

### 4. Diskussion

Aufgrund seiner Fähigkeit, bereits bei minimalem Tumolvolumen zu metastasieren, zählt das maligne Melanom zu den hochgradig bösartigen Tumoren. In den letzten Jahren belegten mehrere epidemiologische Studien, dass Inzidenz und auch Mortalität des malignen Melanoms weltweit in der Zunahme begriffen sind (Sebastian et al. 2000, Burg et al. 1997, Garbe et al. 2003). Im frühesten Stadium (klinisches Stadium I) lässt sich das maligne Melanom durch rechtzeitige Operation meistens heilen, während in fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung durch eine drohende Fernmetastasierung die Prognose drastisch verschlechtert ist. Der Erfolg von adjuvanten Therapiemaßnahmen ist daher vom frühzeitigen Einsatz in der Phase der Mikrometastasierung abhängig und erzielt in der Regel bei Patienten im Stadium der Fernmetastasierung nur eine Lebensverlängerung. Bei ca. 70% der Melanompatienten manifestiert sich eine Metastasierung zunächst lokoregionär und immerhin bei ca. 30% der Patienten tritt die Metastasierung primär in Form einer Fernmetastasierung auf (Meier et al. 2002), wobei sich ca. 85% der Rezidive in den ersten fünf Jahren nach Primärtumorexzision ereignen (Garbe et al. 2003a). In einer prospektiven Studie an der Universitäts-Hautklinik Tübingen, bei der 2 000 Patienten über einen Zeitraum von zwei Jahren nachbeobachtet wurden, wurde festgestellt, dass Patienten mit früherkannten Rezidiven mit einem Tumordurchmesser weniger als 2 cm und der Möglichkeit zur operativen Entfernung eine hochsignifikant günstigere Überlebensprognose haben als Patienten mit später erkannten Tumorrezidiven mit größerem Durchmesser oder fehlender Resektionsmöglichkeit (Garbe et al. 2003b).

Die infauste Prognose des metastasierten Melanoms stimuliert die Suche nach spezifischen Tumormarkern. Idealerweise sollten Tumormarker:

- bei gesunden Probanden und im Fall einer benignen Erkrankung nicht nachweisbar sein
- erst nach Entstehung des Tumors auftreten
- unter Tumorprogression einen Konzentrationsanstieg zeigen
- unter Therapie mit Veränderungen der Tumormasse korrelieren.

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

übernehmen. Heutzutage werden prognostische Aussagen bezüglich der Metastasierung vor allem anhand histologischer Merkmale des Primärtumors (die Gesamttumordicke nach Breslow, das Invasionslevel nach Clark, histologischer Tumortyp), Anzahl der befallenen Lymphknoten, Lokalisation des Primärtumors, Lokalisation der Metastasen, Anzahl der Lokalisationen und der Metastasen, Geschwindigkeit des Wachstums sowie Allgemeinbefinden, Alter und Geschlecht der Patienten getroffen. Beim metastasierten malignen Melanom konnten als unabhängige Prognoseparameter eine AP- und LDH-Erhöhung und eine Albuminerniedrigung festgestellt werden (Heimdal et al. 1989, Henze et al. 1997). Die Zusammensicht dieser Faktoren legt nahe, dass eine einmal stattgefundene Tumorzellausbreitung und deren Progression der entscheidende Faktor für die Metastasierung und dementsprechend für die Prognose des malignen Melanoms darstellt. Eine derartige rein statistische Prognoseschätzung ist aber für die Beurteilung des Einzelfalls unzureichend. Die Entdeckung eines geeigneten Tumormarkers könnte zum Screening möglicher Rezidive bei operierten Melanompatienten im Rahmen der Routinenachsorge oder dem Therapie-Monitoring im Rahmen von adjuvanten oder palliativen Therapiestudien dienen. Als mögliche Tumormarker kommen Melanin-Metabolite, tumorassoziierte Antigene, Adhäsionsmoleküle, Zytokine und Metalloproteinasen in Frage. Keiner der erläuterten Kandidaten hat jedoch bisher das experimentelle Stadium überwinden können. Die Tyrosinase ist ein Marker der engeren Wahl und wird als möglicher Parameter zur Therapie- und Verlaufskontrolle im Falle einer Metastasierung angesehen (Smith et al. 1991, Brossart et al. 1993, Battayani et al. 1995, Melado et al. 1996, Jung et al. 1996, Farthmann et al. 1998, Curry et al. 1998, Schitteck et al. 1999, Palmieri et al. 1999, Proebstle et al. 2000, Carillo et al. 2002, Palmieri et al. 2003).

Die Entwicklung der Polymerase-Kettenreaktion (Saiki et al. 1988) ermöglicht in vitro die enzymatische Herstellung millionenfacher Kopien von spezifischen Nukleotidsequenzen. Dadurch werden auch sehr geringe Mengen von DNA einer Analyse schnell zugänglich gemacht. Die in dieser Arbeit verwendete Methode der RT-PCR (Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion) wird mittlerweile in der Diagnostik mehrerer maligner Tumoren eingesetzt (Naito et al. 1991, Mattano et al. 1992, Burchill et al. 1994, Moreno et al. 1992, Seiden et al. 1994, Komeda et al. 1995). Bei den der Arbeit zugrunde liegenden Untersuchungen konnten zirkulierende Tumorzellen im Blut von Melanompatienten durch den Nachweis gewebsspezifischer Transkription detektiert werden. In Anlehnung an die im

Rahmen verschiedener Studien veröffentlichten Daten, in denen die RT-PCR zur Amplifizierung der melanozytär-spezifisch exprimierten Tyrosinase-mRNA zur Anwendung kam und als sensitive und spezifische Methode zum Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen im peripheren Blut von Melanompatienten bei einer Reihe von Arbeitsgruppen beschrieben wurde (Smith et al. 1991, Brossart et al. 1993, Battayani et al. 1995, Melado et al. 1996, Jung et al. 1996, Farthmann et al. 1998, Curry et al. 1998, Schittek et al. 1999, Palmieri et al. 1999, Proebstle et al. 2000, Carillo et al. 2002, Palmieri et al. 2003), wurde Tyrosinase als möglicher Tumormarker für die Untersuchung der vorliegenden Arbeit berücksichtigt.

Die Tyrosinase ist das Leitenzym der Melaninsynthese, das nur in Melanozyten, Melanomzellen und peripheren Gliazellen aktiv exprimiert wird. Da wir davon ausgehen, dass Melanozyten und Gliazellen physiologischerweise im Blut nicht zirkulieren, kann bei einem positiven Tyrosinase-mRNA-Nachweis im peripheren Blut der Melanompatienten davon ausgegangen werden, dass zum Zeitpunkt der Blutentnahme eine hämatogene Dissemination von Melanomzellen bei dem betroffenen Patienten stattgefunden hat.

### Sensitivität der Tyrosinase-RT-PCR

Unter der Sensitivität der RT-PCR-Methode für Tyrosinase wird die Wahrscheinlichkeit verstanden, mit der ein Tyrosinase-mRNA-positiver Patient als Tyrosinase-mRNA-positiv determiniert, also richtig erkannt wird. Zur Bestimmung der Sensitivität der einzelnen RT-PCR-Analysen für Tyrosinase-mRNA wurden Positivkontrollen der etablierten, humanen Melanomzelllinie SkMel-19 und SkMel-28 (Carey et al. 1976) in absteigenden Konzentrationen von 100, 10, 5 und 1 Zelle in 5 ml Normalblut untersucht. Die Sensitivität der einzelnen Reaktionen variierte zwischen 1 und 5 Zellen der oben genannten Zelllinie und ist somit mit den Befunden anderer Arbeitsgruppen vergleichbar: bis zu 1 Zelle SkMel-28 in 2 ml Normalblut wurde durch Smith et al. 1991, in 5 ml durch Brossart et al. 1993, in 10 ml durch Gläser et al. 1997 dokumentiert. Von Pittmann et al (1996) wurden zwischen 2 und 4 Zellen in 2 ml Blut, von Aubin et al. (2000) und Proebstle et al. (2000) 10 Zellen in 10 ml Blut dokumentiert. Man muss berücksichtigen, dass SkMel-28 wie auch Sk-Mel-19

stark pigmentierte Zelllinien sind, das heißt vermutlich auch mehr Tyrosinase exprimieren. Die Sensitivität in vitro entspricht daher nicht immer der Sensitivität in vivo.

Der Nachweis von GAPDH-mRNA (Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase), die von nahezu allen Zellen exprimiert wird (Ercolani et al. 1988), ermöglicht den Ausschluß von möglichen RNA-Integritätsdefekten und daraus folgenden falsch-negativen PCR-Resultaten.

### Spezifität der Tyrosinase-RT-PCR

Unter der Spezifität der RT-PCR-Methode für Tyrosinase wird die Wahrscheinlichkeit verstanden, mit der ein Tyrosinase-mRNA-negativer Patient als Tyrosinase-mRNA-negativ determiniert wird. Die millionenfache Amplifikationsrate des Templates durch die hintereinandergeschaltete, zweistufige PCR, verbunden mit einer Verdopplung der Verarbeitungsschritte, ermöglicht eine hohe Sensitivität der PCR-Technik und birgt gleichzeitig eine hohe Gefahr gegenüber Übertragungskontaminationen, die zu den falsch-positiven PCR-Ergebnissen führen können. Es werden folgende Kontaminationsarten unterschieden:

1. Kontamination bei der Gewinnung der Patientenblutprobe.
2. Verunreinigung der Blutprobe durch fremdes, genetisches Material.

Verunreinigung der Blutprobe durch eine Aspiration von Hautmelanozyten. Tyrosinase-mRNA wird nicht nur in den Melanomzellen sondern unter anderem auch in den Hautmelanozyten exprimiert. Die RT-PCR-Methode für Tyrosinase ermöglicht keine Unterscheidung zwischen Melanozyten und Melanomzellen, so dass eine Verunreinigung der Blutprobe durch epidermale Melanozyten während der Venenpunktion nicht ausgeschlossen werden kann. Um dieses Kontaminationsrisiko zu vermindern wurde in dieser Studie das jeweils erste Entnahmeröhrchen verworfen bzw. im Rahmen der Routinediagnostik verwertet. Diese Blutentnahmebedingungen wurden bei allen untersuchten Proben der vorliegenden Arbeit erfüllt.

Kontamination von Probe zu Probe. Diese Art von Kontaminationen führt möglicherweise zu einem falsch-positivem Ergebnis.

Reagenzienkontamination. Reagenzien enthalten kontaminierendes, genetisches Material, das zu falsch-positiven Resultaten führt.

Carry-over Kontamination. Aufgrund der hohen Sensitivität der PCR-Methode führt die Verunreinigung der Probe mit positiven Proben oder Positivkontrollen, die millionenfach amplifiziertes Templat enthalten, möglicherweise zu einem falsch-positivem Resultat. Diese Art von Kontamination tritt besonders bei hochsensitiven Testsystemen wie der nested PCR auf, da bei diesem Verfahren eine sehr geringe Zahl von Molekülen nachgewiesen werden kann. Smith et al. (1991), die als Erste nested PCR zum Nachweis der Tyrosinase anhand weniger Analysen angewendet haben, beschrieben bei weiteren Untersuchungen eine zunehmende Anzahl von falsch-positiven Ergebnissen (Pittman et al. 1996). Ein ähnliches Problem wurde auch von Foss et al. (1995) beschrieben. Das Risiko falsch-positive Ergebnisse zu erhalten, steigt möglicherweise mit zunehmender Anzahl von PCR-Zyklen (Pelkey et al. 1996).

Heutzutage schenkt man dem Kontaminationsrisiko größere Aufmerksamkeit. Falsch-positive Ergebnisse können vermieden oder reduziert werden, wenn eine Reihe von Vorschriften beachtet wird:

- Verwendung eines geschlossenes Systems (z.B. Monovetten) bei der Gewinnung des Patientenmaterials sowie das Verwerfen des ersten Entnahmeröhrchen
- getrennte prä- und post-PCR-Räume
- Regelmäßige Dekontamination der Arbeitsplätze
- Verwendung von gestopften, aerosolresistenten Pipettenspitzen und steriler Plastikwaren
- Tragen von puderfreien Einmalhandschuhen und Laborkitteln sowie häufiges Wechseln der Handschuhe
- Mitführen von negativen Kontrollen für alle Schritte der PCR

Bei der Untersuchung aller Blutproben der vorliegenden Arbeit wurde das Kontaminationsrisiko durch Beachtung der oben genannten Vorschriften minimiert. Bei den

RT-PCR-Analysen von 9 Kontroll-Patienten (3 gesunde Probanden und 6 Patienten mit anderen dermatologischen Erkrankungen) trat kein positives Ergebnis auf.

RT-PCR-Nachweis von Tyrosinase-mRNA bei Patienten mit amelanotischem, malignem Melanom

Insbesondere beim fortgeschrittenen malignen Melanom zeigt sich ein heterogenes Expressionsmuster, das sich von dem Expressionsmuster der Melanozyten unterscheidet (Herlyn et al. 1988). Im Spätstadium des Melanoms kommt es häufig im Rahmen der Entdifferenzierung zur Hypo- bzw. Amelanose der Zellen. Da die Tyrosinase einen hohen Differenzierungsgrad der Zellen voraussetzt, wird sie bei der Hypo- bzw. Amelanose meist nicht mehr exprimiert (Orlow et al. 1995) und der Nachweis von Tyrosinase-mRNA mittels RT-PCR wird limitiert. Auch Eberle et al. zeigten 1995 eine verminderte Expression der Tyrosinase in Melanomzelllinien gegenüber Melanozyten. In 4 von 14 untersuchten Melanomzelllinien war keine Tyrosinase-mRNA nachweisbar.

Smith et al. (1991) konnten aber bereits in der ersten Veröffentlichung Tyrosinase-mRNA mittels RT-PCR in einer von den zwei untersuchten amelanotischen Zelllinien nachweisen. Auch Brossart et al. (1993) erbrachten einen positiven Nachweis von Tyrosinase-mRNA mittels RT-PCR bei allen 6 untersuchten Patienten mit histologisch gesichertem, amelanotischem Melanom.

Bewertung einer Detektion von zirkulierenden Melanomzellen im Blut

Die heutzutage erreichbare Sensitivität der RT-PCR-Methode für Tyrosinase erlaubt den Nachweis von bis zu 1 Melanomzelle in 1 ml Blut. Dies ließe auf das Vorhandensein von ca. 5000 Melanomzellen im Blut eines Patienten schließen. Eine von Fidler et al. (1970) durchgeführte tierexperimentelle Untersuchung zum Metastasierungsverhalten gibt Hinweise darauf, dass nur weniger als 0,1% der im Blut vorhandenen Melanomzellen im Stande sind, zu extravasieren und Metastasen zu bilden. Nach einer intravenösen Injektion von radioaktiv markierten, stark kanzerogenen Melanomzelllinien in Mäusen resultierte eine Anschwemmung der meisten Melanomzellen ins Lungengewebe. Nach 24 Stunden waren nur noch weniger als 1% der Melanomzellen lebensfähig, weniger als 0,1% führten tatsächlich zur Metastasierung, da die meisten zirkulierenden Tumorzellen dank den

immunologischen Faktoren des Wirtsorganismus sowie den mechanischen Faktoren (z. B. Strömungsturbulenzen) zugrunde gehen (Fidler 1990, Fidler et al. 1991, Koop et al. 1995). Statistisch ergibt sich somit die Möglichkeit, für weniger als fünf von 5000 im Blut zirkulierenden Tumorzellen Metastasen zu bilden. Somit handelt es sich beim Nachweis einzelner, disseminierter Melanomzellen nicht zwangsläufig um eine Mikrometastasierung.

### Unterschiede in der Methodik der RT-PCR für Tyrosinase

Die Vermutungen, dass die unterschiedlichen Methodiken einen Einfluß auf die Ergebnisse der RT-PCR-Analyse für Tyrosinase-mRNA haben, werden von vielen Autoren angesprochen.

#### 1. Unterschiede in der Blutprobenpräparation:

- Verwendung von Vollblut für die RNA-Isolation (Smith et al. 1991, Brossart et al. 1993, Tobal et al. 1993, Foss et al. 1995, Pittman et al. 1996, Kunter et al. 1996, Van der Velde-Zimmermann et al. 1996, Gläser et al. 1997, Jung et al. 1997, Curry et al. 1998, Hanekom et al. 1999).
- Verwendung von Vollblut mit vorheriger Erythrozytolyse für die RNA-Isolation (Gläser et al. 1997, Farthmann et al. 1998, Proebstle et al. 2000).
- Verwendung von Vollblut mit vorheriger Ficollpräparation für die RNA-Isolation (Hoon et al. 1995, Mellado et al. 1996, Gläser et al. 1997, Jung et al. 1997, Reinhold et al. 1997, Ghossein et al. 1998, Mellado et al. 1999, Schitteck et al. 1999, Aubin et al. 2000, Mellado et al. 2000).

Ziel der beiden letzten Methoden ist die Gewinnung der mononukleären Zellen aus der Blutprobe. Beide Methoden haben ähnlich gute Sensitivität aber unterschiedlichen Kostenfaktor: Erythrozytolysepuffer kann günstiger in großen Mengen angefertigt werden. Bei der Erythrozytolyse wird die Auflösung der roten Blutkörperchen durch Inkubation der Blutprobe in einer hypotonen Lösung erreicht.

Bei der Ficoll-Methode werden mononukleäre Zellen (Monozyten und Lymphozyten) und Melanozyten mittels Dichtegradientenzentrifugation steril isoliert (Boyum 1968). Die Blutprobe wird dazu in ein Röhrchen mit einem Trennmedium aus Ficoll und Natriumdiatrizoat gegeben. Da die mononukleären Zellen und Melanozyten eine geringere Dichte als das Trennmedium haben, wandern sie bei der anschließenden Zentrifugation nicht durch das Medium. Die Erythrozyten und – abhängig von der spezifischen Dichte des Ficoll-Mediums – die Granulozyten, die eine höhere Dichte als die mononukleären Zellen und Melanozyten haben, sinken bei der Zentrifugation zum Sediment. Heutzutage werden industriell angefertigte Ficoll-Röhrchen mit der spezifischen Dichte von 1,077 g/ml und 1,09 g/ml benutzt.

### 2. Unterschiede bei den RNA-Isolationstechniken:

- RNA-Isolation mittels der klassischen Methode nach Chomczynski und Sacchi (Smith et al. 1991, Tobal et al. 1993, Foss et al. 1995, Hoon et al. 1995, Mellado et al. 1996, Farthmann et al. 1998, Mellado et al. 1999, Palmieri et al. 1999, Proebstle et al. 2000, Mellado et al. 2002, Palmieri et al. 2003). Bei der Methode nach Chomczynski und Sacchi wird nach der Erythrozytolyse die Gesamt-RNA durch die Guanidiniumisothiozyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion lokalisiert. Durch die folgende Zentrifugation wird die Lösung in 3 Phasen separiert: eine wässrige RNA-enthaltende Phase, eine Interphase und eine organische (Phenol und Chloroform) Phase. Durch Zugabe von Isopropanol und anschließende, erneute Zentrifugation wird die RNA aus der wässrigen Phase isoliert.
- RNA-Isolation mittels kommerziell verfügbaren Kits (TriReagent Kit bei Reinhold et al. 1997, RNAzol B bei Ghossein et al. 1998, Curry et al. 1998, RNeasy Quiagen).
- RNA-Isolation mittels Trizol-Standard-Methode: Modifikation der sauren Guanidiniumisothiozyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion unter Verwendung des TRIZOL-Reagenz (Van der Velde-Zimmermann et al. 1996).

### 3. Verwendung von unterschiedlichen Primerpaaren für die cDNA-Synthese:

- Verwendung von HTYR2 Primern (Smith et al. 1991, Tobal et al. 1993, Kunter et al. 1996, Mellado et al. 1996, 1999, 2002).

- Verwendung von oligo (dT) Primern (Hoon et al. 1995, Battayani et al. 1995, Van der Velde-Zimmermann et al. 1996, Pittmann et al. 1996, Reinhold et al. 1997, Gläser et al. 1997, Curry et al. 1998).
- Verwendung von random hexamer Primern (Brossart et al. 1993, Kunter et al. 1996, Gläser et al. 1997, Proebstle et al. 2000, Carillo et al. 2002).

#### 4. Verwendung von unterschiedlichen Reversen Transkriptasen:

- Verwendung der M-MLV-RT (murine moloney leukaemia virus reverse transcriptase) (Smith et al. 1991, Tobal et al. 1993, Pittmann et al. 1996, Kunter et al. 1996, Mellado et al. 1996, 1999, 2002, Curry et al. 1998, Aubin et al. 2000).
- Verwendung der AMV-RT (avian myeloblastosis virus reverse transcriptase) (Brossart et al. 1993, Foss et al. 1995, Hoon et al. 1995, Battayani et al. 1995, Gläser et al. 1997, Ghossein et al. 1998, Carillo et al. 2002).

In einer internationalen Qualitätskontrollanalyse der Arbeitsgruppe Malignes Melanom der EORTC wurden Unterschiede in den Ergebnissen der RT-PCR-Untersuchungen in neun verschiedenen Laboren, die unterschiedliche RNA-Isolationstechniken, Primer, Reverse Transkriptasen und Zahl der PCR-Zyklen, ermittelt. Fünf Labore wiesen vergleichbare Spezifität und Sensitivität in der Detektion von 10 Zellen in 10ml Vollblut auf. Vier Labore wiesen Sensitivitäts- und/ oder Spezifitätsmängel auf (Keilholz et al. 1998).

#### RT-PCR-Ergebnisse und klinischer Verlauf bei Melanompatienten im Stadium I in unserem Patientenkollektiv

Die RT-PCR-Analysen ergaben bei 15 Patienten in dem von uns untersuchten Kollektiv von 100 Patienten im klinischen Stadium I den positiven Nachweis von Tyrosinase-mRNA im Blut. Das entspricht einem Gesamtanteil von 15%. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit den von anderen Arbeitsgruppen veröffentlichten Daten. So ermittelten Proebstle et al. 11% (2000), Curry et al. 15% (1998), Schitteck et al. 17,5% (1999), Mellado et al. 18% (1999), Palmieri et al. 31% (1999) der Tyrosinase-mRNA-positiven Proben in Stadium I in ihren Patientenkollektiven.

Zu dieser Tyrosinase-mRNA-positiven Patientengruppe gehörten 7 von insgesamt 49 Patienten mit einer Tumordicke  $\leq 0,75$  mm und 8 von insgesamt 51 Patienten mit einer Tumordicke zwischen 0,76 und 1,55 mm. Die geringste Tumordicke der Patienten mit positivem PCR-Nachweis betrug 0,3 mm. Diese Beobachtung zeigt, dass eine Streuung von Melanomzellen entgegen der sehr guten Prognose bereits bei einer geringen Primärtumordicke erfolgen kann. Auch die klinische Erfahrung bestätigt, dass eine Metastasierung auch bei dünnen Primärtumoren möglich ist. In der 1989 von Garbe et al. veröffentlichten Langzeitbeobachtung von 190 Melanompatienten mit einer Primärtumordicke  $\leq 1$  mm entwickelten 10% der Patienten im Laufe der Zeit ein Lokalrezidiv oder Lymphknoten- bzw. Fernmetastasen, wobei der dünnste Primärtumor, der zur Fernmetastasierung führte, 0,4 mm dick war. Andererseits handelt es sich beim Nachweis von einzelnen, disseminierten Tumorzellen nicht notwendigerweise um eine Mikrometastasierung (Wittekind et al. 1996).

Um die Aussagekraft der RT-PCR für Tyrosinase-mRNA als prognostischer Marker im klinischen Stadium I zu evaluieren, wurden 100 Patienten im Stadium I mit histologisch gesichertem, malignem Melanom über einen Zeitraum von durchschnittlich 62 Monaten beobachtet. In diesem Zeitraum entwickelten 2,3% (2 von 85) von den Tyrosinase-mRNA-negativen Patienten und 20% (3 von 15) von den Tyrosinase-mRNA-positiven Patienten ein Rezidiv.

Die Tumorprogression trat bei den positiv getesteten Patienten durchschnittlich nach 59 Monaten und bei den negativ getesteten Patienten nach 62 Monaten ein.

Die Patienten mit einem positiven RT-PCR-Nachweis für Tyrosinase-mRNA erlitten eine statistisch signifikant frühere Progression des malignen Melanoms als Patienten mit einem negativen RT-PCR-Ergebnis.

RT-PCR-Ergebnisse und klinischer Verlauf bei den Melanompatienten im Stadium II in unserem Patientenkollektiv

Die RT-PCR-Analysen ergaben bei 12 Patienten in dem von uns untersuchten Kollektiv von 46 Patienten im klinischen Stadium II den positiven Nachweis von Tyrosinase-mRNA im Blut. Das entspricht einem Gesamtanteil von 26,09%. Dieses Ergebnis korreliert mit den

von anderen Autoren veröffentlichten Daten: 12,5% bei Ghossein et al. (1998), 18% bei Schittek et al. (1999) und bei Proebstle et al. (2000), 19% bei Mellado et al. (1999), 34% bei Curry et al. (1998), 39% bei Palmieri et al. (1999).

Zu dieser Tyrosinase-mRNA-positiven Patientengruppe gehörten 9 von insgesamt 36 Patienten mit einer Tumordicke zwischen 1,51 mm und 4,0 mm und 3 von insgesamt 10 Patienten mit einer Tumordicke >4 mm.

Um die Aussagekraft der Tyrosinase-RT-PCR als prognostischer Marker bei den Patienten mit malignem Melanom im klinischen Stadium II zu evaluieren, wurden 46 Patienten über einen Zeitraum von im Mittel 43 Monaten beobachtet. In diesem Zeitraum entwickelten 71,43% (5 von 7) von den Tyrosinase-mRNA-positiven Patienten und 30,77% (8 von 26) von den Tyrosinase-mRNA-negativen Patienten ein Rezidiv.

Die Progression des Tumorleidens trat bei den positiv getesteten Patienten im Mittel nach 52 Monaten und bei den negativ getesteten Patienten nach 68 Monaten ein.

Es konnte kein statistisch signifikanter Nachweis erbracht werden, dass Tyrosinase-mRNA-positive Melanompatienten im klinischen Stadium II früher eine Progression der Erkrankung erleiden als Tyrosinase-mRNA-negative. Das eher kleine Patientenkollektiv im klinischen Stadium II zeigt jedoch auf, dass bereits aus einer geringen Änderung der Patientenzahl eine erhebliche prozentuale Abweichung resultieren kann. Ebenso ist hier möglicherweise eine längere Nachbeobachtungszeit notwendig.

Die im Rahmen verschiedener Studien veröffentlichten Ergebnisse mit den genannten methodischen Erkenntnissen sind bis heute zum Teil sehr kontrovers. Ein Vergleich der Daten untereinander und mit denen von uns erzielten Ergebnissen ist aufgrund der genannten methodischen Problematik, unterschiedlicher Größen der Patientenkollektive und unterschiedlich langer Nachbeobachtungszeiten nicht immer möglich. Deshalb ist es zur definitiven Beurteilung langfristig notwendig, in Zusammenarbeit verschiedener Kliniken eine Standardisierung der RT-PCR-Methode für Tyrosinase zu erarbeiten und Qualitätskontrollen für dieses Verfahren einzuführen. Dazu wären umfangreiche Studien mit genauer Dokumentation der Patientendaten erforderlich. Weiterhin sollte die Überlegung angestrebt werden, den RT-PCR-Nachweis für Tyrosinase-mRNA durch mehrmalige Messung bei einem Patienten und in kürzeren Abständen durchzuführen, da

sich auch in diesem Zusammenhang bei den veröffentlichten Daten der einzelnen Studien ein inkonsistentes Bild gezeigt hat. Bei mehrmaligen Untersuchungen an den gleichen Patienten zeigte sich eine diskontinuierliche Tyrosinase-mRNA-Expression, was auf diskontinuierliche Aussaat von Tumorzellen im Blut hinweisen könnte. Da für das maligne Melanom aufgrund der ausgeprägten Heterogenität keine Assoziation mit einem einzigen Marker vorliegt, wäre die Verwendung eines Markerpanels eine Möglichkeit, bessere Nachweisraten zu erbringen. Mehrere Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass durch Verwendung von mehreren Markern eine Erhöhung der Sensitivität des Nachweises von Tumorzellen im Blut der Melanompatienten erzielt werden kann (Hoon et al. 1995, Curry et al. 1998, Palmieri et al. 1999, 2003, Schitteck et al. 1999).