
**Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie
und Onkologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin**

DISSERTATION

Thema: Prognostische Bedeutung zirkulierender Tumorzellen bei Patienten
mit malignem Melanom

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Erhan Erdogan

aus Tuzlucaayir / Türkei

-
1. Gutachter: Prof. Dr. med. U. Keilholz
 2. Gutachter: Prof. Dr. med. P. Brossart
 3. Gutachter: Prof. Dr. med. E. Stockfleth

Datum der Promotion: 23.06.2013

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	6
1.1	Zirkulierende Tumorzellen.....	6
1.2	Zirkulierende Tumorzellen in anderen soliden Tumoren	7
1.3	Zirkulierende Tumorzellen beim malignen Melanom.....	9
1.4	Nachweismethoden von zirkulierenden Tumorzellen	10
1.5	Epidemiologie des malignen Melanoms	11
1.5.1	Prognostische Faktoren.....	11
1.5.2	Therapien.....	12
1.6	Verwendete Surrogat Marker.....	15
1.6.1	Tyrosinase	16
1.6.2	MART-1.....	17
1.7	Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit.....	18
2	PATIENTEN- MATERIAL UND METHODEN	19
2.1	Statistische Methoden	19
2.2	Patienten.....	20
2.3	Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion.....	22
2.4	Stadieneinteilungen.....	23
2.5	Weitere prognostische Faktoren.....	25
2.5.1	Therapie, Tumorlast, Karnofsky-Index, Alter, Geschlecht.....	26
3	ERGEBNISSE	27
3.1	Überlebens- und Progressionswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit des Nachweises von zirkulierenden Tumorzellen	27
3.1.1	Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit des Nachweises von CTC durch RT-PCR	27
3.1.2	Progressionswahrscheinlichkeit bei Nachweis von CTC durch RT-PCR.....	28
3.1.3	Überlebenswahrscheinlichkeit bei Nachweis von MART-1 durch RT-PCR.....	29
3.1.4	Progressionswahrscheinlichkeit bei Nachweis von MART-1	30

3.1.5	Überlebenswahrscheinlichkeit bei Nachweis von Tyrosinase	31
3.1.6	Progressionswahrscheinlichkeit bei Nachweis von Tyrosinase.....	32
3.2	Überlebens- und Progressionswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit	33
	verschiedener klinischer Faktoren.....	33
3.2.1	Überlebenswahrscheinlichkeit verschiedener Krankheitsstadien.....	33
3.2.2	Progressionswahrscheinlichkeit für die verschiedenen Krankheitsstadien.....	34
3.2.3	Überlebenswahrscheinlichkeit für verschiedene Therapiearten.....	35
3.2.4	Progressionswahrscheinlichkeit nach der erhaltenen Therapieart	36
3.2.5	Überlebenswahrscheinlichkeit bei erhöhter Lactatdehydrogenase.....	37
3.2.6	Progressionswahrscheinlichkeit nach Lactatdehydrogenase Erhöhung.....	38
3.2.7	Überlebenswahrscheinlichkeit bei Tumorlast	39
3.2.8	Progressionswahrscheinlichkeit bei Tumorlast.....	40
3.2.9	Überlebenswahrscheinlichkeit im Bezug auf den Karnofsky-Index	41
3.2.10	Progressionswahrscheinlichkeit in Bezug auf den Karnofsky-Index	42
3.2.11	Überlebenswahrscheinlichkeit im Bezug auf das Alter der Patienten	43
3.2.12	Progressionswahrscheinlichkeit in Bezug auf das Alter der Patienten	44
3.2.13	Überlebenswahrscheinlichkeit im Bezug auf das Geschlecht der Patienten	45
3.2.14	Progressionswahrscheinlichkeit in Bezug auf das Geschlecht der Patienten.....	46
3.3	Gesamtüberleben.....	47
3.4	Übersicht der Signifikanz der univariaten Analysen.....	48
3.5	Änderung der PCR von 1. zur 2. Blutentnahme	49
3.6	Multivariate Analyse bezüglich des Überlebens und der Progression.....	50
3.6.1	Cox-Regression Überleben-PCR Vorwärts	50
3.6.2	Cox-Regression Überleben-PCR Rückwärts	51
3.6.3	Cox-Regression Progress-PCR Vorwärts.....	52
3.6.4	Cox-Regression Progress-PCR Rückwärts.....	54
4	DISKUSSION	56
4.1	Zirkulierende Tumorzellen.....	58
4.2	Die RT-PCR Methode.....	58
4.3	Verwendete Surrogat-Marker	58
4.4	Weitere klinische Faktoren und deren Einfluss auf Progress und Überleben.....	60
4.5	Ausblicke	68

5	ZUSAMMENFASSUNG.....	71
6	LITERATURVERZEICHNIS	73
7	DANKSAGUNG	
8	LEBENSLAUF	
9	ERKLÄRUNG ZUR DISSERTATION	

1 EINLEITUNG

1.1 Zirkulierende Tumorzellen

Nach einer malignen Tumorerkrankung stehen heute zu Tage schon sehr viele spezifische Nachweismethoden zur Therapiekontrolle und Prognoseeinschätzung der jeweiligen Erkrankung zur Verfügung. Verbleiben dabei aber nach einer Behandlung der Erkrankung und nachweislich kompletter Remission des Primärtumors noch einzelne Tumorzellen im Körper, stehen diese im Verdacht auch nach Jahren Metastasen oder Rezidive bilden zu können.

Aktuell bestehen noch keine etablierten Methoden um diese Zellen eindeutig nachzuweisen.

Infolge der Fortschritte in der chirurgischen Behandlung maligner Tumoren, wird die Letalität in zunehmendem Maße mit einer frühen Metastasierung der Erkrankung verbunden, die im Allgemeinen zur Zeit der Primärdiagnose im Wesentlichen noch unklar ist. Die Entscheidung, ob dabei eine ergänzende Therapie zur Vermeidung von Rezidiven und/oder Metastasen des Primärtumors angewandt wird, basiert dabei meist nur auf einer statistischen Prognose der jeweiligen Erkrankung. (Armakolas et al. 2010, Kluger et al. 2000)

Diese Tumorzellen, die nach einer Behandlung noch im Körper verbleiben und innerhalb der Blutbahn identifiziert werden können, werden als zirkulierende Tumorzellen (CTCs) gekennzeichnet. Diese CTCs können lympho-hämatogen durch die Zirkulation vom Primärtumor zu entfernten Organen transportiert werden und sind so direkt auch für die meisten tumorbedingten Todesfälle verantwortlich. Patienten mit Metastasen haben dabei schon eine hohe Wahrscheinlichkeit von CTCs, diese CTCs können auch in der Blutbahn nachgewiesen werden. Jedoch werden dabei die biologischen und klinische Bedeutungen von CTCs und ihres Nachweises noch debattiert, denn diese CTCs können sowohl vom Primärtumor, als auch schon von vorhandenen Metastasen entstammen. (Alunni-Fabbroni et al. 2010, Gerges et al. 2010, Hayes et al. 2010)

Das Verständnis der biologischen Eigenschaften von CTCs ist folglich abhängig und begrenzt durch die Verfügbarkeit von Technologien diese CTCs nachzuweisen, zu isolieren und zu charakterisieren. Neben einer prognostischen Relevanz, gilt als wichtiges Ziel und von

großem Interesse, vor allem Methoden zu entwickeln, um CTCs zur Überwachung von Therapieverläufen einzusetzen zu können. Somit könnte auch frühzeitig ein Erfolg der Therapie kontrolliert werden, wenn andere Methoden wie die Bildgebung keine eindeutigen und aussagekräftigen Ergebnisse zeigen sollte. (Alix-Panabières et al.2011, Mavroudis 2010, Mocellin et al. 2006, Koyanagi et al. 2005)

Trotz der Beschränkungen von CTC-Isolierungsmethoden im peripheren Blut haben sich bisherige Studien in ihrer Mehrheit darauf konzentriert, CTCs die von soliden Tumoren abstammen nachzuweisen, wie zum Beispiel von malignen Tumoren der Brust, der Prostata und der Lunge. Welchen Einfluss diese Tumorzellen auf den weiteren Verlauf der Erkrankung, wie zum Beispiel auf Rezidive und/oder Metastasen haben ist bislang nicht eindeutig geklärt und wird weiterhin kontrovers diskutiert. (Gilles et al.2011, Paterlini-Bréchet 2011)

Eine Überwachung dieser CTCs kann sowohl für die Prognose als auch für die Therapie von großem Wert sein. Für den Nachweis dieser CTCs ist es wichtig, eine standardisierte Methode zu etablieren. Diese Methode sollte zum Beispiel im Rahmen einer routinemäßigen Blutentnahme möglichst ohne zusätzliche Belastung für den Patienten erfolgen. Damit bestünde die Möglichkeit einer standardisierten Therapiekontrolle der jeweiligen Tumorerkrankung.

1.2 Zirkulierende Tumorzellen in anderen soliden Tumoren

Beim kolorektalen Karzinom wurden in verschiedenen Studien teilweise differenzierte Ergebnisse gesehen. In einer Studie von Sartre et al. zeigten sich keine bedeutenden Wechselbeziehungen zwischen Tumorstandort, Krankheitsstadium, dem CEA-Niveau oder dem Laktatdehydrogenaseniveau (LDH) bei CTC Nachweis. (Sastre et al. 2008)

Eine Meta-Analyse von neun Studien, die zwischen 1998 und 2006 durchgeführt wurden, offenbarte eine schlechtere Prognose bei Patienten mit CTC-positivem Nachweis, welche durch RT-PCR Methoden in den Blutproben ermittelt wurden. Die Blutproben wurden dabei von Drainagen nach der Operation des Tumors gesammelt. Bei 50 % der Patienten mit Lymphknoten-positiven Tumoren konnte dabei ein CTC-Nachweis erfolgen, gegenüber 21 % der Patienten mit Lymphknoten-negativem Tumor mit einem CTC-Nachweis nach Entfernung des Primärtumors. Außerdem wurden hepatische Metastasen häufiger bei CTC-positiven Patienten

ten (21 %) als bei CTC-negativen Patienten (8 %) gefunden. Diese älteren Berichte zeigen die Relevanz möglicher prognostischer Werte von CTCs bei soliden Tumoren. (Allen et al. 2010, Katsuno et al. 2008)

In einer Studie mit ca. 150 Patientinnen mit Mammakarzinom wurden zirkulierende Tumorzellen mittels der CK19 RT-PCR- Methode nachgewiesen. Bei Nachweis von CTCs hatten die Patientinnen eine signifikant schlechtere Prognose. Die Identifizierung von CTCs stellte zudem einen wichtigen Faktor bei der Therapieentscheidung dar. (Stathopoulou et al. 2002)

Raynor et al. werteten bei Patientinnen mit Mammakarzinom in den frühen Krankheitsstadien den prognostischen Wert des CTC-Nachweises aus. Die Ergebnisse waren mit der Hypothese kompatibel, dass zwar ein CTC-Nachweis ein Hinweis auf ein höheres Risiko eines Rezidivs der Erkrankung und des kürzeren Gesamtüberlebens sei, jedoch wurde in dieser Untersuchung keine statistische Bedeutung erreicht. (Raynor et. al 2009)

Eine andere Studie von 80 Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom untersuchte den CTC-Nachweis im Hinblick auf ein rezidivfreies Überleben und auf das Gesamtüberleben. Dabei hatten Patientinnen ohne einen CTC-Nachweis eine erheblich bessere Prognose. Der Nachweis von CTCs stellte in dieser Studie einen sicheren prognostischen Faktor bei Patientinnen mit einem metastasierten Mammakarzinom dar. (Botteri et. al 2010)

In einer Studie von Jost et al. waren bei ca. 39% der männlichen Patienten mit einem fortgeschrittenen Prostatakarzinom, die Proben mit einem positiven CTC-Nachweis. Während die Kontrollproben bei den männlichen Patienten, mit einer gutartigen Prostatahyperplasie durchweg negative Ergebnisse zeigten. (Jost et. al 2010)

Stott et al. stellten in einer Studie bei Patienten mit Prostatakarzinom fest, dass CTC-Zahlen allein möglicherweise hinsichtlich des wuchernden Zustandes des Tumors nur teilweise informativ sind. Während eine Unterteilung von CTCs in molekular definierte Bevölkerungen, möglicherweise den genaueren Einblick in die biologischen Eigenschaften des Tumors und ein bessere Option für die Therapie darstellt. Dadurch könnte auch eine Tumorantwort bei therapeutischer Intervention verbessert werden. (Stott et al. 2010)

In einer Multicenter Studie mit Patienten, die an einem metastasierten Mammakarzinom, einem metastasierten kolorektalen Karzinom und einem metastasierten Prostatakarzinom erkrankt waren, zeigte sich bei erhöhtem Vorhandensein von CTCs insgesamt eine schlechtere Prognose. Dabei hatten Patienten mit einem erhöhten Nachweis von CTCs ein viel kürzeres Gesamtüberleben als Patienten mit einem geringen Nachweis von CTCs. (Miller et. al 2009)

1.3 Zirkulierende Tumorzellen beim malignen Melanom

Ob ein Nachweis von CTCs auch beim malignen Melanom mit einer schlechteren Prognose verbunden ist und/oder einen Einfluss auf die Progression der Krankheit hat, wird nach wie vor kontrovers diskutiert. Dabei konnte in zahlreichen bis jetzt durchgeführten Studien von verschiedenen Arbeitsgruppen eine Korrelation zwischen dem Vorhandensein von CTCs, dem jeweiligen Tumorstadium und der Prognose der Erkrankung gesehen werden.

Voit et al. untersuchten mittels Bestimmung der Tyrosinase bei ca. 110 Patienten im Stadium II/III der Erkrankung über ca. sechs Jahre die krankheitsspezifische Überlebenschance, welche bei Patienten, die immer eine negative RT-PCR Ergebnisse hatten, bei ca. 97 % lag. Bei Patienten mit mindestens einem positiven Ergebnis lag die krankheitsspezifische Überlebenschance bei 67 %. Dabei wurde eine starke Korrelation zwischen PCR und krankheitsspezifischer Überlebenszeit aufgezeigt. Der Nachweis von Tyrosinase-mRNA im peripheren Blut ist möglicherweise von ähnlicher Bedeutung für den klinischen Verlauf der Erkrankung als die Entdeckung von Mikrometastasen im Wächter-Lymphknoten. (Voit et. al 2005)

Ob Melanom CTCs tumorigen sind und die Ursache von Metastasen sein können, wollten Ma et al. in einem Mensch-zu-Maus-Xenotransplantation Experiment nachweisen. Die Ergebnisse lieferten den Anfangsbeweis, dass Melanom CTCs tumorigen sind und zeigten dabei, dass CTCs zur Metastasenbildung fähig sind. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine völlige CTC-Eliminierung notwendig ist, um eine metastatische Weiterentwicklung der Erkrankung zu hemmen. (Ma J. et al 2010)

1.4 Nachweismethoden von zirkulierenden Tumorzellen

Die molekulare Überwachung von CTCs durch die Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) bei Patienten mit Leukämien und Lymphomen gehören zum Routinegebrauch. Bei soliden Tumoren sind noch keine optimalen Methoden etabliert. Die Nachweismethoden bestehen dabei aus der RT-PCR, der Immunzytochemie, der Immunhistochemie (ICH- Immunhistologie /Immun- bzw. Antikörperfärbung), der Durchflußzytometrie (FACS - Fluorescence Activated Cell Sorting) oder der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH). Als mögliche Untersuchungsmaterialien können dabei peripheres Blut, arterielles Blut, Knochenmark und Lymphknoten dafür verwendet werden. Mit diesen Methoden lassen sich einzelne Tumorzellen unter 10×10^4 bis 10×10^7 Hintergrundzellen (Leukozyten) nachweisen. Zur Gewährleistung einer einfachen und leicht wiederholbaren Langzeitüberwachung sollte eine möglichst leicht zugängliche Methode gewählt werden, in der zum Beispiel peripheres Blut verwendet wird. (Andersen et al. 1997, Böckmann 2001, Olavarria et al. 2001)

Bei der Melanom Erkrankung können CTCs als prognostische Variable verwendet werden, um zum Beispiel eine Therapie zu führen. Die meisten wissenschaftlichen Untersuchungen haben sich bislang auf die Identifizierung von verteilenden Tumorzellen unter Verwendung unterschiedlicher Methoden konzentriert, einschließlich der Polymerase-Kettenreaktion. Diese Methoden haben jedoch eine nicht ausreichende Empfindlichkeits- und Variablenbesonderheit im Bezug auf die prognostische Deutung. Eine neuere Technologie zur Identifizierung ist das CellSearch-System. Dieses System verwendet die Immunomagnetic Zellkennzeichnung und die Digitale-Mikroskopie. Diese Methode könnte eine alternative Methode darstellen um CTCs bei Patienten mit Melanomen im fortgeschrittenen Stadium zu identifizieren und als prognostischer Faktor zu nutzen. (Steen et al. 2008)

Dabei ist gerade bei der Melanomerkkrankung eine zeitlich schnelle Erkennung einer eventuellen Metastasenbildung wichtig. In mehreren Studien wurden zunehmend der Gebrauch von Multimarker Realzeit-RT-PCR für die Krankheitsprognose genutzt. Dabei stellt die dynamische Einschätzung von serienmäßig erhaltenen Blutexemplaren eine nützliche Methode für die frühe Metastasenentdeckung und Behandlungsantwort von Melanompatienten dar. (Arenberger P et al. 2008)

1.5 Epidemiologie des malignen Melanoms

Steigende Inzidenzraten des kutanen Melanoms werden in den letzten vier Jahrzehnten in der weißen Bevölkerung weltweit beobachtet. Die Krebsstatistik in den Vereinigten Staaten registrierten 6 Fälle pro 100.000 Einwohner und Jahr zu Beginn der 1970er Jahre und 18 Fälle pro 100.000 Einwohner und Jahr zu Beginn des Jahres 2000, was eine Verdreifachung der Inzidenzraten zeigt. (Garbe et al. 2009, Schlesinger-Raab et al. 2010, Anger et al. 2010).

Die höchsten Inzidenzraten wurden aus Australien und Neuseeland, von 40 bis 60 Fällen pro 100.000 Einwohner und Jahr, bei bekannt erhöhter UV-Belastung in diesen Ländern gemeldet. Die Mortalität in den Vereinigten Staaten und in Europa hat ebenfalls in den 1970er und 1980er Jahren deutlich zugenommen. Seit den 1990er Jahren wird jedoch ein Einpendeln der Mortalität in vielen Ländern beobachtet. Die American Cancer Society (ACS) schätzt, dass im Jahr 2009 in den Vereinigten Staaten ungefähr 69.000 neue Fälle von invasivem Melanom auftraten. (Garbe et al. 2001, Tawbi et al. 2010)

1.5.1 Prognostische Faktoren

Der wichtigste Prognosefaktor beim malignen Melanom ist bis heute, die Tumordicke nach Breslow des Primärtumors bei der Erstdiagnose. Dabei werden die Kriterien für die Prognose und Therapie über die Stadien der TNM-Klassifikation eingeteilt:

- die Tumordicke (nach Breslow)

- die Ulzeration des Tumors

- die Mitoserate

Hierbei ist wichtig wie die Breslow Tumordicke nach der Resektion bei Erstdiagnose ist und ob dabei schon Metastasen nachzuweisen sind. In der aktuellen Klassifikation von 2009 (AJCC) wird auch die Mitoserate, neben der Tumordicke nach Breslow und der Ulzeration, bei Primärmelanomen von $\leq 1\text{mm}$ verwendet. (Balch et al. 2009, Azzola et al. 2003)

In den klinischen Stadien I und II ist die Prognose als günstig anzusehen. Wenn eine Metastasierung bei der Erstdiagnose nachzuweisen ist, gilt eine deutlich ungünstigere Prognose. (Balch et al. 2001)

Das maligne Melanom ist die Erkrankung der menschlichen Haut, die am häufigsten tödlich verläuft. Der Ursprung der Krankheit geht vom melanozytären Zellsystem aus, meist manifestiert sich die Erkrankung an der Haut. Erhöhte UV-Belichtung einer genetisch prädisponierten Bevölkerung scheint zumindest teilweise verantwortlich für eine kontinuierliche Zunahme der Inzidenz in den letzten Jahrzehnten zu sein. Verdächtige Hautveränderungen sollten daher auf Asymmetrie, Begrenzung etc. (ABCD-Regel) durch erfahrene Ärzte abgeklärt werden. Die Diagnose sollte auf eine vollständige Dicke Exzisionsbiopsie mit einem kleinen Seitenrand beruhen. Dabei kann die Erstmanifestation der Erkrankung auch das Auge, die Hirnhäute oder die Schleimhäute betreffen.

Der Tumor stellt sich in den meisten Fällen mit einer starken Pigmentierung dar, in seltenen Fällen aber auch unpigmentiert als amelanotisches Melanom. (Dummer et al. 2010)

Des Weiteren gelten als Risikofaktoren und Begünstigung zur Entwicklung eines malignen Melanoms: hellhäutige Personen mit einer UV-empfindlichen Haut (Hauttyp I und II), das Risiko dieser Hauttypen ist dabei deutlich gegenüber den Hauttypen III-IV erhöht. Vorhandensein von multiplen Melanozytären Nävi (≥ 100 gewöhnliche Nävi), mehr als fünf atypischen Nävi (aus Familien mit gehäufte Melanomerkrankung), große kongenitale Nävi, Nävi größer als 6mm, PUVA-Therapie, häufige UV-Exposition, Xeroderma Pigmentosum, Immunsuppression, Expositionen gegenüber Gefahrstoffen, Narben und Erbfaktoren. Tatsächlich sind 8%-12% von malignen Melanomen genetisch bedingt auf, die möglicherweise in Verbindung stehenden Gene bzw. Genveränderungen sind Veränderungen des CDKN2A-Gens, das p16 verschlüsselt und ist verbunden mit Chromosom 9p21. Klinisch nachteilige Faktoren umfassen zunehmendes Alter, männliches Geschlecht, Lage des Primärtumors und Metastasen. (Bandarchi et al. 2010)

1.5.2 Therapien

Es bestehen verschiedene, sowohl adjuvante als auch palliative Therapie Möglichkeiten. Nach histologischer Sicherung und Bestimmung der Ausbreitung des Tumors empfiehlt die Deut-

sche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie nach Resektion des Primärtumors eine eher zurückhaltende Strategie. Mit Verlaufsbeobachtung und gegebenenfalls einer weiteren Intervention je nach Beschwerdebild und mit Berücksichtigung nach Prognosefaktoren und Lebensqualität. (DGHO 2004)

Verschiedene adjuvante Therapieansätze bestehen mit Interferonen (Interferone: INF-alpha-2a und INF-alpha-2b). Dabei werden Interferone schon seit längerer Zeit in der systemischen Therapie des fortgeschrittenen malignen Melanoms unter bestimmten Voraussetzungen eingesetzt. Dabei zielt die adjuvante Therapie des malignen Melanoms darauf, die Verringerung der Rezidivrate und Mortalität zu senken. Patienten in den Tumorstadien II B/C und III A-C soll eine adjuvante Interferon-Therapie angeboten werden. Dagegen wird keine adjuvante Chemotherapie (Dacarbazin, Vindesine u.a.) empfohlen, da bis dato kein Vorteil gesehen wurde, wird diese nicht empfohlen. Metastasierte Melanome sind in der Regel sehr widerstandsfähig gegen eine Standard-Chemotherapie. Die Standardbehandlung für Patienten mit metastasierendem Melanom hat sich nicht wesentlich in den vergangenen 20 Jahren verändert, und daher sind neue Strategien zur Behandlung von metastasiertem Melanom dringend erforderlich. (Eigentler et al. 2008, Petrella et al. 2007, Algazi et al. 2010, Mocellin et al. 2010, Garbe et al. 2011b, Verma et al. 2006, Boyle 2011)

Aktuell werden auch einige sehr viel versprechende neue Medikamente in der Behandlung des metastasierten Melanoms erfolgreich eingesetzt. Dabei sind diese neuentwickelten Medikamente auf einem ausführlichen Verständnis der Biologie der Erkrankung ausgelegt und zeigen schon einen bedeutenden Nutzen. Ipilimumab und Vemurafenib zeigten eine positive Auswirkung auf das Gesamtüberleben bei Patienten mit metastasiertem Melanom. (Ribas et al. 2011, Hamid et al. 2011, Tanaka et al. 2011)

Mit Ipilimumab, ein monoklonaler Antikörper, der den Ligand CTLA-4 anvisiert, ist für Patienten mit fortgeschrittenen Melanomen für die Zweitlinientherapie durch die Europäische Medizin-Agentur genehmigt worden (EMA). Es wurde von bedeutendem Überlebenszeitnutzen berichtet, in denen Fällen wo Ipilimumab in Kombination mit Dacarbazine eingesetzt wurde, gegenüber der Monotherapie mit Dacarbazine, welche für die Erstbehandlung verglichen wurde. Andere monoklonale Antikörper, die T-Zell Liganden, wie Programmirtes Death-1 (PD-1) anvisieren, sind auch viel versprechend. Verschiedene Inhibitoren von Maus-

sarkom v-Raf Virenoncogene homologes B1 (BRAF) erbringen hohe Antwortquoten bei den Patienten, welche die BRAF-V600E Veränderung beherbergten. Zu dem wurde eine bedeutende Auswirkung auf Rezidivfreies- und Gesamtüberleben für Vemurafenib demonstriert, dass mit Dacarbazine in einem Phase-III Versuch verglichen wurde, die Zulassung dieser Medikamente ist erfolgt. Beide Medikamente hatten dabei einen Effekt von 2-3 Monaten auf die mittlere Überlebenszeit, also müssen weitere Kombinationstherapien erforscht werden. (Eggermont et al. 2011)

Die Standardbehandlungen mit einer Chemotherapie zeigen ein niedriges Ansprechen, von denen auch wenige dauerhaft sind. Zytokintherapie mit IL-2 erzielt zwar bessere Ergebnisse, dieses wird aber von starken Nebenwirkungen begleitet, hierbei werden die Patienten während der Behandlung hospitalisiert. In einer weiteren Studie mit Patienten mit einem metastasierten Melanom wurden Dacarbazine und Cisplatin kombiniert mit Interferon-alfa-2b im Vergleich wurde einmal mit und einmal ohne Gabe von IL-2 intravenös hochdosiert therapiert, dabei konnten keine klinisch relevante Überlegenheit einer Therapie gesehen werden. In-Transit Metastasen, die zu umfangreich für eine chirurgische Intervention sind oder dadurch nicht behandelbar sind, können durch eine Strahlentherapie behandelt werden, mit einer empfohlenen Gesamtdosis von 50-60 GY. Ein wichtiges Ziel sollte durch Follow-up-Untersuchungen bei Patienten mit malignen Melanomen sein, um die Früherkennung von Rezidiven oder Metastasen zu verbessern. Rechtzeitige Erkennung eines Rezidivs hat einen relevanten Effekt auf die Prognose. (Garbe et al. 2011, Garbe et al. 2008, Garbe et al. 2003, Keilholz et al. 2005)

In der Palliativen Therapie (Chemotherapie und Chemoimmuntherapie in palliativer Indikation) wird eine systemische Chemotherapie oder eine Chemoimmuntherapie eingesetzt, diese werden bei inoperablen Rezidivtumoren, oder bei inoperablen regionalen Metastasen sowie Fernmetastasen eingesetzt. Hierfür werden Kombinationen von Zytostatika (Dacarbazin, Fotemustin, Cisplatin u.a.) mit Zytokinen (Interferone, Interleukin 2) verwendet. (Legha et al. 1998, Vaubel et al. 2011)

Die Patienten in dieser Arbeit erhielten verschiedene Therapiearten, diese erfolgten individuell. Beginnend mit der Exzision des Primärtumors, bis zu Vakzinierung, Mono-

immuntherapeutische oder chemotherapeutische Behandlungsformen. Es erfolgten auch eine Vielzahl von Therapiekombinationen aus den genannten Therapiemöglichkeiten.

1.6 Verwendete Surrogat Marker

Einige Biomarker scheinen, ein bedeutendes Potenzial als prognostische Indikatoren für zukünftige therapeutische Mittel zu haben. Die Anwendung dieser Marker in der klinischen Praxis enthält vielleicht den Schlüssel zu weiteren bedeutenden Fortschritten.

Biomarker schließen molekulare Werkzeuge wie Proteine, Peptide, DNS, mRNA oder Prozesse mit ein, die in gegebenen malignen Erkrankungen, mit spezifischen quantitativen und qualitativen Werkzeugen gemessen werden können. Diese Markierungen können in den Geweben, in den Zellen und/oder in den Körperflüssigkeiten gefunden und nachgewiesen werden. Der ideale Serum Biomarker sollte möglichst eine Molekürentdeckung sein, die im Blut eine Diagnose des wachsenden Tumors bei einem Patienten erlaubt.

Dabei sollte der Biomarker eine genügende Empfindlichkeit aufweisen und die Besonderheit haben, zwecks falsch negativer und falsch positiver Ergebnisse klären können. Die Empfindlichkeit bezieht sich auf den Anteil der Patienten mit einer chronischen Krankheit, bei denen ein positiver Wert für einen Biomarker nachweisbar ist, während die Besonderheit vom Anteil der gesunden Einzelpersonen mit einem negativen Test heraus gefiltert werden sollte. Diese Moleküle können in die Blutbahn ausströmen und direkt durch Melanomzellen oder indirekt durch den Zerstörungsprozess von Melanomzellen, wie durch eine Chemotherapie, Immunotherapie oder Kombinationstherapie nachgewiesen und abgesondert werden. Die Entdeckung von Biomarkern ist ein sehr intensiver und komplexer Forschungsprozess, der die wissenschaftliche Zusammenarbeit und einen immensen Rechen- und Datenanteil mit einbezieht. Zahlreiche frühe Ansätze der Forschung standen auf den bekannten klinischen und pathologischen Ergebnissen teilweise still, durch die heute zur Verfügung stehenden Technologien, konnten deutliche Fortschritte in der klinischen Forschung erreicht werden.

Aktuell existiert noch kein idealer Biomarker auf dem Forschungsgebiet des malignen Melanoms und zusätzliche Marker (vor allem eine Kombination verschiedener Marker), stellen

vermutlich nützlichere Informationen wie in einigen Studien und Forschungsergebnissen schon gezeigt zur Verfügung. Der Routinegebrauch von Tumormarkern könnte eine wichtige Rolle spielen, weil dadurch die Früherkennung und Definition der therapeutischen Strategien damit besser steuerbar sind. (Solassol et. al 2011)

Die Suche nach geeigneten Biomarkern für die Diagnose, Prognose, Staging und Behandlung von Patienten mit malignem Melanom ist wichtig, da wie bei vielen anderen Tumoren auch, die hämatogene Ausbreitung des Melanoms, eine schlechte Prognose darstellt. Dabei wurden in einigen Studien eine direkte Extraktion von intakten Tumorzellen aus dem peripheren Blut und in anderen der Nachweis von Surrogat-Marker der zirkulierenden Melanomzellen wie Tyrosinase oder MART-1 verwendet. Darüber hinaus wurden viele andere Biomarker untersucht, wie die Lactat-Dehydrogenase, S100 B, MIA, TA90, und das C-reaktive Protein um einen geeigneten Biomarker des malignen Melanoms zu finden. Dabei wurden schon viele Fortschritte in den bisherigen Studien zu diesen untersuchten Biomarkern gezeigt. Melanom Läsionen entwickeln sich bei demselben Patienten zu unterschiedlichen Zeiten oder gleichzeitig an verschiedenen Orten und können antigenetisch abweichen, da das maligne Melanom in seiner biologischen, immunologischen und metastatischen Eigenschaften heterogen ist sind sehr spezifische Marker notwendig. (Enk et al. 2004, Kounalakis N et al. 2005, Mocellin et al. 2008, Hofmann et al. 2009, Garnier et al. 2007, Auge et al. 2005, Dumitrascu et al. 2009)

1.6.1 Tyrosinase

Obwohl die Messung der Tyrosinase-Aktivität im Serum in den ersten Studien mit erhöhten Werten für erkrankte Patienten nachweisen ließ, im Vergleich zu gesunden nicht erkrankten Patienten, wurde dieser Marker nicht weiter intensiver erforscht. (Sonesson et al. 1995)

Dabei wird die Tyrosinase nur in wenigen Zelltypen wie Melanomzellen, Melanozyten und peripheren Gliazellen aktiv exprimiert. Ein Nachweis von Tyrosinase-mRNA in der Blutbahn deutet dabei auf ein Vorhandensein von zirkulieren Melanomzellen oder einer hämatogenen Metastasierung hin. (Kwon et al. 1987)

Trotzdem wurde diese Methode nicht weiter verwendet, da sie sich in der klinischen Routine aufgrund der Schwierigkeiten bei der Standardisierung nicht durchsetzen konnte. Deshalb

wurde dieser potenzielle Tumormarker des malignen Melanoms nicht weiter verfolgt. Bis heute wurden Hunderte von Studien durchgeführt, um den klinischen Wert der Tyrosinase zu bewerten, auch in Kombination mit anderen molekularen Markern. Leider existiert aber nach wie vor kein Konsens über den Nachweis und den Nutzen der Tyrosinase als Marker. (Gradilone et al. 2010)

Dabei zeigte sich die RT-PCR Tyrosinase-mRNA-Expression als ein zuverlässiger und reproduzierbarer Marker. Es konnte auch gezeigt werden, dass die Tyrosinaseaktivität mit einem hohen Risiko für eine Melanomprogression verbunden ist und sollte weiterhin in der klinischen Anwendung im Routine Follow-up benutzt werden. (Osella-Abate et al.2003)

1.6.2 MART-1

Der Marker MART-1 (Melanoma Antigen Recognized by T-cells 1) ist von zwei verschiedenen Arbeitsgruppen zuerst beschrieben und entdeckt worden (Coulie et al. 1994, Kawakami et al. 1994). Daher auch eigentlich zwei unterschiedlichen Bezeichnungen, MART-1 und Melan-A.

Die MART-1 wird in Melanozyten, wie auch in Melanomzellen, Naevomelanozyten, sowie in vielen anderen Geweben, wie auch in Steroidproduzierenden Zellen (zum Beispiel Nebenniere) und vielen anderen Tumoren exprimiert. Dass die MART-1 aber auch ein sehr spezifischer Marker für maligne Melanome ist, konnte 1994 durch Coulie et al. bewiesen werden. In den untersuchten Proben von ca. 20 Patienten mit klinisch nachgewiesenem Melanom hatten alle eine MART-1 Expression, wobei die Patienten mit anderen Karzinomen keine MART-1 Expression von zirkulierenden Tumorzellen im peripheren Blut hatten. Das Gen welches die Bezeichnung Melan-A bekam, hatte nichts mit den bis dahin bekannten Genen zutun. Wie das Tyrosinase-Gen, wurde es von den meisten Melanomen Tumorproben exprimiert und unter den normalen Zellen nur von Melanozyten. (Coulie et al. 1994)

Da sich die MART-1-Expression auf Pigmentzellen beschränkt, könnte das Anwenden von RT-PCR für MART-1 neben dem Tyrosinase-mRNA-Nachweis die Nachweisrate von zirkulierenden Tumorzellen im Blut von Melanopatienten erhöhen.

1.7 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Dadurch, dass das maligne Melanom in sehr frühen Stadien der Erkrankung zu Metastasierung über Lymph- und Blutbahnen neigt, gehört es zu den aggressivsten Tumoren des Menschen.

Die aktuellen Tumormarker in der klinischen Anwendung sind noch nicht etabliert genug um die individuelle Prognose eines Patienten effektiv zu ermitteln oder damit eine Therapiekontrolle zu gestalten. Die prognostischen Aussagen bei einer Metastasierung werden derzeit nach histologischen Merkmalen des Primärtumors beurteilt, wie Tumordicke und Ulzeration, diese statistischen Schätzungen sind für den individuellen Fall aber nicht ausreichend. Daher ist es wichtig Methoden zu entwickeln, welche eine eindeutige Klärung dieser Fragen beantworten können. Da maligne Melanome in den Anfangsstadien der Erkrankung durch eine rechtzeitige, zumeist chirurgische Intervention geheilt werden können. In den fortgeschrittenen Stadien wird meist nur eine Lebensverlängerung erreicht, da keine etablierten Methoden zur Verfügung stehen um eine Metastasierung frühzeitig aufzeigen können.

Die Fragestellung dieser Arbeit ist: Haben zirkulierende Tumorzellen einen prognostischen Einfluss auf den Progress und/oder auf das Gesamtüberleben von Patienten mit einer klinisch nachgewiesenen malignen Melanom Erkrankung in den Erkrankungsstadien I-IV.

Es soll dabei durch statistische Analysen untersucht werden, ob ein CTC Nachweis einen bedeutenden Einfluss auf das Überleben und den Progress der Erkrankung hat.

2 PATIENTEN- MATERIAL UND METHODEN

Die statistische Arbeit stellt die prognostische Bedeutung von zirkulierenden Melanomzellen im peripheren Blut, bei Patienten mit histologisch gesichertem malignem Melanom dar. Die Daten von 168 Patienten mit kutanem Melanom, die zwischen 1998 und 2007 im UKBF behandelt oder sich im Rahmen der weiteren Therapie vorgestellt haben, wurden analysiert, die Follow-up Zeit betrug 48 Monate.

2.1 Statistische Methoden

In den Analysen wird der Verlauf der progressionsfreien Zeit (in Monaten) in den Gruppen mit negativem und positivem Ereignis zusammengefasst. Nach Kaplan-Meier-Verfahren werden die Ereignisse, das Eintreffen einer Progression und die Überlebenszeit in verschiedenen Zeitpunkten beobachtet und die Mediane bestimmt.

Die Kaplan-Meier-Methode haben Kaplan und Meier (1958) entwickelt. Es ist eine Methode zur Berechnung der Überlebenswahrscheinlichkeiten, in der die zur Verfügung stehenden Informationen aller Patienten einer Studie so weit wie möglich berücksichtigt werden. Es werden immer, wenn für einen Fall das Zeitereignis wie zum Beispiel ein Rezidiv, Tod usw. eintritt, die Überlebenswahrscheinlichkeiten der noch lebenden Patienten neu berechnet. Der Anfang und das Ende einer Studie werden wie bei allen Überlebensanalysen auch bei der Kaplan-Meier-Methode festgelegt.

Dabei bedeutet „zensiert“, dass ein Patient den Beobachtungszeit überlebt hat oder aber auch sich durch ein konkurrierendes Ereignis der weiteren Beobachtung entzogen hat.

Weiterhin wurde die Cox-Regressions-Methode, ein multivariates Analyseverfahren, angewandt. Mit diesem Verfahren können vermutete Einflussfaktoren oder bekannte Kovariablen und Risikofaktoren, welche einen prognostischen Wert für die Überlebenszeitverteilung haben analysiert werden. (Toutenburg 2009)

Das Überleben und der Progress der Patienten wurde mit unterschiedlichen Einflussgrößen mit dem Programm SPSS durch Kaplan-Meier-Kurvenanalysen und Cox Regression dargestellt.

Die prognostische Bedeutung wurde durch direkten Nachweis von Melanomzellen durch die RT-PCR, durch die Marker Tyrosinase, Mart-1 und Lactatdehydrogenase (LDH) sowie anderer Einflussfaktoren wie Alter, Geschlecht, Tumorlast, Therapiearten, Karnofsky-Index und Stadium der Erkrankung auf prognostische Bedeutung verglichen und kontrolliert.

Es wurden Patientenakten verwendet, die von der Klinik für Hämatologie und Onkologie, der Charité Berlin im Campus Benjamin Franklin zur Verfügung gestellt wurden. Das Follow-up wurde mittels Anschreiben an die Hausärzte, an die Patienten und zu einem großen Teil durch persönlichen Kontakt zu den Patienten zusammen getragen. Die Einhaltung ethischer Grundsätze erfolgte in Anlehnung an die Deklaration von Helsinki.

Mit dem Programm SPSS 17.0 (Statistical Package for the Social Sciences) erfolgten die Auswertungen der Arbeit.

2.2 Patienten

In diese Arbeit wurden Patienten, die sich zwischen Mai 1998 und Dezember 2007 in der Charité - Campus Benjamin Franklin zur Behandlung befanden oder sich wegen weiterer Therapieoptionen vorstellten, aufgenommen. Es wurden Blutproben mit Einverständnis der Patienten entnommen und es erfolgte eine RT-PCR Analyse im Labor Prof. Keilholz.

Es wurden dabei im Gesamtraum der Beobachtungszeit den Patienten nach schriftlichem Einverständnis 10 ml-Blutprobe in EDTA- Blutröhrchen entnommen und diese weiter verarbeitet. Dabei wurde die Gesamt-RNS durch saure Guanidinium Schwefelcyanats-/Phenolchloroformextraktion gereinigt und durch eine hohe reine RNS Isolierungsausrüstung lokalisiert (Roche-Diagnosen, Deutschland). Für Rückübertragung wurde die Omniscript Reverse Transcriptase-Ausrüstung (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet.

Quantitative RT-PCR wurde verwendet, um Abschriften der Melanommarkierungstyrosinase und des MelanA/MART1 zu ermitteln.

Weiterhin wurden die stationären und ambulanten Akten der Patienten dafür herangezogen. Das anfängliche Patientenkollektiv bestand aus insgesamt 168 Patienten (Abb.2.2.1), von diesem Gesamtkollektiv wurden wegen fehlender Akten oder Daten, (wie zum Beispiel das Follow up) insgesamt 34 Patienten aus der Arbeit ausgeschlossen. Von den verbleibenden 134 Patienten hatten alle Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten mindestens eine Blutentnahme mit einer PCR Analyse zum Nachweis zirkulierender Melanomzellen im peripheren Blut.

Von den 134 Patienten wurde eine weitere Untergruppe mit 36 Patienten gebildet, die mindestens zwei Blutentnahmen im Rahmen der Therapiekontrolle erhielten, dabei lag zwischen der 1. und der 2. Blutentnahme ein Zeitraum von 31 Tagen bis 80 Tagen.

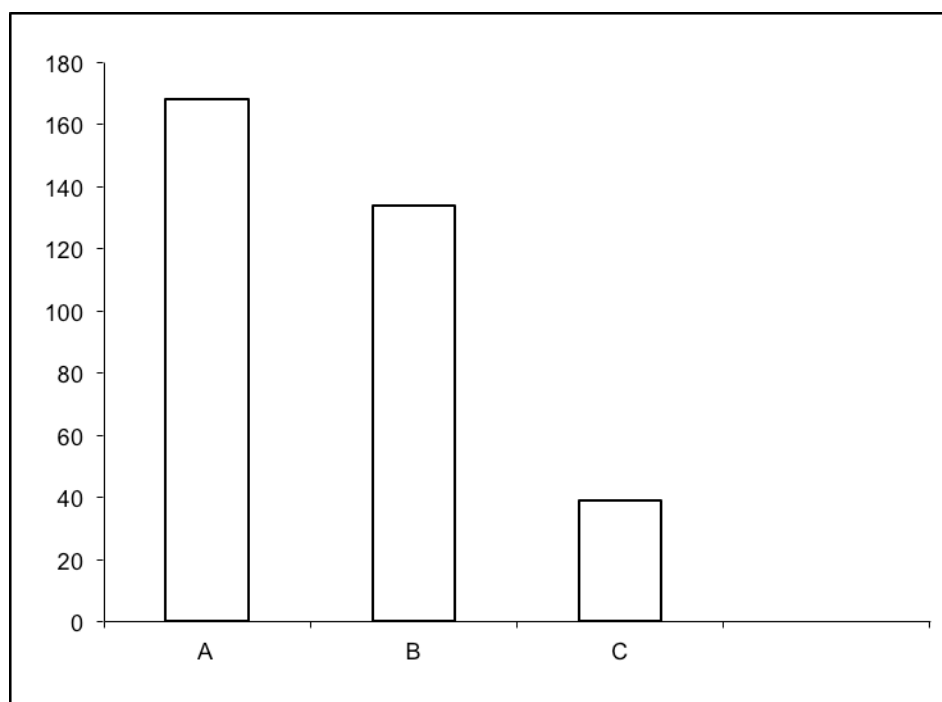


Abb. 2.2.1 A: Gesamtzahl der Patienten bei Beginn der Arbeit
 B: Patienten mit vollständigen Daten und mindestens einer Blutentnahme
 C: Patienten mit vollständigen Daten und mindestens 2 Blutentnahmen

2.3 Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion

Als im Jahr 1991 die Real-Time-quantitative-PCR (qRT-PCR, auch Real Time Detection PCR) oder quantitative Echtzeit-PCR (RT-PCR) eingeführt wurde, war das ein großer Schritt um zum Beispiel später dadurch die Expression von Tyrosinase im peripheren Blut von Melanompatienten zu bewerten und um so den Nachweis von zirkulierenden Melanomzellen zu erkennen.

Die Real-Time-quantitative-PCR (qRT-PCR) ist eine Methode genauer eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren. Dieses Prinzip beruht auf herkömmliche Polymerase-Kettenreaktion (PCR), die aber dadurch eine zusätzliche Quantifizierung der gewonnenen DNA ermöglicht. (Gradilone et al. 2010)

Auch völlig neue Möglichkeiten eröffnete der Nachweis einer Mikrometastasierung im Blut mit der Entwicklung der Polymerase-Kettenreaktion (Keilholz 1998, Saiki et al. 1985). Diese Methode wurde 1983 von Kary Mullis entdeckt und beschrieben (Mullis 1990).

Im Jahre 1991 erfolgte der erste erfolgreiche Nachweis für den Nachweis zirkulierender Melanomzellen bei Patienten mit malignem Melanom Erkrankung durch Anwendung der RT-PCR. (Smith et al. 1991).

Vendittelli et al. konnten zeigen, dass diese Methode in der Lage ist, geringste Mengen von Zellen zu ermitteln. Und wurde als neue standardisierte molekulare Methode für die Behandlung von Melanompatienten vorgeschlagen, besonders für die Überwachung von Patienten in höheren AJCC-Stadien. (Vendittelli et al. 2009)

2.4 Stadieneinteilungen

Die Stadien Einteilung erfolgte ab dem Stadium IV (um einfachere Datenanalysen zu führen) mit den Bezeichnungen IVA, IVB und IVC wie folgt:

IV A (M1a, AJCC)= Lymphknoten-, Hautmetastasen (nicht lokal)

IV B (M1b,AJCC)= Lungenmetastasen

IV C (M1c,AJCC)= Viscerale-,sonstige-, und Fernmetastasen

Die aktuelle Stadien Einteilung der AJCC (American Joint Committee on Cancer) mit der TNM-Klassifikation (2009), diese Stadien Einteilung wurde auch von der UICC akzeptiert.

Tabelle 2.4.1 - T-Klassifikation (TNM-Klassifikation, AJCC , 2009)

T	Tumordicke	Ulzerationsstatus
Tis	nicht nachweisbar	Melanoma in situ
T1	Tumordicke < 1,0 mm	a: ohne Ulzeration, Mitoserate <1/qmm
T1	Tumordicke < 1,0 mm	b: mit Ulzeration oder Mitoserate >1/qmm
T2	Tumordicke 1,01-2,0 mm	a: ohne Ulzeration
T2	Tumordicke 1,01-2,0 mm	b: mit Ulzeration
T3	Tumordicke 2,01-4,0 mm	a: ohne Ulzeration
T3	Tumordicke 2,01-4,0 mm	b: mit Ulzeration
T4	Tumordicke > 4,0 mm	a: ohne Ulzeration
T4	Tumordicke > 4,0 mm	b: mit Ulzeration

Tabelle 2.4.2 - N-Klassifikation (TNM-Klassifikation, AJCC, 2009)

N	Anzahl metastasierter Lymphknoten	Masse der Lymphknotenmetastasen
N0	0	nicht nachgewiesen
N1	1 LK	a: mit Mikrometastase(n) ¹
N1	1 LK	b: mit Makrometastase(n) ²
N2	2-3 LK	a: mit Mikrometastase(n) ¹
N2	2-3 LK	b: mit Makrometastase(n) ²
N2	2-3 LK	c: In-Transit-Metastase(n) / Satelliten-Metastase(n) <u>ohne</u> Lymphknotenbeteiligung
N3	4 oder mehrere LK befallen. oder verbackene LK, oder in-Transit/ Satellitenmetastasen mit Lymphknotenbeteiligung	oder In-Transit-Metastase(n) / Satelliten-Metastase(n) <u>mit</u> Lymphknotenbeteiligung

¹ Mikrometastase(n) Diagnose erfolgt nach Schildwächter- oder elektiver Lymphadenektomie

² Makrometastase(n) sind als klinisch nachgewiesene Lymphknoten-Metastasen definiert, durch therapeutische Lymphadenektomie bestätigt oder Lymphknoten-Metastasen mit großer extrakapsulärer Ausdehnung

Tabelle 2.4.3 - M-Klassifikation- LDH ist neu aufgenommen in die Klassifikation
(TNM-Klassifikation, AJCC, 2009)

M Lokalisation	Serum LDH
M0 Keine Fernmetastasen	normal
M1a Fernmetastasen der Haut, der Subkutis oder der Lymphknoten	normal
M1b Lungenmetastasen	normal
M1c alle anderen viszerale Metastasen	normal
jede Fernmetastase	erhöht

2.5 Weitere prognostische Faktoren

Die Lactatdehydrogenase (LDH) und viele andere Marker sowie auch der Status des Wächterlymphknotens/Sentinel-Lymphknotens, können als prognostische Markierungen bei Melanompatienten verwendet werden und wurden auch in verschiedenen Studien benutzt.

Bei der Primärdiagnose des malignen Melanoms wird eine standardmäßige Bestimmung der LDH nicht empfohlen, da eine LDH-Bestimmung im Anfangsstadium der Erkrankung keine prognostische Bedeutung hat. Dagegen wird eine LDH-Erhöhung, als unabhängiger prognostischer Faktor für das Stadium IV der Erkrankung gesehen, und die Bestimmung der Serum LDH empfohlen. (Balch et al. 2009, Wang et al 2004b)

Egberts et al. untersuchten bei ca. 260 Patienten über einen Zeitraum von 6 Jahren die Serum LDH, S100B im Bezug auf positive/negative SLND. Dabei waren keine der untersuchten Marker von statistischer Bedeutung auf für rezidiv freies Überleben, Metastasen freies Überleben und Gesamtüberleben, in Bezug auf den histopathologischen Status des Wächterlymphknotens. (Egberts et. al 2010)

In dieser Arbeit wurde aus dem Serum die Lactatdehydrogenase als prognostischer Marker verwendet. Dabei wurden die Werte bis 239 U/l für negativ und über einen Wert

von ≥ 240 U/l als positiv gewertet. Patienten ohne eine LDH Bestimmung wurden aus der Arbeit ausgeschlossen, somit kann die LDH, als ein prognostischer Faktor genutzt werden, da bei allen Patienten standardisiert bestimmt.

2.5.1 Therapie, Tumorlast, Karnofsky-Index, Alter, Geschlecht

Die Primärtherapie der meisten Patienten war eine Tumorexzision mit einer Standard mäßigen Bestimmung der Histologie, Breslow-Tumordicke und dem Clark Level. Daraus folgend wurden weitere Therapiemaßnahmen eingeleitet, die dem jeweilig entsprechendem Stadium der Erkrankung anpassend erfolgten. Die folgende systemische Therapie bestand aus Vakzinierung-, Interferon,- und Chemotherapie. Im Falle eines Krankheitsprogresses erfolgte teilweise eine Umstellung der Therapieart oder auch nach einem Progress bei vorherigem Progress freiem Intervall wurde eine neue Therapieart gewählt.

Die Bestimmung der Tumorlast der Patienten erfolgte anhand von klinischen, laborchemischen und radiologischen Verfahren und wurde zu mehreren Zeitpunkten aus den vorliegenden Daten bestimmt. Tumorfrei ist als komplette Remission nach Behandlung ohne jeglichen Nachweis eines Rezidivs bzw. Metastasen definiert.

Der Karnofsky-Index ist definiert als pflegerische Einstufung und wird in Prozent angegeben und ist meistens im Rahmen eines stationären Aufenthaltes bestimmt worden oder wurde aus der Pflege-oder ärztlichen Dokumentation entnommen. Dabei sind Patienten die in einem fortgeschrittenem Stadium der Erkrankung waren natürlich auch zu meist vom Karnofsky-Index unter 90%. Karnofsky-Index von 100% heißt hierbei, komplette alleinige Versorgung durch Patient möglich, ohne jegliche Unterstützung. Eine weitere Unterteilung nach Stadium und Karnofsky-Index erfolgte aber nicht.

Der jüngste Patient war 15 Jahre alt, der älteste Patient war 82 Jahre, von insgesamt 134 Patienten sind 59 weiblich- und 75 männlich. Eine Bestimmung der Lage (anatomische Lage) des Tumors und der Histologie erfolgte, wurde aber nicht in die Analysen einbezogen.

3 ERGEBNISSE

3.1 Überlebens- und Progressionswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit des Nachweises von zirkulierenden Tumorzellen

3.1.1 Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit des Nachweises von CTC durch RT-PCR

Der Nachweis von CTC mittels RT-PCR ist mit einer signifikant geringeren Überlebenswahrscheinlichkeit verbunden. Das mediane Überleben betrug bei Patienten ohne Nachweis von CTC 28 Monate (95%-Vertrauensintervall bei einer maximalen Beobachtungszeit von 120 Monaten: 20 bis 36 Monaten). Im Vergleich zu 5 Monaten (95%-Vertrauensintervall: 2 bis 7 Monate) bei Patienten mit einem Nachweis von CTC. Abbildung 3.1.1a zeigt die Überlebenskurve:

Gesamtvergleiche			
	Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Signifikanz
Log Rank (Mantel-Cox)	15,776	1	0,001

Test auf Gleichheit der Überlebensverteilungen für die verschiedenen Stufen von PCR(1.BE) negativ/ positiv.

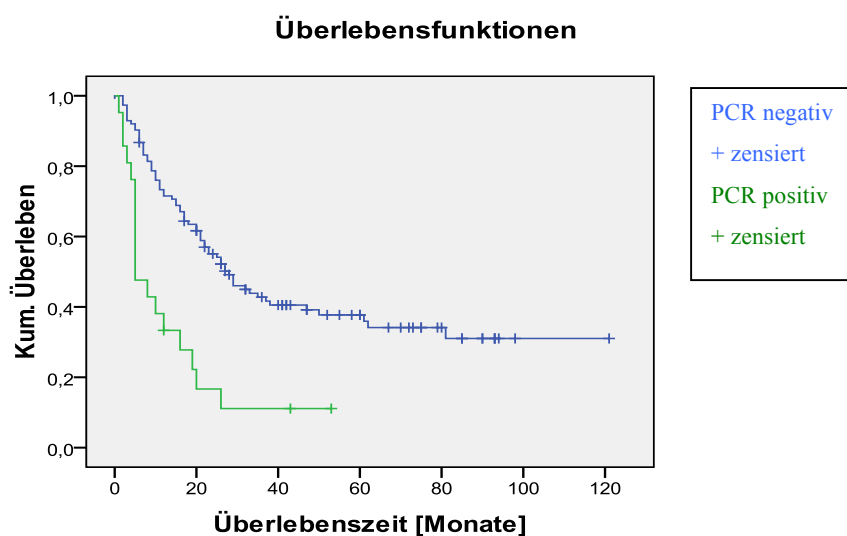


Abb. 3.1.1a: Überlebensfunktion nach Kaplan-Meier-Kurve ausgehend von der 1. Blutentnahme

3.1.2 Progressionswahrscheinlichkeit bei Nachweis von CTC durch RT-PCR

Kein Nachweis von CTC durch die RT-PCR ist auf den Krankheitsprogress mit einer signifikant geringeren Wahrscheinlichkeit verbunden ($p < 0.001$).

Die mediane Zeit bis zum Krankheitsprogress ohne einen CTC-Nachweis betrug 15 Monate (95%-Vertrauensintervall bei einer maximalen Beobachtungszeit von 100 Monaten: 6 bis 24 Monaten). Bei Patienten mit einem Nachweis von CTC betrug die mediane Zeit 2 Monate (95%-Vertrauensintervall: 1 bis 3 Monate). Abbildung 3.1.2a zeigt die Progresskurve:

Gesamtvergleiche			
	Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Signifikanz
Log Rank (Mantel-Cox)	14,010	1	0,000

Test auf Gleichheit der Überlebensverteilungen für die verschiedenen Stufen von PCR(1.BE) negativ/ positiv.

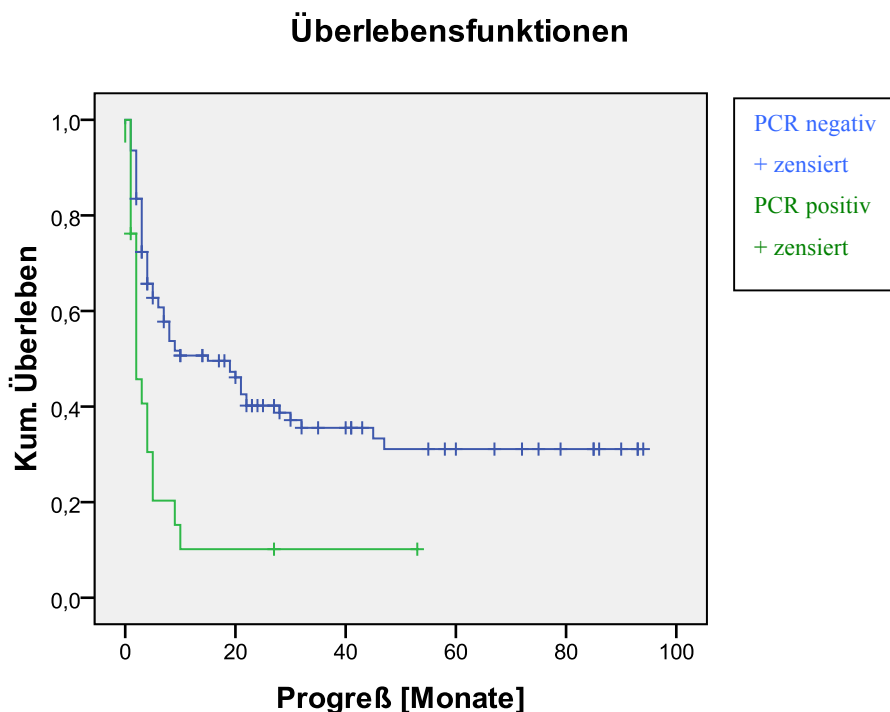


Abb.3.1.2a: Krankheitsprogress nach Kaplan-Meier-Kurve ausgehend von der 1.Blutentnahme

3.1.3 Überlebenswahrscheinlichkeit bei Nachweis von MART-1 durch RT-PCR

Der Nachweis von MART-1 durch RT-PCR hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Überlebenswahrscheinlichkeit ($p= 0.066$).

Das mediane Überleben betrug 26 Monate ohne einen Nachweis von MART-1

(95%-Vertrauensintervall bei einer maximalen Beobachtungszeit von 120 Monaten: 20 bis 32 Monaten). Bei Patienten mit einem Nachweis von MART-1 betrug das mediane Überleben 8 Monate (95%-Vertrauensintervall: 0 bis 16 Monate). Abbildung 3.1.3a zeigt die Überlebenskurve:

Gesamtvergleiche			
	Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Signifikanz
Log Rank (Mantel-Cox)	3,711	1	0,066

Test auf Gleichheit der Überlebensverteilungen von Mart-1 negativ/ positiv

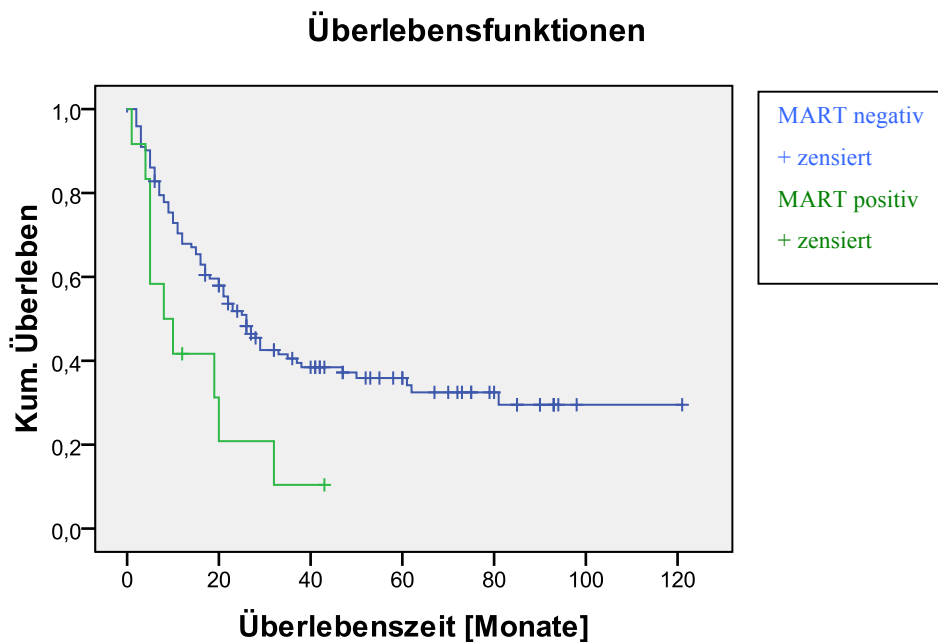


Abb. 3.1.3a: Überlebensfunktion für den Nachweis von MART-1 nach Kaplan-Meier-Kurve ausgehend von der 1.Blutentnahme

3.1.4 Progressionswahrscheinlichkeit bei Nachweis von MART-1

Der Krankheitsprogress der Patienten ohne einen Nachweis von MART-1, durch die RT-PCR, ist mit einer signifikant geringeren Wahrscheinlichkeit verbunden ($p= 0.006$).

Einer medianen Zeit von 9 Monaten (95%-Vertrauensintervall bei einer maximalen Beobachtungszeit von 100 Monaten: 5 bis 19 Monaten) ohne Nachweis von MART-1 stehen gegenüber einer medianen Zeit von 3 Monaten (95%-Vertrauensintervall: 1 bis 5 Monate), bei Patienten mit einem Nachweis von MART-1. Abbildung 3.1.4a zeigt die Progresskurve:

Gesamtvergleiche			
	Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Signifikanz
Log Rank (Mantel-Cox)	7,544	1	,006

Test auf Gleichheit der Überlebensverteilungen für die verschiedenen Stufen von Mart-1 negativ/ positiv.

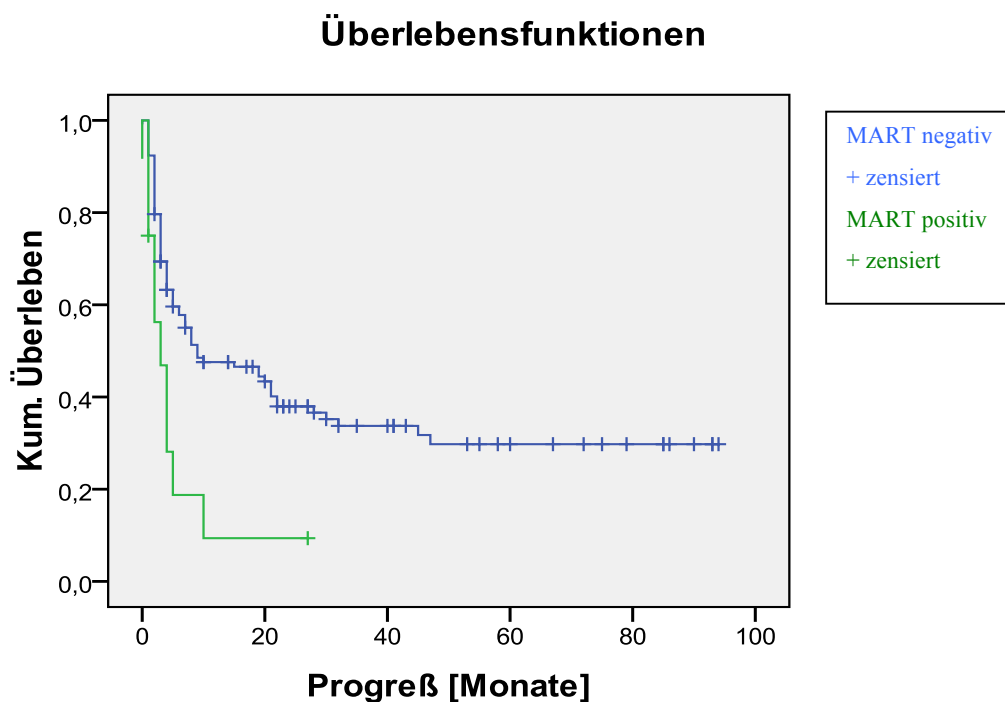


Abb. 3.1.4a: Krankheitsprogress nach Kaplan-Meier-Kurve ausgehend von der 1.Blutentnahme für MART

3.1.5 Überlebenswahrscheinlichkeit bei Nachweis von Tyrosinase

Das Überleben der Patienten ohne Nachweis von Tyrosinase durch RT-PCR war mit einer signifikant geringeren Überlebenswahrscheinlichkeit verbunden ($p < 0.001$).

Ohne Tyrosinase-Nachweis betrug das mediane Überleben 27 Monate (95%-Vertrauensintervall bei einer maximalen Beobachtungszeit von 120 Monaten: 4 bis 35 Monate). Bei den Patienten mit einem Nachweis von Tyrosinase betrug das mediane Überleben 5 Monate (95%-Vertrauensintervall: 2 bis 9 Monate). Abbildung 3.1.5a zeigt die Überlebenskurve:

Gesamtvergleiche			
	Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Signifikanz
Log Rank (Mantel-Cox)	14,052	1	,000

Test auf Gleichheit der Überlebensverteilungen für die verschiedenen Stufen von Tyrosinase negativ/ positiv.

Überlebensfunktionen

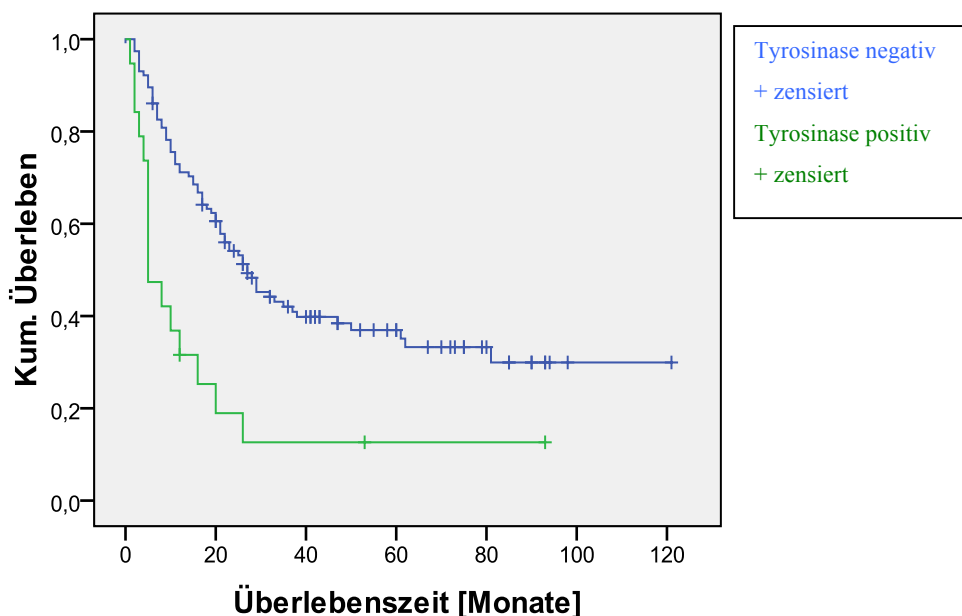


Abb. 3.1.5a : Überlebensfunktion für den Nachweis von Tyrosinase nach Kaplan-Meier-Kurve ausgehend von der 1.Blutentnahme

3.1.6 Progressionswahrscheinlichkeit bei Nachweis von Tyrosinase

Der Krankheitsprogress der Patienten ohne Nachweis von Tyrosinase, durch die RT-PCR, ist mit einer signifikant geringeren Wahrscheinlichkeit verbunden ($p < 0.001$).

Einer medianen Zeit von 10 Monaten (95%-Vertrauensintervall bei einer maximalen Beobachtungszeit von 100 Monaten: 2 bis 18 Monaten), bei Patienten ohne einen Nachweis von Tyrosinase, standen 2 Monate (95%-Vertrauensintervall: 1 bis 3 Monate) mit einem Nachweis von Tyrosinase gegenüber. Abbildung 3.1.6a zeigt die Progresskurve:

Gesamtvergleiche			
	Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Signifikanz
Log Rank (Mantel-Cox)	10,317	1	,001

Test auf Gleichheit der Überlebensverteilungen für die verschiedenen Stufen von Tyrosinase negativ/ positiv.

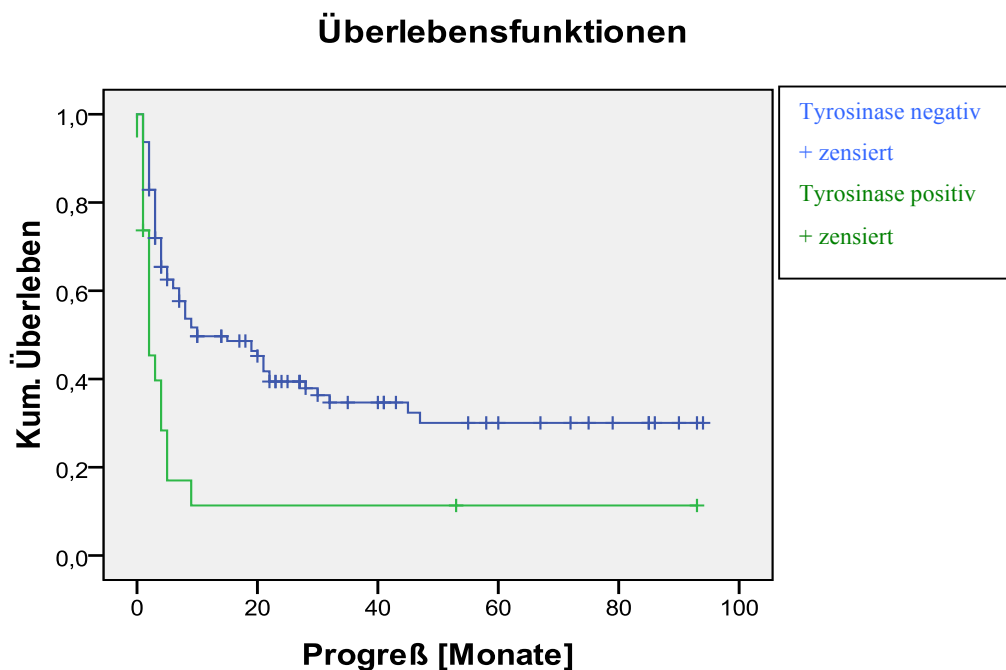


Abb.3.1.6a: Krankheitsprogress nach Kaplan-Meier-Kurve ausgehend von der 1.Blutentnahme für Tyrosinase

3.2 Überlebens- und Progressionswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit verschiedener klinischer Faktoren

3.2.1 Überlebenswahrscheinlichkeit verschiedener Krankheitsstadien

Die unterschiedlichen Krankheitsstadien der Patienten haben einen signifikanten Einfluss auf die Überlebenswahrscheinlichkeit ($p < 0.001$).

Ein medianes Überleben von 50 Monaten (95%-Vertrauensintervall bei einer maximalen Beobachtungszeit von 120 Monaten) zeigte sich bei Patienten in den Stadien I-III. Im Stadium IVA betrug das mediane Überleben 22 Monate, Patienten im Stadium IVB der Erkrankung hatten ein medianes Überleben von 23 Monaten, das mediane Überleben für Patienten im Stadium IVC betrug 10 Monate. Abbildung 3.2.1a zeigt die Überlebenskurve:

Gesamtvergleiche			
	Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Signifikanz
Log Rank (Mantel-Cox)	27,494	3	,000

Test auf Gleichheit der Überlebensverteilungen für die verschiedenen Stufen der Stadien I- III, IVA, IVB, IVC.

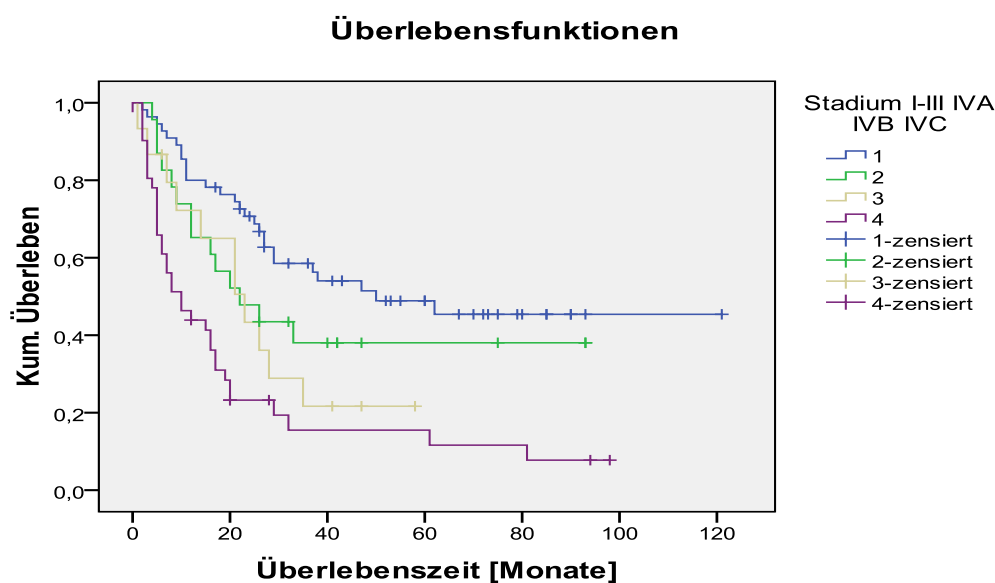


Abb. 3.2.1a: Überlebensfunktion für das Krankheitsstadium nach Kaplan-Meier-Kurve ausgehend von der 1. Blutentnahme

3.2.2 Progressionswahrscheinlichkeit für die verschiedenen Krankheitsstadien

Auf den Krankheitsprogress der Patienten hatten die verschiedenen Stadien der Erkrankung einen signifikanten Einfluss ($p < 0.001$). Ein medianes Überleben von 30 Monaten (95%-Vertrauensintervall bei einer maximalen Beobachtungszeit von 100 Monaten) zeigte sich bei Patienten in den Stadien I-III. Bei Patienten im Stadium IVA der Erkrankung standen 4 Monate (95%-Vertrauensintervall: 0 bis 15 Monate) als medianes Überleben, gegenüber Patienten im Stadium IVB mit einem medianen Überleben von 8 Monaten gegenüber (95%-Vertrauensintervall: 3 bis 14 Monate). Patienten im Stadium IVC hatten ein medianes Überlebens von 3 Monaten (95%-Vertrauensintervall: 2 bis 4 Monate). Abbildung 3.2.2a zeigt die Progresskurve:

Gesamtvergleiche			
	Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Signifikanz
Log Rank (Mantel-Cox)	24,326	3	,000

Test auf Gleichheit der Überlebensverteilungen für die verschiedenen Stufen von Stadien I-III, IVA, VB, IVC.

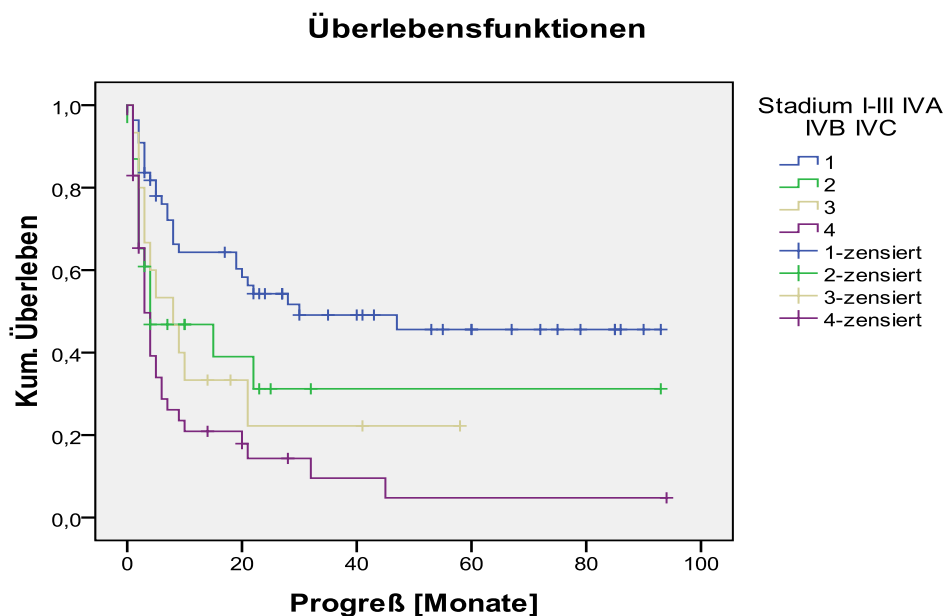


Abb. 3.2.2a: Krankheitsprogress nach Kaplan-Meier-Kurve ausgehend von der 1. Blutentnahme für verschiedene Krankheitsstadien

3.2.3 Überlebenswahrscheinlichkeit für verschiedene Therapiearten

Die verschiedenen Therapiearten hatten einen signifikant Einfluss auf das Überleben der Patienten ($p < 0.001$). Patienten ohne einer systemischen Therapie hatten ein medianes Überlebens von 38 Monaten (95%-Vertrauensintervall bei einer maximalen Beobachtungszeit von 120 Monaten: 5 bis 71 Monaten). Bei den Patienten mit einer Chemotherapie liegt das mediane Überleben bei 8 Monaten (95%-Vertrauensintervall: 5 bis 11 Monate). Patienten mit einer Vakzinierungstherapie hatten ein medianes Überleben von 32 Monaten (95%-Vertrauensintervall: 22 bis 42 Monate). Patienten mit einer Kombinationstherapie aus Vakzinierung-, und Chemotherapie hatten ein medianes Überleben von 26 Monaten (95%-Vertrauensintervall: 9 bis 43 Monate). Das mediane Überleben bei Patienten mit einer Interferon-Therapie lag bei 61 Monaten (95%-Vertrauensintervall: 13 bis 109 Monate). Abbildung 3.2.3a zeigt die Überlebenskurve:

Gesamtvergleiche			
	Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Signifikanz
Log Rank (Mantel-Cox)	24,475	4	,000

Test auf Gleichheit der Überlebensverteilungen für die verschiedenen Stufen von Therapie n. 1. Blutentnahme
 0=Keine Therapie 1=Chemotherapie 2=Vakzine 3=Kombination Vakzine+Chemo 4=Interferone

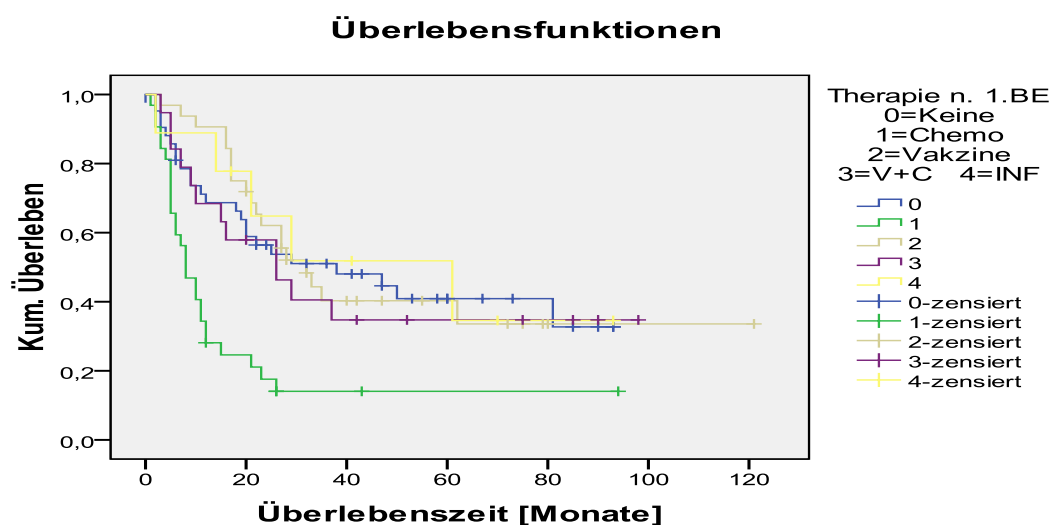


Abb. 3.2.3a: Überlebensfunktion für die Therapien nach Kaplan-Meier-Kurve

3.2.4 Progressionswahrscheinlichkeit nach der erhaltenen Therapieart

Der Krankheitsprogress war signifikant von der Art der applizierten Therapie abhängig ($p < 0.001$). Eine mediane Zeit von 30 Monaten bis zum Progress (95%-Vertrauensintervall bei einer maximalen Beobachtungszeit von 100 Monaten: 9 bis 51 Monaten) hatten Patienten ohne einer systemischen Therapie nach der 1. Blutentnahme. Patienten mit einer Chemotherapie hatten eine mediane Progresszeit von 2 Monaten (95%-Vertrauensintervall: 1 bis 3 Monate). Patienten mit einer Vakzinierungs-Therapie hatten eine mediane Progresszeit von 19 Monaten (95%-Vertrauensintervall: 1 bis 37 Monate). Eine mediane Progresszeit von 5 Monaten (95%-Vertrauensintervall: 1 bis 9 Monate) hatten Patienten mit einer Therapie Kombination aus Vakzinierungs-, und Chemotherapie, Patienten mit einer Interferon-Therapie hatten eine mediane Progresszeit von 22 Monaten (95%-Vertrauensintervall: 20 bis 24 Monate). Abbildung 3.2.4a zeigt die Progresskurve:

Gesamtvergleiche			
	Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Signifikanz
Log Rank (Mantel-Cox)	33,111	4	,000

Test auf Gleichheit der Überlebensverteilungen für die verschiedenen Stufen von Therapie n. 1. Blutentnahme

0=Keine Therapie 1=Chemotherapie 2=Vakzine 3=Kombination Vakzine+Chemo 4=Interferone

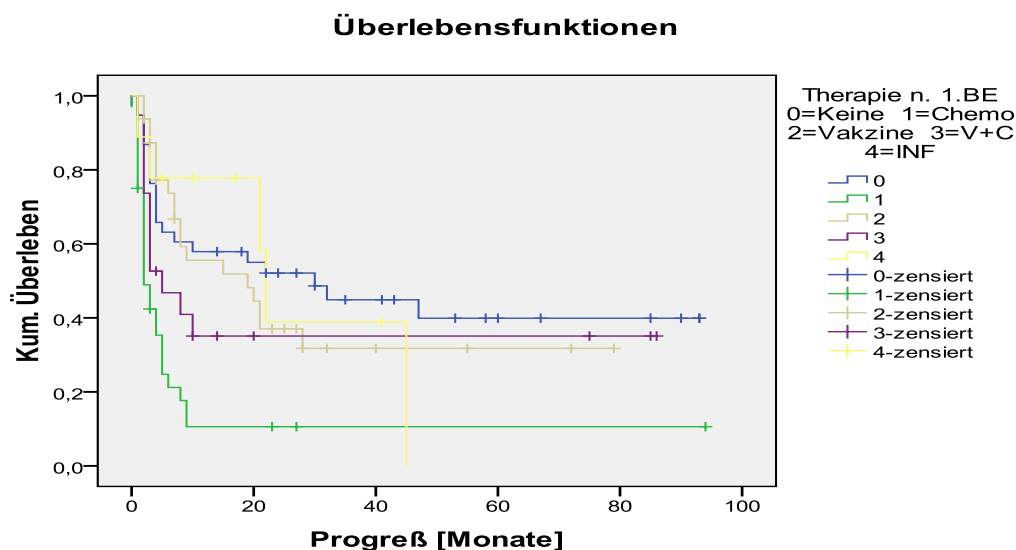


Abb.3.2.4a: Krankheitsprogress nach Kaplan-Meier-Kurve ausgehend von der 1. Blutentnahme für verschiedene Therapiearten

3.2.5 Überlebenswahrscheinlichkeit bei erhöhter Lactatdehydrogenase

Die nicht erhöhte Lactatdehydrogenase (LDH) bei der 1. Blutabnahme hat einen signifikanten Einfluss auf die Überlebenswahrscheinlichkeit ($p < 0.001$).

Die mediane Überlebenszeit betrug 28 Monate ohne eine LDH Erhöhung (95%-Vertrauensintervall bei einer maximalen Beobachtungszeit von 120 Monaten: 20 bis 36 Monaten), Patienten mit einer erhöhten LDH hatten ein medianes Überleben von 8 Monaten (95%-Vertrauensintervall: 4 bis 12 Monate) gegenüber. Abbildung 3.2.5a zeigt die Überlebenskurve:

Gesamtvergleiche			
	Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Signifikanz
Log Rank (Mantel-Cox)	19,250	2	,000

Test auf Gleichheit der Überlebensverteilungen für die verschiedenen Stufen von LDH.

Überlebensfunktionen

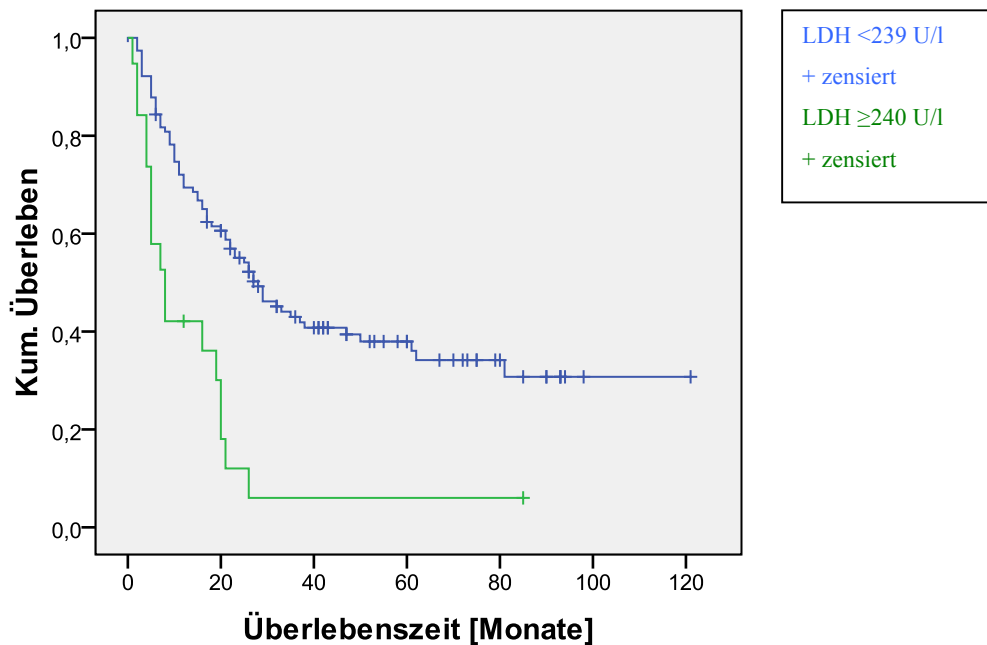


Abb. 3.2.5a: Überlebensfunktion für die LDH nach Kaplan-Meier-Kurve

3.2.6 Progressionswahrscheinlichkeit nach Lactatdehydrogenase Erhöhung

Eine Erhöhung der Lactatdehydrogenase (LDH) hatte einen signifikanten Einfluss auf den Krankheitsprogress ($p < 0.001$).

Einer medianen Progresszeit von 4 Monaten (95%-Vertrauensintervall bei einer maximalen Beobachtungszeit von 100 Monaten: 3 bis 6 Monaten), bei einer LDH-Erhö- hung standen ohne eine Erhöhung der LDH eine mediane Progresszeit von 10 Monaten (95%- Vertrauensintervall: 2 bis 18 Monate) zu sehen. Abbildung 3.2.6a zeigt die Progresskurve:

Gesamtvergleiche			
	Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Signifikanz
Log Rank (Mantel-Cox)	13,152	2	,001

Test auf Gleichheit der Überlebensverteilungen für die verschiedenen Stufen von LDH.

Überlebensfunktionen

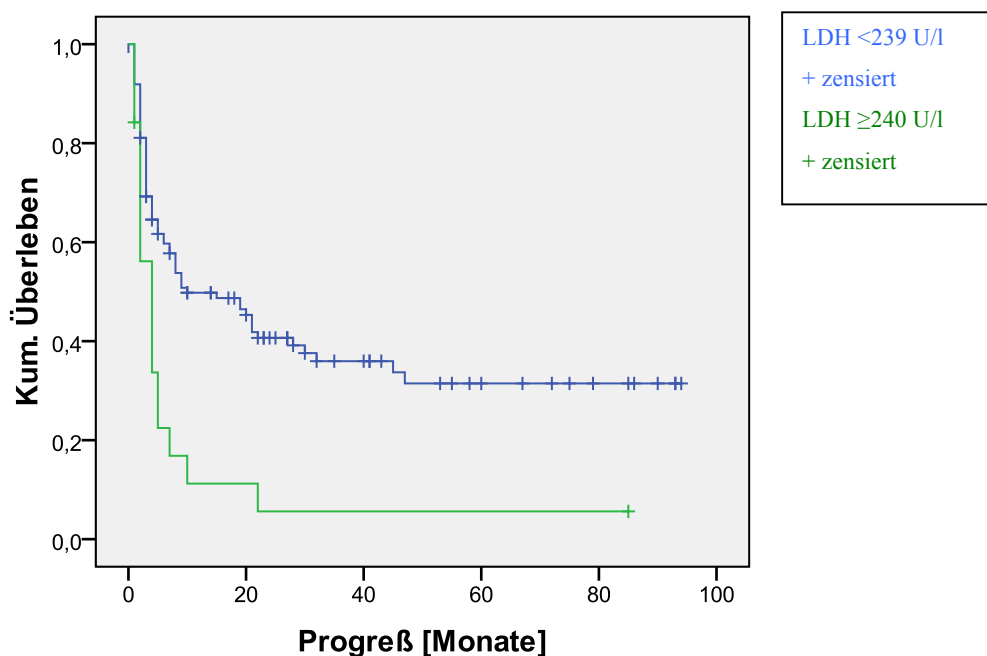


Abb. 3.2.6a: Krankheitsprogress nach Kaplan-Meier-Kurve ausgehend von der 1. Blutentnahme für eine LDH-Erhö- hung

3.2.7 Überlebenswahrscheinlichkeit bei Tumorlast

Die Tumorlast bei der 1. Blutabnahme hatte einen signifikanten Einfluss auf die Überlebenswahrscheinlichkeit ($p < 0.001$).

Eine mediane Überlebenszeit von 50 Monaten hatten Patienten ohne Tumorlast (95%-Vertrauensintervall bei einer maximalen Beobachtungszeit von 120 Monaten), bei Patienten mit einer Tumorlast war die mediane Überlebenszeit mit 12 Monaten nachzuweisen (95%-Vertrauensintervall: 6 bis 18 Monate). Abbildung 3.2.7a zeigt die Überlebenskurve:

Gesamtvergleiche			
	Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Signifikanz
Log Rank (Mantel-Cox)	22,526	1	,000

Test auf Gleichheit der Überlebensverteilungen für die verschiedenen Stufen von Tumorfrei/ Tumorlast.

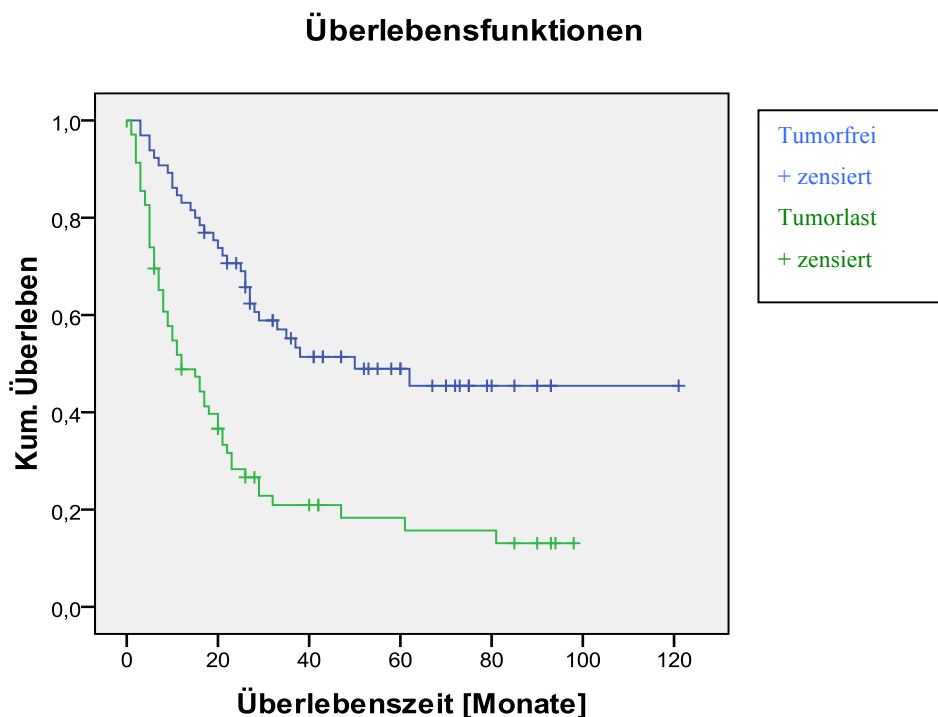


Abb. 3.2.7a: Überlebensfunktion bei Tumorlast und Tumorfreiheit im Bezug zur 1. Blutentnahme nach Kaplan-Meier-Kurve

3.2.8 Progressionswahrscheinlichkeit bei Tumorlast

Die Tumorlast bei der 1. Blutabnahme hatte auf den Krankheitsprogress der Patienten einen signifikanten Einfluss ($p < 0.001$).

Die mediane Progresszeit betrug 4 Monate bei Tumorlast (95%-Vertrauensintervall bei einer maximalen Beobachtungszeit von 100 Monaten: 3 bis 5 Monate). Patienten ohne Nachweis von einer Tumorlast hatten eine mediane Progresszeit von 28 Monaten. Abbildung 3.2.8a zeigt die Progresskurve:

Gesamtvergleiche			
	Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Signifikanz
Log Rank (Mantel-Cox)	20,203	1	,000

Überlebensverteilungen für die verschiedenen Stufen von Tumorfrei/ Tumorlast.

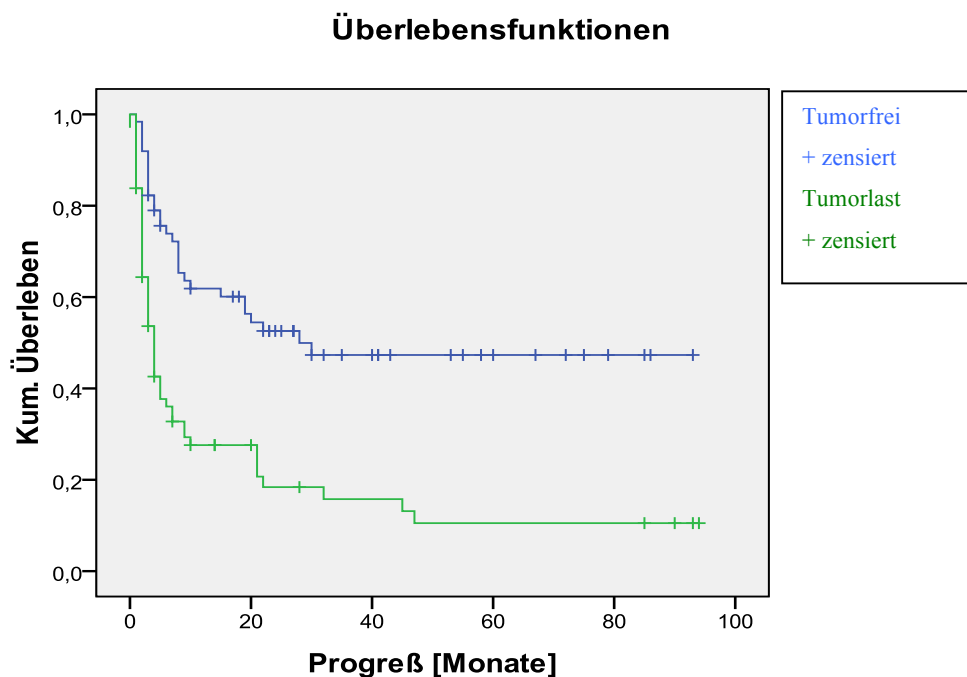


Abb.3.2.8a: Krankheitsprogress nach Kaplan-Meier-Kurve ausgehend von der 1. Blutentnahme bei Tumorlast

3.2.9 Überlebenswahrscheinlichkeit im Bezug auf den Karnofsky-Index

Der Karnofsky- Index (KI) hat einen signifikanten Einfluss auf die Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten ($p= 0.001$). Eine mediane Überlebenszeit von 27 Monaten (95%-Vertrauensintervall bei einer maximalen Beobachtungszeit von 120 Monaten: 21 bis 33 Monaten) hatten Patienten mit einem $KI \geq 90\%$. Patienten mit einem $KI < 90\%$ hatten dagegen eine mediane Überlebenszeit von 6 Monaten (95%-Vertrauensintervall: 4 bis 8 Monate), Abbildung 3.2.9a zeigt die Überlebenskurve:

Gesamtvergleiche			
	Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Signifikanz
Log Rank (Mantel-Cox)	10,926	1	,001

Test auf Gleichheit der Überlebensverteilungen für die verschiedenen Stufen von Karnofsky Index $\geq / < 90\%$

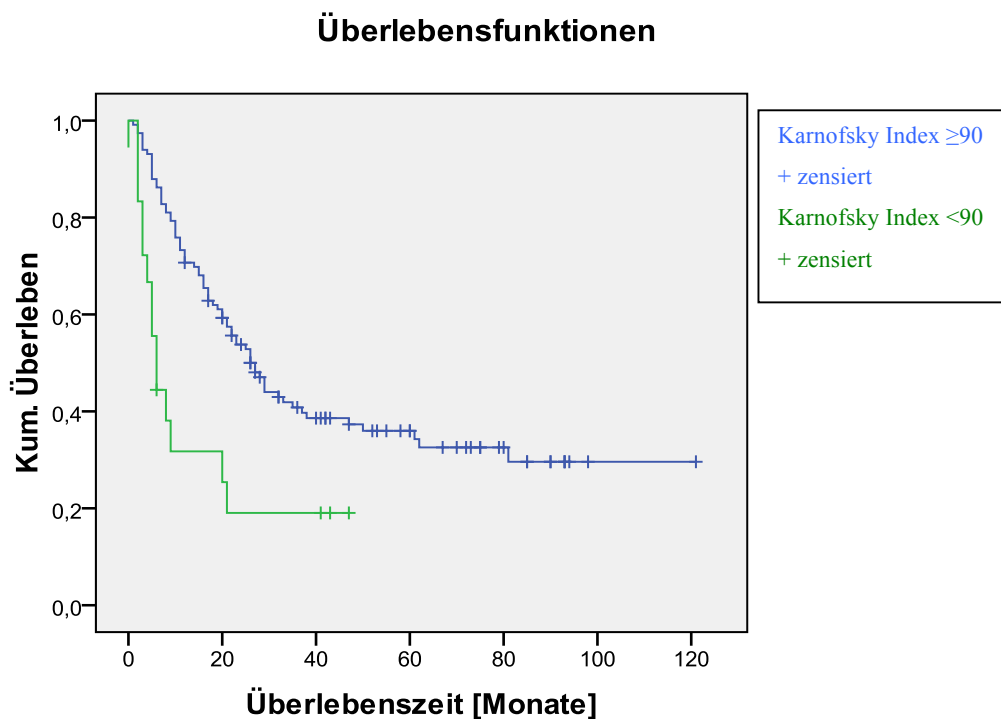


Abb.3.2.9a: Überlebensfunktion der Karnofsky-Index im Bezug zur 1.Blutentnahme nach Kaplan-Meier-Kurve

3.2.10 Progressionswahrscheinlichkeit in Bezug auf den Karnofsky-Index

Auf den Krankheitsprogress hatte der Karnofsky-Index der Patienten keinen signifikanten Einfluss ($p= 0.068$).

Wenn der Karnofsky-Index nicht erniedrigt war, konnte eine Mediane Überlebenszeit von 9 Monaten (95%-Vertrauensintervall bei einer maximalen Beobachtungszeit von 100 Monaten: 0 bis 18 Monaten) beobachtet werden. Bei den Patienten mit nachweislich Prozentuell niedrigem Karnofsky-Index konnten 2 Monate (95%-Vertrauensintervall: 1 bis 3 Monate) als mediane Überlebenszeit gesehen werden. Abbildung 3.2.10a zeigt die Progresskurve:

Gesamtvergleiche			
	Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Signifikanz
Log Rank (Mantel-Cox)	3,334	1	,068

Test auf Gleichheit der Überlebensverteilungen für die verschiedenen Stufen von Karnofsky Index $\geq / <90$

Überlebensfunktionen

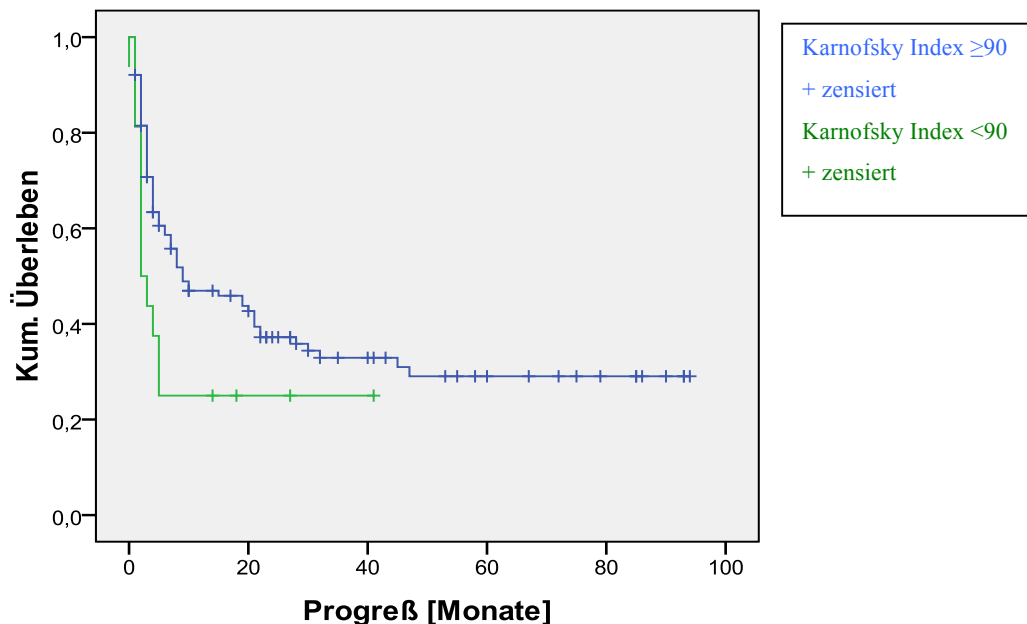


Abb. 3.2.10a: Krankheitsprogress nach Kaplan-Meier-Kurve ausgehend von der 1. Blutentnahme im Bezug auf den Karnofsky-Index

3.2.11 Überlebenswahrscheinlichkeit im Bezug auf das Alter der Patienten

Das Alter der Patienten in Bezug auf die Überlebenswahrscheinlichkeit zeigte sich statistisch als nicht signifikant ($p= 0.457$).

Das mediane Überleben betrug 22 Monate (95%-Vertrauensintervall bei einer maximalen Beobachtungszeit von 120 Monaten: 14 bis 30 Monaten) bei Patienten die jünger als 60 Jahre alt waren. Bei den Patienten die 60 Jahre alt oder älter waren betrug das mediane Überleben 25 Monate (95%-Vertrauensintervall: 7 bis 43 Monate). Abbildung 3.2.11a zeigt die Überlebenskurve:

Gesamtvergleiche			
	Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Signifikanz
Log Rank (Mantel-Cox)	,554	1	,457

Test auf Gleichheit der Überlebensverteilungen für die verschiedenen Stufen von Alter $\geq / < 60$.

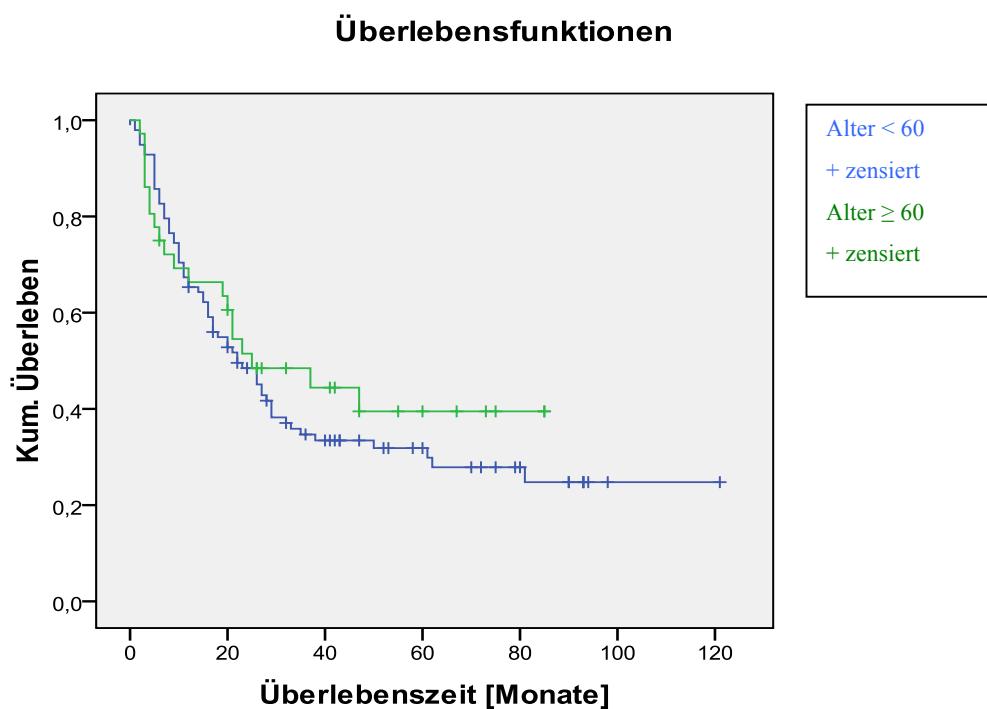


Abb.3.2.11a : Überlebensfunktion des Alters der Patienten im Bezug zur 1.Blutentnahme nach Kaplan-Meier-Kurve

3.2.12 Progressionswahrscheinlichkeit in Bezug auf das Alter der Patienten

Auf den Krankheitsprogress hatte das Alter der Patienten keinen signifikanten Einfluss ($p= 0.206$).

Eine mediane Progresszeit von 8 Monaten (95%-Vertrauensintervall bei einer maximalen Beobachtungszeit von 100 Monaten: 4 bis 12 Monaten) hatten Patienten die jünger als 60 Jahre alt waren. Bei den Patienten die 60 Jahre alt oder älter waren hatten eine mediane Progresszeit von 10 Monaten (95%-Vertrauensintervall: 0 bis 46 Monate).

Abbildung 3.2.12a zeigt die Progresskurve:

Gesamtvergleiche			
	Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Signifikanz
Log Rank (Mantel-Cox)	1,6	1	,206

Test auf Gleichheit der Überlebensverteilungen für die verschiedenen Stufen von Alter $\geq / < 60$.

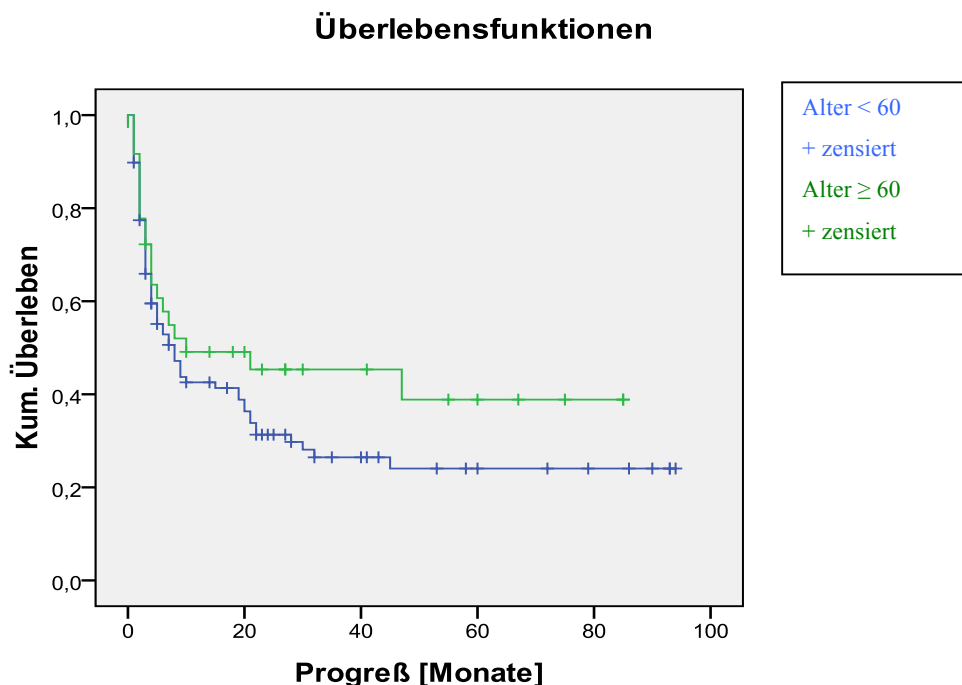


Abb. 3.2.12a: Krankheitsprogress nach Kaplan-Meier-Kurve ausgehend von der 1. Blutentnahme im Bezug das Alter der Patienten

3.2.13 Überlebenswahrscheinlichkeit im Bezug auf das Geschlecht der Patienten

Das Geschlecht der Patienten hatte keinen statistisch signifikant Einfluss auf die Überlebenswahrscheinlichkeit ($p= 0.202$).

Die weiblichen Patienten hatten ein medianes Überleben von 29 Monaten (95%-Vertrauensintervall bei einer maximalen Beobachtungszeit von 120 Monaten: 18 bis 40 Monaten). Bei den männlichen Patienten standen dem 20 Monate (95%-Vertrauensintervall: 14 bis 26 Monate) gegenüber. Abbildung 3.2.13a zeigt die Überlebenskurve:

Gesamtvergleiche			
	Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Signifikanz
Log Rank (Mantel-Cox)	1,627	1	,202

Test auf Gleichheit der Überlebensverteilungen für die verschiedenen Stufen weiblich/ männlich.

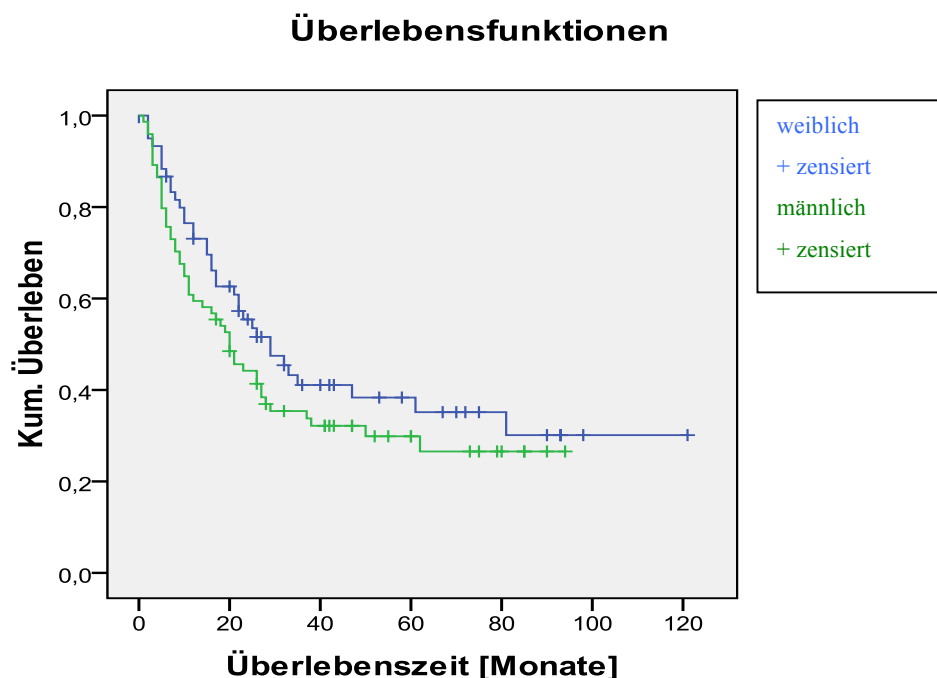


Abb. 3.2.13a: Überlebensfunktion des Geschlechts der Patienten im Bezug zur 1. Blutentnahme nach Kaplan-Meier-Kurve, weiblich /männlich

3.2.14 Progressionswahrscheinlichkeit in Bezug auf das Geschlecht der Patienten

Das Geschlecht der Patienten hatte keinen statistisch signifikanten Einfluss auf den Krankheitsprogress ($p= 0.299$).

Einer medianen Progresszeit von 15 Monaten (95%-Vertrauensintervall bei einer maximalen Beobachtungszeit von 100 Monaten: 0 bis 30 Monaten) bei weiblichen Patienten, standen bei den männlichen Patienten dem 7 Monate (95%-Vertrauensintervall: 1 bis 5 Monate) gegenüber. Abbildung 3.2.14a zeigt die Progresskurve:

Gesamtvergleiche			
	Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Signifikanz
Log Rank (Mantel-Cox)	1,080	1	,299

Test auf Gleichheit der Überlebensverteilungen für die verschiedenen Stufen weiblich/ männlich.

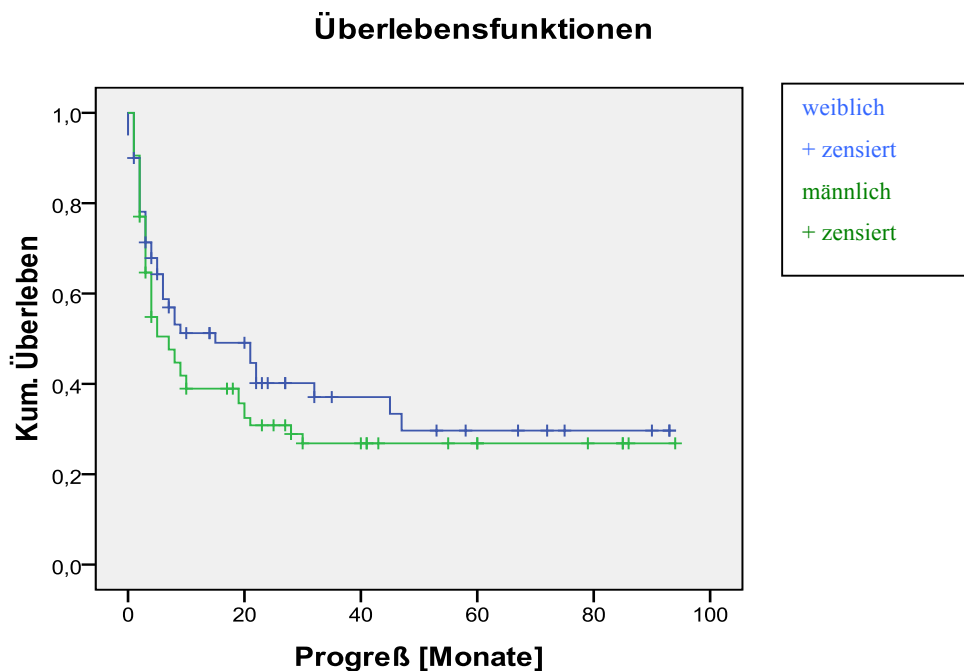


Abb.3.2.14a: Krankheitsprogress nach Kaplan-Meier-Kurve ausgehend von der 1.Blutentnahme im Bezug das Geschlecht der Patienten

3.3 Gesamtüberleben

Von 136 Patienten mit einem malignen Melanom überlebten im einen Beobachtungszeitraum von insgesamt 11 Jahren 49 Patienten (36,0 %). Die Blutentnahmen erfolgten zu den verschiedenen Zeitpunkten, die ersten Daten und Blutwerte stammen von 1998. Dabei sind 87 Patienten (64,0 %) innerhalb des Beobachtungszeitraums verstorben. Bei den 49 Überlebenden Patienten wurden bei 11 (22,4 %) Patienten durch die RT-PCR der Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen im Serum nachgewiesen. Bei den verstorbenen Patienten konnten im Gegensatz dazu bei 37 (42,5 %) Patienten maligne Tumorzellen bei der 1. Blutentnahme nachgewiesen werden (Abb.3.3a).

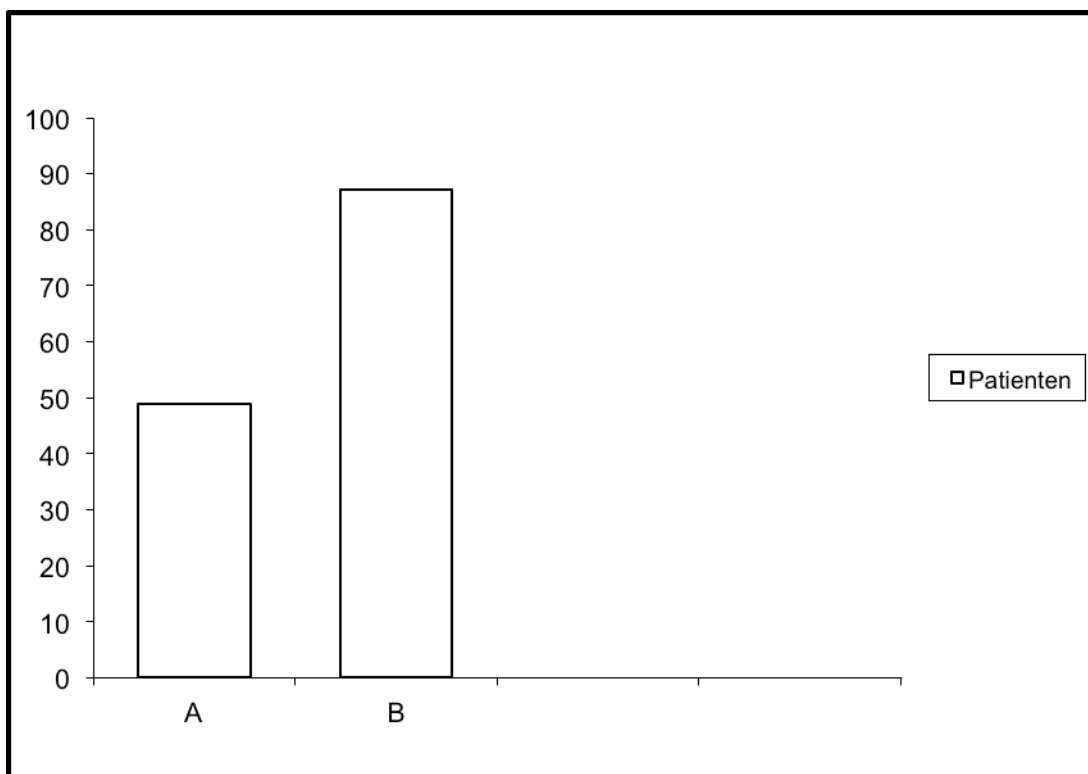


Abb. 3.3 a : A Überlebende Patienten im Beobachtungszeitraum
 B Verstorbene Patienten im Beobachtungszeitraum

3.4 Übersicht der Signifikanz der univariaten Analysen

In der unten dargestellten Tabelle (3.4a) ist eine Übersicht der Signifikanz, unterteilt nach Progress der Erkrankung und Überlebenszeit der Patienten. Alle Einflussgrößen sind zusammengefasst.

Es zeigt sich, dass die Tyrosinase und die LDH als wichtige Marker für Gesamtüberleben und Progress der Erkrankung zu sehen sind. MART-1 ist für den Progress der Erkrankung signifikant.

	p	p
	Progress	Überleben
PCR	0,001	0,001
Tyrosinase	0,001	0,001
Mart-1	0,006	0,066
Lactatdehydrogenase	0,001	0,001
Geschlecht	0,285	0,202
Karnofsky Index	0,068	0,001
Tumorlast	0,001	0,001
Stadium	0,001	0,001
Therapie	0,001	0,001
Alter	0,285	0,457

Abb. 3.4a Tabelle Signifikanz in der Gesamtübersicht für Überlebenszeit und Progress

3.5 Änderung der PCR von 1. zur 2. Blutentnahme

Eine Tabelle (3.5a) zur Übersicht der Änderung der PCR von der 1. zur 2. Blutentnahme für ein Kollektiv von 36 Patienten, bei diesen Patienten erfolgten mindestens 2 Blutabnahmen. Dabei wurde auch ein vergleichbar zeitlichen Abstand zwischen den Blutabnahmen berücksichtigt. Zwischen der 1. und der 2. Blutabnahme liegt ein Zeitraum von 31 Tagen bis 80 Tagen. Es wurden die verschiedenen Therapiearten auf das Ansprechen der jeweiligen Therapie im Bezug auf einen Krankheitsprogress oder Stable Disease zur Art der jeweilig erhaltenen Therapie verglichen.

<u>Änderung PCR 1.-2.BE</u>					
PCR-Änderung	0->0	0 ->1	1 -> 0	1 -> 1	Gesamtzahl
Stable	23	4	0	1	28
Nach 2.BE (31d-80d) Progress	3	0	1	4	8
Chemo-therapie	3	0	0	2	5
Vakzinierung	10	2	0	0	12
Keine Therapie	5	1	0	1	7
Interferon- Therapie	1	0	0	0	1
Vakzinierung+ Chemo-therapie	8	0	1	2	11

Tabelle 3.5 a: Übersicht der PCR-Änderung von 1. Blutabnahme zur 2. Blutentnahme

3.6 Multivariate Analyse bezüglich des Überlebens und der Progression

3.6.1 Cox-Regression Überleben-PCR Vorwärts

In die multivariate Analyse wurden folgende Faktoren einbezogen: PCR, LDH, Stadien der Erkrankung, Therapiearten, Tumorlast, Karnofsky-Index, Alter und das Geschlecht.

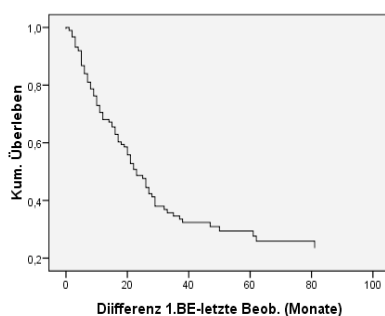
Die Vorwärts- und Rückwärts-Regression ergab übereinstimmend folgende Faktoren als signifikante Parameter für die Überlebenswahrscheinlichkeit. KI (HR 0,305), Alter (HR 1,682), LDH (HR 0,407), Tumorlast (HR 0,386). Die Ergebnisse inklusive der Konfidenzintervalle sind in Abb. 3.6.1a dargestellt.

Block 1: Methode = Vorwärts schrittweise (Bedingt LR)

Variablen in der Gleichung

		df	Signifikanz	Exp(B)	95,0% Konfidenzinterv. für Exp(B)	
					Untere	Obere
Schritt 4	Karnofsk-Index	1	,000	,305	,163	,570
	Alter	1	,025	1,682	1,066	2,652
	LDH	1	,002	,407	,232	,714
	Tumorlast	1	,000	,386	,245	,608

Überlebensfunktion bei Mittelwert der Kovariaten



Hazard-Funktion bei Mittelwert der Kovariaten

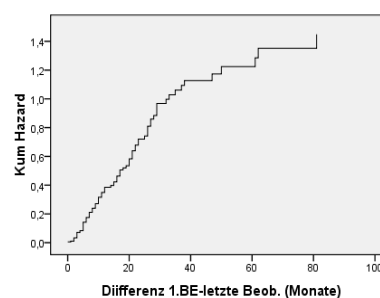


Abb. 3.6.1a: Cox-Regression zur Darstellung des Überlebens mit multiplen Kovarianten vorwärts gerechnet

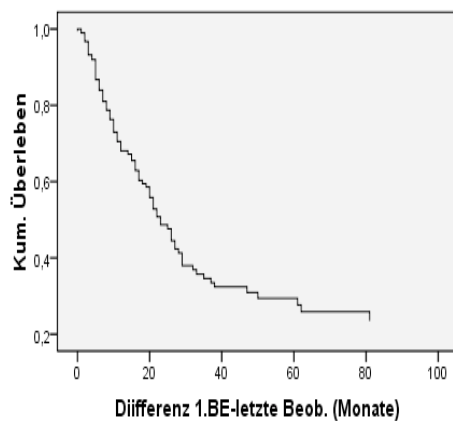
3.6.2 Cox-Regression Überleben-PCR Rückwärts

Methode = Rückwärts schrittweise (Bedingt LR)

Variablen in der Gleichung

	df	Signifikanz	Exp(B)	95,0% Konfidenzinterv. für Exp(B)	
				Untere	Obere
Schritt 7 KarnofskyIndex	1	,000	,305	,163	,570
Alter	1	,025	1,682	1,066	2,652
LDH	1	,002	,407	,232	,714
Tumorlast	1	,000	,386	,245	,608

Überlebensfunktion bei Mittelwert der Kovariaten



Hazard-Funktion bei Mittelwert der Kovariaten

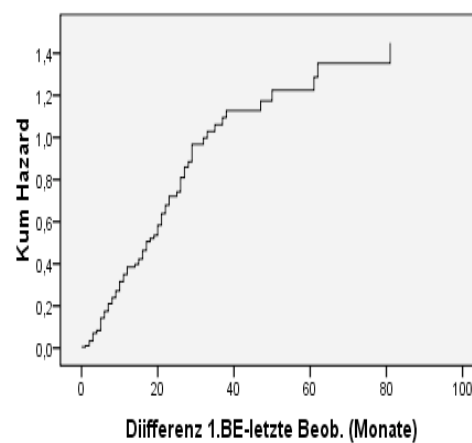


Abb. 3.6.2a: Cox-Regression zur Darstellung des Überlebens mit multiplen Kovarianten rückwärts gerechnet

3.6.3 Cox-Regression Progress-PCR Vorwärts

Es werden nur schrittweise die Variablen (Kovarianten), die einen signifikanten Einfluss für den Progress der Erkrankungen haben, in die Analyse aufgenommen. Im vierten Schritt der Berechnung zeigt sich für die LDH (HR 0,417) und die Tumorlast (HR 0,441) ein signifikanter Einfluss.

Vorwärts schrittweise (Bedingt LR)

Variablen in der Gleichung

		df	Signifikanz	Exp(B)	95,0% Konfidenzinterv. für Exp(B)	
					Untere	Obere
Schritt 4	Alter	1	,016	1,781	1,113	2,848
	LDH	1	,003	,417	,234	,744
	Tumorlast	1	,001	,441	,277	,704
	Therapie 1.BE 0 Keine 1Chemo 2Vakzine 3 V+C 4 INF	4	,016			
	Therapie 1.BE 0Keine 1Chemo 2Vakzine 3V+C 4INF(1)	1	,805	1,134	,417	3,083
	Therapien1.BE 0Keine 1Chemo 2Vakzine 3V+C 4INF(2)	1	,035	2,908	1,080	7,830
	Therapien 1.BE 0Keine 1Chemo 2Vakzine 3V+C 4INF(3)	1	,542	1,363	,504	3,687
	Therapien 1.BE 0Keine 1Chemo 2Vakzine 3V+C 4INF(4)	1	,227	1,934	,663	5,638

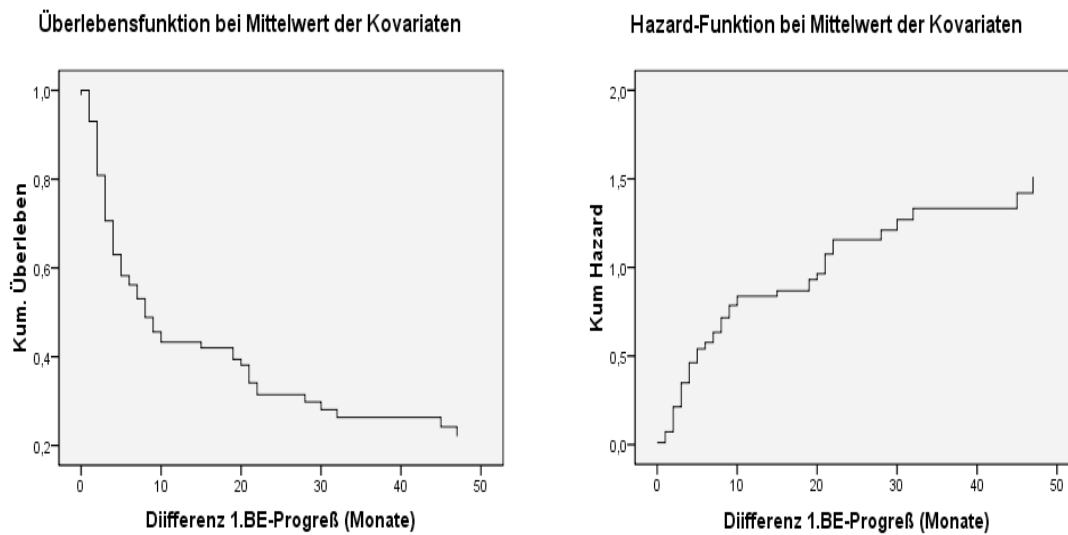


Abb. 3.6.3a: Cox-Regression zur Darstellung des Progresses mit multiplen Kovarianten vorwärts gerechnet

Mit der Hazard-Funktion wird hier die Wahrscheinlichkeit pro Zeiteinheit (hier in Monaten) bezeichnet, in dem ein Patient im Beobachtungsintervall ein Ereignis erfährt (Krankheitsprogress und/oder Tod). Die Voraussetzung ist natürlich, dass der Patient den Beginn des Beobachtungszeitraumes überlebt hat. Aus dem Regressionskoeffizient lässt sich durch Hazard-Ratio der Maß für die jeweilige Stärke des Einflusses der Kovarianten berechnen.

3.6.4 Cox-Regression Progress-PCR Rückwärts

Bei der rückwärts bedingten Analyse werden erneut schrittweise die Kovarianten, die keinen Einfluss auf den Progress haben entfernt. Die LDH und die Tumorlast zeigen hierbei einen signifikanten Einfluss. Die Therapieart ist hierbei unterteilt in die erhaltenen Therapien nach der 1.BE bis zum jeweiligen Ereignis.

Methode = Rückwärts schrittweise (Bedingt LR)

Variablen in der Gleichung

	df	Signifikanz	Exp(B)	95,0% Konfidenzinterv. für	
				Exp(B)	
				Untere	Obere
Schritt 7					
Alter	1	,016	1,781	1,113	2,848
LDH	1	,003	,417	,234	,744
Tumorlast	1	,001	,441	,277	,704
Therapie 1.BE 0 Keine 1Chemo 2Vakzine 3 V+C 4 INF	4	,016			
Therapie 1.BE 0Keine 1Chemo 2Vakzine 3V+C 4INF(1)	1	,805	1,134	,417	3,083
Therapien 1.BE 0Keine 1Chemo 2Vakzine 3V+C 4INF(2)	1	,035	2,908	1,080	7,830
Therapien 1.BE 0Keine 1Chemo 2Vakzine 3V+C 4INF(3)	1	,542	1,363	,504	3,687
Therapien 1.BE 0Keine 1Chemo 2Vakzine 3V+C 4INF(4)	1	,227	1,934	,663	5,638

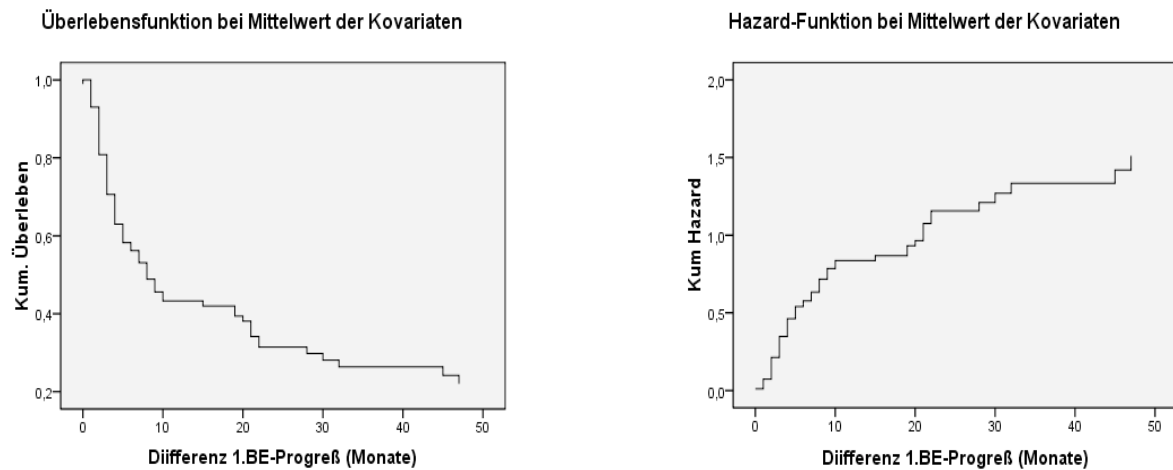


Abb. 3.6.4a: Cox-Regression zur Darstellung des Progresses mit multiplen Kovarianten rückwärts gerechnet

Mit der Hazard-Ratio wird in der gesamten Gruppe verglichen, ob ein bestimmtes Ereignis stattfindet (Progress/Tod). Dabei ist eine Hazard Ratio von 1 = kein Unterschied zwischen den beiden Vergleichsgruppen, hier CTC-Nachweis/kein CTC-Nachweis. Eine Hazard-Ratio kleiner oder größer 1 bedeutet, dass es einen Unterschied in der Überlebenszeitraum zwischen Vergleichsgruppen gibt. Hazard-Ratio höher oder niedriger als 1 bedeutet, dass das Überleben mit/bzw. ohne CTC-Nachweis zeitlich einen besseren Wert ergibt.

4 DISKUSSION

Da das maligne Melanom in sehr frühen Erkrankungsstadium, also auch schon bei sehr geringem Tumolvolumen die Fähigkeit hat, sowohl hämatogen als auch lymphogen zu metastasieren, gehört das maligne Melanom zu den aggressivsten Tumoren des Menschen.

Um bei einer Erkrankung eine optimale Behandlung gewährleisten zu können, werden standardisierte Abläufe im klinischen Alltag benötigt. Dazu gehört auch eine zuverlässige Nachweismethode um zum Beispiel den Therapieerfolg einer Behandlung zu überwachen. Dabei kann unter anderem die RT-PCR Methode zum Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen angewendet werden, diese Methode wurde schon durch viele verschiedene Studien in den letzten Jahren untersucht.

Obwohl die molekulare Kontrolle von zirkulierenden Tumorzellen durch die RT-PCR schon bei Patienten mit bestimmten Leukämien und Lymphomen routinemäßig angewendet wird, ist die Anwendung der RT-PCR bei Patienten mit soliden Tumoren nicht etabliert und wird noch diskutiert. Dabei kann für bestimmte Gruppen von Patienten mit einem erhöhten Risiko zur Metastasen Bildung, durch die Anwendung der RT-PCR-Methode der Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen erfolgen. Des Weiteren kann die Tumorlast mit der RT-PCR Methode nachgewiesen werden und die Wirkung einer angewandten Therapie im Verlauf dieser Behandlung kontrolliert werden. Es sollten zur Etablierung der RT-PCR-Methode folgende Kriterien/ Aspekte berücksichtigt und optimiert werden. (Andersen et al. 1997, Roberts et al. 1997, Guadagni et al. 2001, Olavarria et al. 2001)

- die Sensitivität dieser Methode, unter der Sensitivität der RT-PCR-Methode für CTCs wird die Wahrscheinlichkeit verstanden, mit der ein Patient mit positivem CTC Nachweis, auch als Patient mit CTC-positivem Nachweis definiert ist, also auch richtig erkannt wird. Durch ein- oder zwei Blutentnahmen-/ Proben werden diese in der Blutbahn zirkulierenden Tumorzellen mit einer sehr hohen Wahrscheinlichkeit erfasst und nachgewiesen.

- die Spezifität dieser Methode, mit der Spezifität der RT-PCR-Methode für CTC-Nachweis wird die Wahrscheinlichkeit verstanden, mit der ein CTC-negativer Patient auch als ein CTC-

negativer definiert wird. Dabei sollte die Spezifität einer Methode, mit hohen und ausreichenden positiven Ergebnissen belegt werden, diese CTCs nachweisen zu können. Des Weiteren sollte eine möglichst einfache Verfahrensweise zum Nachweis von CTCs verwendet werden, wie zum Beispiel durch eine periphere Blutabnahme. Die Methode sollte auch eine Möglichkeit zur Therapieüberwachung und dadurch eine Optimierung der Therapie bieten, des Weiteren ein Rezidiv und/oder Metastasen der Erkrankung aufzeigen können. Dabei stellt die Spezifität des Tumorzellnachweises eine Schwierigkeit dar, da auch eine Reihe von Tumor- bzw. Epithelzellspezifischen Transkripten in hämatopoetischen Zellen gesunder Patienten nachweisbar sind.

Eine hohe Sensitivität der RT-PCR-Technik ist aber, gleichzeitig auch anfällig gegenüber Übertragungskontaminationen, die in diesem Falle dann zu falschpositiven PCR-Ergebnissen führen können. Dabei wird zwischen den Kontaminationsarten unterschieden,

- Es kann zu einer Kontamination bei der Blutabnahme der Patientenblutproben kommen.

- des Weiteren kann eine Verunreinigung durch Aspiration von Hautmelanozyten dieser Blutprobe oder durch genetisches Fremdmaterial entstehen.

-Es kann auch eine Verunreinigung der Blutproben, durch epidermale Melanozyten während der Punktion der Venen nicht ausgeschlossen werden.

Um dieses Kontaminationsrisiko welches natürlich immer besteht zu vermindern, wurden die Standard des Labors, welche zum Beispiel die Verwerfung des ersten EDTA-Röhrchens bei der Entnahme von Blutproben vorgeben, eingehalten. Daher kann mit einer großen Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen, dass das Kontaminationsrisiko durch die genannten Vorsichtsmaßnahmen sehr gering ist. Der Nachweis ist auch von den jeweiligen Verfahren der diese Untersuchungen durchführenden Labore abhängig. In einer Studie von Keilholz et al. wurden in den Laboren, die an dieser Studie teilnahmen keine standardisierten Verfahren eingesetzt. (Keilholz et al. 1998).

4.1 Zirkulierende Tumorzellen

Ein Nachweis von CTCs durch verschiedene Methoden kann für die Prognose und für die Therapiekontrolle von wichtiger Bedeutung sein.

Viele Studien und Arbeitsgruppen haben sich in den letzten Jahren auf die spezifische Entdeckung dieser malignen Tumorzellen und/oder von kleinsten Mengen des zellfreien Tumordns im peripheren Blut von Krebspatienten spezialisiert. Verschiedene Nachweismethoden erlauben dabei die Entdeckung und die Kennzeichnung der frühen metastatischen Verbreitung des Tumors und können in der näheren Zukunft wichtige Einblicke in die Mechanismen der metastatischen Kaskade von menschlichen Tumoren, einschließlich der Effekte auf die therapeutischen Interventionen zur Verfügung stellen. Dabei können CTCs im Blut von Patienten mit Epitheltumoren unter Verwendung von verschiedenen analytischen Verfahren schon sehr genau ermittelt werden, obwohl die relative Zahl von CTCs dabei sehr gering ist. (Alix-Panabières et al. 2011, Danova et al. 2011)

4.2 Verwendete Surrogat-Marker

Die Bestimmung der in dieser Arbeit verwendeten Marker Tyrosinase/ MART-1, wird in den aktuellen S3-Leitlinie (AWMF) nicht empfohlen. Dabei hat ein positiver Nachweis der beiden Marker, wie in dieser Arbeit statistisch untersucht, einen signifikanten Einfluss auf den Progress und das Überleben der Patienten.

Auch in einer Studie von de Vries et al. 1999, welche durch eine Qualitätskontrolle die Reproduzierbarkeit und den Nachweis von Tyrosinase und MART-1-Transkripten in über 100 Blutproben von ca. 70 Melanom-Patienten (Stadien III und IV) untersuchte, konnte die Wichtigkeit dieser beiden Marker gezeigt werden. Es sollte die Reproduzierbarkeit von RT-PCR zum Nachweis von minimalen Mengen von zirkulierenden Melanomzellen verbessert werden. Dabei war die Mehrheit der Blutproben für die Tyrosinase (ca. 80%) und für die MART-1 (ca. 66%) negativ, nur eine geringe Anzahl der Proben waren positiv für Tyrosinase und MART-1. Es zeigte sich für die MART-1-PCR bessere Ergebnisse als für Tyrosinase-PCR und die Emp-

findlichkeit war höher, wenn beide Marker verwendet wurden. Eine Folgerung daraus ist, dass die geringe Zahl der Melanom-Marker in PCR-positiven Blutproben durch Unterschiede in der mRNA Qualität erklärt werden können. (de Vries et al. 1999)

Arenberger et al. führten eine Studie mit fünf Melanom-Markern: Melan-A/ MART-1, gp100, MAGE-3, MIA und Tyrosinase, mit ca. 65 Patienten im resezierten Melanom Stadium IIB-III durch. Dabei hatten ca. 20 Patienten einen signifikante Tumormarker Erhebung in einem Zeitraum von 0 bis 9 Monaten vor dem Fortschreiten der Erkrankung. Die MAGE-3 war dabei der empfindlichste Marker einer Krankheitsprogression. Dadurch zeigt sich, dass vor allem standardisierte Methoden und Verfahren nötig sind, um möglichst einheitliche Ergebnisse zu haben.

Auch eine Studie zur Beziehung zwischen dem Tyrosinase Nachweis im peripheren Blut und dem klinischen Verlauf der Erkrankung im Stadium III, nach radikaler Lymphknoten-dissektion und anschließend krankheitsfreien Melanompatienten konnte 2003 zeigen: Dass die RT-PCR Tyrosinase-mRNA-Expression eine zuverlässige und reproduzierbarer Marker mit einer hohen Korrelation für die Melanome Progression und zuversichtlich auf der Ebene der klinischen Anwendung im Routine Follow-up ist. Es wurden RT-PCR-Techniken verwendet, um Tyrosinase-mRNA zu identifizieren, hierbei wurden insgesamt ca. 542 Blutproben untersucht. (Osella-Abate et al. 2003)

Die Tyrosinase und MART-1 sind somit wie schon in vielen Studien belegt, auch in dieser Arbeit als sehr sensible und spezifische Tumormarker zu werten. Dieses sollte durch weitere klinische Studien belegt werden. Dabei ist es wichtig, durch Verwenden von mehr als einem Marker, mehrfachen Analysen und standardisierten Verfahren die Sensitivität der Methode zu erhöhen. Des Weiteren ist es wichtig, mögliche Verunreinigungen der Blutproben durch Epithelzellen durch standardisiertes Vorgehen zu vermeiden und damit die Spezifität zu erhöhen.

Weiterhin wurden so genannte „cut-off“ Werte für die verwendeten Melanom-Marker MelanA/MART1 und Tyrosinase ermittelt, um so die Ergebnisse zu verbessern.

In den aktuellen S3-Leitlinien werden die Tumormarker S100B, LDH und MIA zu verschiedenen Zeitpunkten der Erkrankung verwendet bzw. deren Bestimmung empfohlen. Dabei gehört die Bestimmung des Proteins MIA (Melanoma inhibitory activity) aktuell nicht zur Standarddiagnostik. Aufgrund der jetzigen Studienlage, kann über die prognostische Aussagekraft der MIA keine Aussage getroffen werden, im Vergleich zu empfohlenen Bestimmung von S100B, bei der Primärdiagnose des Melanoms. Die Bestimmung der S100B und LDH bei einer Metastasierung ist aufgrund von vielfachen Studien in der Suche nach potentiellen Tumormarkern des Melanoms empfohlen, da diese sich als nützlich erwiesen haben. Nach den Leitlinien, ist die LDH nicht als sensitiver Tumormarker für die Initial-Diagnostik bei Primärtumoren geeignet. Im Vergleich dazu, hat die LDH in dieser Arbeit bei einer Erhöhung einen signifikanten Einfluss auf das Überleben und den Progress. Diese Patienten mit einem erhöhtem LDH waren aber meist, auch in fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung. So dass sich die Empfehlung, einer Bestimmung in den fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung auch durch die Ergebnisse der Arbeit bestätigt werden können.

4.3 Weitere klinische Faktoren und deren Einfluss auf Progress und Überleben

Die univariaten Analysen haben gezeigt, dass ein CTC Nachweis für die Prognose der Erkrankung von wichtiger Bedeutung ist. Durch die verwendeten Marker Tyrosinase und Melan-A/MART-1 konnte gezeigt werden, dass bei einem CTC-Nachweis im peripheren Blut, die Überlebenszeit verkürzt ist und der Krankheitsprogress statistisch zeitlich schneller stattfindet, gegenüber den Proben der Patienten ohne einen CTC-Nachweis.

In den multivariaten Analysen, zeigte sich durch die PCR für das Überleben, der Karnofsky-Index ($p < 0,001$ und Hazard Ratio: 0,305), die LDH ($p = 0,002$ und Hazard Ratio: 0,407) und die Tumorlast ($p < 0,001$ Hazard Ratio: 0,386) als prognostisch bedeutsame Einflussgrößen.

Für den Progress der Erkrankung zeigten sich in den multivariaten Analysen, die LDH ($p=0,003$ und Hazard Ratio: 0,417) und die Tumorlast ($p<0,001$ Hazard Ratio: 0,441) als prognostisch bedeutsame Einflussgrößen.

STADIUM DER ERKRANKUNG: Wie erwartet, haben die unterschiedlichen Stadien der Erkrankung, einen signifikanten Einfluss auf das Überleben und den Krankheitsprogress der Patienten. Da Patienten in den frühen Stadien (Stadium I) der Erkrankung, bei einer frühen Intervention gute Heilungschancen haben. In den fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung und mit nachweislichen Fernmetastasen, ist eine komplette Remission häufig nicht zu erreichen. Dieses zeigte sich auch in den durchgeführten Analysen. In dieser Arbeit ist dabei bei Patienten, die in den Stadien I-III der Erkrankung waren, die Überlebenszeit statistisch am längsten. Von diesen Patienten verstarben deutlich weniger im Beobachtungszeitraum, als im Vergleich zu Patienten in den Stadien IV- M1c. Auch auf den Krankheitsprogress der Patienten in Abhängigkeit des Stadiums der Erkrankung, zeigte sich ein signifikanter Einfluss. Der Krankheitsprogress war statistisch schneller, waren die Patienten in den Stadien IV-M1c der Erkrankung.

Ähnliche Ergebnisse zeigte eine Studie von Visús et al. 2007, die die prognostische Rolle von zirkulierenden Melanomzellen untersuchte. Es konnte durch Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion für Tyrosinase-mRNA bei Patienten mit einem malignen Melanom nachgewiesen werden, dass das Stadium der Erkrankung der einzige bedeutende prognostische Faktor für das Gesamtüberleben war. (Visús et al. 2007)

Palmieri et al. führten 2003 eine Studie durch, hier zeigte sich allerdings kein signifikanter Einfluss. Es wurde bei Nachweis von zirkulierenden Melanomzellen in peripheren Blutproben zum Zeitpunkt der Diagnose von malignen Melanom Patienten, mit der semiquantitativen RT-PCR untersucht. Dieses führte jedoch zu keiner signifikanten Vorhersagewert für das Stadium der Erkrankung. (Palmieri et al. 2003)

Daher sollten, da in einem frühen Stadium (Stadium I), das maligne Melanom durch eine frühzeitige operative Intervention meistens geheilt werden kann, engmaschige Hautscreenings erfolgen und im optimalen Fall auch eine bildgebende Dokumentation erfolgen. Im Vergleich ist die Prognose des bereits metastasierten malignen Melanoms als eine schlechte anzusehen.

Also ist ein entscheidender Faktor, die frühe Exzision bei suspekten Hautveränderungen zur möglichen Vermeidung einer eventuellen Mikrometastasierung.

VERSCHIEDENE THERAPIEARTEN: Die statistische Untersuchung auf den Einfluss der erhaltenen Therapie der Patienten zeigte unterschiedliche Ergebnisse. Welche individuelle Therapie die Patienten nach der 1. Blutabnahme erhalten haben, hat dabei einen signifikanten Einfluss auf den Überlebenszeitraum der Patienten. Die Unterschiede zwischen den Therapiearten sind zu berücksichtigen und Patienten in den fortgeschrittenen Stadien haben sicherlich um ein weiteres Fortschreiten der Erkrankung, teilweise Therapiekombinationen erhalten.

Die Untergruppen der Patienten ist dabei insgesamt zu klein und die Therapien zu unterschiedlich, um diese miteinander zu vergleichen. Dabei hatten die gängigen Therapien auch keine Abweichungen zu den bis jetzt bekannten Ergebnissen in den bekannten Studien. Der Therapieerfolg ist daher bei bekannter Metastasierung eine Lebensverlängerung.

Daher ist der Erfolg einer adjuvanten Therapiemaßnahme, vom frühzeitigen Einsatz in der Phase vor der Mikrometastasierung nötig. In der Regel ist bei Patienten mit einer Fernmetastasierung der Erkrankung nur noch wie erwähnt eine Lebensverlängerung zu erreichen. In einer Studie von Tejera- Vaquerizo et al. 2007, zeigte sich ein ähnliches Ergebnis, dabei konnte eine Fernmetastasierung bei zunehmender Tumordicke und Fernmetastasen im mittel nach ca. 26 Monaten nachgewiesen werden. (Tejera_ Vaquerizo et al. 2007, Meier et al. 2002)

Patienten die nach der 1.Blutabnahme eine Chemotherapie erhielten, hatten die zeitlich kürzeste Gesamtüberlebenszeit von allen Patienten. Die Patienten die keine systemische Therapie erhielten, da keine Therapie nötig/erwünscht war und/oder diese keinen Progress hatten, hatten statistisch, die längste Überlebenszeit. Ein großer Teil der Patienten erhielten eine Vakzinierungstherapie, dabei scheint es, dass die Vakzinierungstherapie bei bestimmten Patienten eine gute Therapiestrategie darstellt. Bei einer Behandlung mit Vakzinen prognostiziert dabei eine Melanom-spezifische Immunantwort ein insgesamt längeres Gesamtüberleben, obwohl keine eindeutigen Beweise dafür gefunden wurden, dass eine Vakzinierungstherapie insgesamt eine bessere Therapie der Krankheit oder einen Einfluss auf das Gesamtüberleben im Vergleich zu anderen Behandlungen hat. Dieses sollte durch weitere klinische Studien untersucht werden.

In einer Metaanalyse von Chi et al., konnte eine Vakzinierungstherapie bei Patienten mit einem metastasierten Melanom das Gesamtüberleben beeinflussen. Zwischen sechs Studien mit ca. 4400 Patienten, konnte gezeigt werden, dass eine Tumor-spezifische Immunantwort mit einem längerem Gesamtüberleben gegenüber dem Ausbleiben einer Reaktion assoziiert ist. (Chi et al. 2011)

Der Progress der Erkrankung in Abhängigkeit von der Art der erhaltenen Therapie nach der 1. Blutabnahme. Es hatten fast alle Patienten die nach der 1. Blutabnahme eine Chemotherapie oder Kombinationstherapie erhielten einen Krankheitsprogress. Zwar haben diese Patienten, fast alle eine Progression, diese waren aber in den fortgeschrittenen Stadien mit Fernmetastasen. Daher ist es wichtig Methoden zur standardisierten Therapieführung zu entwickeln, um den zeitnahen Erfolg einer Therapie nachzuweisen und nicht erst nach mehreren Zyklen einer erhaltenen Therapie.

Mocellin et al. führten 2010 basierend auf früheren Metaanalysen von randomisierten kontrollierten Studien eine Übersichtsarbeit darüber durch, ob die Verwendung von Interferon alpha (IFN- α) in der adjuvanten Therapie auf den Progress bei Patienten mit malignem Melanom hat. Dabei zeigte die adjuvante Therapie mit IFN- α eine statistisch signifikante Verbesserung auf Progress und Gesamtüberleben der Patienten. (Mocellin et al. 2010)

Des Weiteren konnten Palermo et al. in einer klinischen Pilotstudie mit einer Kombination von Chemotherapie und Immuntherapie aus DTIC plus Peptid Impfung zeigen, dass diese Art der kombinierten Therapie sehr wirksam bei der Verhinderung eines Progress der Erkrankung sein könnte. (Palermo et al. 2010)

LDH: Die Bestimmung der Lactatdehydrogenase (LDH) wird in den S3-Leitlinien bei einer Melanonerkrankung (AJCC, 2009) empfohlen und ist ein wichtiger Marker für ein fortgeschrittenes Stadien der Erkrankung.

Als erhöhte Lactatdehydrogenase-Werte wurden $LDH \geq 240$ U/l im Serum genommen. Es zeigt sich eine signifikante Korrelation zwischen LDH Erhöhung und dem Krankheitsprogress. Eine LDH Korrelation mit dem Überlebenszeitraum bei fortgeschrittenem Melanom zeigte sich auch in zwei großen, randomisierten Studien. Allerdings zeigte die prognostische Aussagekraft der LDH verglichen mit zwei anderen Tumormarkern in einer Studie von Eg-

berts et al. 2011 keine Korrelation zwischen dem Behandlungserfolg und des LDH-Serumspiegels im Stadium IV der Erkrankung. (Agarwala et al. 2009, Egberts et al. 2011)

TUMORLAST: Bei einer Tumorfreiheit ist die Überlebenszeit der Patienten deutlich verlängert. Diese ist entweder klinisch, laborchemisch oder durch bildgebende Verfahren gesichert. Es zeigt sich eine positive Korrelation zwischen noch vorhandenem Tumor und der Überlebenszeit bzw. dem Progress der Erkrankung.

Dabei waren 65 (48,5%) der Patienten bei der 1. Blutabnahme ohne Nachweis von Tumorzellen bzw. konnte keine Tumorlast klinisch oder/und mit bildgebendem Verfahren nachgewiesen werden, 32 (49,2%) der Patienten verstarben in einem Zeitraum von 0 bis ca. 100 Monaten. Bei 69 (51,5%) der Patienten konnte zum Zeitpunkt der 1. Blutentnahme eine Tumorlast nachgewiesen werden, von diesen Patienten verstarben 55 (79,7 %) in einem Zeitraum von 0 bis ca. 40 Monaten, ein Patient verstarb nach ca. 80 Monaten.

KARNOFSKY- INDEX: Der Karnofsky-Index war bei 18 (13,4%) der Patienten bei der 1. Blutentnahme laut der zumeist pflegerischen Dokumentation niedriger als 90 %, davon sind 14 (77,7 %) der Patienten in einem Zeitraum von 0 bis ca. 40 Monaten verstorben. Bei 116 (86,6 %) der Patienten war der Karnofsky-Index ≥ 90 %, von diesen Patienten sind 73 (54,5 %) in einem Zeitraum von 0 bis ca. 100 Monaten verstorben.

Die Patienten mit einem prozentual erniedrigtem Karnofsky- Index von < 90 h% hatten statistisch eine kürzere Überlebenszeit. Der Karnofsky-Index ist für die Überlebenszeit der Patienten von signifikanten Einfluss.

Auch in einer Studie von Mathieu et al. 2007, hatte ein niedriger Karnofsky-Index einen signifikanten Einfluss auf den Progress der Erkrankung. In dieser Studie hatten Patienten mit malignen Melanom und nachgewiesenen Hirnmetastasen eine bessere Überlebenschance mit einem hohen Karnofsky-Index (≥ 90). (Mathieu et al. 2007)

DAS ALTER: Es waren 98 (73,1 %) der Patienten unter dem 60. Lebensjahr, von diesen verstarben 67 (68,4 %) der Patienten in einem Zeitraum von 0 bis ca. 100 Monaten. 36 (26,9 %) der Patienten waren 60 oder älter, von diesen verstarben 20 (55,5 %) der Patienten, in einem

Zeitraum von 0 bis ca. 80 Monaten. Das Alter der Patienten, zeigte keinen prognostischen Einfluss auf den Überlebenszeitraum. Von 98 (73,1 %) Patienten hatten 78 (79,6 %) einen Progress der Erkrankung, in einem Zeitraum von 0 bis ca. 100 Monaten. 36 (26,9 %) Patienten die 60 Jahre oder älter waren hatten 25 (69,4 %) einen Progress, in einem Zeitraum von 0 bis ca. 80 Monaten. Auch auf den Progress der Erkrankung, hat das Alter der Patienten keinen signifikanten Einfluss.

Eine vergleichbare Studie im Bezug auf das Alter (Patienten mit Lymphknotenmetastasen), die ≥ 65 Jahre und < 65 Jahre alt waren, wurde das Alter als unabhängiger prognostischer Faktor für den Überlebenszeitraum analysiert. Diese Analyse zeigte, dass Melanom-Patienten ≥ 65 Jahre, durch ein höheres primäres Tumorstadium eine schlechtere Prognose in Gegenwart von regionalen Lymphknotenmetastasen haben als jüngere Patienten. (Rutkowski et al. 2010)

GESCHLECHT: Das Geschlecht zeigte bei 74 (55,2 %) männlichen Patienten keinen signifikanten Einfluss, von den männlichen Patienten verstarben 51 (68,9 %) in einem Zeitraum von 0 bis ca. 90 Monaten. Von 60 (44,8 %) weiblichen Patienten, verstarben 36 (60 %) der Patientinnen in einem Zeitraum von 0 bis ca. 100 Monaten.

Das Geschlecht der Patienten hat bei der Prognose auf die Überlebenszeit der Erkrankung einen geringen Einfluss, die weiblichen Patienten habe eine relativ geringe längere Überlebenszeit. Von 74 (55,2 %) Patienten hatten 60 (81,1 %) einen Krankheitsprogress, in einem Zeitraum von 0 bis ca. 90 Monaten. Von 60 (44,8%) Patientinnen hatten 43 (71,7 %) einen Krankheitsprogress auch ca. in einem Zeitraum von 0 bis ca. 90 Monaten. Das Geschlecht der Patienten hat einen relativ kleinen signifikanten Einfluss auf den Progress der Erkrankung.

Es wurde bis jetzt in mehreren Studien gezeigt, dass Frauen eine bessere Überlebensrate aufweisen als Männer. (Balch et al. 1992).

Dabei hatten Männer aber einen höheren Anteil an ulzerierten Läsionen als Frauen. Es bestand eine positive Korrelation zwischen der Stärke der Ulzeration. Die Prognose scheint auch von der jeweiligen Lokalisation des Primärtumors abhängig zu sein. Patienten mit Melanom der Kopfhaut, hatten eine schlechtere Prognose als diejenigen mit Läsionen des Halses und diejenigen mit Melanomen an den Händen der deutlich schlechteren Prognose als noch Patienten mit Läsionen an den Armen oder Beinen. Offensichtlich gibt es einen eigenständigen

Einfluss des Geschlechts auf die Prognose, in einer umfassenden AJCC-Validierungsstudie bestätigte sich dieses. Es konnte sich aber nicht klären worauf sich die bessere Prognose bei Frauen beruht. (Balch et al. 2001)

Meier et al. konnten 2002 zeigen, dass dabei eine Metastasierung bei dem größten Teil der Patienten (ca. 50%), lokoregionär erfolgt und der Anteil der Patienten mit Fernmetastasen bei ca. 30 % liegt. Dabei waren anatomische Lage, Geschlecht und Tumordicke signifikante Risikofaktoren für die Entwicklung von Metastasen durch unterschiedliche Wege. (Meier et al. 2002)

In einer großen Studie mit ca. 11.800 Melanom Fällen aus dem Münchner Krebsregister, zeigte sich ein wesentlicher Vorteil für die weiblichen Patienten. Frauen hatten ein niedrigeres Risiko des Fortschreitens, darunter ein geringeres Risiko von Lymphknotenmetastasen und viszeralen Metastasen der Erkrankung und sie hatten einen signifikanten Überlebensvorteil nach der ersten Progression. Lokalisierte Melanome bei Frauen hatten eine geringere Neigung zu metastasieren, was eine bessere Überlebenschance darstellt, mit Männern verglichen. Diese Ergebnisse weisen auf Unterschiede in der Tumor-Wirt-Interaktion über das Geschlecht hin. (Joosse et al. 2011)

ALLGEMEINES: Von 134 Patienten mit einem histologisch gesicherten malignen Melanom überlebten im Beobachtungszeitraum 49 Patienten (36,0 %). Es fanden in einem Zeitraum von ca. 10 Jahren Blutentnahmen zu den verschiedenen Zeitpunkten statt. Diese wurden zu einem größten Teil im Rahmen von Studien standardisiert.

So dass der größte Teil der RT-PCR -Analysen mit den gleichen Laborstandards ausgeführt wurden. 87 Patienten (64,0 %) sind innerhalb des Beobachtungszeitraums verstorben.

Bei den 49 Überlebenden wurden bei 11 (22,4 %) Patienten der Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen im Serum nachgewiesen werden. Bei den Verstorbenen konnten im Gegensatz dazu bei 37 (42,5 %) Patienten Tumorzellen bei der 1. Blutentnahme nachgewiesen werden.

Das Signifikanzniveau ist $p=0,05$, wenn $p < 0,05$ ist hat die jeweilige Analyse eine signifikanten Einfluss auf Überlebenszeitraum oder den Progress. Es zeigte sich, dass die RT-PCR

Analyse von zirkulierenden Melanomzellen im peripheren Blut, für das Überleben ($p < 0,001$) und für den Progress ($p < 0,001$) einen deutlich signifikanten Einfluss zeigt. Für die Marker Tyrosinase Überleben ($p < 0,001$), Progress ($p < 0,001$) und für MART-1 Progress ($p < 0,001$) zeigt sich ein signifikanter Einfluss. Nur für den Überlebenszeitraum zeigt sich für die MART-1 mit ($p = 0,066$) kein signifikantes Ergebnis. Es könnte darauf zurückzuführen sein, dass bei einer geringeren Zahl von Patienten der Marker MART-1 bei den durchgeführten RT-PCR Analysen nachzuweisen war.

Da zeigt die LDH in beiden Analysen für das Überleben ($p < 0,001$) und den Progress ($p < 0,001$) einen signifikanteren Einfluss.

Einen signifikanten Einfluss zeigen auch die Einflussgrößen der Patienten wie Therapie, Tumorlast und Stadium der Erkrankung mit ($p < 0,001$) für den Überlebenszeitraum und ($p < 0,001$) für den Progress. Das Alter ($p = 0,457$) für das Überleben, ($p = 0,285$) für den Progress und das Geschlecht ($p = 0,202$) für das Überleben, ($p = 0,285$) haben keinen signifikanten Einfluss auf den Überlebenszeitraum und dem Progress nach der 1. Blutentnahme. Der Karnofsky-Index zeigt auf den Überlebenszeitraum ($p < 0,001$) einen signifikanten Einfluss zu haben und auf den Progress ($p = 0,068$) nicht.

Bei Verwendung mehrerer Marker zeigen sich bessere Ergebnisse hinsichtlich der Überwachung von Therapien. Daher sollten möglichst auch alle vorhandenen aussagekräftigen Marker mit in die Prognose auf den Überlebenszeitraum, eventuellen Krankheitsprogress und Therapiestrategien einbezogen werden, um eine Optimierung der Behandlung für den jeweiligen Patienten zu erreichen.

Es wurden in den letzten Jahren Unterschiede in der Erfolgsquote der Reverse Transkription Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) zum Nachweis von Melanom-Zellen im peripheren Blut von Patienten beschrieben. Daher ist ein Nachweis auch immer von den Verfahren der jeweiligen Labore abhängig, es werden noch keine standardisierten Verfahren eingesetzt (Keilholz et al. 1998).

Es gibt schon viele verschiedene Methoden zum Nachweis von CTCs, es konnte sich bis jetzt noch keine Methode etablieren, um eine dieser Methoden zu etablieren sollten wichtige Aspekte standardisiert und weiter optimiert werden.

Die 1. Limitierung dieser Arbeit ist: Der retrospektive Charakter der Arbeit,
die 2. Limitierung ist: Heterogene Patienten (Stadien, verschiedene Therapien)

Des Weiteren ist die Gesamtzahl der Patienten die eine standardisierte Blutentnahme, also zu Zeitpunkten der eventuellen Krankheitsprogression oder auch mit Blutentnahmen mit einer PCR Bestimmung in Zyklen zu gering.

Die Auswertung der prognostischen Bedeutung mehrerer aufeinanderfolgender Blutentnahmen ist aufgrund der unterschiedlichen Zeitabstände und der insgesamt geringen Patientenzahl für die Analyse limitiert. Aufgrund der retrospektiven Analyse sind nicht alle Daten für alle Patienten vollständig. Des Weiteren eine teils unvollständige Dokumentation bzw. einem nicht vollständig zu eruiertem Follow-up's.

Es kann nach Betrachtung der Ergebnisse dieser Arbeit zusammenfassend gesagt werden, dass bei einem Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen durch die RT-PCR bei Patienten mit malignem Melanom eine insgesamt schlechtere Prognose der Erkrankungen gesehen werden konnte. Für zukünftige Studien bei der weiteren Untersuchung von CTCs kann nicht ausgeschlossen werden, dass durch die Entwicklung und/oder Weiterentwicklung neuer oder bereits vorhandener Tumormarker, die aktuelle Situation sich ändert.

Dabei sollte nach neuen Tumormarkern gesucht werden, die Optimierung der zur Zeit verwendeten Techniken zur Aufarbeitung der Proben erfolgen und des Weiteren eine gezielte Isolierung von epithelialen Zellen im Vorfeld der RT-PCR erfolgen, um so die Spezifität der Methode bei gleichbleibender Sensitivität möglicherweise zu erhöhen. Dieses kann nur durch weitere prospektive klinische Studien erfolgen.

4.4 Ausblicke

Es passiert im Hinblick auf neue Therapiestrategien und Optionen aktuell sehr viel, diese sind aber noch auf Patienten beschränkt welche sich schon in fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung befinden und dabei schon meistens Fernmetastasen nachzuweisen sind. Da aktuell noch keine sehr spezifischen Tumormarker für das maligne Melanom existieren, liegt die Schwierigkeit darin die Patientin heraus zu filtern, bei denen eine eventuelle Mikrometastasierung im frühen Stadien der Erkrankung stattfand oder die eine Gefahr haben im Verlauf ein

Rezidiv und/oder Fernmetastase bilden können, aber diese laborchemisch bei der Erstdiagnose nicht nachzuweisen war.

Daher ist ein besonderes Ziel, noch spezifischere Tumormarker zu suchen. Welche bei gesunden Patienten nicht vorhanden sind, bzw. Normwerte zeigen und bei Patienten mit einem Tumor nachweisbar sind, bzw. pathologisch sein sollten. Diese sollten bei einer Progression idealerweise erneut ansteigen und somit eine optimale Aussage auf Prognose und die Wahl der jeweiligen Therapiestrategie haben. Bei aktuell sehr schlechter Prognose des metastasierten Melanoms sollte dies einer der Hauptziele der klinischen Forschung sein.

Die Biologie des Melanoms ist ein äußerst komplexer Prozess, der mehrere Mutationen sowie Aktivierung mehrerer onkogener Signalwege beinhaltet. Gegenwärtig laufen Studien die eine Kombination verschiedener Wirkstoffe gezielt, sowie mit Kombinationen von Chemotherapie und / oder biologischer Therapie und Signaltransduktion- Inhibitoren. Dabei sind diese klinischen Studien wichtig, um die durchgeführten korrelativen Studien zum Verständnis der molekularen Biologie des Melanoms zu verstehen. Diese tragen dazu bei, dass ein besseres Verständnis der Melanom- Biologie und ihrer Mechanismen der Resistenzbildung gegen die derzeitigen Standardtherapien. Dadurch kann möglicherweise die Entwicklung neuer, wirksamerer Substanzen erfolgen. (Kudchadkar R 2010)

Zum jetzigen Zeitpunkt gibt es keinen einzelnen Tumormarker für das maligne Melanom, welcher diese Kriterien erfüllt. Die prognostischen Faktoren werden aktuell nach Histologie des Primärtumors, Tumordicke nach Breslow, dem Invasionslevel nach Clark, Alter und Geschlecht des Patienten, Anzahl der befallenen Lymphknoten bei Erstdiagnose, vorhandenen Metastasen und der Lokalisation des Primärtumors gestellt. (Mouawad et al. 2010)

Sollte ein diese Kriterien erfüllender Tumormarker gefunden werden, könnte dieser im klinischen Alltag sehr von Nutzen sein, wie zum Beispiel frühzeitig ein mögliches Rezidiv zu zeigen oder im Rahmen der Nachsorge zur Optimierung der möglichen Therapien und Therapiewirkungen dienen. Der einzige Serum-Marker, der in den aktuellen AJCC Klassifikation für die klinische Anwendung eingebaut wurde ist die Lactatdehydrogenase (LDH)-Dosierung, diese ist aber begrenzt auf die Prognose von Metastasen. Die jüngste Entwicklung von Proteomanalyse Technologien bieten neue Perspektiven auf diesem Gebiet. Um prognostische Bi-

omarker im Serum von Melanom-Patienten zu identifizieren, könnte dieses der eine entscheidende Schritt sein. (Sekulic et al. 2008, Solassol et al. 2011).

Die Anwesenheit von zirkulierenden Melanomzellen ist ein Marker für ein hohes Rezidivrisiko und ein kürzeres krankheitsfreies Überleben, ob postoperativ erkannt oder während des Follow-up.

Tyrosinase-mRNA-Amplifikation durch Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion kann ein nützliches Werkzeug für die Überwachung der Wirksamkeit der adjuvanten Behandlung sein. Die aktuellen verschiedenen Marker, besonders wenn sie in Kombination bewertet werden, können verwendet werden, um Patienten zu überwachen, die ein Rezidivrisiko haben. (Gogas et al. 2002, Kluger et al. 2011)

Wichtig wäre weiterhin die Spezialisierung von Centern weiter zu fördern und weiter zu konzentrieren mit spezialisiertem Personal zur Betreuung von Erkrankten Patienten, um so möglichst schnelle Diagnosen und Therapiemöglichkeiten zu haben.

Die Inzidenz und die Mortalität des malignen Melanoms nahm in den letzten Jahrzehnten deutlich zu, obwohl noch vor wenigen Jahrzehnten das maligne Melanom, als ein der selteneren Tumoren des Menschen galt. Im Jahr 2008 rangierte es bei Frauen auf Platz fünf und bei Männern auf Platz acht der häufigsten soliden Tumorentitäten in Deutschland. Um einen Einfluss auf die Verringerung der Inzidenz zu haben, muss eine bessere Methode der Früherkennung von Melanomen und die Methoden zur Verhütung einer Erkrankung verbessert werden. Dabei sollte vor allem die Aufklärung und Sensibilisierung mit intensiven Bemühungen, um eine eventuelle Erkrankung zu vermeiden, schon im Kleinkindesalter erfolgen. Da die Sonnenexposition im Kindesalter und das Risiko an einem kutanen Melanom zu erkranken korrelieren. (Riker et al. 2010, Kaatsch et al. 2012, Cust et al. 2011, Garbe et al. 2003, Burg et al. 1997).

5 ZUSAMMENFASSUNG

Das maligne Melanom ist ein sehr aggressiver Tumor des Menschen, dabei werden Patienten in Anfangsstadien der Erkrankung primär zu meist chirurgisch versorgt. Die Gefahr das dabei kleinste Mengen ausstreuender Tumorzellen im Körper verbleiben können und so eine Gefahr für ein Rezidiv und/oder eine Metastase darstellen, stellt die Kliniker vor eine große Aufgabe, diese CTCs nachzuweisen und zu eliminieren.

In diese Arbeit wurden insgesamt 134 Patienten mit einer histologisch gesicherten malignen Melanom Erkrankung eingeschlossen, welche im Campus Benjamin Franklin der Charité betreut wurden. Es wurde mittels der RT-PCR Methode, unter Verwendung der Biomarker (Tyrosinase und MART-1) der Nachweis von CTCs und deren prognostische Aussagekraft auf das Überleben und den Progress der Erkrankung mit statistischen Analysen untersucht. Die Patienten waren dabei in verschiedenen Stadien (I-IV) der Erkrankung und erhielten neben der zumeist primär chirurgischen Intervention unterschiedliche systemische Therapien (Vakzinierung-, Interferon-, Chemo-, und Kombinationstherapien).

Es konnte durch univariate und multivariate Analysen gezeigt werden, dass bei Patienten mit einem Nachweis von CTCs, ein signifikant kürzeres Überleben bestand, gegenüber Patienten ohne einen Nachweis von CTCs. Auch das erhöhte Risiko einer Progression der Erkrankung, konnte bei Patienten, mit einem Nachweis von CTCs statistisch gezeigt werden. Des Weiteren wurden Faktoren, wie die Erhöhung der LDH, das Alter, das Geschlecht, die Tumorlast, der Karnofsky-Index und deren Einfluss auf das Überleben und den Krankheitsprogress analysiert: Für diese Faktoren zeigten sich unterschiedlich signifikante Ergebnisse in den Analysen. Die analysierten Ergebnisse dieser Arbeit wurden mit anderen Studiendaten verglichen.

Dabei bedarf es weiterer prospektiver Studien, um den Nutzen der Einführung des Nachweises der CTCs in der klinischen Routine zu belegen.

Die zunehmende Kenntnis der pathophysiologischen Mechanismen der Tumorbio-
logie, Tumormimmunologie und steigendem molekularbiologischen Verständnis des Melanoms, sollten

dazu eingesetzt werden um ein individuelles Behandlungskonzept für Patienten zu gestalten. Wichtig ist weiterhin die Spezialisierung von Centern zu fördern und zu konzentrieren, um die Betreuung von erkrankten Patienten zu verbessern.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Agarwala SS, Keilholz U, Gilles E, Bedikian AY, et al.. LDH correlation with survival in advanced melanoma from two large, randomised trials (Oblimersen GM301 and EORTC 18951). *Eur J Cancer*. 2009 Jul;45(10):1807-14.

van Akkooi AC, Nowecki ZI, Voit C, Schäfer-Hesterberg G, Michej W, et al. Sentinel node tumor burden according to the Rotterdam criteria is the most important prognostic factor for survival in melanoma patients: a multicenter study in 388 patients with positive sentinel nodes. *Ann Surg*. 2008 Dec;248(6):949-55.

Algazi AP, Soon CW, Daud AI. Treatment of cutaneous melanoma: current approaches and future prospects. *Cancer Manag Res*. 2010 Aug 17;2:197-211.

Alix-Panabières C, Schwarzenbach H, Pantel K. Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA. *Annu Rev Med*. 2011 Jan 26.

Allen JE, El-Deiry WS. Circulating Tumor Cells and Colorectal Cancer. *Curr Colorectal Cancer Rep*. 2010 Oct 1;6(4):212-220.

Alunni-Fabbroni M, Sandri MT. Circulating tumour cells in clinical practice: Methods of detection and possible characterization. *Methods*. 2010 Apr;50(4):289.

Andersen N. S., Donovan J. W., Borus J. S., Poor C. M. et al. Failure of immunologic purging in mantle cell lymphoma assessed reaction detection of minimal residual disease. *Blood*, 15: 4212-4221, 1997.

Anger M, Friedhofer H, Fukutaki MF, Ferreira MC, Landman G. Primary cutaneous melanoma: an 18-year study. *Cinics (Sao Paulo)*. 2010 Mar;65(3):257-63.

Arenberger P, Arenbergerova M, Vohradnikova O, Kremen J. Early detection of melanoma progression by quantitative real-time RT-PCR analysis for multiple melanoma markers. *Keio J Med*. 2008 Mar;57(1):57-64.

Andersen N. S., Donovan J. W., Borus J. S., Poor C. M., Neuberg D., Aster J. C., Nadler L. M., Freedman A. S., Gribben J. G. Failure of immunologic purging in mantle cell lymphoma assessed re-action detection of minimal residual disease. *Blood*, **15**: 4212-4221, 1997.

Arenberger P, Arenbergerova M, Gkalpakiotis S, Lippert J, Stribrna J, Kremen J. Multimarker real-time reverse transcription-PCR for quantitative detection of melanoma-associated antigens: a novel possible staging method. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2008 Jan;22(1):56-64.

Armakolas A, Panteleakou Z, Nezos A, Tsouma A. et al. Detection of the circulating tumor cells in cancer patients. *Future Oncol*. 2010 Dec;6(12):1849-56.

Auge JM, Molina R, Filella X, Bosch E, Gonzalez Cao M, Puig S, Malveyh J, Castel T, Ballesta AM (2005) S-100beta and MIA in advanced melanoma in relation to prognostic factors. *Anticancer Res* 25: 1779-1782

Azzola MF, Shaw HM, Thompson JF, Soong SJ, Scolyer RA, Watson GF, Colman MH, Zhang Y Tumor mitotic rate is a more powerful prognostic indicator than ulceration in patients with primary cutaneous melanoma: an analysis of 3661 patients from a single center. (2003) *Cancer* 97: 1488-1498.

Balch CM. Cutaneous melanoma: prognosis and treatment results worldwide. *Semin Surg Oncol*. 1992 Nov-Dec;8(6):400-14.

Balch CM, Soong SJ, Gershenwald JE, et al. (2001) Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: Validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. *J Clin Oncol* 19:3622–3634.

Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, et al.. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol*. (2009) Dec 20;27(36):6199-206.

Bandarchi B, Ma L, Navab R, Seth A, Rasty G. From melanocyte to metastatic malignant melanoma. *Dermatol Res Pract*. 2010;2010. pii: 583748. Epub 2010 Aug 11.

Botteri E, Sandri MT, Bagnardi V, et al. Modeling the relationship between circulating tumour cells number and prognosis of metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2010 Jul;122(1):211-7.

Boyle GM. Therapy for metastatic melanoma: an overview and update.

Expert review of anticancer therapy. 2011 May;11(5):725-37.

Burg G, Nestle F, Dummer R: Neue Erkenntnisse zum malignen Melanom. Deutsches Ärzteblatt 94: A-1191 (1997).

Chi M, Dudek AZ. Vaccine therapy for metastatic melanoma: systematic review and meta-analysis of clinical trials. *Melanoma Res.* 2011 Jun;21(3):165-74.

Coulie PG, Brichard V, Van Pel A, et al. . A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J Exp Med.* 1994 Jul 1;180(1):35-42.

Cust AE, Jenkins MA, Goumas C, Armstrong BK et al. Early-life sun exposure and risk of melanoma before age 40 years. *Cancer Causes Control.* 2011 Jun;22(6):885-97.

Danova M, Torchio M, Mazzini G. Isolation of rare circulating tumor cells in cancer patients: technical aspects and clinical implications. *Expert Rev Mol Diagn.* 2011 Jun;11(5):473-85. doi: 10.1586/ERM.11.33.

Dumitrascu G, Constantin C, Manda G, Hristescu S, Margaritescu I, Chirita D, Neagu M. Serum markers in skin melanoma--preliminary study (2009). *Roum Arch Microbiol Immunol* 68: 125-135

Dummer R, Hauschild A, Guggenheim M, Jost L, Pentheroudakis G; Melanoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2010 May;21 Suppl 5:v194-7.

Eigentler TK, Radny P, Hauschild A, Gutzmer R, Linse R, Pföhler C, Wagner SN, Schadendorf D, Ellwanger U, Garbe C; German Dermatologic Cooperative Oncology Group. Adjuvant treatment with vintedine in comparison to observation alone in patients with metastasized melanoma after complete metastasectomy: a randomized multicenter trial of the German Dermatologic Cooperative Oncology Group. *Melanoma Res.* 2008 Oct;18(5):353-8.

Egberts F, Momkvist A, Egberts JH, Kaehler KC, Hauschild A. Serum S100B and LDH are not useful in predicting the sentinel node status in melanoma patients. *Anticancer Res.* 2010 May;30(5):1799-805.

Eggermont AM, Robert C. New drugs in melanoma: it's a whole new world. *Eur J Cancer*. 2011 Sep;47(14):2150-7. Epub 2011 Jul 27.

Enk CD, Lotem M, Gimon Z, Hochberg M. Molecular detection of MART-1, tyrosinase and MIA in peripheral blood, lymph nodes and metastatic sites of stage III/IV melanoma patients (2004). *Melanoma Res*. 2004 Oct;14(5):361-5.

Garbe C, Schadendorf D, Surveillance and follow-up examinations in cutaneous melanoma. *Onkologie*. 2003 Jun;26(3):241-6.

Garbe C, Terheyden P, Keilholz U, Kölbl O, Hauschild A. Treatment of melanoma. *Dtsch Arztebl Int*. 2008 Dec;105(49):845-51.

Garbe C, Leiter U. Melanoma epidemiology and trends. Division of Dermato-oncology, Eberhard Karls-University, 72076 Tuebingen, Germany. *Clinics in Dermatology*, 2009 Jan-Feb;27(1):3-9.

Garbe C, Eigentler TK, Keilholz U, Hauschild A, Kirkwood JM. Systematic review of medical treatment in melanoma: current status and future prospects. *Oncologist*. 2011;16(1):5-24.

Garnier JP, Letellier S, Cassinat B, Lebbe C, Kerob D, Baccard M, Morel P, Basset-Seguin N, Dubertret L, Bousquet B, Stoitchkov K, Le Bricon T. Clinical value of combined determination of plasma L-DOPA/tyrosine ratio, S100B, MIA and LDH in melanoma (2007). *Eur J Cancer* 43: 816-821

Gerges N, Rak J, Jabado N. New technologies for the detection of circulating tumour cells. *Br Med Bull*. 2010;94:49-64.

Gilles C, Collignon J, Noël A, Jerusalem G, Foidart JM. Circulating tumor cells: detection, characterization and clinical impact]. *Rev Med Liege*. 2011 May-Jun;66(5-6):279-84.

Gradilone A, Cigna E, Aglianò AM, Frati L. 2010. Tyrosinase expression as a molecular marker for investigating the presence of circulating tumor cells in melanoma patients. *Curr Cancer Drug Targets*. 2010 Aug;10(5):529-38.

Gogas H, Kefala G, Bafaloukos D, Frangia K, et al. Prognostic significance of the sequential detection of circulating melanoma cells by RT-PCR in high-risk melanoma patients receiving adjuvant interferon. *Br J Cancer*. 2002 Jul 15;87(2):181-6.

Hamid O, Boasberg PD, Rosenthal K, O'Day SJ. Systemic treatment of metastatic melanoma: new approaches. *J Surg Oncol*. 2011 Sep;104(4):425-9.

Hayes DF, Smerage JB. Circulating tumor cells. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2010;95:95-112.

Hofmann MA, Gussmann F, Fritsche A, Biesold S, Schicke B, Kuchler I, Voit C, Trefzer U. Diagnostic value of melanoma inhibitory activity serum marker in the follow-up of patients with stage I or II cutaneous melanoma (2009). *Melanoma Res* 19: 17-23

Joose A, de Vries E, Eckel R, Nijsten T, Eggermont AM, Hölzel D, Coebergh JW, Engel J. Gender differences in melanoma survival: female patients have a decreased risk of metastasis. *J Invest Dermatol*. 2011 Mar;131(3):719-26. Epub 2010 Dec 9.

Jost M, Day JR, Slaughter R, Koreckij TD, et al. Molecular assays for the detection of prostate tumor derived nucleic acids in peripheral blood. *Mol Cancer*. 2010 Jul 2;9:174.

Kaatsch P, Spix C, Katalinic A, Hentschel S, Baras N, Barnes B, et al. (2012) Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes - Krebs in Deutschland 2007/2008. RKI.

Katsuno H, Zacharakis E, Aziz O, Rao C, Deeba S, et al. Does the presence of circulating tumor cells in the venous drainage of curative colorectal cancer resections determine prognosis? A meta-analysis. *Ann Surg Oncol*. 2008 Nov;15(11):3083-91. Epub 2008 Sep 12.

Kawakami Y, Eliyahu S, Delgado CH, Robbins PF, et al. Cloning of the gene coding for a shared human melanoma antigen recognized by autologous T cells infiltrating into tumor. *D Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Apr 26;91(9):3515-9.

Keilholz U. New prognostic factors in melanoma: mRNA tumour markers. *Eur J Cancer*. 1998 Jul;34 Suppl 3:S37-41.

Keilholz U, Kleeberg U, Melanom, 2004 Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie.

- Keilholz U, Punt CJ, Gore M, Kruit W. et al. Dacarbazine, cisplatin, and interferon-alfa-2b with or without interleukin-2 in metastatic melanoma: a randomized phase III trial (18951) of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer Melanoma Group. *J Clin Oncol.* 2005 Sep 20;23(27):6747-55.
- Kluger HM, Hoyt K, Bacchiocchi A, Mayer T, Kirsch J, Kluger Y, Sznol M, Ariyan S, Molinaro A, Halaban R. Plasma markers for identifying patients with metastatic melanoma. *Clin Cancer Res.* 2011 Apr 15;17(8):2417-25.
- Kostler WJ, Brodowicz T, Hejna M, Wiltschke C, Zielinski CC. Detection of minimal residual disease in patients with cancer: a review of techniques, clinical implications, and emerging therapeutic consequences. *Cancer Detect Prev* 2000; 24: 376-403.
- Kounalakis N, Goydos JS. Tumor cell and circulating markers in melanoma: diagnosis, prognosis, and management. *Curr Oncol Rep.* 2005 Sep;7(5):377-82.
- Koyanagi K, O'Day SJ, Gonzalez R, et al. Serial monitoring of circulating melanoma cells during neoadjuvant biochemotherapy for stage III melanoma: outcome prediction in a multicenter trial. *J Clin Oncol* 2005;23:8057-64.
- Kudchadkar R. Novel targeted therapies for the treatment of metastatic melanoma. *Ochsner J.* 2010 Summer;10(2):117-24.
- Ma J, Lin JY, Alloo A, Wilson BJ, Schatton T, Zhan Q, Murphy GF, et al. Isolation of tumorigenic circulating melanoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 Nov 26;402(4):711-7. Epub 2010 Oct 25.
- Mavroudis D. Circulating cancer cells. *Ann Oncol.* 2010 Oct;21 Suppl 7:vii95-100.
- Mathieu D, Kondziolka D, Cooper PB, Flickinger JC, Niranjan A, Agarwala S, Kirkwood J, Lunsford LD. Gamma knife radiosurgery in the management of malignant melanoma brain metastases. *Neurosurgery.* 2007 Mar;60(3):471-81; discussion 481-2.
- Meier F, Will S, Ellwanger U, Schlagenhauff B, Schitteck B, Rassner G, Garbe C. Metastatic pathways and time courses in the orderly progression of cutaneous melanoma. *Br J Dermatol.* 2002 Jul;147(1):62-70.

Miller MC, Doyle GV, Terstappen LW. Significance of Circulating Tumor Cells Detected by the CellSearch System in Patients with Metastatic Breast Colorectal and Prostate Cancer. *J Oncol*. 2010;2010:617421.

Mocellin S, Keilholz U, Rossi CR, Nitti D. Circulating tumor cells: the 'leukemic phase' of solid cancers. *Trends Mol Med* 2006;12:130-9.

Mocellin S, Pasquali S, Rossi CR, Donato D. Interferon Alpha Adjuvant Therapy in Patients With High-Risk Melanoma: A Systematic Review and Meta-analysis. *JNCI J Natl Cancer Inst* (2010) 102 (7): 493-501.

Mocellin S, Zavagno G, Nitti D. The prognostic value of serum S100B in patients with cutaneous melanoma: a meta-analysis (2008). *Int J Cancer* 123: 2370-2376

Mouawad R, Spano JP, Khayat D. Old and new serological biomarkers in melanoma: where we are in 2009. *Melanoma Res*. 2010 Apr;20(2):67-76.

Mullis KB: The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am* 262: 56-61 (1990)

Olavarria E., Kanfer E., Szydlo R., Kaeda J., et al. Early detection of BCR-ABL transcripts by quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction predicts outcome after allogeneic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia. *Blood*, 97: 1560-1565, 2001

Osella-Abate S, Savoia P, Quaglino P, Fierro MT, et al. Tyrosinase expression in the peripheral blood of stage III melanoma patients is associated with a poor prognosis: a clinical follow-up study of 110 patients. (2003) *Br J Cancer*. 2003 Oct 20;89(8):1457-62.

Palermo B, Del Bello D, Sottini A, et al. Dacarbazine treatment before peptide vaccination enlarges T-cell repertoire diversity of melan-a-specific, tumor-reactive CTL in melanoma patients. *Cancer Res*. 2010 Sep 15;70(18):7084-92.

Palmieri G, Ascierto PA, Perrone F, Satriano SM, et al. Prognostic value of circulating melanoma cells detected by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Oncol*. 2003 Mar 1;21(5):767-73.

Paterlini-Bréchet P. Organ-specific markers in circulating tumor cell screening: an early indicator of metastasis-capable malignancy. *Future Oncol.* 2011 Jul;7(7):849-71.

Petrella T, Quirt I, Verma S, Haynes AE, Charette M, Bak K; Members of the Melanoma Disease Site Group of Cancer Care Ontario's Program in Evidence-Based Care. Single-agent interleukin-2 in the treatment of metastatic melanoma. *Curr Oncol.* 2007 Feb;14(1):21-6.

Raynor MP, Stephenson SA, Pittman KB, Walsh DC, Henderson MA, Dobrovic A. Identification of circulating tumour cells in early stage breast cancer patients using multi marker immunobead RT-PCR. *J Hematol Oncol.* 2009 Jun 5;2:24.

Ribas A, Hersey P, Middleton MR, Gogas HJ, Flaherty KT, et al. New challenges in endpoints for drug development in advanced melanoma. *Clin Cancer Res.* 2011 Dec.

Riker AI, Zea N, Trinh T. The epidemiology, prevention, and detection of melanoma. *Ochsner J.* 2010 Summer;10(2):56-65.

Rutkowski P, Nowecki ZI, Zdzienicki M, Michej W, Symonides M, Rosinska M, Dziewirski W, Bylina E, Ruka W. Cutaneous melanoma with nodal metastases in elderly people. *nt J Dermatol.* 2010 Aug;49(8):907-13.

Roberts W. M., Estrov Z., Ouspenskaia M. V., Johnston D. A., McClain K. L., Zipf T. F. Measurement of residual leukemia during remission in childhood acute lymphoblastic leukemia. *N. Engl. J. Med.*, **336**: 317-323, 1997.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N: Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354 (1985).

Sastre J, Maestro ML, Puente J, Veganzones S, et al.. Circulating tumor cells in colorectal cancer: correlation with clinical and pathological variables. *Ann Oncol.* 2008 May;19(5):935-8.

Sekulic A, Haluska P Jr, Miller AJ, Genebriera De Lamo J, et al. Malignant melanoma in the 21st century: the emerging molecular landscape. *Mayo Clin Proc.* 2008 Jul;83(7):825-46.

Schlesinger-Raab A, Schubert-Fritschle G, Hein R, Stolz W, Volkenandt M, Hölzel D, Engel J. Quality of life in localised malignant melanoma. *Ann Oncol*. 2010 Dec;21(12):2428-35.

Smith B, Selby P, Southgate J, Pittman K, Bradley C, Blair GE. Detection of melanoma cells in peripheral blood by means of reverse transcriptase and polymerase chain reaction. *Lancet*. 1991 Nov 16;338(8777):1227-9.

Stathopoulou A, Vlachonikolis I, Mavroudis D, et al. "Molecular detection of cytokeratin-19-positive cells in the peripheral blood of patients with operable breast cancer: evaluation of their prognostic significance." *J Clin Oncol* 20(16): 3404-12.

Steen S, Nemunaitis J, Fisher T, Kuhn J. Circulating tumor cells in melanoma: a review of the literature and description of a novel technique. *Proc (Bayl Univ Med Cent)*. 2008 Apr;21(2):127-32.

Stott SL, Lee RJ, Nagrath S, et al. Isolation and characterization of circulating tumor cells from patients with localized and metastatic prostate cancer. *Sci Transl Med*. 2010 Mar 31;2(25):25ra23.

Solassol J, Guillot B, Maudelonde T. Circulating prognosis markers in melanoma: proteomic profiling and clinical studies. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2011 Mar-Apr;69(2):151-7.

Solassol J, Du-Thanh A, Maudelonde T, Guillot B. Serum proteomic profiling reveals potential biomarkers for cutaneous malignant melanoma. *Int J Biol Markers*. 2011 Apr-Jun;26(2):82-7.

Sonesson B, Eide S, Ringborg U, Rorsman H, Rosengren E: Tyrosinase activity in the serum of patients with malignant melanoma. *Melanoma Res* 5: 113-116 (1995).

Tanaka R, Koyanagi K, Narita N, Kuo C, Hoon DS. Prognostic molecular biomarkers for cutaneous malignant melanoma. *J Surg Oncol*. 2011 Sep;104(4):438-46.

Tawbi HA, Buch SC. Chemotherapy resistance abrogation in metastatic melanoma. *Clin Adv Hematol Oncol*. 2010 Apr;8(4):259-66.

Tejera-Vaquerizo A, Barrera-Vigo MV, Fernández-Canedo I, Blázquez-Sánchez N et al. Longitudinal study of different metastatic patterns in the progression of cutaneous melanoma. *Actas Dermosifiliogr*. 2007 Oct;98(8):531-8.

Toutenburg, Deskriptive Statistik: Eine Einführung in Methoden und Anwendungen mit R und SPSS Springer Berlin Heidelberg; Auflage: 7., aktual. u. erw. Aufl. 2009-ISBN-10: 3642018343

Vaubel J, Schadendorf D. State-of-the-art pharmacotherapy of malignant melanoma. Internist (Berl). 2011 Jun;52(6):756-764.

Vendittelli F, Santonocito C, Paradisi A, Romitelli F, et al. A new standardized absolute quantitative RT-PCR method for detection of tyrosinase mRNAs in melanoma patients: technical and operative instructions. Clin Chim Acta. 2009 Nov;409(1-2):100-5.

Vendittelli F, Santonocito C, Paradisi A, Romitelli F, Concolino P, Silveri SL, Sisto T, Capizzi R, Categoricalà C, Mulè A, Di Carlo A, Zuppi C, Capoluongo E.

Visús C, Andres R, Mayordomo JI, Martinez-Lorenzo MJ, et al. Prognostic role of circulating melanoma cells detected by reverse transcriptase-polymerase chain re-action for tyrosinase mRNA in patients with melanoma. Melanoma Res. 2007 Apr;17(2):83-9.

Voit C, Kron M, Rademaker J, Schwürzer-Voit M, Sterry W, Weber L, Ozdemir C, Proebstle T, Keilholz U. Molecular staging in stage II and III melanoma patients and its effect on long-term survival. J Clin Oncol. 2005 Feb 20;23(6):1218-27.

de Vries TJ, Fourkour A, Punt CJ, van de Locht LT, et al. Reproducibility of detection of tyrosinase and MART-1 transcripts in the peripheral blood of melanoma patients: a quality control study using real-time quantitative RT-PCR. Br J Cancer. 1999 May;80(5-6):883-91.

Wang TS, Johnson TM, Cascade PN, Redman BG, Sondak VK, Schwartz JL. Evaluation of staging chest radiographs and serum lactate dehydrogenase for localized melanoma (2004b). J Am Acad Dermatol 51: 399-405

Weight RM, Dale PS, Viator JA. Detection of circulating melanoma cells in human blood using photoacoustic flowmetry. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc. 2009;2009:106-9.

DANKSAGUNG

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Keilholz für die Überlassung des Themas und für die Möglichkeit, diese Arbeit in der Abteilung der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie der Charité Campus Benjamin Franklin durchführen zu können.

Ich danke dem Labor Prof. Dr. med. Ulrich Keilholz für die Durchführung und Überlassung der Laborwerte und die Benutzung der Ergebnisse der Blutproben und RT-PCR Analysen.

Ein besonderer Dank gilt Frau Dr. Dr. Ronny Schuster für die hervorragende Unterstützung und Betreuung meiner Doktorarbeit.

Insbesondere danke ich Can, Ben, Lui und meiner Ehefrau Stefanie Erdogan für das Verständnis und die Unterstützung. Diese Arbeit widme ich meinen Eltern.

LEBENS LAUF

"Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht."

ERKLÄRUNG ZUR DISSERTATION

„Ich, Erhan Erdogan, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:
Prognostische Bedeutung zirkulierender Tumorzellen bei Patienten mit malignem Melanom,
selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne
die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dar-
gestellt habe.“

Datum 27.11.2012

Unterschrift