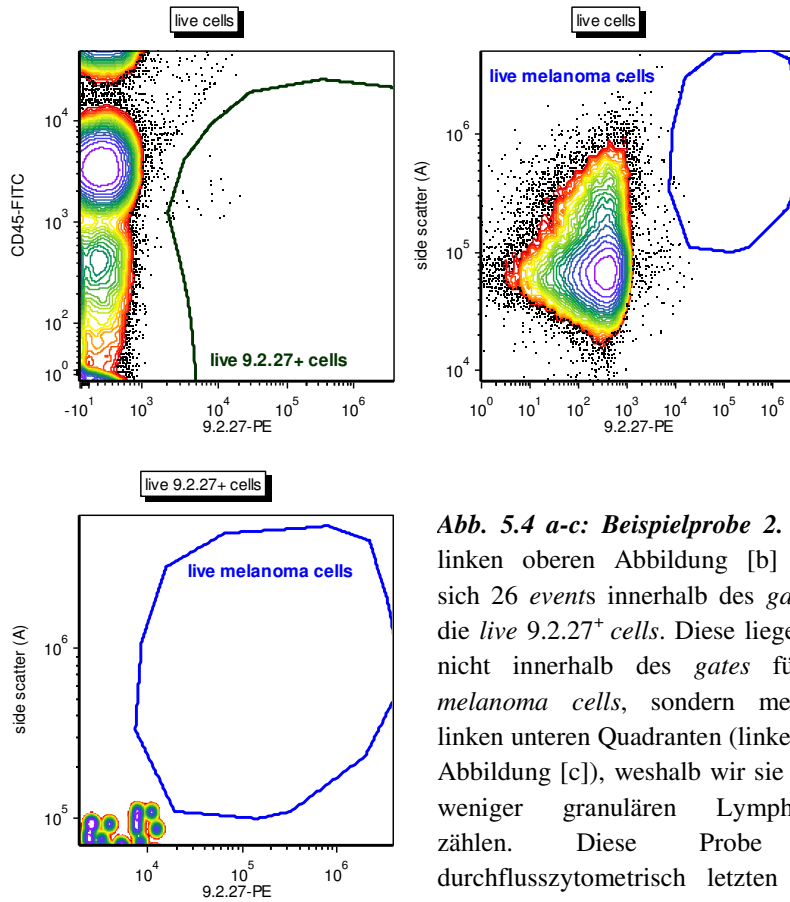


Abb. 5.4 a-c: Beispielprobe 2. In der linken oberen Abbildung [b] finden sich 26 events innerhalb des gates für die live 9.2.27⁺ cells. Diese liegen aber nicht innerhalb des gates für live melanoma cells, sondern mehr im linken unteren Quadranten (linke untere Abbildung [c]), weshalb wir sie zu den weniger granulären Lymphozyten zählen. Diese Probe war durchflusszytometrisch letzten Endes richtig negativ (auch die MZD war 0).

Folgende Probe mit fast gleich gelegten *gates* war letzten Endes durchflusszytometrisch positiv und negativ in der LDI, also vermutlich falsch positiv (Abb. 5.5):

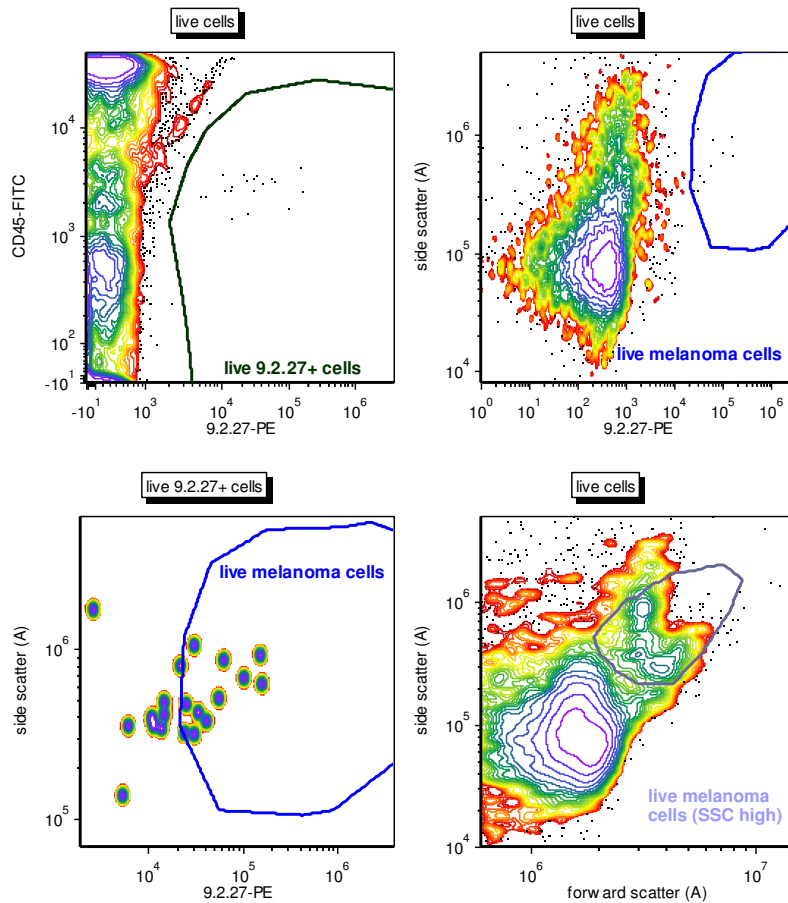


Abb. 5.5 a-d: Beispielprobe 3. Hier sieht man im ersten Bild [a] eindeutig $9.2.27^+$ events ($n=20$). Diese liegen auch zum Teil im *live melanoma cells-gate* [b,c] ($n=11$) und im *forward-side-scatter* im oberen rechten Quadranten (*live melanoma cells (SSC high)* in [d]), sind also durchflusszytometrisch als Tumorzellen zu werten. In der LDI betrug die MZD für diese Probe 0.

Im Vergleich dazu eine richtig positive Probe mit MZD = 24 (Abb. 5.6):

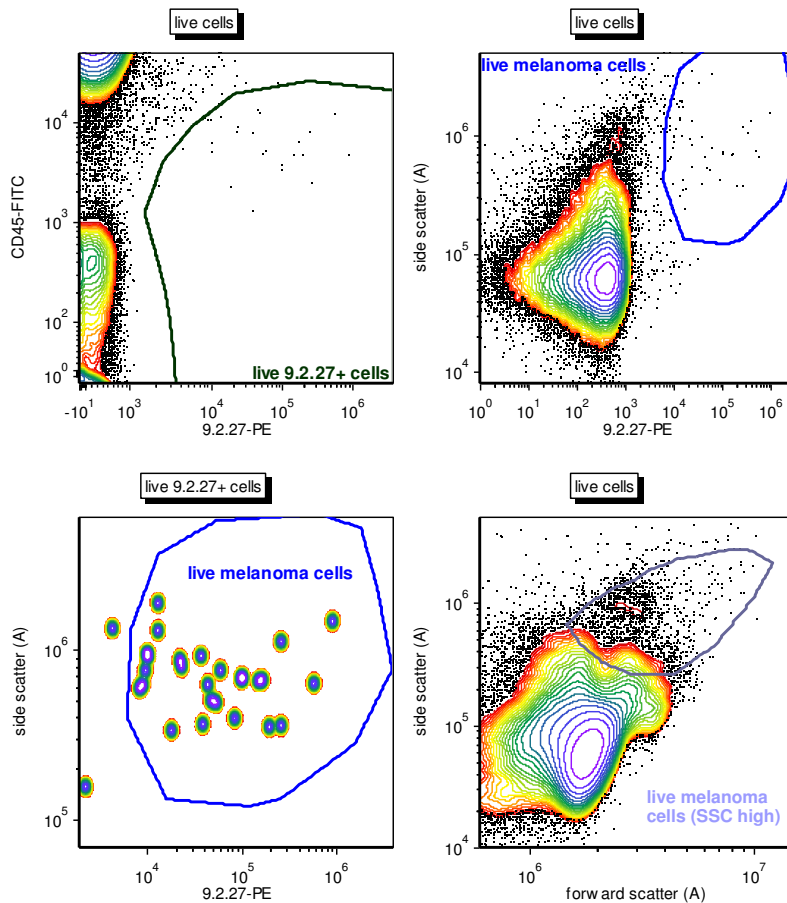


Abb. 5.6 a-d: Beispielprobe 4. Auch hier sind im ersten Bild [a] eindeutig 9.2.27⁺ events zu sehen (n=28), die sich im *live melanoma cells-gate* [b und c] als Melanomzellen bestätigen und im *forward-side-scatter* im oberen rechten Quadranten liegen.

Abb. 5.5 und 5.6 sollen zeigen, dass im Durchflusszytometer sich ähnelnde Proben immunzytologisch völlig unterschiedliche Diagnosen haben können (MZD=0 vs. MZD=24) und dass die durchflusszytometrische Analyse von Proben mit geringer Anzahl von mutmaßlich positiven Zellen schwierig und nicht immer eindeutig ist.

5.3.3.1.1 Lebend-Tot-Färbung: Relevanz?

Bei unserer ersten Messreihe, der Einfach-Färbung durch den 9.2.27, führten wir auch eine Lebend-Tot-Färbung durch. Wie schon in 3.2.1.1 erwähnt, ist bei einer

durchflusszytometrischen Analyse die Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen insofern wichtig, als dass tote Zellen unspezifische Bindungen eingehen und daher auch zu falsch positiven Ergebnissen führen können [81]. Bei der extrazellulären Färbung, bei der wir einen Lebend-Tot-Farbstoff verwendet haben, hätte man also streng genommen alle toten Zellen aus der Analyse ausschließen und nicht mit berücksichtigen sollen. Aufgrund verschiedener Beobachtungen bei der Auswertung unserer Proben nahmen wir letzten Endes dennoch auch die toten Zellen mit in die Ergebnisse auf:

Die Probe, die von allen analysierten die höchste MZD (Nr. 6 in 4.2.7, MZD = 11586) enthielt, hatte in unserer Analyse 95,3% tote Melanomzellen und nur 4,7% lebende. Interessant ist, dass hierbei aber der Großteil der gesamten Probe (91,2%) aus lebenden Zellen bestand (s. Abb. 5.7).

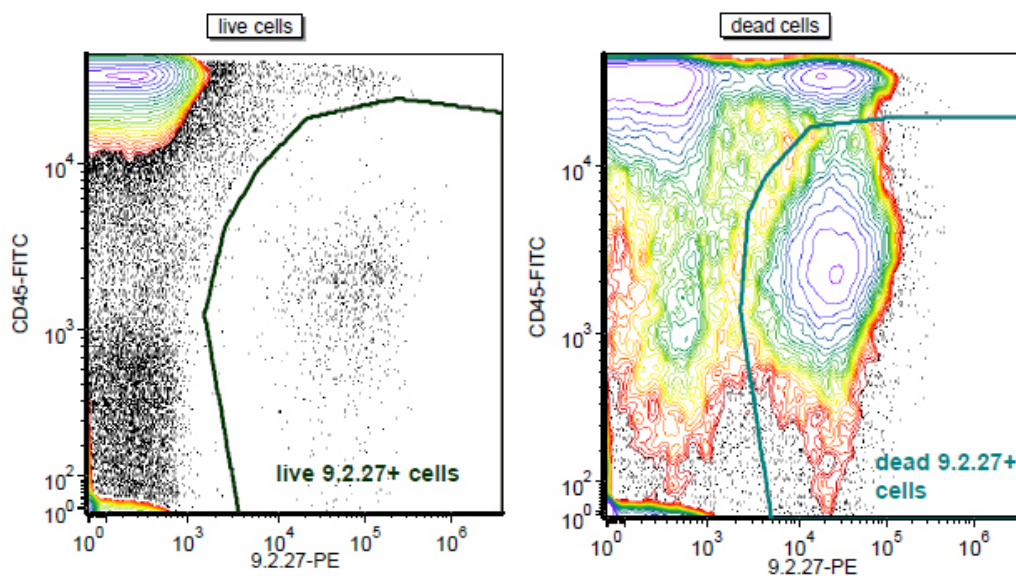


Abb. 5.7 a und b: Probe mit MZD = 11586. Zu sehen ist die Probe aufgeteilt in die *live cells* (links [a]) und die *dead cells* (rechts [b]). Innerhalb der *gates* sind deutlich abgrenzbare 9.2.27⁺ Populationen sichtbar. Die Population der *dead 9.2.27⁺ cells* ist hier deutlich größer (95,3% aller Melanomzellen). Für mehr Zahlen siehe 4.2.7.

Bei der Analyse stellte sich die Frage, ob diese tote, deutlich abgrenzbare 9.2.27⁺ Population in Abb. 5.7 b echte Melanomzellen repräsentiert oder tote Lymphozyten, die unspezifisch 9.2.27 binden. Für echte Melanomzellen sprechen zwei Dinge: zum einen

sind die stark 9.2.27⁺, toten Zellen gleichzeitig CD45⁻, zum anderen stimmt ihre Anzahl (22161,12/Mio, etwa doppelt so viel wie die MZD) besser mit dem Ergebnis der LDI überein als nur die Anzahl der live melanoma cells (1084,31/Mio, etwa zehnmal so wenig wie die MZD).

Betrachtet man nun Sensitivität und Spezifität der extrazellulären Färbung für alle 105 Proben (vgl. Tab.4.7), sieht man, dass die Durchflusszytometrie für live melanoma cells zwar eine höhere Sensitivität, aber eine leicht geringere Spezifität aufweist als die dead melanoma cells. Beim Vergleich des Korrelationskoeffizienten Spearman's ρ (vgl. 4.2.6) für Proben mit MZD > 0 ist dieser für die dead melanoma cells mit 0,6610 sogar noch höher als für die live melanoma cells mit 0,5433 und insgesamt korrelieren die total melanoma cells am besten mit der MZD ($\rho=0,6827$).

Wir entschlossen uns daraufhin, die als tot angefärbten Zellen mit in unsere Ergebnisse aufzunehmen, unter der Hypothese, dass auch tote Melanomzellen noch MCSP exprimieren und somit vom 9.2.27 angefärbt werden. Eine Erklärung für die großen Raten an toten Melanomzellen könnte sein, dass die Melanomzellen in den Proben mit erhöhter Tumorlast ex vivo schneller zugrunde gehen als die Lymphozyten, z.B. weil sie sich im proteinlosen Medium PBS noch weniger wohl fühlen [88] (vgl. dazu auch 5.2.3). Weiterhin wäre denkbar, dass Melanomzellen vermehrt unspezifisch den Lebend-Tot-Farbstoff Ax680 binden. Da bisher keine durchflusszytometrischen Forschungen an Melanomzellen im WLK durchgeführt worden sind, lässt sich diese Vermutung nicht durch andere Quellen belegen.

5.3.3.2 Auswertestrategie der intrazellulären Färbung

Aufgrund der fehlenden Lebend-Tot-Färbung erfolgte die Diagnostik lediglich aufgrund der Positivität einer Zelle für 9.2.27 und/oder beteb und/oder C3 (vgl. 3.2.4). Im *forward-side-scatter* zeigten sich Melanomzellen entsprechend der Analyse der extrazellulären Färbung im Vergleich zur restlichen Population weiter rechts und weiter oben (größer, granulärer).

5.3.3.2.1 Grundpositivität

Wie in 4.3.4.1 zu sehen, war bei der intrazellulären Färbestrategie jeder WLK positiv für mindestens einen der drei melanomspezifischen Antikörper, sodass sich keine

verwertbare Spezifität unserer Färbung ergab. So war auch die Richtig-Positiv-Rate mit ca. 36% sehr niedrig. Ca. 64% der durchflusszytometrisch positiven WLK waren falsch positiv, d.h. in der LDI negativ. Insgesamt fällt eine hohe Grundpositivität der WLK bei den Einzelkörperfärbungen auf (vgl. 4.3.6).

5.3.4 Diskussion der Ergebnisse für die Antikörperfärbungen

5.3.4.1 9.2.27-Färbung

In dieser Arbeit ging es in erster Linie darum, eine Färbung von WLK mit an immunfluoreszierenden Stoffen gebundenen melanomspezifischen Antikörpern zu testen und ein Färbeschema zu etablieren. Aufgrund seiner Bindung an der Zelloberfläche und der so fehlenden Notwendigkeit einer Permeabilisierung der Probe verwendeten wir zunächst nur den Antikörper 9.2.27 (vgl. 1.2.3.1).

Von Ulmer 2004 wurde die starke Färbung von 9.2.27 an im peripheren Blut zirkulierenden Melanomzellen nachgewiesen [63]. Befinden sich diese Melanomzellen nun auch im WLK von Patienten mit malignem Melanom, müsste auch in diesem eine Färbung durch 9.2.27 nachzuweisen sein. In unserer Arbeit vergleichen wir unsere 9.2.27-Rate mit der MZD, d.h. der HMB45-Rate von Ulmer. Wir nehmen hierbei an, dass jede im WLK vorhandene Melanomzelle extrazellulär MCSP und intrazellulär gp100 exprimiert und von beiden Antikörpern angefärbt wird. In unserer Arbeit wird gezeigt, dass beide Raten positiv miteinander korrelieren ($\rho=0,6827$ für *total melanoma cells* bzw. $0,6579$ für 9.2.27, vgl. 4.2.6 und 4.3.5.1).

Setzt man die LDI dem Goldstandard gleich, ergibt sich für die alleinige 9.2.27-Färbung nach dem extrazellulären Färbeprotokoll nur eine Richtig-Positiv-Rate von 49-61%. Die Richtig-Negativ-Rate liegt bei 87-91% (s. 4.2.5). Unter Ausschluss nicht fixierter Proben steigt die Sensitivität auf bis zu 100%, die Spezifität sinkt jedoch auf bis zu 73,5% (*total melanoma cells*) (s. 4.2.8). Bei der 9.2.27-Färbung nach dem intrazellulären Färbeprotokoll ergab sich eine Sensitivität von knapp 36% und eine nicht verwertbare Spezifität, da alle Proben mindestens eine durchflusszytometrisch 9.2.27⁺Zelle enthielten (vgl. 4.3.4.1).

Auch auf dysplastischen Nävuszellen, Epidermiszellen, Chondrozyten, Haarfollikeln und glatten Muskelzellen wird MCSP exprimiert [61]. Eine etwaige Kontamination der

WLK-Probe durch z.B. Haut oder glatte Muskelzellen von Gefäßen, z.B. aus der Nähe des WLK ist allerdings aufgrund der sorgfältigen postoperativen Aufarbeitung sowie durch die Waschschrirte während des Färbeprotokolls eher unwahrscheinlich. Es ist allerdings möglich, dass benigne Nävuszellen innerhalb des WLK, die bei bis zu 28% der Melanompazienten beschrieben wurden [65], ebenfalls durch den 9.2.27 angefärbt wurden.

Ulmer et al zeigten 2004 eine schwache Färbung von einigen Granulozyten mit dem 9.2.27, während Melanomzellen stark gefärbt waren [41]. Solche Granulozyten könnten auch in unserer Zellsuspension enthalten sein und durch die schwach 9.2.27 positiven Zellen repräsentiert werden. Wir gehen allerdings davon aus, dass sie, wie bei Ulmer [63] über ihre geringere Größe und Granularität herausgefiltert wurden.

Die hohe Falsch-Positiv-Rate des 9.2.2.7 bei der intrazellulären Färbeprozedur könnte zusätzlich durch vermehrte unspezifische Bindungen, verursacht durch die WLK-Aufarbeitung und Permeabilisierung der Probe (vgl. 3.2.1.2), zustande gekommen sein und verringerte sich bei der Kombinationsfärbung von 9.2.27 mit anderen melanomspezifischen Antikörpern deutlich (vgl. 4.3.4.2).

Bislang wurde 9.2.27 nicht als Antikörper für die Diagnostik von Metastasen eingesetzt, weswegen wir keine direkten Vergleichsmöglichkeiten mit anderen Studien haben. Bei Ulmer et al wurden nahezu 100% der bei 26% der Pazienten im Blut zirkulierenden Melanomzellen mit dem 9.2.27 angefärbt [63]. Richards et al zeigen eine durchflusszytometrische Färbung von 76-98,9% der Melanomzellen verschiedener Zelllinien durch den Anti-MCSP-Antikörper (Klon LMH-1) [86].

5.3.4.2 Beteb-Färbung

Beteb bindet, wie HMB45, an Glykoprotein 100 im Melanosomenkomplex und ist sehr spezifisch für Melanommetastasen [54]. Durch Verwendung dieses Antikörpers in unserer Arbeit hatten wir eine direkte Vergleichsmöglichkeit beider diagnostischer Möglichkeiten (LDI und Durchflusszytometrie). Für beteb hätte man durchflusszytometrisch eine viel höhere Sensitivität und Spezifität erwartet, da er ja an dasselbe Antigen bindet wie HMB45 und dieser bei Ulmer 2014 keinen der Kontrolllymphknoten anfärbte [41]. Allerdings ist der Korrelationskoeffizient für die

Einfachfärbung mit beteb bei den Proben mit einer MZD > 0 mit $\rho=0,8193$ der zweithöchste insgesamt, d.h. die richtig positiven Proben zeigen im Durchflusszytometer eine gute Korrelation mit der HMB45-Färbung bei der LDI.

Beteb ist zwar aus einem anderen Klon als HMB45 gezüchtet worden, wodurch er eventuell an ein anderes Epitop von gp100 als HMB45 bindet. Wir vermuten aber eher die bei jeder Einfachfärbung beobachtete und vermutlich durch die Permeabilisierung bedingte „Grundpositivität“ als Ursache für die schlechten Richtig-Positiv- und Negativ-Raten.

Bei Richards et al wurden 77-98% der Melanomzellen verschiedener Klone durchflusszytometrisch mit HMB45 angefärbt [86].

5.3.4.3 C3-Färbung

C3 färbt CD63, ein zytoplasmatisches Antigen von Melanomzellen. Für C3 war eine hohe Positivität auch bei nicht vorhandenen Melanomzellen zu erwarten, da er auch andere in WLK enthaltene Zellen wie Histozyten, dendritische Zellen, Mastzellen sowie intranodale Nävi anfärbt [53,54,58]. Die in der Literatur zu findende Sensitivität von 86-100% ließ sich in unserer Arbeit nicht bestätigen (35,85%, vgl. 4.3.4.1). Beim Vergleich dieser Zahlen muss natürlich unser kleines Patientenkollektiv (n=53) berücksichtigt werden und dass unsere Sensitivität und Spezifität auf HMB45-positive Zellen bezogen werden.

Die Korrelation von C3 und der MZD bei den Proben mit MZD > 0 war mit $\rho=0,6088$ zwar positiv, insgesamt aber hatte sie den niedrigsten Korrelationskoeffizienten von allen Einzel-oder Kombinationsfärbungen mit der MZD.

5.3.4.4 Permeabilisierung als Ursache für die erhöhte Positivitätsrate?

Laut Pala et al erhöht eine Permeabilisierung der Probe die Menge an Proteinen, welche für unspezifische Bindungen zur Verfügung stehen [82]. Es wäre also denkbar, dass die Permeabilisierung zu der erhöhten Grundpositivität geführt hat.

Die (von uns ebenfalls durchgeführte) sorgfältige Titration der Antikörper und die Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen (z.B. dem Fc-Rezeptor) mit Immunglobulinen sollte dies aber verhindern [82]. Über die genaue Zusammensetzung

des von uns verwendeten Permeabilisierungsagens 8E liegen uns leider keine Informationen vor, außer dass es auf Paraformaldehyd basiert [95]. Es könnten also auch hier freie Aldehyd-Gruppen zu vermehrten unspezifischen Bindungen geführt haben. Letztlich kann über einen Einfluss eines oder mehrere Bestandteile von 8E auf die Sensitivität und Spezifität unserer Färbung nur spekuliert werden. Ohnehin sind die von uns berechneten Richtig-Positiv- und Negativ-Raten der Einzelkörperfärbung bei der geringen Fallzahl von insgesamt nur 53 WLK nur bedingt aussagekräftig.

5.3.4.5 Antikörper-Kombination

5.3.4.5.1 Kombination von jeweils zwei Antikörpern

Bei der Kombination von 9.2.27 und beteb berechnen wir eine Sensitivität von 60% und eine Spezifität von 85,71% für unsere Färbung. Weiterhin lässt sich in unserer Arbeit für diese Kombination die höchste Korrelation ($\rho=0,8787$) mit der MZD zeigen, d.h. die Rate von Zellen, die sowohl 9.2.27 als auch beteb⁺ sind, korreliert bei Proben mit MZD > 0 am stärksten mit der MZD. Wir gehen davon aus, dass die falsch 9.2.27⁺ Zellen durch ihre beteb-Negativität als falsche Melanomzellen herausgefiltert werden.

Die Kombination aus 9.2.27 und C3 ergab zwar eine positive Korrelation mit der MZD, aber enttäuschende Richtig-Positiv und-Negativ-Raten (vgl. 4.3.4.2.), da jeder WLK für beide Antikörper positiv war.

Die Kombination von C3 und beteb erhöhte sowohl Sensitivität und Spezifität als auch den Korrelationskoeffizienten der Durchflusszytometrie (vgl. Tab.4.17 und Abb.4.16), aber insgesamt nicht so sehr wie die Kombination von 9.2.27 und beteb.

5.3.4.5.2 Kombination aller drei Antikörper

Die Dreifachkombination von 9.2.27, beteb und C3 ergibt die besten Ergebnisse für Spezifität (85,71%) und Sensitivität (77,78%) der Durchflusszytometrie, da eine dreifach positive Zelle am wahrscheinlichsten eine richtig positive Melanomzelle ist. Der Korrelationskoeffizient der in der LDI positiven WLK ist mit $\rho=0,7894$ allerdings niedriger als derjenige der Zweifachkombinationsfärbung aus 9.2.27+beteb.

5.3.4.6 Vergleich der Ergebnisse der extra- und intrazellulären Färbestrategie

Beim Vergleich aller 49 sowohl mit der extra- als auch mit der intrazellulären Färbestrategie gemessenen Proben ergaben sich zum Teil sehr unterschiedliche Tumorzell-dichten. Der Vergleich der reinen 9.2.27-Rate zeigte insgesamt 19 Proben, die nach dem extrazellulären Protokoll negativ für den 9.2.27 waren, nach dem intrazellulären Protokoll jedoch positiv (mit bis zu 1707 Zellen/Mio) (vgl.4.4.1). Diese sehr unterschiedlichen Ergebnisse für die Färbung mit dem gleichen Antikörper kommen vermutlich durch die verschiedenen Protokolle zustande. Zum einen ist 9.2.27 je nach Färbestrategie unterschiedlich konjugiert (PE (FL2) vs. Ax647 (FL4), vgl. 3.2.1.3), was dazu führen kann, dass eine 9.2.27⁺ Zelle je nach Färbestrategie unterschiedlich stark in den jeweiligen Detektor strahlt und die Färbung nicht komplett „mit sich vergleichbar“ macht. Zum anderen hängt die hohe Falsch-Positiv-Rate bei der intrazellulären Färbestrategie vermutlich mit dem unterschiedlichen Färbeprotokoll (insbesondere der Permeabilisierung) zusammen, da sie alle Einfach-Färbungen betrifft (s.o.). Vergleicht man die 17 (bzw. 15) Proben mit MZD > 0, stellt man fest, dass die jeweilige 9.2.27-Rate gut vergleichbar ist und mit einem Koeffizienten von ca.0,8-0,9 korreliert (vgl. 4.4.2). So kann man davon ausgehen, dass bei den richtig positiven Proben die 9.2.27-Färbung mit beiden Färbestrategien fast gleich gut funktioniert und die Unterschiede besonders auf den verschiedenen Färbeprotokollen beruhen könnten.

Beim Vergleich der *total melanoma cells*-Rate mit der 9.2.27+beteb- bzw. *triple positive cells*-Rate für alle 49 Proben ergeben sich ebenfalls sehr verschiedene Tumorzell-dichten. Dies könnte natürlich besonders auf die unterschiedliche Anzahl an Antikörpern zurückzuführen sein. Demnach steigt die Richtig-Positiv-Rate bei einer Kombinationsfärbung und die Tumorzell-dichten sinken, was sich auch in Abb. 4.18 widerspiegelt.

5.3.5 Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich Sensitivität und Spezifität der Durchflusszytometrie erhöhen, je mehr Antikörper man kombiniert. Durch eine Fixierung erhöht sich vermutlich die Sensitivität, während die Spezifität eher sinkt. Alle durchflusszytometrischen Tumorzell-dichten der positiven Proben korrelieren gut mit der MZD, am besten die Kombination aus 9.2.27+beteb und die

Dreifachkombination. Eine Kombinationsfärbung ist auch für zukünftige Messungen zu empfehlen. Da C3 von allen verwendeten Antikörpern die schlechtesten Ergebnisse zeigt, würden wir bei einer zukünftigen Dreifachkombination eher einen anderen Antikörper (z.B. Melan A) wählen. Aufgrund der schnellen Sterberate aller und besonders der Melanomzellen wurden in dieser Arbeit die durchflusszytometrischen Tumorzellichten der toten Zellen mit berücksichtigt. In Zukunft sollte man aber versuchen, die Sterberate zu verringern und dann eine Lebend-Tot-Färbung anwenden, um eindeutig tote Zellen aus der Auswertung auszuschließen. Interessant wäre die Frage, wie die Ergebnisse bei der Verwendung eines für die Durchflusszytometrie konjugierten HMB45 im Vergleich zu denen von beteb ausfielen würden. Eventuell könnte man sich vorstellen, die Antikörper dann auch mit anderen Fluorochromen zu konjugieren, die eindeutiger in die jeweiligen Detektoren hineinstrahlen und das Setzen von *thresholds* vereinfachen würden.

5.3.6 Durchflusszytometrie genauer bei Proben mit MZD > 100?

In der LDI beschränkt man sich bei hohen Melanomzellzahlen auf die stichprobenartige Auszählung einiger Quadrate im Gesichtsfeld und die anschließende Hochrechnung der MZD durch Multiplikation mit bestimmten Faktoren. Je nachdem, welches Quadrat man auszählt, kann man so auf unterschiedliche MZD kommen, die Methode wird somit umso ungenauer, je höher die Anzahl an Melanomzellen ist. Im Durchflusszytometer wird keine stichprobenartige Auszählung gemacht, sondern jede Zelle individuell in der Zellsuspension auf ihre Antikörper-Positivität und weitere Faktoren wie Granularität und Größe untersucht. Wie in 4.3.7 und Tab.4.22 zu sehen, ergaben sich bei der durchflusszytometrischen Analyse der WLK mit MZD > 100 teilweise große Unterschiede zur MZD der LDI. Hierbei zeigten sich vor allem bei der extrazellulären Färbung nur mit dem 9.2.27 weitaus höhere durchflusszytometrische Tumorzellichte (bis zu knapp 11-mal mehr) als bei der LDI. Zur Veranschaulichung der FC⁺ Populationen der WLK-Proben Nr. 6 und 7 aus Tab.4.22 vgl. 4.2.7 und 3.2.3 und 5.3.3.1.1. Diese Bilder zeigen deutliche große Antikörper-positive Populationen.

Da wir in unserer Arbeit außer der LDI keine weitere Vergleichsmethode zur Quantifizierung der Tumorlast haben und diese als Goldstandard voraussetzen, ist nicht zu klären, welche der beiden Methoden die genauere Dichte an Melanomzellen angibt.

Der Vorteil der Durchflusszytometrie, große Zellmengen in sehr kurzer Zeit zu messen, liegt allerdings auf der Hand [73,86]. Zwar befördert jede WLK-Probe mit mindestens einer Tumorzelle den Patienten ohnehin in Stadium III der Melanomerkrankung, dennoch ist eine so genaue Quantifizierung wie möglich wünschenswert, da die Anzahl der Tumorzellen im WLK auch eine prognostische Bedeutung für den Patienten hat [41].

6 Zusammenfassung und Ausblick

In letzter Zeit scheint der Wunsch nach der möglichst genauen Diagnostik von isolierten Submikrometastasen im Wächterlymphknoten von Melanompatienten aufgrund ihrer vermuteten prognostischen Relevanz immer größer zu werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine neue Messmethode zur quantitativen Detektion von Mikrometastasen in Wächterlymphknoten von Melanompatienten etabliert. Hierzu wurde der WLK disaggregiert, mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch auf Melanomzellen untersucht. Vorteil gegenüber bisher angewandten diagnostischen Möglichkeiten ist die Fähigkeit der Durchflusszytometrie, in kurzer Zeit große Mengen an Zellen bis hin zum kompletten WLK quantitativ auf Antigenexprimierung und andere Zelleigenschaften zu analysieren.

Die Ergebnisse wurden mit der ebenfalls quantitativen Lymphozyten-Disaggregations-Immunzytologie von Ulmer et al verglichen. Tab.6.1 stellt die beiden quantitativen Methoden LDI und FC vergleichend gegenüber.

	LDI	FC
Gemeinsamkeiten	Zellen liegen als Zellsuspension vor → Vorteil: Möglichkeit der quantitativen Analyse Nachteil: keine Aussage zur Zelle im Zellverband machbar	
Unterschiede und Vergleich	ein Antikörper ausreichend (HMB45) + Morphologie (Größe, Granularität)	mindestens zwei Antikörper in Kombination (9.2.27, beteb) + Größe, Granularität
	Bei Proben mit MZD > 100 evtl. ungenauer	bei Proben mit MZD > 100 evtl. genauer
	bei Proben mit MZD ≥ 1 evtl. genauer	bei Proben mit MZD ≥ 1 evtl. ungenauer
	subjektiver	objektiver
	Dauer: mindestens 2 Tage	Dauer: Färbung und Messung 2-5 Stunden
	Auszahlkapazität (auf 2 Mio) begrenzt	große Mengen in kurzer Zeit analysierbar
Probleme		hohe Grundpositivität für Antikörper nach Permeabilisierung

Tab.6.1: Vergleich LDI und FC

Es ergab sich bei allen verwendeten Antikörpern und Färbestrategien eine positive Korrelation mit den Ergebnissen der LDI (höchster Korrelationskoeffizient $\rho=0,8787$ für 9.2.27+beteb⁺ Zellen) und Sensitivitäten von bis zu knapp 78% (für dreifach positive Zellen) sowie Spezifitäten von bis zu 91% (einfache 9.2.27- Färbung). Weiterhin zeigte sich, dass eine vorherige Konservierung mit PFA die starke Verklumpung der Proben vermindert, die Zahl der im Durchflusszytometer zur Verfügung stehenden Zellzahlen erhöht und die Sensitivität eher steigert, während die Spezifität der Methode vermutlich leicht gesenkt wird.

Bei WLK mit niedriger MZD stellten sich die Melanomzellen im Durchflusszytometer nur noch als einzelne Punkte dar, sodass eine Detektion schwieriger und vermutlich

ungenauer ist als das „Zählen von roten Zellen“ (vgl. Abb.1.3) und die Möglichkeit der morphologischen Beurteilung bei der LDI.

WLK mit einer MZD > 100 zeigten durchflusszytometrisch deutliche Melanomzell- Populationen, die teils größer waren als die in der LDI ausgezählte MZD und eventuell eine genauere Tumorzelldichte angeben als diese. Wäre die durchflusszytometrische Tumorzelldichte tatsächlich genauer als die in der LDI ausgezählte MZD, hätte die Durchflusszytometrie ein noch größeres Potential zur realistischen Abschätzung des Todesrisikos bei klinisch vermutlich untertriebener Einstufung von Melanompatienten.

Zusammenfassend halten wir die durchflusszytometrische Untersuchung der WLK von Melanompatienten zur quantitativen Analyse der darin enthaltenen Melanomzellen für eine praktikable Methode, sofern die in unserer Arbeit aufgetretenen Nachteile (große Zellzahlverluste, Verklumpung und Notwendigkeit einer Fixierung, hohe Sterberate insbesondere der Melanomzellen) verbessert werden können.

Für die weitere Anwendung der Methode würden wir eine Kombinationsfärbung mit mindestens zwei, besser drei oder mehr Antikörpern (9.2.27, beteb oder HMB45, Melan A) und eine Lebend-Tot-Färbung empfehlen. Vorschläge zur Verbesserung der Probenaufbereitung sind die Aufbewahrung in einem geeigneten Nährmedium (mit einer Salzlösung, Serumalbumin oder fetalem Kälberserum und pH-Wert-Stabilisatoren), eine direkte Fixierung mit PFA und die sofortige Weiterverarbeitung. Gemessen werden sollte bestenfalls in einem Durchflusszytometer mit mehr als vier Detektoren und mit einer integrierten Auswertesoftware, die Kapazitäten von mehreren Millionen Zellen zulässt.

Die Durchflusszytometrie soll neben der LDI mit histopathologischen/immunhistologischen Untersuchungen kombiniert werden, die immer noch der Goldstandard sind, weil sie eine qualitative und morphologische Beurteilung der Tumorlast sowie ihre Lokalisation innerhalb des WLK erlauben.

7 Literaturverzeichnis

- [1] Neagu M, Constantin C, Manda G and Margaritescu I. Biomarkers of metastatic melanoma. *Biomarkers in medicine*, vol.3, no.1, pp.71-89, 2009
- [2] P. Altmeyer and Paech. *Enzyklopädie der Dermatologie, Allergologie, Umweltmedizin*. Springer, 2. Auflage 2014.
- [3] Rassner, Gernot: *Dermatologie Lehrbuch und Atlas*. Urban und Fischer, Tübingen, 9. Edition, 2009.
- [4] Deutsches Krebsforschungszentrum. Krebsinzidenz in Deutschland 2010: http://www.dkfz.de/de/krebsatlas/gesamt/mort_5.html [Zugriff 30.10.2014]
- [5] Deutsches Krebsforschungszentrum. Krebsmortalität in Deutschland 2012: <http://www.dkfz.de/de/krebsatlas/gesamt/organ.html> [Zugriff 30.10.14]
- [6] O. Braun-Falco, G. Plewig, H.H.Wolff, W.H.C.Burgdorf and M. Landthaler. *Dermatologie und Venerologie*. Springer, 6. Edition, 2012.
- [7] Davies H, Bignell GR, Stephens P et al. Mutations oft he BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002; 417: 949-954.
- [8] Curtin JA, Busam K, Pinkel D, Bastian PC. Somatic Activation of KIT in Distinct Subtypes of Melanoma. *J Clin Oncol*. 2006 Sep 10;24(26):4340-6.
- [9] Lee JH, Choi JW, Kim YS. Frequencies of BRAF and NRAS mutations are different in histological types and sites of origin of cutaneous melanoma: a metaanalysis. *Br J Dermatol*. 2011; 164(4): 776-84
- [10] Horst B, Gruvberger-Saal S, Hopkins B et al. Gab2-mediated signaling promotes melanoma metastasis. *Am J Pathol*. 2009;174:1524–33
- [11] Garbe C et al. Diagnosis and treatment of melanoma. European consensus-based interdisciplinary guideline - Update 2016. *Eur J Cancer*. 2016 Aug;63:201-17. doi: 10.1016/j.ejca.2016.05.005. Epub 2016 Jun 29
- [12] Firoz EF et al. (2009) Association of MDM2 SNP309, age of onset, and gender in cutaneous melanoma. *Clin Cancer Res* 15: 2573-2580
- [13] Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG, Fleming ID, Gershenwald JE, Houghton A Jr, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MF, Morton DL, Reintgen DS, Ross MI, Sober A, Thompson JA, Thompson JF. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol*. 2001 Aug 15;19(16):3635-48
- [14] Balch CM et al: Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification, *Journal of clinical oncology*, 27:6199-6206, dec 2009

- [15] Wong SL, Balch CM, Hurley P, Agarwala SS, Akhurst TK, Cochran A, Cormier JN, Gorman M, Kim TY, McMasters KM, Noyes RD, Schuchter LM, Valsecchi ME, Weaver DL, Lyman HG; American Society of Clinical Oncology; Society of Surgical Oncology. Sentinel Lymph Node Biopsy for Melanoma: American Society of Clinical Oncology and Society of Surgical Oncology Joint Clinical Practice Guideline, 2012.
- [16] Leiter et al. Complete lymph node dissection versus no dissection in patients with sentinel lymph node biopsy positive melanoma (DeCOG-SLT): a multicentre, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2016 Jun;17(6):757-67. doi: 10.1016/S1470-2045(16)00141-8. Epub 2016 May 5.
- [17] Van der Ploeg et al. Prognosis in patients with sentinel node-positive melanoma without immediate completion lymph node dissection. *Br J Surg.* 2012 Oct;99(10):1396-405. doi: 10.1002/bjs.8878.
- [18] Martin Röcken, Martin Schaller, Elke Sattler, Walter Burgdorf: Taschenatlas Dermatologie: Grundlagen, Diagnostik, Klinik. Thieme, 1. Auflage, 2010
- [19] Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF. Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *N Engl J Med* 2010; 363:711-723
- [20] Acharya UH, Jeter JM. Use of ipilimumab in the treatment of melanoma. *Clinical Pharmacology: Advances and Applications* 2013;5 (Suppl 1) 21-27
- [21] McGettigan S: Dabrafenib: A New Therapy for Use in BRAF-Mutated Metastatic Melanoma. *Journal of the advanced practitioner in oncology* 2014 May; 5(3):211-215
- [22] European public assessment report (EPAR), Tafinlar-Dabrafenib: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Public_assessment_report/human/002604/WC500149673.pdf [Zugriff 19.07.2015]
- [23] Robert C, Schachter J, Long GV, Arance A et al: Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med* 2015, Jun 25; 372(26): 2521-32
- [24] Mashima E, Inoue A, Sakuragi Y, Yamaguchi T, Sasaki N, Hara Y, Omoto D, Ohmori S, Haruyama S, Sawada Y, Yoshioka M, Nishio D, Nakamura M. Nivolumab in the treatment of malignant melanoma: review of the literature. *Onco Targets Ther.* 2015, Aug. 6; 8:2045-51
- [25] Cochran AJ, Huang RR, Lee J, Itakura E, Leong SPL and Essner R. Tumor-induced immune modulation of sentinel lymph nodes. *Nature reviews*, Vol.6, September 2006, 659-670, 2006
- [26] Snow H: Abstract of a lecture on melanotic cancerous disease. *Lancet* 1892, 15:87
- [27] Snow H: Twenty Two Years' Experience in the Treatment of Cancerous and Other Tumors. London: Balliere, Tindall and Cox, 1898:122

- [28] Neuhaus SJ, Clark MA, and Thomas JM. Dr. Herbert Lumley Snow, MD, MRCS (1847-1930): The Original Champion of Elective Lymph Node Dissection in Melanoma. *Annals of Surgical Oncology* September 2004, Volume 11, Issue 9, pp 875-878
- [29] Scheri RP, Essner R, Turner RR, Ye X, Morton DL: Isolated Tumor *cells* in the Sentinel Node Affect Long-Term Prognosis of Patients with Melanoma. *Annals of Surgical Oncology* 14(10): 2861-2866
- [30] De Wilt JHW, van Akooi ACJ, Vernhoef C, Eggermont AMM: Detection of melanoma micrometastases in sentinel-nodes-The cons. *Surgical Oncology* (2008) 17, 175-181
- [31] Cook MG et al: The development of optimal pathological assessment of sentinel lymph nodes for melanoma, *Journal of Pathology*; 200:314-319, 2003.
- [32] Scoyler RA, Murali R, Satzger I, Thompson JF. The detection and significance of melanoma micrometastases in sentinel nodes. *Surg Oncol* 2008; 17:165-74
- [33] Morton DL, Wen DR, Wong JH, Economou JS, Cagle LA, Storm FK, Foshag LJ and Cochran AJ. Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. *Arch Surg.* 1992, Apr; 127 (4): 392-399, 1992.
- [34] Morton DL, Thompson JF, Cochran AJ et al: Sentinel-lymph node biopsy or nodal observation in melanoma.
- [35] Morton DL, Thompson JF, Cochran AJ, Mozzillo N et al. Final Trial Report of Sentinel-Node Biopsy versus Nodal Observation in Melanoma. *The New England Journal of Medicine.* Med 370, No.7: 599-609, 2006.
- [36] Van Akooi ACJ, de Wilt JHD, Verhoef C, Schmitz OIM, van Geel AN, Eggermont AMM, Kliffen M: Clinical relevance of melanoma micrometastases (<0,1mm) in sentinel nodes: are these nodes to be considered negative? *Annals of Oncology* Sept 12,2006 17(10):1578-85.
- [37] Mareike Berger: Charakterisierung der Lymphozytenpopulation im Wächterlymphknoten bei Patienten mit malignem Melanom, Inauguraldissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin. Eberhard-Karls-Universität Tübingen, 2015.
- [38] Prashant J, Kanada: Sentinel Lymph Node Biopsie (SLNB) in Malignant Melanoma, pg.13. <http://de.slideshare.net/Dr.Prashant.Jani/melanoma-sentinel-lymph-node-1454544> [Zugriff 22.10.2015]
- [39] Mahmood MN, Lee MW, Linden MD, Nathanson SD, Hornyak TJ, Zarbo RJ: Diagnostic Value of HMB-45 and Anti-Melan A Staining of Sentinel Lymph Nodes with Isolated Positive cells. *The United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* Vol 15, No. 12, P. 1288, 2002

- [40] Garbe et al: Histopathological diagnostics of malignant melanoma in accordance with the recent AJCC classification 2009: Review of the literature and recommendations for general practice, JDDG; 2011. 9:690-700
- [41] Ulmer A, Dietz K, Hodak I, Polzer B, Scheitler S et al: Quantitative Measurement of Melanoma Spread in Sentinel Lymph Nodes and Survival. PLoS Med. 2014 Feb 18;11(2):e1001604. doi: 10.1371/journal.pmed.1001604. eCollection 2014.
- [42] Lobo AZC, Tanabe KT, Luo S, Muzikansky A, Sober AJ, Tsao H, Cosimi AB, Duncan LM: The Distribution of Microscopic Melanoma Metastases in Sentinel Lymph Nodes. Am J Surg Pathol 2012; 36:1841-1848, 2012
- [43] Murali R, Thompson JF, Shaw HM, Scoyler RA: The Prognostic Significance of Isolated HMB45-or MelanA-Positive *cells* in Melanoma Sentinel Lymph Node. Am J Surg Pathol Volume 32, Number 7, July 2008
- [44] Satzger I, Völker B, Meier A, Schenck F, Kapp A, Gutzmer R: Prognostic Significance of Isolated HMB45 or Melan A Positive *cells* in Melanoma Sentinel Lymph Nodes. Am J Surg Pathol Volume 31, No 8, August 2007.
- [45] Carlson GW, Murray DR, Lyles RH, Staley CA, Hestley A, Cohen C: The amount of metastatic melanoma in a sentinel lymph node: does it have prognostic significance? Ann Surg Oncol 2003 Jun; 10(5): 575-81
- [46] Cochran AJ, Roberts A, Wen DR, Huang RR, Itakura E, Luo F, Binder SW. Optimized assessment of sentinel lymph nodes for metastatic melanoma: implications for regional surgery and overall treatment planning, Ann Surg Oncol. 2004 Mar;11(3 Suppl):156S-61S
- [47] Dewar DJ, Newell B, Green MA, Topping AP, Powell BWE, and Cook MG. The Microanatomic Location of Metastatic Melanoma in Sentinel Lymph Nodes Predicts Nonsentinel Lymph Node Involvement. American Society of Clinical Oncology, 2004
- [48] Lee JH, Essner R, Torisu-Itakura H, Wanek L, Wang H, Morton DL: Factors predictive of tumor-positive nonsentinel lymph nodes after tumor-positive sentinel lymph node dissection for melanoma. J Clin Oncol. 2004 Sep 15;22 (18):3677-84
- [49] Reeves ME, Delgado R, Busam KL, Brady MS, Coit DG. Prediction of nonsentinel lymph node status in melanoma. Ann Surg Oncol. 2003 Jan-Feb;10(1):27-31
- [50] Giese T, Engstner M, Mansmann U, Hartschuh W, Arden B: Quantification of Melanoma Micrometastases in Sentinel Lymph Nodes Using Real-Time RT-PCR. Journal of Investigative Dermatology (2005) 124, 633-637
- [51] Cole CM et al: Histopathologic Evaluation of the Sentinel Lymph Node for Malignant Melanoma: The Unstandardized Process. Am J Dermatopathology 2013; 0:1-8, 2013

- [52] Van Diest PJ et al, Histopathological workup of sentinel lymph nodes: how much is enough? J Clin Pathol 1999; 52:871-873
- [53] Ohsie SJ, Peter Sarantopoulos G, Cochran AJ, and Binder SW. Immunohistochemical characteristics of melanoma. J Cutan Pathol 2008; 35: 433-444. 2008
- [54] Karimipour DJ, Lowe L, Su L, Hamilton T, Sondak V, Johnson TM, Fullen D: Standard immunostains for melanoma in sentinel lymph node specimens: which ones are most useful? J Am Acad Dermatol 2004, May; 50(5): 759-64
- [55] Cochran AJ, Wen DR. S-100 protein as a marker for melanocytic and other tumors. Pathology 1985; 17: 340
- [56] McKee PH, Calonje E, Granter SR. Pathology of the skin with clinical correlations, 3rd ed. Philadelphia: Elsevier Mosby 2005
- [57] Taatjes DJ, PhD; Arendash-Durand B, MD; von Turkovich M; Trainer TD, MD. HMB-45 Antibody Demonstrates Melanosome Specificity by Immunoelectron Microscopy. Arch Pathol Lab Med-Vol 117, March 1993
- [58] Zubovits J, MD, Buzney E, Yu L, MD, and Duncan LM, MD, HMB-45, S-100, NK1/C3, and Mart-1 in Metastatic Melanoma, Elsevier, 2004
- [59] Ulmer A et al, Detection of Melanoma Zubovits J, MD, Buzney E, Yu L, MD, and Duncan LM, MD, HMB-45, S-100, NK1/C3, and Mart-1 in Metastatic Melanoma, Elsevier, 2004 *cells* Displaying Multiple Genomic Changes in Histopathologically Negative Sentinel Lymph Nodes, Clin Cancer Res 2005; 11 August 1, 2005
- [60] Li Y, Madigan MC, Lai K, Conway RM, Billson FA, Crouch R, and Allen BJ. Human uveal melanoma expresses NG2 immunoreactivity. Br J Ophthalmol. May 2003; 87(5): 629-632
- [61] De Bruyn M, Rybcynska AA, Wie Y, Schwenkert M, Fey GH, Dierckx RA, van Waarde A, Helfrich W, Bremer E. Melanoma-associated Chondroitin Sulfate Proteoglycan (MCSP)-targeted *delivery* of soluble TRAIL potently inhibits melanoma outgrowth in vitro and in vivo. Mol Cancer. 2010 Nov 23;9:301. doi: 10.1186/1476-4598-9-301
- [62] Pluschke G, Vanek M, Evans A, Ditmar T, Schmid P, Itin P, Filardo EJ, Reisfeld RA. Molecular cloning of a human melanoma-associated chondroitin sulfate proteoglycan. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Sep 3;93(18):9710-5
- [63] Ulmer A, Schmidt-Kittler O, Fischer J, Ellwanger U, Rassner G, Riethmüller G, Fierlbeck G, Klein CA. Immunomagnetic Enrichment, Genomic Characterization, and Prognostic Impact of Circulating Melanoma *cells*. Clin Cancer Res. 2004 Jan 15;10(2):531-7

- [64] Mackie RM, Campbell I, Turbitt ML. Use of NK1 C3 monoclonal antibody in the assessment of benign and malignant melanocytes. *J Clin Pathol* 1984; 37:367-372
- [65] Abrahamsen HN, Hamilton-Dutoit SJ, Larsen J, Steiniche T. Sentinel lymph nodes in malignant melanoma: Extended Histopathologic Evaluation Improves Diagnostic Precision. *American Cancer Society*, 2004; 100:1638-1691
- [66] Blaheta H, Ellwanger U, Schittek B: Examination of regional lymph nodes by sentinel lymph node biopsy and molecular analysis provides new staging facilities in primary cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol* 2000; 114 (4): 637-642
- [67] Van der Helde-Zimmermann D, Schipper MEI, de Weger RA, Hennipman A, Borel Rinkes IHM: Sentinel node biopsies in melanoma patients: a protocol for accurate, efficient, and costeffective analysis by preselection for immunohistochemistry on the basis of Tyr-PCR. *Ann Surg Oncol* 2000; 7(1): 51-54
- [68] Bieligg SC, Ghosein R, Bhattacharya S, Coit DG. Detection of tyrosinase mRNA by reverse transcription-polymerase chain reaction in melanoma sentinel nodes. *Ann Surg Oncol* 2001; 6(3): 232-240
- [69] Ulmer et Fierlbeck: Neue Strategien zur Erfassung des Wächterlymphknotenstatus aus: Claus Garbe: Management des Melanoms: Diagnosestellung, Therapie, Nachsorge. S. 247 ff. Springer 1. Auflage 2006
- [70]<http://www.krebs-nachrichten.de/forschung-details/neue-methode-erlaubt-fruehe-verlaufsprognose-und-bessere-therapieplanung.html> [Zugriff 25.01.2016]
- [71] Petersen I et al: Die komparative genomische Hybridisierung. Eine Screeningmethode in der genetischen Tumordiagnostik, *Pathologie* 1996; 17:333-341, Springer-Verlag 1996
- [72] A. Raffael. Grundlagen der analytischen Durchflusszytometrie. *Labor-Medizin* 11(1988), 89-97, 1988.
- [73] Ormerod MG: Flow cytometry. A basic introduction. 2008. Online-Version auf <http://www.denovosoftware.com/> [Zugriff 07.01.16]
- [74] Janeway CA, Travers P, Walport M, and Shlomchik MW. *Immunobiology: The immune system in health and disease*. Garland Science, 6. Edition, 2005
- [75] Jörg Ahlers. Identifikation einer Zellpopulation mit Stammzellmarkern mit Korrelation zum klinischen Verlauf bei Diagnosestellung akuter kindlicher Leukämien. PhD thesis, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, 2009
- [76]https://www.bdbiosciences.com/br/wcmimages/accuri_c6_plus_optics_optical_bench.jpg [Zugriff 25.09.16]

- [77] Herzenberg LA, Tung J, Moore MA, Herzenberg LA, and Parks DR. Interpreting flow cytometry data: a guide for the perplexed. *Nature Immunology* Vol. 7 Nr. 7 (July 2006) 681-685, 2006
- [78] Tung J, Heydari K, Tirouvanziam R, Sahaf B, Parks DR, Herzenberg LA and L.A. Herzenberg. *Modern Flow Cytometry: A Practical Approach*. Clin Lab Med 27 (2007) 453-468, 2007
- [79] Tung J, Parks DR, Moore WA, Herzenberg LA, and L.A. Herzenberg. New approaches to fluorescence compensation and visualization of FACS data. *Clinical Immunology* 110 (2004) 277-283, 2004
- [80] Sack U, Tarnok A, Rothe G: *Zelluläre Diagnostik: Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*. 1. Aufl.: Karger Publishers (S. 165ff, 173ff). 2006
- [81] Perfetto SP, Chattopadhyay PK, Lamoreaux L, Nguyen R, Ambrozak D, Koup RA, Roederer M. *Amine reactive dyes: An effective tool to discriminate live and dead cells in polychromatic flow cytometry*. *Journal of Immunological Methods*. Vol 313, Issues 1-2, Pages 199-208. 2006
- [82] Pala P, Hussell T, Openshaw PJM. Flow cytometric measurement of intracellular cytokines. *Journal of Immunological Methods* 243 (2000) 107-124
- [83] Jung T, Schauer U, Heusser C, Neumann C, Rieger C. Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*, 159 (1993) 197-207
- [84] Altin JG, Sloan EK. The role of CD45 and CD45-associated molecules in T cell activation. *Immunol Cell Biol*. 1997 Oct;75(5):430-45
- [85] Jaimes N, Marghoob AA, Rabinowitz H, Braun RP, Cameron A, Rosendahl C, Canning G, Keir J. Clinical and dermoscopic characteristics of melanomas on nonfacial chronically sun-damaged skin. *Journal of the American Academy of Dermatology*; Vol 72 Issue 6, 1027-1035, 2015
- [86] Richards J, Treisman J, Garlie N, Hanson JP, Oaks MK. Flow Cytometry Assessment of Residual Melanoma in Tumor-Infiltrating Lymphocyte Cultures. *Cytometry Part A*. 81A: 374-381, 2012
- [87] J. Bortz: *Statistik für Sozialwissenschaftler*. Springer, 5. Auflage 1999
- [88] http://www.bioind.com/page_151 [Zugriff 07.01.16]
- [89] Zhu W, Chen J, Cong X, Hu S and Chen X: Hypoxia and serum deprivation-induced apoptosis in mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 24:416–425. 2006.

- [90] Bialik S, Cryns VL, Drincic A, Miyata S, Wollowick AL, Srinivasan A, Kitsis RN. The Mitochondrial Apoptotic Pathway Is Activated by Serum and Glucose Deprivation in Cardiac Myocytes. *Circ Res.* 1999 Sep 3;85(5):403-14.
- [91] Gross HJ, Verwer B, Houck D, Recktenwald D. Detection of Rare Cells at a Frequency of One Per Million by Flow Cytometry. *Cytometry* 14519-526 (1993)
- [92] Amidzadeh Z, Behbahani AB, Erfani N, Sharifzadeh S, Ranjbaran R, Moezi L, Aboualizadeh F, Okhovat MA, Alavi P, Azarpira N. Assessment of Different Permeabilization Methods if Minimizing Damage to the Adherent *cells* for Detection of Intracellular RNA by Flow Cytometry. *Avicenna J Med Biotech* 2014; 6(1): 38-46
- [93] Neagu M, Constantin C und Zurac S. Immune Parameters in the Prognosis and Therapy Monitoring of Cutaneous Melanoma Patients: Experience, Role and Limitations. *Hindawi BioMed Research International*, Volume 2013, p 1-13
- [94] Farzad Z, Cochran AJ, McBride WH, Gray JD, Wong V und Morton DL. Lymphocyte Subset Alterations in Nodes Regional to Human Melanoma. *Cancer Research* 50, 3585-3588, June 15, 1990
- [95] Kerst G, Bergold N, Gieseke F, Coustan- Smith E, Lang P, Kalinova M, Handgretinger R, Trka R, Müller I. WT1 protein expression in childhood acute leukemia. *Am. J. Hematol.* 83:382–386, 2008

8 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Universitäts-Hautklinik Tübingen unter Betreuung von Prof. Dr. Anja Ulmer angefertigt. Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Kai Witte, Diplom-Biologe, und Oberarzt Dr. Martin Ebinger, Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen. Sämtliche Versuche wurden (nach Einarbeitung durch Labormitglieder (Petra Lehnert, Nadine Luz, Kai Witte) von mir eigenständig durchgeführt. Die Bereitstellung der WLK erfolgte durch Petra Lehnert und Nadine Luz. Die durchflusszytometrischen Färbungen, Messungen und die Auswertung wurden durch mich mit freundlicher Unterstützung durch Kai Witte, Kinderklinik, durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte nach Beratung durch Aline Naumann vom Institut für Biometrie der Universität Tübingen. Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Köln, den 25.09.2016

9 Danksagung

Sehr herzlich möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Anja Ulmer für die Annahme als Doktorandin, die inhaltliche Begleitung, zuverlässige Betreuung und ständige Motivation bedanken. Mein herzlicher Dank gilt außerdem Kai Witte, der mich bei unzähligen Treffen mit dem Pipettieren, Resuspendieren, Filtrieren, Zentrifugieren, Messen und der Auswertung vertraut gemacht hat und mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Auch möchte ich Petra Lehnert und Nadine Luz danke sagen, die mir zuverlässig Tag für Tag die Lymphknoten bereitgestellt und dann immer Bescheid gegeben haben. Sehr herzlich möchte ich mich auch bei Frau Aline Naumann bedanken, die mich bei der statistischen Auswertung beraten hat.

10 Lebenslauf