

Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein

Klinikum rechts der Isar
Technische Universität München
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. J. Ring)

Die Bedeutung von MIA bei der Verlaufskontrolle von Melanompatienten mit Tumorstadium I und II

Stefanie Pfundmair

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier
Prüfer der Dissertation:
1. apl. Prof. Dr. R. Hein
2. Univ.-Prof. Dr. M. W. Ollert

Die Dissertation wurde am 05.09.2007 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 09.04.2008 angenommen.

*Wie wichtig es ist die richtigen Menschen um sich zu haben...
Für ihre Liebe, Freundschaft, Unterstützung und Ermutigung
Für Claus, Lissy, Sanni, Michi und Dominik*

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	5
EINLEITUNG	6
1. Das Maligne Melanom	6
1.1 Definition	6
1.2 Epidemiologie	6
1.3 Risikofaktoren	7
1.4 Ätiopathogenese	9
1.5 Diagnose	10
1.6 Klinik und Typeneinteilung	10
1.7 Prognosefaktoren, Stadieneinteilung und Prognose	12
1.8 Tumornachsorge	16
2. Tumormarker	19
2.1 Definition, allgemeine Anforderungen, Anwendung	19
2.2 Tumormarker des malignen Melanoms	19
3. Melanoma Inhibitory Activity (MIA)	22
3.1 Entdeckung und Klonierung	22
3.2 MIA-Gen und MIA-Protein	22
3.3 Funktion von MIA	23
3.4 Vorkommen der MIA-Expression	25
3.5 Einsatz von MIA als Marker	25
MOTIVATION UND ZIELSETZUNG	28
MATERIAL UND METHODEN	29
4. Das Patientenkollektiv	29
5. MIA-Bestimmung mittels ELISA	35
5.1 Testprinzip	35
5.2 Inhalt des Testbestecks	36
5.3 Vorbereitung der Reagenzien	36
5.4 Vorbereitung der Proben	37
5.5 Testablauf	37
5.6 Auswertung	37
5.7 Messgenauigkeit und Messbereich	37
5.8 Cutoff	38
6. Dokumentation	39
7. Auswertung der dokumentierten Befunde	40
8. Statistische Methoden	42
8.1 Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer prädiktiver Wert	42
8.2 Testverfahren zum Vergleich zweier Gruppen	42
8.3 Erläuterungen zu einzelnen statistischen Methoden	43

ERGEBNISSE	46
9. Klinische und prognostische Bedeutung von MIA gemessen an einem Cutoff	46
9.1 Bedeutung von MIA gemessen an einem Cutoff als Spiegel des klinischen Bildes	46
9.2 Prognostische Bedeutung von MIA-Cutoff- Überschreitungen	51
10. Klinische und prognostische Bedeutung von MIA ohne Berücksichtigung eines Cutoffs	58
10.1 Bedeutung von MIA ohne Berücksichtigung eines Cutoffs als Spiegel des klinischen Bildes	58
10.2 Prognostische Bedeutung des MIA-Verlaufs	62
DISKUSSION	69
11. Spiegelt MIA das klinischen Bild wider?	69
12. Hat MIA prognostische Aussagekraft bezüglich Tumor- progression?	76
12.1 Prognostische Bedeutung von MIA-Cutoff- Überschreitungen	76
12.2 Prognostische Bedeutung des MIA-Verlaufs ohne Berücksichtigung eines Cutoffs	83
ZUSAMMENFASSUNG	88
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	90
TABELLENVERZEICHNIS	91
LITERATURVERZEICHNIS	92
DANKSAGUNG	107
LEBENS LAUF	108

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABTS	2,2'-Azino-di-3-ethylbenzthiazolin-sulfonat
AJCC	American Joint Committee on Cancer
ALM	Akrolentiginöses malignes Melanom
AMM	Amelanotisches malignes Melanom
bFGF	Basic fibroblast growth factor
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
CCND1	Cyclin D1
CDK4	Cyclin-dependend kinase 4
CDKN2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
CD-RAP	Cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein
CMM1	Cutaneous malignant melanoma-Gen 1
CT	Computertomographie
d.h.	das heißt
ELISA	Enzyme-linked immuno sorbent assay
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
HLA	Humane Leukozytenantigene
kb	Kilo Basen
kDa	Kilo Dalton
LASA-P	Lipid-bound sialic acid
LDH	Laktatdehydrogenase
LMM	Lentigo-maligna-Melanom
MAB	Monoclonal antibody
MART-1	Melanoma antigen recognized by T cells-1
MEK	Mitogen activated ERK-activating kinase
MIA	Melanoma inhibitory acitivity
mm	Millimeter
mRNA	Messenger ribonucleic acid
MRT	Magnetresonanztomographie
NMM	Noduläres malignes Melanom
NSE	Neuronenspezifische Enolase
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
POD	Peroxidase
rpm	Rounds per minute
SH3	Src homology 3
sICAM	Soluble intracellular adhesion molecule
SSM	Superfiziell spreitendes Melanom
sVCAM	Soluble vascular cell adhesion molecule
TA90	90-kd tumor-associated antigen
u.a.	unter anderem
VEGF	Vascular endothelial growth factor
z.B.	zum Beispiel

EINLEITUNG

1. Das Maligne Melanom

1.1 Definition

Das maligne Melanom ist ein bösartiger Tumor der Haut. Es entsteht durch maligne Transformation von Melanozyten, die frühzeitig lymphogen und hämatogen Metastasen setzen. Neben der Haut findet sich das maligne Melanom in selteneren Fällen auch an den Schleimhäuten, an den Hirnhäuten, an der Uvea und Retina des Auges.

1.2 Epidemiologie

1.2.1 Inzidenz und Mortalität

Das maligne Melanom tritt vorwiegend bei der hellhäutigen Bevölkerung auf. Bei Afrikanern und Asiaten kommt dieser Tumor seltener vor (0,2–0,4 pro 100.000 und Jahr). Bei ihnen befindet er sich meistens an den Handflächen, Fußsohlen und Schleimhäuten – Körperstellen, die weniger der UV-Strahlung ausgesetzt sind. Bei der hellhäutigen Bevölkerung dagegen steht das maligne Melanom in starkem Zusammenhang mit der UV-Belastung (Crombie 1979): Das maligne Melanom entsteht bei hellhäutigen Menschen vor allen an UV-Strahlung ausgesetzten Körperregionen, wie dem Stamm und den Extremitäten. Darüber hinaus findet man das maligne Melanom gehäuft in Gebieten mit hoher Lichteinstrahlung.

So gibt es die weltweit höchste Inzidenz mit 40–60 Fällen pro 100.000 Einwohner und Jahr in Australien. Im Vergleich dazu liegen die Inzidenzen in Europa zwischen 15 (Skandinavien) und 5–7 (Mittelmeerraum) Fällen pro 100.000 Einwohner und Jahr. In den USA ist die Inzidenz mit 10–20 Fällen pro 100.000 Einwohner und Jahr etwas höher als in Europa. Weltweit, so auch in Deutschland, war in den letzten Jahrzehnten eine stark steigende Inzidenz beobachtet worden: Anfang der 70er Jahre betrug die Inzidenz in Deutschland 3 Fälle pro 100.000 Einwohner und Jahr, in den 90er Jahren dann schon 9–12 Fälle pro 100.000 Einwohner und Jahr.

Auch die Mortalitätsrate stieg zwischen 1970 und 1995 bei den deutschen Männern von 1,7 auf 3,2 Todesfälle pro 100.000 Einwohner und Jahr an, bei den deutschen Frauen von 1,6 auf 2,0 Todesfälle pro 100.000 Einwohner und Jahr (Rigel 1993, MacKie 1998, Hall et al. 1999, Garbe und Blum 2001). Seit Mitte der 90er Jahre kann jedoch besonders bei jüngeren Leuten (22–44 Jahre) in einigen europäischen Ländern – dank greifender Präventionsprogramme – ein Abfall der Mortalitätsrate um 14% bei den Männern und um 11% bei den Frauen festgestellt werden (Garbe und Blum 2001, Bosetti et al. 2004). Dieser Abwärtstrend der Mortalität und auch der Inzidenz zeichnet sich vor allem bei Frauen ab, die kurz vor dem zweiten Weltkrieg und später geboren sind. In Australien, den USA und den nordeuropäischen Ländern (z.B.

Skandinavien) war dieser Abwärtstrend bereits früher zu erkennen, da dort schon eher Programme zur Prävention des malignen Melanoms eingeführt wurden (Hall et al. 1999, Cohn-Cedermark et al. 2000, Severi et al. 2000, Marks 2002). Die konsequente Aufklärung der Bevölkerung führt zur Diagnose von zunehmend dünneren ($\leq 0,75$ statt 1,3 mm) und weniger invasiven Tumoren mit besserer Prognose (Hall et al. 1999, Garbe et al. 2000, Garbe und Blum 2001).

1.2.2 Geschlechts- und Altersverteilung

Auch die Geschlechtsverteilung bei Melanompatienten änderte sich mit der Zeit: Während in den 70er Jahren in Deutschland 2/3 aller Melanompatienten noch Frauen waren, ist die Verteilung heute mit einem Männeranteil von über 45% ausgeglichener (Crombie 1979, Garbe und Blum 2001).

Die Altersverteilung ist dagegen unverändert: Melanome können grundsätzlich in jedem Alter auftreten. Sie sind jedoch bei Kindern sehr selten (0,8 Fälle pro 1.000.000) und entwickeln sich bei ihnen meistens auf dem Boden von kongenitalen Nävuszellnävi (Ceballos et al. 1995). Statistisch gesehen entstehen die meisten Melanome zwischen dem 30. und 70. Lebensjahr. Während das Durchschnittsalter beim Auftreten eines nodulären malignen Melanoms bei 55 Jahren und bei einem superfiziell spreitenden Melanom bei 51 Jahren liegt, tritt das Lentigo-maligna-Melanom mit einem Durchschnittsalter von 68 Jahren eher später (nach dem 60. Lebensjahr) auf.

1.3 Risikofaktoren

Ein generell erhöhtes Risiko ein malignes Melanom zu entwickeln haben Menschen mit heller, lichtempfindlicher Haut (Hauttyp I und II nach Fitzpatrick), Sommersprossen, heller oder rötlicher Haarfarbe und blauen Augen (Holly et al. 1987, Weiß et al. 1990, Garbe 1992, Landi et al. 2001, Naldi et al. 2000, Fagnoli et al. 2004).

Besonders gefährdet sind Menschen mit einer großen Anzahl an Nävuszellnävi (Swerdlow et al. 1986, Holly et al. 1987, Garbe 1992, Naldi et al. 2000): So haben Menschen mit mehr als 50 Nävuszellnävi im Vergleich zu Personen mit weniger als 10 Nävi ein 4,8-fach höheres Risiko (Weiß et al. 1990), bzw. eine Odds Ratio von 4,7 (95% Konfidenzintervall, Fagnoli et al. 2004). Die Odds Ratio von 100 oder mehr Nävuszellnävi (mit einem Durchmesser ≥ 2 mm) im Vergleich zu bis zu vier Nävuszellnävi ist schon 7,7 ($p < 0,0001$) (Bataille et al. 1996).

Größte Gefahr ein malignes Melanom zu entwickeln besteht bei atypischen Nävi (Snels et al. 1999, Fagnoli et al. 2004): Die Odds Ratio von Leuten mit vier oder mehr atypischen Nävi im Vergleich zu Menschen ohne atypischen Nävus beträgt 28,7 ($p < 0,0001$, Bataille et al. 1996).

Ein erhöhtes Risiko für maligne Melanome wurde auch bei Patienten mit vorhergehenden Hauttumoren (Holly et al. 1987, Goggins und Tsao 2003) und anderen Tumoren, wie z.B. Brustkrebs, chronisch lymphatischer Leukämie oder Non-Hodgkin-Lymphomen

(Achiron et al. 2004, McKenna et al. 2003), beobachtet. Zudem ist das Risiko eines Melanompatienten an einem weiteren malignen Melanom zu erkranken gegenüber der Allgemeinbevölkerung mindestens zehnfach erhöht (Gummer et al. 2000).

Ein weiterer bedeutender Risikofaktor ist die Sonnenexposition. Dabei ist (mit Ausnahme der Lentigo-maligna-Melanome) weniger die kumulative Strahlendosis entscheidend, als vielmehr das kurzfristige, ungewohnte Aussetzen der Haut einer hohen Sonnenstrahlung mit der Folge von schweren Sonnenbränden (Holly et al. 1987, MacKie 1998). Dies bedeutet, dass Menschen, deren Haut z.B. beruflich bedingt an längere Sonneneinstrahlung gewöhnt ist, ein geringeres Risiko haben ein malignes Melanom zu entwickeln als Menschen, die in ihrer Freizeit bzw. im Urlaub sich dieser kurzfristig aussetzen (Osterlind et al. 1988, Fagnoli et al. 2004). Am meisten gefährdet sind Menschen, die in ihrer Kindheit oder Jugend (vor dem 20. Lebensjahr) verstärkt starker Sonne ausgesetzt waren und gehäuft schwere Sonnenbrände erlitten haben (Weinstock et al. 1989, Garbe 1992, Naldi et al. 2000).

Eine ungewohnt hohe UV-Belastung führt häufig zu aktivierenden Mutationen des Onkogens BRAF und/oder RAS. BRAF kodiert eine durch RAS regulierte Serin-/Thyrosinkinase, die über ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) und MEK (*mitogen activated ERK-activating kinase*) Zellzyklusprogression und Wachstum fördert (Reifenberger et al. 2004, Wellbrock et al. 2004). Welche Rolle diese Mutationen bei der Melanomentstehung spielen, ist noch nicht genau geklärt, da sie oft auch schon in Nävuszellnävi zu finden sind (Kumar et al. 2004, James et al. 2005). Allerdings findet man sie fast ausschließlich in Tumoren, die auf sonnenexponierten Hautarealen entstanden sind. Melanome an UV-geschützten Stellen (wie Mukosa-, Palmar-, Plantar- und Subungualmelanome) weisen im Gegensatz dazu häufig andere Mutationen (z.B. von CCND1, CDK4) auf, auf die im Folgenden näher eingegangen wird (Cohen et al. 2004, Edwards et al. 2004, Curtin et al. 2005).

8 bis 12% der malignen Melanome kommen familiär gehäuft vor (Greene 1999). In ungefähr 25% der betroffenen Familien kommen Mutationen des INK4a-ARF (bzw. CDKN2A) Gens vor (MacKie 1998, Hayward 2000, Piepkorn 2000). Dieses Gen liegt auf Chromosom 9p21 und kodiert für zwei Tumorsuppressorproteine: p16/INK4a und p14/ARF (bzw. p19/ARF in Mäusen), die normalerweise beide den Zellzyklus anhalten können, zum einen durch Inhibition der Cyclin-abhängigen Kinase 4/CDK4 zwischen der G1- und S-Phase, zum anderen in der G1- und G2-Phase des Zellzyklus, und auf diese Weise Tumorentstehung unterdrücken können (MacKie 1998, Sherr 2000, Della Torre et al. 2001, Soufir et al. 2004). Bei Mutation dieser Tumorsupressorgene kann dagegen Tumorentstehung nicht mehr verhindert werden.

Neben Mutationen des INK4a-ARF (bzw. CDKN2A) Gens gibt es in selteneren Fällen sowohl bei familiär als auch bei sporadisch auftretenden Melanomen Mutationen des CDK4 Gens, die ebenfalls zu einem blockierten Zellzyklusstopp zwischen der G1- und S-Phase und damit zu ungebremseter Tumorentstehung führen (Wolfel et al. 1995, Zuo et al. 1996, Guldberg et al. 1997, Soufir et al. 1998, Della Torre et al. 2001).

Patienten mit familiärem Melanom haben, neben dem generell erhöhten Risiko ein Melanom zu entwickeln (MacKie 2002), ein wesentlich höheres Risiko multiple Primär-

tumore (Anderson et al. 1967, Wallace et al. 1973) und Zweittumore (Slingluff et al. 1993) zu bekommen. Familiäre Melanome treten früher auf als sporadische (Durchschnittsalter 40 Jahre), scheinen aber insgesamt eine bessere Prognose zu haben (Slingluff et al. 1993).

Eine genetische Prädisposition zum malignen Melanom haben auch Patienten mit dem Syndrom der dysplastischen Nävi (Clark et al. 1978). Der Erbgang ist autosomal-dominant mit jedoch unvollständiger Penetranz. Einige Patienten weisen eine Mutation im *Cutaneous malignant melanoma-Gen 1* (CMM1, 1p36) auf. Bei betroffenen Patienten können sich schon sehr früh (vor dem 20. Lebensjahr) aus dysplastischen Nävi multiple maligne Melanome entwickeln. Bis zum 70. Lebensjahr ist dann bei fast allen Patienten mit Dysplastischen Nävi Syndrom mindestens ein malignes Melanom entstanden.

1.4 Ätiopathogenese

Die genaue Ätiologie des malignen Melanoms ist unbekannt. Es wird jedoch angenommen, dass sich das maligne Melanom in mehreren Stufen entwickelt. Am Anfang steht ein erster Gendefekt, der entweder ererbt oder durch UV-Licht ausgelöst wurde. Durch UV-Licht, später spontan durch die Instabilität des Genoms folgen weitere Mutationen, die die regelrechte Funktion der Melanomzellen zunehmend ändern und zur Selektion von aggressiveren Zellklonen führen (Garbe 1992, Hipfel et al. 2000, Trisal et al. 2004). So weist die Mehrzahl primär kutaner Melanome (ca. 95%) chromosomale Aberrationen auf. Besonders häufig kommt es dabei zu Verlusten von Nukleinbasen (Deletion und Verlust der Heterozygotität) auf Chromosom 9, 10, 6q und zu Zugewinnen auf Chromosom 7, 6p, 8q, 1q, 17, 20. In Melanommetastasen sind zudem weitere chromosomale Aberrationen nachweisbar (Greulich et al. 2000, Palmieri et al. 2000, Bastian 2002).

Die zunehmende Selektion von aggressiven Zellklonen wird vor allem durch ihre erlangte Fähigkeit begünstigt, auf verschiedene Weisen der Immunreaktion des Körpers zu entkommen, aber auch durch eine eventuell bestehende Immunschwäche/Immunsuppression des Patienten (McKenna et al. 2003).

Als sogenannte „Precursor“ (Vorläufer) des malignen Melanoms gelten die Lentigo maligna, der dysplastische Nävuszellnävi und der kongenitale Nävus (Crowson et al. 2002). Gewöhnliche Nävuszellnävi sind zwar keine Melanomvorläufer im engeren Sinne, jedoch entstehen 20–30% aller Melanome aus Nävuszellnävi. Weitere 10% entstehen auf dem Boden von kongenitalen Nävuszellnävi und ungefähr 2/3 auf unveränderter Haut.

Wie die Ausbildung gewöhnlicher und dysplastischer Nävuszellnävi mit der frühen Melanomentstehung zusammenhängt ist nicht genau bekannt. Bei den dysplastischen Nävi kann jedoch im Vergleich zu benignen Nävi eine bereits zunehmende genetische Instabilität (Verlust der Heterozygotität und Mikrosatelliteninstabilität) nachgewiesen werden (Rübber et al. 2002).

1.5 Diagnose

Die Diagnose des malignen Melanoms wird in der Regel klinisch gestellt. Hilfsmittel sind dabei das (inzwischen auch digitalisierte) Auflichtmikroskop (Pehamberger et al. 1987, Stolz et al. 1989, Braun-Falco et al. 1990, Wolff 2002) und die sogenannte **ABCD(E)-Regel**, in der wichtige klinische Zeichen des malignen Melanoms prägnant zusammengefasst sind (Friedmann et al. 1985, Abbasi et al. 2004):

- A** – Asymmetrie
- B** – Begrenzung unregelmäßig (teils scharf, teils unscharf begrenzt)
- C** – „Color“/Farbtöne sind unterschiedlich (braun, schwarz, blau, rot, weiß, grau)
- D** – Durchmesser ist größer als 5 mm
- (E** – Erhabenheit der Läsion)

Jeder Pigmenttumor, der neu auftritt, wächst oder sich bezüglich Farbe/Form/Oberfläche verändert, ist verdächtig. Weitere Warnzeichen sind Sekundärveränderungen wie Erosion, Blutung, Krusten und Juckreiz (Stolz und Landthaler 1994). Bei unklaren klinischen und dermatoskopischen Befunden kann man zusätzliche Informationen (wie z.B. über die Tumordicke) durch eine hochauflösende 20-MHz-Sonographie erhalten (Schmid-Wendtner 2000). Bei Verdacht auf ein malignes Melanom wird eine Exzision mit mindestens einem Zentimeter Sicherheitsabstand durchgeführt und die Diagnose anschließend histopathologisch gesichert. In Einzelfällen kann dabei die Verwendung von immunhistochemischen Markern (wie z.B. S100, HBM-45, NK1-C3, Vimentin) eine Entscheidungshilfe geben (Tronnier et al. 1997, Sander et al. 2000).

1.6 Klinik und Typeneinteilung

Nach Clark werden beim malignen Melanom klinisch und histologisch vier Typen unterschieden (Clark et al. 1969): Das superfiziell spreitende Melanom (SSM; ca. 60%), das noduläre maligne Melanom (NMM; ca. 20%), das Lentigo-maligna-Melanom (LMM; ca. 10%) und das akrolentiginöse Melanom (ALM; ca. 5% bei Kaukasiern, häufiger bei Afrikanern und Asiaten (Ridgeway et al. 1995)).

Die restlichen 5% sind Sonderformen wie amelanotische maligne Melanome (AMM), desmoplastische und neurotrope Melanome, verruköse maligne Melanome, polypöse maligne Melanome, Aderhautmelanome, Melanome der sichtbaren Schleimhäute, Melanome innerer Organe, Melanome auf großen kongenitalen Nävi, maligne Melanome bei unbekanntem Primärtumor und unklassifizierbare maligne Melanome (Orfanos et al. 1994).

Im Idealfall lassen sich die vier Haupttypen des malignen Melanoms klinisch sowie histopathologisch durch einige charakteristische Merkmale voneinander abgrenzen (Stolz und Landthaler 1994, Tronnier et al. 1997, Sander et al. 2000):

Superfiziell spreitendes Melanom (SSM)

Das superfiziell spreitende Melanom weist primär ein horizontales Wachstumsmuster auf. Es imponiert als flacher münzförmiger Herd mit unterschiedlichen Farbtönen (von rot über braun bis schwarz) und oft polyzyklischer Begrenzung. Bei weiterer Progression kommt es häufig zu weißen Regressionszonen. Es tritt bevorzugt an Rücken, Brust und Extremitäten auf. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 51 Jahren. Die Anamnese beträgt in der Regel 3 bis 5 Jahre. Histopathologisch ist es durch eine Akanthose der Epidermis und eine intraepidermale Aussaat von pagetoiden, atypischen Melanozyten (einzeln oder zu Nestern aggregiert) gekennzeichnet. Die Veränderungen sind zum Rand hin meist unscharf begrenzt. Bei Progression kommt es zur Infiltration der Dermis und zum Auftreten von Knoten.

Primär noduläres malignes Melanom (NMM)

Das primär noduläre maligne Melanom ist durch ein vorwiegend vertikales Wachstum gekennzeichnet. Klinisch findet sich meistens ein scharf begrenzter, erhabener, rot-schwarzer bis braun-schwarzer Knoten, der sich relativ rasch innerhalb von Monaten oder wenigen Jahren entwickelt. Das mittlere Erkrankungsalter beträgt 55 Jahre und die bevorzugten Lokalisationen sind Rücken, Brust und Extremitäten. Histologisch setzt sich das primär noduläre maligne Melanom aus großen epitheloidzelligen, aus spindelförmigen und/oder aus kleinen malignen Melanozyten zusammen, die zwar nach lateral scharf begrenzt sind, jedoch früh vertikales Tumorstadium mit Infiltration des Korioms zeigen.

Lentigo-maligna-Melanom (LMM)

Das Lentigo-maligna-Melanom entwickelt sich auf dem Boden einer oft schon Jahre bis Jahrzehnte lang bestehender melanotischen Präkanzerose, der Lentigo maligna. Es findet sich überwiegend bei älteren Menschen (mittleres Alter: 68 Jahre) in sonnenexponierter und lichtgeschädigter Haut (Gesicht, Hals, Hände, Arme, Unterschenkel). Die LMM stellt sich klinisch als planer, meist relativ großer (2–6cm) Herd dar, dessen Farbe zwischen hell-, dunkelbraun und schwarz, oder auch zwischen weiß-grau (Regressionsareale) und blau-grau variiert. Dazwischen finden sich dunkelbraune bis schwarze Knötchen mit invasivem, vertikalem Wachstum. Histopathologisch findet man im Bereich der planen Tumorareale in den Basalschichten Nester von atypischen, meist spindelförmigen Melanozyten, die entlang der Hautadnexe auch in die Tiefe wachsen können. In den knotigen Arealen dehnen sich die malignen Zellen vertikal in beide Richtungen aus. Die Haut ist als Zeichen der aktinischen Schädigung durch ausgeprägte aktinische Elastose gekennzeichnet.

Akrolentiginöses malignes Melanom (ALM)

Das akrolentiginöse maligne Melanom befindet sich primär im Bereich der Palmar, Plantar oder gelegentlich im Bereich der Schleimhäute. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 63 Jahren. Bei dunkelhäutigen oder orientalischen Völkern ist es der häufigste Melanomtyp (Ridgeway et al. 1995), wohingegen es in der hellhäutigen Bevölkerung

mit einem Anteil von 5% eher zu den selteneren Melanomtypen zählt. Typisch ist eine plane, zum Teil unscharf begrenzte, hellbraun bis schwarze Makula, auf der sich zentral oft pigmentierte, aber auch amelanotische Knoten entwickeln können. Im Bereich des Nagelbettes kann das ALM zunächst als subunguale Verfärbung imponieren oder durch Nagelwachstumsstörungen auffallen. Histologisch ist es durch eine verbreiterte Epidermis mit kompakter Hornschicht charakterisiert, die von einzelnen oder in unregelmäßigen Nestern angeordneten atypischen, dendritischen Melanozyten durchsetzt ist. Häufig reichen die atypischen Melanozyten bis in die Schweißdrüsenausführungsgänge.

1.7 Prognosefaktoren, Stadieneinteilung und Prognose

1.7.1 Prognosefaktoren

Die Prognose des malignen Melanoms wird von zahlreichen Faktoren beeinflusst. Als einer der wichtigsten Faktoren zeigte sich immer wieder die Masse des Tumors zum Zeitpunkt der Diagnose bzw. Therapie (Rigel et al. 1985, Garbe et al. 1995, MacKie et al. 1995, Dong et al. 2000, Marghoob et al. 2000). Zum Einschätzen der Tumormasse wird der sogenannte **Invasionslevel nach Clark** histologisch bestimmt, der angibt bis in welche Hautschichten der Tumor maximal eindringt (Clark et al. 1969, Tronnier et al. 1997, Sander et al. 2000):

Level I	Tumorzellen innerhalb der Epidermis (Melanoma in situ)
Level II	Tumorzellen im oberen Stratum papillare
Level III	Tumorzellen füllen das Stratum papillare völlig aus
Level IV	Tumorzellen reichen in das Stratum reticulare
Level V	Tumorzellen reichen in die Subkutis

Wegen der geringeren Varianz bei der Beurteilung durch unterschiedliche Untersucher und wegen der noch größeren prognostischen Aussagekraft wurde in den letzten Jahren der Clark-Level weitgehend von der **Tumordicke nach Breslow** abgelöst. Dabei wird am histologischen Präparat die vertikale Ausdehnung des Melanoms von der obersten Schicht des Stratum granulosum bis zum tiefsten Invasionspunkt in Millimetern gemessen (Breslow 1970, Clark et al. 1989, Morton et al. 1991, Gamel et al. 1993, Tronnier et al. 1997, Buzaid et al. 1995, Sander et al. 2000, Staius Muller et al. 2001, Balch et al. 2001b, Zettersten et al. 2002, Roka et al. 2005).

Als weiterhin sehr wichtiger prognostischer Parameter erwies sich in vielen Studien die **Ulzeration**. Als Ulzeration versteht man dabei das vollständige Fehlen der Epidermis über einem Teil des Melanoms. Bei vergleichbaren Tumordicken weisen ulzerierte Melanome eine deutlich schlechtere Prognose auf als nicht-ulzerierte Melanome (Rigel et al. 1985, MacKie et al. 1995, Tronnier et al. 1997, Dong et al. 2000, Balch et al. 2001b, Staius Muller et al. 2001, Zettersten et al. 2002, Roka et al. 2005).

Der **histologische Typ des Primärtumors** hat ebenfalls Einfluss auf die Prognose (Garbe et al. 1995, Zettersten et al. 2002): So hat das noduläre Melanom eine besonders ungünstige Prognose, da es durch sein primär vertikales Tumorstadium rasch die Basalmembran durchbricht. Auch Tumore mit unbekanntem Primärtumor haben in der Regel eine schlechtere Prognose (Morton et al. 1991, Ross et al. 2004). Patienten mit multiplen Primärtumoren weisen dagegen keinen Nachteil bezüglich der Überlebenszeit auf (Slingluff et al. 1993).

Als unabhängiger Prognosefaktor spielt nicht zuletzt auch die **Lokalisation des Primärtumors** eine wichtige Rolle: Patienten mit malignen Melanomen an den Extremitäten (vor allem Waden, Fersen, Oberarmen; mit Ausnahme der Hände/Füße) und im Gesicht (inklusive Stirn, Schläfen, Backen) haben eine bessere Prognose als Patienten mit Melanomen am Stamm (vor allem mittlerer und unterer Rücken, Brust, Dekolleté), am Hals und am behaarten Kopf. Besonders schlecht ist die Prognose bei Befall der Akren (Rigel et al. 1985, Reintgen et al. 1987, Clark et al. 1989, Coit et al. 1991, Morton et al. 1991, Gamel et al. 1993, Garbe et al. 1995, MacKie et al. 1995, Keilholz et al. 1996, Dong et al. 2000, Manola et al. 2000, Konstadoulakis et al. 2002, Gillgren et al. 2005).

Bei Metastasierung in die Lymphknoten korreliert die Prognose stark mit dem **Ausmaß und der Anzahl der befallenen Lymphknoten bzw. -wege** (Coit et al. 1991, Morton et al. 1991, Buzaid et al. 1995, Balch et al. 2001b, Konstadoulakis et al. 2002, Jimenez et al. 2005). Von besonderer prognostischer Relevanz ist dabei, ob der sogenannte Sentinel-Lymphknoten (Wächter-Lymphknoten) bereits von Tumorzellen befallen ist oder nicht (Stenius Müller et al. 2001, Lejeune 2002, Zettersten et al. 2002, Roka et al. 2005).

Bei Fernmetastasen hängt die Prognose zum einen von der **Anzahl**, aber auch von der **Lokalisation der Fernmetastasen** ab: So haben nicht lokoregionäre kutane oder subkutane Metastasen und Lymphknotenmetastasen eine bessere Prognose als viszerale Metastasen. Bei den letzteren haben gastrointestinale Metastasen sowie Hirnmetastasen eine besonders schlechte und Lungenmetastasen eine etwas bessere Prognose (Keilholz et al. 1996, Eton et al. 1998, Manola et al. 2000, Balch et al. 2001b).

Im Endstadium der Erkrankung hat sich eine **Erhöhung der Laktatdehydrogenase und des Albumins** im Serum als unabhängiger prognostischer Faktor erwiesen (Sirott et al. 1993, Keilholz et al. 1996, Eton et al. 1998, Manola et al. 2000). Einige Studien weisen darauf hin, dass noch weitere Laborparameter, wie z.B. eine erhöhte alkalische Phosphatase oder abnormale Plättchenwerte, mit einer schlechteren Prognose verbunden sein könnten (Keilholz et al. 1996, Manola et al. 2000).

1.7.2 Stadieneinteilung

Um maligne Melanome einheitlich erfassen und bewerten zu können und um einzelne Patienten definierten, prognostischen Gruppen mit entsprechender Therapie und Nachsorge zuführen zu können, werden die malignen Melanome nach der TNM-Klassifikation in Stadien eingeteilt. Dabei beurteilt die T-Klassifikation den primären Tumor, die N-Klassifikation den Lymphknotenstatus (Noduli) und die M-Klassifikation

den Status der Fernmetastasierung. Es wurden bisher schon mehrere Klassifikationen und Stadieneinteilungen aufgestellt, die jedoch alle mehr oder weniger umstritten waren. Erst die neue Stadieneinteilung der AJCC (American Joint Committee on Cancer) von 2001 (**Tabelle 1 und 2**) stößt auf allgemeine Akzeptanz, da in ihr versucht wird den wichtigsten unabhängigen Prognosefaktoren – basierend auf Untersuchungen an über 40.000 Melanompatienten – Rechnung zu tragen (Balch et al. 2000, Guerry et al. 2004).

T-Klassifikation	Tumordicke	Ulzeration (+ oder -)
T1	≤ 1,0 mm	a: - und Clark Level II/III b: + oder Clark Level IV/V
T2	1,01–2,0 mm	a: - b: +
T3	2,01–4,0 mm	a: - b: +
T4	≥ 4,0 mm	a: - b: +
N-Klassifikation	Anzahl der befallenen Lymphknoten (LK)	nodale Tumorlast
N1	1	a: Mikrometastasen b: Makrometastasen
N2	2–3	a: Mikrometastasen b: Makrometastasen c: In-Transit- bzw. Satellitenmetastasen ohne LK-Metastasen
N3	≥ 4 oder LK-Konglomerate oder In-Transit- bzw. Satellitenmetastasen mit LK-Metastasen	
M-Klassifikation	Lokalisation	Serum-Laktatdehydrogenase
M1a	nicht lokoregionäre kutane, subkutane oder LK-Metastasen	normal
M1b	Lungenmetastasen	normal
M1c	alle anderen viszerale Metastasen, alle Fernmetastasen	normal erhöht

Tabelle 1: Einteilung des malignen Melanoms nach der TNM-Klassifikation der AJCC von 2001

Stadium	klinische Stadieneinteilung			pathologische Stadieneinteilung		
	T	N	M	T	N	M
0	Tis (in situ)	N0	M0	Tis (in situ)	N0	M0
IA	T1a	N0	M0	T1a	N0	M0
IB	T1b/T2a	N0	M0	T1b/T2a	N0	M0
IIA	T2b/T3a	N0	M0	T2b/T3a	N0	M0
IIB	T3b/T4a	N0	M0	T3b/T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0	T4b	N0	M0
III	jedes T	N1–N3	M0			
IIIA				T1–4a T1–4a	N1a N2a	M0 M0
IIIB				T1–4b T1–4b T1–4a T1–4a T1–4a/b	N1a N2b N1b N2b N2c	M0 M0 M0 M0 M0
IIIC				T1–4b T1–4b jedes T	N1b N2b N3	M0 M0 M0
IV	jedes T	jedes N	jedes M1	jedes T	jedes N	jedes M1

Tabelle 2: Klinische und pathologische Stadieneinteilung des malignen Melanoms nach der Klassifikation der AJCC von 2001

In ihr werden folgende Erkenntnisse berücksichtigt (Buzaid et al. 1995, Buzaid et al. 1997, Balch et al. 2000, Balch et al. 2001a und b): Die wichtigsten prognostischen Faktoren bei noch nicht metastasierten Melanomen (Stadium I und II) sind die Tumordicke und Ulzeration. Der Invasionslevel nach Clark liefert dagegen nur bei Patienten mit einer Tumordicke ≤ 1 mm signifikante, prognostische Informationen. Statistisch am günstigsten erwiesen sich Tumordickengrenzen von 1mm, 2mm und 4 mm (im Gegensatz zu den früher geltenden Grenzen von 0,75mm, 1,5mm und 4mm). Bei Patienten mit Lymphknotenmetastasen (Stadium III) zeigte die Größe der befallenen Lymphknoten (\leq oder > 3 cm), wie sie in den bisherigen Stadieneinteilungen verwendet wurde, keine prognostische Aussagekraft. Vielmehr ist die Anzahl der befallenen Lymphknoten für das Überleben des Patienten entscheidend (Buzaid et al. 1995). Ein weiterhin entscheidendes Kriterium bezüglich der Prognose ist, ob die Lymphknotenmetastasen nur mikroskopisch (histologisch) oder bereits makroskopisch sichtbar sind. Patienten mit Satellitenmetastasen (Tumornester bis zu 2 cm vom Primärtumor entfernt) oder In-Transit-Metastasen (Tumornester mindestens 2 cm vom Primarius entfernt) haben eine ähnlich schlechte Prognose wie Patienten mit Lymphknotenmetastasen und

zählen deshalb nun als eigene Staging-Entität zu Stadium III (N2). Ein Zusammentreffen von Satelliten- oder In-Transit-Metastasen mit Lymphknotenmetastasen verschlechtert die Prognose noch weiter (N3). Zudem werden alle Patienten mit Stadium I, II und III von vornherein schlechter eingestuft, wenn ihr Primärtumor ulzeriert ist. Bei Fernmetastasen (Stadium IV) werden zum einen die unterschiedlichen Prognoseaussichten verschiedener Metastaselokalisationen berücksichtigt: Nicht-viszerale Metastasen haben eine bessere Prognose als viszerale Metastasen, wobei Lungenmetastasen für den Zeitraum eines Jahres einen weiteren kleinen Überlebensvorteil aufweisen (Balch et al. 2001b). Zum anderen wird die prognostische Relevanz von erhöhten LDH-Werten berücksichtigt. Um neuer Staging-Informationen, die durch intraoperatives Lymphmapping oder Sentinel-Lymphknoten-Biopsie gewonnen werden konnten, Rechnung tragen zu können, wird in der neuen AJCC-Klassifikation von 2001 erstmals zwischen einer klinischen und einer pathologischen Stadieneinteilung unterschieden.

1.7.3 Prognose

Die Überlebensraten nehmen in den höheren Tumorstadien kontinuierlich ab. So ergaben sich in der Studie von Balch (Balch et al. 2001a), auf deren Ergebnissen auch das neue AJCC-Staging-System beruht, folgende 5-Jahres-Überlebensraten: Die 5-Jahres-Überlebensrate von Patienten mit Stadium I liegt zwischen 95 und 89%. Bei Stadium II reicht sie von 77 bis 45%. Bei Lymphknotenmetastasen, Satelliten- und In-Transit-Metastasen (Stadium III) reduziert sich die 5-Jahres-Überlebensrate weiter auf 70 bis 27%. Patienten mit Fernmetastasen haben eine 5-Jahres-Überlebensrate von nur noch 19 bis 7%.

Tritt eine Tumorprogression auf, so erscheint sie bei 20% der Patienten als Lokalrezidiv, bei 50% als Lymphknotenmetastase und bei 30% als Fernmetastase (Braun-Falco et al. 1986, Francken et al. 2004). Etwa 80% der Progressionsereignisse treten in den ersten drei Jahren nach der Tumorentfernung auf, etwa 90% innerhalb von 5 Jahren. Obwohl die Chancen auf Heilung mit der Länge der rezidivfreien Zeit steigt, ist eine Tumorprogression nach über 10 Jahren nicht selten (Braun-Falco et al. 1986, Reintgen et al. 1987, Gamel et al. 2002). Sogar nach 20 bis 30 Jahren können Spätmetastasierungen auftreten. Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt bei einem lokalen Rezidiv 49% und die Langzeit-Überlebensrate (> 10 Jahre) ungefähr 35% (Dong et al. 2000). Die durchschnittliche Überlebenszeit bei Fernmetastasen beträgt 6 bis 7 Monate.

1.8 Tumornachsorge

Um auf der einen Seite möglichst früh Tumorprogression sowie Zweittumoren zu erkennen und durch frühzeitige Therapie die Überlebenszeit vieler Patienten zu verlängern, und um auf der anderen Seite den Patienten besser begleiten und führen zu können (Gummer et al. 2000, Dummer et al. 2001), sollte mindestens 10 Jahre, am besten ein Leben lang eine Tumornachsorge durchgeführt werden (Orfanos et al. 1994, DiFronzo et al. 2001). Besonders engmaschig sollte sie in den ersten 2–3 Jahren nach Erstdiagnose sein, da Tumorprogression meistens in diesem Zeitraum stattfindet

(Gummer et al. 2000). Desweiteren sollte sich – allein schon aus Kostengründen, aber auch um dem Patienten unnötigen Zeitaufwand und psychische Belastung zu ersparen – der Umfang und die Häufigkeit der Nachsorgeuntersuchungen nach dem Risiko für Tumorprogression richten, das im wesentlichen von der Tumordicke bestimmt wird (Gummer et al. 2000, DiFronzo et al. 2001, Dummer et al. 2001).

Besonders effektiv sowie kostengünstig ist die klinische Untersuchung/Anamnese und die Lymphknoten-sonographie (Bassères et al. 1995, Weiss et al. 1995, Hofmann et al. 2002, Garbe et al. 2003b). So wurden in einer Studie von Garbe (Garbe 2002, Garbe et al. 2003b) allein durch die klinische Untersuchung 50% der Rezidive entdeckt. Weitere 21% der Rezidive konnten durch die Lymphknoten-Sonographie gefunden werden. Dabei konnte der Großteil der Rezidive (48%) in einem frühen Stadium aufgespürt werden, so dass diese Patienten eine signifikant bessere Überlebenschance hatten. Andere bildgebende Verfahren (wie z.B. Röntgen-Thorax, Abdomen-Sonographie) und das Routinelabor alleine hatten dagegen beim Anzeigen von Rezidiven im Rahmen der Tumornachsorge von Melanompatienten mit Stadium I, II, III nur eingeschränkten Wert und sind zudem sehr teuer (Bassères et al. 1995, Weiss et al. 1995, Hofmann et al. 2002). Der routinemäßige Einsatz von Computertomographie erwies sich sogar als nutzlos (Bassères et al. 1995).

Es gibt keine international gültigen Richtlinien zur Tumornachsorge. Sie ist im englischen Sprachraum weniger streng organisiert als im deutschen (Eggermont 1996, Négrier et al. 2001, Garbe 2002). Von der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft werden abhängig vom Tumorstadium/Tumordicke Nachsorgeuntersuchungen in folgenden Intervallen empfohlen (**Tabelle 3**) (Garbe et al. 2005):

Untersuchungsintervalle in Monaten (Tabelle 3)				
Stadium Tumordicke	I < 1mm	I + II > 1mm	IIc + III	IV
Körperliche Untersuchung 1.–5. Jahr	6	3	3	individuell
Körperliche Untersuchung 6.–10. Jahr	12	6–12	6	individuell
Lymphknoten- sonographie 1.–5. Jahr	keine	6	3–6	individuell
Blutunter- suchung 1.–5. Jahr	keine	3–6	3–6	individuell
Bildgebende Untersuchung 1.–5. Jahr	keine	keine (bei adjuvanter Therapie: 6–12)	6	individuell

Bei der körperlichen Untersuchung wird das gesamte Hautorgan inspiziert. Das Operationsareal des Primärtumors, die Transitstrecke und die regionären, sowie übrigen Lymphknotenstationen werden palpiert und inspiziert. Das Labor beinhaltet standardmäßig die Routinelaborparameter (Blutbild, LDH, Leber- und Nierenwerte) und zusätzlich die Tumormarker S-100B/MIA, wobei nach den neuesten Leitlinien für die Rezidiverkennung allein S-100B als geeignet gilt. Zu den bildgebenden Untersuchungen gehören eine Abdomen-Sonographie und ein Röntgen-Thorax oder CT bzw. MRT oder PET. Bei Patienten mit Fernmetastasen wird die Tumornachsorge individuell gestaltet. Weitere wichtige Aufgaben bei der Tumornachsorge sind die Unterweisung des Patienten in Techniken der Selbstuntersuchung und das Angebot von psychoonkologischer Betreuung, falls dies vom Patienten gewünscht wird (Gummer et al. 2000, Garbe et al. 2005).

2. Tumormarker

2.1 Definition, allgemeine Anforderungen, Anwendung

Tumormarker sind Moleküle, die von Tumorzellen selbst oder als Reaktion auf den Tumor (z.B. als Reaktion des Immunsystems) gebildet werden und im Blut oder anderen Körperflüssigkeiten nachweisbar sind. Meistens handelt es sich dabei um Proteine, seltener um Kohlenhydrate oder Lipide, die primär zell- oder gewebsständig sind und sekundär entweder aktiv in den Interzellularraum abgegeben werden oder passiv nach Zerfall der Zelle in diesen gelangen.

Zum Nachweis und zur Messung der Tumormarker im klinischen Alltag sollte ein kommerziell erhältliches, einfaches, standardisiertes und reproduzierbares Testsystem zur Verfügung stehen.

Der Tumormarker sollte für eine bestimmte Tumorentität spezifisch sein und sollte bei gesunden Menschen bzw. Patienten mit anderen Erkrankungen/Tumoren nicht oder nur in geringem Maße vorhanden sein (Kriterium der Spezifität). Desweiteren sollte der Tumormarker mit einer hohen Wahrscheinlichkeit den Tumor erkennen können. Dieses Kriterium zur Beurteilung der Validität des Tumormarkers bezeichnet man als Sensitivität. Schließlich sollte es der Tumormarker ermöglichen zwischen gesunden Patienten (ohne Tumor) und Patienten mit Tumor zu unterscheiden. Hierbei gibt der positiv-prädiktive Wert die Wahrscheinlichkeit an, dass bei positivem Testergebnis ein Tumor vorliegt, und der negativ-prädiktive Wert, dass ein Patient mit negativem Testergebnis tumorfrei ist.

Um im klinischen Einsatz den Verlauf und die Therapie von malignen Erkrankungen optimal kontrollieren zu können, sollte der Tumormarker möglichst mit der Tumormasse korrelieren. D.h. unter Therapie oder im Krankheitsverlauf entspricht ein Spiegelabfall einer partiellen oder kompletten Remission, ein gleichbleibender Spiegel spiegelt eine Konstanz der Tumormasse wider, und steigende Werte reflektieren eine Progression der Erkrankung. Ein idealer Tumormarker besitzt zudem prognostische Aussagekraft, die es dem Arzt ermöglicht, Patienten mit einem erhöhten Risiko für ein Rezidiv oder eine Metastasierung zu erkennen und entsprechenden Nachsorge- bzw. Therapieschemata zuzuführen. Tumormarker lassen sich also zum Screening, zur Diagnosestellung, zur Verlaufskontrolle, zum Therapiemonitoring und zum Einschätzen der Prognose einsetzen (Gross 1986, Lamerz und Mann 1986, Fateh-Moghadam und Stieber 1996, Ugurel 2005).

2.2 Tumormarker des malignen Melanoms

Schon seit Jahren wird von verschiedenen Arbeitsgruppen versucht Tumormarker für das maligne Melanom zu etablieren, welche die oben genannten Kriterien erfüllen. Dabei werden zum einen nicht-zelltyp- bzw. -gewebespezifische und zum anderen zelltyp- bzw. gewebespezifische Tumormarker untersucht.

Zu der Gruppe der nicht-zelltyp- bzw. -gewebespezifischen Tumormarker gehören u.a.:

- **Proangiogenetische Faktoren:** Sie spielen in der Neovaskularisation von gutartigem Gewebe sowie Tumorzellverbänden eine Rolle und werden in Tumorzellen aufgrund der starken Wachstumskapazität in größerer Menge produziert. Vertreter sind **VEGF** (*vascular endothelial growth factor*), **bFGF** (*basic fibroblast growth factor*), **Interleukin-8**.
- **Adhäsionsmoleküle:** Sie kommen sowohl auf Tumorzellen als auch auf gutartigen Zelltypen vor und dienen zum einen der Anheftung an umgebende Strukturen, zum anderen sind sie für die Migration und Metastasierung von Tumorzellen von Bedeutung. Beispiele sind **sICAM** (*soluble intracellular adhesion molecule 1*) und **sVCAM** (*soluble vascular cell adhesion molecule 1*).
- **HLA-Moleküle:** Die humanen Leukozytenantigene dienen der Präsentation und Erkennung fremder (beispielsweise viraler oder maligner) Strukturen auf der Oberfläche von verschiedenen benignen und malignen Zellen durch das Immunsystem. Beispiele sind **lösliche HLA-DR** und **lösliche HLA-Klasse-I**.
- **Zytokine und Zytokinrezeptoren:** Als Botenstoffe des Immunsystems werden sie sowohl von benignen als auch malignen Zelltypen exprimiert. Vertreter sind **Interleukin-6**, **Interleukin-8**, **Interleukin-10** und der **lösliche Interleukin-2-Rezeptor**.
- **Sonstige:** Moleküle, die mit tumorspezifischen Stoffwechselfunktionen oder entzündlichen Vorgängen im Rahmen einer Tumorerkrankung assoziiert sind wie z.B. **LDH** (Laktatdehydrogenase) oder **C-reaktives Protein**.

Zu der Gruppe der weitgehend zelltyp- bzw. gewebespezifischen Tumormarker gehören u.a.:

- **Differenzierungsantigene:** Sie werden im Rahmen der Differenzierung eines Zelltyps exprimiert bzw. produziert und kommen in der Regel sowohl in gutartigen, als auch in bösartigen Zellen eines Typs vor. Dazu zählen beispielsweise Enzyme der Melaninsynthese in melanozytären Zellen (**Tyrosinase**) oder Metaboliten des Melaninstoffwechsels (**5-S-Cysteinyldopa**, **L-Dopa/L-Tyrosin**, **6-Hydroxy-5-Methoxyindol-2-Carboxylsäure**). Weitere Beispiele sind **S100-beta** („soluble“, d.h. löslich in 100% Ammoniumsulfat), **MART-1** (*melanoma antigen recognized by T cells*) und **MIA** (*melanoma inhibitory activity*), wobei letztere vornehmlich von malignen Melanomzellen exprimiert werden.
- **Tumorassoziierte Antigene:** Sie werden im Rahmen verschiedener Tumoren vermehrt exprimiert. Beispiele sind **NSE** (Neuronenspezifische Enolase), **LASA-P** (*Lipid-bound sialic acid*) und **TA90-Immunkomplex** (*90-kd tumor-associated antigen immune complex*).

Da alle bislang untersuchten Tumormarker in ihrer Serumkonzentration stark mit der Tumorlast korrelieren, gibt es derzeit keine geeigneten Tumormarker zum Screening oder zur Diagnostik von Primärmelanomen, die nur eine geringe Tumorlast aufweisen. Im Rahmen der Verlaufskontrolle sollen Erkrankungsrezidive bzw. -progression bei

klinisch tumorfreien Patienten möglichst früh erkannt werden. Hierzu eignen sich einige der momentan verfügbare Serummarker, besonders wenn sie stark mit der Tumorlast assoziiert sind und nach Möglichkeit noch melanomspezifisch exprimiert werden. Auch für das Therapiemonitoring von bereits metastasierten Patienten eignen sich die derzeit verfügbaren Tumormarker. Dagegen gibt es für postoperativ tumorfreie Patienten, die keine oder eventuell nur eine geringe Tumorlast aufweisen, momentan keine geeigneten Serummarker, um den Erfolg einer adjuvanten Therapie überprüfen zu können. Das gleiche gilt für die prognostische Einschätzung der Gesamtüberlebenschance bzw. des progressionsfreien Intervalls: Nur bei bereits metastasierten Melanompatienten, nicht jedoch bei der großen Gruppe der tumorfreien Melanompatienten können Serummarker als prognostische Indikatoren angewendet werden, da die Überlebensprognose stark mit der Tumorlast korreliert und diese wiederum erst ab einer bestimmten Größe von den momentan verfügbaren Tumormarkern angezeigt wird (Brochez und Naeyaert 2000, Ugurel 2005). Im klinischen Alltag werden hauptsächlich S100-beta, MIA und LDH eingesetzt. Alle anderen erwähnten Tumormarker konnten sich nicht durchsetzen oder werden bislang rein experimentell verwendet.

3. Melanoma Inhibitory Activity (MIA)

3.1 Entdeckung und Klonierung

MIA wurde erstmals – bei dem Versuch autokrin sezernierte, Tumorwachstum-hemmende Proteine aus Zellkulturen zu gewinnen – im Zellkulturüberstand einer Melanomzelllinie (HTZ-19dM) entdeckt und wegen seiner proliferationshemmenden Fähigkeit *in vitro* als „Melanoma inhibitory activity“ bezeichnet (Bogdahn et al. 1987 und 1989, Apfel et al. 1992). Nach Aufreinigung und partieller Sequenzierung des Proteins konnten mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion Teile der MIA-mRNA amplifiziert und sequenziert werden. Ein so gewonnenes cDNA-Fragment wurde als Sonde in einem Phagenscreen eingesetzt, um einen vollständig kodierenden cDNA-Klon von MIA zu isolieren (**Abbildung 1**) (Blesch et al. 1994).

```

1      CCA GCA CCC CCT TGC TCA CTC TCT TGC TCA CAG TCC ACG ATG GCC CGG
1      Met Ala Arg

49     TCC CTG GTG TGC CTT GGT GTC ATC ATC TTG CTG TCT GCC TTC TCC GGA
4     Ser Leu Val Cys Leu Gly Val Ile Ile Leu Leu Ser Ala Phe Ser Gly

97     CTT GGT GTC AGG GGT GGT CCT ATG CCC AAG CTG GCT GAC CGG AAG CTG
20    Pro Gly Val Arg Gly Gly Pro Met Pro Lys Leu Ala Asp Arg Lys Leu

145    TGT GCG GAC CAG GAG TGC AGC CAC CCT ATC TCC ATG GCT GTG GCC CTT
36    Cys Ala Asp Gln glu Cys Ser His Pro Ile Ser Met Ala Val Ala Leu

193    CAG GAC TAC ATG GCC CCC GAC TGC CGA TTC CTG ACC ATT CAC CGG GGC
52    Gln Asp Tyr Met Ala Pro Asp Cys Arg Phe Leu Thr Ile His Arg Gly

241    CAA GTG GTG TAT GTC TTC TCC AAG CTG AAG GGC CGT GGG CGG CTC TTC
68    Gln Val Val Tyr Val Phe Ser Lys Leu Lys Gly Arg Gly Arg Leu Phe

289    TGG GGA GGC AGC GTT CAG GGA GAT TAC TAT GGA GAT CTG GCT GCT CGC
84    Trp Gly Gly Ser Val Gln Gly Asp Tyr Tyr Gly Asp Leu Ala Ala Arg

337    CTG GGC TAT TTC CCC AGT AGC ATT GTC CGA GAG GAC CAG ACC CTA AAA
100   Leu Gly Tyr Phe Pro Ser Ser Ile Val Arg Glu Asp Gln Thr Leu Lys

385    CCT GGC AAA GTC GAT GTG AAG ACA GAC AAA TGG GAT TTC TAC TGC CAG
116   Pro Gly Lys Val Asp Val Lys Thr Asp Lys Trp Asp Phe Tyr Cys Gln

433    TGA GCT CAG CCT ACC GCT GGC CCT GCC
132   End

```

Abbildung 1: Humane MIA-cDNA- und -Protein-Sequenz (Blesch et al. 1994)

3.2 MIA-Gen und MIA-Protein

Das 2 kb umfassende MIA-Gen konnte auf dem humanen Chromosom 19q13.32 lokalisiert werden (Koehler et al. 1996). Der Aufbau des MIA-Gens und seines Promotors wurden intensiv erforscht (Bossert et al. 1996). So kodieren 4 Exons für ein 131-Aminosäuren-langes Vorläuferprotein, das schließlich nach Abspaltung eines

Sekretionssignals als 107-Aminosäuren-langes und 11 kDa schweres Protein sezerniert wird (Blesch et al. 1994). MIA ist bei 100°C über 3 Minuten hitzestabil, stabil gegen Säure und kann durch Trypsin verdaut werden (Bogdahn et al. 1989).

MIA ist ein kleines, aus einer einzelnen Domäne bestehendes, globuläres Protein. In Lösung faltet es sich in SH3 (*Src homology 3*) Domänen ähnlicher Weise, wobei zwei aus jeweils drei bzw. fünf Bündeln bestehende, antiparallele Betablätter aufeinander senkrecht stehen. Zusätzlich zu der SH3-ähnlichen Faltung besitzt MIA zwei Disulfidbrücken und ein weiteres antiparalleles Betablatt, das aus 20-Aminosäuren-langen Verlängerungen am C- und N-Ende gebildet wird. MIA ist das erste extrazelluläre Protein mit SH3-ähnlicher Faltung und damit der erste Vertreter einer ganzen Familie von sezernierten Proteinen mit SH3-ähnlicher Struktur (weitere Mitglieder dieser Familie sind OTOR/FDP/MIAL, MIA2 und TANGO) (**Abbildung 2**) (Lougheed et al. 2001 und 2002, Stoll et al. 2001, Bosserhoff und Büttner 2002).

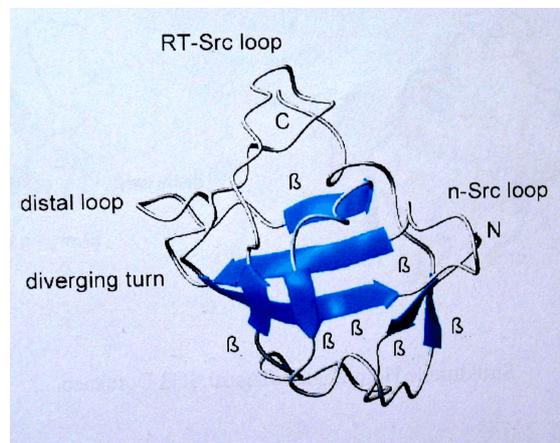


Abbildung 2: Dreidimensionale Struktur des MIA-Proteins in Lösung (Stoll et al. 2001)

3.3 Funktion von MIA

Strukturell bedingt kann sich MIA an Laminin und Fibronectin (genaugenommen Typ III-Wiederholungen von Fibronectin) binden und so diese extrazellulären Bindungsstellen der Matrixproteine für Zelloberflächenmoleküle/Integrine (insbesondere $\alpha 4\beta 1$ und $\alpha 5\beta 1$ Integrine) maskieren. Die Melanomzellen können dadurch nicht mehr an die extrazelluläre Matrix gebunden werden und lösen sich ab. MIA führt auf diese Weise zum „aktiven“ Ablösen von Melanomzellen aus dem Gewebeverband (*active detachment*) und somit zu einer gesteigerten Motilität, wodurch die Fähigkeit zur Metastasierung begünstigt wird (**Abbildung 3**) (Bosserhoff et al. 1998 und 2003, Stoll et al. 2001).

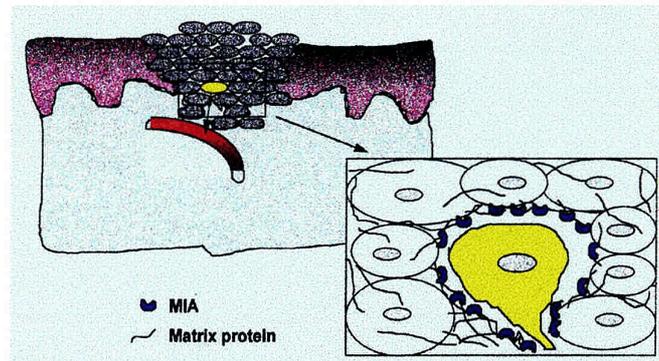


Abbildung 3: Schematische Darstellung der MIA-Funktion (Bosserhoff et al. 1998)

Diese funktionelle Rolle von MIA in vivo – die ganz der ursprünglich in vitro gefundenen Funktion widerspricht – konnte durch verschiedene Experimente bestätigt werden: So führte im Hamstermodell eine gesteigerte Expression von MIA in Hamstermelanomzellen (A-mel3) zu einem signifikanten Anstieg des Metastasierungspotentials, ohne dass davon das Tumorzellwachstum des Primärtumors, die Zellproliferation oder die Apoptoserate beeinflusst wurden. Zudem konnte bei übermäßiger MIA-Expression eine höhere Rate an Tumorzellinvasion und Extravasation beobachtet werden (Guba et al. 2000). Im Mausmodell korrelierte die Fähigkeit einer murinen Melanomzelllinie (B16) Lungenmetastasen zu bilden streng mit MIA-Expression und -Sekretion (Bosserhoff et al. 2001b). Weiterhin konnten zwei in vitro gefundene Hemmstoffe der MIA-Funktion (Peptid Fn6 und Peptid 878) in vivo (im Mausmodell) eine Hemmung des Wachstums von Melanommetastasen bewirken (Bosserhoff et al. 2003).

Neben dem Vermitteln des „aktiven Ablösens“ der Melanomzellen von ihrer Umgebung scheint MIA über weitere Mechanismen die Tumorprogression zu begünstigen: So konnten in einer humanen Melanomzelllinie (HMB2) bei längerfristiger Inhibition der MIA-Expression einige Veränderungen beobachtet werden, die zu einer Minderung der Migrationsfähigkeit beitragen (charakteristische Änderungen der Zellmorphologie, wiederhergestellte Zell-Zell-Kontakte, Reinduktion der E-Cadherin Expression, Herunterregulierung einiger Melanom-assoziiierter Gene). Desweiteren konnte infolge einer Reexpression der für die Melaninsynthese notwendigen Enzyme Tyrosinase und *Tyrosinase-Related-Protein1* eine Reinduktion der Melanin-Synthese aufgezeigt werden. Die Gegenwart von MIA führte im Gegensatz dazu zu einer gesteigerten Migrationsfähigkeit der Melanomzellen, zu einer Induktion von Melanom-assoziierten Genen und zu einer Inhibition der Apoptose (Poser et al. 2004, Tatzel et al. 2005).

In einer aktuellen Studie wurde außerdem gezeigt, dass MIA zelluläre, gegen den Tumor gerichtete Immunreaktionen unterdrücken kann und wahrscheinlich auf diese Weise zu der oft bei malignen Melanomen beobachteten Immunsuppression beiträgt (Jachimczak et al. 2005).

3.4 Vorkommen der MIA-Expression

In normaler Haut, in Melanozyten, Fibroblasten und Keratinozyten sowie in nicht-melanozytären Hauttumoren konnte keine signifikante MIA-Expression nachgewiesen werden. In gutartigen melanozytären Nävi findet sich eine schwache bis mittlere Expression. Dagegen konnte in der überwiegenden Zahl aller primären und metastasierenden malignen Melanome und Melanomzelllinien eine starke MIA-Expression nachgewiesen werden (Blesch et al. 1994, Groningen et al. 1995, Bosserhoff et al. 1996 und 1999b, Perez et al 2000, Hau et al. 2002).

In Zelltypen außerhalb der melanozytären Linie ist die Expression von MIA weniger weit verbreitet. So fand man in nichtmelanozytären Malignomen MIA-Expression bei Gliomen (Blesch et al. 1994, Hau et al. 2002 und 2004), Chondrosarkomen (Bosserhoff et al. 1997b, Yonekawa et al. 2002) und verschiedenen, meistens fortgeschrittenen Adenokarzinomen (z.B. der Brust, des Kolons oder des Pankreas) (Bosserhoff et al. 1999b, Perez et al 2000, Wagner et al. 2000, Hau et al. 2002, El Fitori et al. 2005). In gutartigem Normalgewebe konnte eine MIA-Expression lediglich in Knorpelzellen aufgezeigt werden, wo MIA wegen der Hemmbarkeit seiner Expression durch Retinsäure zunächst als CD-RAP (*cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein*) bezeichnet wurde (Dietz und Sandell 1996). Elektronenmikroskopische Untersuchungen ergaben, dass MIA für die Formation der stark geordneten Faser-Struktur und -Architektur des Knorpels verantwortlich ist (Moser et al. 2002).

3.5 Einsatz von MIA als Marker

Die Erkenntnis, dass MIA relativ spezifisch in Chondrozyten und malignen Melanomzellen exprimiert wird, führte zu der Idee MIA als molekularen Marker einzusetzen: einerseits als potentiellen **Marker für erhöhten Knorpelmetabolismus/Schaden** (beispielsweise bei rheumatischen Erkrankungen, bei extremen sportlichen Belastungen, beim Chondrosarkom) (Bosserhoff et al. 1997b, Müller-Ladner et al. 1999, Neidhart et al. 2000, Schmidt-Rohlfing et al. 2002, Liu und Yang 2004), andererseits als **Tumormarker für das maligne Melanom**.

Die ersten Untersuchungen zur MIA-Expression bei Melanompatienten wurden von Bosserhoff et al. durchgeführt (Bosserhoff et al. 1997a): Mithilfe eines nichtradioaktiven ELISAs wurden die MIA-Serumspiegel von 112 Patienten mit malignem Melanom im Stadium I bis IV vor Operation bestimmt. Positive (d.h. > 6,5 ng/ml) Werte ergaben sich bei 13% der Patienten mit Stadium I, bei 23% der Patienten mit Stadium II, bei 100% der Patienten mit Stadium III und bei 100% der Patienten mit Stadium IV. Die enge Korrelation zwischen den MIA-Serumwerten und dem Tumorstadium sowie die hohe Sensitivität von MIA – besonders bei Tumorstadium III und IV – wurden in zahlreichen Folgestudien immer wieder bestätigt (Dréau et al. 1999, Djureen Martenson et al. 1999, Bosserhoff et al. 2000 und 2001a, Schmitz et al. 2000, Stahlecker et al. 2000, Meral et al. 2001).

Bosserhoff et al. und später viele andere beobachteten zudem, dass sich Therapiemaßnahmen bei Patienten mit fortgeschrittenen Melanomen (Stadium III und IV) in den MIA-

Serumwerten widerspiegeln: Nach der Operation fielen die MIA-Werte signifikant. Patienten, die auf Chemotherapie ansprachen, zeigten fallende MIA-Werte, während die MIA-Serumwerte von Patienten mit Tumorprogression während oder nach Chemo-/Immuntherapie anstiegen. Die Eignung von MIA für das Therapiemonitoring von Patienten mit fortgeschrittenen Melanomen (Stadium III und IV) konnte also immer wieder gezeigt werden (Bosserhoff et al. 1997a, 1999a, 2000 und 2001a, Dréau et al. 1999, Djukanovic et al. 2000, Schmitz et al. 2000, Stahlecker et al. 2000, Deichmann et al. 2001, Jürgensen et al. 2001).

Um zu prüfen, ob MIA als Tumormarker im Rahmen der Tumornachsorge eine Progression von lokalisierten Tumoren (Stadium I und II) zu Metastasen (Stadium III und IV) anzeigen könne, bestimmten Bosserhoff et al. regelmäßig die MIA-Serumwerte von 350 Melanompatienten mit Tumorstadium I und II nach OP. 32 Patienten entwickelten positive MIA-Werte. 15 von ihnen wiesen zum Zeitpunkt der MIA-Bestimmung bereits Metastasen auf, ein weiterer metastasierte 6 Monate später. Keiner der Patienten mit normalen MIA-Werten entwickelte dagegen während der 6–12 Monate-langen Nachbeobachtungszeit Metastasen (Bosserhoff et al. 1997a). Viele folgende Studien bestätigten die Fähigkeit von MIA, neu entstehende Metastasen gleichzeitig oder davor anzuzeigen (Bosserhoff et al. 1999a, Stahlecker et al. 2000, Jürgensen et al. 2001, Krähn et al. 2001, Dornier et al. 2002, Matsushita et al. 2002, Faries et al. 2003, Garbe et al. 2003a). Dabei wurden Sensitivitäten zwischen 22% und 80% gefunden (Jürgensen et al. 2001, Krähn et al. 2001, Matsushita et al. 2002, Garbe et al. 2003a).

Weiterhin wurde vielfach gezeigt, dass MIA mit dem Krankheitsverlauf von Melanompatienten mit Tumorstadium III und IV korreliert (Deichmann et al. 1999, Bosserhoff et al. 2000, Djukanovic et al. 2000, Stahlecker et al. 2000, Deichmann et al. 2001, Dornier et al. 2002). Bei Deichmann et al. zeigten erhöhte MIA-Werte mit einer Sensitivität von 88% Tumorprogression in Stadium IV an (Deichmann et al. 2001). In zwei anderen Studien wurde die Korrelation zwischen MIA und dem Krankheitsverlauf für alle Stadien I bis IV untersucht: Bei Dornier et al. waren in 57% der Fälle ein stabiler klinischer Verlauf mit stabilen MIA-Werten assoziiert, und 92% der Patienten mit Tumorprogression zeigten erhöhte MIA-Serumwerte (Dornier et al. 2002). Bei Djukanovic et al. spiegelten in insgesamt 74% der Fälle die MIA-Werte den Krankheitsverlauf wider (Djukanovic et al. 2000).

Viele Studien belegen, dass MIA auch prognostische Aussagekraft besitzt: So sind dauerhaft erhöhte MIA-Serumwerte nach Operation, nach oder während systemischer Behandlung oder im Laufe der Tumornachsorge mit einer kürzeren Überlebenszeit verbunden. Dagegen ist ein Abfall der MIA-Werte mit einer besseren Prognose assoziiert (Djureen Martenson et al. 1999, Meral et al. 2001, Guba et al. 2002, Faries et al. 2003, Garbe et al. 2003a, Tas et al. 2004). Guba et al. konnten zudem zeigen, dass erhöhte MIA-Werte vor Therapie bei Melanompatienten mit Stadium III und IV bereits kürzerer Überlebenszeiten vorhersagen können (Guba et al. 2002).

In zahlreichen Studien wurde die Eignung der beiden Tumormarker MIA und S100B für das Therapiemonitoring und die Tumornachsorge, sowie ihre prognostischer Aussage

kraft miteinander und mit anderen Tumormarkern verglichen (Deichmann et al. 1999 und 2001, Djureen Martenson et al. 1999, Jürgensen et al. 2001, Djuanovic et al. 2000, Schmitz et al. 2000, Krähn et al. 2001, Dornier et al. 2002, Garbe et al. 2003a, Tas et al. 2004).

Zusammenfassend kann man festhalten, dass beide Tumormarker eng mit den Tumorstadien korrelieren und dabei am besten die fortgeschrittenen Tumorstadien anzeigen. Ihr Verlauf ist mit dem Krankheitsverlauf assoziiert. Sie sind beide die zurzeit besten Serumparameter, um Tumorprogression vom lokalisierten zum metastasierten Melanom zu erkennen und um den Therapieerfolg bei fortgeschrittenen Melanomen zu kontrollieren. Die dabei gefundenen geringen Unterschiede in Sensitivität und Spezifität sind sehr wahrscheinlich messtechnisch bedingt (Bossert und Büttner 2002). Sowohl bei MIA als auch bei S100B korreliert die Überlebenszeit signifikant mit der Höhe des Serumwertes (Djureen Martenson et al. 1999, Garbe et al. 2003a, Tas et al. 2004). Bei der Anzeige von Tumorprogression im fortgeschrittenen Tumorstadium IV hat sich neben den hochsensitiven Tumormarkern MIA und S100B die hochspezifische LDH als besonders geeignet erwiesen (Deichmann et al. 1999). Ein erhöhtes LDH im Endstadium gilt zudem als unabhängiger prognostischer Faktor (Sirott et al. 1993, Keilholz et al. 1996, Eton et al. 1998, Manola et al. 2000) und fand daher sogar Eingang in die TNM-Klassifikation der AJCC von 2001.

MOTIVATION UND ZIELSETZUNG

Das maligne Melanom ist die am häufigsten tödlich verlaufende Hautkrankheit. Seine Inzidenz ist in den letzten Jahrzehnten weltweit, so auch in Deutschland, stark angestiegen. Einer der wichtigsten Prognosefaktoren des malignen Melanoms ist die Tumordicke bei Erstdiagnose: Je früher der Tumor entdeckt wird, je kleiner/dünner er ist, desto besser ist die Prognose des Patienten. Zudem ist eine vollständige Heilung nur durch eine frühzeitige operative Entfernung des gesamten Tumors möglich, was meistens nur bei kleinen, lokalisierten Primärtumoren (Stadium I und II) gelingt. Aber auch bei bereits vorliegender Metastasierung (Stadium III und IV) korreliert die Prognose des Patienten stark mit dem Ausmaß des Tumorbefalls.

Es ist also in allen Fällen für die Prognose des Patienten am besten, wenn der Tumor bzw. die Tumorprogression möglichst frühzeitig entdeckt wird. Da selbst nach über 10 Jahren eine Tumorprogression gar nicht so selten ist, ist eine möglichst lebenslange Tumornachsorge für den Patienten empfehlenswert. Um dem Patienten unnötigen Zeitaufwand und psychische Belastung zu ersparen, aber auch aus Kostengründen wird versucht möglichst sensitive, aber auch einfache diagnostische Möglichkeiten für die Tumornachsorge zu etablieren. Aus diesen Gründen werden seit Jahren von verschiedenen Arbeitsgruppen Tumormarker für das maligne Melanom erprobt, die es dem klinisch tätigen Arzt ermöglichen sollen, auf einfache Art und Weise anhand von Blutuntersuchungen neu auftretende Metastasen frühzeitig zu erkennen, die Therapie und den Verlauf der Erkrankung zu kontrollieren und die Prognose des Patienten einzuschätzen.

Einer wegen seiner hohen Sensitivität zur Zeit vielversprechendsten Tumormarker ist das erstmals 1987 im Zellkulturüberstand von Melanomzellen entdeckte und wegen seiner proliferationshemmenden Eigenschaft *in vitro* als *Melanoma Inhibitory Activity* bezeichnete MIA. MIA zeichnet sich, so belegen einige Studien, durch eine enge Korrelation mit den Tumorstadien – besonders den fortgeschrittenen Stadien III und IV – aus. Sein Verlauf ist mit dem Krankheitsverlauf assoziiert. Er gilt momentan als einer der besten Serumparameter, um Tumorprogression vom lokalisierten zum metastasierten Melanom anzuzeigen und um den Therapieerfolg bei fortgeschrittenen Melanomen zu kontrollieren. Schließlich ermöglicht MIA prognostische Aussagen über die Überlebenszeit von Patienten.

In den bisherigen Studien wurde die Eignung von MIA als Tumormarker besonders bei Vorhandensein größerer Tumormassen gezeigt. In der vorliegenden Studie soll dagegen speziell der Krankheitsverlauf von Patienten mit primär geringer Tumormasse (mit Tumorstadium I und II) verfolgt und mit dem Verlauf der MIA-Werte verglichen werden. Das Ziel dieser Studie ist zum einen die detaillierte Untersuchung, ob und auf welche Weise MIA das klinische Bild am besten widerspiegeln kann, um daraus Schlüsse für den optimalen Einsatz von MIA zur Verlaufskontrolle von Melanompatienten zu ziehen. Zum anderen soll im Detail die prognostische Bedeutung von MIA bezüglich der Anzeige von Tumorprogression untersucht werden. Eine Besonderheit dieser Studie sind die vergleichsweise langen Nachbeobachtungszeiten der Patienten von bis zu sieben Jahren.

MATERIAL UND METHODEN

4. Das Patientenkollektiv

In der Dermatologischen Klinik des Universitätskrankenhauses Regensburg und in der Klinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein der Technischen Universität in München wurde von 1997 bis 2004 der Krankheitsverlauf von 1894 Patienten mit malignem Melanom der TNM-Stadien I bis IV verfolgt. Bei den Patienten fanden regelmäßig Bestimmungen des Tumormarkers *Melanoma Inhibiting Associated Protein* (MIA) statt. Das Ergebnis wurde zusammen mit Angaben zum aktuellen klinischen Bild dokumentiert. Insgesamt wurden 7488 Untersuchungen gemacht und schriftlich festgehalten.

Für diese Studie wurden aus diesem Kollektiv retrospektiv 174 Patienten mit primärem TNM-Stadium I und II ausgewählt. Dabei mussten folgende Kriterien erfüllt sein:

- I. Die Patienten mussten mindesten 3 dokumentierte Untersuchungen haben.
- II. Die Patienten mussten entweder später metastasieren oder, falls sie nicht metastasierten, mindestens 3 Jahre lang nachbeobachtet worden sein, um eine Metastasierung möglichst auszuschließen.

Insgesamt lagen so 2009 Untersuchungen vor, d.h. pro Patient lagen im Durchschnitt 11,3 +/- 5,4 Untersuchungen vor, minimal 3 Untersuchungen und maximal 36 Untersuchungen.

Der Beobachtungszeitraum reichte vom 19.06.1997 bis zum 18.05.2004. Er war also 2525 Tage/7 Jahre lang. Der einzelne Patient wurde durchschnittlich 4,1 +/- 1,5 Jahre (1467 +/- 535 Tage), minimal 58 Tage und maximal 2395 Tage (6,7 Jahre) beobachtet.

In der Studie waren 84 Frauen (48,3%) und 90 Männer (51,7%) vertreten.

Ihr Durchschnittsalter zum Zeitpunkt des Eintritts in die Studie betrug 55,0 +/- 14,5 Jahre (Frauen: 55,7 +/- 14,0 Jahre, Männer: 54,5 +/- 15,0 Jahre). Der Jüngste war 15 Jahre und der Älteste war 87 Jahre alt. Die jüngste Frau war 24 Jahre und die älteste Frau war 81 Jahre alt.

Die Altersverteilung in Gruppen sah aus wie folgt (**Tabelle 4**):

	insgesamt		Männer		Frauen	
	absolute Häufigkeit	Häufigkeit in %	absolute Häufigkeit	Häufigkeit in %	absolute Häufigkeit	Häufigkeit in %
11 bis 20 Jahre	1	0,6	1	1,1	0	0
21 bis 30 Jahre	12	6,9	7	7,8	5	6,0
31 bis 40 Jahre	19	10,9	11	12,2	8	9,5
41 bis 50 Jahre	23	13,2	10	11,1	11	13,1
51 bis 60 Jahre	52	29,9	28	31,1	24	28,6
61 bis 70 Jahre	42	24,1	22	24,4	20	23,8
71 bis 80 Jahre	21	12,1	5	5,6	6	7,1
81 bis 90 Jahre	4	2,3	3	3,3	1	1,2
insgesamt	174	100	90	100	84	100

Tabelle 4

Altersverteilung des Patientenkollektivs

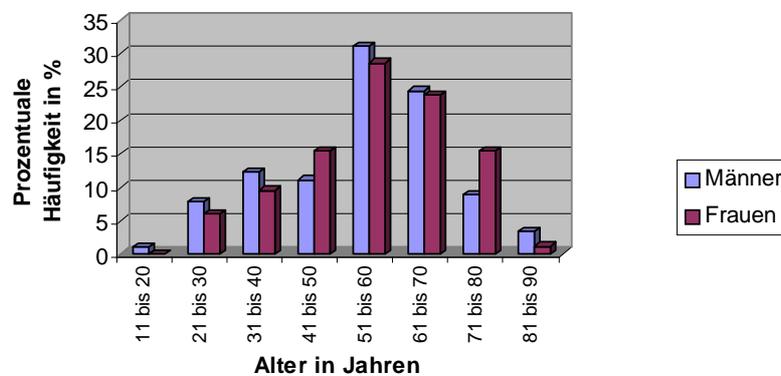


Abbildung 4

Die Altersgruppe der 51 bis 60 Jährigen war also am meisten vertreten, gefolgt von der Altersgruppe der 61 bis 70 Jährigen. Vergleicht man die Altersgruppenverteilung bei Männern und Frauen (**Abbildung 4**), dann sieht man, dass in den Altersgruppen der 41 bis 50 Jährigen und der 71 bis 80 Jährigen mehr Frauen als Männer vorkamen. In allen anderen Altersgruppen gab es mehr Männer als Frauen.

In die Studie wurden 106 Melanompatienten mit Tumorstadium I (insgesamt 60,9%, 54,8% aller Frauen und 66,7% aller Männer) und 68 Patienten mit Tumorstadium II (insgesamt 39,1%, 45,2% aller Frauen und 33,3% aller Männer) eingeschlossen.

Von den 174 Patienten haben insgesamt 59 Patienten später metastasiert (24 waren Frauen und 35 waren Männer). Vor klinischer Entdeckung der Metastasierung gab es im Durchschnitt 5,3 +/- 3,5 Untersuchungen, minimal 1 und maximal 17 Untersuchungen. Die Patienten wurden durchschnittlich bereits 15,8 Monate +/- 13,4 Monate vor Auffinden der Metastasierung beobachtet.

Bei 13 Patienten wurden 2 Tumoren diagnostiziert. Davon hatten 5 Patienten 2 maligne Melanome gleichzeitig und 8 Patienten entwickelten später ein zweites malignes Melanom.

Es gab folgende Primärerkrankungen:

- 1: superfiziell spreitendes Melanom
- 2: noduläres Melanom
- 3: akrolentiginöse Melanom
- 4: Lentigo-Maligna-Melanom
- 5: nicht klassifizierbares Melanom
- 8: malignes Melanom
- 11: atypischer Nävuszellnävus

Die Verteilung sah aus wie folgt (**Tabelle 5**):

Primär- erkrankung	insgesamt		Frauen		Männer	
	absolute Häufigkeit	Häufigkeit in %	absolute Häufigkeit	Häufigkeit in %	absolute Häufigkeit	Häufigkeit in %
1	75	43,1	33	39,3	42	46,7
2	56	32,2	31	36,9	25	27,8
3	4	2,3	3	3,6	1	1,1
4	14	8,0	4	4,8	10	11,1
5	1	0,6	1	1,2	0	0
8	23	13,2	12	14,3	12	13,3
11	1	0,6	1	1,2	0	0
insgesamt	174	100	84	100	90	100

Tabelle 5

Am häufigsten war mit 43,1% das superfiziell spreitende Melanom vertreten, gefolgt vom nodulären Melanom mit 32,2%. Das Lentigo-Maligna-Melanom kam bei 8,0% der Patienten vor und das akrolentiginöse Melanom bei 2,3%. Bei Frauen und Männern kamen diese vier Tumorarten in der gleichen Reihenfolge, jedoch unterschiedlich stark gewichtet vor: Bei den Frauen kam das superfiziell spreitende Melanom und das noduläre Melanom ähnlich häufig vor (39,3% und 36,9%). Ebenso waren das Lentigo-

Maligna-Melanom und das akrolentiginöse Melanom annähernd gleich häufig vertreten (4,8% und 3,6%). Bei den Männern dagegen gab es das superfiziell spreitende Melanom wesentlich häufiger als das noduläre Melanom (46,7% im Vergleich zu 27,8%) und das Lentigo-Maligna-Melanom sehr viel häufiger als das akrolentiginöse Melanom (11,1% zu nur 1,1%).

Die Tumordicke betrug im Durchschnitt 1,7 +/- 1,3 mm. Der kleinste Tumor war 0,1 mm dick, der Größte 9 mm. Betrachtet man die Verteilung der Tumordicken im Patientenkollektiv (**Tabelle 6 und Abbildung 5**), dann kann man sehen, dass am häufigsten die kleinen Tumore mit einer Dicke von 0 bis 1,0 mm vorkamen (33,3%), gleich gefolgt von Tumoren mit einer Dicke von 1,01 bis 2,0 mm (31,6%). Es waren also zu fast zwei Drittel die kleineren Tumoren vertreten. Sehr große Tumoren mit einer Dicke von über 4,0 mm kamen seltener vor (5,2%).

Tumordicke	absolute Häufigkeit	Häufigkeit in %
0 bis 1,0 mm	58	33,3
1,01 bis 2,0 mm	55	31,6
2,01 bis 4,0 mm	37	21,3
> 4,0 mm	9	5,2
keine Angabe	8	4,6
insgesamt	174	100

Tabelle 6

Verteilung der Tumordicke im Patientenkollektiv

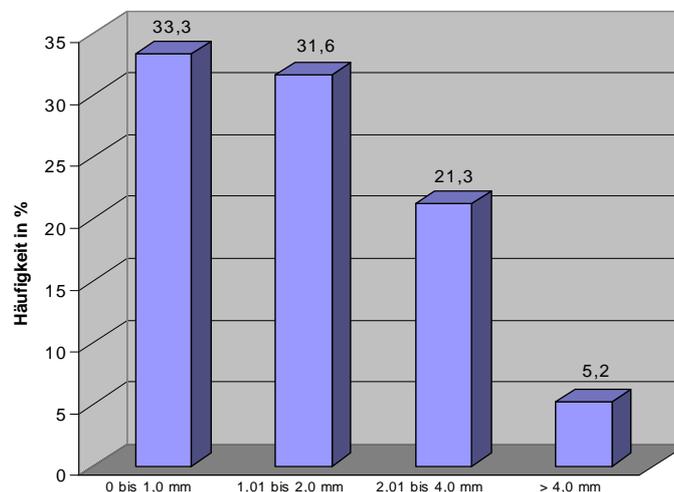


Abbildung 5

Die Verteilung des diagnostizierten Clark-Levels sah aus wie folgt (**Tabelle 7** und **Abbildung 6**):

Clark-Level	absolute Häufigkeit	Häufigkeit in %
1	0	0
2	22	12,6
3	79	45,4
4	64	36,8
5	2	1,1
keine Angabe	4	2,3
insgesamt	174	100

Tabelle 7

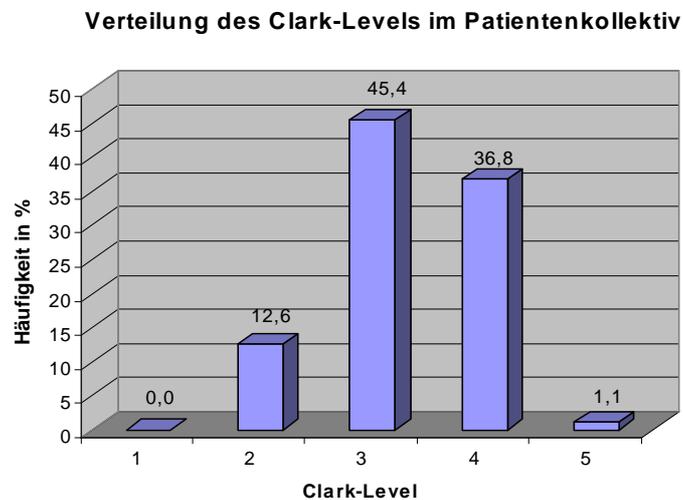


Abbildung 6

Am häufigsten wurde der Clark-Level 3 (45,4%) diagnostiziert, am zweithäufigsten der Clark-Level 4 (36,8%). An dritter Stelle folgte in ein wenig Abstand der Clark-Level 2 (12,6%).

Die Tumoren lagen an folgenden Lokalisationen:

- 1: untere Extremität
- 2: obere Extremität
- 3: Rumpf
- 4: Kopf
- 6: akral

Diese Tumorlokalisationen waren folgendermaßen verteilt (**Tabelle 8**):

Lokalisation	insgesamt		Frauen		Männer	
	absolute Häufigkeit	Häufigkeit in %	absolute Häufigkeit	Häufigkeit in %	absolute Häufigkeit	Häufigkeit in %
1	56	32,2	39	46,4	17	18,9
2	32	18,4	17	20,2	15	16,7
3	65	37,4	19	22,6	46	51,1
4	16	9,2	7	8,3	9	10,0
6	3	1,7	1	1,2	2	2,2
keine Angabe möglich	1	0,6	0	0	1	1,1
insgesamt	174	100	84	100	90	100

Tabelle 8

Am häufigsten lagen die Tumoren am Rumpf (37,4%), gefolgt von der unteren Extremität (32,2%). Am dritthäufigsten lagen die Tumoren an der oberen Extremität (18,4%). Vergleicht man Männer und Frauen (**Abbildung 7**), dann erkennt man deutliche Unterschiede: Bei fast der Hälfte der Frauen (46,4%) lagen die Tumoren an der unteren Extremität. Bei über der Hälfte der Männer dagegen (51,1%) lagen die Tumoren am Rumpf. Am zweithäufigsten lagen die Tumoren bei den Frauen am Rumpf (22,6%), bei den Männern an der unteren Extremität (18,9%). Am dritthäufigsten waren sowohl bei Frauen als auch bei Männern die Tumoren an der oberen Extremität lokalisiert (20,2% und 16,7%).

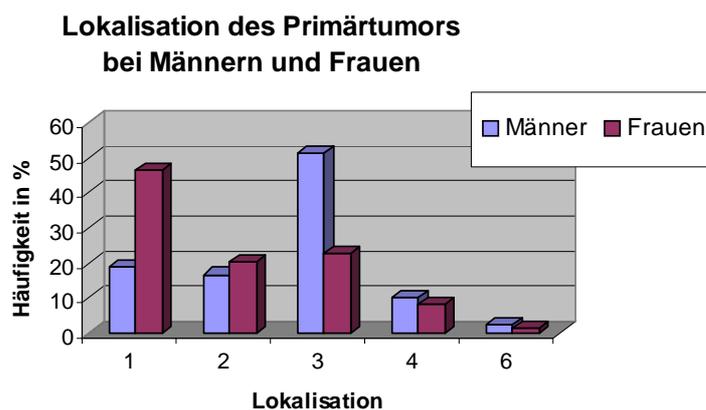


Abbildung 7

5. MIA-Bestimmung mittels ELISA

Für die quantitative Bestimmung des Proteins MIA in Patientenserum wurde der MIA-ELISA (*Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*) der Firma Roche Diagnostics, Penzberg/Deutschland (Bestellnummer: 1 976 826) verwendet.

5.1 Testprinzip

Der MIA-ELISA ist ein „One-Step-ELISA“, bei dem das Protein MIA eine Bindung mit zwei monoklonalen Antikörpern eingeht (**Abbildung 8**). Der eine Antikörper (MAB 2F7) bindet an einem 14-Aminosäuren-langen Sequenzbereich am C-terminalen Ende und der andere (MAB 1A12) an einem ebenfalls 14-Aminosäuren-langen Bereich am N-terminalen Ende des Proteins.

Der eine Antikörper ist mit Biotin konjugiert, mit dessen Hilfe er MIA an Streptavidin bindet, welches wiederum fest mit der Mikrotiterplatte verbunden ist. Die Aufgabe dieses Antikörpers ist also die Fixierung von im Serum gelösten MIA an der Mikrotiterplatte. Die Aufgabe des zweiten Antikörpers ist es dann das gebundene MIA sichtbar und messbar zu machen. An den zweiten Antikörper ist deshalb das Enzym Peroxidase angehängt. Dieses setzt zugesetztes ABTS (2,2'-Azino-di-3-ethylbenzthiazolin-sulfonat) um, so dass es zu einem Farbumschlag kommt, der mit Hilfe eines MRX II ELISA-Readers (Dynex Technologies Chantilly, Virginia/USA) photometrisch gemessen werden kann. Dabei ist die gemessene Farbdichte direkt proportional zur MIA-Protein-Konzentration im Serum.

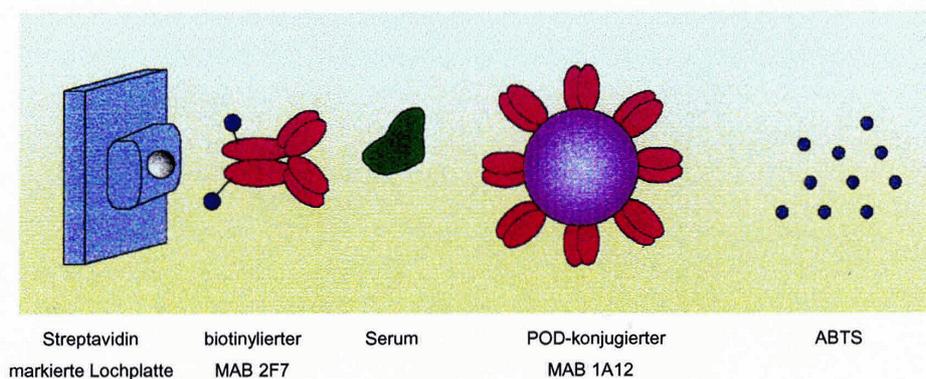


Abbildung 8: Schematische Darstellung des MIA-ELISAs

5.2 Inhalt des Testbestecks

Inhalt	Farbe zur Markierung	Eigenschaften/Menge
Anti-MIA-Biotin	blau	monoklonaler Antikörper von der Maus (MAB 2F7) konjugiert mit Biotin, lyophil
Anti-MIA-Peroxidase	rot	monoklonaler Antikörper von der Maus (MAB 1A12, Fab-Fragment) konjugiert mit Peroxidase, lyophil
MIA-Standard	orange	6 Fläschchen mit MIA-Standardlösung, bestehend aus einer serumanalogen Matrix und zwischen 0 und 50 ng/ml rekombinanten MIA-Protein, das von einer stabil mit MIA-cDNA transfizierten Chinese Hamster Ovary-Zelllinie gewonnen wurde
MIA-Kontrollserum	violett	1 Fläschchen mit ca. 25 ng/ml MIA in Humanserum, lyophil
Inkubationspuffer	rot	100 ml gebrauchsfertige, klare Lösung
Waschpuffer	weiß	2 Tabletten
ABTS-Substrat-Lösung	schwarz	27 ml gebrauchsfertige, klare Lösung
Mikrotiterplatte		96 Kammern, beschichtet mit Streptavidin
selbstklebende Folie		2 Blätter

Tabelle 9

5.3 Vorbereitung der Reagenzien

Alle Reagenzien werden vor Testbeginn zunächst auf Raumtemperatur (15–25° C) gebracht.

1. Anti-MIA-Biotin

Das Lyophilisat wird 10 Minuten lang in 0,7 ml destilliertem Wasser gelöst und dann gut durchgemischt.

2. Anti-MIA-Peroxidase

Das Lyophilisat wird ebenfalls 10 Minuten lang in 0,7 ml destilliertem Wasser gelöst und anschließend gut gemischt.

3. MIA-Standard

Die Standards werden jeweils mit 0,5 ml destillierten Wasser versetzt und nach 10 Minuten gut gemischt.

4. MIA-Kontrollserum

Zu dem Kontrollserum wird 0,3 ml destilliertes Wasser gegeben und das Ganze nach 10 Minuten gut gemischt.

5. Waschpuffer

Eine Tablette wird in 2 Liter destilliertem Wasser gelöst.

6. Immun-Reagens

Für 1,8 ml Immun-Reagens werden zunächst 50 μl Anti-MIA-Peroxidase, dann 50 μl Anti-MIA-Biotin zu 1,7 ml Inkubationspuffer gegeben und jedes Mal gut gemischt.

5.4 Vorbereitung der Proben

Den Patienten wurden 10 ml Blut in einem Serumröhrchen abgenommen. Die Erythrozyten und Leukozyten wurden in einer Rotina 35 R Zentrifuge (Firma Hettich, Tuttingen/Deutschland) bei 5000 rpm (*rounds per minute*/Umdrehungen pro Minute) abzentrifugiert. Das so gewonnene Serum wurde bis zur MIA-Bestimmung in einem NUNC-Gefäß bei -70°C gelagert. Kurz vor der MIA-Bestimmung wurden die Serumproben auf Raumtemperatur gebracht.

5.5 Testablauf

Zuerst werden jeweils 20 μl der sechs Standards, des Kontrollserums und der Serumproben auf die Mikrotiterplatte pipettiert. Zur zusätzlichen Kontrolle werden jeweils 20 μl von drei weiteren, eigenen Kontrollseren mit auf die Mikrotiterplatte pipettiert. Anschließend werden jeweils 180 μl Immun-Reagens hinzugegeben. Die Mikrotiterplatte wird mit einer Folie abgedeckt und auf einem Schüttler (450 rpm) bei Raumtemperatur 90 min lang inkubiert. Nach Entfernung des Überstandes folgt ein dreimaliger Waschvorgang mit je 300 μl Waschpuffer. Nun kann die ABTS-Substrat-Lösung (200 μl) zugegeben werden. Die Mikrotiterplatte wird erneut von einer Folie bedeckt und auf dem Schüttler (450 rpm) bei Raumtemperatur 15 min lang inkubiert. Abschließend wird die optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen.

5.6 Auswertung

Mit Hilfe der sechs Standards und ihrer gemessenen Absorption erstellt man eine kalibrierte Standardkurve (MIA-Konzentration in ng/ml zu Absorption), an der die MIA-Werte der Patientenseren abgelesen werden können.

5.7 Messgenauigkeit und Messbereich

Die Werte aller Standards, der Kontrollseren und immer einiger Patientenseren wurden zur Kontrolle doppelt bestimmt, wobei die Ergebnisse nie mehr als 5% voneinander abweichen durften und die Mittelwerte in die Auswertung eingingen.

Mit Hilfe des MIA ELISAs kann MIA-Protein ab 0,32 g/ml im Serum nachgewiesen werden (= Sensitivität/*Limit of Detection*). Die quantitative Bestimmung des MIA-Wertes ist in dem Bereich 0,49 g/ml (=Sensitivität/*Limit of Quantification*) bis ca. 50 ng/ml (=

Konzentration des höchsten Standards) möglich, da in diesem Bereich lineare Signale vom ELISA-Reader gemessen werden. Lagen MIA-Werte über diesem linearen Messbereich (also > 50 g/ml) wurden die Patientenserumproben mit Inkubationspuffer verdünnt und die MIA-Bestimmung ein zweites Mal (jeweils doppelt) durchgeführt. Bei der Bestimmung des MIA-Wertes wurde dann der Verdünnungsfaktor miteingerechnet.

5.8 Cutoff

Um eine Aussage darüber machen zu können, ob ein bestimmter MIA-Wert erhöht oder normal ist, bestimmt man den Cutoff/Grenzwert. Dabei betrachtet man die Verteilung der MIA-Werte in einem gesunden Kontrollkollektiv. Der MIA-Wert, unter dem die Werte von 95% der gesunden Probanden liegen, bezeichnet man als Cutoff. MIA-Werte, die über dem Cutoff liegen, gelten als erhöht und MIA-Werte, die unter dem Cutoff liegen gelten als normal.

Im Laufe der sieben-jährigen Beobachtungszeit dieser Studie änderte sich der gültige Cutoff-Wert drei Mal, mit Tendenz zu zunehmend höheren Werten. Die gültigen Cutoffs waren:

1997	6,5 ng/ml
1998 bis 22.11.2001	8,5 ng/ml
ab 22.11.2001	10,0 ng/ml

In dieser Studie wurden die zu jedem Zeitpunkt jeweils gültigen Cutoffs berücksichtigt.

6. Dokumentation

Neben dem gemessenen MIA-Serumwert wurden folgende Angaben zu jeder Untersuchung bzw. zu jedem Patienten in einer Tabelle von Microsoft Excel (Microsoft Excel 2000; Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA) festgehalten:

- Datum der Blutabnahme
- Geburtsdatum des Patienten
- Geschlecht des Patienten
- Alter bei der Untersuchung
- Art der Primärerkrankung
- Lokalisation des Tumors
- Tumordicke
- Clark-Level
- TNM-Angaben
- TNM-Stadium
- Erkrankungsbeginn
- Therapie

Bei Unklarheiten wurde in den Patientenakten noch einmal nachgelesen.

7. Auswertung der dokumentierten Befunde

Zunächst wurden die gesammelten Daten aus Microsoft Excel (Microsoft Excel 2000; Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA) in eine MySQL-Datenbank (MySQL Version 4.1.6-gamma; MySQL AB, Uppsala, Schweden) importiert. Dies geschah mit einem *Script* (= kleines Programm) in der Programmiersprache Python (Python 2.3; Active State, Vancouver, British Columbia, Kanada). Mit Hilfe von Python wurden außerdem die vorhandenen Daten in ein einheitliches Format gebracht und neue Tabellen generiert. Zusätzliche Abfragen der vorhandenen Daten wurden mit SQL gemacht. Die neuen Tabellen und die Ergebnisse der Abfragen wurden in einer Microsoft Access-Datenbank (Microsoft Access 2000; Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA) gespeichert. Von dort wurden sie wieder in Microsoft Excel bzw. SPSS (SPSS Version 13; SPSS Inc., Chicago, IL, USA) importiert, wo schließlich Auswertungen und Grafiken gemacht wurden.

Folgende zusätzliche Informationen konnten auf diese Weise für jeden Patienten der Studie gewonnen werden:

- 1. Serumwert des Patienten (mit Datum)
- Maximaler Serumwert des Patienten (mit Datum)
- Primärstadium des Patienten
- Stadium bei der Entdeckung der Metastasierung, bzw. Stadium bei der letzten Untersuchung (mit Datum) bei nicht metastasierenden Patienten
- Datum der letzten Untersuchung
- Beobachtungszeit des Patienten (Zeit zwischen erster und letzter Untersuchung)
- Gesamtzahl der Untersuchungen
- Anzahl der Untersuchungen vor klinischer Entdeckung der Metastasierung
- Anzahl der Cutoff-Überschreitungen insgesamt
- Anzahl der Cutoff-Überschreitungen vor klinischer Entdeckung der Metastasierung
- Anzahl von aufeinander folgenden Cutoff-Überschreitungen vor klinischer Entdeckung der Metastasierung (mit Zeit zwischen 1. Cutoff-Überschreitung der Folge und Entdeckung der Metastasierung)
- Anzahl der Untersuchungen mit MIA-Anstieg (im Vergleich zur vorhergehenden Untersuchung) insgesamt
- Anzahl der Untersuchungen mit MIA-Anstieg vor klinischer Entdeckung der Metastasierung

- Anzahl von aufeinander folgenden Untersuchungen mit MIA-Anstieg vor klinischer Entdeckung der Metastasierung (mit Zeit zwischen 1. MIA-Anstieg der Folge und Entdeckung der Metastasierung)

Folgende zusätzliche Informationen konnten auf diese Weise für jede einzelne Untersuchung der Studie gewonnen werden:

- Zeit zwischen aktueller Untersuchung und erster Untersuchung
- Zeit zwischen aktueller Untersuchung und Zeitpunkt der klinischen Entdeckung der Metastasierung
- Angabe, ob bei dieser Untersuchung der jeweils gültige Cutoff überschritten wurde
- Angabe, ob bei dieser Untersuchung im Vergleich zur vorhergehenden Untersuchung ein Anstieg des MIA-Wertes vorliegt
- Größe des MIA-Anstiegs im Vergleich zur vorhergehenden Untersuchung

8. Statistische Methoden

Im Folgenden werden zum einen in der Studie häufig angewandte statistische Methoden näher erläutert. Zum anderen werden bei bestimmten Untersuchungen der Studie geltende Untersuchungskriterien und das genaue Vorgehen erklärt.

8.1 Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer prädiktiver Wert

Die Sensitivität und Spezifität sind Gütekriterien diagnostischer Tests. Dabei bezeichnet die **Sensitivität** die Wahrscheinlichkeit, dass ein Test bei einer erkrankten Person ein richtig positives Ergebnis liefert. Umgekehrt gibt die **Spezifität** die Wahrscheinlichkeit an, mit der eine nicht erkrankte Person durch ein korrekt negatives Ergebnis angezeigt wird. Mit dem positiv- und negativ-prädiktivem Wert lässt sich die Vorhersagekraft eines Tests einschätzen. Der **positiv-prädiktive Wert** sagt aus, mit welcher Wahrscheinlichkeit die Krankheit vorliegt, wenn der Test positiv ausfällt. Der **negativ-prädiktive Wert** dagegen gibt an, mit welcher Wahrscheinlichkeit keine Krankheit vorliegt, wenn der Test negativ ist.

Die Anwendung in dieser Studie lässt sich am besten anhand einer Vierfeldertafel verdeutlichen:

	Krankheit/ Metastasierung	keine Krankheit/ keine Metastasierung
Test positiv	A	B
Test negativ	C	D

$$\text{Sensitivität} = A / A + C$$

$$\text{Spezifität} = D / D + B$$

$$\text{positiv-prädiktiver Wert} = A / A + B$$

$$\text{negativ-prädiktiver Wert} = D / D + C$$

8.2 Testverfahren zum Vergleich zweier Gruppen

Um zwei in der Studie gebildete Gruppen auf signifikante Unterschiede hin zu prüfen, bediente man sich des Mann-Whitney-Tests (für quantitative Merkmale) und des Chi-Quadrat-Tests (für qualitative Merkmale). Dabei gefundene statistische Signifikanzen wurden durch p-Werte gekennzeichnet. „P“ steht für „probability“ (Wahrscheinlichkeit). Der p-Wert bezieht sich auf die zunächst als wahr angenommene Nullhypothese (z.B.

„kein Unterschied“). Sind die p-Werte gering muss die Nullhypothese abgelehnt werden und die Alternativhypothese (z.B. „signifikanter Unterschied“) kann angenommen werden.

Die Signifikanzgrenze wurde bei $p < 0,05$ festgelegt. Ein p-Wert $< 0,05$ galt daher als signifikant, ein p-Wert $< 0,01$ als hoch signifikant und ein p-Wert $< 0,001$ als höchstsignifikant.

8.3 Erläuterungen zu einzelnen statistischen Methoden

Das genaue Vorgehen und die Untersuchungskriterien bei bestimmten Untersuchungen der Studie werden im Folgenden näher erklärt.

8.3.1 Korreliert das Gesamtbild der Cutoff-Überschreitungen mit dem klinischen Verlauf?

Es wurde der Krankheitsverlauf jedes Patienten betrachtet und verglichen, ob der MIA-Verlauf (gemessen an Cutoff-Überschreitungen) mit diesem korrelierte.

Unter folgenden Bedingungen lag ein Zusammenhang vor:

- Nicht metastasierende Patienten haben keine oder maximal zwei Cutoff-Überschreitungen.
- Patienten, die nicht metastasieren, haben zunächst erhöhte MIA-Werte, die jedoch im Verlauf unter den Cutoff sinken und dauerhaft unterhalb des Cutoffs bleiben.
- Metastasierende Patienten haben öfters/sehr oft/meistens MIA-Werte, die oberhalb des Cutoffs liegen.
- Eine Cutoff-Überschreitung liegt vor oder gleichzeitig mit Entdeckung der Metastasierung vor.
- Eine Cutoff-Überschreitung kommt vor oder gleichzeitig mit der Entdeckung eines Zweitumors vor.
- Der MIA-Wert sinkt nach/durch Therapie unterhalb des Cutoffs.

Dagegen wurde unter folgenden Gegebenheiten kein Zusammenhang gezählt:

- Nicht metastasierende Patienten haben öfters/sehr oft/meistens Cutoff-Überschreitungen.
- Metastasierende Patienten haben keine Cutoff-Überschreitung oder erst nach klinischer Entdeckung der Metastasierung.
- Patienten, bei denen ein Zweitumor gefunden wurde, haben keine Cutoff-Überschreitung oder erst danach.

Der klinische Verlauf war bei einem Patienten aufgrund fehlender Angaben nicht richtig beurteilbar. Er wurde bei dieser Untersuchung deshalb nicht berücksichtigt. Insgesamt wurden die Krankheits- und MIA-Verläufe von 173 Patienten untersucht.

8.3.2 Zeigen Cutoff-Überschreitungen (Flips) in derselben oder der darauf folgenden Untersuchung eine Metastasierung an?

Um diese Frage zu beantworten, wurden zunächst diejenigen Patienten ausgewählt, die folgende Kriterien erfüllten:

- Die Patienten hatten einen sogenannten „Flip“ (Sprung) im Verlauf ihrer MIA-Serumwerte, d.h. die MIA-Serumwerte lagen zunächst unterhalb des Cutoffs, stiegen dann jedoch über den Cutoff.
- Zu der Untersuchung, in der der Flip vorkam, musste ein Tumorstadium angegeben sein.
- Vor oder nach dem Flip musste es eine Untersuchung mit Stadienangabe geben.

Bei den ausgewählten Patienten wurde dann das Stadium in der Untersuchung mit Flip mit dem Stadium der davor liegenden und der darauf folgenden Untersuchung verglichen, um festzustellen, ob es zu einem/einer Stadienanstieg/Metastasierung beim Flip oder in der darauf folgenden Untersuchung gekommen war.

8.3.3 Korreliert das Gesamtbild des MIA-Serumwertverlaufs mit dem klinischen Verlauf?

Bei allen metastasierenden Patienten wurde untersucht, ob der MIA-Verlauf (Anstieg und Abfall) mit dem Krankheitsverlauf korrelierte.

Der MIA-Verlauf war mit dem Krankheitsverlauf assoziiert, wenn

- der MIA-Serumwert vor oder mit klinischer Entdeckung der Metastasierung (Lymphknoten- und Fernmetastasen), des Zweittumors und des Rezidivs anstieg.
- der MIA-Serumwert nach Entfernen des Tumors, der Metastase oder nach sonstiger Therapie (z.B. Chemotherapie) abfiel.

Zudem wurde die MIA-Verlaufstendenz von jedem Patienten genau charakterisiert und untersucht, bei wie vielen Patienten eine letztendlich steigende, fallende oder nicht genau bestimmbare Verlaufstendenz vorlag. Vier Patienten, die insgesamt nur drei Untersuchungen aufwiesen, wurden dabei nicht beurteilt.

Auch bei allen nicht metastasierenden Patienten wurde die MIA-Verlaufstendenz genau untersucht und ausgezählt, wie viele Patienten eine letztendlich steigende, fallende oder schwankende MIA-Verlaufstendenz hatten. Zwei Patienten, die insgesamt nur drei Untersuchungen hatten, wurden dabei nicht berücksichtigt. Mit Hilfe dieser Beobach-

tungen wurde schließlich entschieden, bei wie vielen Patienten der MIA-Verlauf mit dem klinischen Verlauf korrelierte.

Dabei wurde Folgendes als Zusammenhang gewertet:

- Der MIA-Verlauf zeigte nach Tumorentfernung eine letztendlich sinkende oder um ein bestimmtes Niveau schwankende Tendenz.
- Der MIA-Serumwert stieg vor oder mit klinischer Entdeckung des Zweittumors an.

8.3.4 Sind die Verlaufstendenzen des MIA-Serumwerts signifikant?

Um herauszufinden, ob die unter 10.2.3 beobachteten Verlaufstendenzen des MIA-Serumwertes auch signifikant (d.h. nicht zufällig) sind, wurden Regressionsanalysen gemacht. Dabei wurde jeweils diejenige Regressionsgerade gesucht, die den Zusammenhang zwischen MIA-Serumwert und zeitlichem Verlauf am besten beschreibt, und auf Signifikanz getestet. Ein p-Wert $< 0,05$ galt als signifikant, ein p-Wert $< 0,01$ als hochsignifikant und ein p-Wert $< 0,001$ als höchstsignifikant.

Im Detail wurden folgende Regressionsanalysen durchgeführt:

- Regression (Vorhersage) des MIA-Serumwertverlaufs in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Erstuntersuchung (bei nicht metastasierenden Patienten, bei den metastasierenden Patienten insgesamt, bei den metastasierenden Patienten aufgeschlüsselt nach den Endstadien III und IV)
- Regression (Vorhersage) des MIA-Serumwertverlaufs in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Entdeckung der Metastasierung (bei Endstadium III und IV zusammen und aufgeschlüsselt nach den Endstadien III und IV)

ERGEBNISSE

9. Klinische und prognostische Bedeutung von MIA gemessen an einem Cutoff

9.1 Bedeutung von MIA gemessen an einem Cutoff als Spiegel des klinischen Bildes

9.1.1 Spiegeln erhöhte bzw. niedrige MIA-Werte das aktuelle klinische Bild wieder?

Vorkommen von erhöhten und niedrigen MIA-Werten bei den Tumorstadien I bis IV

Alle Untersuchungen wurden je nachdem, ob der gemessene MIA-Wert ober- oder unterhalb des zu diesem Zeitpunkt gültigen Cutoffs lag, in zwei Gruppen eingeteilt. Das Auszählen der Anzahl der Untersuchungen mit niedrigem bzw. erhöhtem MIA-Wert bei den Tumorstadien I bis IV lieferte folgendes Ergebnis (**Tabelle 10**):

	Anzahl der Untersuchungen mit niedrigem MIA-Wert	in %	Anzahl der Untersuchungen mit erhöhtem MIA-Wert	in %	Unter- suchungen insgesamt
Stadium I	767	83,6	151	16,4	918
Stadium II	454	79,4	118	20,6	572
Stadium III	158	76,0	50	24,0	208
Stadium IV	53	54,1	45	45,9	98
insgesamt	1443		364		1796

Tabelle 10

Mit zunehmendem Tumorstadium kommen häufiger erhöhte MIA-Werte und seltener niedrige MIA-Werte vor.

Mit folgender/-m Sensitivität, Spezifität, positiv- und negativ-prädiktiven Wert zeigen erhöhte MIA-Werte Untersuchungen mit Tumorstadien III und IV an:

$$\text{Sensitivität} = (50 + 45) / (208 + 98) = 31,0\%$$

$$\text{Spezifität} = (767 + 454) / (918 + 572) = 81,9\%$$

$$\text{Positiv-prädiktiver Wert} = (50 + 45) / 364 = 26,1\%$$

$$\text{Negativ-prädiktiver Wert} = (767 + 454) / 1443 = 84,6\%$$

Die Wahrscheinlichkeit, dass bei nicht Vorliegen von Stadium III und IV – also bei Vorliegen von Stadium I und II – MIA nicht erhöht ist, ist mit 81,9% recht hoch. Ebenso ist die Wahrscheinlichkeit mit 84,6% hoch, dass bei niedrigen MIA-Werten nicht Stadium III oder IV vorliegt.

Verteilung der MIA-Werte bei den Tumorstadien I bis IV

Stellt man in einem Punktediagramm die gemessenen MIA-Werte zu dem Stadium dar, das der jeweiligen Untersuchung zugeordnet wurde, so kann man gut erkennen welche Bandbreite an MIA-Werten bei den Stadien I bis IV vorkommt (**Abbildung 9**). Man sieht sehr deutlich, dass mit steigendem Tumorstadium auch zunehmend höhere MIA-Werte vorkommen, wobei man dies besonders deutlich bei Stadium IV erkennen kann.

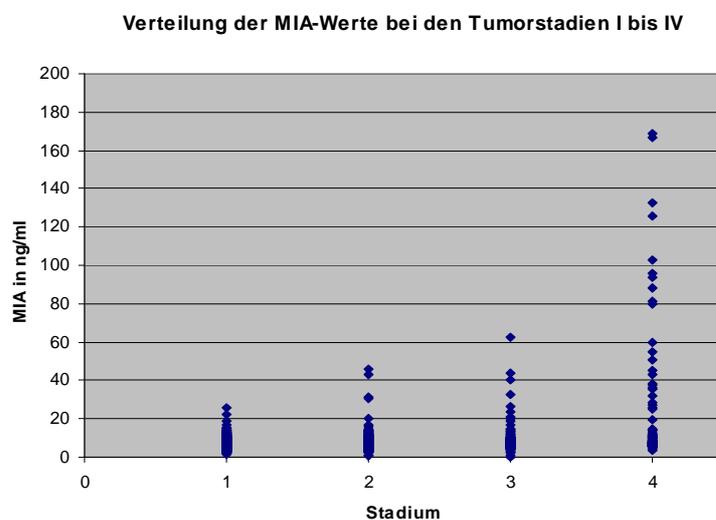


Abbildung 9

Vergleich der Aspekte Tumordicke, Primärerkrankung und Stadium bei Untersuchungen mit erhöhten und niedrigen MIA-Werten

Ein Vergleich der Tumordicken bei Untersuchungen mit erhöhten MIA-Werten und Untersuchungen mit niedrigen MIA-Werten mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests ergibt einen signifikanten Unterschied (p -Wert = 0,023). D.h. bei größeren Tumordicken kommen auch vermehrt erhöhte MIA-Werte vor.

Beim Vergleich der Primärerkrankungen mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests ergibt sich ein hoch signifikanter Unterschied (p -Wert = 0,007): Bei den Primärerkrankungen noduläres Melanom und Lentigo-maligna-Melanom kommen gehäuft erhöhte MIA-Werte vor. Dagegen kommen bei den Primärerkrankungen superfiziell spreitendes Melanom und akrolentiginöses Melanom gehäuft niedrige MIA-Werte vor.

Zuletzt wird auch die Stadienverteilung mit dem Chi-Quadrat-Test bei den beiden Gruppen „Untersuchungen mit erhöhten MIA-Werten“ und „Untersuchungen mit

niedrigen MIA-Werten“ verglichen. Hier ergibt sich ein höchst signifikanter Unterschied (p-Wert < 0,001). Sehr deutlich zeigt sich: Je höher das Stadium, desto wahrscheinlicher ist das Vorkommen von erhöhten MIA-Werten.

9.1.2 Spiegelt die Häufigkeit von Cutoff-Überschreitungen das klinische Bild wieder?

Häufigkeit von Cutoff-Überschreitungen bei metastasierenden und nicht metastasierenden Patienten

Für jeden Patienten wurde die Gesamtzahl seiner Cutoff-Überschreitungen bestimmt. Anschließend wurde sowohl bei den metastasierenden als auch bei den nicht metastasierenden Patienten ausgezählt, wie oft eine bestimmte Anzahl von Cutoff-Überschreitungen vorkam. Dabei ergab sich folgende Häufigkeitsverteilung (**Tabelle 11** und **Abbildung 10**):

Anzahl der Cutoff-Überschreitungen	metastasierende Patienten (n = 59)		nicht metastasierende Patienten (n = 115)	
	Anzahl der Patienten	in %	Anzahl der Patienten	in %
0	19	32,2	53	46,1
1	9	15,3	24	20,9
2	3	5,1	8	7,0
3	10	16,9	7	6,1
4	2	3,4	5	4,3
5	3	5,1	4	3,5
6	4	6,8	4	3,5
7	3	5,1	2	1,7
8	1	1,7	1	0,9
9	0	0,0	1	0,9
10	0	0,0	1	0,9
11	1	1,7	3	2,6
12	1	1,7	1	0,9
13	0	0,0	0	0,0
14	2	3,4	0	0,0
15	0	0,0	1	0,9
16	1	1,7	0	0

Tabelle 11

Sowohl bei den metastasierenden als auch bei den nicht metastasierenden Patienten kommen am häufigsten keine oder nur eine einzelne Cutoff-Überschreitung vor. Bei den metastasierenden Patienten kommen zusätzlich sehr häufig drei Cutoff-Überschreitungen vor.

Vergleicht man die metastasierenden Patienten mit den nicht metastasierenden Patienten, so fällt auf, dass bei den nicht metastasierenden Patienten häufiger 0, 1, 2 Cutoff-Überschreitungen vorkommen. Bei den metastasierenden Patienten kommen dagegen häufiger 3, 5, 6, 7, 8 Cutoff-Überschreitungen vor. Bei den nicht metastasierenden Patienten kommen also tendenziell eher weniger Cutoff-Überschreitungen vor,

bei den metastasierenden Patienten dagegen eher mehrere. Bei den metastasierenden Patienten gibt es zudem drei Patienten mit extrem vielen Cut-off-Überschreitungen (14 und 16). Bei den nicht metastasierenden Patienten hat nur ein Patient extrem viele Cut-off-Überschreitungen (15).

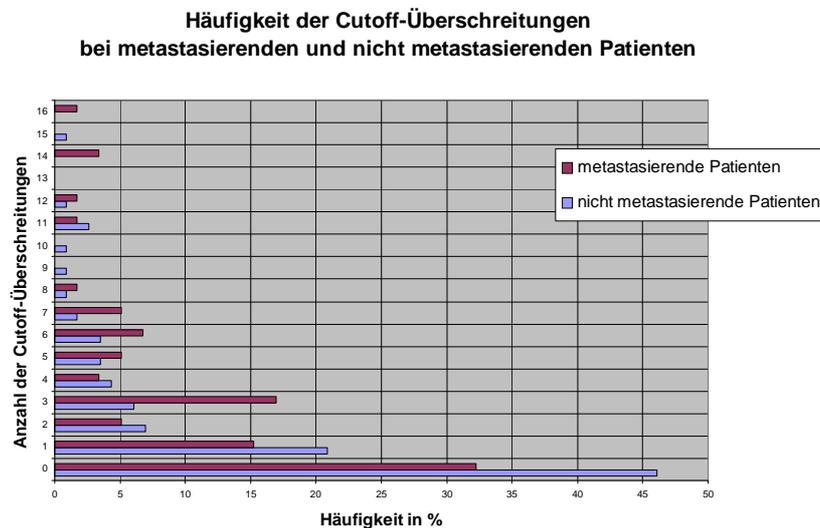


Abbildung 10

Mit folgender/-m Sensitivität, Spezifität, positiv- und negativ-prädiktiven Wert weisen Cutoff-Überschreitungen auf Metastasierung hin:

$$\text{Sensitivität} = (59 - 19) / 59 = 67,8\%$$

$$\text{Spezifität} = 53 / 115 = 46,1\%$$

$$\text{Positiv-prädiktiver Wert} = (59 - 19) / 59 + 115 - 19 - 53 = 39,2\%$$

$$\text{Negativ-prädiktiver Wert} = 53 / (19 + 53) = 73,6\%$$

Die Wahrscheinlichkeit, dass ein Patient nicht metastasiert, wenn er keine Cutoff-Überschreitung hat, ist mit 73,6% hoch.

Prozentualer Anteil der Cutoff-Überschreitungen an allen Untersuchungen bei metastasierenden und nicht metastasierenden Patienten

Der durchschnittliche prozentuale Anteil von Untersuchungen mit Cutoff-Überschreitungen an allen Untersuchungen beträgt bei metastasierenden Patienten 25,0% und bei den nicht metastasierenden Patienten 18,1%.

Vergleicht man Minimum, Maximum, Median, 1. und 3. Quartil des prozentualen Anteils der Cutoff-Überschreitungen an allen Untersuchungen bei metastasierenden und

nicht metastasierenden Patienten (**Abbildung 11 und 12**), dann fällt vor allem auf, dass der Median (16,7 % im Vergleich zu 7,1%) und das 3. Quartil (45,6% im Vergleich zu 32,1%) bei den metastasierenden Patienten viel höher liegt als bei den nicht metastasierenden Patienten.

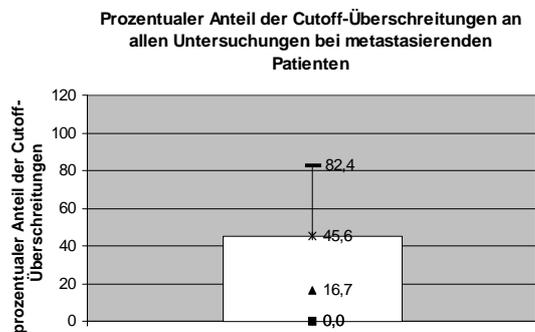


Abbildung 11

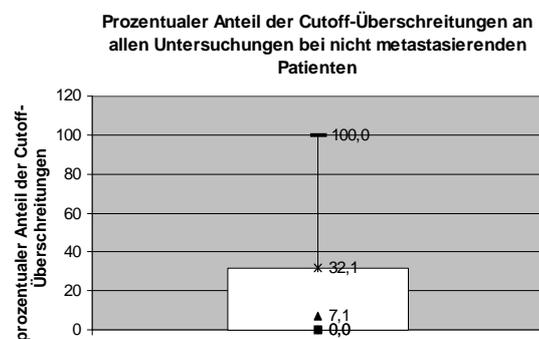


Abbildung 12

9.1.3 Korreliert das Gesamtbild der Cutoff-Überschreitungen mit dem klinischen Verlauf?

Insgesamt korrelierte bei 105 von 173 Patienten (60,7%) der Verlauf der MIA-Werte (gemessen an Cutoff-Überschreitungen) mit dem klinischen Verlauf. Es fiel auf, dass es oft keine Cutoff-Überschreitung vor der Entdeckung von Zweitumoren, Rezidiven und In-Transit- bzw. Satellitenmetastasen gab.

Bei drei Patienten, deren Tumor über Lymphknotenmetastasen zu Fernmetastasen fortschritt, wurde entweder nur die Lymphknotenmetastase (ein Patient) oder die Fernmetastase (zwei Patienten) durch eine vorzeitige Erhöhung des MIA-Wertes über den Cutoff angezeigt. Interessant waren zudem zwei Patienten, die ohne Melanommetastasen zu entwickeln dennoch erhöhte MIA-Wertes hatten. Der eine Patient entwickelte Lungenfiliae bei gleichzeitig vorliegendem Kolonkarzinom, bei dem anderen Patienten wurde drei Monate nach Messung des erhöhten MIA-Wertes ein Akustikusneurinom diagnostiziert.

9.2 Prognostische Bedeutung von MIA-Cutoff-Überschreitungen

9.2.1 Haben Cutoff-Überschreitungen zu bestimmten Zeitpunkten im MIA-Serumwertverlauf prognostische Aussagekraft?

Prognostische Bedeutung des 1. MIA-Serumwertes

Größe des ersten MIA-Serumwertes bei metastasierenden und nicht metastasierenden Patienten

Der durchschnittliche erste MIA-Serumwert ist bei später metastasierenden Patienten minimal höher als bei nicht metastasierenden Patienten: 6,40 ng/ml +/- 2,04 ng/ml im Vergleich zu 6,37 ng/ml +/- 2,42 ng/ml. Minimum, 1. Quartil und Median sind ebenfalls bei den metastasierenden Patienten ein wenig höher als bei den nicht metastasierenden Patienten (2,2 ng/ml zu 1,9 ng/ml; 5,3 ng/ml zu 4,6 ng/ml; 6,3 ng/ml zu 6,2 ng/ml). 3. Quartil und Maximum sind dagegen bei den nicht metastasierenden Patienten ein wenig höher als bei den später metastasierenden Patienten (7,6 ng/ml zu 7,4 ng/ml; 15,7 ng/ml zu 14,7 ng/ml). Diese Unterschiede sind minimal. Der erste MIA-Serumwert ist also bei metastasierenden und nicht metastasierenden Patienten insgesamt betrachtet sehr ähnlich.

Schlüsselt man nach den Tumorstadien I und II auf, so ergibt sich für Tumorstadium I ein durchschnittlicher erster MIA-Wert von 5,93 ng/ml bei metastasierenden und 6,00 ng/ml bei nicht metastasierenden Patienten. Für Tumorstadium II berechnet man einen durchschnittlichen ersten MIA-Wert von 7,20 ng/ml bei metastasierenden und 6,83 ng/ml bei nicht metastasierenden Patienten. Bei Tumorstadium II sieht man also einen etwas größeren Unterschied.

Häufigkeit der Endstadien I bis IV und Metastasierungsrate bei Patienten mit erhöhtem und niedrigem ersten MIA-Serumwert

Die Überprüfung der beiden Gruppen „Patienten mit erhöhtem ersten MIA-Serumwert“ und „Patienten mit niedrigem ersten MIA-Serumwert“ auf signifikante Unterschiede mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests (bzgl. Primärstadium, Endstadium, Geschlecht, Primärerkrankung, Clark-Level, Lokalisation) und des Mann-Whitney-Tests (bzgl. erstem Serumwert, maximalem Serumwert, Beobachtungszeit, Tumordicke, Alter) ergibt einen signifikanten Unterschied für das Endstadium. Betrachtet man die Häufigkeiten der Endstadien I bis IV bei Patienten mit erhöhtem und niedrigem ersten MIA-Wert (**Tabelle 12 und Abbildung 13**), dann fallen folgende Unterschiede auf:

Endstadium	Patienten mit erhöhtem ersten MIA-Wert		Patienten mit niedrigem ersten MIA-Wert	
	in %		in %	
I	22	57,9	69	50,7
II	6	15,8	18	13,2
III	4	10,5	40	29,4
IV	6	15,8	9	6,6
insgesamt	38	100	136	99,9

Tabelle 12

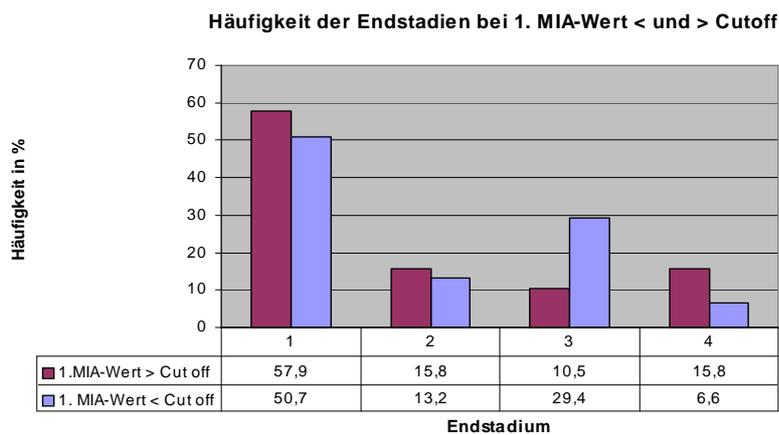


Abbildung 13

Bei Patienten mit erhöhtem ersten MIA-Wert kommen öfters als bei den Patienten mit niedrigem ersten MIA-Wert die Endstadien I und II vor, d.h. Stadien, in denen keine Metastasierung vorliegt. Bei den Patienten mit niedrigem ersten MIA-Wert kommt fast dreimal häufiger später eine Lymphknotenmetastase (Endstadium III) vor als bei Patienten mit erhöhtem ersten MIA-Wert. Dagegen kommen bei den Patienten mit erhöhtem ersten MIA-Wert mehr als doppelt so häufig Fernmetastasen (Endstadium IV) vor.

Aus diesen Ergebnissen ergibt sich bei Patienten mit niedrigen ersten MIA-Werten insgesamt eine Metastasierungsrate von 36,0% (29,4% + 6,6%) und bei Patienten mit erhöhten ersten MIA-Werten eine Metastasierungsrate von nur 26,3% (10,5% + 15,8%).

Mit folgender/-m Sensitivität, Spezifität, positiv- und negativ-prädiktiven Wert zeigt ein erhöhter erster MIA-Wert spätere Metastasierung an:

$$\text{Sensitivität} = (4 + 6) / (4 + 6 + 40 + 9) = 16,9\%$$

$$\text{Spezifität} = (69 + 18) / (22 + 6 + 69 + 18) = 75,7\%$$

$$\text{Positiv-prädiktiver Wert} = (4 + 6) / 38 = 26,3\%$$

$$\text{Negativ-prädiktiver Wert} = (69 + 18) / 136 = 64,0\%$$

Die Wahrscheinlichkeit, dass Patienten, die später nicht metastasieren, einen niedrigen ersten MIA-Wert haben, ist mit 75,7% hoch. Die Wahrscheinlichkeit, dass später metastasierende Patienten einen erhöhten ersten MIA-Wert haben, ist mit 16,9% sehr gering, ebenso wie die Wahrscheinlichkeit, dass man von einem erhöhten ersten MIA-Wert auf spätere Metastasierung schließen kann (26,3%).

Metastasierungsrate bei Patienten mit erhöhtem und niedrigem ersten präoperativen MIA-Serumwert

Von 42 Patienten, bei denen die erste MIA-Bestimmung vor Operation des Tumors lag, hatten 6 (14,3%) einen erhöhten ersten MIA-Wert und 36 (85,7%) einen niedrigen ersten MIA-Wert. Aus der Gruppe der Patienten mit erhöhtem ersten MIA-Wert metastasierten später 3 (50,0%) und aus der Gruppe der Patienten mit niedrigem ersten MIA-Wert metastasierten 13 (36,1%). Die Metastasierungsrate ist also bei den Patienten mit erhöhtem MIA-Wert vor OP wesentlich höher als bei Patienten mit MIA-Werten unterhalb des Cutoffs vor OP (**Abbildung 14 und 15**).

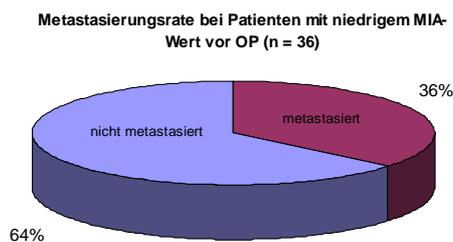


Abbildung 14

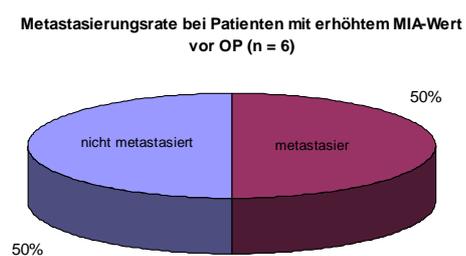


Abbildung 15

Eine Überprüfung der beiden Gruppen „Patienten mit erhöhtem ersten MIA-Serumwert vor OP“ und „Patienten mit niedrigem ersten MIA-Serumwerten vor OP“ auf signifikante Unterschiede mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests (bzgl. Primärstadium, Endstadium, Geschlecht, Primärerkrankung, Clark-Level, Lokalisation) und des Mann-Whitney-Tests (bzgl. erstem Serumwert, maximalem Serumwert, Beobachtungszeit, Tumordicke, Alter) ergibt allerdings keinen signifikanten Unterschied bezüglich späterer Metastasierung.

Beziehung zwischen erstem MIA-Wert und Endstadium

Trägt man von jedem Patienten seinen ersten MIA-Serumwert und sein Endstadium in ein Punktediagramm ein (**Abbildung 16**), so kann man keinen eindeutigen Zusammenhang zwischen dem ersten MIA-Serumwert eines Patienten und dessen Endstadium erkennen: Abgesehen von ein paar Ausreißern liegt bei allen vier Endstadien der Großteil der ersten MIA-Werte im Bereich 4 bis 10 ng/ml. Auffallend ist, dass nur bei Endstadium I erste MIA-Werte vorkommen, die unter 2,7 ng/ml liegen.

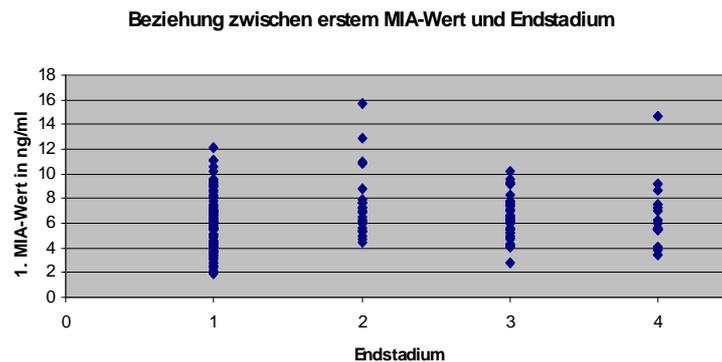


Abbildung 16

Prognostische Bedeutung des maximalen MIA-Serumwertes

Beziehung zwischen maximalem MIA-Serumwert und Endstadium

Betrachtet man das Punktediagramm (**Abbildung 17**), in dem für jeden Patienten sein größter MIA-Wert und sein Endstadium dargestellt wird, dann sieht man eindeutig, dass später metastasierende Patienten (Endstadium III oder IV), sehr viel höhere maximale MIA-Werte erreichen als nicht metastasierende Patienten.

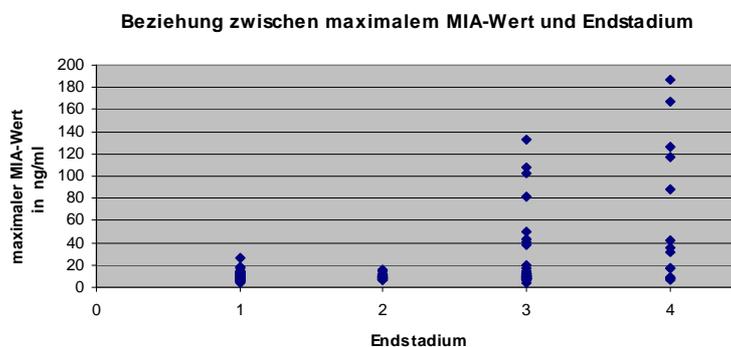


Abbildung 17

Bei Patienten, die nicht metastasieren (Endstadium I und II), reichen die maximalen MIA-Werte bis ca. 20 ng/ml. Bei sehr vielen Patienten mit späteren Lymphknotenmetastasen (Endstadium III) liegen die maximalen MIA-Werte ebenfalls in diesem Bereich. Allerdings gibt es unter ihnen auch sehr viele Patienten, die noch höhere maximale MIA-Werte (bis 133 ng/ml) aufweisen. Patienten, die Fernmetastasen entwickeln, erreichen die höchsten maximalen MIA-Werte (bis 187 ng/ml). Die maximal erreichbare Höhe des MIA-Wertes ist also bei metastasierenden und nicht metastasierenden Patienten unterschiedlich.

Untersuchungen zum Zeitpunkt des maximalen MIA-Wertes

Bei nicht metastasierenden Patienten lag der maximale MIA-Wert im Durchschnitt weit vor der letzten Untersuchung (bei Endstadium I durchschnittlich 984 Tage und bei Endstadium II durchschnittlich 913 Tage vor der letzten Untersuchung). Bei Patienten, die Lymphknotenmetastasen (Endstadium III) entwickelten, lag der maximale MIA-Wert durchschnittlich 14 Tage nach Entdeckung der Metastasierung vor. Bei Patienten, die Fernmetastasen entwickelten (Endstadium IV), zeigte sich der maximale MIA-Wert durchschnittlich 122 Tage (4,4 Monate) nach Auffinden der Metastasierung.

9.2.2 Können Cutoff-Überschreitungen eine Metastasierung anzeigen?

Zeigen Cutoff-Überschreitungen (Flips) in derselben oder der darauf folgenden Untersuchung eine Metastasierung an?

Unter den insgesamt 2009 Untersuchungen (von 174 Patienten) konnten 236 Untersuchungen (von 82 Patienten) mit Flip (einer Cutoff-Überschreitung) gefunden werden. Bei 40 der 236 Untersuchungen mit Flip bzw. bei 21 von 82 Patienten konnte in der Untersuchung mit Flip oder in der darauf folgenden Untersuchung eine Metastasierung festgestellt werden.

Der positiv-prädiktive Wert, mit dem ein Flip in der gleichen oder der darauf folgenden Untersuchung eine Metastasierung anzeigt beträgt also $40 / 236 = 16,9\%$ (für Untersuchungen) bzw. $21 / 82 = 25,6\%$ (für Patienten).

Die genaue Betrachtung und der Vergleich der MIA-Gesamtverläufe von Patienten, bei denen der Flip eine Metastasierung in derselben oder der darauf folgenden Untersuchung anzeigt, und von Patienten, die einen Flip haben, jedoch nicht metastasieren, liefert folgendes Ergebnis: Bei Patienten, bei denen der Flip eine Metastasierung in derselben oder der darauf folgenden Untersuchung anzeigt, steigt der MIA-Serumwert im Verlauf oft immer wieder kurzzeitig an, um am Ende schließlich erhöht zu bleiben. Der Flip zeigt in den meisten Fällen (17 von 21 = 81,0%) die Metastasierung vor (durchschnittlich 152 Tage/5,1 Monate davor, maximal 25,9 Monate und minimal 0,8 Monate davor) und bei vier Patienten (19,0%) gleichzeitig mit Entdeckung der Metastasierung an.

Patienten, die einen Flip in ihrem MIA-Serumwertverlauf haben, jedoch nicht metastasieren, haben im Gegensatz dazu sehr häufig nur ein bis zwei vereinzelte Flips. Der übrige MIA-Verlauf ist unauffällig.

Haben kontinuierlich erhöhte MIA-Werte prognostische Relevanz?

Bei allen 59 metastasierenden Patienten der Studie wurde geprüft, ob der MIA-Serumwert in der letzten Serumkontrolle vor klinischer Entdeckung der Metastasierung ober- oder unterhalb des gültigen Cutoffs lag. Lag er oberhalb des Cutoffs wurde der MIA-Wert in der Untersuchung davor ebenfalls auf Cut-off-Überschreitung überprüft. Die Anzahl von aufeinander folgenden Cutoff-Überschreitungen vor klinischer Entdeckung der Metastasierung wurde für jeden Patienten gezählt.

15 von 59 metastasierenden Patienten (25,4%) hatten ein oder zwei aufeinander folgende Cutoff-Überschreitungen in den Serumkontrollen unmittelbar vor Entdeckung der Metastasierung. Der Großteil der metastasierenden Patienten (44 von 59 = 74,6%) hatte keine Cutoff-Überschreitung direkt vor dem Auffinden der Metastasierung (**Tabelle 13**).

Anzahl von aufeinander folgenden Cutoff-Überschreitungen in den Serumkontrollen unmittelbar vor Entdeckung der Metastasierung	Anzahl der Patienten	in %
0	44	74,6
1	11	18,6
2	4	6,8
insgesamt	59	100

Tabelle 13

4 von 59 metastasierenden Patienten hatten zwar eine Cutoff-Überschreitung gleichzeitig mit Entdeckung der Metastasierung. Die meisten metastasierenden Patienten (40 von 59) hatten jedoch weder gleichzeitig noch direkt vor dem Auffinden der Metastasierung eine Cutoff-Überschreitung.

Bei den Patienten, die ein oder zweimal in Folge MIA-Erhöhung direkt vor klinischer Entdeckung der Metastasierung hatten, waren die MIA-Werte durchschnittlich 5,3 Monate (159 Tage) vor der Entdeckung bereits erhöht. Am kürzesten waren sie 0,8 Monate (25 Tage), am längsten 25,9 Monate (776 Tage) vorher erhöht.

Die Sensitivität, mit der kontinuierliche Cutoff-Überschreitungen direkt folgende Metastasierung anzeigen, beträgt $(11 + 4) / 59 = 25,4\%$.

Hat die Gesamtzahl der Cutoff-Überschreitungen prognostische Relevanz?

Für jeden metastasierenden Patienten wurde gezählt, wie viele MIA-Cutoff-Überschreitungen er insgesamt vor klinischer Entdeckung der Metastasierung hatte. Die Anzahl der MIA-Cutoff-Überschreitungen vor Entdeckung der Metastasierung war folgendermaßen verteilt (**Tabelle 14**):

Anzahl der Cutoff-Überschreitungen vor Entdeckung der Metastasierung	Anzahl der Patienten	in %
0	33	55,9
1	9	15,3
2	10	16,9
3	3	5,1
4	4	6,8
insgesamt	59	100

Tabelle 14

Über die Hälfte der metastasierenden Patienten (55,9%) hatte keine einzige MIA-Cutoff-Überschreitung vor Entdeckung der Metastasierung. Nur 26 von 59 metastasierenden Patienten (44,1%) hatten mindestens einmal vor dem Auffinden der Metastasierung einen erhöhten MIA-Serumwert. Die Sensitivität, mit der MIA-Cutoff-Überschreitung spätere Metastasierung anzeigt, beträgt also 44,1%.

10. Klinische und prognostische Bedeutung von MIA ohne Berücksichtigung eines Cutoffs

10.1 Bedeutung von MIA ohne Berücksichtigung eines Cutoffs als Spiegel des klinischen Bildes

10.1.1 Spiegeln MIA-Anstieg bzw. -Abfall das aktuelle klinische Bild wieder?

Vorkommen von MIA-Anstieg und MIA-Abfall bei den Tumorstadien I bis IV

Der MIA-Serumwert jeder Untersuchung wurde mit dem MIA-Serumwert der davor liegenden Untersuchung verglichen. Die Untersuchungen wurden anschließend, je nachdem, ob der MIA-Serumwert im Vergleich zur vorhergehenden Untersuchung gestiegen oder nicht gestiegen war, in zwei Gruppen eingeteilt.

Bei 5 Untersuchungen gab es weder MIA-Anstieg noch -Abfall. Bei 734 Untersuchungen gab es einen MIA-Abfall im Vergleich zur vorhergehenden Untersuchung und bei 772 Untersuchungen gab es einen MIA-Anstieg im Vergleich zur vorhergehenden Untersuchung.

Das Auszählen der Anzahl der Untersuchungen mit MIA-Abfall bzw. MIA-Anstieg bei den Tumorstadien I bis IV lieferte folgendes Ergebnis (**Tabelle 15**):

	Anzahl der Untersuchungen mit MIA-Abfall	in %	Anzahl der Untersuchungen mit MIA-Anstieg	in %	Unter- suchungen insgesamt
Stadium I	379	48,7	400	51,3	779
Stadium II	241	50,8	233	49,2	474
Stadium III	81	51,3	77	48,7	158
Stadium IV	33	34,7	62	65,3	95
insgesamt	734		772		1506

Tabelle 15

Untersuchungen mit MIA-Anstieg und MIA-Abfall kommen bei Tumorstadium I, II und III ähnlich häufig vor. Nur bei Tumorstadium IV gibt es deutlich mehr Untersuchungen mit MIA-Anstieg als MIA-Abfall (65,3% im Vergleich zu 34,7%).

Mit folgender/-m Sensitivität, Spezifität, positiv- und negativ-prädiktiven Wert zeigt ein MIA-Anstieg Tumorstadium III und IV an:

$$\text{Sensitivität} = (77 + 62) / (158 + 95) = 54,9\%$$

$$\text{Spezifität} = (379 + 241) / (779 + 474) = 49,5\%$$

$$\text{Positiv-prädiktiver Wert} = (77 + 62) / 772 = 18,0\%$$

$$\text{Negativ-prädiktiver Wert} = (379 + 241) / 734 = 84,5\%$$

Die Wahrscheinlichkeit, dass bei abfallenden MIA-Werten Tumorstadium I oder II vorliegt, ist mit 84,5% recht hoch.

Größe des MIA-Anstiegs bei den Tumorstadien I bis IV

Betrachtet man die Punktdiagramme, in denen jeder Tumorstadiumangabe der MIA-Anstieg bzw. der prozentuale MIA-Anstieg derselben Untersuchung zuordnet wird (**Abbildung 18 und 19**), kann man bei Tumorstadium IV deutlich höhere MIA-Anstiege als bei den Tumorstadien I, II und III erkennen.

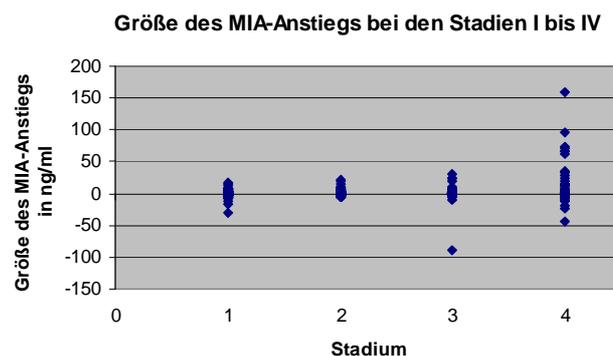


Abbildung 18

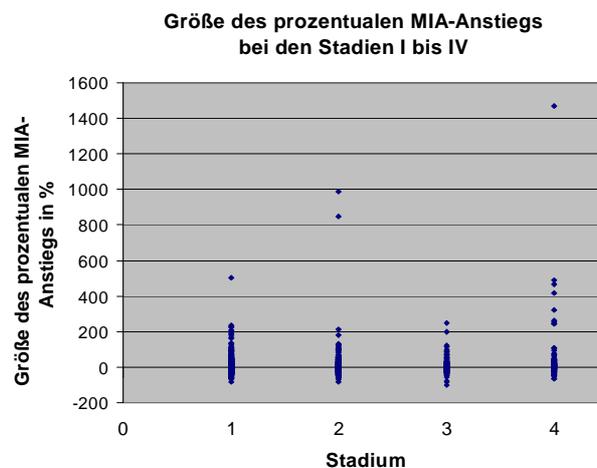


Abbildung 19

Vergleich der Aspekte Tumordicke, Primärerkrankung und Stadium bei Untersuchungen mit MIA-Anstieg und MIA-Abfall

Bei der Untersuchung der beiden Gruppen „Untersuchungen mit MIA-Anstieg bzw. MIA-Abfall“ auf signifikante Unterschiede bezüglich Tumordicke (Mann-Whitney-Test, p-Wert = 0,910) und Primärerkrankung (Chi-Quadrat-Test, p-Wert = 0,477) konnten keine signifikanten Unterschiede gefunden werden. Beim Vergleich der Stadien mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests ergab sich ein signifikanter Unterschied (p-Wert = 0,034): Bei Untersuchungen mit MIA-Abfall kam gehäuft Tumorstadium II und bei Untersuchungen mit MIA-Anstieg gehäuft Tumorstadium IV vor.

10.1.2 Spiegelt die Häufigkeit von MIA-Anstiegen das klinische Bild wieder?

Bei jedem Patienten wurde gezählt, wie viele Untersuchungen mit MIA-Anstieg er hatte. Daraus und aus der Gesamtzahl seiner Untersuchungen wurde der prozentuale Anteil der Untersuchungen mit MIA-Anstieg an allen Untersuchungen für jeden Patienten berechnet.

Beim Vergleich von Mittelwert (43,8% zu 48,8%), Minimum (0% zu 16,7%), Maximum (66,7% zu 87,5%), 1. Quartil (36,4% zu 40,0%), Median (44,4% zu 50,0%) und 3. Quartil (50,0% zu 59,3%) des prozentualen Anteils von Untersuchungen mit MIA-Anstieg an allen Untersuchungen bei metastasierenden und nicht metastasierenden Patienten (**Abbildung 20 und 21**) fällt auf, dass alle Werte bei den metastasierenden Patienten höher liegen als bei den nicht metastasierenden. Erstere haben also insgesamt einen höheren Anteil an Untersuchungen mit MIA-Anstieg. Oder anders formuliert: Metastasierung bzw. die Ausbreitung und Vermehrung der Tumormasse steht mit dem gehäuftem Auftreten von MIA-Anstiegen im Zusammenhang.

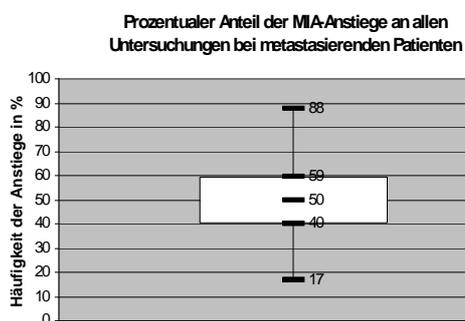


Abbildung 20

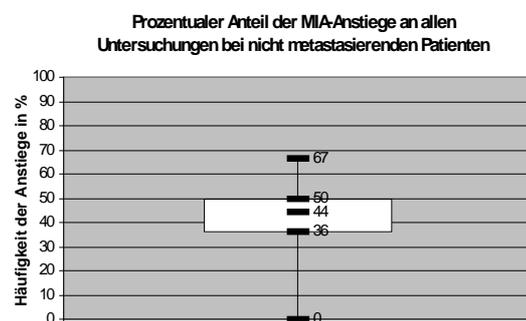


Abbildung 21

10.1.3 Korreliert das Gesamtbild des MIA-Serumwertverlaufs mit dem klinischen Verlauf?

Vergleich des MIA-Anstiegs und -Abfalls mit dem klinischen Verlauf bei metastasierenden Patienten

- Bei 39 von 58 (67,2%) beurteilbaren Patientenverläufen korrelierte der MIA-Anstieg und -Abfall mit dem klinischen Verlauf.
- Bei 8 von 58 (13,8%) Patienten korrelierte der MIA-Verlauf nur teilweise mit dem klinischen Verlauf.
- Bei 6 von 58 (10,3%) Patienten korrelierte der MIA-Anstieg und -Abfall nicht mit dem klinischen Verlauf.
- Bei 5 von 58 (8,6%) konnte keine Entscheidung, ob Korrelation vorlag oder nicht, getroffen werden.

Bei 34 von 58 (58,6%) Patienten wurde eine Metastase und/oder ein Zweitumor vorher durch MIA-Anstieg angezeigt. Im Detail wurden vorher angezeigt:

- Lymphknotenmetastasen bei 16 Patienten
- Fernmetastasen bei 14 Patienten
- Lymphknoten- und Fernmetastase bei 1 Patienten
- Zweitumor bei 1 Patienten
- Fernmetastase und Zweitumor bei 1 Patienten
- Lymphknotenmetastase und Rezidiv bei 1 Patienten

Die Sensitivität, mit der MIA-Anstieg auf folgende Metastasierung deutet, beträgt $33 / 58 = 56,9\%$

Eine am Ende **steigende MIA-Verlaufstendenz** lag bei 28 von 58 (48,3%) Patienten vor. Eine schließlich **fallende MIA-Verlaufstendenz** lag bei 9 von 58 (15,5%) Patienten vor. Bei 17 von 58 (29,3%) Patienten konnte wegen dem **schwankenden MIA-Verlauf** nicht entschieden werden, welche Verlaufstendenz vorlag.

4 von 58 (6,9%) Patienten hatten insgesamt nur 3 Untersuchungen und wurden deshalb nicht in die Bewertung miteinbezogen.

Vergleich des MIA-Anstiegs und -Abfalls mit dem klinischen Verlauf bei nicht metastasierenden Patienten

Eine am Ende **steigende MIA-Verlaufstendenz** lag bei 14 von 115 (12,2%) beurteilten Patienten vor. Eine letztendlich **abfallende MIA-Verlaufstendenz** gab es bei 32 von 115 (27,8%) Patienten. Eine am Ende **schwankende MIA-Verlaufstendenz** (d.h. keine klar erkennbare ansteigende oder abfallende Tendenz) hatten 67 von 115 (58,3%) Patienten.

2 von 115 (1,7%) der Patienten hatten nur 3 Untersuchungen und wurden deshalb nicht beurteilt.

Der Vergleich des MIA-Verlaufs mit dem Krankheitsverlauf lieferte folgendes Ergebnis:

- Bei 96 von 115 (83,5%) korrelierte der MIA-Verlauf mit dem klinischen Verlauf.
- Bei 2 von 115 (1,7%) korrelierte der MIA-Verlauf nur teilweise mit dem klinischen Verlauf. In beiden Fällen lag es daran, dass es vor oder mit Entdeckung des Zweittumors keinen MIA-Anstieg gab, wie erwartet wurde.
- Bei 14 von 115 (12,2%) korrelierte der MIA-Verlauf nicht mit dem klinischen Verlauf.
- Bei 3 von 115 (2,6%) konnte keine Entscheidung, ob Korrelation vorlag oder nicht, getroffen werden.

Gesamtrate der positiven Übereinstimmungen von MIA-Verlauf mit klinischem Verlauf bei metastasierenden und nicht metastasierenden Patienten

Insgesamt korrelierte bei $(39 + 96) / (58 + 115) = 135 / 173 = 78,0\%$ der Patienten der MIA-Verlauf mit dem klinischen Verlauf.

10.2 Prognostische Bedeutung des MIA-Verlaufs

10.2.1 Hat die MIA-Verlaufstendenz Aussagekraft bezüglich späterer Metastasierung?

Der Vergleich der MIA-Verlaufstendenzen von metastasierenden und nicht metastasierenden Patienten liefert folgendes Ergebnis (**Tabelle 16**):

	Häufigkeit bei metastasierenden Patienten (n = 58)		Häufigkeit bei nicht metastasierenden Patienten (n = 115)	
		in %		in %
Tendenz steigend	28	48,3	14	12,2
Tendenz fallend	9	15,5	32	27,8
Schwankungen	17	29,3	67	58,3
nur 3 Untersuchungen	4	6,9	2	1,7

Tabelle 16

Bei den metastasierenden Patienten findet man in fast der Hälfte der Fälle (48,3%) eine steigende MIA-Verlaufstendenz. Bei den nicht metastasierenden Patienten ist sie dagegen relativ selten (12,2%). Am zweithäufigsten (29,3%) sieht man bei den metastasierenden Patienten eine schwankende MIA-Verlaufstendenz. Bei den nicht metastasierenden Patienten schwankt der MIA-Wert am häufigsten (58,3%) konstant um einen

bestimmten Wert. Bei ihnen findet man am zweithäufigsten (27,8%) eine abfallende MIA-Verlaufstendenz. Im direktem Vergleich kommt sie bei den nicht metastasierenden Patienten wesentlich häufiger vor als bei den metastasierenden Patienten (27,8% zu 15,5%).

Für eine steigende MIA-Verlaufstendenz als Marker für Metastasierung ergibt sich folgende (-r) Sensitivität, Spezifität, positiv- und negativ-prädiktiver Wert:

$$\text{Sensitivität} = 28 / 54 = 51,9\%$$

$$\text{Spezifität} = (32 + 67) / 113 = 87,6\%$$

$$\text{Positiv-prädiktiver Wert} = 28 / (28 + 14) = 66,7\%$$

$$\text{Negativ-prädiktiver Wert} = (32 + 67) / (9 + 17 + 32 + 67) = 79,2\%$$

10.2.2 Hat kontinuierlicher MIA-Anstieg prognostische Aussagekraft?

Bei den 59 metastasierenden Patienten wurde untersucht, ob und wie viele aufeinander folgende MIA-Anstiege es in den Serumkontrollen direkt vor klinischer Entdeckung der Metastasierung gab: 33 der 59 Patienten (55,9%) hatten gar keinen MIA-Anstieg direkt vor dem Auffinden der Metastasierung. 18 von diesen (30,5%) hatten zwar einen MIA-Anstieg gleichzeitig mit Entdeckung der Metastasierung. Die restlichen 15 (25,4%) Patienten hatten jedoch weder gleichzeitig noch vor Entdeckung der Metastasierung einen MIA-Anstieg.

26 der 59 Patienten (44,1%) hatten mindestens einen MIA-Anstieg unmittelbar vor der klinischen Entdeckung der Metastasierung. 15 (25,4%) dieser Patienten hatten einen MIA-Anstieg in der letzten Serumkontrolle vor Entdeckung der Metastasierung. 7 (11,9%) Patienten hatten zwei MIA-Anstiege in den letzten beiden Serumkontrollen vor Entdeckung der Metastasierung. 3 (5,1%) Patienten hatten dreimal in Folge und 1 (1,7%) Patient hatte sogar fünfmal in Folge MIA-Anstiege in den Serumkontrollen unmittelbar vor Auffinden der Metastasierung.

Die Zeit zwischen Auftreten eines ersten MIA-Anstiegs und Entdeckung der Metastase betrug im Durchschnitt 184 Tage (6,1 Monate), minimal 16 Tage, maximal 865 Tage (28,8 Monate).

Mit einer Sensitivität von $(18 + 26) / 59 = 74,6\%$ zeigt ein MIA-Anstieg direkt davor oder gleichzeitig Metastasierung an. Die Sensitivität von MIA-Anstieg als Indikator für direkt folgende Metastasierung beträgt $26 / 59 = 44,1\%$.

10.2.3 Unterscheidet sich der MIA-Serumwert-Verlauf von metastasierenden und nicht metastasierenden Patienten?

Darstellung des Verlaufs der MIA-Serumwerte in Bezug auf den Zeitpunkt der Erstuntersuchung bei metastasierenden und nicht metastasierenden Patienten

Vergleicht man die beiden Diagramme von metastasierenden und nicht metastasierenden Patienten, die alle MIA-Serumwerte in ihrem zeitlichen Abstand zur Erstuntersuchung darstellen (**Abbildung 22 und 23**), so fällt auf, dass die eingezeichnete Trendlinie bei den nicht metastasierenden Patienten relativ konstant bei ungefähr 7 ng/ml verläuft. Bei den metastasierenden Patienten verläuft sie dagegen steil ansteigend. Die MIA-Serumwerte von nicht metastasierenden Patienten sind nur ein einziges Mal größer als 20 ng/ml. Dagegen gibt es bei den metastasierenden Patienten MIA-Serumwerte bis 187 ng/ml.

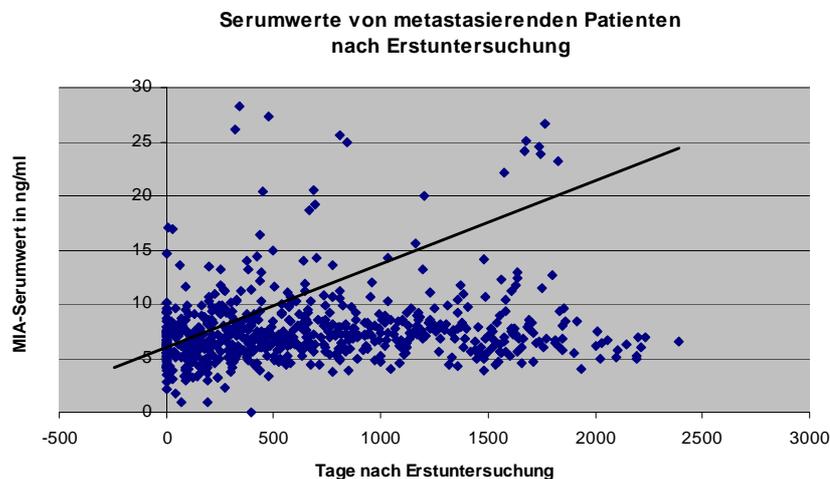


Abbildung 22

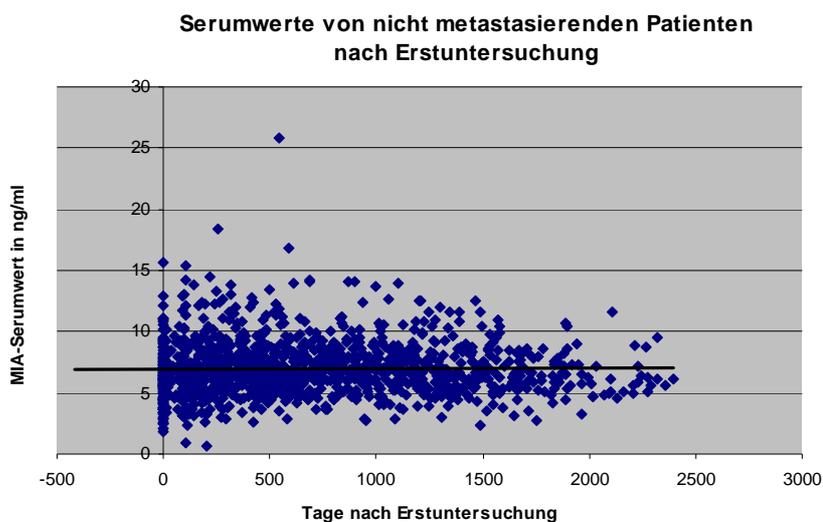


Abbildung 23

Darstellung des Verlaufs der MIA-Serumwerte in Bezug auf den Zeitpunkt der Entdeckung der Metastasierung

In dem Diagramm, das alle MIA-Serumwerte von metastasierenden Patienten in ihrem zeitlichen Abstand zur Entdeckung der Metastasierung darstellt (**Abbildung 24**), sieht man sehr deutlich, dass der größte Teil der MIA-Ausreißer und die größten MIA-Werte erst nach Feststellung der Metastase (Zeitpunkt 0) auftreten. Kurz vor Entdeckung der Metastasierung gibt es zwar schon einige höhere MIA-Werte, die allermeisten liegen jedoch noch unter 20 ng/ml. Die lineare Trendlinie ist steigend.

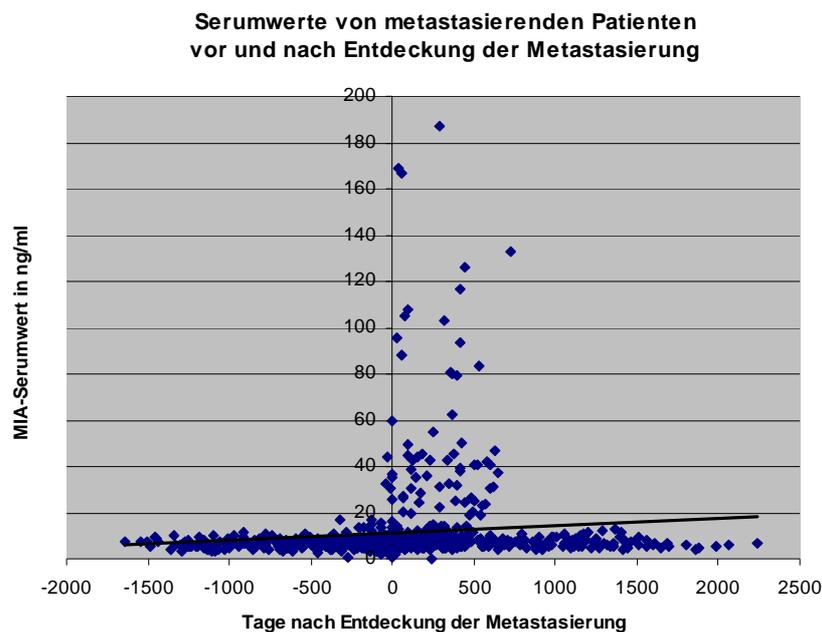


Abbildung 24

Vergleicht man die linearen Trendlinien der Diagramme, die die MIA-Serumwerte vor und nach Entdeckung der Metastasierung getrennt darstellen (**Abbildung 25 und 26**), so erkennt man vor Entdeckung der Metastasierung eine leicht steigende und nach Entdeckung der Metastasierung eine abfallende Trendlinie.

Beim Vergleich des MIA-Verlaufs vor Entdeckung der Metastasierung mit dem MIA-Verlauf von nicht metastasierenden Patienten (**Abbildung 23**) kann man erkennen, dass es bei den später metastasierenden Patienten schon vor klinischer Entdeckung der Metastasierung zunehmend steigende MIA-Serumwerte gibt, wohingegen bei den nicht metastasierenden Patienten die MIA-Serumwerte zwar schwanken, insgesamt jedoch relativ konstant bleiben.

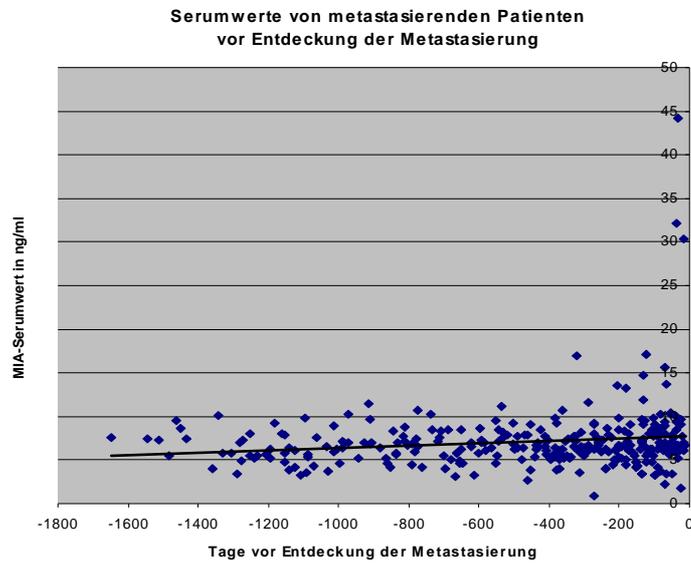


Abbildung 25

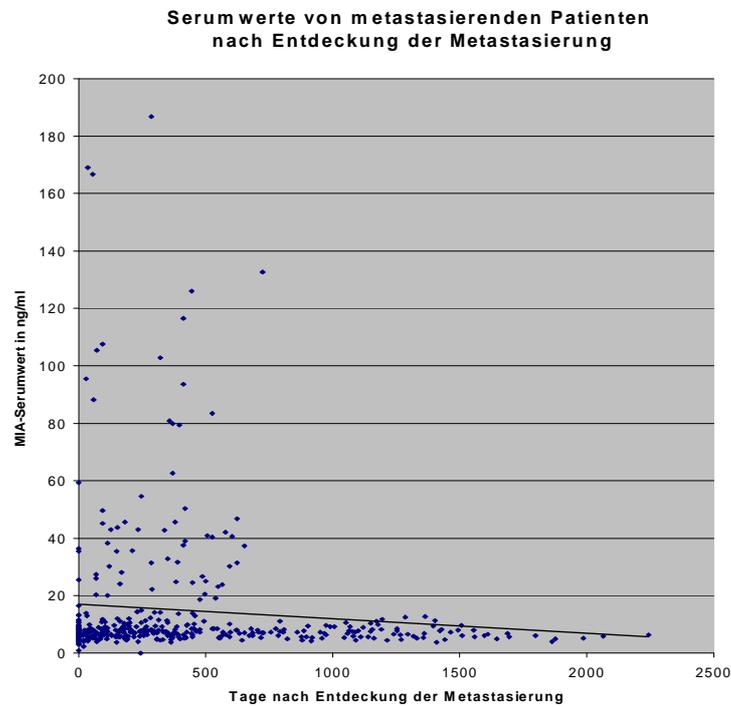


Abbildung 26

10.2.4 Sind die Verlaufstendenzen des MIA-Serumwertes signifikant?

Die in den Diagrammen aus 10.2.3 gemachten Beobachtungen zur Verlaufstendenz des MIA-Serumwertes nach Erstuntersuchung bzw. vor und nach Entdeckung der Metastasierung bestätigten sich im Großen und Ganzen noch einmal in den Regressionsanalysen. Nur in einem Fall lieferte die Regressionsanalyse ein etwas anderes Ergebnis: Der Verlauf der MIA-Werte von nicht metastasierenden Patienten nach Erstuntersuchung wurde in der Graphik als relativ konstant, d.h. horizontal verlaufend beschrieben. Die Regressionsanalyse ergab dagegen ein Anstieg, der jedoch nicht signifikant war.

Die Regressionsanalysen lieferten folgende **signifikante Ergebnisse**:

- Der Verlauf der MIA-Serumwerte von metastasierenden Patienten nach Erstuntersuchung ist (mit einem p-Wert von 0,00000000002) signifikant steigend. Die MIA-Werte steigen um 0,008 ng/ml pro Tag.
- Der Verlauf der MIA-Serumwerte in Bezug auf den Zeitpunkt der Entdeckung der Metastasierung ist (mit einem p-Wert von 0,005) signifikant steigend. Die MIA-Werte steigen dabei um 0,003 ng/ml pro Tag.
- **Der Verlauf der MIA-Serumwerte vor klinischer Entdeckung der Metastasierung ist (mit einem p-Wert von 0,009) signifikant steigend. Die MIA-Werte steigen vor klinischer Entdeckung der Metastasierung um 0,001 ng/ml pro Tag.**
- Der Verlauf der MIA-Serumwerte nach Entdeckung der Metastasierung ist (mit einem p-Wert von 0,04) signifikant abfallend. Die MIA-Werte fallen nach Entdeckung der Metastasierung um 0,005 ng/ml pro Tag.

Durch das Berechnen der Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der y-Achse (der Diagramme aus 10.2.3) konnten zudem Informationen über die Höhe des MIA-Serumwertes und des MIA-Anstiegs zum Zeitpunkt der Entdeckung der Metastasierung und zum Zeitpunkt der Erstuntersuchung gewonnen werden:

- Zum Zeitpunkt der Erstuntersuchung betrug der MIA-Serumwert bei den nicht metastasierenden Patienten 6,96 ng/ml und bei den metastasierenden Patienten 6,05 ng/ml (Stadium III: 7,76 ng/ml, Stadium IV: 5,24 ng/ml).
- Zum Zeitpunkt der Entdeckung der Metastasierung betrug der MIA-Serumwert 11,34 ng/ml (Stadium III: 8,82 ng/ml, Stadium IV: 16,31 ng/ml) und der MIA-Anstieg im Vergleich zur vorhergehenden Untersuchung 1,72 ng/ml.

Alle Regressionsanalysen wurden abschließend noch einmal getrennt für metastasierende Patienten mit Lymphknotenmetastasen (Stadium III) und Fernmetastasen (Stadium IV) gemacht. Dabei wurden folgende signifikante Unterschiede im Vergleich zu den Regressionsanalysen, wo Stadium III und IV gemeinsam untersucht wurden, gefunden:

- Der Verlauf der MIA-Serumwerte in Bezug auf den Zeitpunkt der Entdeckung der Metastasierung ist bei Stadium III und IV gemeinsam und bei Stadium III (p -Wert = 0,009, Anstieg: 0,002 ng/ml pro Tag) signifikant steigend. Bei Stadium IV alleine wird jedoch keine Signifikanz erreicht.
- **Der Verlauf der MIA-Serumwerte vor Entdeckung der Metastasierung ist bei Stadium III und IV gemeinsam und bei Stadium IV alleine (p -Wert = 0,003, Anstieg: 0,004 ng/ml pro Tag) signifikant steigend. Die Signifikanz wird von Stadium III alleine nicht erreicht.**
- Der Verlauf der MIA-Serumwerte nach Entdeckung der Metastasierung ist bei Stadium III und IV gemeinsam und bei Stadium IV alleine (p -Wert = 0,005, Abfall: 0,018 ng/ml pro Tag) signifikant fallend. Auch hier wird die Signifikanz von Stadium III alleine nicht erreicht.

Zusammenfassen lässt sich also Folgendes:

Das wichtigste Ergebnis all dieser Regressionsanalysen ist der Nachweis, dass der Anstieg der MIA-Serumwerte vor klinischer Entdeckung der Metastasierung signifikant, d.h. nicht zufällig ist.

Der um 0,001 ng/ml pro Tag (0,1 ng/ml pro 100 Tage) ansteigende MIA-Serumwertverlauf von später metastasierenden Patienten unterscheidet sich also vom MIA-Serumwertverlauf von nicht metastasierenden Patienten, bei denen in der Graphik eine relativ gleichbleibende und bei der Regressionsanalyse eine zwar leicht steigende, jedoch nicht signifikante Tendenz erkennbar war.

Unterscheidet man zwischen Patienten, die Fernmetastasen entwickelten (Stadium IV), und Patienten, die Lymphknotenmetastasen entwickelten (Stadium III), so kann die signifikant steigende MIA-Verlaufstendenz vor Entdeckung der Metastasierung nur bei Patienten, die Fernmetastasen entwickelten (Stadium IV), und nicht bei Patienten, die Lymphknotenmetastasen entwickelten (Stadium III) nachgewiesen werden.

DISKUSSION

11. Spiegelt MIA das klinische Bild wider?

Eine wichtige Voraussetzung, um ein Molekül als Tumormarker für die Überwachung des Krankheitsverlaufs und das Therapiemonitoring einsetzen zu können, ist seine Fähigkeit das klinische Bild widerzuspiegeln. Um dies zu prüfen, wurde in der vorliegenden Studie zum einen das Vorkommen von erhöhten und normalen MIA-Werten ($>$ und $<$ Cutoff) bei den Tumorstadien I bis IV untersucht. Dabei konnte ein Zusammenhang zwischen der Höhe der MIA-Werte und den Tumorstadien gefunden werden: Mit zunehmendem Tumorstadium kommen häufiger erhöhte MIA-Werte und seltener niedrige MIA-Werte vor (Häufigkeit erhöhter MIA-Werte bei Untersuchungen mit Stadium I: 16,4%, Stadium II: 20,6%, Stadium III: 24,0%, Stadium IV: 45,9%). Dies bestätigte sich hochsignifikant ($p < 0,001$) im Chi-Quadrat-Test. Eine Betrachtung der Verteilung der MIA-Werte bei den Tumorstadien I bis IV (**Abbildung 9**) zeigte zudem recht deutlich, dass mit steigendem Tumorstadium zunehmend höhere MIA-Werte erreicht werden.

Die Korrelation zwischen den MIA-Serumwerten und den Tumorstadien wurde bereits von vielen Autoren beschrieben: Bosserhoff et al. fanden in ihrer ersten Studie zu MIA als Serummarker des malignen Melanoms (Bosserhoff et al. 1997a und 1999a) bei 13% der Patienten mit Tumorstadium I, bei 23% der Patienten mit Stadium II und gleich bei 100% der Patienten mit Tumorstadium III und IV erhöhte MIA-Werte vor Operation des Tumors. Dabei nahm MIA in den Tumorstadien III und IV Werte zwischen 7,1 und 82,0 ng/ml an. Im Vergleich dazu lagen die MIA-Serumwerte in unserer Studie zwischen 3,8 und 169,0 ng/ml. In einer folgenden Studie von Bosserhoff et al. mit einem größeren Patientenkollektiv wurde die hohe Sensitivität, mit der MIA Stadium III- und IV-Patienten erkannte, nicht mehr ganz erreicht: In 59% der Patienten mit Stadium III und in 89% der Patienten mit Stadium IV wurden vor Operation erhöhte MIA-Serumwerte gefunden (Bosserhoff et al. 2000).

Die Bestimmung von MIA in den verschiedenen Tumorstadien I bis IV wurde nach Bosserhoff et al. von vielen weiteren Arbeitsgruppen wiederholt (Djureen Martenson et al. 1999, Djukanovic et al. 2000, Schmitz et al. 2000, Stahlecker et al. 2000, Meral et al. 2001, Tas et al. 2004). Sie berichten – abhängig davon, ob der MIA-Serumwert vor Operation oder gemischt vor und nach Operation bestimmt worden war – von zum Teil etwas unterschiedlichen Sensitivitäten: In Studien, in denen der MIA-Serumwert vor Operation des Tumors gemessen worden war, wurden für Tumorstadium I Sensitivitäten zwischen 0% und 13%, für Stadium II Sensitivitäten zwischen 0% und 23%, für Tumorstadium III Sensitivitäten zwischen 53,8% und 100% und für Stadium IV Sensitivitäten zwischen 68,0% und 100% gemessen. In Studien, in denen MIA-Serumwertbestimmungen gemischt vor und nach Operation durchgeführt worden waren, wurden tendenziell etwas niedrigere Sensitivitäten gefunden: Für Stadium I zwischen 0% und

4,4%, für Stadium II zwischen 11,5% und 14,3%, für Stadium III zwischen 20% und 60% und für Stadium IV zwischen 61,4% und 89,5%.

Auch in unserer Studie wurde MIA vor und nach Operation des Primärtumors bestimmt. Für Tumorstadium III/IV wurde eine Sensitivität von 31,0%, eine Spezifität von 81,9%, ein positiv-prädiktiver Wert von 26,1% und ein negativ-prädiktiver Wert von 84,6% gefunden, mit denen erhöhte MIA-Werte Tumorstadium III und IV anzeigen. Die im Vergleich zu vorhergehenden Studien eher niedrig erscheinende Sensitivität erklärt sich, wenn man bedenkt, dass die allermeisten der 1807 berücksichtigten Serumwertbestimmungen erst nach Operation des Tumors durchgeführt wurden, als bei den meisten Patienten keine oder nur noch eine geringe Tumorlast vorhanden war. Die gefundene Spezifität und der negativ-prädiktive Wert sind dagegen recht hoch, d.h. die Wahrscheinlichkeit, dass bei Vorliegen von Stadium I und II der MIA-Wert nicht erhöht ist, ist recht hoch, wie auch die Wahrscheinlichkeit, dass bei normal hohen MIA-Werten nicht Stadium III oder IV (d.h. Lymphknoten- oder Fernmetastasen) vorliegen. Dies verdeutlicht weiterhin den Zusammenhang zwischen MIA-Serumwert und Tumorstadium.

Um weiter der Frage nachzugehen, inwieweit MIA das klinische Bild widerspiegelt, wurden neben dem Aspekt des Tumorstadiums, auch die Aspekte Tumordicke und Primärerkrankung näher untersucht: Ein Vergleich der beiden Gruppen „Untersuchungen mit erhöhten MIA-Werten“ und „Untersuchungen mit normalen MIA-Werten“ bezüglich der Tumordicke des Primärtumors ergab einen signifikanten Unterschied ($p = 0,023$): Patienten mit dickeren Primärtumoren wiesen vermehrt erhöhte MIA-Serumwerte vor. In dieser Studie gab es also einen Zusammenhang zwischen der Höhe der MIA-Serumwerte und der Tumordicke. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu dem Ergebnis einer Studie von Bosserhoff et al. (Bosserhoff et al. 1997a), in der keine klare Korrelation zwischen Tumordicke und MIA-Werten gefunden werden konnte, was damals zu der Überlegung führte, ob MIA eventuell ein von der Tumordicke unabhängiger Prognosemarker sei. Beim Vergleich der Primärerkrankungen in den beiden Gruppen konnte interessanterweise auch ein hoch signifikanter Unterschied gefunden werden: Bei den Primärerkrankungen noduläres Melanom (56 von 174 Patienten) und Lentigo-maligna-Melanom (14 von 174 Patienten) kamen gehäuft erhöhte MIA-Werte vor, während bei den Primärerkrankungen superfiziell spreitendes Melanom (75 von 174 Patienten) und akrolentiginöses Melanom (4 von 174 Patienten) eher normal hohe MIA-Werte gefunden wurden.

Eine mögliche Erklärung für die in den beiden Gruppen „Untersuchungen mit erhöhten und niedrigen MIA-Werten“ gefundenen Unterschiede bezüglich Tumordicke und Primärerkrankung ist, dass dickere Tumoren, die definitionsbedingt gehäuft beim noduläre Melanom vorkommen, eher zu Metastasierung und wegen der damit einhergehenden, größeren Tumormasse auch eher zu erhöhten MIA-Werten neigen als dünnere Tumoren, die mehr beim superfiziell spreitenden Melanom oder auch bei früh diagnostizierten akrolentiginösen Melanomen vertreten sind. Die in unserer Studie gefundenen tendentiell erhöhten MIA-Werte beim LMM, welches bezüglich späterer

Metastasierung prognostisch eher besser eingeschätzt wird, passen nicht zu dieser Erklärung. Allerdings war auch nur eine relativ geringe Zahl an Patienten mit dieser Primärerkrankung in unserer Studie vertreten, um eine definitive Aussage machen zu können.

Nachdem sich gezeigt hatte, dass die Höhe von MIA-Werten in enger Beziehung zu Tumorstadium, Tumordicke und Primärerkrankung steht, sollte in dieser Studie untersucht werden, ob auch MIA-Anstieg bzw. -Abfall auf diese Weise das klinische Bild widerspiegeln kann. Dazu wurde zunächst parallel das Vorkommen von MIA-Anstieg und MIA-Abfall (im Vergleich zur vorhergehenden Untersuchung eines Patienten) bei den Tumorstadien I bis IV untersucht. Dabei gab es nur bei Tumorstadium IV deutlich mehr MIA-Anstiege als MIA-Abfälle (65,3% im Vergleich zu 34,7%). Im Chi-Quadrat-Test wurde nur für Tumorstadium II und IV jeweils ein signifikantes Ergebnis ($p = 0,034$) gefunden: Untersuchungen mit MIA-Abfall waren verstärkt mit Tumorstadium II und Untersuchungen mit MIA-Anstieg gehäuft mit Tumorstadium IV assoziiert. Bei der Betrachtung des (prozentualen) MIA-Anstiegs bei den Tumorstadien I bis IV (**Abbildung 18 und 19**) kann man vor allem bei Tumorstadium IV deutlich höhere MIA-Anstiege erkennen. All diese Untersuchungen weisen stark daraufhin, dass ein MIA-Anstieg vor allem in Stadium IV – einem Tumorstadium mit meist schnell fortschreitendem Tumor und großer Tumormasse – vorkommt.

Die Sensitivität, mit der ein MIA-Anstieg auf Tumorstadium III und IV hinweist, ist mit 54,9% wesentlich höher als die Sensitivität von 31,0%, mit der Cutoff-Überschreitungen Tumorstadium III und IV anzeigen. Allerdings sind die Spezifität (49,5% im Vergleich zu 81,9% bei Cutoff-Überschreitungen) und der positiv-prädiktive Wert (18,0% im Vergleich zu 26,1% bei Cutoff-Überschreitungen) viel geringer. Dies ist nicht verwunderlich, wenn man bedenkt, dass der Anstieg eines MIA-Wertes im Vergleich zum MIA-Wert der vorangehenden Untersuchung selbst bei Stadium I und II-Patienten nicht unbedingt etwas Außergewöhnliches sein muss. Der negativ-prädiktive Wert liegt mit 84,5% ähnlich hoch wie der negativ-prädiktive Wert von Cutoff-Überschreitungen (84,6%). Er sagt aus, dass bei abfallenden MIA-Werten die Wahrscheinlichkeit hoch ist, dass Tumorstadium I oder II – also metastasefreie Tumorstadien – vorliegen.

Zuletzt sollte auch für MIA-Anstieg bzw. MIA-Abfall untersucht werden, ob sie – wie die Höhe der MIA-Serumwerte – mit der Tumordicke und der Primärerkrankung zusammenhängen. Beim Vergleich der beiden Gruppen „Untersuchungen mit MIA-Anstieg und MIA-Abfall“ konnten allerdings keine signifikanten Unterschiede gefunden werden. Dies mag wiederum an der geringen Spezifität von MIA-Anstieg bzw. MIA-Abfall liegen.

Zusammengefasst zeigen all diese Untersuchungen zum Verhältnis zwischen dem MIA-Anstieg und dem klinischen Bild recht deutlich, dass MIA-Anstieg weniger mit der Primärtumorart bzw. -dicke, sondern vielmehr mit dem Fortschreiten, der Ausbreitung und Vermehrung von Tumormasse – wie sie besonders in Tumorstadium IV vorkommen – im Zusammenhang steht. Die besonders gute Beziehung zwischen dem MIA-Verlauf und dem klinischen Verlauf bei fortgeschrittenen Melanomen, wurde bereits in mehreren Studien festgestellt. Bosserhoff et al. berichten von 39 Patienten, bei denen regel-

mäßig gemessene MIA-Werte mit dem klinischen Verlauf verglichen wurden. Bei 29 von 34 (85,3%) Patienten mit schneller Tumorprogression korrelierte die Zunahme der Anzahl und Größe von Metastasen mit einem signifikanten MIA-Anstieg. Bei allen fünf Patienten, die auf Immuntherapie ansprachen, konnte dagegen ein signifikanter Abfall der MIA-Werte gemessen werden (Bosserhoff et al. 2000). Die Tatsache, dass bei Stadium IV-Patienten eine Tumorprogression mit MIA-Anstieg und ein Ansprechen auf Therapie bzw. eine partielle Remission mit MIA-Abfall verbunden ist, wurde zudem auch von Stahlecker et al., Deichmann et al. und Dornier et al. aufgezeigt (Stahlecker et al. 2000, Deichmann et al. 1999 und 2001, Dornier et al. 2002).

Ob, neben der MIA-Höhe und dem MIA-Verlauf, auch die Häufigkeit von MIA-Cutoff-Überschreitungen bzw. MIA-Anstiegen das klinische Bild widerspiegeln kann, sollte als nächstes in unserer Studie untersucht werden. Dazu wurde zunächst die Häufigkeit von Cutoff-Überschreitungen im MIA-Serumwertverlauf von metastasierenden und nicht metastasierenden Patienten miteinander verglichen. Es stellte sich heraus, dass Cutoff-Überschreitungen sowohl bei metastasierenden als auch bei nicht metastasierenden Patienten vorkommen und sie in beiden Gruppen eher selten sind: Sowohl bei metastasierenden als auch bei nicht metastasierenden Patienten kommen am häufigsten keine oder nur eine einzelne MIA-Cutoff-Überschreitung im gesamten MIA-Serumwertverlauf vor (metastasierende Patienten: $32,2\% + 15,3\% = 47,5\%$ versus nicht metastasierende Patienten: $46,1\% + 20,9\% = 67,0\%$). Insgesamt findet man jedoch bei den nicht metastasierenden Patienten tendenziell weniger, bzw. bei den metastasierenden Patienten mehrere Cutoff-Überschreitungen im MIA-Gesamtverlauf. Dies verdeutlichte auch die Bestimmung des prozentualen Anteils der Cutoff-Überschreitungen an allen Untersuchungen: Der Durchschnitt, der Median und das 3. Quartil lagen bei den metastasierenden Patienten deutlich höher als bei den nicht metastasierenden Patienten (25,0%, 16,7%, 45,6% versus 18,1%, 7,1%, 32,1%).

Bestimmt man im Vergleich dazu den prozentualen Anteil von MIA-Anstiegen an allen Untersuchungen, dann erkennt man noch deutlicher einen Unterschied zwischen metastasierenden und nicht metastasierenden Patienten: Nicht nur der Durchschnitt (48,8% versus 43,8%), das Minimum (16,7% versus 0%) und das Maximum (87,5% versus 66,7%), sondern auch der Median (50,0% versus 44,4%), das 1. (40,0% versus 36,4%) und das 3. Quartil (59,3% versus 50,0%) lagen bei den metastasierenden Patienten wesentlich höher als bei den nicht metastasierenden Patienten. Metastasierende Patienten haben also insgesamt einen größeren Anteil von Anstiegen an allen Untersuchungen als nicht metastasierende Patienten. Metastasierung bzw. die Ausbreitung und Vermehrung von Tumormasse ist, anders formuliert, mit einem gehäuften Auftreten von MIA-Anstiegen verbunden. Zudem scheinen MIA-Anstiege deutlicher als Cutoff-Überschreitungen auf Metastasierung zu weisen.

Wie unbefriedigend Cutoff-Überschreitungen Metastasierung anzeigen, macht auch die Bestimmung von Sensitivität, Spezifität, positiv- und negativ-prädiktivem Wert klar: 67,8% der metastasierenden Patienten hatten im Laufe der Tumornachsorge mindestens einmal einen erhöhten MIA-Wert und nur 46,1% der nicht metastasierenden

Patienten hatten überhaupt keine Cutoff-Überschreitung. Die Sensitivität (67,8%) und Spezifität (46,1%) mit der Cutoff-Überschreitungen auf Metastasierung hinweisen sind also eher gering, genau wie der positiv-prädiktive Wert (39,2%). Dagegen ist der negativ-prädiktive Wert, d.h. die Wahrscheinlichkeit, dass ein Patient nicht metastasiert, wenn er niemals den MIA-Cutoff überschreitet, mit 73,6% höher.

In der bisher veröffentlichten Literatur gibt es nicht sehr viele Angaben zu der genauen Anzahl von Cutoff-Überschreitungen bei metastasierenden und nicht metastasierenden Patienten. Bosserhoff et al. berichten, dass während einer 6 bis 12 Monate langen Nachbeobachtungszeit keiner der Patienten mit normalen MIA-Serumwerten Metastasen entwickelte (Bosserhoff et al. 1997a und 1999a). Ebenso berichten Stahlecker et al., dass während einer 3 bis 11 Monate dauernden Nachbeobachtungszeit keiner der Stadium I/II-Patienten mit normalen MIA-Werten und keiner der Stadium III/IV-Patienten, die nach chirurgischer Metastasenentfernung, nach Bestrahlung oder nach Chemotherapie wieder niedrige MIA-Werte erreicht hatten, metastasierte (Stahlecker et al. 2000). Die Schlussfolgerung, dass normale MIA-Werte relativ sicher mit Nicht-Metastasierung verbunden sind, kann in dieser Studie mit bis zu sieben Jahre langen Nachbeobachtungszeiten eindeutig widerlegt werden: 32,2% der metastasierenden Patienten hatten in ihrer gesamten Beobachtungszeit stets normal hohe MIA-Werte und metastasierten trotzdem. Auf der anderen Seite hatten über die Hälfte (53,9%) der nicht metastasierenden Patienten mindestens einmal einen erhöhten MIA-Serumwert im Laufe der individuellen Tumornachsorge! Dréau et al. beobachteten, dass nach Immuntherapie nur 74% der Patienten mit Tumorprogression bzw. mit einem Rezidiv MIA-Serumwerte oberhalb des Cutoffs aufwiesen (Dréau et al. 1999). Ähnlich hatten in unserer Studie nur 67,8% der metastasierenden Patienten mindestens einmal einen erhöhten MIA-Serumwert.

Der Zusammenhang zwischen Vorkommen von Cutoff-Überschreitungen und klinischem Bild bzw. Risiko für spätere Metastasierung ist also nicht so einfach. Deshalb sollte als weiterer Schritt bei jedem einzelnen Patienten geprüft werden, ob das Gesamtbild der Cutoff-Überschreitungen (unter Berücksichtigung von Zeitpunkt, Häufigkeit und Abfolge) eher mit dem klinischen Verlauf übereinstimmt. Während der bis zu sieben Jahre langen Beobachtungszeit korrelierte bei insgesamt 60,7% der Patienten der Verlauf der MIA-Werte (gemessen an einem Cutoff) mit dem klinischen Verlauf. Auffallend war, dass es vor Zweittumoren, lokalen Rezidiven, In-Transit- bzw. Satellitenmetastasen oft keine Cutoff-Überschreitungen gab.

Ein Grund für die doch überraschend niedrige Korrelationsrate könnte sein, dass ein zuvor festgelegte Cutoff, der sich in der Regel an der 95. Perzentile von gemessenen MIA-Werten eines gesunden Kontrollkollektivs orientiert, für einzelne Melanompatienten weniger Bedeutung hat. Kleinere Anstiege oder Abfälle der MIA-Werte, die möglicherweise für den individuellen Patienten große Bedeutung haben, bleiben bei Orientierung an einem allgemeingültigen Cutoff oft unberücksichtigt.

Aus diesem Grund wurde nochmals bei jedem einzelnen Patienten, ohne Berücksichtigung eines Cutoffs, das Gesamtbild des MIA-Serumwertverlaufs mit dem kli-

nischen Verlauf verglichen: Bei den metastasierenden Patienten stimmten MIA-Anstieg und MIA-Abfall zu 67,2% vollständig, zu 13,8% nur teilweise und zu 10,3% nicht mit dem klinischen Verlauf überein. Dabei hatten 48,3% der Patienten eine am Ende eindeutig steigende und 15,5% eine eindeutig fallende MIA-Verlaufstendenz. Bei 29,3% der Patienten lag keine eindeutige Verlaufstendenz vor. Im Vergleich dazu gab es bei den nicht metastasierenden Patienten in nur 12,2% der Fälle eine am Ende steigende, bei 27,8% eine abfallende und bei der großen Mehrheit (58,3%) eine schwankende, nicht eindeutige MIA-Verlaufstendenz. Wertet man letztendlich sinkende oder um ein bestimmtes Niveau schwankende MIA-Werte als positive Übereinstimmung, so korrelierte bei den nicht metastasierenden Patienten in gleich 83,5% der Fälle der MIA-Verlauf vollständig mit dem klinischen Verlauf. Bei 2 von 115 nicht metastasierenden Patienten (1,7%) spiegelte der MIA-Verlauf nur teilweise den klinischen Verlauf wider, da es in beiden Fällen zu keinem MIA-Anstieg vor oder mit der Entdeckung eines Zweittumors gekommen war. In 12,2% der Fälle entsprach der MIA-Verlauf nicht dem klinischen Verlauf.

Insgesamt stimmte bei metastasierenden und nicht metastasierenden Patienten zusammengekommen in 78,0% der Fälle der MIA-Verlauf mit dem klinischen Verlauf überein. Diese Korrelationsrate ist wesentlich höher als die Korrelationsrate von 60,7%, die unter Berücksichtigung des Cutoffs gefunden worden war. Sie ist zudem gut mit den Raten vergleichbar, die bisher von anderen Autoren veröffentlicht wurden.

Beispielsweise verglichen Djukanovic et al. in einer sehr ähnlichen Weise bei 65 Patienten mit Tumorstadien I bis IV bis zu 14 Monate lang im Rahmen der Tumornachsorge den klinischen Verlauf mit dem Verlauf der MIA-Werte. Sie konnten bei 73,8% der Patienten eine Korrelation zwischen den MIA-Werten und dem klinischen Verlauf finden (Djukanovic et al. 2000).

Dornier et al. verfolgten bei 47 Patienten bis zu 16 Monate lang parallel den Verlauf der MIA-Serumwerte und den klinischen Verlauf. Sie konnten bei 20 von 35 (57,1%) Patienten ohne Tumorprogression stabile MIA-Werte finden. Vergleichbar häufig wurden bei 58,3% der nicht metastasierenden Patienten unserer Studie auf relativ konstanten Niveau schwankende MIA-Werte festgestellt! Im Gegensatz zu unserer Studie stiegen in der Untersuchung von Dornier et al. bei gleich 11 von 12 (91,7%) Patienten mit Tumorprogression die MIA-Serumwerte über den Cutoff. Nur ein Patient mit einem lokoregionären Rezidiv hatte MIA-Werte knapp unterhalb des Cutoffs (Dornier et al. 2002). Dies ähnelt wieder der in unserer Studie gemachten Beobachtung, dass Zweittumoren, lokale Rezidive, In-Transit- bzw. Satellitenmetastasen oft zu keiner vorzeitigen Cutoff-Überschreitung führen.

Schließlich fanden Dréau et al. bei ihrer Beobachtung von Melanompatienten mit Stadium II bis IV, die mit verschiedenen Immuntherapien behandelt worden waren, heraus, dass Patienten ohne Tumorprogression stabile MIA-Werte aufwiesen, während die MIA-Werte bei den meisten Patienten mit Tumorprogression bzw. -rezidiv (74%) signifikant anstiegen. Interessanterweise wurde dieser Anstieg beobachtet, bevor das Rezidiv klinisch diagnostiziert wurde (Dréau et al. 1999). Ähnlich konnte in unserer Studie beim Vergleich der MIA-Verlaufstendenz mit dem klinischen Verlauf bei 34 von 58 (58,6%) der metastasierenden Patienten ein MIA-Anstieg vor klinischer Entdeckung der Metastase und/oder Zweittumor gefunden werden, wobei in den allermeisten Fällen

(bei 33 von 34 Fällen) Lymphknoten- und Fernmetastasen und in selteneren Fällen (bei 3 von 34 Fällen) auch Zweittumoren bzw. ein lokales Rezidiv vorher durch MIA-Anstieg angezeigt wurden.

Neben dieser interessanten Beobachtung, auf die später detaillierter eingegangen werden soll, fiel in unserer Studie zudem folgende Besonderheit auf: Zwei Patienten wiesen, obwohl sie keine Melanommetastasen entwickelten, erhöhte MIA-Werte auf. Es stellte sich heraus, dass bei dem einen ein gleichzeitig vorliegendes Kolonkarzinom in die Lunge metastasierte und bei dem anderen drei Monate nach Messung der erhöhten MIA-Werte ein Akustikusneurinom diagnostiziert wurde. Der erste beobachtete Fall stimmt mit der Entdeckung überein, dass eine verstärkte MIA-Expression auch bei fortgeschrittenen Adenokarzinomen, wie z.B. dem Kolonkarzinom, vorkommen kann (Perez et al. 2000, Wagner et al. 2000, Hau et al. 2002). Im zweiten Fall dagegen konnte bisher nur in Gliomen eine erhöhte MIA-Expression nachgewiesen werden, nicht jedoch in anderen (nicht-glialen) ZNS-Tumoren (Blesch et al. 1994, Hau et al. 2002 und 2004). Die erhöhten MIA-Werte bei dem Patienten mit Akustikusneurinom sind deshalb wahrscheinlich eher zufällig bedingt.

Zusammenfassend kann also eine gewisse Korrelation zwischen dem MIA-Verlauf und dem klinischen Verlauf – besonders bei fortgeschrittenen Melanomen – festgestellt werden.

Während all der Untersuchungen, ob MIA-Werte (gemessen an einem Cutoff) oder MIA-Anstiege das klinische Bild widerspiegeln können, ergaben sich wiederholt Hinweise, dass sowohl Cutoff-Überschreitungen als auch MIA-Anstiege Tumorprogression vorangehen können. Dies führte zu der Idee, den prognostischen Wert von MIA bezüglich der Anzeige von Tumorprogression näher zu untersuchen. Die dabei gefundenen Ergebnisse werden nun im folgenden, zweiten Teil der Diskussion ausführlich besprochen.

12. Hat MIA prognostische Aussagekraft bezüglich Tumorprogression?

Die Fähigkeit eines Tumormarkers, im Rahmen der Tumornachsorge ein Tumorrezidiv oder eine Tumorprogression frühzeitig zu erkennen, ist eine der wichtigsten. Je früher ein Tumor entdeckt wird, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass er sich noch nicht zu weit ausgebreitet hat, und die Chancen steigen, dass man ihn durch therapeutische Maßnahmen eindämmen, eventuell sogar ganz beseitigen kann. Dies gilt ganz besonders für das maligne Melanom, da es abgesehen von der frühzeitigen operativen Entfernung eines noch nicht systemisch gestreuten Melanoms keine heilenden Therapiemöglichkeiten gibt.

Die Eigenschaft von MIA, im Rahmen der Tumornachsorge das Fortschreiten eines Melanoms anzuzeigen, wurde bereits von einigen Autoren beschrieben (Bosserhoff et al. 1997a, 1999a und 2001a, Dréau et al. 1999, Stahlecker et al. 2000, Jürgensen et al. 2001, Dornier et al. 2002, Matsushita et al. 2002, Klimek et al. 2002, Garbe et al. 2003a, Faries et al. 2003).

In unserer Studie wurde im Detail untersucht, auf welche Weise MIA Tumorprogression anzeigen kann. Dabei orientierte man sich im ersten Teil an MIA-Grenzwerten – wie es bereits in den meisten vorangegangenen Studien gemacht wurde. Im zweiten Teil wurde ohne Berücksichtigung eines Cutoffs die prognostische Bedeutung des MIA-Verlaufs untersucht.

12.1 Prognostische Bedeutung von MIA-Cutoff-Überschreitungen

Zunächst stellt sich die Frage, ob Cutoff-Überschreitungen zu bestimmten Zeitpunkten im MIA-Serumverlauf eines Patienten prognostische Aussagekraft besitzen. Dazu wurde in unserer Studie als erstes die Bedeutung des bei jedem Patienten zuerst bestimmten MIA-Serumwertes untersucht.

Beim Vergleich des ersten MIA-Wertes von metastasierenden Patienten und von nicht metastasierenden Patienten konnten keine wesentlichen Unterschiede gefunden werden: Der durchschnittliche erste MIA-Wert von metastasierenden Patienten ist, genau wie das Minimum, das 1. Quartil und der Median, nur geringfügig höher als bei nicht metastasierenden Patienten (Mittelwert +/- Standardabweichung: 6,40 +/- 2,04 ng/ml im Vergleich zu 6,37 +/- 2,42 ng/ml, Minimum: 2,2 ng/ml im Vergleich zu 1,9 ng/ml, 1. Quartil: 5,3 ng/ml im Vergleich zu 4,6 ng/ml, Median: 6,3 ng/ml im Vergleich zu 6,2 ng/ml). Dagegen liegen das 3. Quartil und das Maximum bei den nicht metastasierenden Patienten ein wenig höher als bei den metastasierenden Patienten (3. Quartil: 7,6 ng/ml im Vergleich zu 7,4 ng/ml, Maximum: 15,7 ng/ml im Vergleich zu 14,7 ng/ml).

Bei einer Aufschlüsselung nach den Tumorstadien I und II ergibt sich für Tumorstadium II bei den metastasierenden Patienten ein etwas größerer durchschnittlicher erster MIA-Wert als bei den nicht metastasierenden Patienten (7,20 ng/ml im Vergleich zu 6,83 ng/ml). Im Tumorstadium I sind jedoch die durchschnittlichen ersten MIA-Werte von metastasierenden und nicht metastasierenden Patienten in etwa gleich (5,93 ng/ml im Vergleich zu 6,00 ng/ml). Es liegt die Vermutung nahe, dass die etwas höheren ersten MIA-Werte von später metastasierenden Patienten im Vergleich zu nicht metastasierenden Patienten mit Primärstadium II durch eine bereits größere Tumorlast bedingt sind. Insgesamt scheinen die ersten MIA-Serumwerte von metastasierenden und nicht metastasierenden Patienten jedoch sehr ähnlich zu sein, was einen ersten Hinweis darauf gibt, dass der erste MIA-Serumwert keine prognostische Aussagekraft bezüglich späterer Metastasierung besitzt.

Einen weiteren Hinweis, dass kein Zusammenhang zwischen erstem MIA-Wert eines Patienten und dessen Endstadium (also spätere Metastasierung oder nicht) besteht, erhält man, wenn man den ersten MIA-Serumwert jedes Patienten gegen sein Endstadium aufträgt (**Abbildung 16**): Bis auf wenige Ausreißer liegt bei allen vier Endstadien der Großteil der ersten MIA-Werte zwischen 4 und 10 ng/ml. Auffällig ist nur, dass allein bei Endstadium I erste MIA-Werte vorkommen, die kleiner als 2,7 ng/ml sind, was durch die geringere Tumorlast bedingt sein kann. Einen Unterschied, dass höhere erste MIA-Werte eher mit den Endstadien III und IV – also späterer Metastasierung – assoziiert sind, findet man jedoch nicht.

Vergleicht man die Verteilung der Endstadien I bis IV bei Patienten mit erhöhtem und normal hohem ersten MIA-Wert, so findet man zwar einen signifikanten Unterschied in diesen beiden Gruppen, jedoch nicht in dem Sinne, dass man erhöhte erste MIA-Werte als Indikator für spätere Metastasierung einsetzen könnte: Patienten mit erhöhtem ersten MIA-Wert hatten häufiger als Patienten mit normal hohen MIA-Werten die Endstadien I und II, d.h. Stadien, in denen es zu keiner Metastasierung gekommen war. Patienten mit normalen ersten MIA-Werten dagegen entwickelten fast dreimal häufiger Lymphknotenmetastasen (Endstadium III) als Patienten mit erhöhten MIA-Werten. Ein Zusammenhang zwischen erhöhtem ersten MIA-Wert und erhöhtem Risiko für Metastasierung konnte nur bei Patienten mit Fernmetastasierung gefunden werden: Patienten mit erhöhtem ersten MIA-Wert entwickelten mehr als doppelt so häufig Fernmetastasen (Endstadium IV) als Patienten mit normalem ersten MIA-Wert.

Insgesamt hatten Patienten mit niedrigem ersten MIA-Wert eine Metastasierungsrate von 36,0%, Patienten mit erhöhtem ersten MIA-Wert dagegen eine Metastasierungsrate von nur 26,3%. Dies zeigt deutlich, dass der erste MIA-Serumwert keine sinnvolle Aussage zu dem Risiko späterer Metastasierung machen kann.

Abschließend wurden die Sensitivität, die Spezifität, der positive und negative prädiktive Wert, mit denen der erste MIA-Wert spätere Metastasierung anzeigt, bestimmt. Dabei erreichte nur die Spezifität mit 75,7% einen hohen Wert. Die Wahrscheinlichkeit, dass nicht metastasierende Patienten einen normal hohen ersten MIA-Wert haben, ist damit hoch. Die Wahrscheinlichkeit, dass später metastasierende Patienten einen erhöhten ersten MIA-Serumwert aufweisen (Sensitivität), ist dagegen mit 16,9% eher gering;

ebenso wie die Wahrscheinlichkeit, dass von einem erhöhten ersten MIA-Wert auf eine spätere Metastasierung geschlossen werden kann (positiv-prädiktiver Wert = 26,3%). Auch Klimek et al. und Garbe et al. bestimmten in ihren Studien die Sensitivität, mit der MIA im Rahmen der Tumornachsorge von primär tumorfreien Patienten rezidivierende bzw. fortschreitende Krankheit erkennen kann (Klimek et al. 2002, Garbe et al. 2003a). Klimek et al. zogen dabei – ähnlich wie in unserer Untersuchung – Ein-Punkt-Messungen heran, die einen Monat bis fünf Jahre nach totaler Entfernung des Primärtumors durchgeführt worden waren. Dabei schlossen sie insgesamt 39 Patienten mit Tumorstadium II (1 Patient), Tumorstadium III (29 Patienten) und Tumorstadium IV (9 Patienten) in ihre Studie ein. In diesem Punkt unterscheidet sich ihre Studie von der unseren, in der nur Patienten mit Tumorstadium I (106 Patienten) und II (69 Patienten) berücksichtigt wurden. Dennoch fanden Klimek et al. eine Sensitivität von 17,4% (4 von 23 Patienten mit rezidivierender Tumorerkrankung hatten erhöhte MIA-Werte), die damit vergleichbar mit der in unserer Studie gefundenen Sensitivität von 16,9% ist.

Garbe et al. fanden eine etwas höhere Sensitivität von 22%, sowie eine diagnostische Genauigkeit von 86%. Sie beobachteten tumorfreie Melanompatienten mit Primärstadium II (167 Patienten) und III (129 Patienten). Im Gegensatz zu unserer Studie und der von Klimek et al. wurden die MIA-Werte mehrfach bestimmt: als erstes bei Einschluss in die Studie, dann ein bis zweimal pro Jahr bei einer Beobachtungszeit von 1 bis 33 Monaten. Alle Serumwerte oberhalb des Cutoffs wurden als erhöht gewertet. Da auf diese Weise mehrere MIA-Messungen in die Bestimmung der Sensitivität eingingen, erklärt sich die etwas höhere Sensitivität.

In anderen Studien zur Sensitivität von MIA bezüglich der Anzeige von Tumorprogression wurden Sensitivitäten zwischen 64% und 91% gefunden (Deichmann et al. 1999, Djukanovic et al. 2000, Krähn et al. 2001, Matsushita et al. 2002). Im Vergleich zu diesen sind die von uns, Klimek et al. und Garbe et al. gemessenen Sensitivitäten von MIA zur Detektion von Tumorprogression bei zunächst tumorfreien Patienten enttäuschend niedrig. Jedoch sollte man nicht außer Acht lassen, dass in den Studien, in denen derart hohe Sensitivitäten erreicht wurden, MIA meistens zu dem Zeitpunkt bestimmt worden war, als bereits Metastasierung vorlag. Dagegen wurden in unsere Studie sowie in der von Klimek et al. und Garbe et al. schwerpunktmäßig Patienten beobachtet, die primär klinisch tumorfrei waren.

Garbe nennt als weiteren möglichen Grund für die von seiner Arbeitsgruppe gefundene, niedrige Sensitivität seine relativ kurze Beobachtungszeit von durchschnittlich 19 Monaten (1–33 Monate). Dem widerspricht die ebenso niedrige Sensitivität unsere Studie, in der wesentlich länger – durchschnittlich 49 Monate (2–80 Monate) lang – nachbeobachtet worden war. Eine weitere Erklärung könnte sein, dass in unserer Studie und in der Studie von Garbe et al. die MIA-Werte bei den verschiedenen Patienten in ganz unterschiedlichen Krankheitsphasen bestimmt wurden: Bei einigen Patienten wurde der erste MIA-Wert noch vor oder kurz nach Operation des Primärtumors bestimmt, als der MIA-Wert vermutlich noch höher lag. Andere Patienten hatten ihre erste Blutabnahme für die Studie lange nachdem der Primärtumor entfernt worden war. Die Wahrscheinlichkeit, bei solchen Patienten erhöhte MIA-Werte zu finden, ist natürlich wesentlich geringer. Der Zeitpunkt, zu dem MIA bestimmt wurde, ist also nicht einheitlich genug. Zudem ist es bei einzelnen MIA-Bestimmungen eher zufällig, ob MIA

zum „richtigen“ Zeitpunkt bestimmt wurde. So vermuten Klimek et al., dass die Bestimmung von MIA zum falschen Zeitpunkt Ursache für die niedrige Sensitivität gewesen sein könnte: Ginge man von der Möglichkeit aus, dass MIA erst kurz vor klinischer Detektion der Metastasierung ansteige, so wären viele Blutabnahmen zu früh abgenommen worden, um Metastasierung entdecken zu können (Klimek et al. 2002).

Aus den letztgenannten Gründen wurden in unserer Studie nochmals die Metastasierungsraten von Patienten mit erhöhtem und normalem MIA-Wert bestimmt, bei denen die MIA-Messung vor Operation des Primärtumors stattgefunden hatte: 6 von 42 Patienten (14,3%), bei denen die erste MIA-Bestimmung vor der Operation lag, hatten einen erhöhten ersten MIA-Wert und 36 von 42 Patienten (85,7%) hatten einen normalen ersten MIA-Wert. 3 von 6 Patienten (50,0%) mit erhöhtem ersten MIA-Wert metastasierten später, während nur 13 von 36 Patienten (36,1%) mit niedrigem ersten MIA-Wert Metastasen entwickelten. Die Metastasierungsrate von Patienten mit erhöhtem MIA-Wert vor Operation liegt also wesentlich höher als bei Patienten mit normalem MIA-Wert vor OP. Allerdings konnte beim Vergleich der beiden Gruppen „Patienten mit erhöhtem und normalem ersten MIA-Wert vor Operation“ kein signifikanter Unterschied bezüglich späterer Metastasierung gefunden werden. Inwieweit der MIA-Serumwert vor Operation prognostische Aussagekraft besitzt, lässt sich daher bei der geringen Patientenzahl nicht mit Sicherheit sagen und sollte in einer Studie mit einem größerem Patientenkollektiv nochmals überprüft werden.

Nachdem sich der erste MIA-Serumwert als nicht besonders sensitiv bei der Anzeige von Metastasierung erwiesen hatte, sollte als nächstes die prognostische Relevanz des maximalen MIA-Serumwertes eines Patienten untersucht werden. Im Gegensatz zum ersten MIA-Wert zeigte sich bei Darstellung des maximalen MIA-Serumwertes jedes Patienten gegenüber seinem Endstadium (**Abbildung 17**) eindeutig, dass später metastasierende Patienten (mit Endstadium III oder IV) sehr viel höhere maximale MIA-Werte erreichten als nicht metastasierende Patienten (mit Endstadium I oder II). Dies weist auf eine Korrelation zwischen MIA und der Tumormasse. Nicht metastasierenden Patienten erreichten MIA-Werte bis maximal 20 ng/ml. MIA-Werte über 20 ng/ml sollten daher kritisch bezüglich eines erhöhten Metastasierungsrisikos eingeschätzt werden. Die maximalen MIA-Werte von Patienten, die später Lymphknotenmetastasen entwickelten (Endstadium III), lagen zwar oft in dem Bereich bis 20 ng/ml. Jedoch gab es auch sehr viele Patienten mit Endstadium III, die wesentlich höhere maximale MIA-Serumwerte (bis 133 ng/ml) erreichten. Patienten mit späteren Fernmetastasen (Endstadium IV) entwickelten in den meisten Fällen deutlich höhere maximale MIA-Werte (bis 187 ng/ml). Zusammenfassend kann man also festhalten, dass die maximal erreichbare Höhe des MIA-Wertes bei metastasierenden und nicht metastasierenden Patienten unterschiedlich ist.

Um die prognostische Aussagekraft des maximalen MIA-Serumwertes weiter zu prüfen, wurde in unserer Studie das Auftreten des maximalen MIA-Wertes im MIA-Serumwertverlauf bei metastasierenden und nicht metastasierenden Patienten näher untersucht. Zum einen stellte man dabei interessanter Weise fest, dass der maximale MIA-Wert von

nicht metastasierenden Patienten im Durchschnitt weit vor der letzten Untersuchung jedes Patienten lag (bei Endstadium I: \approx 984 Tage davor, bei Endstadium II: \approx 913 Tage davor). Dies kann als Hinweis darauf verstanden werden, dass die MIA-Serumwerte von Patienten ohne Tumorprogression nach Erreichen eines Maximalwertes schnell wieder abfallen. Zum anderen musste jedoch auch festgestellt werden, dass der maximale MIA-Wert von metastasierenden Patienten meistens erst nach klinischer Entdeckung der Metastasierung auftrat. Besonders bei der Entwicklung von Fernmetastasen wurden die allerhöchsten MIA-Werte erst weit nach der Diagnose der Metastasierung erreicht (\approx 122 Tage danach). Aber auch bei Patienten mit Lymphknotenmetastasen kam es im Durchschnitt erst nach der klinischen Entdeckung der Lymphknotenmetastasen zu maximalen MIA-Werten (\approx 14 Tage danach). Damit ist leider auch der maximale MIA-Wert für die prognostische Anzeige von Metastasierung schlecht geeignet.

Zusammenfassend führten die Untersuchungen zur prognostischen Relevanz von erhöhten MIA-Werten zu bestimmten Zeitpunkten im MIA-Serumwertverlauf zu keinem befriedigenden Ergebnis: Der erste MIA-Serumwert konnte – wahrscheinlich aufgrund seiner Bestimmung zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Krankheitsverlauf – nur mit einer geringen Sensitivität von 16,9% Tumorprogression vorher anzeigen. Der maximale MIA-Wert scheiterte als Marker für folgende Tumorprogression, da er in den meisten Fällen erst nach klinischer Detektion der Metastase erreicht wurde. Dennoch bleibt im Raum, dass sehr viele Autoren immer wieder von der Möglichkeit berichten, dass MIA Tumorprogression bei zunächst tumorfreien Patienten bereits vor klinischer Entdeckung anzeigen könne (Bosserhoff et al. 1997a, 1999a und 2001a, Dréau et al. 1999, Stahlecker et al. 2000, Jürgensen et al. 2001, Dornier et al. 2002, Klimek et al. 2002, Matsushita et al. 2002, Garbe et al. 2003a, Faries et al. 2003). Zudem existieren Studien, die andeuten, dass wiederholte MIA-Bestimmungen bei der vorzeitigen Anzeige von Tumorprogression besser geeignet seien als einzelne MIA-Bestimmungen (Matsushita et al. 2002, Faries et al. 2003). Aus diesen Gründen sollte in der vorliegenden Studie weiter geforscht werden, ob und auf welche Weise erhöhte MIA-Werte Tumorprogression vor deren klinischen Entdeckung anzeigen können.

Zunächst wurde untersucht, ob in der Untersuchung, in der MIA den Cutoff überschritt (sogenannter „Flip“), oder in der darauf folgenden Untersuchung eine Metastasierung erfolgte. Bei 40 von 236 Untersuchungen mit Flip bzw. bei 21 von 82 Patienten konnte in der Untersuchung mit Flip oder in der anschließenden Untersuchung Metastasierung festgestellt werden. Der positiv-prädiktive Wert, mit dem ein Flip eine Metastasierung in der gleichen oder der darauf folgenden Untersuchung anzeigt, beträgt 16,9% (für Untersuchungen) bzw. 25,6% (für Patienten). Dies bedeutet jedoch auch, dass bei dem Großteil der Untersuchungen (83,1%) mit Flip gleichzeitig oder daran anschließend keine Metastasierung entdeckt werden konnte.

Die Ursache wird klar, wenn man die MIA-Gesamtverläufe von Patienten mit Flip und gleichzeitiger bzw. darauf folgender Metastasierung mit den MIA-Gesamtverläufen von Patienten mit Flip, jedoch ohne Metastasierung vergleicht: Bei Patienten mit Flip und gleichzeitiger bzw. darauf folgender Metastasierung steigen die MIA-Werte im Gesamt-

verlauf öfters kurzzeitig über den Cutoff, ohne dass auf jede Cutoff-Überschreitung gleich Metastasierung folgt. Gegen Ende bleiben die MIA-Werte jedoch dann oft erhöht. Patienten mit Flip, jedoch ohne Metastasierung weisen zwar auch oft ein bis zwei Flips in ihrem MIA-Gesamtverlauf auf. Allerdings sind sie vereinzelt. Der übrige MIA-Verlauf ist unauffällig.

Dies führt zu dem Schluss, dass ein bis zwei vereinzelt MIA-Erhöhungen über den Cutoff keineswegs pathologisch sind und nicht unbedingt als Zeichen für folgende Metastasierung gewertet werden dürfen. Vielmehr sollte der Gesamtverlauf der MIA-Werte beurteilt werden. Genau zu dem gleichen Ergebnis kamen Matsushita et al.: Sie beobachteten, dass viele Patienten ohne Tumorprogression nur ein-/zweimal abnormale MIA-Werte aufwiesen (5 von 31 Patienten ohne Tumorprogression zeigten eine MIA-Erhöhung, davon nur 1 Patient zweimal), während Patienten mit Tumorprogression sehr oft mehr als zweimal erhöhte MIA-Werte vor klinischer Entdeckung der Metastase hatten (4 von 7 Patienten). Sie folgerten, dass eine kontinuierliche MIA-Erhöhung möglicherweise gut die Entwicklung von Metastasen vorhersagen könne (Matsushita et al. 2002). Zusammenfassend kann man also feststellen, dass auf eine MIA-Cutoff-Überschreitung nicht unbedingt gleich Metastasierung folgen muss. Vielmehr sollten mehrere MIA-Bestimmungen zur Beurteilung, ob ein erhöhtes Risiko für Metastasierung besteht, herangezogen werden.

Faries et al. beobachteten bei Stadium III-Patienten, dass einmal angestiegene MIA-Werte meistens erhöht blieben bzw. weiter anstiegen (Faries et al. 2003). Dies führte zu der Idee, in unserer Studie zu untersuchen, wie oft in Folge vor Entdeckung der Metastasierung MIA-Werte erhöht sind, und ob die Anzahl der Cutoff-Überschreitungen in den Untersuchungen vor klinischer Entdeckung der Metastasierung möglicherweise prognostische Relevanz hat. Überraschenderweise hatten nur 15 von 59 metastasierenden Patienten (25,4%) ein (11 Patienten) oder maximal zwei (4 Patienten) aufeinander folgende Cutoff-Überschreitungen in den Serumkontrollen direkt vor klinischer Entdeckung der Metastasierung. Der Großteil der Patienten (44 von 59 = 74,6%) hatte keine Cutoff-Überschreitung in der letzten Serumkontrolle vor Entdeckung der Metastasierung, wobei 4 von diesen 44 Patienten zumindest gleichzeitig mit Detektion der Metastasierung eine Cutoff-Überschreitung aufwiesen. Bei Patienten, die ein- oder zweimal in Folge MIA-Erhöhungen direkt vor der Entdeckung der Metastasierung hatten, waren die MIA-Werte durchschnittlich 5,3 Monate vor dem Auffinden der Metastasierung bereits erhöht (0,8–25,9 Monate).

Sehr ähnlich beobachteten Faries et al. bei Stadium III-Patienten im Durchschnitt 4 Monate lang erhöhte MIA-Werte, bevor eine Tumorprogression/ein Tumorrezidiv klinisch nachgewiesen werden konnte (Faries et al. 2003). Bedenkt man, dass in ihrer Studie Stadium III-Patienten beobachtet wurden, die eher zu Tumorprogression neigen als die Stadium I und II-Patienten unserer Studie, dann sind die in ihrer und unserer Studie gefundenen Zeiträume mit erhöhten MIA-Werten gut vergleichbar (\varnothing 4 Monate

im Vergleich zu $\approx 5,3$ Monate). Beide Zeiträume werden zudem von den derzeit für die frühe Tumornachsorge empfohlenen, dreimonatigen Untersuchungsintervallen (in den ersten drei Jahren, im vierten und fünften Jahr dann alle sechs Monate) gut erfasst (Garbe et al. 2005).

Die Sensitivität, mit der kontinuierlich erhöhte MIA-Werte direkt folgende Metastasierung anzeigen, ist in unserer Studie mit 25,4% (15 von 59 Patienten) allerdings nicht sehr hoch. In der annähernd vergleichbaren Studie von Faries et al. hatten wesentlich mehr, nämlich 36% der Patienten (18 von 50) bereits vor Entdeckung der Tumorprogression/dem Tumorrezidiv erhöhte MIA-Werte (Faries et al. 2003). Die von Faries et al. bei Stadium III-Patienten gemachte Beobachtung, dass der MIA-Wert von Patienten mit Tumorprogression erhöht bleibt bzw. weiter ansteigt, sobald er einmal erhöht ist, konnte bei den Stadium I und II-Patienten unserer Studie meistens leider nicht vor, sondern erst nach klinischer Entdeckung der Metastase gemacht werden, so dass MIA-Cutoff-Überschreitung(en) als prognostischer Marker für unmittelbar folgende Metastasierung bei Patienten mit Tumorstadium I und II weniger geeignet erscheinen. Der Grund mag in der vielleicht zu Beginn der Metastasierung noch relativ geringen Tumormasse von Stadium I und II-Patienten liegen, die – im Gegensatz zur bereits größeren Tumormasse von Stadium III-Patienten – oft noch nicht zu einer Erhöhung der MIA-Werte über den Cutoff führt.

In einer abschließenden Untersuchung sollte geprüft werden, ob generell das Vorkommen von Cutoff-Überschreitungen vor Metastasierung prognostische Bedeutung hat. Dabei ergab die Analyse der Anzahl der Cutoff-Überschreitungen vor klinischer Entdeckung der Metastasierung, dass über die Hälfte der metastasierenden Patienten (55,9%) keine einzige MIA-Cutoff-Überschreitung vor Entdeckung der Metastasierung hatte! Nur 26 von 59 metastasierenden Patienten (44,1%) hatten mindestens einen, maximal vier erhöhte MIA-Serumwerte vor Entdeckung der Metastasierung. Die Sensitivität, mit der eine MIA-Cutoff-Überschreitung einmal folgende Metastasierung anzeigt, beträgt also 44,1%.

Zum Teil sehr ähnliche Sensitivitäten wurden bereits von anderen Autoren gefunden: Wie schon oben erwähnt gingen bei Faries et al. bei insgesamt 36% der Patienten (18 von 50) eine MIA-Erhöhung der klinischen Entdeckung des Rezidivs voraus (Faries et al. 2003). Die Arbeitsgruppe um Matsushita konnte bei 50% der Patienten mit Tumorprogression (7 von 14) 4 bis 53 Monate vor der klinischen Entdeckung bereits erhöhte MIA-Werte im Serum finden (Matsushita et al. 2002). In gleich 74% der Fälle (20 von 27) stellten Dréau et al. einen MIA-Anstieg über den Cutoff im Durchschnitt 5,9 Monate vor klinischer Diagnose der Metastasierung fest (Dréau et al. 1999). Die vergleichsweise hohe Sensitivität könnte dadurch bedingt sein, dass diese Arbeitsgruppe ausschließlich Hochrisiko-Patienten während einer Immuntherapie beobachtete, die von Haus aus bereits größere Tumormasse aufweisen. Im Gegensatz dazu fanden Klimek et al. bei nur 17% (4 von 32) der Patienten erhöhte MIA-Werte vor Entdeckung der Tumorprogression (Klimek et al. 2002). Die Ursache dieser vergleichsweise niedrigen Sensitivität liegt allerdings sehr wahrscheinlich darin begründet, dass diese Arbeitsgruppe – im Gegensatz zu den anderen – nur eine einzige MIA-Bestimmung in die Bewertung miteinschloss, was – wie bereits oben besprochen wurde – für eine

optimale Risikoeinschätzung nicht so günstig ist. Eine etwas höhere Sensitivität wurde von Stahlecker et al. gefunden: In 22,7% der Fälle (5 von 22) hatten Patienten 2 bis 6 Monate vor klinischer Entdeckung der Metastasierung erhöhte MIA-Werte. Die Nachbeobachtungszeit war mit 3 bis 11 Monaten allerdings nicht so lange, so dass bei vielen Patienten (40,9%) zwar erhöhte MIA-Werte festgestellt wurden, am Ende der Studie aber noch keine Metastasierung klinisch nachweisbar war. In weiteren Untersuchungen sollte deshalb geklärt werden, ob diese Patienten später noch Metastasen entwickeln würden (Stahlecker et al. 2000).

Zusammenfassend kann man also festhalten, dass MIA-Erhöhungen über den Cutoff mit einer Sensitivität von 25,4% direkt folgende Metastasierung anzeigen und mit einer Wahrscheinlichkeit von 44,1% irgendeinmal später von Metastasierung gefolgt werden.

12.2 Prognostische Bedeutung des MIA-Verlaufs ohne Berücksichtigung eines Cutoffs

Nachdem im ersten Teil unserer Studie detailliert untersucht worden war, ob und auf welche Weise MIA-Serumwerte oberhalb des Cutoffs Tumorprogression bereits vorzeitig anzeigen können, sollte im zweiten Teil der Studie geprüft werden, ob noch bessere Vorhersagen möglich seien, wenn sich der MIA-Wert nicht an einem festgelegten Cutoff orientiert, sondern am individuellen MIA-Serumwertverlauf jedes einzelnen Patienten. Dazu wurde jeder MIA-Wert eines Patienten mit dem MIA-Wert der vorhergehenden Untersuchung verglichen, um festzustellen, ob ein individueller MIA-Anstieg oder -Abfall vorlag. Die so gewonnenen Informationen über den individuellen MIA-Verlauf eines Patienten wurden anschließend auf deren prognostische Bedeutung bezüglich vorzeitiger Anzeige von Tumorprogression untersucht. Die Ergebnisse sollen im Folgenden vor allem mit den Ergebnissen aus den Untersuchungen zur prognostischen Bedeutung von MIA-Cutoff-Überschreitungen verglichen werden, da in der Literatur kaum Untersuchungen ohne Berücksichtigung eines Cutoffs beschrieben sind.

Zunächst wurde untersucht, ob die MIA-Verlaufstendenz Aussagekraft bezüglich späterer Metastasierung hat. Ein Vergleich der MIA-Verlaufstendenzen von metastasierenden und nicht metastasierenden Patienten ergab, dass man bei fast der Hälfte (48,3%) der metastasierenden Patienten eine insgesamt steigende MIA-Verlaufstendenz vorlag. Diese war bei den nicht metastasierenden Patienten dagegen relativ selten (12,2%) vertreten. Am zweithäufigsten (29,3%) sah man bei den metastasierenden Patienten eine schwankende MIA-Verlaufstendenz. Bei den nicht metastasierenden Patienten schwankte der MIA-Serumwert im Vergleich dazu am häufigsten (58,3%) relativ stabil um einen bestimmten Wert. Am zweithäufigsten (27,8%) fand man bei den nicht metastasierenden Patienten eine abfallende MIA-Verlaufstendenz. Diese kam bei den nicht metastasierenden Patienten wesentlich häufiger vor als bei den metastasierenden Patienten (27,8% im Vergleich zu 15,5%).

Basierend auf diesen Ergebnissen ergibt sich für eine steigende MIA-Verlaufstendenz als Marker für Metastasierung eine Sensitivität von 51,9%, eine Spezifität von 87,6%, ein

positiv-prädiktiver Wert von 66,7% und ein negativ-prädiktiver Wert von 79,2%. Die Spezifität (d.h. die Wahrscheinlichkeit, dass nicht metastasierende Patienten keine ansteigende MIA-Verlaufstendenz aufweisen) und der negativ-prädiktive Wert (d.h. die Wahrscheinlichkeit, dass bei Vorliegen einer nicht ansteigenden MIA-Verlaufstendenz auch keine Metastasierung folgen wird) sind beide hoch. Die Sensitivität, mit der eine ansteigende MIA-Verlaufstendenz Metastasierung anzeigt, erscheint mit 51,9% erst einmal nicht so hoch, allerdings ist sie vergleichsweise höher als die Sensitivität von 44,1%, mit der Cutoff-Überschreitungen Metastasierung anzeigen. Es zeigt sich also erneut, dass die Beurteilung des MIA-Serumwert-Verlaufs eines Patienten eine wesentlich bessere (sensitivere) Aussage über das Risiko späterer Metastasierung ermöglicht, als die Beurteilung einzelner MIA-Cutoff-Überschreitungen.

Desweiteren sollte auch die Bedeutung von kontinuierlichem MIA-Anstieg in den Serumkontrollen direkt vor klinischer Entdeckung der Metastasierung untersucht werden: Von den 59 metastasierenden Patienten hatten 33 (55,9%) keinen MIA-Anstieg direkt vor Entdeckung der Metastasierung, wobei 18 der 59 Patienten (30,5%) zumindest gleichzeitig mit Entdeckung der Metastase einen Anstieg hatten. Im Vergleich dazu hatten 44 von 59 metastasierenden Patienten (74,6%) keine Cutoff-Überschreitung direkt vor Entdeckung der Metastasierung, und nur 4 der 59 Patienten (6,8%) wiesen wenigstens gleichzeitig mit Entdeckung der Metastase eine MIA-Cutoff-Überschreitung auf.

26 von 59 Patienten (44,1%) hatten mindestens einen MIA-Anstieg direkt vor dem Auffinden der Metastasierung: 15 (25,4%) dieser Patienten hatten einen MIA-Anstieg in der letzten Serumkontrolle vor Entdeckung der Metastasierung. 7 (11,9%) Patienten hatten MIA-Anstiege in den letzten beiden Serumkontrollen vor Entdeckung der Metastasierung. 3 (5,1%) Patienten hatten dreimal in Folge und 1 (1,7%) Patient hatte sogar fünfmal in Folge MIA-Anstiege in den Serumkontrollen direkt vor Entdeckung der Metastasierung. Ganz im Gegensatz dazu hatten nur 15 von 59 metastasierenden Patienten (25,4%) meistens eine (11 Patienten), maximal zwei (4 Patienten) Cutoff-Überschreitungen vor Detektion der Metastase.

Bei diesem Vergleich erkennt man gut, dass die Beurteilung der individuellen MIA-Anstiege wesentlich sensibler in der Detektion von Metastasen ist als die Beurteilung der MIA-Werte anhand eines allgemein festgelegten Grenzwertes. Ganz deutlich sieht man dies auch beim Vergleich der Sensitivitäten, mit denen Metastasierung vorzeitig (und gleichzeitig mit der klinischen Entdeckung) erkannt wurde: Mit einer Sensitivität von 74,6% zeigte MIA-Anstieg unmittelbar davor oder gleichzeitig die Metastasierung an! Und mit einer Sensitivität von immer noch 44,1% konnte MIA-Anstieg im voraus direkt folgende Metastasierung anzeigen. Cutoff-Überschreitungen erreichten dagegen nur eine Sensitivität von 25,4%, mit der sie direkt folgende Metastasierung anzeigten.

Die höhere Sensitivität führt zu einem dazu, dass man die von Faries et al. gemachte Beobachtung, dass einmal angestiegene MIA-Werte meistens konstant erhöht bleiben bzw. weiter ansteigen, besser bei Betrachtung der MIA-Anstiege als bei Betrachtung der Cutoff-Überschreitungen erkennen kann (Faries et al. 2003). Zum anderen ist der Zeitraum zwischen erster Anzeige der Metastasierung durch MIA und der tatsächlichen klinischen Entdeckung der Metastase größer: Die Zeit zwischen dem ersten MIA-Anstieg

und der tatsächlichen klinischen Entdeckung der Metastase betrug im Durchschnitt 6,1 Monate (Minimum: 0,5 Monate, Maximum: 28,8 Monate). Die Zeit zwischen der ersten MIA-Cutoff-Überschreitung und der tatsächlichen klinischen Diagnose der Metastasierung war dagegen mit durchschnittlich 5,3 Monaten (Minimum: 0,8 Monate, Maximum: 25,9 Monate) etwas kürzer. D.h. bei Beurteilung der MIA-Anstiege kann Metastasierung eventuell noch ein wenig früher diagnostiziert werden als bei Beurteilung der MIA-Cutoff-Überschreitungen. Insgesamt scheinen also auch in dieser Analyse die MIA-Anstiege den MIA-Cutoff-Überschreitung bezüglich einer möglichst frühen, sensitiven Anzeige von Tumorprogression überlegen zu sein.

Um herausfinden, inwieweit sich die MIA-Serumwert-Verläufe von metastasierenden und nicht metastasierenden Patienten nun wirklich unterscheiden, sollte der MIA-Serumwert-Gesamtverlauf von allen metastasierenden und nicht metastasierenden Patienten noch einmal genau untersucht und miteinander verglichen werden. Mögliche Unterschiede sollten zudem auf prognostische Relevanz hin geprüft werden.

Bei der Darstellung des Verlaufs der MIA-Werte in Bezug auf den Zeitpunkt der Erstuntersuchung (**Abbildung 22 und 23**) kann man deutliche Unterschiede bei metastasierenden und nicht metastasierenden Patienten erkennen: Während die eingezeichnete Trendlinie bei den nicht metastasierenden Patienten relativ konstant bei ungefähr 7 ng/ml verläuft, ist sie bei den metastasierenden Patienten steil ansteigend. Die MIA-Serumwerte von nicht metastasierenden Patienten sind nur ein einziges Mal größer als 20 ng/ml, wohingegen bei den metastasierenden Patienten MIA-Serumwerte bis 187 ng/ml erreicht werden.

Passend dazu ergaben Regressionsanalysen bei den nicht metastasierenden Patienten keine signifikante Verlaufstendenz und bei den metastasierenden Patienten einen höchst signifikanten ($p < 0,00001$) Anstieg der MIA-Werte nach Erstuntersuchung, wobei die MIA-Werte um 0,008 ng/ml pro Tag steigen (Steigung der Regressionsgeraden). Der Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der y-Achse liefert zum Zeitpunkt der Erstuntersuchung einen MIA-Serumwert von 6,96 ng/ml bei den nicht metastasierenden Patienten und einen Serumwert von 6,05 ng/ml (Stadium III: 7,76 ng/ml, Stadium IV: 5,24 ng/ml) bei den später metastasierenden Patienten. Hier erkennt man zum einen noch einmal ganz deutlich – wie auch schon oben näher ausgeführt, dass der erste MIA-Wert keinerlei prognostische Relevanz hat. Damit kann auch die Beobachtung von Faries et al. bestätigt werden, dass die ersten MIA-Werte im Vergleich zu MIA-Bestimmungen im späteren Krankheitsverlauf eine sehr viel schlechtere prognostische Aussagekraft bezüglich des Krankheitsverlaufs besitzen (Faries et al. 2003). Zum anderen sieht man, dass die MIA-Serumwerte bei metastasierenden Patienten mit zunehmender Tumormasse ansteigen, was ein weiterer Hinweis darauf ist, wie sehr MIA mit der Tumormasse korreliert.

Stellt man den Verlauf der MIA-Werte in Bezug auf den Zeitpunkt der Entdeckung der Metastasierung dar (**Abbildung 24**), dann kann man erkennen, dass der größte Teil der MIA-„Ausreißer“ und die größten MIA-Werte alle erst nach Feststellung der Metastasierung liegen. Kurz vor Entdeckung der Metastasierung gibt es zwar schon einige höhere MIA-Werte, die allermeisten liegen jedoch noch unter 20 ng/ml. Die Tumormasse ist also vor klinischer Entdeckung der Metastase in den meisten Fällen noch nicht so groß.

Trotzdem erkennt man auch hier – genau wie bei der Darstellung der MIA-Werte in Bezug auf den Zeitpunkt der Erstuntersuchung – eine ansteigende lineare Trendlinie. Stellt man die MIA-Serumwerte vor und nach Entdeckung der Metastasierung getrennt dar (**Abbildung 25 und 26**), erkennt man vor Entdeckung der Metastasierung eine leicht steigende und nach Entdeckung der Metastasierung eine abfallende Trendlinie. Dies steht mit der Theorie im Einklang, dass MIA mit der Tumormasse korreliert: Vor Entdeckung der Metastase nimmt die Tumormasse allmählich zu und die MIA-Werte steigen mit an. Nach Entdeckung der Metastasierung und eingeleiteter Therapie (operative Entfernung, Chemo- und/oder Immuntherapie) nimmt die Tumormasse zusammen mit dem MIA-Wert wieder ab.

Die anschließend durchgeführten Regressionsanalysen bestätigten für Tumorstadium III und IV zusammen eine hoch signifikant steigende MIA-Verlaufstendenz bei der Darstellung der MIA-Serumwerte in Bezug auf den Zeitpunkt der Entdeckung der Metastasierung ($p = 0,005$, Anstieg: $0,003$ ng/ml pro Tag). Vor Entdeckung der Metastasierung sind die MIA-Serumwerte ebenfalls hoch signifikant steigend ($p = 0,009$), wobei sie um $0,001$ ng/ml pro Tag bzw. $0,1$ ng/ml pro 100 Tage ansteigen. Nach Entdeckung der Metastasierung sind sie dagegen signifikant abfallend ($p = 0,04$, Abfall: $0,005$ ng/ml pro Tag).

Führt man die Regressionsanalysen alleine für Patienten mit späteren Lymphknotenmetastasen (Tumorstadium III) durch, dann sind die MIA-Werte bei der gemeinsamen Darstellung vor und nach Entdeckung der Metastasierung auch wieder hoch signifikant steigend ($p = 0,009$; Anstieg: $0,002$ ng/ml pro Tag), jedoch wird bei der getrennten Darstellung sowohl vor als auch nach Entdeckung der Metastasierung keine Signifikanz erreicht. Vermutlich ist die Tumormasse bei Lymphknotenmetastasen einfach zu gering, um kleine Änderungen, wie eine Tumormassenzunahme vor klinischer Entdeckung bzw. eine Tumormassenabnahme bei eingeleiteter Therapie, mit Hilfe von MIA darstellen zu können.

Im Gegensatz dazu findet man bei den Regressionsanalysen für Patienten, die Fernmetastasen entwickelten (Tumorstadium IV), einen hoch signifikanten Anstieg der MIA-Werte bereits vor klinischer Entdeckung der Fernmetastasen ($p = 0,003$, Anstieg: $0,004$ ng/ml pro Tag) und eine hochsignifikante Abnahme der MIA-Werte nach klinischer Entdeckung der Fernmetastasen ($p = 0,005$, Abfall: $0,018$ ng/ml pro Tag). Der MIA-Serumwert korreliert also sehr stark mit der vorhandenen Tumormasse und kann deshalb besonders bei bestehender bzw. entstehender großer Tumormasse – wie sie bei Fernmetastasen meistens auftritt – als Marker für den Krankheitsverlauf eingesetzt werden. Dies wurde bereits von vielen Autoren postuliert (Deichmann et al. 1999, Bosserhoff et al. 2000, Djukanovic et al. 2000, Stahlecker et al. 2000, Deichmann et al. 2001, Dornier et al. 2002) und kann in unserer Studie erneut bestätigt werden.

Weiterhin zeigt unsere Studie, dass MIA-Anstieg auch als prognostischer Marker für folgende Metastasierung einsetzbar ist: Während nicht metastasierende Patienten einen schwankenden, insgesamt jedoch relativ konstant verlaufenden MIA-Serumwertverlauf aufweisen, lassen später metastasierende Patienten bereits vor Entdeckung der Metastasen signifikant steigende MIA-Werte erkennen. MIA-Werte können also bereits im voraus folgende Metastasierung aufzeigen. Man muss jedoch einschränken, dass dies sehr wahrscheinlich nur bei einer entsprechend größeren Tumormasse funktioniert,

wenn Patienten mit zunächst lokalisierten Primärtumoren (mit Tumorstadium I oder II) Fernmetastasen (Tumorstadium IV) entwickeln. Bei Lymphknotenmetastasen ist die Tumormasse vermutlich noch zu gering, um von MIA zuverlässig wiedergespiegelt zu werden. MIA ist also besonders als Marker für Tumorprogression im Sinne von Fernmetastasierung geeignet.

Dass MIA-Anstieg als prognostischer Marker für Tumorprogression einsetzbar ist, ist insbesondere von Bedeutung, da – wie bereits oben näher ausgeführt wurde – die Bewertung des MIA-Verlaufs eine wesentlich höhere Sensitivitäten beim Erkennen von Tumorprogression verspricht als die Beurteilung von einzelnen MIA-Cutoff-Überschreitungen, wie dies bisher weitgehend praktiziert wurde. Durch die höhere Sensitivität könnte Tumorprogression früher erkannt und therapiert werden, wodurch sich möglicherweise eine bessere Prognose für den Patienten ergäbe. Da MIA – wie sich in unserer Studie gezeigt hat – jedoch wahrscheinlich nur Fernmetastasierung (Stadium IV) sicher vorzeitig anzeigen kann und Patienten mit Tumorstadium IV eine generell schlechte Prognose haben, stellt sich allerdings die Frage, inwieweit eine etwas frühere Diagnose der Fernmetastasierung überhaupt prognostische Vorteile bringt. Diese Frage kann in dieser Studie nicht beantwortet werden und sollte Gegenstand weiterer Studien sein. Fest steht jedoch, dass MIA-Anstieg tatsächlich prognostische Relevanz bezüglich der Anzeige von Tumorprogression (insbesondere Fernmetastasierung) hat.

Einen Anhaltspunkt, welcher MIA-Anstieg als kritisch bezüglich eines erhöhten Risikos für spätere Metastasierung einzuschätzen ist, geben die Ergebnisse der Regressionsanalysen: Später metastasierende Patienten zeigten bereits vor Entdeckung der Metastase einen signifikanten ($p = 0,009$) Anstieg der MIA-Werte um $0,001 \text{ ng/ml pro Tag}$ bzw. $0,1 \text{ ng/ml pro 100 Tage}$. Patienten, die Fernmetastasen entwickelten, zeigten sogar einen signifikanten ($p = 0,003$) MIA-Anstieg von $0,004 \text{ ng/ml pro Tag}$. Man könnte also bei Beobachtung des MIA-Serumwertverlaufs im Rahmen der Tumornachsorge ein gehäuftes Auftreten von MIA-Anstiegen von $0,1 \text{ ng/ml pro 100 Tagen}$ (oder mehr) als Warnsignal für mögliche Metastasierung werten und sollte die weitere Tumornachsorge dieser Patienten engmaschiger gestalten. Ob sich dieser Grenzwert allgemeingültig anwenden lässt, sollte in weiteren Studien geprüft werden.

ZUSAMMENFASSUNG

Das wegen seiner proliferationshemmenden Eigenschaft in vitro als „Melanoma Inhibitory Activity“ bezeichnete MIA ist ein von Melanomzellen sezerniertes Protein, das durch Maskierung von extrazellulären Bindungsstellen die Bindung der Tumorzellen zur umgebenden Matrix verringert und so deren Motilität und damit Metastasierungspotential vergrößert. Da MIA in der überwiegenden Zahl aller malignen Melanome, aber nur vereinzelt in anderen Tumorarten nachweisbar ist, wurde es schon bald als potentieller Tumormarker für das maligne Melanom postuliert und erforscht. Dabei erwies sich MIA wegen seiner hohen Sensitivität – besonders bei größeren Tumormassen – als einer der momentan vielversprechendsten Tumormarker des malignen Melanoms.

In dieser Studie wurde speziell bei Melanompatienten mit primär geringer Tumormasse (Tumorstadium I oder II) detailliert untersucht, ob und auf welche Weise MIA das klinische Bild am besten widerspiegeln kann. Desweiteren wurde im Detail die prognostische Bedeutung von MIA zur Früherkennung einer Tumorprogression analysiert. Dabei wurde der MIA-Wert zunächst anhand des zu dem Zeitpunkt der Blutabnahme gültigen Cutoffs (1997: 6,5 ng/ml, 1998 bis 22.11.2001: 8,5 ng/ml, ab 22.11.2001: 10,0 ng/ml) bewertet. Anschließend wurde der MIA-Wert ohne Berücksichtigung eines Cutoffs bei jedem einzelnen Patienten individuell beurteilt, indem man sich am MIA-Anstieg bzw. -Abfall im Vergleich zur vorhergehenden Untersuchung orientierte. Insgesamt wurde der Krankheitsverlauf und der MIA-Serumwertverlauf von 174 Patienten mit histologisch gesichertem malignem Melanom der TNM-Stadien I und II aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie der Universität Regensburg und der Klinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein der Technischen Universität in München von 1997 bis 2004 systematisch verfolgt und miteinander verglichen. Die MIA-Bestimmungen wurden regelmäßig, im Rahmen der Tumornachsorge, zum Teil vor und größtenteils nach operativer Entfernung des Primärtumors mit Hilfe eines MIA-ELISAs der Firma Roche Diagnostics durchgeführt. Insgesamt wurden 2009 Untersuchungen in die Studie eingeschlossen, wobei die einzelnen Patienten zwischen 3 und 36 Mal untersucht wurden. Um Metastasierung möglichst auszuschließen, wurden Patienten ohne Nachweis von Metastasierung mindestens 3 Jahre lang nachbeobachtet.

Zusammenfassend konnte in dieser Langzeitstudie mit bis zu 6,7 Jahre langen Nachbeobachtungszeiten (2–80 Monate, \bar{x} 49 Monate) eine **gute Korrelation zwischen MIA und dem klinischen Bild – besonders in den höheren Tumorstadien bzw. bei größerer Tumormasse** – gefunden werden. So zeigte sich zum einen, dass erhöhte MIA-Werte signifikant (p -Wert = 0,023, Mann-Whitney-Test) vermehrt bei größeren Tumordicken und höchst signifikant (p -Wert < 0,001, Chi-Quadrat-Test) vermehrt bei zunehmenden Tumorstadien vorkommen. Zum anderen war Metastasierung, d.h. die Ausbreitung und Vermehrung von Tumormasse, mit gehäuften und höheren MIA-Anstiegen verbunden (signifikant gehäufte MIA-Anstiege bei Fernmetastasierung/Stadium IV, p = 0,034, Chi-Quadrat-Test). Aus diesen Gründen **kann MIA besonders gut bei bestehender oder entstehender großer Tumormasse als Marker für den Krankheitsverlauf eingesetzt werden. Dabei haben einzelne MIA-Wert-Bestimmungen eine wesentlich geringere**

Aussagekraft als die Beurteilung des MIA-Verlaufs nach Mehrfachbestimmungen. Eine weitere **Steigerung der Aussagekraft von MIA erreicht man, wenn die MIA-Werte jedes Patienten am individuellen Verlauf und nicht anhand eines vorgegebenen, allgemeingültigen Cutoffs bewertet werden.** So korrelierte der individuelle MIA-Verlauf (MIA-Anstieg und -Abfall, ohne Berücksichtigung eines Cutoffs) der Stadium I und II-Patienten dieser Studie zu 78,0% (135 von 173 Patienten), der MIA-Verlauf gemessen an einem Cutoff dagegen nur zu 60,7% (105 von 173 Patienten) mit dem klinischen Verlauf. Ähnliches gilt auch beim Einsatz von MIA als prognostischer Marker: **Weniger einzelne MIA-Bestimmungen, als vielmehr die Verfolgung des individuellen MIA-Verlaufs machen eine frühzeitige, prognostische Aussage bezüglich Tumorprogression (besonders Fernmetastasierung) möglich:** Es zeigte sich in dieser Studie, dass später metastasierende Patienten mit primär geringer Tumormasse (mit Tumorstadium I und II) bereits vor der klinischen Entdeckung der Metastasierung einen signifikant (um 0,001 ng/ml pro Tag, $p = 0,009$) steigenden MIA-Serumwertverlauf aufwiesen und sich damit eindeutig von den nicht metastasierenden Patienten mit nicht signifikant, schwankend verlaufenden MIA-Werten unterschieden. **Im Rahmen der Tumornachsorge von Melanompatienten mit Stadium I und II sollte daher ein MIA-Anstieg von 0,001 ng/ml pro Tag bzw. 0,1 ng/ml pro 100 Tage als kritisch bezüglich eines erhöhten Risikos für Metastasierung betrachtet werden.**

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1	Humane MIA-cDNA- und -Protein-Sequenz (Blesch et al. 1994)
Abbildung 2	Dreidimensionale Struktur des MIA-Proteins in Lösung (Stoll et al. 2001)
Abbildung 3	Schematische Darstellung der MIA-Funktion (Bosserhoff et al. 1998)
Abbildung 4	Altersverteilung des Patientenkollektivs
Abbildung 5	Verteilung der Tumordicke im Patientenkollektiv
Abbildung 6	Verteilung des Clark-Levels im Patientenkollektiv
Abbildung 7	Lokalisation des Primärtumors bei Männern und Frauen
Abbildung 8	Schematische Darstellung des MIA-ELISAs
Abbildung 9	Verteilung der MIA-Werte bei den Tumorstadien I bis IV
Abbildung 10	Häufigkeit der Cutoff-Überschreitungen bei metastasierenden und nicht metastasierenden Patienten
Abbildung 11	Prozentualer Anteil der Cutoff-Überschreitungen an allen Untersuchungen bei metastasierenden Patienten
Abbildung 12	Prozentualer Anteil der Cutoff-Überschreitungen an allen Untersuchungen bei nicht metastasierenden Patienten
Abbildung 13	Häufigkeit der Endstadien I bis IV bei 1. MIA-Wert $<$ und $>$ Cutoff
Abbildung 14	Metastasierungsrate bei Patienten mit niedrigem MIA-Wert vor OP
Abbildung 15	Metastasierungsrate bei Patienten mit erhöhtem MIA-Wert vor OP
Abbildung 16	Beziehung zwischen erstem MIA-Wert und Endstadium
Abbildung 17	Beziehung zwischen maximalem MIA-Wert und Endstadium
Abbildung 18	Größe des MIA-Anstiegs bei den Stadien I bis IV
Abbildung 19	Größe des prozentualen MIA-Anstiegs bei den Stadien I bis IV
Abbildung 20	Prozentualer Anteil der MIA-Anstiege an allen Untersuchungen bei metastasierenden Patienten
Abbildung 21	Prozentualer Anteil der MIA-Anstiege an allen Untersuchungen bei nicht metastasierenden Patienten
Abbildung 22	Serumwerte von metastasierenden Patienten nach Erstuntersuchung
Abbildung 23	Serumwerte von nicht metastasierenden Patienten nach Erstuntersuchung
Abbildung 24	Serumwerte von metastasierenden Patienten vor und nach Entdeckung der Metastasierung
Abbildung 25	Serumwerte von metastasierenden Patienten vor Entdeckung der Metastasierung
Abbildung 26	Serumwerte von metastasierenden Patienten nach Entdeckung der Metastasierung

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1	Einteilung des malignen Melanoms nach der TNM-Klassifikation der AJCC von 2001
Tabelle 2	Klinische und pathologische Stadieneinteilung des malignen Melanoms nach der Klassifikation der AJCC von 2001
Tabelle 3	Untersuchungsintervalle in Monaten bei der Tumornachsorge (nach der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft)
Tabelle 4	Altersverteilung des Patientenkollektivs
Tabelle 5	Verteilung der Primärerkrankungen im Patientenkollektiv
Tabelle 6	Verteilung der Tumordicke im Patientenkollektiv
Tabelle 7	Verteilung des Clark-Levels im Patientenkollektiv
Tabelle 8	Verteilung der Tumorlokalisationen im Patientenkollektiv
Tabelle 9	Inhalt des Testbestecks
Tabelle 10	Untersuchungen mit niedrigem bzw. erhöhtem MIA-Wert bei den Tumorstadien I bis IV
Tabelle 11	Häufigkeit von Cutoff-Überschreitungen bei metastasierenden und nicht metastasierenden Patienten
Tabelle 12	Häufigkeit der Endstadien I bis IV bei Patienten mit erhöhtem und niedrigem ersten MIA-Wert
Tabelle 13	Anzahl von aufeinander folgenden Cutoff-Überschreitungen in den Serumkontrollen unmittelbar vor Entdeckung der Metastasierung
Tabelle 14	Anzahl der Cutoff-Überschreitungen vor Entdeckung der Metastasierung
Tabelle 15	Untersuchungen mit MIA-Abfall und MIA-Anstieg bei den Tumorstadien I bis IV
Tabelle 16	MIA-Verlaufstendenzen von metastasierenden und nicht metastasierenden Patienten

LITERATURVERZEICHNIS

Abbasi NR, Shaw HM, Rigel DS, Friedmann RJ, Mc Carthy WH, Osman I, Kopf AW, Polsky D. Early diagnosis of cutaneous melanoma: revisiting the ABCD criteria. *JAMA* 292 (2004) 2771–2776

Achiron A, Catane R, Mandel M. Melanoma risk in women with previous breast cancer. *J Clin Oncol* 22 (2004) Abstr. 7553

Anderson DE, Smith JL Jr, McBride CM. Hereditary aspects of malignant melanoma. *JAMA* 200 (1967) 741–746

Apfel R, Lottspeich F, Hoppe J, Behl C, Dürr B, Bogdahn U. Purification and analysis of growth regulating proteins secreted by a human melanoma cell line. *Melanoma Research* 2 (1992) 327–336

Balch CM, Buzaid AC, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG, Fleming ID, Houghton A Jr, Kirkwood JM, Mihm MF, Reintgen D, Ross MI, Sober A, Soong SJ, Thompson JA, Thompson JF, Gershenwald JE, McMasters KM. A new American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *Cancer* 88 (2000) 1484–1491

Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG, Fleming ID, Gershenwald JE, Houghton A Jr, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MR, Morton DL, Reintgen DS, Ross MI, Sober A, Thompson JA, Thompson JF. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 19 (2001a) 3635–3648

Balch CM, Soong SJ, Gershenwald JE, Thompson JF, Reintgen DS, Cascinelli N, Urist M, McMasters KM, Ross MI, Kirkwood JM, Atkins MB, Thompson JA, Coit DG, Byrd D, Desmond R, Zhang Y, Liu PY, Lyman GH, Morabito A. Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: Validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. *J Clin Oncol* 19 (2001b) 3622–3634

Bassères N, Grob JJ, Richard MA, Thirion X, Zarour H, Noe C, Collet-Vilette AM, Lota I, Bonerandi JL. Cost-effectiveness of surveillance of stage I melanoma. *Dermatology* 191 (1995) 199–203

Bastian BC. Genomische Analyse von Melanomen und melanozytären Nävi. Diagnostische Möglichkeiten und Einblick in die Pathogenese. *Hautarzt* 53 (2002) 499–509

Bataille V, Newton Bishop JA, Sasieni P, Swerdlow AJ, Pinney E, Griffiths K, Cuzick J. Risk of cutaneous melanoma in relation to the numbers, types and sites of naevi: a case-control study. *Br J Canc* 73 (1996) 1605–1611

Blesch A, Bosserhoff AK, Apfel R, Behl C, Hessdoerfer B, Schmitt A, Jachimczak P, Lottspeich F, Buettner R, Bogdahn U. Cloning of a novel malignant melanoma-derived growth-regulatory protein, MIA. *Cancer Res* 54 (1994) 5695–5701

Bogdahn U, Apfel R, Hahn M, Gerlach M, Behl C, Hoppe J, Martin R. Autocrine tumor cell growth-inhibiting activities from human malignant melanoma. *Cancer Res* 49 (1989) 5358–5363

Bogdahn U, Hahn M, Gerlach M. Autocrine proliferation-inhibiting peptides of human malignant melanoma. *J Neurooncol* 5 (1987) 168

Bosetti C, La Vecchia C, Naldi L, Lucchini F, Negri E, Levi F. Mortality from cutaneous malignant melanoma in Europe. Has the epidemic levelled off? *Melanoma Res* 14 (2004) 301–309

Bosserhoff AK, Buettner R. Expression, function and clinical relevance of MIA (Melanoma Inhibitory Activity). *Histol Histopathol* 17 (2002) 289–300

Bosserhoff AK, Hauschild A, Hein R, Schadendorf D, Stockfleth E, Bogenrieder T, Landthaler M, Buettner R, Stolz W. Elevated MIA serum levels are of relevance for management of metastasized malignant melanomas: Results of a German multicenter study. *J Invest Dermatol* 114 (2000) 395–396

Bosserhoff AK, Dréau D, Hein R, Landthaler M, Holder WD, Buettner R. Melanoma inhibitory activity (MIA), a serological marker of malignant melanoma. In: *Recent Results in Cancer Research*, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg, 2001a, Vol. 158, 158–167

Bosserhoff AK, Echtenacher B, Hein R, Buettner R. Functional role of melanoma inhibitory activity in regulating invasion and metastasis of malignant melanoma cells in vivo. *Melanoma Research* 11 (2001b) 417–421

Bosserhoff AK, Golob M, Buettner R, Landthaler M, Hein R. MIA („melanoma inhibitory activity“): Biologische Funktionen und klinische Relevanz beim malignen Melanom. *Hautarzt* 49 (1998) 762–769

Bosserhoff AK, Hein R, Bogdahn U, Buettner R. Structure and promoter analysis of the gene encoding the human melanoma-inhibiting protein MIA. *J Biol Chem* 271 (1996) 490–495

Bosserhoff AK, Kaufmann M, Kaluza B, Bartke I, Zirngibl H, Hein R, Stolz W, Buettner R. Melanoma-inhibiting activity, a novel serum marker for progression of malignant melanoma. *Cancer Res* 57 (1997a) 3149–3153

Bosserhoff AK, Kondo S, Moser M, Dietz UH, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Buettner R, Sandell LJ. Mouse CD-RAP/MIA gene: structure, chromosomal localization, and expression in cartilage and chondrosarcoma. *Dev Dyn* 208 (1997b) 516–525

Bosserhoff AK, Lederer M, Kaufmann M, Hein R, Stolz W, Apfel R, Bogdahn U, Buettner R. MIA, a novel serum marker for progression of malignant melanoma. *Anticancer Res* 19 (1999a) 2691–2694

Bosserhoff AK, Moser M, Hein R, Landthaler M, Buettner R. In situ expression patterns of melanoma-inhibiting activity (MIA) in melanomas and breast cancers. *J Pathol* 187 (1999b) 446–454

Bosserhoff AK, Stoll R, Sleeman JP, Bataille F, Buettner R, Holak TA. Active detachment involves inhibition of cell-matrix contacts of malignant melanoma cells by secretion of melanoma inhibitory activity. *Lab Invest* 83 (2003) 1583–1594

Braun-Falco O, Landthaler M, Hölzel D, Konz B, Schmoeckel C. Therapie und Prognose maligner Melanome der Haut. *DMW* 111 (1986) 1750–1756

Braun-Falco O, Stolz W, Bilek P, Merkle T, Landthaler M. Das Dermatoskop. Eine Vereinfachung der Auflichtmikroskopie von pigmentierten Hautveränderungen. *Hautarzt* 41 (1990) 131–136

Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg* 172 (1970) 902–908

Brochez L, Naeyaert JM. Serological markers for melanoma. *Br J Dermatol* 143 (2000) 256–268

Buzaid AC, Ross MI, Balch CM, Soong SJ, McCarthy WH, Tinoco L, Mansfield P, Lee JE, Bedikian A, Eton O, Plager C, Papadopoulos N, Legha SS, Benjamin RS. Critical analysis of the current American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma and proposal of a new staging system. *J Clin Oncol* 15 (1997) 1039–1051

Buzaid AC, Tinoco LA, Jendiroba D, Tu ZN, Lee JJ, Legha SS, Ross MI, Balch CM, Benjamin RS. Prognostic value of size of lymph node metastases in patients with cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 13 (1995) 2361–2368

Ceballos PI, Ruiz-Maldonado R, Mihm MC Jr. Melanoma in children. *N Engl J Med* 332 (1995) 656–662

Clark WH Jr, Elder DE, Guerry D 4th, Braitman LE, Trock BJ, Schultz D, Synnetwedt M, Halpern AC. Model predicting survival in stage I melanoma bases on tumor progression. *J Natl Cancer Inst* 81 (1989) 1893–1904

Clark WH Jr, From L, Bernardino EA, Mihm MC. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res* 29 (1969) 705–726

Clark WH Jr, Reimer RR, Greene M, Ainsworth AM, Mastrangelo MJ. Origin of familial malignant melanomas from heritable melanocytic lesions. „The B-K mole syndrome“. *Arch Dermatol*. 114 (1978) 732–738

Cohen Y, Rosenbaum E, Begum S, Goldenberg D, Esche C, Lavie O, Sidransky D, Westra WH. Exon 15 BRAF mutations are uncommon in melanomas arising in nonsun-exposed sites. *Clin Cancer Res* 10 (2004) 3444–3447

Cohn-Cedermark G, Mansson-Brahme E, Rutqvist LE, Larsson O, Johansson H, Ringborg U. Trends in mortality from malignant melanoma in Sweden, 1970–1996. *Cancer* 89 (2000) 348–355

Coit DG, Rogatko A, Brennan MF. Prognostic factors in patients with melanoma metastatic to axillary or inguinal lymph nodes. *Ann Surg* 214 (1991) 627–636

Crombie IK. Racial differences in melanoma incidence. *Br J Cancer* 40 (1979) 185–193

Crowson AN, Magro CM, Sanchez-Carpintero I, Mihm MC Jr. The precursors of malignant melanoma. In: *Recent Results in Cancer Research*, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg, 2002, Vol. 160, 75–84

Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, Patel HN, Busam KJ, Kutzner H, Cho KH, Aiba S, Brocker EB, Le Boit PE, Pinkel D, Bastian BC. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med* 353 (2005) 2135–2147

Deichmann M, Benner A, Bock M, Jäckel A, Uhl K, Waldmann V, Näher H. S100-beta, melanoma-inhibiting activity, and lactate dehydrogenase discriminate progressive from nonprogressive American Joint Committee on Cancer stage IV melanoma. *J Clin Oncol* 17 (1999) 1891–1996

Deichmann M, Benner A, Kuner N, Wacker J, Waldmann V, Näher H. Are response to therapy of metastasized malignant melanoma reflected by decreasing serum values of S100? Or melanoma inhibitory activity (MIA)? *Melanoma Res* 11 (2001) 291–296

Della Torre G, Pasini B, Frigerio S, Donghi R, Rovini D, Delia D, Peters G, Huot TJG, Bianchi-Scarra G, Lantieri F, Rodolfo M, Parmiani G, Pierotti MA. CDKN2A and CDK4 mutations analysis in Italian melanoma-prone families: functional characterization of a novel CDKN2A germ line mutation. *Br J Cancer* 85 (2001) 836–844

Dietz UH, Sandell LJ. Cloning of a retinoic acid-sensitive mRNA expressed in cartilage and during chondrogenesis. *J Biol Chem* 271 (1996) 3311–3316

DiFronzo LA, Wanek LA, Morton DL. Earlier diagnosis of second primary melanoma confirms the benefits of patient education and routine postoperative follow-up. *Cancer* 91 (2001) 1520–1524

Djukanovic D, Hofmann U, Sucker A, Rittgen W, Schadendorf D. Comparison of S100 protein and MIA protein as serum marker for malignant melanoma. *Anticancer Res* 20 (2000) 2203–2208

Djureen Martenson E, Hansson LO, Nilsson B, Hansson J, Schoultz E v, Hauschild A, Ringborg U. S-100B and melanoma inhibiting activity (MIA): new prognostic serum markers in patients with malignant melanoma. *Melanoma Research* 9 (1999) 321–322

Dong XD, Tyler D, Johnson JL, DeMatos P, Seigler HF. Analysis of prognosis and disease progression after local recurrence of melanoma. *Cancer* 88 (2000) 1063–1071

Dornier C, Dousset B, Legras B, Barbaud A, Schmutz JL. Protéine S-100B et MIA (melanoma inhibiting activity) sériques. Etude prospective de leur valeur comme marqueurs de progression du mélanome. *Ann Dermatol Venereol* 129 (2002) 739–740

Dréau D, Bosserhoff AK, White RL, Buettner R, Holder WD. Melanoma-inhibitory activity protein concentrations in the blood of melanoma patients treated with immunotherapy. *Oncol Res* 11 (1999) 55–61

Dummer R, Bösch U, Panizzon R, Bloch PH, Burg B. Swiss guidelines for the treatment and follow-up of cutaneous melanoma. *Dermatology* 203 (2001) 75–80

Edwards RH, Ward MR, Wu H, Medina CA, Brose MS, Volpe P, Nussen-Lee S, Haupt HM, Martin AM, Herlyn M, Lessin SR, Weber BL. Absence of BRAF mutations in uv-protected mucosal melanomas. *J Med Genet* 41 (2004) 270–272

Eggermont AMM. Nachbeobachtung von Patienten mit einem Melanom im Stadium I nach Exzision des Primärtumors: einfach und kosteneffizient. *Onkologie* 2 (1996) 476–480

El Fitori J, Kleeff J, Giese NA, Guweidhi A, Bosserhoff AK, Buchler MW, Friess H. Melanoma inhibitory activity (MIA) increases the invasiveness of pancreatic cancer cells. *Cancer Cell Int* 5 (2005) 3

Eton O, Legha SS, Moon TE, Buzaid AC, Papadopoulos NE, Plager C, Burgess AM, Bedikian AY, Ring S, Dong Q, Glassman AB, Balch CM, Benjamin RS. Prognostic factors for survival of patients treated systemically for disseminated melanoma. *J Clin Oncol* 16 (1998) 1103–1111

Fargnoli MC, Piccolo D, Altobelli E, Formicone F, Chimenti S, Peris K. Constitutional and environmental risk factors for cutaneous melanoma in an Italian population. A case-control study. *Melanoma Research* 14 (2004) 151–157

Faries MB, Gupta RK, Ye X, Hsueh EC, Morton DL. Melanoma-inhibiting activity assay predicts survival in patients receiving a therapeutic cancer vaccine after complete resection of American Joint Committee on Cancer stage III melanoma. *Ann Surg Oncol* 11 (2003) 85–93

Fateh-Moghadam A, Stieber P. Kriterien für den Einsatz von Tumormarkern. *Fortschr Med* 114 (1996) 64–67

Francken AB, Shaw HM, McCarthy WH, Soong SJ, Accortt NA, Thompson JF. Detection of first recurrences in cutaneous melanoma patients: A prospective study. *J Clin Oncol* 22 (2004) Abstr. 7546

Friedman RJ, Rigel DS, Kopf AW. Early detection of malignant melanoma: the role of physician examination and self-examination of the skin. *CA Cancer J Clin* 35 (1985) 130–151

Gamel JW, George SL, Edwards MJ, Seigler HF. The long-term clinical course of patients with cutaneous melanoma. *Cancer* 95 (2002) 1286–1293

Gamel JW, George SL, Stanley WE, Seigler HF. Skin melanoma. *Cancer* 72 (1993) 1219–1223

Garbe C. Sonne und malignes Melanom. *Hautarzt* 43 (1992) 251–257

Garbe C. A rational approach to the follow-up of melanoma patients. In: *Recent Results in Cancer Research*, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg, 2002, Vol. 160, 205–215

Garbe C, Blum A. Epidemiology of cutaneous melanoma in Germany and worldwide. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 14 (2001) 280–290

Garbe C, Büttner P, Bertz J, Burg G, d`Hoedt B, Drepper H, Guggenmoos-Holzmann I, Lechner W, Lippold A, Orfanos CE, Peters A, Rassner G, Stadler R, Stroebel W. Primary cutaneous melanoma. *Cancer* 75 (1995) 2484–2491

Garbe C, Leiter U, Ellwanger U, Blaheta HJ, Meier R, Rassner G, Schittek B. Diagnostic value and prognostic significance of protein S-100 β , melanoma-inhibitory activity, and tyrosinase/MART-1 reverse transcription-polymerase chain reaction in the follow-up of high risk melanoma patients. *Cancer* 97 (2003a) 1737–1745

Garbe C, McLeod GRC, Buettner PG. Time trends of cutaneous melanoma in Queensland, Australia and Central Europe. *Cancer* 89 (2000) 1269–1278

Garbe C, Paul A, Kohler-Sp ath H, Ellwanger U, Stroebel W, Schwarz M, Schlangenhauff B, Meier F, Schittek B, Blaheta HJ, Blum A, Rassner G. Prospective evaluation of a follow-up schedule in cutaneous melanoma patients: Recommendations for an effective follow-up strategy. *J Clin Oncol* 21 (2003b) 520–529

Garbe C, Hauschildt A, Volkenandt M, Schadendorf D, Stolz W, Reinhold U, Kortmann RD, Kettelhack C, Frerich B, Keilholz U, Dummer R, Sebastian G, Tilgen W, Mackensen A, Kaufmann R. Deutsche Leitlinie: Malignes Melanom. In: Interdisziplin re Leitlinien zur Diagnostik und Behandlung von Hauttumoren, Garbe C (Hrsg), Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York, 2005, 23–54

Gillgren P, Brattstr m G, Frisell J, Persson JO, Ringborg U, Hansson J. Effect of primary site on prognosis in patients with cutaneous malignant melanoma. A study using a new model to analyse anatomical locations. *Melanoma Research* 15 (2005) 125–132

Goggins WB, Tsao H. A population-based analysis of risk factors for a second primary cutaneous melanoma among melanoma survivors. *Cancer* 97 (2003) 639–643

Greene MH. The genetics of hereditary melanoma and nevi. 1998 update. *Cancer* 86 (1999) Supplement 11, 2464–2477

Greulich KM, Utikal J, Peter RU, Kr hn G. c-MYC and nodular malignant melanoma. *Cancer* 89 (2000) 97–103

Groningen JJM v, Bloemers HPJ, Swart GWM. Identification of melanoma inhibitory activity and other differentially expressed messenger RNAs in human melanoma cell lines with different metastatic capacity by messenger RNA differential display. *Cancer Res* 55 (1995) 6237–6243

Gross R. Tumormarker: Eine kritische Zwischenbilanz. *Deutsches  rzteblatt* 33 (1986) 2289–2293

Guba M, Bosserhoff AK, Steinbauer M, Abels C, Anthuber M, Buettner R, Jauch KW. Overexpression of melanoma inhibitory activity (MIA) enhances extravasation and metastasis of A-mel 3 melanoma cells in vivo. *Brit J Cancer* 83 (2000) 1216–1222

Guba M, Steinbauer M, Ruhland V, Schütz A, Geissler EK, Anthuber M, Vogt T, Bosserhoff A, Jauch KW. Elevated MIA serum levels are predictors of poor prognosis after surgical resection of metastatic malignant melanoma. *Oncol Reports* 9 (2002) 981–984

Guerry D, Botbyl JD, Gimotty PA. A population-based validation of the AJCC melanoma staging system. *J Clin Oncol* 22 (2004) Abstr. 7500

Guldborg P, Kirkin AF, Gronbaek K, thor Straten P, Ahrenkiel V, Zeuthen J. Complete scanning of the CDK4 gene by denaturing gradient gel electrophoresis: a novel missense mutation but low overall frequency of mutations in sporadic metastatic malignant melanoma. *Int J Cancer* 72 (1997) 780–783

Gummer M, Schmid L, Clemm C, Volkenandt M. Nachsorge bei Patienten mit malignen Melanomen. In: *Manual Maligne Melanome des Tumorzentrum Münchens*, 2000, 5. Auflage, 124–129

Hall HI, Miller DR, Rogers JD, Bewerse B. Update on the incidence and mortality from melanoma in the United States. *J Am Acad Dermatol* 40 (1999) 35–42

Hau P, Apfel R, Wiese P, Tschertner I, Blesch A, Bogdahn U. Melanoma-inhibiting activity (MIA/CD-RAP) is expressed in a variety of malignant tumors of mainly neuroectodermal origin. *Anticancer Res* 22 (2002) 577–583

Hau P, Ruummele P, Kunz-Schughart LA, Doerfelt A, Hirschmann B, Lohmeier A, Koch H, Mueller A, Bogdahn U, Bosserhoff AK. Expression levels of melanoma inhibitory activity correlate with time to progression in patients with high-grade glioma. *Oncol Rep* 12 (2004) 1355–1364

Hayward N. New developments in melanoma genetics. *Curr Oncol Rep.* 2 (2000) 300–306

Hipfel R, Schitteck B, Bodingbauer Y, Garbe C. Specifically regulated genes in malignant melanoma tissues identified by subtractive hybridization. *Br J Cancer* 82 (2000) 1149–1157

Hofmann U, Szedlak M, Rittgen W, Jung EG, Schadendorf D. Primary staging and follow-up in melanoma patients – monocenter evaluation of methods, costs and patient survival. *Br J Cancer* 87 (2002) 151–157

Holly EA, Kelly JW, Shpall SN, Chiu SH. Number of melanocytic nevi as a major risk factor for malignant melanoma. *J Am Acad Dermatol* 17 (1987) 459–468

Jachimczak P, Apfel R, Bosserhoff AK, Fabel K, Hau P, Tschertner I, Wise P, Schlingensiepen KH, Schuler-Thurner B, Bogdahn U. Inhibition of immunosuppressive effects of melanoma-inhibiting activity (MIA) by antisense techniques. *Int J Cancer* 113 (2005) 88–92

James MR, Roth RB, Shi MM, Kammerer S, Nelson MR, Stark MS, Dumenil T, Montgomery GW, Hayward NK, Martin NG, Braun A, Duffy DL. BRAF polymorphism and risks of melanocytic neoplasia. *J Invest Dermatol* 125 (2005) 1252–1258

Jimenez RE, Panageas K, Busam KJ, Brady MS. Prognostic implications of multiple lymphatic basin drainage in patients with truncal melanoma. *J Clin Oncol* 23 (2005) 518–524

Jürgensen A, Holzapfel U, Hein R, Stolz W, Buettner R, Bosserhoff AK. Comparison of two prognostic markers for malignant melanoma: MIA and S100 β . *Tumor Biol* 22 (2001) 54–58

Keilholz U, Scheibenbogen C, Sommer M, Pritsch M, Geuke AM. Prognostic factors for response and survival in patients with metastatic melanoma receiving immunotherapy. *Melanoma Res* 6 (1996) 173–178

Klimek VM, Williams L, Chapman PB. Serum levels of melanoma-inhibiting activity do not predict relapse in melanoma patients. *Cytokines Cell Mol Ther* 7 (2002) 71–74

Koehler MR, Bosserhoff AK, Beust G v, Bauer A, Blesch A, Buettner R, Schlegel J, Bogdahn U, Schmid M. Assignment of the human melanoma inhibitory activity gene (MIA) to 19q13.32-q13.33 by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Genomics* 35 (1996) 265–267

Konstadoulakis MM, Messaris E, Zografos G, Ricaniadis N, Androulakis G, Karakousis C. Common prognostic factors for stage III melanoma patients and for stage I and II melanoma patients with recurrence to their regional lymph nodes. *Melanoma Research* 12 (2002) 357–364

Krähn G, Kaskel T, Sander S, Pereira Y, Waizenhöfer J, Wortmann S, Leiter U, Peter RU. S100 β is a more reliable tumor marker in peripheral blood for patients with newly occurred melanoma metastases compared with MIA, albumin and lactate-dehydrogenase. *Anticancer Res* 21 (2001) 1311–1316

Kumar R, Angelini S, Snellman E, Hemminki K. BRAF mutations are common somatic events in melanocytic nevi. *J Invest Dermatol* 122 (2004) 342–348

Lamerz R, Mann K. Tumormarker. In: *Kompendium Internistische Onkologie*, Schmoll HJ, Höffken K, Possinger K (Hrsg.), Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1986, 473–477

- Landi MT, Baccarelli A, Calista D, Pesatori A, Fears T, Tucker MA, Landi G. Combined risk factors for melanoma in a Mediterranean population. *Br J Cancer* 85 (2001) 1304–1310
- Lejeune FJ. The impact of surgery on the course of melanoma. In: *Recent Results in Cancer Research*, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg, 2002, Vol. 160, 151–157
- Liu Y, Yang TF. Basic research and clinical applications of cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi* 18 (2004) 66–69
- Lougheed JC, Holton JM, Alber T, Bazan JF, Handel TM. Structure of melanoma inhibitory activity protein, a member of a recently identified family of secreted proteins. *PNAS* 98 (2001) 5515–5520
- Lougheed JC, Domaille PJ, Handel TM. Solution structure and dynamics of melanoma inhibitory activity protein. *J Biomol NMR* 22 (2002) 211–223
- MacKie RM. Incidence, risk factors and prevention of melanoma. *Eur J Cancer* 34 (1998) Supplement 3, S3–S6
- MacKie RM. Risk factors for the development of primary cutaneous malignant melanoma. *Dermatol Clin* 20 (2002) 597–600
- MacKie RM, Aichison T, Sirel JM, McLaren K, Watt DC. Prognostic models for subgroups of melanoma patients from the Scottish melanoma group database 1979–86, and their subsequent validation. *Br J Cancer* 71 (1995) 173–176
- Manola J, Atkins M, Ibrahim J, Kirkwood J. Prognostic factors in metastatic melanoma: A pooled analysis of Eastern Cooperative Oncology Group trials. *J Clin Oncol* 18 (2000) 3782–3793
- Marghoob AA, Koenig K, Bittencourt FV, Kopf AW, Bart RS. Breslow thickness and Clark level in melanoma. Support for including level in pathology reports and in American Joint Committee on Cancer staging. *Cancer* 88 (2000) 589–595
- Marks R. The changing incidence and mortality of melanoma in Australia. In: *Recent Results in Cancer Research*, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg, 2002, Vol. 160, 113–124
- Matsushita Y, Hatta N, Wakamatsu K, Takehara K, Ito S, Takata M. Melanoma inhibitory activity (MIA) as a serum marker for early detection of post-surgical relapse in melanoma patients: comparison with 5-s-cysteinyldopa. *Melanoma Research* 12 (2002) 319–323

McKenna DB, Stockton D, Brewster DH, Doherty VR. Evidence for an association between cutaneous malignant melanoma and lymphoid malignancy: a population-based retrospective cohort study in Scotland. *Br J Cancer* 88 (2003) 74–78

Meral R, Duranyildiz D, Tas F, Camlica H, Yasasever V, Kurul S, Dalay N. Prognostic significance of melanoma inhibitory activity levels in malignant melanoma. *Melanoma Research* 11 (2001) 627–632

Morton DL, Wanek L, Nizze A, Elashoff RM, Wong JH. Improved long-term survival after lymphadenectomy of melanoma metastatic to regional nodes. *Ann Surg* 214 (1991) 491–501

Moser M, Bosserhoff AK, Hunziker EB, Sandell L, Fassler R, Buettner R. Ultrastructural cartilage abnormalities in MIA/CD-RAP-deficient mice. *Mol Cell Biol* 22 (2002) 1438–1445

Müller-Ladner U, Bosserhoff AK, Dreher K, Hein R, Neidhart M, Gay S, Scholmerich J, Buettner R, Lang B. MIA (melanoma inhibitory activity): a potential serum marker for rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 38 (1999) 148–154

Naldi L, Imberti GL, Parazzini F, Gallus S, La Vecchia C. Pigmentary traits, modalities of sun reaction, history of sunburns, and melanocytic nevi as risk factors for cutaneous malignant melanoma in the Italian population. *Cancer* 88 (2000) 2703–2710

Négrier S, Fervers B, Bailly C, Beckendorf V, Cupissol D, Doré JF, Dorval T, Garbay JR, Vilmer C. Cutaneous melanoma. *Br J Cancer* 84 (2001) Supplement 2, 81–85

Neidhart M, Müller-Ladner U, Frey W, Bosserhoff AK, Colombani PC, Frey-Rindova P, Hummel KM, Gay RE, Hauselmann H, Gay S. Increased serum levels of non-collagenous matrix proteins (cartilage oligomeric matrix protein and melanoma inhibitory activity) in marathon runners. *Osteoarthritis Cartilage* 8 (2000) 222–229

Orfanos CE, Jung EG, Rassner G, Wolff HH, Garbe C. Stellungnahme und Empfehlungen der Kommission malignes Melanom der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft zur Diagnostik, Behandlung und Nachsorge des malignen Melanoms. *Hautarzt* 45 (1994) 285–291

Osterlind A, Tucker MA, Stone BJ, Jensen OM. The Danish case-control study of cutaneous malignant melanoma. II. Importance of uv-light exposure. *Int J Cancer* 42 (1988) 319–324

Palmieri G, Cossu A, Ascierto PA, Botti B, Strazzullo M, Lissia A, Colombino M, Casula M, Floris C, Tanda F, Pirastu M, Castello G. Definition of the role of chromosome9p21 in sporadic melanoma through genetic analysis of primary tumours and their metastases. *Br J Cancer* 83 (2000) 1707–1714

- Pehamberger H, Steiner A, Wolff K. In vivo epiluminescence microscopy of pigmented skin lesions. I. Pattern analysis of pigmented skin lesions. *J Am Acad Dermatol* 17 (1987) 571–583
- Perez RP, Zhang P, Bosserhoff AK, Buettner R, Abu-Hadid M. Expression of Melanoma inhibitory activity in melanoma and nonmelanoma tissue specimens. *Hum Pathol* 31 (2000) 1381–1388
- Piepkorn M. Melanoma genetics: an update with focus on the CDKN2A(p16)/ARF tumor suppressors. *J Am Acad Dermatol* 42 (2000) 705–722
- Poser I, Tatzel J, Kuphal S, Bosserhoff AK. Functional role of MIA in melanocytes and early development of melanoma. *Oncogene* 23 (2004) 6115–6124
- Reifenberger J, Knobbe CB, Sterzinger AA, Blaschke B, Schulte KW, Ruzicka T, Reifenberger G. Frequent alterations of Ras signaling pathway genes in sporadic malignant melanomas. *Int J Cancer* 109 (2004) 377–384
- Reintgen DS, Vollmer R, Tso CY, Seigler HF. Prognosis for recurrent stage I malignant melanoma. *Arch Surg* 122 (1987) 1338–1342
- Ridgeway CA, Hieken TJ, Ronan SG, Kim DK, Das Gupta TK. Acral lentiginous melanoma. *Arch Surg* 130 (1995) 88–92
- Rigel DS. The gender-related issues in malignant melanoma. *Hawaii Med J* 52 (1993) 124, 146
- Rigel DS, Rogers GS, Friedman RJ. Prognosis of malignant melanoma. *Dermatol Clin* 3 (1985) 309–314
- Roka F, Kittler H, Cuzig P, Hoeller C, Hinterhuber G, Wolff K, Pehamberger H, Diem E. Sentinel node status in melanoma patients is not predictive for overall survival upon multivariate analysis. *Cancer Res* 92 (2005) 662–667
- Ross MI, Cornier JN, Xing Y, Gershenwald JE, Lee JE, Mansfield PF. Prognosis and survival outcomes in melanoma patients with unknown primary site (MUP). *J Clin Oncol* 22 (2004) Abstr. 7544
- Rübben A, Bogdahn I, Grubendorf-Conen EI, Burg G, Böni R. Loss of heterozygosity and microsatellite instability in acquired melanocytic nevi: towards a molecular definition of the dysplastic nevus. In: *Recent Results in Cancer Research*, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg, 2002, Vol. 160, 100–112

Sander CA, Flaig MJ, Starz H, Gummer M, Haraida S. Histopathologie des malignen Melanoms. In: Manual Maligne Melanome des Tumorzentrum Münchens, 2000, 5. Auflage, 28–31

Schmidt-Rohlfing B, Schneider U, Thomsen M, Bosserhoff AK. Correlation of a novel matrix protein with the degree of cartilage degradation. *Rheumatol Int* 22 (2002) 165–169

Schmid-Wendtner MH. Sonographie. In: Manual Maligne Melanome des Tumorzentrum Münchens, 2000, 5. Auflage, 26–27

Schmitz C, Brenner W, Henze E, Christophers E, Hauschild A. Comparative study on the clinical use of protein S100B and MIA (melanoma inhibitory activity) in melanoma patients. *Anticancer Res* 20 (2000) 5059–5064

Severi G, Giles GG, Robertson C, Boyle P, Autier P. Mortality from cutaneous melanoma: evidence for contrasting trends between populations. *Br J Cancer* 82 (2000) 1887–1891

Sherr CJ. Cell cycle control and cancer. *Harvey Lect* 96 (2000) 73–92

Sirott MN, Bajorin DF, Wong GYC, Tao Y, Chapman PB, Templeton MA, Houghton AN. Prognostic factors in patients with metastatic malignant melanoma. *Cancer* 72 (1993) 3091–3098

Slingluff CL Jr, Vollmer RT, Seigler HF. Multiple primary melanoma: Incidence and risk factors in 283 patients. *Surgery* 113 (1993) 330–339

Snels DG, Hille ET, Gruis NA, Bergman W. Risk of cutaneous malignant melanoma in patients with nonfamilial atypical nevi from a pigmented lesion clinic. *Am Acad Dermatol* 40 (1999) 686–693

Soufir N, Avril MF, Chompret A, Demenais F, Bombléd J, Spatz A, Stoppa-Lyonnet D, Benard J, Bressac-de Paillerets B. Prevalence of p16 and CDK4 germline mutations in 48 melanoma-prone families in France. The French Familial Melanoma Study Group. *Hum Mol Genet* 7 (1998) 209–216

Soufir N, Lacapere JJ, Bertrand G, Matichard E, Meziani R, Mirebeau D, Descamps V, Gérard B, Archimbaud A, Ollivaud L, Bouscarat F, Baccard M, Lanternier G, Saiag P, Lebbé C, Basset-Seguín N, Crickx B, Cave H, Grandchamp B. Germline mutations of the INK4a-ARF gene in patients with suspected genetic predisposition to melanoma. *Br J Cancer* 90 (2004) 503–509

Stahlecker J, Gauger A, Bosserhoff A, Büttner R, Ring J, Hein R. MIA as a reliable tumor marker in the serum of patients with malignant melanoma. *Anticancer Res* 20 (2000) 5041–5044

Stadius Muller MG, Leeuwen PAM van, Lange-De Klerk ESM de, Diest PJ van, Pijpers R, Ferwerda CC, Vuylsteke RJCLM, Meijer S. The sentinel lymph node status is an important factor for predicting clinical outcome in patients with stage I or II cutaneous melanoma. *Cancer* 91 (2001) 2401–2408

Stoll R, Renner C, Zweckstetter M, Bruggert M, Abrosius D, Palme S, Engh RA, Bolob M, Breibach I, Buettner R, Voelter W, Holak TA, Bosserhoff AK. The extracellular human melanoma inhibitory activity (MIA) protein adopts an SH3 domain-like fold. *EMBO J* 20 (2001) 340–349

Stolz W, Bilek P, Landthaler M, Merkle T, Braun-Falco O. Skin surface microscopy. *Lancet* II (1989) 864–865

Stolz W, Landthaler M. Klassifikation, Diagnostik und Differentialdiagnostik des malignen Melanoms. *Der Chirurg* 64 (1994) 145–152

Swerdlow AJ, English J, MacKie RM, O`Doherty CJ, Hunter JAA, Clark J, Hole DJ. Benign melanocytic naevi as a risk factor for malignant melanoma. *BMJ* 292 (1986) 1555–1559

Tas F, Yasaever V, Duranyildiz D, Camlica H, Ustuner Z, Aydiner A, Topuz E. Clinical value of protein S100 and melanoma-inhibitory activity (MIA) in malignant melanoma. *Am J Clin Oncol* 27 (2004) 225–228

Tatzel J, Poser I, Schroeder J, Bosserhoff AK. Inhibition of melanoma inhibitory activity (MIA) expression in melanoma cells leads to molecular and phenotypic changes. *Pigment Cell Res* 18 (2005) 92–101

Trisal V, Zhou M, Shen B, Chu D. Over expression of capping protein z line alpha (CAPZA 1) and protein phosphatase 1 (PP 1) in malignant melanoma as identified by subtractive hybridization. *J Clin Oncol* 22 (2004) Abstr. 7518

Tronnier M, Garbe C, Bröcker EB, Stadler R, Steinkraus V, Soyer HP, Wolff HH. Standards der histologischen Diagnose maligner Melanome. *Hautarzt* 48 (1997) 720–729

Ugurel S. Serummarker des malignen Melanoms. *Hautarzt* 56 (2005) 173–186

Wagner V, Rudi J, Naher H, Stremmel W. Seropositivity for MIA and S100 in patients with gastrointestinal carcinomas. *Med Oncol* 17 (2000) 35–38

Wallace DC, Beardmore GL, Exton LA. Familial malignant melanoma. *Ann Surg* 177 (1973) 15–20

Weinstock MA, Colditz GA, Willett WC, Stampfer MJ, Bronstein BR, Mihm MC Jr, Speizer FE. Nonfamilial cutaneous melanoma incidence in women associated with sun exposure before 20 years of age. *Pediatrics* 84 (1989) 199–204

Weiß J, Garge C, Bertz J, Biltz H, Burg G, Hennes B, Jung EG, Kreysel HW, Orfanos CE, Petzold D, Schwermann M, Stadler R, Tilgen W, Tronnier H, Völkers W. Risikofaktoren für die Entwicklung maligner Melanome in der Bundesrepublik Deutschland. *Hautarzt* 41 (1990) 309–313

Weiss M, Loprinzi CL, Creagan ET, Dalton RJ, Novotny P, O`Fallon JR. Utility of follow-up tests for detecting recurrent disease in patients with malignant melanomas. *JAMA* 274 (1995) 1703–1705

Wellbrock C, Ogilvie L, Hedley D, Karasarides M, Martin J, Niculescu-Duvaz D, Springer CJ, Marais R. V599EB-RAF is an oncogene in melanocytes. *Cancer Res* 64 (2004) 2338–2342

Wolfel T, Hauer M, Schneider J, Serrano M, Wolfel C, Klehmann-Hieb E, De Plaen E, Hankeln T, Meyer zum Buschenfelde KH, Beach D. A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science* 269 (1995) 1281–1284

Wolff K. Why is epiluminescence microscopy important? In: *Recent Results in Cancer Research*, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg, 2002, Vol. 160, 125–132

Yonekawa M, Kondo S, Sugiura H, Kobayashi K, Watanabe T, Kimata K, Sandell LJ, Iwata H. Serum cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein (CD-RAP) levels in swarm rat sarcoma. *J Orthop Res* 20 (2002) 382–386

Zettersten E, Sagebiel RW, Miller JR 3rd, Tallapureddy S, Leong SP, Kashani-Sabet M. Prognostic factors in patients with thick cutaneous melanoma (> 4mm). *Cancer* 94 (2002) 1049–1056

Zuo L, Weger J, Yang Q, Goldstein AM, Tucker MA, Walker GJ, Hayward N, Dracopoli NC. Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial melanoma. *Nat Genet* 12 (1996) 97–99

DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Professor Dr. med. Rüdiger Hein für die freundliche Überlassung des Themas meiner Dissertation und für die großartige Betreuung bei der Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit bedanken. Er nahm sich stets Zeit und stand engagiert mit fachlichem Rat und Tat zur Seite.

Für zahlreiche wertvolle Ratschläge und Hinweise bedanke ich mich auch ganz besonders bei Frau Professor Dr. Anja Bosserhoff.

Mein großer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Dr. phil. Johannes Ring für die Möglichkeit, die Untersuchungen meiner Studie in der von ihm geleiteten Klinik durchzuführen.

Für die technische Aufbereitung der Proben und die freundliche Hilfestellung bei Fragen im Labor möchte ich Frau Heidi Loy-Weigand danken.

Ein herzliches Dankeschön richte ich an Frau Regina Hollweck aus dem Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie der Technischen Universität München, die mich bei der statistischen Datenauswertung unermüdlich beraten und unterstützt hat.

Für ihren Rat bei statistischen Fragen, für Tipps und Tricks beim Bearbeiten von Grafiken danke ich Michaela Pfundmair.

Meinen herzlichen Dank für ihre engagierte redaktionelle Unterstützung und viele hilfreiche Anmerkungen möchte ich Pamela Habermann aussprechen.

Bei Anil K. Jain möchte ich mich für seine wertvollen Ratschläge bei kniffligen Layout-Fragen bedanken.

Ganz lieber und besonderer Dank gilt Dominik Jain. Durch unsere Diskussionen habe ich zahlreiche Denkanstöße und Anregungen für die Auswertung dieser Arbeit erhalten. Er hat mir gezeigt, wie durch geschicktes Anwenden der Informatik in der Medizin wertvolle Informationen gewonnen werden können. Er hat mir so die Informatik um einiges näher gebracht und dabei große Hilfe bei der Auswertung der Studienergebnisse geleistet. Nicht zuletzt war er mein 24-Stunden-Berater bei Software-Fragen.

Zum Schluß möchte ich mich ganz besonders bei meinen lieben Eltern und meiner Familie bedanken, die mir beim Erstellen dieser Arbeit und bei meinem beruflichen Werdegang mit viel Engagement, Rat, Ermutigung und Verständnis stets zur Seite standen.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name:	Stefanie Pfundmair
Geburtsdatum:	04.06.1981
Geburtsort:	Mindelheim, Deutschland
Eltern:	Lieselotte Pfundmair-Bischoff geb. Bischoff, Lehrerin Claus-Peter Anton Pfundmair, Dr. med.

Schulbildung

1987 – 1991	Grundschule in Aichach
1991 – 2000	Deutschherren Gymnasium in Aichach 06/2000 Allgemeine Hochschulreife

Hochschulbildung

10/2000 – 09/2002	Studium der Humanmedizin (Vorklinik) an der Ludwig-Maximilians-Universität München 08/2002 Ärztliche Vorprüfung
10/2002 – 04/2007	Studium der Humanmedizin (Klinik) an der Technischen Universität München 08/2003 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 03/2006 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/2006 – 03/2007	Praktisches Jahr im Krankenhaus der Barmherzigen Brüder München in der Frauenklinik vom Roten Kreuz, München im Eastbourne District General Hospital 04/2007 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
26.04.2007	Approbation als Ärztin