

5. Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

Viele epidemiologische Studien belegen, dass weltweit eine deutliche Zunahme der Inzidenz des malignen Melanoms der Haut zu beobachten ist. Aufgrund seiner Fähigkeit, bereits bei minimalem Tumorzellvolumen zu metastasieren, gehört dieser Tumor zu den bösartigsten Erkrankungen. Während die frühzeitig diagnostizierten Melanome meist durch operative Exzision und adjuvante Therapie geheilt werden können, ist die Prognose im Stadium der Metastasierung als äußerst ungünstig einzustufen.

Die wichtigsten klinischen Parameter, mit dessen Hilfe die Tumorausbreitung sich abschätzen lässt, sind heutzutage die Gesamttumordicke nach Breslow, das Invasionslevel nach Clark sowie die Faktoren histologischer Tumortyp, Lokalisation des Primärtumors, Alter und Geschlecht des Patienten. Die einzelnen, disseminierten Tumorzellen können aber anhand histologischer Merkmale des Primärtumors sowie hochauflösender, bildgebender Diagnoseverfahren nicht nachgewiesen werden. Die Vorstellung, dass vor dem Auftreten von Fernmetastasen Tumorzellen im peripheren Blut zirkulieren müssen, stimuliert die Suche nach spezifischen Tumormarkern. Mit Einführung der Reversen Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) konnte die Sensitivität des Nachweises von Mikrometastasen erheblich erhöht werden. Bei der reversen Transkription erfolgt zuerst die Erstellung einer cDNA-Kopie von der mRNA-Matrize. Anschließend werden bestimmte Abschnitte dieser cDNA mittels PCR vervielfältigt. Die RT-PCR ist somit ein äußerst sensibles Verfahren mit dessen Hilfe auch sehr geringe Mengen von mRNA einer Analyse schnell zugänglich gemacht werden und damit einzelne, im peripheren Blut zirkulierende, Tumorzellen nachgewiesen werden können.

Beim malignen Melanom ergeben sich gewebsspezifische Besonderheiten durch die melanozytär-spezifisch exprimierte mRNA (z.B. Tyrosinase). Die Tyrosinase ist das Leitenzym der Melaninsynthese, das nur in Melanozyten, Naevuszellen, Melanomzellen und peripheren Gliazellen aktiv exprimiert wird. Da man annimmt, dass Melanozyten und Gliazellen physiologischerweise im Blut nicht zirkulieren, kann bei einem positiven Tyrosinase-mRNA-Nachweis im peripheren Blut bei Melanompatienten davon ausgegangen werden, dass zum Zeitpunkt der Blutentnahme eine hämatogene Dissemination von Melanomzellen bei dem betroffenen Patienten stattgefunden hat.

Die RT-PCR-Methode zum Nachweis von Tyrosinase-mRNA wurde als ein sensibles und spezifisches Verfahren zum Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen im peripheren Blut

von Melanompatienten von einer Reihe von Arbeitsgruppen beschrieben (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). Die im Rahmen verschiedener Studien veröffentlichten Ergebnisse sind aber bis heute zum Teil sehr kontrovers.

Zur Überprüfung der möglichen Korrelation zwischen dem Nachweis von zirkulierenden Melanomzellen und der klinischen Progression des Tumors habe ich in dieser Arbeit die RT-PCR-Analysen von insgesamt 146 in der Klinik und Poliklinik für Dermatologie am UKBF von 1995 bis 2002 untersuchten Melanompatienten in den klinischen Stadien I und II und den klinischen Verlauf der oben genannten Patienten analysiert.

Die RT-PCR-Analysen ergaben bei 15 Patienten des untersuchten Kollektivs von 100 Patienten im klinischen Stadium I den positiven Nachweis von Tyrosinase-mRNA im Blut. Das entspricht einem Gesamtanteil von 15%. 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. Um die Aussagekraft der Tyrosinase-RT-PCR als prognostischen Marker im klinischen Stadium I zu evaluieren, wurden die Patienten über einen Zeitraum von im Mittel 62 Monaten beobachtet. In diesem Zeitraum entwickelten 2,3% (2 von 85) der Tyrosinase-mRNA-negativen Patienten und 20% (3 von 15) der Tyrosinase-mRNA-positiven Patienten ein Rezidiv. 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.

In dem von uns untersuchten Kollektiv von 46 Patienten im klinischen Stadium II ergaben die RT-PCR-Analysen bei 12 Patienten den positiven Nachweis von Tyrosinase-mRNA im Blut. Das entspricht einem Gesamtanteil von 26,09%. 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 von >4 mm. Die Patienten wurden über einen Zeitraum von im Mittel 43 Monaten beobachtet. In diesem Zeitraum entwickelten 71,43% (5 von 12) der Tyrosinase-mRNA-positiven Patienten und 30,77% (8 von 34) der Tyrosinase-mRNA-negativen Patienten ein Rezidiv oder Metastasen. Es konnte kein statistisch signifikanter Nachweis erbracht werden, dass Tyrosinase-mRNA-positiv getestete Melanompatienten im klinischen Stadium II früher eine

Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

Progression der Erkrankung erleiden als Tyrosinase-mRNA-negativ getestete. Bei der geringen Größe des Patientenkollektivs im klinischen Stadium II ist aber zu bedenken, dass bereits aus einer geringen Änderung der Patientenzahl eine erhebliche prozentuale Abweichung resultieren kann, so dass weitere Untersuchungen an einem größeren Patientenkollektiv notwendig sind.

Eine definitive Beurteilung der Korrelation des Tyrosinase-mRNA-Nachweises mit der möglichen Tumorprogression erfordert eine Zusammenarbeit mehrerer Kliniken, eine Standardisierung der RT-PCR-Methode für Tyrosinase und die Einführung von Qualitätskontrollen für dieses sehr sensitive Verfahren.

Die in dieser Arbeit gefundene Korrelation zwischen dem Nachweis zirkulierender Melanomzellen mittels RT-PCR bei Patienten im klinischen Stadium I und dem erhöhten Risiko einer Progression lässt den Schluß zu, dass Tyrosinase-RT-PCR positive Patienten in diesem Stadium einer engeren und/oder intensiveren Nachbetreuung bedürfen.