

1. Einleitung

1.1 Das maligne Melanom

In den letzten Jahrzehnten zeigt das maligne Melanom trotz umfangreicher öffentlicher Aufklärungsarbeit weltweit eine dramatische Inzidenz- und Mortalitätszunahme (Sebastian et al. 2000, Burg et al. 1997, Garbe et al. 2003). Die Ursache dafür ist derzeit nur teilweise bekannt, was zu einem wachsenden Interesse an diesem Tumor, der zu den bösartigsten aller Hauttumoren zählt, führt. Eine Vielzahl von klinisch-epidemiologischen Studien und Untersuchungen beschäftigt sich mit dem Krankheitsverlauf, möglichen prognostischen Faktoren und neuen Therapieverfahren mit vordringlicher Aufgabe, Patienten mit hohem Metastasierungsrisiko zu identifizieren und wirksamere Therapieschemata zu entwickeln.

1.1.1 Epidemiologie

Das maligne Melanom stellt in der Bundesrepublik Deutschland ca. 1,9% aller malignen Neuerkrankungen dar. Eine deutliche Zunahme der Inzidenz des malignen Melanoms wurde in Deutschland von ca. 3 Neuerkrankten pro 100.000 Einwohner jährlich in den 70er Jahren auf ca. 10 bis 12 Neuerkrankten pro 100.000 Einwohner jährlich in den 90er Jahren beobachtet (Garbe et al. 2001). In Regionen mit stärkerer UV-Belastung (Australien, südliche USA) wurden sogar bis etwa 60 Neuerkrankte pro 100.000 Einwohner pro Jahr registriert (Boyle et al. 1995; Elder et al. 1995, Garbe et al. 2000, Garbe et al. 2001).

Ebenfalls bedrohlich steigt die Mortalität des malignen Melanoms. Für die Bundesrepublik Deutschland wurde seit den 50er Jahren eine jährliche Anstiegsrate von 3% ermittelt. Dies entspricht einer Verdoppelung der Mortalität innerhalb von 30 Jahren (Garbe et al. 1986). Die Mortalitätsrate des malignen Melanoms in Deutschland in den 90er Jahren betrug 3,2, bzw. 2,0 Todesfälle (m/w) pro 100.000 Einwohner (Garbe et al. 2000, Garbe et al. 2001).

1.1.2 Klinisch-histologische Subtypen

Das maligne Melanom ist ein Tumor, der in über 90% der Fälle von den Melanozyten der basalen Epidermisschichten ausgeht. Er entwickelt sich entweder de novo auf normaler Haut, auf kongenitalen oder erworbenen Naevuszellnaevi oder auf dem Boden einer Lentigo maligna (Braun-Falco et al. 1986). Seltener entstehen Melanome aus Pigmentzellen der Schleimhäute, der Leptomeningen, der Retina, der Kochlea, dem vestibulären Labyrinth des inneren Ohres und des Gastrointestinaltrakts (Hein et al. 2000).

Klinisch und histologisch lassen sich 4 Subtypen des malignen Melanoms unterscheiden:

Superfiziell-spreitendes Melanom (SSM)

- flach, später auch knotig
- zentrifugale Ausbreitungstendenz
- Häufigkeit ca. 60%
- mittleres Erkrankungsalter ca. 50 Jahre

Noduläres Melanom (NM)

- Knotenbildung, frühzeitige Invasion in die Dermis
- vertikale Ausbreitungstendenz
- Häufigkeit ca. 20%
- mittleres Erkrankungsalter ca. 55 Jahre

Lentigo-maligna-Melanom (LMM)

- Entwicklung aus einer Lentigo maligna
- Häufigkeit ca. 10%
- mittleres Erkrankungsalter ca. 65 Jahre

Akrolentiginöses Melanom (ALM)

- Lokalisation an Palmae und Plantae oder subungual und periungual
- zentrifugale, dann vertikale Ausbreitungstendenz
- Häufigkeit ca. 5% (häufigste Form in Afrika und Asien (5))
- mittleres Erkrankungsalter ca. 65 Jahre

Sonderformen des malignen Melanoms sind das Melanom auf großen kongenitalen Naevi, naevusassoziiertes Melanom, Schleimhautmelanome, desmoplastische und unklassifizierbare Melanome. Ihr Anteil an allen Melanomen beträgt etwa 5%.

1.1.3 Stadieneinteilung

Zu den wichtigsten prognostischen Kriterien beim malignen Melanom gehören die Tumordicke des primären Melanoms (pT), ein möglicher metastatischer Befall der Lymphknoten (N) und ein mögliches Vorliegen von Fernmetastasen (M). Entsprechend dieser Kriterien erfolgt die im Jahre 1978 eingeführte TNM-Klassifikation (Tabelle 1).

Tabelle 1: TNM-Klassifikation des malignen Melanoms entsprechend der Empfehlung der Kommission Malignes Melanom der Deutschen dermatologischen Gesellschaft (DDG):

pT	Primärtumor	
pT1	Tumordicke $\leq 0,75$ mm	Bei fehlender Angabe zur Tumordicke: Invasionslevel II
pT2	Tumordicke 0,76-1,5 mm	Bei fehlender Angabe zur Tumordicke: Invasionslevel III
pT3	Tumordicke 1,51-4,0 mm	Bei fehlender Angabe zur Tumordicke: Invasionslevel IV
pT4	Tumordicke > 4 mm	Bei fehlender Angabe zur Tumordicke: Invasionslevel V
pTa	Satellitenmetastasen innerhalb von 2 cm vom Primärtumor (bzw. Lokalrezidiv nach Entfernung mit Sicherheitsabstand)	
pTb	In-transit-Metastasen vor der regionären Lymphknotenstation	
N	Regionäre Metastasen (regionäre Lymphknoten)	
N1	Metastasen ≤ 3 cm in regionären Lymphknoten	
N2	Metastasen > 3 cm in regionären Lymphknoten	
M-	Fernmetastasen	
M1(a)	Befall von Haut, Subkutis, oder Lymphknoten jenseits der regionären LK	
M2 (b)	VisViszerale Metastasen	

Einleitung

Die Tumoreindringtiefe (pT) lässt sich mit Hilfe des Breslow-Index, bzw. des Clark-Levels bestimmen.

Mit der Ende der 60er Jahre von Clark entwickelten Methode wird die Eindringtiefe des Tumors relativ an den betroffenen anatomischen Hautschichten gemessen (Clark 1967). Allerdings ist die Haut von verschiedenen Personen und an verschiedenen Körperregionen unterschiedlich dick, so dass die einzelnen Level bei unterschiedlichen Menschen an verschiedenen Körperregionen nicht vergleichbar sind (Tabelle 2).

Tabelle 2: Tumoreindringtiefe nach Clark:

Level I	Tumorzellen ausschließlich in der Epidermis
Level II	Tumorzellen durch Basalmembran bis in das Stratum papillare
Level III	Tumorzellen im oberen Korium bis zur Grenzzone vom Stratum reticulare
Level IV	Tumorzellen im mittleren und unteren Korium
Level V	Tumorzellen im subkutanen Fettgewebe

Nach den von Breslow entwickelten Kriterien erfolgt eine vertikale Messung vom obersten Niveau des Stratum granulosum der Epidermis bis zum tiefsten Tumoranteil (Breslow 1970)(Tabelle 3). Die Messung der absoluten maximalen Tumordicke nach Breslow ist gegenüber der Messung der Tumoreindringtiefe aussagekräftiger, weil sie von den regionalen und persönlichen Kaliberschwankungen der Haut unabhängig ist. Es ist aber ratsam in bestimmten Situationen auch die Tumoreindringtiefe nach Clark anzugeben (z.B. ein malignes Melanom des Levels IV in dünner Haut hat eine geringe Eindringtiefe, ist aber trotzdem prognostisch ungünstig).

Tabelle 3: Tumordicke des Primärtumors nach Breslow:

pT	Primärtumor
pT1	Tumordicke $\leq 0,75$ mm
pT2	Tumordicke 0,76-1,5 mm
pT3	Tumordicke 1,51-4,0 mm
pT4	Tumordicke > 4 mm

Für die Therapieplanung, Prognose und statistische Vergleichbarkeit sind bei jedem Patienten eine Abschätzung der Tumorausbreitung und eine Einordnung entsprechend einer

Klassifikation erforderlich. Es existiert eine Reihe von Schemata zur Klassifikation. In Deutschland hat sich eine Klassifikation entsprechend der von der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Onkologie (ADO) und der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft (DDG) im Jahre 1994 empfohlenen differenzierten klinischen Stadieneinteilung bewährt (Tabelle 4). Diese erfolgt entsprechend der Tumordicke. Darauf beruhen sowohl die T-Kategorien der TNM-Einteilung der UICC (Union International Contre le Cancer) von 1987, als auch der modifizierten TNM-Stadieneinteilung nach den Empfehlungen der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft. Die beiden wesentlichen Unterschiede sind eine zusätzliche Berücksichtigung eines Invasionslevels nach Clark und keine gesonderte Erfassung von Satelliten- oder In-transit-Metastasen bei der UICC-Klassifikation.

Tabelle 4: Klinische Stadieneinteilung entsprechend der Empfehlung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Onkologie und der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft:

Stadium	pT	N	M
Stadium Ia	pT1	N0	M0
Stadium Ib	pT2	N0	M0
Stadium IIa	pT3	N0	M0
Stadium IIb	pT4	N0	M0
Stadium IIIa	pTa, pTb	N0	M0
Stadium IIIb	Jedes pT	N1, N2	M0
Stadium IV	Jedes pT	Jedes N	M1

Die neue Klassifikation des American Joint Committee on Cancer von 2001 berücksichtigt die prognostisch relevanten Faktoren und technologischen Fortschritte in der Tumorausbreitung und teilt die Patienten nach folgenden Risikofaktoren ein:

Histologie des Primärtumor (Tumordicke nach Breslow, Ulzeration)

Status des Schildwächterlymphknotens (negativ, Mikro-/Makrometastase)

Zahl der regionalen Lymphknotenmetastasen

Vorliegen von in-transit Metastasen (zwischen Primärtumor und regionärer Lymphknotenstation) und/oder Satellitenmetastasen (im Umkreis von 2cm um den Primärtumor)

Vorliegen von Fernmetastasen

1.1.4 Prognostische Faktoren

In einer im Jahre 1995 veröffentlichten multizentrischen, kooperativen Studie des Zentralregisters Malignes Melanom in Berlin, an der vier deutsche Hautkliniken teilnahmen und die mehr als 5 000 Melanomfälle umfasste, erwiesen sich vier Faktoren als hochsignifikant für die Prognose primärer Melanome (Garbe et al. 1995 a und b):

1. Tumordicke nach Breslow
2. Geschlecht
3. Tumorlokalisation
4. Invasionslevel nach Clark

ad 1.) Die vertikale Tumordicke nach Breslow gilt als wichtigster prognostischer Faktor des primären Melanoms. Zwischen Tumordicke und dem Risiko der Entwicklung von Metastasen wurde bis zu einer Tumordicke von 6 mm eine ungefähr lineare Korrelation festgestellt. Die 10-Jahres-Überlebensrate bei Tumoren mit einer Tumordicke von weniger als 0,75 mm beträgt ca. 97%, bei einer Tumordicke zwischen 0,76-1,5 mm ca. 90%, zwischen 1,51-4,0 mm ca. 67% und bei mehr als 4,0 mm Tumordicke nur noch ca. 43% (Orfanos et al. 1994).

ad. 2.) Männer haben eine deutlich schlechtere Prognose bei ansonsten vergleichbaren Prognosefaktoren.

ad. 3.) Die anatomische Lokalisation des Primärtumors ist ein weiteres prognostisches Kriterium. Melanome im Bereich des oberen Stammes, der Oberarme, des Halses und des behaarten Kopfes haben eine ungünstige Prognose (TANS= thorax, arm, neck, scalp (siehe Tabelle 5.))

ad. 4.) Das Invasionslevel nach Clark (insbesondere die Unterscheidung zwischen Level II und III) ist für dünne Tumoren von prognostischer Bedeutung.

Einleitung

Weitere prognostische Faktoren wie das Alter (ungünstigere Prognose für ältere Menschen), der histologische Typ (das noduläre Melanom erwies sich als prognostisch ungünstig) und der histologische Befund einer Ulzeration (prognostisch ungünstig) sind auf einem niedrigeren Signifikanzniveau prognostisch relevant (Sebastian et al. 2000).

Die individuelle Prognose für den einzelnen Melanompatienten hängt in erster Linie von der Ausbreitung des Tumors ab. Das primäre Melanom metastasiert in ca. 70% der Fälle lymphogen und nur in ca. 30% hämatogen.

Tabelle 5: Prognostische Risikogruppen beim malignen Melanom (Orfanos et al. 1995). Lokalisation TANS: upper Trunk, upper Arm, Neck, Scalp:

Risiko	Männer	Frauen	5-Jahres-Über- Lebensrate (%)	10-Jahres-Über- Lebensrate (%)
Sehr niedrig	≤ 1mm + Clarklevel II	≤ 1mm	99 (98,2-99,8)	97 (95,2-98,8)
Niedrig	≤ 1mm + Clarklevel >III	1,01-2 mm	92 (90,0-94,0)	87 (83,6-90,4)
Mittel	1,01-2 mm (außer NM)	2,01-4 mm (außer TANS)	83 (79,8-86,2)	74 (69,2-78,8)
Hoch	1,01-2 mm + NM 2,01-4 mm >4 mm + Lokalisa- tion außer TANS	2,01-4 mm+ TANS >4 mm	65 (61,1-68,4)	55 (50,4-59,6)
Sehr hoch	>4 mm + TANS		39 (29,0-49,0)	14 (0,8-27,2)

1.1.5 Staging

Ziel der Diagnostik beim malignen Melanom ist die genaue Bestimmung der Größe und Ausbreitung des Primärtumors, der möglichen Metastasierung in die Lymphknoten und weitere Organe, mit Bedeutung für die Therapieplanung, Prognose und statistische Vergleichbarkeit.

In Deutschland hat sich ein standardisiertes Stagingprogramm bewährt, dem alle Patienten mit primärem und metastasiertem Melanom zugeführt werden (Tabelle 6).

Beim Verdacht auf eine Metastasierung des Primärtumors werden zusätzlich zur Primärdiagnostik Knochenszintigraphie, entsprechendes kraniales CT, bzw. MRT durchgeführt.

Tabelle 6: Routineuntersuchungsdiagnostik beim malignen Melanom (Garbe et al. 1997):

Routineausbreitungsdiagnostik und Befunddokumentation beim malignen Melanom
Lymphknotenultraschall
Röntgenthorax
Oberbauchultraschall oder Computertomographie des Abdomens
bei Tumoren mit höherem Metastasierungsrisiko (Tumordicke >1,5 mm):
kraniales CT oder MRT
Blutuntersuchung:
Blutbild und Differentialblutbild
Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit
GOT
GPT
GT
LDH
Kreatinin
Harnstoff

1.2 Nachweis zirkulierender Tumorzellen beim malignen Melanom

1.2.1 Historische Daten

Ein wesentliches Problem in der Nachsorge der Melanompatienten ist die Diagnostik des frühen Metastasierungsstadiums (insbesondere bei Patienten, die sich in einem fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung befinden, ist die Prognose durch eine drohende Fernmetastasierung drastisch verschlechtert). Viele wissenschaftliche Studien bemühen sich, Untersuchungsverfahren zum Nachweis von Mikrometastasen im Blut zu entwickeln, um eine Progression der Erkrankung frühzeitig zu erkennen.

Im Jahre 1962 wurden erste Versuche unternommen, Tumorzellen mittels zytologischer Techniken im Blutaussstrich mikroskopisch nachzuweisen (Nadel 1962). Diese Methode lieferte ungenaue Ergebnisse. In verschiedenen Studien wurden Nachweisraten zwischen 0% und 100% festgestellt. Diese Methode ließ sich bei niedriger Sensitivität (hohe Rate falsch negativer Testergebnisse) und geringer Spezifität (hohe Rate falsch positiver Testergebnisse) nicht etablieren.

Anfang der 80er Jahre ermöglichte die Entwicklung immunzytochemischer Methoden den Nachweis von Tumorzellen unter 10.000 bis 100.000 mononukleären Zellen. Voraussetzung dafür war die Verfügbarkeit spezifischer Antikörper gegen tumorspezifische Zelloberflächenantigene. Immunzytologische Verfahren werden seit Jahren erfolgreich zum möglichen Nachweis von Mikrometastasen bei Patienten mit Bronchial-Ca (Stahel et al. 1985), Mamma-Ca (Redding et al. 1983) und Neuroblastom (Moos et al. 1990) in Blut und Knochenmark eingesetzt. Mit dem Nachweis von 2 Tumorzellen unter 100.000 mononukleären Zellen wurde die höchste Sensitivität bei Neuroblastompatienten erreicht.

Bei Tumormarkern handelt es sich zumeist um im Blutkreislauf oder in anderen Körperflüssigkeiten befindliche tumorassoziierte Proteine. Diese Proteine werden von den malignen transformierten Zellen synthetisiert und sezerniert, durch Tumorzerfall freigesetzt oder als Reaktion des Körpers auf den Tumor gebildet. Ihr Auftreten und Konzentrationsänderungen signalisieren die mögliche Entstehung oder Wachstum maligner

Tumore. Physiologischerweise werden die Proteine zum Teil auch von normalen Zellen gebildet, kommen dann aber in wesentlich niedrigeren Konzentrationen vor.

Der einzige Marker, der bisher weltweiten Einsatz zum Screening eines Tumors gefunden hat, ist das Prostata-spezifische Antigen (PSA). Eine weite Verbreitung bekamen aufgrund ihrer Sensitivität und Spezifität auch das karzino-embryonale Antigen (CEA) beim Kolonkarzinom und der Marker CA15-3 beim Mammakarzinom. Diese Tumormarker wurden in den Richtlinien der American Society of Clinical Oncology (ASCO) von 1996 und der European Group on Tumor Markers (EGTM) ausdrücklich empfohlen.

Für das maligne Melanom ist ein solcher tumorspezifischer Marker trotz großer Anstrengungen bisher nicht etabliert. Die Versuche, Metaboliten des Melaninstoffwechsels, wie z.B. das 5-S-Cysteinyl-dopa (5-S-CD), den Hauptvorläufer des gelb-roten Phäomelanins, im Urin und im Serum der Melanompatienten nachzuweisen, wurden wieder verlassen. Ein Grund dafür ist, dass der Spiegel dieses Moleküls erst bei weit fortgeschrittenen Stadien des Melanoms erhöht ist und hohe Spiegelwerte auch bei einer unspezifischen Aktivierung des Pigmentsystems, z.B. durch eine UV-Belastung, dokumentiert sind (Peterson et al. 1988; Wakamatsu et al. 1995).

Weitere Marker, wie das melanozytenstimulierende Hormon (α -MSH) und 6-Hydroxy-5-Methoxyindol-2-Carbonsäure (6H5MI2C), Indolderivat und Metabolit des braunschwarzen Eumelanins, zeigten ebenfalls keine ausreichende Korrelation mit dem Krankheitsverlauf (Schwartz et al. 1994).

Das lösliche Intercellular Adhesion Molekule-1 (sICAM-1), Interleukine (IL-8, IL-10), Neuronenspezifische Enolase (NSE), Lipid bound sialic acid (LSA) und die Serum-Mangan-Superoxid-Dismutase (MnSOD) wurden evaluiert, haben aber wegen fehlender Sensitivität und Spezifität hinsichtlich des Melanoms keine klinische Anwendung gefunden.

1.2.2 Experimentelle, serologische Marker.

1.2.2.1 S-100.

S-100 ist ein saures, thermolabiles, kalziumbindendes, 21-Kilo Dalton (kDa) großes Protein. Erstmals wurde S-100 im zentralen Nervensystem von Vertebraten isoliert (Moore 1965). Es besteht als Dimer aus den 2 isomeren Untereinheiten α und β . Das Molekulargewicht der α -Untereinheit ist 10,4 kDa und der β -Untereinheit 10,5 kDa. Auftreten können alle 3 möglichen Kombinationen: S-100 $\alpha\alpha$, S-100 $\alpha\beta$ und S-100 $\beta\beta$ (Donato 1991, Kligman et al. 1988). Von der α -Untereinheit sind bisher 13 verschiedene Gene für S-100A1-A13 auf dem Chromosom 1q21 nachgewiesen worden (Isobe et al. 1978, Schäfer et al. 1995, Wicki et al. 1996). Das Gen der β -Untereinheit ist auf dem Chromosom 21 lokalisiert (Allore et al. 1990). Proteine der S-100-Familie sind im Zytoplasma lokalisiert (Nakajima et al. 1982), wo sie als kalziumbindende Proteine für die Signaltransduktion von Differenzierungs- und Proliferationssignalen eine wichtige Rolle spielen (Clapham 1995).

Das S-100-Protein wird unter physiologischen Bedingungen in verschiedenen humanen Geweben nachgewiesen. S-100 $\beta\beta$ wird in hohen Konzentrationen in Gliazellen und Schwannschen Zellen zentraler Neurone exprimiert. S-100 $\alpha\beta$ wurde ebenfalls in Gliazellen nachgewiesen. Das Dimer S-100 $\alpha\alpha$ ist in der quergestreiften Muskulatur, in der glatten Herzmuskulatur und der Niere vorhanden. Beide S-100-Isomere werden außerdem in einigen Tumoren exprimiert, z.B. in Meningiomen, Gliomen, Neurinomen, Schwannomen und Neuroblastomen (Takahashi et al. 1984, Fagnart et al. 1988).

Das Protein S-100 findet sich unter anderem auch in Melanozyten und Keratinozyten. In Melanozyten, junktionalen und dysplastischen junktionalen Naevi ist nur die α -Untereinheit des S-100 vorhanden. Nur das S-100 β -Isomer wird in dermalen Nestern von Compound-, dysplastischen Compound- und in dermalen Naevi exprimiert. S-100 wurde im Jahr 1980 erstmals in humanen Melanomzelllinien entdeckt (Gaynor et al. 1980) und später auch in malignen Melanomen als S-100 $\alpha\beta$ beschrieben (Nakajima et al. 1982, Cho et al. 1990). Heute ist S-100 ein etablierter immunhistopathologischer Marker zur histologischen Sicherung maligner Melanomen. Im Jahr 1988 entdeckten Fagnart et al., dass Patienten mit

einem metastasiertem malignen Melanom erhöhte S-100-Protein-Werte im Serum aufweisen. Seitdem hat S-100 als Serummarker für das maligne Melanom Beachtung gefunden.

Die Bestimmung von S-100 im Serum erfolgt entweder immunradiometrisch oder immunluminometrisch mit Hilfe von immunologischen Assays, die nach dem Sandwichprinzip funktionieren. Die auf dem deutschen Markt gebräuchlichen Systeme IRMA und LIA verwenden 3 monoklonale Antikörper, welche die β -Untereinheit des Proteins S-100 erkennen. Somit werden mit Hilfe dieser Verfahren $\alpha\beta$ -Heterodimere und $\beta\beta$ -Homodimere nachgewiesen. Zwei von den drei Antikörpern befinden sich in der Festphase und werden mit dem Patientenserum inkubiert. Bei dem Verfahren IRMA dient das an den dritten Antikörper gekoppelte, radioaktive I^{125} zur quantitativen Messung. Bei dem weiterentwickelten System LIA wird ein Isoluminol-Tracer zum Sichtbarmachen einer lumineszenzmarkierten Reaktion verwendet.

Umfangreiche Studien zur S-100-Bestimmung stimmten bisher im Wesentlichen in folgenden Punkten überein:

S-100-Serumspiegel bei Patienten im Stadium des Primärtumors (I und II) waren nur gering erhöht (1,3-9% der Patienten) (Guo et al. 1995, Hauschild et al. 1997, Henze et al. 1997, Abraha et al. 1997, Ghanem et al. 1997).

S-100-Serumspiegel bei Patienten im Stadium der lokoregionären Metastasierung (III) (8,7-21,4% der Patienten) und der Fernmetastasierung (67,9-89% der Patienten) waren erhöht (Guo et al. 1995, Hauschild et al. 1997, Henze et al. 1997, Ghanem et al. 1997).

In der Nachbeobachtungszeit wurden bei einer Tumorprogression ansteigende S-100-Werte und bei einer Tumorremission abfallende S-100-Werte beobachtet (Guo et al. 1995, Ghanem et al. 1997).

Schoultz et al. haben 1996 nachgewiesen, dass Patienten mit einem S-100-Serumspiegel, der $>0,3 \mu\text{g/l}$ ist, eine kürzere Gesamtüberlebenszeit aufweisen als andere, die niedrigere Werte haben. Patienten mit einem S-100-Serumspiegel $>0,6 \mu\text{g/l}$ im Stadium III der Erkrankung entwickelten innerhalb von einigen Monaten signifikant häufiger Metastasen als Patienten mit niedrigeren Werten.

Buer et al. (1997) berichteten ebenfalls über eine deutlich reduzierte, mediane Überlebenszeit bei Patienten mit S-100-Serumspiegel $>0,3 \mu\text{g/l}$ (6 Monaten gegenüber 13 Monaten in der Patientengruppe mit S-100-Serumspiegel $<0,3 \mu\text{g/l}$). Bei der Gesamtzahl von 22 Patienten korrelierten die erhöhten S-100-Serumwerte signifikant mit erhöhten LDH-Serumspiegeln. Keine Korrelation bestand dagegen zwischen den erhöhten S-100-Serumwerten und Geschlecht und Alter der Patienten.

Auch von Miliotes et al (1996) wurde eine verkürzte, mediane, rezidivfreie Zeit von 7,6 Monaten bei 32 Patienten mit erhöhten S-100-Serumwerten gegenüber 33,8 Monaten bei 35 Patienten mit normalen S-100-Serumwerten festgestellt. Hauschild et al. (1999) konnten bei Auswertung von 489 Seren von 64 Patienten mit metastasiertem, malignen Melanom eine prognostisch signifikante Korrelation zwischen positiven S100-Werten und Überlebenszeit nachweisen. Eine Reihe von weiteren Autoren hat über die Korrelation zwischen der Menge des messbaren S-100 und der Prognose der Erkrankung berichtet (Bröcker et al. 1997, Schultz et al. 1997, Deichmann et al. 1999). Jäckel et al (1999) konnten allerdings keine Korrelation zwischen der S100-Konzentration und Verlauf der Melanomerkrankung feststellen. Außerdem zeigten bis zu 5% gesunder Probanden erhöhte S100-Werte.

1.2.2.2 MIA

MIA (Melanoma-Inhibitory-Activity) wurde erstmals im Zellkulturüberstand der Melanomzelllinie HTZ-19d nachgewiesen, anlässlich des Versuches, zelleigene Proteine zu isolieren, die Melanomwachstum-inhibierende Aktivität zeigen (Bogdahn et al. 1989). Bis heute sind die humane, murine, bovine und die Ratten-Sequenz des MIA-Gens bekannt.

Das Protein besteht aus 107 Aminosäuren und ist 11 kDa schwer. Das humane MIA-Gen ist auf Chromosom 19q13.32 lokalisiert (Koehler et al. 1996). MIA wird mittels ELISA bestimmt und quantifiziert.

Es wird von Melanomzellen exprimiert und sezerniert. In Normalgewebe wurde eine Expression des MIA nur in differenzierten Knorpelzellen gefunden (Dietz et al. 1996, Bosserhoff et al. 1997). Für eine Expression von MIA in Melanozyten, Fibroblasten und

Keratinocyten gibt es keinerlei Hinweise. In gutartigen melanozytären Naevi findet sich eine schwache bis mittlere MIA-Expression (Bosserhof et al. 1998). Durch die Behandlung mit Retinsäure scheint MIA in Chondrozyten exprimierbar zu sein (Dietz et al. 1996). Auch in einzelnen Karzinomen (Glioblastom, Kolonkarzinom, Mammakarzinom, Magenkarzinom) wurde eine schwache MIA-Expression nachgewiesen (Bosserhoff et al. 1998). Das spricht dafür, dass schwach positive MIA-Werte nicht spezifisch für das maligne Melanom sind.

MIA verhindert durch Inhibition der Zell-Matrix-Bindungen an Laminin und Fibronectin die Adhäsion zwischen Melanomzelle und Matrixproteinen. Die MIA-Expression ermöglicht damit den Tumorzellen das Ablösen von der umgebenden Matrix, wodurch die Metastasierungspotenz des malignen Melanoms deutlich erhöht wird.

Die ersten Ergebnisse zur MIA-Expression bei Melanompatienten mittels eines nichtradioaktiven ELISA wurden von Bosserhoff et al. (1997) veröffentlicht. Erhöhte MIA-Serumwerte wurden bei 13% von 38 Patienten im Stadium I, bei 23% von 13 Patienten im Stadium II, bei 100% von 6 Patienten im Stadium III und bei 100% von 44 Patienten im Stadium IV beobachtet. Dabei bestand keine Korrelation mit der Tumordicke. Von 25 Basaliompatienten, die als Kontrolle dienten, zeigten 16% leicht erhöhte MIA-Werte. Von 10 Patienten mit Zustand nach Exzision von benignen Naevi zeigte ein Patient mit dysplastischem Naevuszellnaevus-Syndroms schwach erhöhte Werte. Auch in 270 Serumproben von Patienten mit epithelialen, mesenchymalen Tumoren sowie Gliomen wurden in einem geringen Anteil positive Werte festgestellt.

Im Rahmen der Tumornachsorge wurden von Bosserhoff et al. (1998) in Serien von 350 Patienten MIA-Werte bestimmt. 32 Patienten zeigten erhöhte MIA-Serumwerte. Davon entwickelten 17 Patienten eine Metastasierung. Bei den MIA-negativen Patienten wurde in keinem Fall eine Metastasierung festgestellt. Bei 8 Patienten im Stadium III, bei denen die Serumwerte vor und nach Exzision der Metastasen bestimmt wurden, sanken in 5 Fällen die Werte signifikant. In 3 weiteren Fällen fielen die Werte auf den Normbereich zurück. All diese Patienten entwickelten bis zu 3 Monaten nach Operation keine Metastasen. Weiterhin wurden 6 Patienten im Stadium IV während kombinierter operativer und

Immunochemotherapie beobachtet. Drei davon, die therapieresistent waren und noch vor Beendigung des Therapiezyklus starben, zeigten kontinuierlich steigende MIA-Serumwerte. Zwei von den 6 Patienten sprachen auf die Therapie an und zeigten eine Reduktion der Serumwerte. Bei einem Patient wurde initial ein Therapieansprechen registriert, es kam aber nach Beendigung des Therapiezyklus zum Rezidiv und somit zu einem Anstieg der MIA-Werte.

Zusammenfassend sind der endgültigen Bewertung der Wertigkeit von MIA als Tumormarker für eine Früherkennung der Tumorprogression und für die Beurteilung der Effektivität einer Therapie weitere prospektive Studien mit größeren Patientenkollektiven von Nöten.

1.2.3 Die Polymerase-Kettenreaktion

Völlig neue Möglichkeiten eröffnete der Nachweis einer Mikrometastasierung im Blut mit der Entwicklung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Saiki et al. 1985). Die Methode wurde 1983 von Kary Mullis entdeckt und beschrieben (Mullis 1990). Für diese Entdeckung erhielt Kary Mullis 1993 den Nobelpreis für Chemie. Der Einsatz von hitzestabilen Polymerasen (Saiki et al. 1988) ermöglichte eine Automatisierung der Methode und dadurch breite Anwendung in Klinik und Forschung.

PCR-Verfahren erlauben bei geeigneten Reaktionsbedingungen die *in-vitro*-Amplifikation von bestimmten DNA-Sequenzen. Das Verfahren entspricht in seinem Ablauf der natürlichen DNA-Replikation in Zellen; die einzelnen Reaktionsschritte werden aber in kurzer Zeit sehr oft wiederholt, wodurch die spezifischen DNA-Sequenzen exponentiell amplifiziert werden. Als Ausgangsmaterial dient entweder isolierte, doppelsträngige, genomische DNA, welche vor Durchführung durch ein geeignetes Restriktionsenzym in Fragmente zerschnitten wird oder es erfolgt zunächst eine Umschreibung von mRNA mit Hilfe des Enzyms „Reverse Transkriptase“ in cDNA-Kopien, deren Sequenzen anschließend amplifiziert werden. Mit Hilfe des Enzyms DNA-Polymerase wird von einem DNA-Einzelstrang als Matrize ein DNA-Doppelstrang hergestellt. Voraussetzung dafür ist

die Kenntnis der Randbereiche (Anfang und Ende), welche die zu vervielfältigende Nucleotidsequenz einschließen. Für die Randbereiche werden als Startmoleküle synthetische DNA-Oligonucleotide (Primer) verwendet, die an die Matrizen-DNA hybridisieren. An deren 3'-Ende werden DNA-Nukleotide angehängt und durch eine DNA-Polymerase miteinander zu einem Strang verknüpft. Der prinzipielle Ablauf eines einzelnen Polymerase-Kettenreaktion-Zyklus ist wie folgt:

1. Denaturierung

Thermische Denaturierung der zu amplifizierenden Doppelstrang-DNA bei etwa 90-94° C, Entstehung einzelsträngiger DNA-Matrizenmoleküle.

2. Annealing

Überschüssige Zugabe der Primer nach Absenkung der Temperatur auf etwa 50-52° C, Primer-Hybridisierung an die entsprechende Einzelstrang-DNA, wobei die Primer an die basenkomplementären Sequenzen der Matrizen binden.

3. Elongation

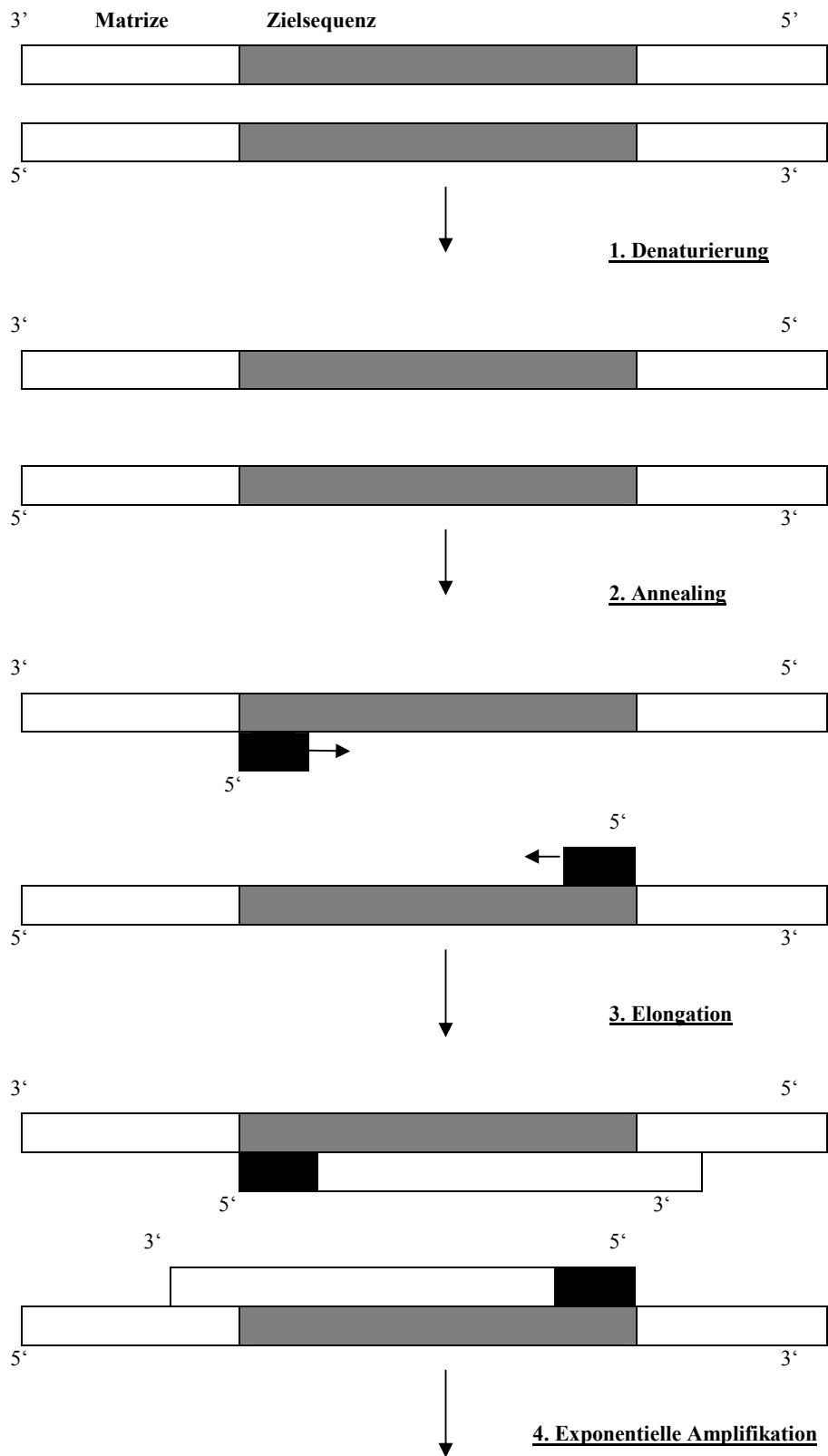
Polymerisierung der Einzelstrang-DNA zu Doppelstrang-DNA durch die hitzestabile DNA-Polymerase in Anwesenheit von DNA-Nukleotiden in Form von Desoxy-Nukleosid-Triphosphaten bei 72° C.

4. Exponentielle Amplifikation

20 bis 40malige Wiederholung des ganzen Zyklus (Gassen et Bertram 1991; Newton 1994; Watson et al. 1993), wobei sowohl die ursprüngliche als auch die neusynthetisierte DNA als Matrize für die DNA-Synthese verwendet wird. Die gesuchten Sequenzen werden exponentiell (entsprechend 2^{n-2} , n = Anzahl der PCR-Zyklen) vermehrt. Dabei wird eine Vervielfältigung um den Faktor 10^6 bis 10^7 erreicht. Eine weitere Amplifikation um den Faktor 10^9 bis 10^{10} erfolgt durch eine zweite PCR mit einer 1:10 Verdünnung des ersten PCR-Produkts.

Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR) stellt eine Kombination aus der Methode der reversen Transkription und der Polymerase-Kettenreaktion dar. Bei der reversen Transkription erfolgt zuerst eine Hybridisierung eines Primers an die RNA-Matrize und Erstellung einer cDNA-Kopie mittels der Reversen Transkriptase (Newton 1994; Tse & Forget 1990). Darauf folgt eine PCR, in der die zuvor gebildete cDNA als Matrize dient (Abbildung 1)

Einleitung



$$2^{n-2}, n = \text{Zykluszahl}$$

Abbildung 1: Polymerase-Kettenreaktion

1.2.4 PCR in der onkologischen Diagnostik

1.2.4.1 Amplifikation tumorspezifischer DNA-Abnormitäten

Erstmals wurde die enzymatische Amplifikation tumorspezifischer DNA-Abnormitäten zur Detektion der t (14;18)-Translokation in folliculären Lymphomen eingesetzt (Lee et al. 1987). Die verwendeten Primer sind komplementär für die Randbereiche, welche die Translokation umschließen, so dass eine Amplifikation der gesuchten DNA-Abschnitte nur bei Vorliegen der Translokation möglich ist. Damit gelingt der Nachweis von 1 Lymphomzelle in 1 Mio. Zellen, die nicht von der Translokation betroffen sind.

1.2.4.2 Amplifikation tumorspezifischer mRNA

Mit Hilfe der RT-PCR gelang der Nachweis der tumorspezifischer mRNA zum Beispiel bei der chronisch myeloischen Leukämie (CML). So findet man bei 90% der Patienten mit CML die Translokation t (9;22). Durch die zugrunde liegende Chromosomen-Translokation wird das bcr-Gen auf dem Chromosom 22 mit dem abl-Gen auf dem Chromosom 9 verknüpft, so dass ein sogenanntes Philadelphia-Chromosom entsteht. Da die Bruchstelle der Translokation einen sehr großen Abschnitt umfasst, ist die direkte Amplifikation der entsprechenden DNA-Abschnitte durch die PCR nicht möglich. Da die Introns (intervenierende Sequenzen) während der Transkription herausgeschnitten werden, resultiert ein mRNA-Transkript, das über seine cDNA-Kopie amplifizierbar wird (Kawasaki et al. 1988; Cross et al. 1993).

Die weltweit erste Anwendung von RT-PCR erfolgte zum Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen im Blut bei Patienten mit malignem Melanom (Smith et al. 1991). Mittlerweile wird die RT-PCR auch in der Diagnostik anderer maligner Tumoren eingesetzt [Expression der Tyrosinhydroxylase für das Neuroblastom (Naito et al. 1991; Mattano et al. 1992; Burchill et al. 1994), des Prostataspezifischen Antigens (PSA) beim Prostata-Karzinom (Moreno et al. 1992; Seiden et al. 1994; Katz et al. 1994), des Keratins 19 (K19) beim Mammakarzinom (Datta et al. 1994), des alpha-Fetoproteins beim Leberzell-Karzinom (Komeda et al. 1995) und des carcinoembryonalen Antigens (CEA) im Blut von Patienten

mit gastrointestinalen Tumoren (Gerhard et al. 1994)]. Voraussetzung dafür ist die genaue Kenntnis der Nukleotidsequenz eines spezifisch exprimierten Gens.

1.2.4.3 Tyrosinase

Die Tyrosinase ist das Leitenzym der Melaninsynthese. Dieses kupferhaltige Enzym katalysiert drei Reaktionen des Raper-Mason-Schema der Melanogenese (Abbildung 2):

- 1 als Monophenolase Katalyse der Reaktion vom Tyrosin zum DOPA (3,4-Dihydroxyphenylalanin)(Fitzpatrick et al. 1993). Die Reaktion benötigt DOPA als Ko-Faktor.
- 2 mit der Catecholase-Aktivität die Oxidation des DOPA zum Dopachinon (Fitzpatrick et al. 1993). DOPA ist das Substrat selbst.
- 3 Umwandlung von 5,6-Dihydroxyindol (DHI) zu Melanochrom (Körner et al. 1982). Die Reaktion benötigt ebenfalls DOPA als Ko-Faktor.

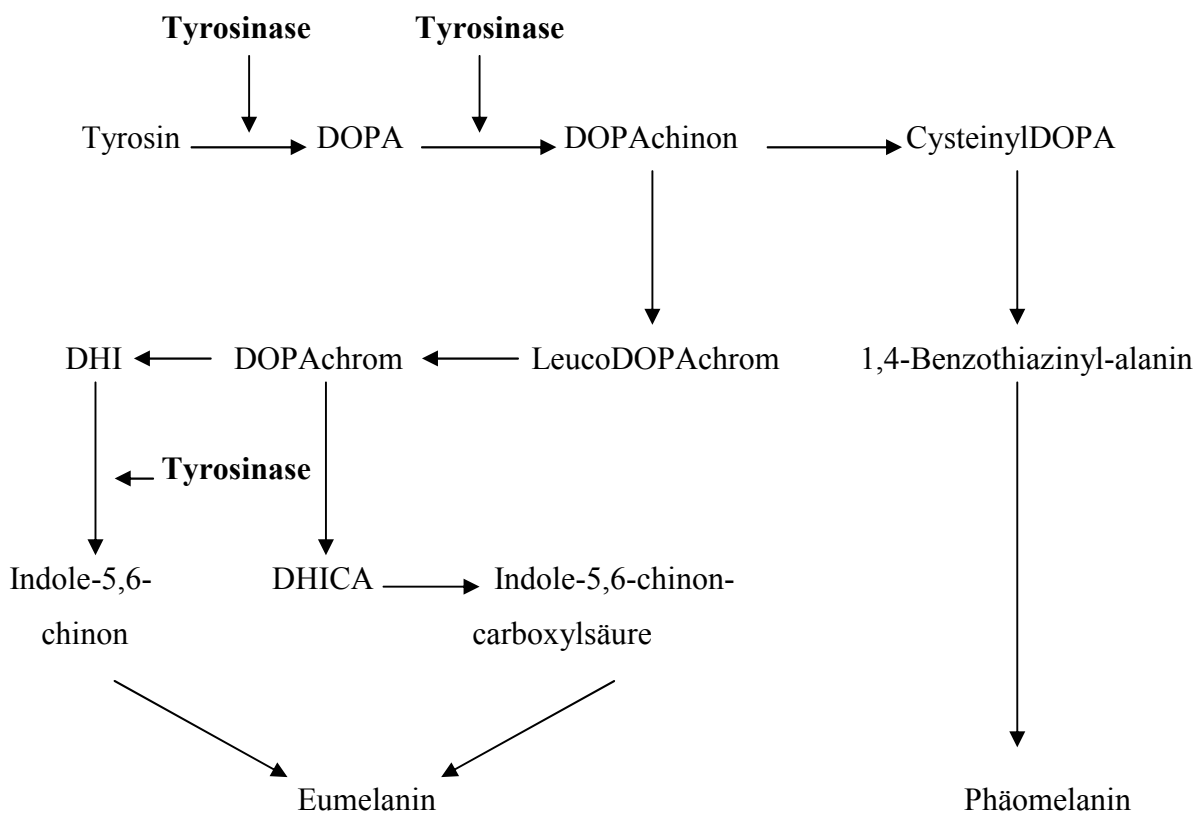


Abbildung 2: Raper-Mason-Schema der Melanogenese.

Sequenzanalysen des menschlichen Tyrosinasegens zeigen 5 Exons und 4 Introns, welche eine Spanne von etwa 65 kb auf Chromosom 11 umfassen (Giebel et al. 1991).

Tyrosinase wird nur in einigen Zelltypen neuroektodermalen Ursprungs wie Melanozyten, Melanomzellen und peripheren Gliazellen aktiv exprimiert (Kwon et al. 1987). Melanozyten und Gliazellen zirkulieren physiologischerweise nicht im Blut, so dass der Nachweis der Tyrosinase-mRNA im Blut auf das Vorhandensein zirkulierender Melanomzellen bzw. auf eine mögliche hämatogene Metastasierung hindeutet.

Über den Nachweis von Tyrosinase-mRNA mittels RT-PCR können zirkulierende Melanomzellen im Blut von Melanompatienten mit einer hohen Sensitivität von einer einzelnen Melanomzelle in 1 ml Blut nachgewiesen werden (Smith et al. 1991; Brossart et al. 1995). Voraussetzung für die Anwendung der PCR zum Nachweis der Expression des Tyrosinase-Gens war die Kenntnis der cDNA-Sequenz, die 1986 vollständig beschrieben wurde (Kwon et al. 1987). Im Jahre 1989 wurde der Aufbau des auf dem Chromosom 11 lokalisierten Gens entschlüsselt (Tomita et al. 1989).

Vor Etablierung der PCR-Technik wurden Versuche unternommen, das Enzym im Blut der Melanompatienten mittels HPLC nachzuweisen. Im Jahre 1995 wurden bei 10 Melanompatienten, im Vergleich zu gesunden Probanden, erhöhte Enzymkonzentrationen im Serum nachgewiesen (Sonesson et al. 1995).

Die erste Publikation über den Nachweis zirkulierender Tumorzellen bei Melanompatienten mittels RT-PCR erfolgte im Jahre 1991 (Smith et al. 1991). In dieser Studie wurde das periphere Blut von 7 Patienten mit metastasiertem malignem Melanom, 4 Patienten mit anderen metastasierten Malignomen und 4 gesunden Probanden untersucht. Bei 4 Melanompatienten konnte Tyrosinase-mRNA festgestellt werden, während bei allen 4 Blutproben der gesunden Probanden und bei den Patienten mit anderen Malignomen eine Tyrosinase-mRNA-Expression nicht nachweisbar war.

In den letzten Jahren haben weitere, verschiedene Arbeitsgruppen RT-PCR-Analysen zum Tyrosinase-mRNA-Nachweis bei größeren Patientenkollektiven durchgeführt (Tabelle 7).

Einleitung

Tabelle 7: Anteil positiver RT-PCR-Ergebnisse für Tyrosinase-mRNA im Blut bei Patienten mit malignem Melanom in den einzelnen Publikationen. Stadieneinteilung entsprechend der Empfehlungen der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft.

* vor Beginn der Interferon-Therapie

** Tyrosinase-positiv bei wenigstens einer Untersuchungsmethode.

Autoren	Jahr	Stadium I		Stadium II		Stadium III		Stadium IV		Kutane Mel.		Uveale M.	
		%	Σ	%	Σ	%	Σ	%	Σ	%	Σ	%	Σ
Smith et al.	1991	-	-	-	-	-	-	57%	4/7	57%	4/7	-	-
Brossart et al.	1993	10% 1/10				35%	6/17	100%	29/29	64%	36/56	-	-
Tobal et al.	1993	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50%	3/6
Battayani et al.	1995	20% 2/10				44%	8/18	50%	16/32	43%	26/60	-	-
Foss et al.	1995	-	-	-	-	-	-	0%	0/6	0%	0/6	0%	0/36
Hoon et al.	1995	-	-	-	-	-	-	-	-	59%	70/119	-	-
Kunter et al.	1996	0% 0/16				19% 9/48				14%	9/64	-	-
Melado et al.	1996	23%	4/17	45%	10/22	40%	7/17	94%	32/35	58%	53/91	-	-
Pittmann et al.	1996	-	-	-	-	-	-	12,5%	3/24	12,5%	3/24	-	-
Van der Velde-Zimmermann et al.	1996	25% 3/12				-	-	-	-	25%	3/12	-	-
Reinhold et al.	1997	0% 0/31				5%	1/21	38%	5/13	9%	6/65	-	-
Gläser et al.	1997	2% 1/43				0%	0/15	27%	12/44	13%	13/102	-	-
Jung et al.	1997	-	-	-	-	-	-	26%	13/50	26%	13/50	-	-
Farthmann et al.	1998	13% 6/46				17%	7/41	44%	16/36	23,5%	29/123	-	-
Ghossein et al.	1998	-	-	12,5%	2/16	15%	6/40	6%	1/17	12%	9/73	-	-
Curry et al.	1998	15%	5/31	34%	43/129	52%	60/116	-	-	39%	108/276	-	-
Schittek et al.	1999	17,5%	13/74	18%	8/45	17%	8/48	36%	21/58	22%	50/225	-	-
Hanekom et al.	1999	5%	4/76	9%	6/67	0%	0/10	0%	0/12	6%	11/181	17%	1/6
Palmieri et al.	1999	31%	27/87	39%	26/67	49%	24/49	75%	24/32	43%	101/235	-	-
Mellado et al.	1999	18%	2/11	19%	6/33	15%	2/13	-	-	17,5%	10/57	-	-
Proebstle et al.	2000	11%	12/106	18%	10/56	31%	8/26	67%	16/24	22%	46/212	-	-
Aubin et al.	2000	3%	1/35	0%	0/2	100%	2/2	-	-	8%	3/39	-	-
Farthmann et al.	2002	19%	4/21	23%	7/31	29%	13/45	41%	20/49	30%	44/146	-	-
Mellado et al.*	2002	-	-	18%	10/55	12%	6/50	33%	5/15	17,5%	21/120	-	-
Carrillo et al.	2002	14% 2/14				71%	20/28	87%	14/16	62%	36/58	-	-
Georgieva et al.**	2002	-	-	0%	0/2	14%	1/7	50%	5/10	31,5%	6/19	-	-
Palmieri et al.	2003	39%	36/93	47%	24/51	54%	13/24	65%	15/23	45%	90/200	-	-

1.2.4.4 MART-1 / Melan-A

MART-1 (melanoma antigen recognized by T cells 1) wurde gleichzeitig von zwei unterschiedlichen Arbeitsgruppen entdeckt und beschrieben (Coulie et al. 1994, Kawakami et al. 1994). Davon kommen auch die zwei unterschiedlichen Bezeichnungen: MART-1 und Melan-A. MART-1 wird in Melanozyten, melanozytären Naevi, Melanomzellen, steroidhormonproduzierendem Gewebe (Ovarhiluszellen, Granulosazellen, Rete ovarii, Tumoren der Nebennierenrinde, Leydig Zell Tumoren, Keimstrang Stromatumoren des Ovars), Angiomyolipomen, bei Lymphangioliomyomatose und Klarzelltumoren der Lunge exprimiert (Stewart et al. (2000), Miettinen et al. (2001)). Coulie et al. (1994) haben in 100% von 26 Melanomproben MART-1-Expression festgestellt, während keiner der Patienten mit anderen Karzinomen MART-1-positiv war. Sarantou et al. (1997) haben im Rahmen einer Studie ein Kollektiv von 32 Melanompatienten in verschiedenen Tumorstadien untersucht. Es bestanden vergleichbare Nachweisraten für die Marker MART-1 und Tyrosinase im Blut, bei gleichzeitig höherer Sensitivität des Nachweises für MART-1. Curry et al. (1998) beschrieben Blutuntersuchungen von 276 Patienten mit malignem Melanom in klinischen Stadien I-III für mehrere Tumormarker. Die Sensitivität der PCR-Bestimmung für MART-1 war ungefähr gleich wie für Tyrosinase und offensichtlich spezifisch für zirkulierende Melanomzellen im Blut. Allerdings wurde nur eine geringe Überlappung positiver Ergebnisse für beide Marker festgestellt.

Schittek et al (1999) untersuchten RT-PCR-Ergebnisse für Tyrosinase und MART-1 bei 225 Melanompatienten in unterschiedlichen klinischen Stadien. Insgesamt waren 50 Patienten Tyrosinase-positiv und 38 MART-1-positiv. Nur 16 Patienten waren aber für beide Marker positiv. Außerdem wurde eine MART-1-Expression bei 22 Tyrosinase-negativen Patienten festgestellt. Der PCR-Nachweis beider Marker korrelierte mit dem klinischen Stadium.

Bei den Untersuchungen von Palmieri et a. (1999) wurde eine Nachweisrate für MART-1 von 33% festgestellt (20% im Stadium I, 30% im Stadium II, 43% im Stadium III und 62% im Stadium IV).

In einer Folgestudie haben Palmieri et al. (2003) mehrere Tumormarker bei einem Kollektiv von 200 Patienten untersucht. Bei den Patienten mit Melanoma in situ waren 22% MART-1-positiv. Im Stadium I waren 28%, im Stadium II 27%, im Stadium III 33% und im Stadium IV 61% der Patienten MART-1-positiv.

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 Melanompatienten erhöhen.

1.2.5 Rationale der Anwendung mehrerer Tumormarker

Zur Entdeckung eines Melanom-Primärtumors der Haut wird im Gegensatz zu Primärtumoren anderer Organe keine Tumormarkerbestimmung benötigt. Ziel des Einsatzes des Tumormarker-Screening zum Nachweis zirkulierender Tumorzellen im Blut der Melanompatienten ist der Metastasierungsnachweis zum frühestmöglichen Zeitpunkt in der Phase der Mikrometastasierung. Die RT-PCR zum Nachweis von Tyrosinase-mRNA liefert keine direkte, quantitative Aussage aufgrund einer Differenz der Tyrosinase-mRNA-Expression bei unterschiedlichen Patienten (Curry et al. 1996). Johnson et al. (1995) haben festgestellt, dass auch die Amplifikations- und Transkriptionsrate individuellen Schwankungen unterliegt. Orlow et al. (1995) wiesen bei der Progression des malignen Melanoms, im Rahmen der Entdifferenzierung von Pigmentzellen, ein häufiges Auftreten einer Hypo- oder Amelanose der Zellen nach. Das führt zur abnehmenden Expression von Tyrosinase, die einen hohen Differenzierungsgrad der Zellen voraussetzt. Somit ist der Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen mittels Tyrosinase-RT-PCR limitiert. Der Nachweis von Tumormarker mit einer stärkeren Assoziation zur Melanomprogression kann eine höhere Sensitivität des Nachweises von zirkulierenden Tumorzellen und somit des Metastasierungsnachweises ermöglichen. Das maligne Melanom weist insbesondere in fortgeschrittenen Stadien ein heterogenes Expressionsmuster auf. Dadurch ist eine Assoziation mit einem einzigen Marker nicht möglich. Die Verwendung mehrerer Tumormarker könnte die Sensitivität des Tumorzellnachweises im Blut der Melanompatienten erhöhen. Dies beweisen auch die Publikationen von Hoon et al. (1995), Sarantou et al. (1997), Curry et al. (1998), Schitteck et al. (1999), Palmieri et al. (1999), Palmiere et al. (2003).

1.3 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Das maligne Melanom zählt aufgrund seiner Fähigkeit, bereits bei minimalem Tumolvolumen und minimaler Tumormasse Metastasen zu bilden, zu den hochgradig bösartigen Tumoren. Seine Aggressivität und hohe metastatische Potenz erfordern bereits in früheren Stadien eine individuelle Therapieplanung. Während die frühzeitig im Stadium des Primärtumors diagnostizierten Melanome meist durch rechtzeitige Operation geheilt werden können, ist die Prognose in fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung durch eine drohende Fernmetastasierung drastisch verschlechtert (die mittlere Überlebenszeit beträgt 6 Monate). Der Erfolg der adjuvanten Therapiemaßnahmen ist daher von dem Tumorstadium abhängig und erzielt in der Regel bei den Patienten im Stadium der Fernmetastasierung lediglich eine Lebensverlängerung. Zum Nachweis von Mikrometastasen ist bisher kein geeignetes, klinisch etabliertes Verfahren bekannt. Heutzutage werden prognostische Aussagen bezüglich der Metastasierung vor allem anhand histologischer Merkmale des Primärtumors (Tumordicke) getroffen. Eine derartige, rein statistische Prognoseschätzung ist aber für die Beurteilung des Einzelfalls unzureichend.

Die infauste Prognose des metastasierten Melanoms stimuliert die Suche nach spezifischen, aussagekräftigen, individuellen Progressionsmarkern, die zum Screening möglicher Rezidive bei operierten Melanompatienten im Rahmen der Routinenachsorge oder dem Therapie-Monitoring im Rahmen von adjuvanten oder palliativen Therapiestudien dienen könnten.

Alle Tumormarker für das maligne Melanom, die bisher beschrieben wurden, sind noch nicht in der Lage die Funktion eines frühen Progressionsmarkers zuverlässig zu übernehmen.

Seit Einführung der RT-PCR für Tyrosinase-mRNA durch Smith et al. (1991) konnten mehrere Arbeitsgruppen eine positive Korrelation des Anteils positiver Patienten mit späterer Entwicklung von Tumorrezidiv oder Fernmetastasierung beobachten.

Da wir davon ausgehen, dass vor dem Auftreten von Fernmetastasen Tumorzellen im Blut der Patienten zirkulieren müssen, spräche ein positiver Tyrosinase-mRNA-Nachweis im peripheren Blut bei Melanompatienten dafür, dass zum Zeitpunkt der Blutentnahme eine

hämatogene Dissemination von Melanomzellen bei dem betroffenen Patienten stattgefunden hat. Dass der einmalige Nachweis von zirkulierenden Melanomzellen tatsächlich mit einem erhöhten Risiko der Metastasierung einhergeht, ist aber bislang nicht bewiesen.

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit ist, die klinische Relevanz des Tyrosinase-mRNA-Nachweises bezüglich der individuellen Prognose des betroffenen Patienten zu ermitteln. Anhand der Patientendaten in den klinischen Stadien I und II soll untersucht werden ob disseminierte Melanomzellen tatsächlich zur Fernmetastasierung führen und ob ein positiver RT-PCR-Nachweis für Tyrosinase-mRNA im Stadium des Primärtumors ein erhöhtes Progressionsrisiko darstellt.

Hier setzt die Fragestellung der vorliegenden Arbeit an:

Ist ein RT-PCR-Nachweis von Tyrosinase-mRNA im peripheren Blut der Melanompatienten ein zuverlässiger Progressionsmarker im Stadium des Primärtumors?

Besteht eine Korrelation zwischen der Tumorprogression und positiven RT-PCR-Ergebnissen für Tyrosinase-mRNA?

Kann man bei einem positiven RT-PCR-Nachweis für Tyrosinase-mRNA daraus schließen, dass ein Übergang in die Phase der hämatogenen Metastasierung erfolgt ist oder unmittelbar bevorsteht?