

3. Ergebnisse

RT-PCR-Analysen für den Marker Tyrosinase wurden bei 146 Patienten mit histologisch gesichertem Primärmelanom in den Stadien I (davon 49 im Stadium Ia und 51 im Stadium Ib) und II (davon 36 im Stadium IIa und 10 im Stadium IIb) durchgeführt. Diese Stadien umfassen Primärtumoren aufsteigender Tumordicke ohne Nachweis einer Metastasierung. Die Blutentnahme erfolgte postoperativ nach Entfernung des Primärtumors.

Ein positiver Nachweis von Tyrosinase-mRNA mittels RT-PCR-Analysen im peripheren venösen Blut erfolgte bei 27 Patienten. Das entspricht einem Gesamtanteil von 18,49%. Davon befanden sich 15 (15%) Patienten im Stadium I und 12 (26,09%) im Stadium II der Erkrankung.

1.1 RT-PCR-Resultate der Patienten in den einzelnen klinischen Stadien

Bei 119 Patienten (davon 85 im Stadium I und 34 im Stadium II) wurde kein Nachweis von Tyrosinase-mRNA erbracht. Der Gesamtanteil von Patienten mit negativem RT-PCR-Nachweis für Tyrosinase-mRNA betrug somit 81,51%.

Tabelle 8: RT-PCR-Resultate der Patienten mit Primärtumor in den einzelnen klinischen Stadien:

PCR-Ergebnis	Stadium I		Stadium II		Zusammen	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Tyrosinase-positiv	15	15	12	26,09	27	18,49
Tyrosinase-negativ	85	85	34	73,91	119	81,51
Zusammen	100		46		146	

Im klinischen Stadium I zeigten die durchgeführten RT-PCR-Analysen bei 11 der 50 männlichen Patienten ein positives Ergebnis, während bei den weiblichen Patienten nur 4 von 45 positiv waren. Im Stadium II waren 6 von 20 männlichen Patienten und 6 von 14 Patientinnen aus dem vorliegenden Patientenkollektiv Tyrosinase-positiv (Tabelle 8).

Tabelle 9: RT-PCR-Analyse nach Geschlechtern getrennt:

PCR-Ergebnis	Zahl der Männer		Zahl der Frauen		Zusammen	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Stadium I						
Tyrosinase-positiv	11	22	4	9	15	15
Tyrosinase negativ	39	78	45	90	84	84
Zusammen	50		50		100	
Stadium II						
Tyrosinase-positiv	6	23,08	6	30	12	26,09
Tyrosinase negativ	20	76,92	14	70	34	73,91
Zusammen	26		20		46	

Betrachtet man das Durchschnittsalter der untersuchten Patienten, so lag im Stadium I das Durchschnittsalter bei Diagnosestellung bei den Tyrosinase-mRNA-positiven Patienten mit 51,07 Jahren etwas höher als bei den Tyrosinase-mRNA-negativen Patienten, die im Durchschnitt mit 49,42 Jahren zur ersten Diagnose kamen. Der Median lag bei 53 bzw. 49 Jahren. Der Gipfel in der Altersverteilung der Tyrosinase-positiven Melanompatienten befand sich bei Patienten im Stadium I mit 40% in der 6. Lebensdekade (Abbildung 5).

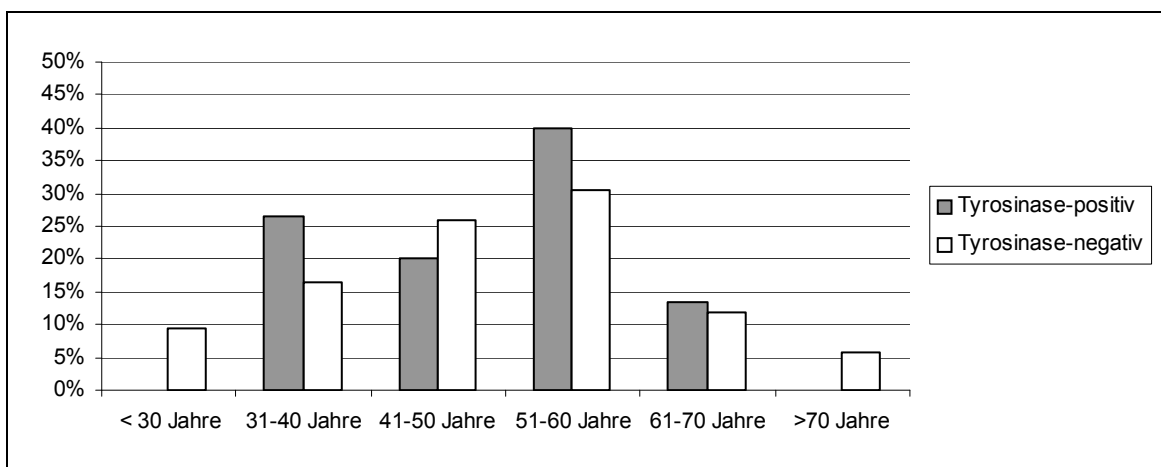


Abbildung 5: Korrelation des Tyrosinase-mRNA-Nachweises mit dem Alter der Patienten im Stadium I

Im Stadium II wurde bei den Tyrosinase-mRNA-positiven Patienten ein Durchschnittsalter von 58,92 Jahren festgestellt (der Median lag bei 60 Jahren). Dies ist wiederum etwas

höher als bei den Tyrosinase-mRNA-negativen Patienten, bei denen die erste Diagnose im Durchschnitt mit 57,68 Jahren gestellt wurde (der Median lag bei 59 Jahren).Der höchste Prozentsatz der Tyrosinase-positiven Patienten lag mit 33,33% zwischen dem 41. und dem 50. Lebensjahr (Abbildung 6).

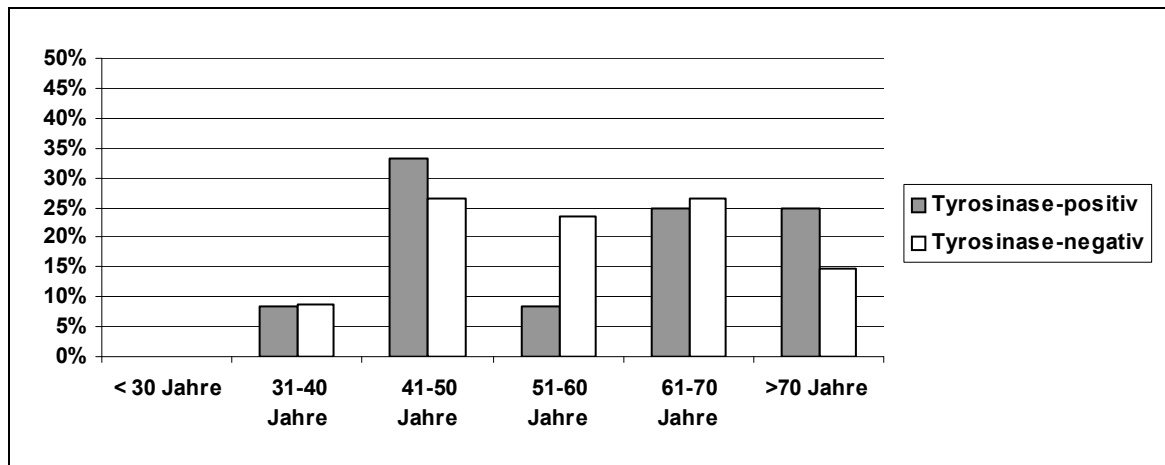


Abbildung 6: Korrelation des Tyrosinase-mRNA-Nachweises mit dem Alter der Patienten im Stadium II

Die durchgeführten RT-PCR-Analysen ergaben einen positiven Nachweis von Tyrosinase-mRNA bei 7 von 49 Patienten mit einer Tumordicke $\leq 0,75$ mm, bei 8 von 51 mit einer Tumordicke zwischen 0,76 und 1,5 mm, bei 9 von 36 mit einer Tumordicke zwischen 1,5 und 4 mm und bei 3 von 10 Patienten mit der Tumordicke > 4 mm. Dies zeigt eine deutliche Korrelation zwischen der Dicke des Primärtumors und der Häufigkeit des Tyrosinase-mRNA-Nachweises bei dem untersuchten Patientenkollektiv.

Die durchschnittliche Tumordicke bei den Tyrosinase-mRNA-positiven Patienten lag mit 2,28 mm (das Median lag bei 1,30 mm) um 0,79 mm höher gegenüber der durchschnittlichen Tumordicke (1,49 mm) bei den Tyrosinase-mRNA-negativen Patienten (das Median lag bei 0,95 mm) (Abbildung 7).

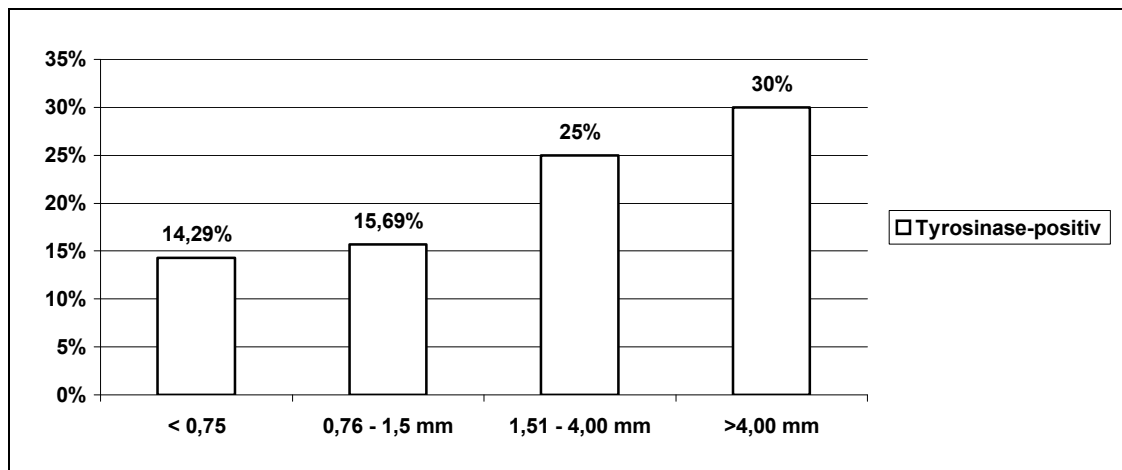


Abbildung 7: Korrelation des Tyrosinase-mRNA-Nachweises mit der Tumordicke

Im Stadium I wurde bei 9 von 61 Patienten mit dem Primärtumor am Stamm, bei 1 von 10 mit dem Primärtumor an den oberen Extremitäten, bei 3 von 22 mit dem Primärtumor an den unteren Extremitäten und bei 2 von 3 mit sonstiger oder unbekannter Tumorlokalisation eine positive Tyrosinase-mRNA-Reaktion festgestellt.

Es wurden keine deutlichen Unterschiede in der Prozentzahl der Tyrosinase-mRNA-positiven und –negativen Patienten festgestellt. Eine Ausnahme stellen Melanome mit einer sonstigen und unbekanntem Lokalisation, wo die Zahl der Tyrosinase-mRNA-positiven Patienten mit 13,33% deutlich überwiegt (Tabelle 10).

Tabelle 10: Tyrosinase-mRNA-Nachweis und die Lokalisation des Primärtumors im Stadium I:

Tumor-Lokalisation	Tyrosinase-positiv		Tyrosinase-negativ		Zusammen	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Kopf / Hals	0	0	4	4,71	4	4
Stamm	9	60	52	61,18	61	61
Obere Extremität	1	6,67	9	10,59	10	10
Untere Extremität	3	20	19	22,35	22	22
Sonstige / unbekannt	2	13,33	1	1,18	3	3
Zusammen	15		85		100	

Im Stadium II zeigten 1 von 2 Patienten mit der Tumorlokalisation an Kopf / Hals, 5 von 24 mit dem Primärtumor an Stamm, 3 von 5 mit dem Primärtumor an den oberen Extremitäten

und 3 von 13 Patienten mit dem Primärtumor an den unteren Extremitäten eine positive Tyrosinase-mRNA-Reaktion. Es ist ein Überwiegen, in der Prozentzahl der Tyrosinase-positiven Patienten mit dem Primärtumor an den oberen Extremitäten gegenüber den Tyrosinase-negativen Patienten, zu sehen (Tabelle 11).

Tabelle 11: Tyrosinase-mRNA-Nachweis und Lokalisation des Primärtumors im Stadium II:

Tumor-Lokalisation	Tyrosinase-positiv		Tyrosinase-negativ		Zusammen	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Kopf / Hals	1	8,33	1	2,94	2	4,35
Stamm	5	41,67	19	55,88	24	52,17
Obere Extremität	3	25	2	5,88	5	10,87
Untere Extremität	3	25	10	29,41	13	28,26
Sonstige / unbekannt	0	0	2	5,88	2	4,55
Zusammen	12		34		46	

10 von 57 Patienten mit einem superfiziell-spreitenden Melanom und 5 von 31 mit einem sonstigen oder unbekanntem Melanom zeigten im Stadium I der Erkrankung eine positive Tyrosinase-mRNA-Reaktion. Bei den Patienten mit nodulären, akrolentiginösen und Lentigo-maligna Melanomen wurde kein positiver Nachweis festgestellt (Abbildung 8).

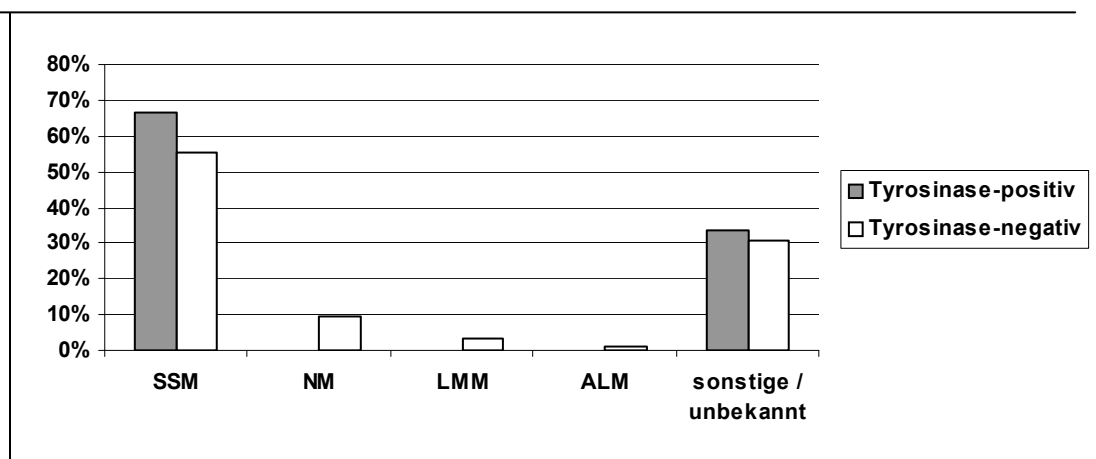


Abbildung 8: Korrelation des Tyrosinase-mRNA-Nachweises mit der histologischen Klassifikation des Primärtumors im Stadium I

Bei den Stadium-II-Patienten zeigten 3 von 11 mit einem superfiziell-spreitenden, 4 von 19 mit einem nodulären, 1 von 5 mit einem akrolentiginösen und 4 von 10 mit einem sonstigen oder unbekanntem Melanom eine positive Tyrosinase-mRNA-Reaktion. Bei den Patienten mit einem Lentigo-maligna Melanom wurde kein positiver Nachweis festgestellt (Abbildung 9).

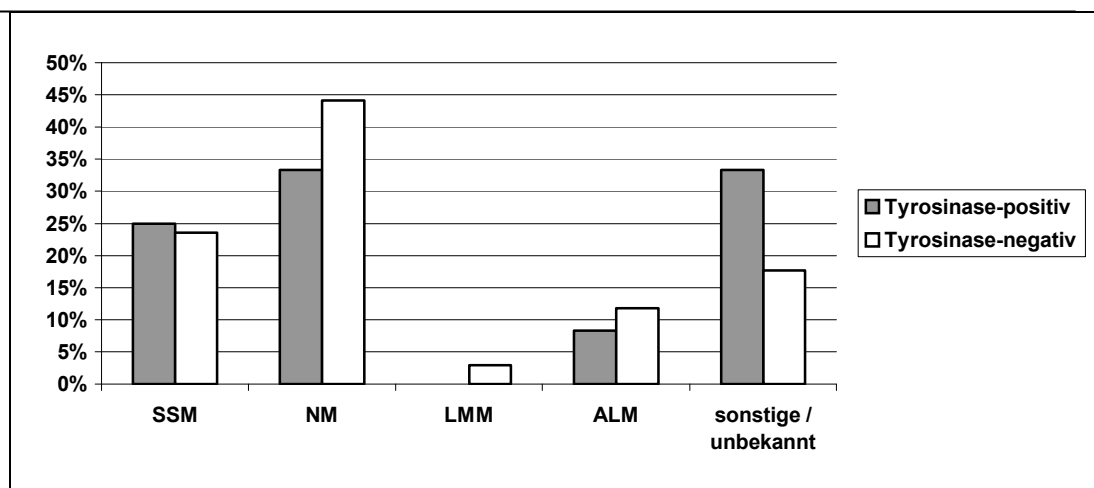


Abbildung 9: Korrelation des Tyrosinase-mRNA-Nachweises mit der histologischen Klassifikation des Primärtumors im Stadium II

3.2 Klinischer Verlauf der untersuchten Patienten

Zur Beurteilung des klinischen Verlaufs der untersuchten Patienten wurden in der Hautklinik des Universitätsklinikums Benjamin Franklin der Freien Universität Berlin regelmäßige Staginguntersuchungen durchgeführt. Die Nachbeobachtungszeit wurde dabei als der Zeitraum definiert, der zwischen Zeitpunkt der Diagnosestellung und dem zuletzt durchgeführten Staging bzw. bis zur Progredienz der Erkrankung liegt. Die mittlere Nachbeobachtungszeit betrug im Stadium I 66,70 Monate (Median 62,50 Monate) und im Stadium II 60,24 Monate (Median 40 Monate) (Tabelle 12).

Tabelle 12: Nachbeobachtungszeit in Monaten:

Nachbeobachtungszeit (in Monaten)			Maximum	Mittelwert	Median	Minimum
Std. I	Tyr-negativ	Nicht Progredient	175	67,49	62,00	19
		Progredient	89	63,00	63,00	37
	Tyr-positiv	Nicht Progredient	135	62,08	59,00	29
		Progredient	94	65,67	66,00	37
Std. II	Tyr-negativ	Nicht progredient	181	76,35	68,00	23
		Progredient	67	31,38	26,50	17
	Tyr-positiv	Nicht Progredient	143	59,43	52,00	22
		Progredient	33	23,80	27,00	6

Im vorgelegten Patientenkollektiv wiesen 5 von 100 Melanompatienten im Stadium I und 13 von 46 Patienten im Stadium II eine Progression ihres Tumorleidens auf. Dazu gehören 3 von den 15 Patienten mit positivem Tyrosinase-mRNA-Nachweis und 2 von den 85 Patienten mit negativem Tyrosinase-mRNA-Nachweis im Stadium I, bzw. 5 von den 12 Patienten mit positivem RT-PCR-Ergebnis und 8 von den 34 Patienten mit negativem RT-PCR-Ergebnis im Stadium II (Tabelle 13).

Tabelle 13: Progression des Primärtumors und RT-PCR-Ergebnis:

RT-PCR- Ergebnis	Zahl der Patienten ohne Progression		Zahl der Patienten mit Progression		Zusammen	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Stadium I						
Tyr-negativ	83	87,37	2	40	85	85
Tyr-positiv	12	12,63	3	60	15	15
Zusammen	95		5		100	
Stadium II						
Tyr-negativ	26	78,79	8	61,54	34	73,91
Tyr-positiv	7	21,21	5	38,46	12	26,09
Zusammen	33		13		46	

3.3 Verlaufsanalyse der Tyrosinase-mRNA-negativen und Tyrosinase-mRNA-positiven Patienten im Stadium I

In der Gruppe der Tyrosinase-negativen Patienten im klinischen Stadium I kam es bei 2 von 85 Patienten und in der Gruppe der Tyrosinase-positiven bei 3 von 15 Patienten zu einer Progression der Tumorerkrankung (Tabelle 14).

Tabelle 14: Geschlechtsverteilung bei Patienten im Stadium I:

Geschl.	PCR-negativ / nicht progr.		PCR-negativ / progredient		PCR-positiv / nicht progr.		PCR-positiv / progredient		Zusammen	
	abs.	%	abs.	%	abs.	%	abs.	%	abs.	%
Männer	39	46,99	0	0	8	66,67	3	100	50	50
Frauen	44	53,01	2	100	4	33,33	0	0	50	50
Zus.	83		2		12		3		100	

Das durchschnittliche Alter bei der Diagnosestellung betrug bei den Tyrosinase-negativen nicht progredienten Patienten 49,43 Jahre (Median 49), bei den Tyrosinase-negativen progredienten Patienten 49 Jahre (Median 49), bei den Tyrosinase-positiven nicht progredienten Patienten 53 Jahre (Median 55) und bei den Tyrosinase-positiven progredienten Patienten 43,33 Jahre (Median 45).

Die mittlere Dicke des Primärtumors betrug in der Gruppe der Tyrosinase-negativen, nicht progredienten Patienten 0,74 mm, bei den Tyrosinase-negativen, progredienten Patienten 1,1 mm, bei den Tyrosinase-positiven, nicht progredienten Patienten 0,83 mm und in der Gruppe der Tyrosinase-positiven, progredienten Patienten 1,05 mm.

Bei den Primärtumoren von den 2 Tyrosinase-negativen, progredienten Patienten handelte es sich um ein noduläres und ein sonstiges Melanom. Die 3 Tyrosinase-positiven, progredienten Patienten wiesen zwei superfiziell-spreitende und ein sonstiges Melanom auf (Tabelle 15).

Tabelle 15: Histologische Tumorklassifikation bei Patienten im Stadium I:

Tumor-Typ	PCR-negativ / nicht progr.		PCR-negativ / progredient		PCR-positiv / nicht progr.		PCR-positiv / progredient		Zusammen	
	abs.	%	abs.	%	abs.	%	abs.	%	abs.	%
SSM	47	56,63	0	0	8	66,67	2	66,67	57	57
NM	7	8,43	1	50	0	0	0	0	8	8
LMM	3	3,61	0	0	0	0	0	0	3	3
ALM	1	1,20	0	0	0	0	0	0	1	1
Sonstige / unb.	25	30,12	1	50	4	33,33	1	33,33	31	31
Zusammen	83		2		12		3		100	

Bei der Lokalisation des Primärtumors bei den zwei Tyrosinase-negativen, progredienten Patienten handelte es sich um den Stamm. In der Gruppe der Tyrosinase-positiven, progredienten Patienten befanden sich Primärtumoren bei zwei Patienten an unterer Extremität und bei einem handelte es sich um eine sonstige bzw. unbekannte Lokalisation des Primärtumors (Tabelle 16).

Tabelle 16: Lokalisation des Primärtumors bei Patienten im Stadium I:

Tumor-Lok.	PCR-negativ/ nicht progr.		PCR-negativ/ progredient		PCR-positiv/ nicht progr.		PCR-positiv/ progredient		Zusammen	
	abs.	%	abs.	%	abs.	%	abs.	%	abs.	%
Kopf / Hals	4	4,82	0	0	0	0	0	0	4	4
Stamm	50	60,24	2	100	9	75	0	0	61	61
Obere Extremität	9	10,84	0	0	1	8,33	0	0	10	10
Untere Extremität	19	22,89	0	0	1	8,33	2	66,67	22	22
Sonstige / unb.	1	1,20	0	0	1	8,33	1	33,33	3	3
Zusammen	83		2		12		3		100	

Die Fälle, bei denen eine Progression des malignen Melanoms nach der Diagnosestellung festgestellt wurde, werden als „abgeschlossen“ klassifiziert. Damit gelten 5 der 100 nachbeobachteten Fälle für statistische Auswertung als „abgeschlossen“. In der Analyse

wird der Verlauf der progressionsfreien Zeit (in Monaten) in den Gruppen mit negativem und positivem PCR-Nachweis der Tyrosinase-mRNA miteinander verglichen. Der Unterschied in der progressionsfreien Zeit ist mit $p=0,0015$ statistisch signifikant. Das bedeutet, dass Patienten mit einem positiven Tyrosinase-mRNA-Nachweis statistisch signifikant frühere Progression des malignen Melanoms erleiden, als Patienten mit einem negativen PCR-Ergebnis (Abbildung 10).

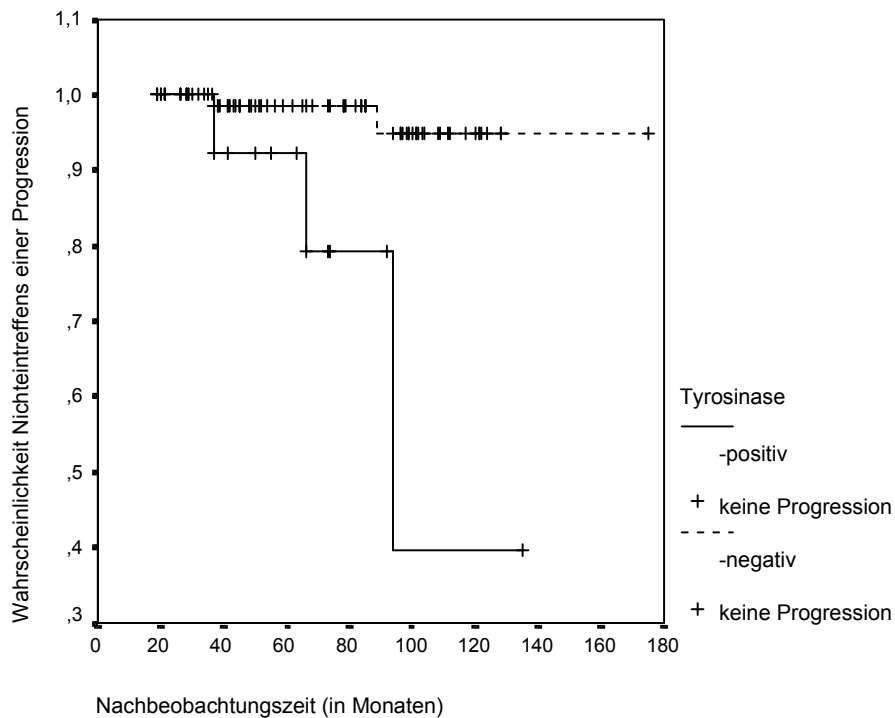


Abbildung 10: Wahrscheinlichkeit des Nichteintreffens einer Tumorprogression im Stadium

3.4 Verlaufsanalyse der Tyrosinase-mRNA-negativen und Tyrosinase-mRNA-positiven Patienten im Stadium II

Bei 8 von 34 Tyrosinase-negativen und bei 5 von 12 Tyrosinase-positiven Patienten kam es zu einer Progression des malignen Melanoms (Tabelle 17).

Tabelle 17: Geschlechtsverteilung bei Patienten im Stadium II:

Geschl.	PCR-negativ / nicht progr.		PCR-negativ / progredient		PCR-positiv / nicht progr.		PCR-positiv / progredient		Zusammen	
	abs.	%	abs.	%	abs.	%	abs.	%	abs.	%
Männer	16	61,64	4	50	4	57,14	2	40	26	56,52
Frauen	10	38,46	4	50	3	42,86	3	60	20	43,48
Zus.	26		8		7		5		46	

Das durchschnittliche Alter bei der Diagnosestellung betrug bei den Tyrosinase-negativen, nicht progredienten Patienten 55,23 Jahre (Median 55,5), bei den Tyrosinase-negativen, progredienten Patienten 65,63 Jahre (Median 65,5), bei den Tyrosinase-positiven, nicht progredienten Patienten 60,29 Jahre (Median 57) und bei den Tyrosinase-positiven, progredienten Patienten 57 Jahre (Median 63).

Die durchschnittliche Tumordicke betrug in der Gruppe der Tyrosinase-negativen, nicht progredienten Patienten 3,33 mm, bei den Tyrosinase-negativen, progredienten Patienten 3,47 mm, bei den Tyrosinase-positiven, nicht progredienten Patienten 2,12 mm und in der Gruppe der Tyrosinase-positiven, progredienten Patienten 6,76 mm.

Bei den Primärtumoren von den Tyrosinase-negativen progredienten Patienten handelte es sich um jeweils 1 superfiziell-spreitendes, akrolentiginöses und Lentigo-maligna Melanom, 3 noduläre und 2 sonstige Melanome. Bei den 5 Tyrosinase-positiven progredienten Patienten lagen 3 noduläre und jeweils 1 superfiziell-spreitendes und akrolentiginöses Melanom (Tabelle 18).

Tabelle 18: Histologische Tumorklassifikation bei Patienten im Stadium II:

Tumor-Typ	PCR-negativ/ nicht progr.		PCR-negativ/ progredient		PCR-positiv/ nicht progr.		PCR-positiv/ progredient		Zusammen	
	abs.	%	abs.	%	abs.	%	abs.	%	abs	%
SSM	7	26,92	1	12,5	2	28,57	1	20	11	23,91
NM	12	46,15	3	37,5	1	14,29	3	60	19	41,30
LMM	0	0	1	12,5	0	0	0	0	1	2,17
ALM	3	11,54	1	12,5	0	0	1	20	5	10,87
Sonstige / unbekannt	4	15,38	2	25	4	57,14	0	0	10	21,74
Zusammen	26		8		7		5		46	

Bei der Lokalisation des Primärtumors bei den Tyrosinase-negativen, progredienten Patienten handelte es sich bei 4 Fällen um Stamm und jeweils um einen Tumor an Kopf-, Hals-Region, oberer, unterer Extremität und einen Tumor mit unbekannter bzw. sonstiger Lokalisation. In der Gruppe der Tyrosinase-positiven, progredienten Patienten befanden sich Primärtumoren bei jeweils zwei Patienten am Stamm und an unterer Extremität und bei einem an oberer Extremität (Tabelle 19).

Tabelle 19: Lokalisation des Primärtumors bei Patienten im Stadium II:

Tumor-Lok.	PCR-negativ / nicht progr.		PCR-negativ / progredient		PCR-positiv / nicht progr.		PCR-positiv / progredient		Zusammen	
	abs	%	abs	%	abs	%	abs	%	abs	%
Kopf / Hals	0	0	1	12,50	1	14,29	0	0	2	4,35
Stamm	15	57,69	4	50	3	42,86	2	40	24	52,17
Obere Extremität	1	3,85	1	12,50	2	28,57	1	20	5	10,87
Untere Extremität	9	34,62	1	12,50	1	14,29	2	40	13	28,26
Sonstige / unbekannt	1	3,85	1	12,50	0	0	0	0	2	4,55
Zusammen	26		8		7		5		46	

Ergebnisse

Im Stadium II gelten 13 nachbeobachtete Fälle als „abgeschlossen“. Der Unterschied in der Analyse der progressionsfreien Zeit in den Gruppen mit negativem und positivem PCR-Nachweis der Tyrosinase-mRNA ist mit $p=0,1390$ statistisch nicht signifikant. Es besteht kein statistisch signifikanter Nachweis dafür, dass Patienten mit positivem PCR-Nachweis im Stadium II der Erkrankung früher eine Progression des malignen Melanoms erleiden (Abbildung 11).

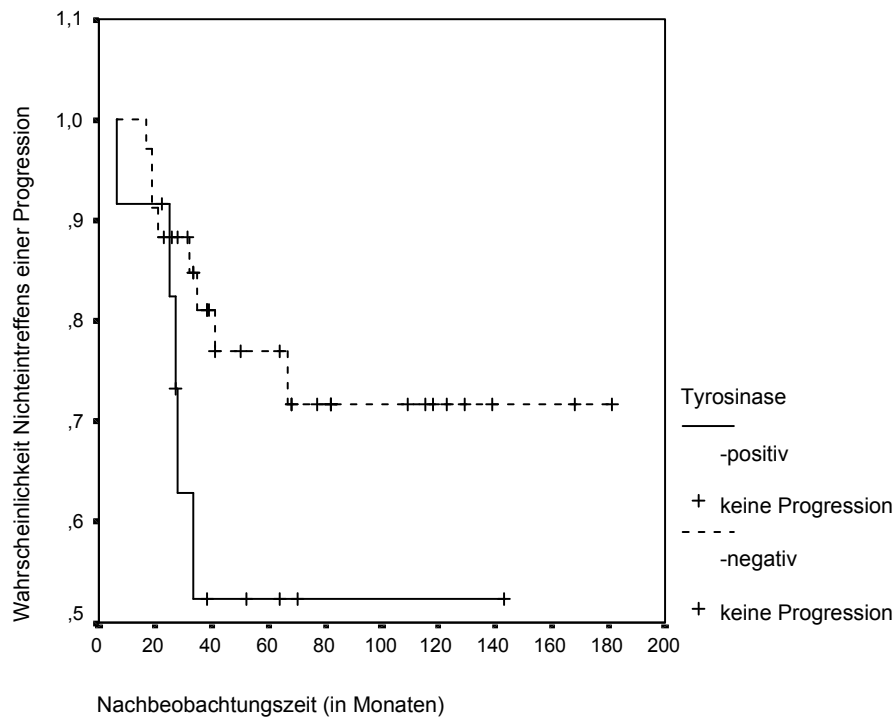


Abbildung 11: Wahrscheinlichkeit des Nichteintreffens einer Progression im Stadium II