

Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein
Technische Universität München
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.- Prof. Dr. Dr. Johannes Ring)

**Melanoma-inhibitory-activity (MIA) als Tumormarker
bei metastasierendem malignen Melanom
-klinische Relevanz für Tumornachsorge und Therapiemonitoring-**

Julia Stahlecker

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. Dr. J. Ring

Die Dissertation wurde am 24.03.2005 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 19.10.2005 angenommen.

	Seite
1. Einleitung.....	3
1.1. Malignes Melanom.....	3
1.1.1. Definition.....	3
1.1.2. Epidemiologie.....	3
1.1.2.1. Inzidenz.....	3
1.1.2.2. Mortalität.....	3
1.1.2.3. Geschlechts-/Altersverteilung.....	4
1.1.2.4. Risikofaktoren (auslösende- u. prädisponierende).....	4
1.1.3. Klinik und Typeneinteilung.....	5
1.1.4. Stadieneinteilung.....	8
1.1.5. Prognose.....	11
1.1.6. Tumornachsorge.....	13
1.2. Tumormarker.....	14
1.2.1. Allgemeine Anforderungen.....	14
1.2.2. Tumormarker des malignen Melanom.....	15
1.2.2.1. Tyrosinase.....	15
1.2.2.2. 5-S-CD.....	16
1.2.2.3. NSE.....	16
1.2.2.4. LASA-P.....	16
1.2.2.5. S100.....	17
1.2.2.6. LDH.....	18
1.3. Melanoma Inhibitory Activity (MIA).....	18
2. Ziele.....	22
3. Material und Methoden.....	24
3.1. MIA Bestimmung mittels Enzym-linked-immuno-sorbent-assey (ELISA).....	24
3.2. Patienten.....	26
3.3. Bestimmung der Sensitivität und Spezifität.....	27
3.4. MIA-Serumwerte in verschiedenen Patientenkollektiven.....	28
3.5. MIA-Serumwerte vor und nach Metastasenreduktion.....	28

3.6. Korrelation der MIA-Serumwerte mit dem Krankheitsverlauf unter Therapie.....	29
3.7. Prognostische Wertigkeit von MIA im Rahmen der Tumornachsorge.....	29
3.8. Statistische Methoden.....	30
4. Ergebnisse.....	31
4.1. Verteilung der MIA-Serumwerte in einem gesunden Kontrollkollektiv.....	31
4.2. Sensitivität und Spezifität von MIA als Serummarker bei malignem Melanom....	32
4.3. Verteilung der MIA-Serumwerte in verschiedenen Patientenkollektiven.....	33
4.4. MIA-Serumwerte vor und nach Metastasenreduktion.....	34
4.5. Korrelation der MIA-Serumwerte mit dem Krankheitsverlauf unter Therapie.....	36
4.6. Prognostische Wertigkeit von MIA im Rahmen der Tumornachsorge.....	39
5. Diskussion.....	40
5.1. Validität von MIA-Serumwerten zur Detektion von lokoregionären- und Fernmetastasen.....	41
5.2. MIA als Kontrollparameter unter Therapie.....	44
5.3. MIA als möglicher prognostischer Faktor.....	45
5.4. MIA im Vergleich mit anderen Tumormarkern.....	47
6. Zusammenfassung.....	51
7. Abkürzungsverzeichnis.....	53
8. Verzeichnis der Abbildungen.....	54
9. Verzeichnis der Tabellen.....	54
10. Literatur.....	55
11. Lebenslauf.....	69
12. Danksagung.....	70

1. Einleitung

1.1. Malignes Melanom

1.1.1. Definition

Das maligne Melanom ist ein bösartiger Tumor, der sich zumeist an der sichtbaren Haut, seltener an Schleimhäuten, am Auge (Uvea und Retina) und an den Hirnhäuten durch maligne Transformation von melanozytären Zellen entwickelt.

1.1.2. Epidemiologie

1.1.2.1. Inzidenz

Das maligne Melanom betrifft vorwiegend die weiße Bevölkerung. Bei Afrikanern und Asiaten tritt das maligne Melanom nur selten auf und betrifft dann vornehmlich Hände, Füße sowie die Schleimhäute.

Weltweit wurde in den letzten Jahrzehnten eine steigende Inzidenz beobachtet. Wurde in Westdeutschland zu Beginn der 70er Jahre eine Inzidenz von 3 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner pro Jahr dokumentiert, so lag sie hier in den 90er Jahren zwischen 9-12 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner pro Jahr. Europaweit lag die Zahl der Neuerkrankungen zwischen 5-7 in den mediterranen und 15 pro 100.000 Einwohner in den skandinavischen Ländern. Amerika liegt für diesen Zeitraum mit einer Inzidenz von 10-20 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner und Jahr auf einem geringfügig höheren Niveau als Europa. Im Vergleich dazu findet sich in Australien mit 40-60 pro 100.000 Einwohner und Jahr die weltweit höchste Inzidenz. Erfreulicherweise zeichnete sich in den letzten Jahren in einigen Ländern jedoch ein verlangsamter Anstieg ab (Garbe *et al.* 2001, Hall *et al.* 1999, McKie 1998).

1.1.2.2. Mortalität

Mit der Inzidenz ist auch die Mortalität des malignen Melanoms in den letzten Jahrzehnten angestiegen. In Deutschland zeigt ein Vergleich von 1970 und 1995 einen Anstieg der Mortalität bei Männern von 1,7 auf 3,2 Todesfälle pro 100.000 Einwohner und bei Frauen von 1,6 auf 2,0 pro 100.000 Einwohner. Trotzdem fiel der Anstieg im Vergleich zur Inzidenz

deutlich geringer aus. Dies könnte auf eine bessere Früherkennung sowie ein verbessertes Management von malignen Melanomen zurückzuführen sein (Garbe *et al.* 2001, McKie 1998).

1.1.2.3. Geschlechts- / Altersverteilung

Während in den 70er Jahren noch ca. 2/3 aller Melanompatienten weiblich waren, zeigt sich heute eine ausgeglichenerere Geschlechtsverteilung mit einem männlichen Anteil der Melanompatienten von mehr als 45%. Eine leichte Prädominanz des weiblichen Geschlechts findet sich auch in anderen europäischen Ländern wie z.B. Scotland (Garbe *et al.* 2001, MacKie 1998). Melanome vor der Pubertät sind eine extreme Seltenheit, diese entstehen vornehmlich in großflächigen, kongenitalen Nävuszellnävi (Ceballos *et al.* 1995, Hendrickson und Ross 1981). Die Mehrzahl der Melanome entwickeln sich zwischen dem 20.-70. Lebensjahr mit einem Altersgipfel zwischen dem 50.-60. Lebensjahr (Garbe *et al.* 2001).

1.1.2.4. Risikofaktoren (auslösende- u. prädisponierende)

Mehrere intraindividuelle Faktoren sind von unterschiedlichen Autoren als unabhängige Risikofaktoren für die Entstehung von malignen Melanomen beschrieben worden (Holly *et al.* 1987, MacKie 1998, Sverdlow *et al.* 1986, Weiß *et al.* 1990).

So ist das relative Risiko für Patienten mit Hauttyp I oder II nach Fitzpatrick im Vergleich zu denen mit Hauttyp III oder IV signifikant erhöht. Ebenso gehen rote oder blonde Haare und das Vorhandensein von Sommersprossen mit einem erhöhten Melanomrisiko einher. Die Augenfarbe hingegen ist lediglich ein schwaches Kriterium, wenn es um die Einschätzung des individuellen Melanomrisikos geht. Hier sind jedoch die Patienten mit blauer Augenfarbe gefährdeter als andere.

Eine hohe Anzahl an benignen melanozytären Nävi sowie das Auftreten von mehr als 5 sogenannten dysplastischen Naevuszellnävi sind weitere wichtige Parameter, die mit einem gesteigerten Melanomrisiko assoziiert sind (Bataille *et al.* 1996, Snels *et al.* 1999, Weiß *et al.* 1990).

Ca. 5% der Melanompatienten haben eine positive Familienanamnese mit einem oder mehreren ebenfalls betroffenen Familienmitgliedern. In diesen Fällen kann bei etwa 25% eine Mutation in Gen p16/CDKN2A nachgewiesen werden, das auf Chromosom 9 lokalisiert ist und im Zellzyklus als Tumorsuppressor-Gen wirkt. Mitglieder von Melanomfamilien, die Träger dieser Mutation sind, zeigten in den USA bis zum 60. Lebensjahr ein Risiko von 60%

an einem malignen Melanom zu erkranken. Sie liegen damit deutlich über dem vergleichbaren Risiko von Individuen, die nicht Träger dieser Genmutation sind (MacKie 2002). Außerdem ist bei Patienten mit Melanomen in der Vorgeschichte das Risiko für die Entwicklung eines Zweitmelanoms erhöht (Craig *et al.* 1993).

Der Einfluß von UV-Licht auf die Entwicklung von malignen Melanomen bei hellhäutigen Personen ist letztlich nicht eindeutig geklärt. Aufgrund der vorliegenden epidemiologischen Studien scheint vor allem die Intensität der Sonnenexposition in Kindheit und Adoleszenz sowie das Auftreten von Sonnenbränden im frühen Lebensalter die wesentlichen Risikofaktoren für die Entstehung von malignen Melanomen in Bezug auf UV-Licht zu sein. Die kumulative Strahlendosis konnte hingegen als Risikofaktor für die Entstehung kutaner maligner Melanome nicht in allen Studien bestätigt werden, scheint aber für die Gruppe der Lentigo-maligna-Melanome von Bedeutung zu sein (Garbe 1992, Österlind *et al.* 1988, Weinstock *et al.* 1989).

1.1.3. Klinik und Typeneinteilung

Da sich das maligne Melanom in über 90% primär an der sichtbaren Haut manifestiert, kann die Diagnose von erfahrenen Dermatologen häufig bereits klinisch gestellt werden. Wegweisend sind dabei die klinischen Zeichen, die 1985 von Friedmann *et al.* im sogenannten ABCD(E)-System zusammengefasst wurden (Friedmann *et al.* 1985):

A = Asymmetrie

B = Begrenzung unregelmäßig

C = Color (Farbe) variiert in der Läsion

D = Durchmesser >5mm

(E = Erhabenheit der Läsion)

Sind mehrere dieser Kriterien erfüllt, muss der Verdacht auf ein malignes Melanom geäußert werden. Die Läsion sollte dann in jedem Fall entfernt werden (Friedmann *et al.* 1985, Rigel und Friedmann 1993). Die endgültige Diagnose wird histologisch gestellt. Dabei erfolgt die Einteilung in die 1969 von Clark erstellte und 1976 von Reed um das akrolentiginöse Melanom erweiterte Klassifikation in klinisch-histologische Subtypen (Clark *et al.* 1969, Reed 1976).

Unterschieden werden 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% verteilen sich auf Sonderformen wie desmoplastisches Melanom, Melanom auf großen kongenitalen Nävi, malignes Melanom bei unbekanntem Primärtumor u.a. (Orfanos *et al.* 1994).

Im Idealfall lassen sich die 4 Haupttypen des malignen Melanoms klinisch sowie histologisch durch einige charakteristische Merkmale voneinander abgrenzen (Stolz und Landthaler 1994, Tronnier *et al.* 1997):

Superfiziell spreitendes Melanom (SSM)

Das SSM ist durch ein zunächst horizontales Wachstum charakterisiert. Klinisch findet sich eine überwiegend makulöse Läsion, mit meist polyzyklischer Begrenzung. Die Farbpalette reicht von rot über unterschiedliche Brauntöne bis zu schwarz. Im weiteren Verlauf finden sich weißliche Areale, die als Regressionszonen innerhalb des Tumors angesehen werden. Anamnestisch lassen sich Verläufe zwischen 3-5 Jahren eruieren.

Histologisch findet sich eine mit einzeln stehenden oder zu Nestern aggregierten atypischen Melanozyten durchsetzte Epidermis mit einem subläsionalen Entzündungsinfiltrat. Die Läsion weist eine ausgeprägte horizontale Ausbreitung mit unscharfer Begrenzung im seitlichen Randbereich auf. In etwa 30% der Fälle ist das SSM mit einem melanozytären Nävus assoziiert. Bei fortgeschrittenem primärem SSM kann es sekundär zu einem knotigen Wachstum kommen.

Noduläres malignes Melanom (NMM)

Das NMM entwickelt sich relativ rasch innerhalb von Monaten oder wenigen Jahren. Es ist durch ein vornehmlich vertikales Wachstum gekennzeichnet, welches sich klinisch als ein meist scharf begrenzter rot- bis braun-schwarzer knotiger Tumor manifestiert. Im Gegensatz zum SSM sind die ABCDE-Regeln vielfach nicht erfüllt. Die makroskopischen Aspekte finden sich histologisch in einem kompakten knotig, vertikalen Wachstum mit scharfer seitlicher Begrenzung wieder. Es finden sich epitheloide und / oder spindelzellige atypische Melanozyten. Daneben weisen eine relativ große Anzahl von Mitosen, eine starke Vaskularisierung und die fehlende „Reifung“ der Zellen zur Tiefe auf ein aggressives Wachstumsverhalten hin.

Lentigo-maligna-Melanom (LMM)

Das LMM tritt bevorzugt im höheren Lebensalter im Bereich lichtexponierter Areale (70% im Kopf- / Gesichtsbereich) auf. Als Vorläuferläsion gilt die Lentigo maligna, die als Melanoma in situ nicht selten seit mehreren Jahren oder Jahrzehnten besteht.

Klinisch entwickelt sich auf dem Boden einer unregelmäßig begrenzten bräunlich-schwärzlichen Makula eine langsam zunehmende Infiltration oder Knotenbildung. Aufgrund der Prädilektion der lichtexponierten Areale findet sich histologisch neben einer atrophen Epidermis mit verstrichenen Reteleisten eine aktinische Elastose. Ferner sieht man junctional einzelne epitheloide als auch spindelzellige, atypische Melanozyten mit sporadischer Nestbildung, die entlang der Basalzellschicht im Bereich der Adnexe in die Tiefe ziehen können. Daneben finden sich Melanophagen.

Akrolentiginöses Melanom (ALM)

Diese Melanome finden sich an Palmae, Plantae oder subungual. In Deutschland zählt der Typ mit einem Anteil von 5% aller Melanome zu den eher seltenen Varianten. Es ist jedoch die häufigste Form maligner Melanome bei Afrikanern und Asiaten (Ridgeway *et al.* 1995). Klinisch ähnelt das ALM in seiner Entwicklung dem SSM. Gehäuft finden sich jedoch hier auch amelanotische Varianten, wodurch die Diagnose erschwert wird. Die subungualen Melanome zeigen meist initial eine Hyperpigmentierung, im weiteren Verlauf auch eine Destruktion der Nagelplatte. Die Differentialdiagnose zu anderen subungualen Veränderungen wie z.B. dem Hämangiom, der Verruca vulgaris oder einem Hämatom ist klinisch häufig nicht eindeutig zu treffen. Zur Abgrenzung von hämorrhagischen Veränderungen ist das sogenannte *Hutchinsonsche* Zeichen hilfreich. Dieses bezeichnet eine Pigmentablagerung in der Umgebung des Nagels, über die Nagelfalz hinaus, wie sie bei Hämorrhagien in der Regel nicht auftritt. Histologisch finden sich neben einem lokalisationstypischen Epithel mit breiter Epidermis und kompakter Hornschicht Tumorzellen mit häufig langen, dendritischen Ausläufern in der Basalzellschicht. Daneben finden sich atypische Melanozyten auch in den Schweißdrüsenausführungsgängen. Ferner durchwandern atypische Einzelzellen und z.T. große Nestformationen in relativ hoher Zahl die Epidermis.

1.1.4. Stadieneinteilung

Eine standardisierte und allgemein anerkannte Stadieneinteilung ist bei allen malignen Tumoren so auch beim malignen Melanom Voraussetzung für die Zuordnung von Patienten in definierte, prognostische Gruppen und einer dementsprechenden stadiengerechten Therapie und Nachsorge. Voraussetzung ist hierbei eine einfache und praktikable sowie reproduzierbare Anwendbarkeit. Die verwendeten Kriterien müssen außerdem die wesentlichen prognostischen Faktoren des jeweiligen Tumors beinhalten.

TNM-Klassifikation

Die Stadieneinteilung beim malignen Melanom erfolgt nach der TNM- Klassifikation (Tab. 1).

Die T-Klassifikation beurteilt dabei den primären Tumor.

Die Eindringtiefe des Primärtumors ist 1970 erstmals von Breslow als prognostischer Faktor beim malignen Melanom beschrieben worden (Breslow 1970). Am histologischen Präparat wird die Ausdehnung des primären Melanoms von der obersten Schicht des Stratum granulosum bis zum tiefsten Invasionspunkt des Tumors in Millimetern gemessen. Zur Vereinfachung wurden die ursprünglich von Breslow vorgeschlagenen Grenzen abgeändert, nachdem sich gezeigt hatte, dass sich die Risikogruppen nicht an starren Normwerten definieren lassen. Die bereits 1969 von Clark *et al.* vorgeschlagene Einteilung nach der zur Tiefe maximal befallenen Hautschicht findet in der aktuellen Stadieneinteilung der AJCC (American Joint Committee on Cancer) von 2001 aufgrund ihrer größeren Varianz bei der Beurteilung durch unterschiedliche Untersucher und ihrer geringeren prognostischen Aussagekraft lediglich noch als zusätzliches Kriterium bei der Einteilung dünner Melanome unter 1 mm Eindringtiefe Verwendung (Balch *et al.* 2001a/b; Clark *et al.* 1969). Zusätzlich findet bei der neuen T-Klassifikation die Ulzeration des primären Tumors Berücksichtigung. Der Begriff Ulzeration ist histologisch als Verlust der Epidermis über einem Tumor definiert. Sie hat sich in vielen Studien als zweitwichtigster prognostischer Parameter erwiesen. Die Prognose eines Patienten mit ulzeriertem primären Melanom verschlechtert sich im Vergleich zu der eines Patienten mit gleich dickem, nicht ulzerierten Melanom. Es konnte sogar gezeigt werden, dass Patienten mit dicken, ulzerierten Primärtumoren ohne Nachweis von Lymphknoten-Metastasen eine schlechtere Prognose haben als einige Untergruppen mit Lymphknoten-Metastasen aber ohne nachweisbarer Ulzeration (Balch *et al.* 2001a).

Die N-Klassifikation bezieht sich auf die Anzahl der befallenen Lymphknoten.

Dabei verringert sich die Überlebenswahrscheinlichkeit, je mehr Lymphknoten befallen sind (Balch *et al.* 2001a/b). Aufgrund neuer diagnostischer Entwicklungen wird zusätzlich eine Unterscheidung zwischen Mikro- und Makrometastasen vorgenommen. Unter Ersteren versteht man klinisch inapparente Metastasen die histologisch nach Sentinel-Lymphonodektomie oder elektiver Lymphknoten-Dissektion diagnostiziert worden sind. Im Gegensatz dazu sind Makrometastasen bereits klinisch auffällige Veränderungen der Lymphknoten. Die Bestätigung der klinischen Verdachtsdiagnose erfolgt am histologischen Präparat. Makrometastasen spiegeln eine größere Tumorlast wieder und haben somit im Vergleich zu Mikrometastasen eine schlechtere Prognose (Balch *et al.* 2001a/b). Unter Satellitenmetastasen versteht man klinisch manifeste oder mikroskopisch diagnostizierbare Tumornester in einer Entfernung bis zu 2 cm vom Primärtumor. In-Transit-Metastasen dagegen liegen mindestens 2 cm vom Primarius entfernt. Beide sind das Korrelat einer lymphogenen Metastasierung und gehen als solches mit einer verschlechterten Prognose einher. Dabei unterscheiden sich die beiden Formen nicht wesentlich voneinander. Diese Prognoseverschlechterung ist nach den Einschätzungen der AJCC vergleichbar mit der von 2-3 Lymphknotenmetastasen und wird in der aktuellen Staging-Klassifikation entsprechend eingestuft (Balch *et al.* 2001a, Buzaid *et al.* 1997). Ergänzend konnte gezeigt werden, dass ein Zusammentreffen von lokoregionären Haut- und Lymphknotenmetastasen gleichbedeutend mit einer weiteren Prognoseverschlechterung ist (Balch *et al.* 2001). Im Gegensatz zur früheren Einschätzung scheint die Größe der Metastasen, wie sie in alten Klassifikationen als Unterscheidungsmerkmal benutzt wurde, nicht als ein unabhängiger prognostischer Faktor zu fungieren (Buzaid *et al.* 1997 und 1995).

Im Falle einer Fernmetastasierung (M) wurden drei Untergruppen definiert, die, wenn auch nur kleine, Unterschiede in der Prognose aufweisen. Dabei spielt vor allem die Lokalisation der Fernmetastase eine entscheidende Rolle. Nicht lokoregionäre kutane oder subkutane Metastasen und Lymphknotenmetastasen haben eine bessere Prognose als viszerale Metastasen (Balch *et al.* 2001a/b, Barth *et al.* 1995). Bei letzteren scheinen Lungenmetastasen im Vergleich zu Metastasen an anderen Organen einen kleinen Überlebensvorteil für den Zeitraum eines Jahres zu haben (Balch *et al.* 2001a/b). Eine Erhöhung der Lactatdehydrogenase im Serum, die nicht mit anderen Erkrankungen erklärbar ist, findet in der neuen Klassifikation zusätzliche Berücksichtigung, nachdem sie sich in einigen Studien als unabhängiger prognostischer Faktor im Endstadium der Erkrankung erwiesen hatte (Deichmann *et al.* 1999, Eton *et al.* 1998, Franzke *et al.* 1998, Sirott *et al.* 1993).

In den Tabellen 1 und 2 sind die Kriterien für die TNM-Klassifikation zusammengefasst und den entsprechenden klinischen Stadien zugeordnet.

Tabelle 1: Einteilung des malignen Melanoms nach der TNM-Klassifikation der AJCC 2001 (Balch *et al.* 2001a)

T	Tumoreindringtiefe nach Breslow	Ulzeration (+ od. -)
Tis	In situ	
T1	< = 1 mm	a. – und Clark Level II od. III b. + oder Clark Level IV od. V
T2	1,01-2 mm	a. - b.+
T3	2,01-4 mm	a. - b.+
T4	>4 mm	a. - b.+
N	Anzahl befallener Lymphknoten (LK)	Tumorlast
N0	0	a. Mikrometastasen
N1	1	b. Makrometastasen
N2	2-3	a ./b. s.o.
N3	> =4 od. LK- Konglomerate od. in-transit- bzw. Satelliten-Metastasen <u>mit</u> LK-Metastasen	c. In-transit od. Satelliten-Metastasen <u>ohne</u> Lymphknotenmetastasen
M	Lokalisation	Lactatdehydrogenase i.S.
M0	Keine	
M1a	Nicht locoregionäre kutane, subcutane od. LK-Metastasen	Normal
	Lunge	Normal
M1b	Alle übrigen Organe	Normal
M1c	Alle Fernmetastasen	Erhöht

Tabelle 2: Klinische und pathologische Stadieneinteilung des malignen Melanoms nach der Klassifikation der AJCC von 2001 (Balch *et al.* 2001a).

Stadium	Klinisch	Pathologisch
0	Tis N0 M0	
IA	T1a N0 M0	
B	T1b/T2a N0 M0	
IIA	T2b/T3a N0 M0	
B	T3b/T4a N0 M0	
C	T4b N0 M0	
III	Jedes T N1-3M0	
IIIA		T1-4a N1a M0 T1-4a N2a M0
B		T1-4b N1a M0 T1-4b N2a M0 T1-4a N1b M0 T1-4a N2b M0 T1-4a/bN2c M0
C		T1-4b N1b M0 T1-4b N2b M0 Jedes TN3 M0
IV	Jedes T/N M1a-c	Jedes T/N M1a-c

1.1.5. Prognose

Die 10-Jahres-Überlebensrate nimmt in den höheren Stadien kontinuierlich ab. Im Stadium I beträgt sie noch zwischen 90-97%. Bei Primärtumoren mit einer größeren Tumoreindringtiefe entsprechend dem Stadium II zeigt sich bereits eine deutliche Prognoseverschlechterung mit 10-Jahres-Überlebensraten zwischen 43-67%. Bei In-transit- oder regionären Lymphknotenmetastasen reduziert sich die 10-Jahres-Überlebensrate weiter auf 19-28%. Patienten mit Fernmetastasen weisen nur noch eine begrenzte Überlebenszeit auf (10-Jahres-Überlebenszeit ca. 3%) (Orfanos *et al.* 1994).

Die Prognose wird also vornehmlich durch die histologische Charakteristik des Primärtumors und im weiteren Verlauf durch das Auftreten von Rezidiven und Metastasen bestimmt. In einigen Untersuchungen konnte jedoch gezeigt werden, dass auch andere Kriterien einen unabhängigen Einfluss auf die Prognose haben können.

So spielt die Lokalisation des Primärtumors eine wichtige Rolle. Patienten mit Melanomen an den Extremitäten, mit Ausnahme der Hände und Füße, haben eine bessere Prognose als solche, bei denen sich der Tumor am Stamm, im Nacken oder am behaarten Kopf manifestiert hat. Bei Befall der Akren zeigt sich demgegenüber eine deutlich schlechtere Prognose (Balch *et al.* 2001b, Clark *et al.* 1989, Day *et al.* 1982, Gamel *et al.* 1993, Garbe *et al.* 1995, MacKie *et al.* 1995, Reintgen *et al.* 1987, Stidham *et al.* 1994).

Auch das Lebensalter gilt als ein unabhängiger prognostischer Faktor. Höheres Lebensalter ist mit schlechteren Überlebensraten assoziiert. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte eine im höheren Alter abnehmende Immunabwehr sein (Balch *et al.* 2001b, Gamel *et al.* 1993, Garbe *et al.* 1995).

Widersprüchliche Angaben finden sich in der Literatur bezüglich der prognostischen Wertigkeit des Geschlechts. Einige Autoren sehen in dem vermeintlichen Überlebensvorteil des weiblichen Geschlechts lediglich eine Reflexion der Tatsache, dass Frauen bei der Erstdiagnose eher dünnere, nicht-ulzerierte Melanome bevorzugt an den Extremitäten aufweisen (Day *et al.* 1982, Gamel *et al.* 1993). Im Gegensatz dazu zeigte sich in anderen Studien das Geschlecht, auch nach Korrektur für Lokalisation, Dicke und Ulzeration als unabhängiger prognostischer Faktor (Clark *et al.* 1989, Garbe *et al.* 1995, MacKie *et al.* 1995, Stidham *et al.* 1994).

Eine hohe Mitose-Rate (Mitosen pro mm² im dermalen Anteil eines Melanoms) sowie ein hoher prognostischer Index (Mitose-Rate x Eindringtiefe in mm) sind assoziiert mit einer schlechteren Prognose (Schmoeckel *et al.* 1980).

Zu der Wertigkeit von Regressionszonen innerhalb des Tumors, der Ausprägung einer antitumorösen Entzündungsreaktion sowie dem Vorliegen einer Vaskularisierung finden sich in der Literatur uneinheitliche Angaben. Dies mag unter anderem an der schlechten bzw. uneinheitlichen Beurteilbarkeit dieser Kriterien liegen (Brogelli *et al.* 1992, Clark *et al.* 1989, Day *et al.* 1982, Fallowfield *et al.* 1989, MacKie *et al.* 1995, Ronan *et al.* 1987).

Nach dem Auftreten von Metastasen gelten im Wesentlichen die im Rahmen der neuen AJCC-Klassifikation eingearbeiteten prognostischen Überlegungen (s.o.).

1.1.6. Tumornachsorge

Nachsorgeuntersuchungen haben das Ziel, Rezidive oder Zweittumoren frühzeitig zu erkennen. Dabei richten sich der Umfang und die Frequenz nach dem Stadium und dem damit verbundenen Risikoprofil des Patienten. Zwar sind Spätmetastasierungen nichts ungewöhnliches, jedoch manifestiert sich der überwiegende Teil der Metastasen innerhalb der ersten 5 Jahre nach Primärdiagnose und Therapie (Hofmann *et al.* 2002, Levy *et al.* 1991). Im Allgemeinen wird eine 10-jährige bis zu lebenslange Nachsorge empfohlen, wobei ein Schwerpunkt auf die ersten fünf Jahre gelegt wird. Von der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft (DDG) wurde 1994 das in Tabelle 3 beigefügte Nachsorge-Schema empfohlen (Orfanos *et al.* 1994).

Tabelle 3: Nachsorgeschema für Patienten mit malignem Melanom nach den Empfehlungen der DDG von 1994

	Stadium I	Stadium II	Stadium III	Stadium IV
Röntgen-Thorax	1x jährlich	1x jährlich	2x jährlich	individuell
Abdomensonographie	1x jährlich	1x jährlich	2x jährlich	individuell
Lymphknotenonographie	1x jährlich	2x jährlich	2x jährlich	individuell

Aus unterschiedlichen Gründen wurde in den letzten Jahren wiederholt die Frage gestellt, inwieweit und in welchem Rahmen Nachsorgeuntersuchungen bei Patienten mit malignem Melanom überhaupt sinnvoll sind. Hierzu zählen die mit steigenden Patientenzahlen verbundenen logistischen Probleme in Praxen und Kliniken sowie die ökonomische Belastung. Weitere Überlegungen beziehen sich auf emotionale und körperliche Belastungen des Patienten, wie sie durch die zahlreichen Untersuchungen hervorgerufen werden können. Dabei stellt sich nicht nur die Frage, wie geeignet die etablierten Untersuchungsmethoden zur Detektion von Metastasen sind, sondern auch inwieweit eine frühzeitige Detektion von Metastasen die langfristige Prognose der Patienten verbessert.

Die Metastasierung erfolgt in etwa 70% der Fälle zunächst lokoregionär in Form von Haut- oder Lymphknotenmetastasen (Meier *et al.* 2002). Erstere können ebenso wie Zweittumoren durch klinische Inspektion meist frühzeitig erkannt werden. Somit kommt der Anamnese und der klinischen Untersuchung eine wesentliche Bedeutung in der Nachsorge von Melanompatienten zu.

Zur frühzeitigen Detektion von Lymphknotenmetastasen im primären Abflussgebiet hat sich die Lymphknotensonographie als sensitive Methode bewährt. Im Rahmen von Studien wurden 13-14% der neu aufgetretenen Metastasen mittels Sonographie diagnostiziert. In anderen Studien waren 35-45% der Lymphknotenmetastasen durch dieses Verfahren zu einem Zeitpunkt nachweisbar, als sich klinisch noch ein unauffälliger Palpationsbefund zeigte (Garbe *et al.* 2003b, Hofmann *et al.* 2002, Korting und Sterry 1997)

Demgegenüber konnte in mehreren retrospektiven Studien gezeigt werden, dass mit Röntgen-Thorax und Abdomen-Sonographie nur maximal 10% aller Rezidive entdeckt werden. Zusätzlich ergaben sich durch nach falsch-positiven Ergebnissen durchgeführte Zusatzuntersuchungen weitere Belastungen für Patient und Budget. Somit scheinen diese Verfahren insbesondere bei Patienten mit niedrigem Progressionsrisiko als wenig Kosten/Nutzen effizient (Basseres *et al.* 1995, Hofmann *et al.* 2002, Weiss *et al.* 1995).

Andererseits kommen aufgrund der höheren Sensitivität zunehmend andere bildgebende Verfahren wie Computertomographie und Positronen-Emissions-Tomographie (PET) bei Hochrisikopatienten zum Einsatz (Dummer *et al.* 2001, Garbe *et al.* 2003b, Schulthess von *et al.* 1998).

1.2. Tumormarker

1.2.1. Allgemeine Anforderungen

Tumormarker sind Moleküle, die von Tumorzellen selbst oder von nicht-malignen Zellen (z.B. als Antwort des Immunsystems) synthetisiert werden und im Blut oder anderen Körperflüssigkeiten nachweisbar sind. Für den klinischen Alltag sollte ein kommerziell erhältliches, standardisiertes, einfaches und reproduzierbares Testsystem zur Verfügung stehen.

Dabei sollte ein Tumormarker spezifisch für „seinen“ Tumor sein. Eine Erhöhung über den, in einem gesunden Kollektiv definierten, oberen Normwert sollte bei anderen Tumoren oder Erkrankungen nicht vorkommen.

Die Zuverlässigkeit mit der ein Wiederauftreten des Tumors angezeigt wird, ist ein weiteres Kriterium zur Beurteilung der Validität des Tumormarkers. Sie bezeichnet man als Sensitivität.

Generell sollte die Höhe des Tumormarkers mit der Tumorlast korrelieren. Unter Therapie würde ein Spiegelabfall einer partiellen oder kompletten Remission entsprechen, Spiegel-

persistenz kann mit Konstanz der Tumormasse gleichgesetzt werden und steigende Werte reflektieren eine Progression der Erkrankung.

Idealerweise besitzt ein Tumormarker eine von anderen Faktoren unabhängige prognostische Aussagekraft, die es dem klinisch tätigen Arzt ermöglicht, Patienten mit einem erhöhten Risiko eines Rezidivs oder einer Metastasierung zu erkennen und dementsprechenden Nachsorge- und Therapieschemata zuzuführen. So sollen Tumormarker ergänzende Informationen im Screening, in der Differentialdiagnose, bei der Verlaufskontrolle und dem Therapiemonitoring bei Patienten mit malignen Erkrankungen liefern.

1.2.2. Tumormarker des malignen Melanoms

Leider ist die Detektion von Metastasen aufgrund der fehlenden frühdiagnostischen Möglichkeiten nach wie vor häufig verzögert. Seit Jahren wird daher von verschiedenen Arbeitsgruppen versucht, Tumormarker für das maligne Melanom zu etablieren, welche die oben genannten Kriterien erfüllen. Als potentielle Tumormarker des malignen Melanoms kommen vor allem Metabolite des Melanin-Stoffwechsels, Melanom assoziierte Antigene, Adhäsionsmoleküle und Zytokine in Frage (Hauschild *et al.* 2001). Auf die wichtigsten Vertreter soll im Folgenden kurz eingegangen werden.

1.2.2.1. Tyrosinase

Tyrosinase ist ein Schlüsselenzym des Melaninstoffwechsels. Außer in melanozytären Zellen wird es noch in Schwannschen Zellen exprimiert (Jung *et al.* 1996). Da angenommen wird, dass weder benigne melanozytäre Zellen noch Schwannsche Zellen im Blut zirkulieren, würde der Nachweis von Tyrosinase im peripheren Blut für ein Vorhandensein von Melanomzellen sprechen. Smith *et al.* beschrieben 1991 erstmals die Möglichkeit mittels RT-PCR Tyrosinase mRNA (und damit indirekt Melanomzellen) im peripheren Blut von Patienten im Stadium IV nachzuweisen (Smith *et al.* 1991).

In unterschiedlichen Arbeitsgruppen variierte die Sensitivität dieser Methode bei Patienten mit Fernmetastasen jedoch erheblich. In einer klinischen Studie waren lediglich 27,3% der untersuchten Patienten im Stadium IV Tyrosinase-positiv (Gläser *et al.* 1997). Ähnlich entmutigende Ergebnisse fanden sich in anderen Studien mit Sensitivitäten zwischen 13-50% (Battayani *et al.* 1995, Kunter 1996, Pittmann *et al.* 1996, Reinhold *et al.* 1997). Demgegenüber wurden von Brossart *et al.* sowie Mellado *et al.* Sensitivitäten von 100% und 94% beschrieben (Brossart *et al.* 1993, 1995, Mellado *et al.* 1996).

1.2.2.2. 5-S-Cysteinylidopa (5-S-CD)

5-S-Cysteinylidopa (5-S-CD) ist ein weiterer Metabolit des Melaninstoffwechsels und sollte daher ebenso hoch spezifisch für Melanozyten oder melanozytäre Läsionen sein. Sein Nachweis im Serum erfolgt mittels High-Performance Liquid Chromatographie (HPLC). In einigen Studien konnte eine Korrelation der 5-S-CD-Level mit dem Tumorstadium gezeigt werden. Allerdings fanden Hirai *et al.* erhöhte Werte nur im Stadium IV. Dabei kann die Erhöhung der 5-S-CD-Werte dem Nachweis von Metastasen mittels klinischer Untersuchung, laborchemischen und radiologischen Untersuchungen vorangehen (Hirai *et al.* 1997, Horokoshi *et al.* 1994, Peterson *et al.* 1988, Wimmer *et al.* 1997). Leider zeigten sich in der kaukasischen Bevölkerung zum Teil erhebliche Schwankungen in Abhängigkeit von der Jahreszeit und den unterschiedlichen ethnischen Gruppen, so dass sich die Frage nach einem sinnvollen, einheitlichen Grenzwert stellt. Ebenso scheint der Nachweis mittels HPLC für die tägliche Routine als wenig geeignet (Hauschild *et al.* 2001).

1.2.2.3. Neuronen spezifische Enolase (NSE)

Dieses Enzym der Glykolyse besteht als Dimer aus zwei von drei möglichen Untereinheiten: α , β und γ . Die Dimere $\alpha\gamma$ und $\gamma\gamma$ kommen in Neuronen und neuroendokrinen Zellen vor und wurden deshalb als NSE bezeichnet. Ursprünglich wurde NSE dementsprechend als Marker für neuroendokrine Tumore wie das kleinzellige Bronchialkarzinom und das Neuroblastom verwendet (Hornef *et al.* 1992). Beim malignen Melanom konnten durch Hornef *et al.* erhöhte Werte lediglich bei Patienten mit Fernmetastasen entsprechend dem Tumorstadium IV nachgewiesen werden (Hornef *et al.* 1992). Obwohl in einer Studie ein signifikant längeres mittleres Überleben von Patienten mit normalen NSE-Werten im Vergleich zu den NSE-Positiven berichtet wurde (Wibe *et al.* 1992), verneinten andere Autoren den Zusammenhang zwischen NSE-Werten und dem klinischen Verlauf der Erkrankung (Buzaid *et al.* 1994, Couvreur *et al.* 1993). In der Literatur findet sich für die Stadien III und/oder IV eine Sensitivität zwischen 32 und 34,8% (Guo *et al.* 1995, Tofani *et al.* 1997, Wibe *et al.* 1992).

1.2.2.4. Lipid-bound sialic acid (LASA-P)

Lipid-bound sialic acid (LASA-P) ist ein an die Membranen von verschiedenen Tumorzellen gebundenes Sialoglykolipid. In einer großen Studie von Reintgen *et al.* zeigte sich eine höhere Sensitivität (65%) von LASA-P im Vergleich zu NSE (27%) bei vergleichbarer Spezifität (76%) der beiden Marker (Reintgen *et al.* 1992). In einer weiteren Studie konnte

eine Assoziation von LASA-P-Werten mit dem Wiederauftreten von Metastasen oder dem Überleben nicht nachgewiesen werden (Miliotes *et al.* 1996).

1.2.2.5. S-100B

Hierbei handelt es sich um ein saures, Kalzium bindendes, thermolabiles Protein, das erstmalig von Moore 1965 aus dem Zentralnervensystem von Schweinen isoliert wurde (Moore 1965). Durch Gaynor *et al.* erfolgte 1980 der Nachweis in humanen Melanomzelllinien (Gaynor *et al.* 1980).

Die Eigenschaft von S-100B in 100% gesättigter (englisch = saturated) Ammoniumsulfat-Lösung bei neutralem pH-Wert in Lösung zu bleiben, brachte ihm seinen Namen ein. Als Dimer besteht es aus einer α - und einer β -Untereinheit. Diese kommen in drei verschiedenen Kombinationen ($\alpha\alpha$, $\alpha\beta$, $\beta\beta$) vor (Donato *et al.* 1991, Kligman und Hilt 1988). In malignen Melanomen wird S-100 $\alpha\beta$ exprimiert (Cho *et al.* 1990). Neben Melanozyten können immunhistologisch mit polyklonalen S-100 Antikörpern ferner Langerhans-, Glia- und Schwannzellen (vornehmliche Expression von $\beta\beta$) markiert werden (Hauschild *et al.* 1999a). Es ist daher als immunhistologischer Marker in der Diagnose und Differentialdiagnose von malignen Melanomen und Tumoren der genannten Zellpopulationen etabliert.

Die Bestimmung von S-100B im Serum erfolgt entweder immunradiometrisch oder immunluminometrisch mit mittlerweile kommerziell erhältlichen Testsystemen (z.B. LIA-mat, BYK-Sangatec Diagnostica, Dietzenbach, oder Elecsys S100 Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland). Da beide Nachweismethoden die β -Untereinheit von S-100 erkennen, muss differentialdiagnostisch eine Schädigung des Zentralnervensystems berücksichtigt werden.

Die vorliegenden klinischen Studien über S-100B als Tumormarker des malignen Melanoms lassen sich aufgrund unterschiedlicher Nachweismethoden, verschiedener Grenzwerte und unterschiedlicher Patientenkollektive nur schwer vergleichen. Für das Stadium III und IV finden sich Sensitivitäten zwischen 9-31% bzw. 40-79% (Guo *et al.* 1995, Bonfrer *et al.* 1998, Hauschild *et al.* 1999a, Henze *et al.* 1997, Schultz *et al.* 1998). Es konnte wiederholt gezeigt werden, dass S-100B-Werte mit Tumorstadium, metastastischer Ausdehnung, Progression und Überleben korrelieren (Bonfrer *et al.* 1998, Bruer *et al.* 1997, Deichmann *et al.* 1999, Hauschild *et al.* 1999a/b/c 1999, Kaskel *et al.* 1999, Miliotes *et al.* 1996, Schoultz *et al.* 1996, Schultz *et al.* 1998). Dadurch eignet sich S-100B gut zur Verlaufskontrolle im Rahmen von Nachsorgeuntersuchungen und zum Monitoring unter Therapie (Guo *et al.* 1995, Henze *et al.* 1997, Hauschild *et al.* 1999c, Schultz *et al.* 1998).

In einer Studie von Hauschild *et al.* zeigte sich zudem eine unabhängige prognostische

Wertigkeit von S-100B bei Patienten mit fortgeschrittenem, metastasiertem Melanom (Hauschild *et al.* 1999b).

1.2.2.6. Lactatdehydrogenase (LDH)

Erhöhte LDH-Werte wurden bei Melanom-Patienten erstmals 1954 beschrieben (Hill und Levi 1954). Seitdem wird über den Nutzen von LDH als Tumormarker des malignen Melanoms diskutiert. Dabei erwies sich LDH als besonders guter Marker einer vorhandenen Lebermetastasierung (Finck *et al.* 1983). In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass LDH einen unabhängigen prognostischen Faktor für Patienten im Stadium IV der Erkrankung darstellt (Deichmann *et al.* 1999, Eton *et al.* 1998, Franzke *et al.* 1998, Keilholz *et al.* 1996, Sirott *et al.* 1993). Wie bereits oben erwähnt, werden in der neuen AJCC-Klassifikation Patienten im Stadium IV mit erhöhten LDH-Serumwerten deshalb einer eigenen Untergruppe (M1c) zugeteilt (Balch *et al.* 2001a). Hohe LDH-Werte werden als Zeichen eines erhöhten Stoffwechsels von Tumorzellen angesehen. Ihre prognostische Relevanz konnte bereits für andere maligne Tumor gezeigt werden (Deichmann *et al.* 1999). Aufgrund dieser geringen Spezifität bietet sie keine zusätzlichen Informationen für die Differentialdiagnose maligner Erkrankungen. Außerdem finden sich erhöhte Serumwerte bekanntermaßen auch bei anderen Krankheiten, die mit einem Zellschaden einhergehen, wie dem Myokardinfarkt oder der Hämolyse. Um falsch-positive Werte auszuschließen, sollten daher andere für eine LDH-Erhöhung möglicherweise ursächliche Grunderkrankungen ausgeschlossen werden (Balch *et al.* 2001a).

1.3. Melanoma Inhibitory Activity (MIA)

MIA wurde erstmals im Zellkulturüberstand einer Melanomzelllinie (HTZ-19) isoliert. Aufgrund seiner proliferationsinhibitorischen Eigenschaften *in vitro* wurde es als „Melanoma Inhibitory Activity“ bezeichnet (Apfel *et al.* 1992, Bogdahn *et al.* 1989). Nach Aufreinigung und partieller Sequenzierung des Proteins konnten mittels PCR Teile der MIA-mRNS isoliert werden. Über einen Phagenscreen konnte daraus die kodierende komplementäre DNS von MIA gewonnen werden (Abb.1)(Blesch *et al.* 1994). Neben dem humanen ist heute auch das murine MIA-Gen bekannt. Sie konnten auf Chromosom 19q13.32 bzw. 7 lokalisiert werden (Bossert *et al.* 1997a, Koehler *et al.* 1996).

Translatiert wird ein 131 Aminosäuren großes Vorläufermolekül. Das reife, sezernierte Protein besteht aus 107 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von ca. 11 kDa (Blesch *et al.* 1994). MIA ist bei 100°C über 3 Minuten wärmestabil, stabil bei Säurebelastung und kann durch Trypsin verdaut werden. In normaler Haut und Melanozyten lässt sich mittels RT-PCR keine signifikante MIA-Expression nachweisen. Dagegen findet sich eine schwache MIA-Expression in der Mehrzahl gutartiger, melanozytärer Nävi. Hohe MIA-mRNS Werte konnten in allen primären und metastasierten Melanomen nachgewiesen werden (Blesch *et al.* 1994, Bosserhoff *et al.* 1996). Somit bestand ein erster Hinweis auf eine mögliche Rolle von MIA im Rahmen der Tumorgenese. Die spezifische Expression von MIA-mRNS und Protein in malignen Tumoren (vornehmlich maligne Melanome) und deren Fehlen in aus gesunder Haut kultivierten Melanozyten konnte in weiteren Studien bestätigt werden (van Groningen *et al.* 1995, Bosserhoff *et al.* 1999, Perez *et al.* 2000).

```

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: komplementäre DNS-Sequenz des humanen MIA-Proteins (aus Blesch *et al.* 1994)

Unabhängig davon konnte MIA in Knorpelzellen nachgewiesen werden (Bosserhoff *et al.* 1997a, Dietz und Sandell 1996). An Mäuseembryonen und reifem murinen Gewebe fand sich ein knorpel-spezifisches MIA-mRNS Expressionsmuster. Diese Expression war während der gesamten Entwicklung des Skelettsystems nachweisbar (Bosserhoff *et al.* 1997a). Sakano *et al.* konnten 1999 MIA nach Knochenbrüchen im Knorpel nachweisen (Sakano *et al.* 1999). Bei gleichzeitig fehlendem Nachweis von MIA in Knochen- oder Bindegewebe wurde MIA als möglicher molekularer Marker der Knorpelbildung im Rahmen der Frakturheilung postuliert (Muller-Ladner *et al.* 1999).

Erhöhte MIA-Serumwerte wurden bei Patienten in fortgeschrittenen Stadien von Brustkrebs nachgewiesen. In einer daraufhin initiierten Untersuchung konnten signifikante MIA-mRNS Werte in 17 von 20 Proben, die aus fortgeschrittenen Adenokarzinomen der Brust bzw. deren Metastasen gewonnen worden waren, nachgewiesen werden (Bosserhoff *et al.* 1999). Insgesamt scheint es sich bei der MIA-Expression offenbar um einen für Melanome, Chondrozyten und einzelne Adenokarzinome spezifischen Vorgang zu handeln.

MIA verhindert die Bindung von Melanomzellen an Fibronectin und Laminin, indem es die Bindungsstelle von Zelloberflächenmolekülen (Integrine) zu ihren extrazellulären Matrixproteinen maskiert. (d.h. MIA bindet an Fibronectin und Laminin und verhindert damit die Bindung der Melanomzellen an die umgebende Matrix). Somit führt MIA zum Ablösen der Melanomzellen und damit zu einer gesteigerten Motilität, womit wiederum die Fähigkeit zur Metastasierung begünstigt wird (Bosserhoff *et al.* 1998, Stoll *et al.* 2001).

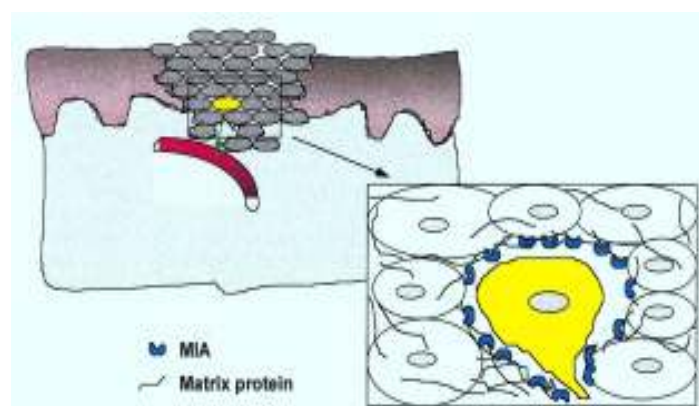


Abbildung 2: Schematische Darstellung der MIA-Funktion (aus Bosserhoff *et al.* 1998)

In Tiermodellen konnte von Guba *et al.* bzw. von Bosserhoff *et al.* der wichtige Einfluß von MIA bei der Metastasierung von malignen Melanomen bestätigt werden. So konnte durch eine forcierte Expression von MIA in Hamstermelanomzellen deren Metastasierungspotential vergrößert werden. Die Wachstumsrate des Primärtumors, die Zellproliferation oder die Apoptose blieben dabei unbeeinflusst. Ferner zeigte in einem Mausmodell die Fähigkeit einer murinen Melanomzelllinie, Lungenmetastasen zu bilden, eine strenge Korrelation mit der MIA-Expression (Bosserhoff *et al.* 2001, Guba *et al.* 2000).

2. Ziele

Die gestiegene Anzahl an Melanompatienten stellt die dermato-onkologisch tätigen Ärzte vor zunehmende logistische Probleme in der Organisation von Tumorambulanzen. Intensive Nachsorgeprogramme werden dabei zunehmend auch zu einem gesundheitsökonomischen Problem. Zudem wird der Nutzen etablierter Untersuchungsmethoden zur frühzeitigen Detektion von Metastasen in den letzten Jahren eher kritisch beurteilt, da diese zumeist eine eher geringe Sensitivität aufweisen. Andererseits fehlen Studien zur Überprüfung der Effektivität von Nachsorgeprogrammen in Bezug auf eine Verbesserung für das Gesamtüberleben.

Auch die Kontrolle des Therapieverlaufs erfolgt zumeist mittels umfangreicher, diagnostischer Verfahren, die neben ihrer Kostenintensivität auch immer eine körperliche und emotionale Belastung des Patienten mit sich bringen können.

Aus diesen Gründen wird seit Jahren von verschiedenen Arbeitsgruppen versucht, einen Tumormarker für das maligne Melanom zu etablieren, mit dessen Hilfe es dem klinisch tätigen Arzt möglich sein soll, neu aufgetretene Metastasen frühzeitig anhand einer einfachen Blutuntersuchung zu diagnostizieren, den Verlauf der Erkrankung unter Therapie zu verfolgen und so nicht zuletzt eine bessere Einschätzung über den weiteren Verlauf der Erkrankung und damit die Prognose des Patienten zu gewinnen.

Melanoma Inhibitory Activity, kurz MIA, wurde erstmalig Ende der 80er/ Anfang der 90er Jahre von der Arbeitsgruppe um Professor Bogdahn aus Regensburg im Zellkulturüberstand von Melanomzellen nachgewiesen (Apfel *et al.* 1992, Bogdahn *et al.* 1989, Blesch *et al.* 1994). Aufgrund seiner präferentiellen Expression in malignen Melanomen (Bosserhoff *et al.* 1996) wurde es in der Folge als möglicher Tumormarker für das maligne Melanom postuliert. Nach Etablierung eines ELISA zur Bestimmung von MIA im Serum fanden sich in einer Pilotstudie Sensitivitäten bis zu 100% (Bosserhoff *et al.* 1997b).

Unter Kenntnis dieser Ergebnisse begannen wir systematisch bei Patienten mit malignem Melanom im Rahmen der Tumornachsorge oder im Therapieverlauf MIA-Serumwerte zu bestimmen. Ziel dieser Untersuchung ist die Beantwortung der Frage, inwieweit sich die Bestimmung der MIA-Serumwerte bei Melanompatienten zur Detektion von im Rahmen der Tumornachsorge neu aufgetretenen Metastasen eignet.

Ferner soll die Frage geklärt werden, ob durch die Bestimmung von MIA im Serum eine effektive Verlaufskontrolle unter Therapie gewährleistet werden kann.

In beiden Fällen werden zu diesem Zweck die Ergebnisse mit denen der etablierten diagnostischen Verfahren verglichen.

Ergänzend soll die prognostische Relevanz von Veränderungen der MIA-Serumwerte im Rahmen der Nachsorge beurteilt werden.

3. Material und Methoden

3.1. MIA-Bestimmung mittels ELISA

MIA wird mittels eines, mittlerweile auch kommerziell erhältlichen Enzym-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (Roche Diagnostics) im Blutserum bestimmt (Abb.3).

Zur Detektion von MIA wurden zwei markierte monoklonale Antikörper verwendet, von denen der eine (MAB 1A12) gegen einen 14 Aminosäuren langen Sequenzbereich am N-terminalen Ende und der andere (MAB 2F7) gegen einen ebenfalls 14 Aminosäuren langen Bereich am C-terminalen Ende des Proteins angreifen.

Entnahme, Lagerung und Aufarbeitung der Proben:

Den Patienten wurden 10ml Blut in ein Serumröhrchen abgenommen. Nach Abzentrifugation von Erythrozyten und weißen Blutkörperchen in einer Rotina 35 R Zentrifuge (Firma Hettich, Tuttlingen, Deutschland) bei 5000 RPM wird das Serum in einem NUNC-Gefäß bis zur Bestimmung bei -70°gelagert.

Verwendet wurde der MIA-ELISA der Firma Roche Diagnostics (Bestell-Nummer: 1 976 826). Die Bestimmung erfolgte anhand der Gebrauchsanleitung des Herstellers.

Schritt 1:

Jeweils 20 µl Patientenserum wurden in eine mit Streptavidin markierte 96-Lochplatte pipetiert.

Schritt 2:

Inkubation für 90 Minuten mit dem biotinylierten MAB 2F7 und POD-konjugierten MAB 1A12-Antikörpern

Schritt 3:

Dreimaliges Waschen mit Phosphat gepufferter Lösung (PBS)

Schritt 4:

Inkubation mit ABTS-Lösung (2,2'-Azino-di-[3-ethylbenz-thiazolinsulfonat]) für 10-20 Minuten.

Schritt 5:

Der entstandene Farbumschlag wird in einem MRX II ELISA-Reader (Dynex Technologies Chantilly, Virginia, USA) colorimetrisch bei 405 nm Wellenlänge gemessen.

Kalibrierung:

Zur Kalibrierung wurde rekombinantes MIA-Protein verwendet, welches von einer stabil mit MIA-cDNA transfizierten CHO (Chinese Hamster Ovary)-Zelllinie gewonnen worden war. Dabei wurden in einem Bereich zwischen 0 und ca. 50 ng/ml lineare Signale gemessen. Im Lieferumfang des Kits sind zur Kalibrierung sechs entsprechende Standardlösungen (a-f) enthalten.

Serumproben mit MIA-Werten oberhalb des linearen Messbereichs des ELISA-Readers wurden in Abhängigkeit zum ersten Messwert verdünnt (z.B. 1:2, 1:4 usw.) und erneut gemessen.

Die Analyse erfolgte ohne Kenntnis des klinischen Status.

Jeder Wert wurde doppelt bestimmt, wobei die Ergebnisse nie mehr als 5% voneinander abwichen.

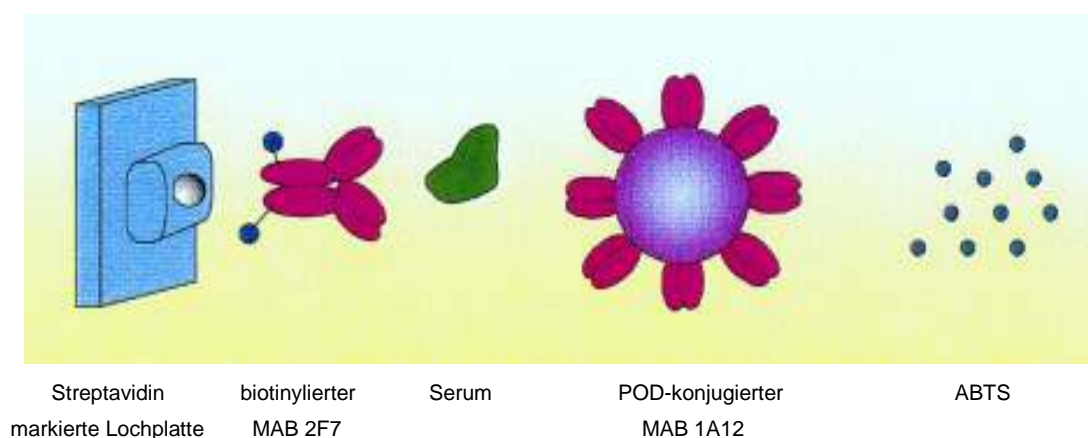


Abbildung 3: Schematische Darstellung des MIA-ELISA

3.2. Patienten

Von September 1997 bis Juni 2003 wurden insgesamt 1361 Serumproben von 120 Patienten mit malignem Melanom, darunter 50 Frauen und 70 Männer im Alter von 23-88 Jahren (Mittelwert 56 Jahre \pm 16,1), untersucht. Die Patienten wurden über einen Zeitraum von 2- 66 Monaten beobachtet (im Mittel 28,6 Monate; \pm 17,7).

Die Diagnose eines malignen Melanoms wurde jeweils mittels histologischer Untersuchung bestätigt. Dabei wurde die Tumoreindringtiefe nach Breslow und / oder der Invasionslevel nach Clark bestimmt (Breslow *et al.*1970, Clark *et al.*1969). Die Verteilung der klinisch-histologischen Typen in unserem Patientenkollektiv ist in Abbildung 4 zusammengefasst.

Tabelle 4: Anzahl (n) klinisch-histologischer Typen

	SSM	NMM	ALM	LMM	Unbekannter Primärtumor	Nicht klassifiziert
n	21	52	6	3	16	22

Die Stadieneinteilung erfolgte retrospektiv nach den Kriterien des American Joint Committee on Cancer von 2001 (Balch *et al.* 2001a). Dabei erfolgte die Einstufung immer in die prognostisch ungünstigste Gruppe (z.B. lokoregionäre Lymphknoten- und Organfiliae in Stadium IV)

Bei Erstvorstellung befanden sich 5 Patienten im Stadium IA, jeweils 6 im Stadium IB bzw. IIA, 5 weitere im Stadium IIB, 21 im Stadium IIIA, 46 im Stadium IIIB, 5 im Stadium IIIC und 26 im Stadium IV (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: Verteilung der eingeschlossenen Patienten mit malignem Melanom gemäß der AJCC-Stadien 2001 bei Erstvorstellung

Stadium	IA	IB	IIA	IIB	IIIA	IIIB	IIIC	IV
Anzahl	5	6	6	5	21	46	5	26

Von den eingeschlossenen Patienten wurden in der Regel mindestens drei MIA-Werte zu unterschiedlichen Zeitpunkten bestimmt. Lediglich zwei Patienten flossen mit nur zwei verschiedenen Serumwerten in die Bewertung ein. Patienten, von denen im Beobachtungszeitraum nur Einzelwerte vorlagen, wurden nicht berücksichtigt. Ebenso wurden Patienten mit Zweitumoren im Vorfeld aus der Bewertung eliminiert. Die Probenentnahme erfolgte im Rahmen der regelmäßigen Tumornachsorge bzw. vor, während und nach Therapie.

Die Ergebnisse der MIA-Serumwerte wurden durch eine individuell angepasste Diagnostik bestehend aus körperlicher Untersuchung, Bestimmung von Routinelaborparametern (Serumchemie und Blutbild), Lymphknoten- und Abdomen-Sonographie sowie Röntgen-Thorax auf ihre Richtigkeit überprüft. Hinzu kamen je nach Tumorstadium und aktuellem Verlauf computertomographische, magnetresonanz-tomographische und positronen-emissions-tomographische Untersuchungen.

Zur Bestimmung des oberen Normwertes (cut-off) wurden zusätzlich 100 Serumproben gesunder Probanden untersucht.

3.3. Bestimmung von Sensitivität und Spezifität

Sensitivität und Spezifität sind Gütekriterien diagnostischer Tests. Dabei bezeichnet man als 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 im Test durch ein korrekt negatives Ergebnis angezeigt wird.

Bei der Berechnung der Sensitivität bei Patienten im Stadium III oder IV mit aktueller Tumorlast als auch bei der Bestimmung der Spezifität wurde zur Vermeidung von Doppelbestimmungen jeweils nur der letzte gemessene Wert des aktuellen Tumorstadiums in die statistische Auswertung eingeschlossen. Allerdings wurden Veränderungen in der Tumorlast (z.B. nach Tumorfreiheit neu aufgetretene Metastasen oder Tumorfreiheit nach Therapie) jeweils neu beurteilt. So kamen manche Patienten im Verlauf ihrer Erkrankung mehrfach, in zum Teil unterschiedlichen Stadien, zur Beurteilung. Insgesamt wurden nur die Werte berücksichtigt, bei denen ein zeitlicher Bezug zu einer apparativen Diagnostik bzw. chirurgischen Intervention gewährleistet war und / oder der Wert retrospektiv durch Untersuchungen sicher als richtig- oder falsch-positiv bzw. -negativ eingestuft werden konnte. Insgesamt flossen so 216 Werte (143 Stadium III, 73 Stadium IV) in die Berechnung ein.

Die Bestimmung erfolgte 1. im Gesamtkollektiv, 2. bei Patienten im Stadium III sowie IIIA / B und C und 3. bei Patienten im Stadium IV.

3.4. MIA-Serumwerte in verschiedenen Patientenkollektiven

Es wurden 3 verschiedene Patientenkollektive definiert:

- Gruppe 1: Patienten mit malignem Melanom und aktuellen Metastasen entsprechend dem Stadium III
- Gruppe 2: Patienten mit malignem Melanom und aktuellen Metastasen entsprechend dem Stadium IV
- Gruppe 3: Patienten mit malignem Melanom im Stadium III oder IV ohne nachweisbare Tumorlast.

In diesen Gruppen wurden das 1.-3. Quartil entsprechend der 25%-Perzentile, dem Median und der 75%-Perzentile, sowie der Minimal-, Mittel- und Maximalwert anhand aller der entsprechenden Gruppe sicher zuordbaren MIA-Serumwerte bestimmt. Dies waren im ersten Kollektiv 226, im zweiten Kollektiv 93 und im dritten Kollektiv 724 MIA-Serumwerte. Zur Überprüfung der Gruppenunterschiede in den verschiedenen Patientenkollektiven wurde unter Vorschaltung des Kruskal-Wallis-Tests der Mann-Whitney-U-Test verwendet.

3.5. MIA-Serumwerte vor und nach Metastasenreduktion

Zur Beurteilung, inwieweit MIA mit der Tumorlast, korreliert wurden in 29 Fällen vor und nach tumorreduzierender Therapie wie Chirurgie, Radiochirurgie bzw. in einem Fall Chemoembolisation von Metastasen (davon 9 Fernmetastasen und 20 lokoregionäre Metastasen) die MIA-Serumwerte bestimmt. Eine Reduktion des MIA-Wertes nach Therapie um $\geq 10\%$ des Ausgangswertes wurde als signifikant definiert. Anschließend wurde unter spezieller Berücksichtigung vier verschiedener Gruppen

- Gesamtkollektiv
- MIA vor Therapie $\geq 9,8\text{ng/ml}$
- Lokoregionäre Metastasen entsprechend Stadium III
- Fernmetastasen entsprechend Stadium IV

beurteilt, wie oft durch Therapie ein signifikanter Abfall der MIA-Serumwerte zu verzeichnen war. Ergänzend erfolgte eine Berechnung der jeweiligen Gruppenunterschiede vor und nach Metastasenreduktion mittels des Wilcoxon-Tests für zwei verbundene Stichproben.

3.6. Korrelation der MIA-Serumwerte mit dem Krankheitsverlauf unter Therapie

Um die Bedeutung von MIA zur Verlaufskontrolle der Erkrankung unter Therapie zu ermitteln, erfolgten bei 25 Patienten (initial 6 x Stadium III, 19 x Stadium IV) mehrfache Bestimmungen der MIA-Serumwerte unter Chemo- bzw. Chemoimmuntherapie. Die Ergebnisse wurden durch eine individuell angepasste bildgebende Diagnostik kontrolliert und die Korrelation der MIA-Serumwerte mit dem Krankheitsverlauf ermittelt. Eine Reduktion der Tumormasse wurde als Ansprechen der Therapie definiert. Eine Größenzunahme des Tumors bzw. der Metastasen wurde hingegen als Therapieversagen gewertet.

3.7. Prognostische Wertigkeit von MIA im Rahmen der Tumornachsorge

Im Untersuchungszeitraum traten im Rahmen der regelmäßigen Tumornachsorge in 36 Fällen neue Fernmetastasen auf. Retrospektiv wurde für diese Fälle der zeitliche Verlauf zwischen einer Erhöhung der MIA-Serumwerte und der Detektion der Metastasen ermittelt. Dabei ließen sich vier Gruppen unterscheiden:

Gruppe 1: MIA-Erhöhung als diagnostisch wegweisender Parameter.
Die daraufhin initiierte apparative Diagnostik konnte den Verdacht einer Metastasierung bestätigen.

Gruppe 2: Erhöhung der MIA-Werte ging der Detektion von Metastasen zeitlich voraus. Dabei wurden die Fälle, in denen unmittelbar zum Zeitpunkt der MIA-Erhöhung kein Staging erfolgte auch keine potentiell prognostische Wertigkeit von MIA angenommen. Diese Patienten wurden der ersten Gruppe zugeordnet.

Gruppe 3: MIA-Anstieg erst nach Detektion der Filiae.

Gruppe 4: Kein MIA-Anstieg obwohl Metastasen aufgetreten waren.

3.8. Statistische Methoden

Die den Berechnungen zugrunde liegenden statistischen Testverfahren sind unter den jeweiligen Überschriften erwähnt.

Die ermittelten statistischen Signifikanzen wurden durch p-Werte gekennzeichnet. Das „p“ steht dabei für „probability“ (deutsch: Wahrscheinlichkeit). Der p-Wert bezieht sich auf die zunächst als wahr angenommene Nullhypothese (z.B. „kein Zusammenhang“ oder „kein Unterschied“). Geringe p-Werte führen zur Ablehnung der Nullhypothese und machen Alternativen („signifikanter Zusammenhang“, „signifikanter Unterschied“) plausibel. Die Signifikanzgrenze wurde auf $p < 0,05$ festgelegt. Für die p-Werte gelten folgende Signifikanzunterschiede

$p > 0,05$ = nichtsignifikanter Unterschied= n.s.

$p < 0,05$ = signifikanter Unterschied= *

$p < 0,01$ = hochsignifikanter Unterschied= **

$p < 0,001$ = hochsignifikanter Unterschied= ***

Zur Aufarbeitung und Berechnung der Daten wurden Microsoft Excel® Version 10.0.3506.0 bzw. SPSS® Base verwendet.

4. Ergebnisse

4.1. Verteilung der MIA-Serumwerte in einem gesunden Kontrollkollektiv

Zur Bestimmung des oberen Normwertes (cut-off) wurden 100 Seren von gesunden Kontrollpersonen untersucht. In diesem Kollektiv verteilen sich die Serumwerte zwischen 1,2 und 12,3 ng/ml entsprechend einer Gaußschen Normalverteilung (Abb. 4). Der Mittelwert lag bei 6,56 ng/ml bei einer Standardabweichung von $\pm 1,43$. Die 97. Perzentile wurde bei 9,8 ng/ml ermittelt und dieser Werte als oberer Normwert (cut-off) definiert.

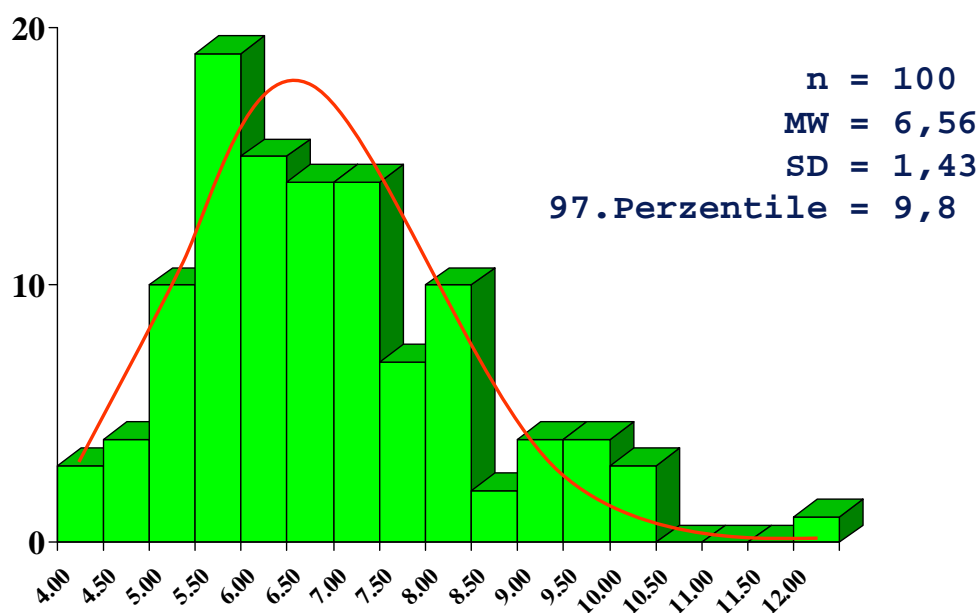


Abbildung 4: MIA-Serumwerte (ng/ml) bei gesunden Kontrollpersonen

4.2. Sensitivität und Spezifität von MIA als Serummarker bei malignem Melanom

In der Gruppe aller Patienten mit malignem Melanom im Stadium III und IV (gesamt) fand sich eine Sensitivität von 46,84% (59 von 126 Werten richtig positiv) bei einer Spezifität von 98,9% (89 von 90 Werten richtig negativ) (Tabelle 6).

Im Stadium III lag die Sensitivität bei 18,84% (13 von 69 Werten richtig positiv). Unter Berücksichtigung der einzelnen Untergruppen fanden sich für die Stadien IIIA, IIIB und IIIC Sensitivitäten von 0% (keiner von 14 Werten richtig positiv), 24,24% (8 von 33 Werten richtig positiv) und 22,73% (5 von 22 Werten richtig pos).

Mit 80,7% (57 Werte davon 46 richtig positiv) deutlich höher lag die Sensitivität in der Gruppe der Patienten mit Fernmetastasen entsprechend dem Stadium IV.

Die Spezifität wies im Gegensatz dazu keine wesentlichen Unterschiede in den einzelnen Gruppen auf. Sie lag insgesamt im Stadium III bei 98,65% (73 von 74 Werten richtig negativ), im Stadium IIIA bei 100% (20 Werte), im Stadium IIIB bei 97,67% (42 von 43 Werten richtig negativ), im Stadium IIIC bei 100% (11 Werte) und im Stadium IV bei 100% (16 Werte).

Tabelle 6: Sensitivität und Spezifität von MIA im Serum von Melanompatienten

	Sensitivität	Spezifität
gesamt	46,84%	98,90%
Stadium III	18,84%	98,65%
Stadium IIIA	0%	100%
Stadium IIIB	24,24%	97,67%
Stadium IIIC	22,73%	100%
Stadium IV	80,70%	100%

4.3. Verteilung der MIA-Serumwerte in verschiedenen Patientenkollektiven

Für die drei definierten Gruppen verteilten sich die MIA-Serumwerte folgendermaßen (Abb. 5):

Gruppe 1

Bei Patienten mit malignem Melanom und aktuellen Metastasen entsprechend dem Stadium III A/B/C lag der Mittelwert bei 9,09 ng/ml, der Median bei 7,73 ng/ml (min. 2,48 ng/ml; max. 43,83 ng/ml) die 25. und 75. Perzentile fanden sich bei 6,56 ng/ml bzw. 9,01 ng/ml.

Gruppe 2

Bei Patienten mit malignem Melanom und aktuellen Metastasen entsprechend dem Stadium IV lag der Mittelwert bei 59,43 ng/ml (min. 3,02 ng/ml; max. 507 ng/ml), der Median bei 26,47 ng/ml. Die 25. und 75. Perzentile fanden sich in dieser Gruppe bei 9,96 ng/ml bzw. 62,41 ng/ml.

Gruppe 3

Bei Patienten mit malignem Melanom im Stadium III oder IV ohne nachweisbare Tumorlast schwankten die Werte zwischen 0,41 ng/ml und 10,77 ng/ml um einen Mittelwert von 6,61 ng/ml. Die 25. und 75. Perzentile lagen bei 5,58 ng/ml bzw. 7,65 ng/ml. Der Median lag in dieser Gruppe der zum Zeitpunkt der Messung tumorfreien Patienten bei 6,46 ng/ml.

Eine Prüfung der Gruppenunterschiede ergab einen signifikanten Unterschied sowohl zwischen den Patienten im Stadium IV mit aktueller Tumorlast und denen im Stadium III mit aktueller Tumorlast als auch zwischen den Patienten im Stadium IV mit aktueller Tumorlast zu den Patienten ohne aktuelle Metastasierung. Ebenso unterschieden sich die Gruppen der Patienten mit Metastasen entsprechend dem Stadium III und der ohne aktuell nachweisbaren Tumor signifikant voneinander.

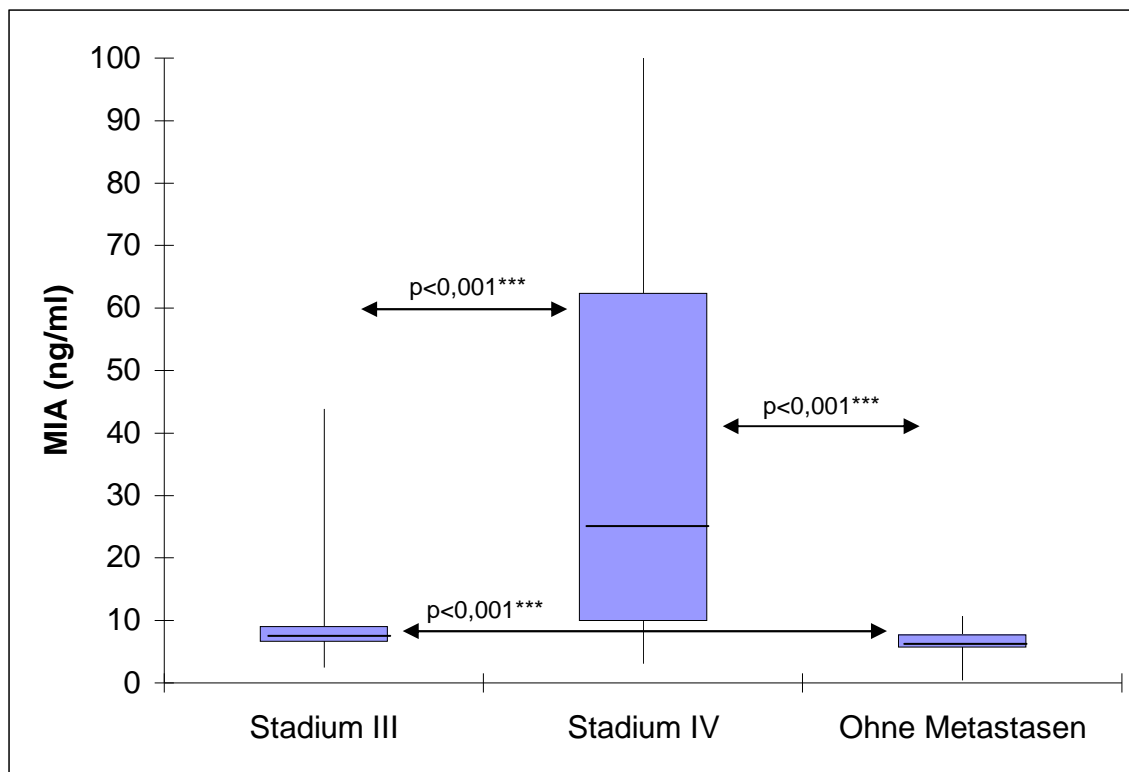


Abbildung 5: Verteilung der MIA-Serumwerte in unterschiedlichen Patientengruppen

4.4. MIA-Serumwerte vor und nach Metastasenreduktion

Zur Klärung der Frage, inwieweit MIA mit der Tumormasse korreliert, wurden bei insgesamt 29 neu aufgetretenen Metastasen unmittelbar vor und nach Chirurgie, Radiochirurgie bzw. in einem Fall Chemoembolisation MIA-Serumwerte bestimmt (Tab. 7).

Gesamtkollektiv

Bei 21 von 29 Patienten (72,41%) zeigte sich ein als signifikant eingestuftes Absinken um mehr als 10% des Ausgangswertes nach Therapie, unabhängig davon, ob vor Therapie der MIA-Wert erhöht war oder im Normbereich lag.

MIA-Serumwerten $\geq 9,8$ ng/ml

In der Gruppe der Patienten mit erhöhten Serumwerten vor Therapie zeigten 86,67% (13 von 15) einen signifikanten Abfall.

Patienten im Stadium IV

Im Stadium IV zeigte sich die größte Korrelation. Bei 89% (8 von 9) der Patienten kam es nach Therapie zu einem signifikanten Abfall der MIA-Serumwerte. Interessanterweise führte die Reduktion der Tumormasse auch bei 75% derjenigen Patienten zu einem Abfall, die vor Therapie keine erhöhten MIA-Werte aufwiesen.

Patienten im Stadium III

Hier zeigte sich lediglich in 65% (13 von 20) der Fälle ein relevanter Abfall der MIA-Werte nach Tumorreduktion. Dies war auch bei 50% derjenigen Patienten ohne vorherigen Anstieg der MIA-Werte oberhalb der 97% Perzentile zu beobachten.

Ein Vergleich der jeweiligen Gruppen vor und nach Tumorreduktion zeigte in allen Fällen einen signifikanten Unterschied (Abb. 6, Tab.7).

Tabelle 7: MIA- Serumwerte vor / nach Therapie

Patienten	MIA-Rückgang (>10%)	Median (max /min)		p-Wert
		vor→	Chirurgie→ nach	
Gesamt (n= 29)	72,4% (n=21)	10,17 (45,27- 3,96)	6,78 (15,12- 2,48)	p<0,001***
MIA >9,8 ng/ml (n= 15)	86,7% (n=13)	12,2 (45,27- 10,17)	8,98 (15,12- 4,52)	p<0,001***
Stadium IV (n= 9)	89% (n= 8)	10,64 (45,27- 7,47)	6,4 (12,11- 4,85)	p<0,01**
Stadium III (n= 20)	65% (n=13)	9,69 (41,49- 3,9)	7,11 (15,12- 2,48)	p<0,001***

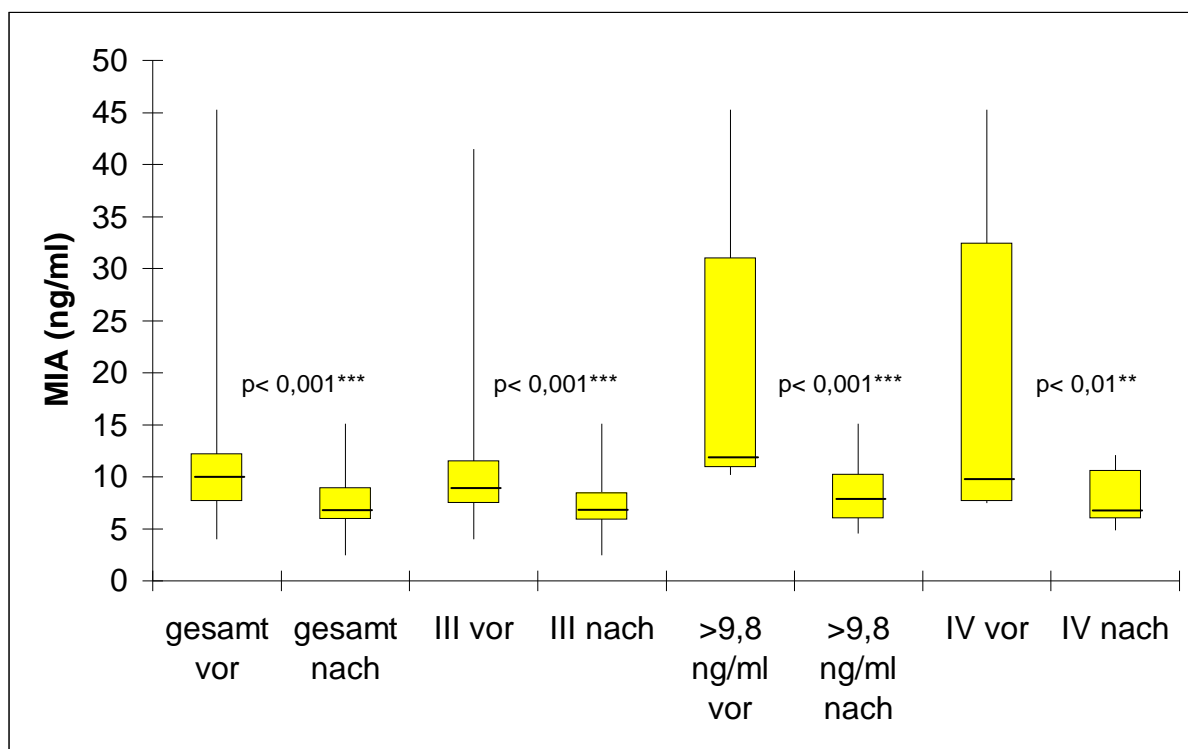


Abbildung 6: Veränderung der MIA-Serumwerte in unterschiedlichen Patientenkollektiven durch Reduktion der Tumormasse

4.5. Korrelation der MIA-Serumwerte mit dem Krankheitsverlauf unter Therapie

Bei 25 Patienten (initial 6 x Stadium III, 19 x Stadium IV) wurden die MIA-Serumwerte im Verlauf unter Chemo- bzw. Chemoimmuntherapie wiederholt bestimmt. Zusätzlich erfolgte eine Therapiekontrolle mittels individuell angepasster, apparativer Diagnostik.

Dabei zeigte sich bei 20 Patienten eine Korrelation der MIA-Serumwerte mit dem klinischen Verlauf der Erkrankung. Exemplarisch sind in Abbildung 7-10 Verlaufskurven von vier Patienten dargestellt. Lediglich bei drei Patienten fand sich kein Anhalt für einen Zusammenhang zwischen dem Verlauf der MIA-Werte und dem Krankheitsverlauf. Einer dieser Patienten blieb trotz ausgedehnter systemischer Metastasierung im gesamten Verlauf MIA-negativ. Bei einem Weiteren zeigten sich konstant hohe Werte, zu einem Zeitpunkt als mittels bildgebender Diagnostik keine metastasenverdächtigen Strukturen mehr nachweisbar waren. Bei der dritten Patientin ließ sich über den gesamten Beobachtungszeitraum anhand der MIA-Werte keine zeitig eindeutige Aussage über den Krankheitsverlauf treffen.

Bei zwei weiteren Patienten war ein Zusammenhang von MIA-Werten und Klinik zunächst gegeben, verlor sich dann allerdings im weiteren Verlauf der Therapie. Einen Kurvenverlauf zeigt exemplarisch Abb. 11. Dabei war in beiden Fällen eine weitere Progression der Erkrankung nicht mehr mit weiter steigenden MIA-Werten assoziiert.

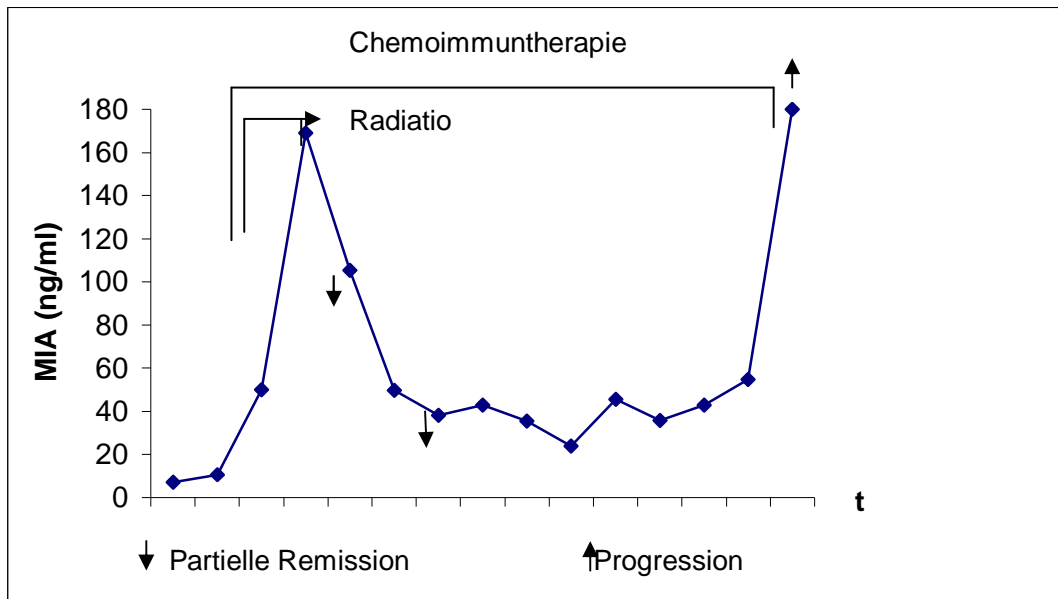


Abbildung 7: P1 weiblich, 31 Jahre

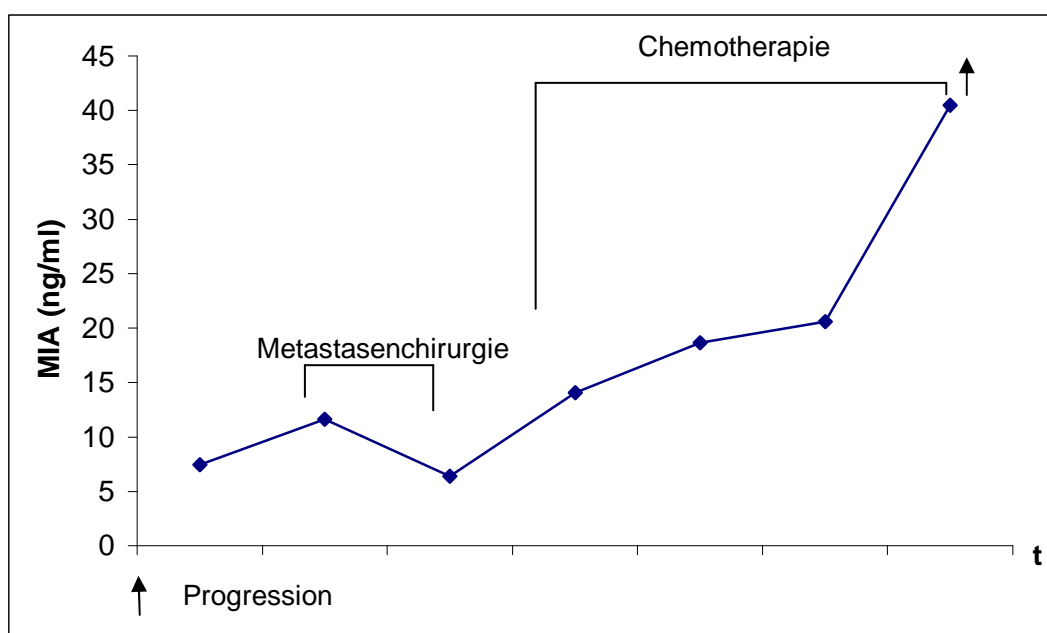


Abbildung 8: P2 männlich, 58 Jahre

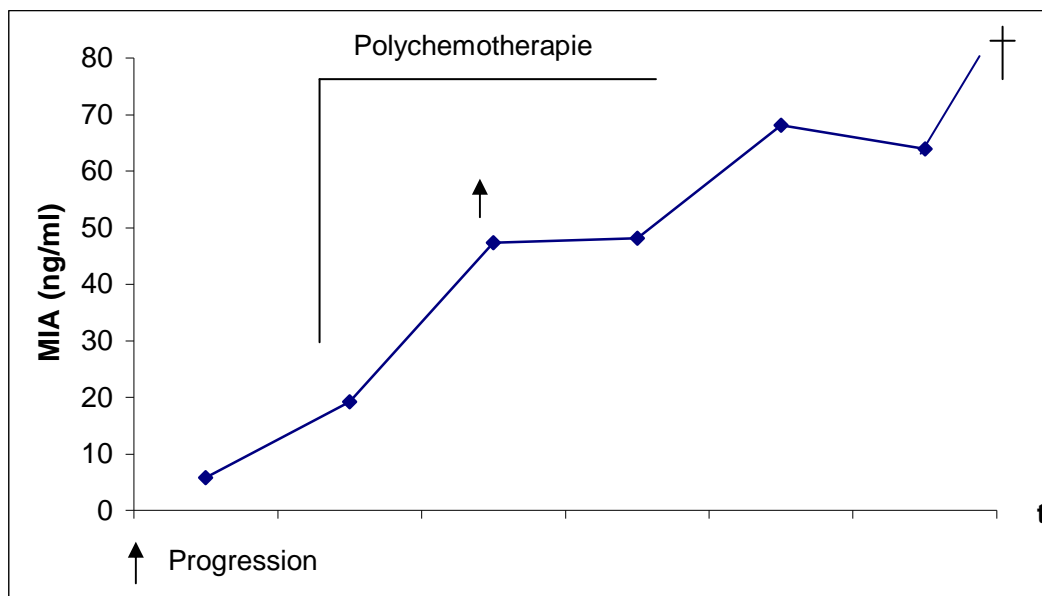


Abbildung 9: P3 weiblich, 71 Jahre

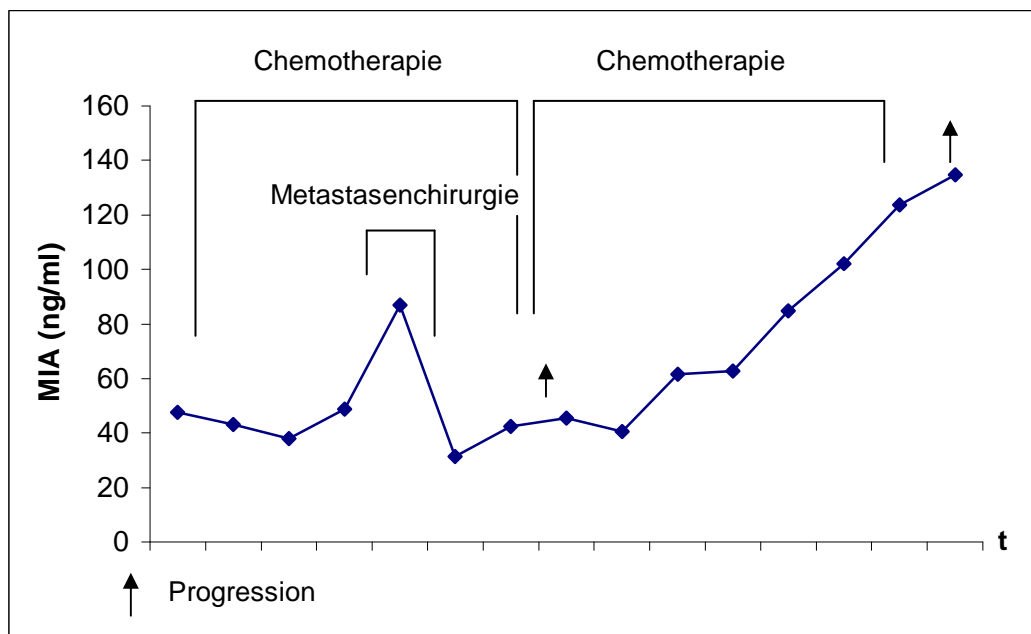


Abbildung 10: P4 weiblich, 45 Jahre

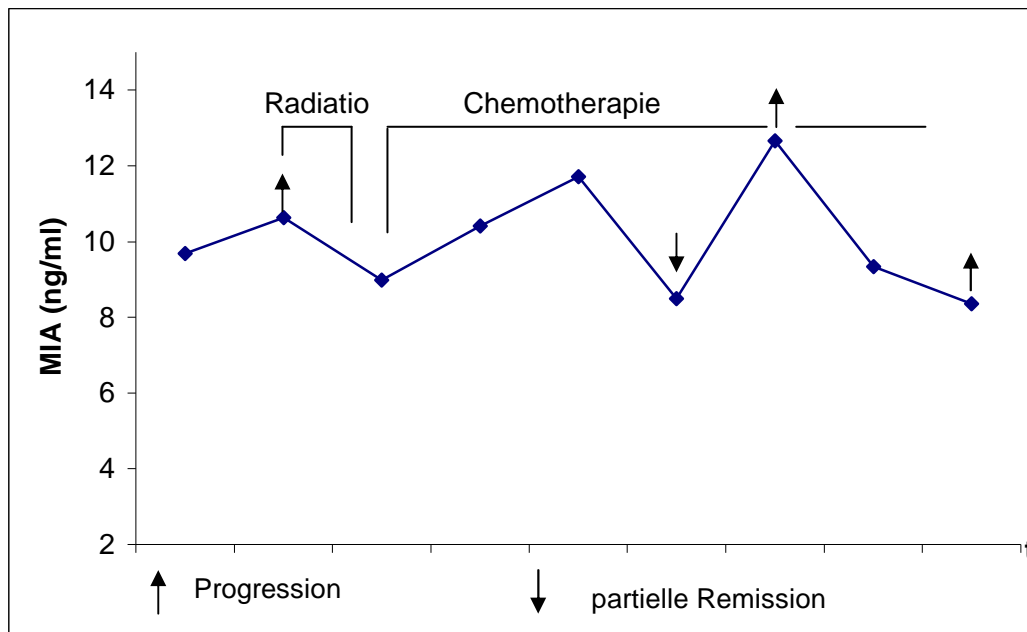


Abbildung 11: P5 männlich, 81 Jahre

4.6. Prognostische Wertigkeit von MIA im Rahmen der Tumornachsorge

In 36 Fällen traten im Rahmen der routinemäßigen Tumornachsorge Fernmetastasen auf. Davon waren 77,8% (entsprechend $n = 28$) MIA positiv. Allerdings ließ sich ein Anstieg der MIA-Werte über den oberen Normwert in 5 Fällen (13,9%) erst nach Metastasendetektion nachweisen. In 16 Fällen (44,4%) war eine Erhöhung des MIA-Wertes diagnostisch wegweisend. In der daraufhin veranlassten apparativen Diagnostik konnte jeweils eine Metastasierung nachgewiesen werden. Bei 7 Patienten (19,4%) konnte eine Progression erst 1,5-10 Monate (MW 4,6; Median 4) bzw. 10-43 Wochen (MW 20,9; Median 19) nach MIA-Anstieg bestätigt werden. Insgesamt konnten durch einen erhöhten MIA-Serumwert in 63,9% (23 von 36) Metastasen diagnostiziert werden.

5. Diskussion

Die Inzidenz des malignen Melanoms ist in den letzten Jahrzehnten weltweit angestiegen. So hat sich in Westdeutschland die Anzahl der Neuerkrankungen pro 100 000 Einwohner pro Jahr vom Beginn der 70er Jahre bis in die 90er Jahre von 3 auf 9-12 mehr als verdreifacht.

Durch diesen Anstieg werden immer höhere Patientenzahlen in den Tumorambulanzen betreut. Dies führt zunehmend zu logistischen und ökonomischen Problemen.

Gleichzeitig geraten die etablierten Nachsorgeschemata bezüglich ihres Nutzen in der frühzeitigen Detektion von Metastasen und der Verbesserung der Prognose des Patienten zunehmend in Kritik. Kontrollierte, randomisierte Studien zur Effektivität von Nachsorgeprogrammen im Sinne einer Verbesserung des Gesamtüberlebens fehlen. Gut belegt ist der Zusammenhang zwischen Ausmaß des metastatischen Befalls lokoregionärer Lymphknoten und der Verschlechterung der langfristigen Prognose der Patienten (Buzaid *et al.* 1995; Coit *et al.* 1991; Morton *et al.* 1991). Unklarer ist die prognostische Relevanz einer Früherkennung bei Fernmetastasen. Hier scheinen vor allem Patienten, bei denen eine komplette chirurgische Sanierung möglich ist, von der Früherkennung zu profitieren (Göhl *et al.* 1996; Overett und Shiu 1985).

Zusätzlich ist eine umfangreiche apparative Diagnostik nötig, um die Effektivität von Therapien im Verlauf zu kontrollieren. So ist es für den klinisch tätigen Arzt nach wie vor schwierig, den individuellen Nutzen einer Therapie abzuschätzen. Hier gilt es sowohl unwirksame, den Patienten belastende Therapien zu verhindern, als auch zumeist emotional und / oder körperlich belastende Untersuchungen zu minimieren.

Aus diesen Gründen wird seit Jahren versucht, einen Tumormarker für das maligne Melanom zu etablieren, der zusätzliche Informationen über den zu erwartenden Krankheitsverlauf im Rahmen von Nachsorgeprogrammen und unter Therapie liefert.

Als serologische Marker für das maligne Melanom kommen Moleküle in Frage, die von Tumorzellen selbst oder als Reaktion des Immunsystems synthetisiert werden und im Blut oder anderen Körperflüssigkeiten nachweisbar sind. Für den klinischen Alltag sollte ein kommerziell erhältliches, standardisiertes, einfaches und reproduzierbares Testsystem zur Verfügung stehen.

Melanoma-Inhibitory Activity (MIA) wurde frühzeitig als ein solcher möglicher Marker postuliert, da es bei allen untersuchten malignen Melanomen nachgewiesen werden konnte (Blesch *et al.* 1994, Bosserhoff *et al.* 1996).

In einer Pilotstudie wurde von Bosserhoff und Kollegen ein quantitativer ELISA, der mittlerweile kommerziell erhältlich ist, zur Bestimmung von MIA im Serum etabliert. In dieser ersten Studie ließen sich bei allen Melanompatienten im Stadium III und IV erhöhte MIA-Serumwerte nachweisen (Bosserhoff *et al.* 1997b).

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit sollte am Patientenkollektiv der Klinik und Poliklinik der Technischen Universität München der klinische Nutzen von MIA für die Tumornachsorge und als Therapieverlaufparameter bei metastasiertem Malignem Melanom untersucht werden.

In der Studie wurden 1361 Serumproben von 120 Patienten mit malignem Melanom beurteilt. Dabei zeigte sich, dass MIA

- als hochsensitiver Marker zur Detektion von Fernmetastasen anzusehen ist;
- zum Erfassen neu aufgetretener lokoregionärer Filiae wenig geeignet erscheint;
- als sinnvoller Parameter zur Verlaufskontrolle unter Therapie einsetzbar ist;
- möglicherweise ergänzende Informationen zur Beurteilung der Prognose beiträgt.

5.1. Validität von MIA-Serumwerten zur Detektion von lokoregionären- und Fernmetastasen

Zur Einschätzung des Nutzens eines Tumormarkers für den klinischen Alltag ist seine Fähigkeit, zwischen „Erkrankten“ (Patienten mit aktueller Tumorlast) und „Gesunden“ (Patienten ohne nachweisbare Tumormanifestation) unterscheiden zu können, von essentieller Bedeutung. Gütekriterien sind dabei Sensitivität, als Ausdruck der Fähigkeit richtig positive Ergebnisse zu liefern, als auch Spezifität, als Maß für den Anteil an richtig negativen Befunden.

Somit muss zunächst gewährleistet sein, dass der gewählte obere Normwert bei gesunden Probanden keine bzw. möglichst wenige falsch positive Ergebnisse liefert. Bei Werten, die sich wie MIA in einem gesunden Kontrollkollektiv nach der Gaußschen-Normalverteilung richten, hat sich in vielen Studien die Bestimmung der 97. Perzentile als oberer Normwert

bewährt. In unserer Kontrollgruppe konnte als 97. Perzentile ein Wert von 9,8 µg/ml definiert werden.

Unter Verwendung dieses Grenzwertes zeigten sich in der vorliegenden Untersuchung bei Patienten im Stadium IV in 46 von 57 Fällen positive MIA-Serumwerte über 9,8 ng/ml. Dies entspricht einer Sensitivität von 80,7%.

Dieser Wert ist mit den in anderen Studien für das Stadium IV errechneten Sensitivitäten gut in Einklang zu bringen. Hier fanden sich mit Sensitivitäten zwischen 65 und 100% im Stadium IV ähnliche Ergebnisse (Bosserhoff *et al.* 2000 und 1997b; Dreau *et al.* 1999; Guba *et al.* 2002; Juergensen *et al.* 2001, Schmitz *et al.* 2000, Stahlecker *et al.* 2000).

Zur weiteren Einschätzung der Aussagekraft von MIA untersuchten wir die Verteilung der Serumwerte unter Berücksichtigung der einzelnen Tumorstadien. Dabei wurden die unterschiedlichen Gruppen miteinander verglichen. Hier zeigten sich bei den Patienten im Stadium IV mit aktueller Tumorlast signifikant höhere Werte (Median 26,47 ng/ml) sowohl gegenüber den aktuell im Stadium III befindlichen Patienten (Median 7,73 ng/ml) als auch im Vergleich zu einem zum Untersuchungszeitpunkt tumorfreien Patientenkollektiv (Median 6,46 ng/ml).

Insgesamt konnte MIA in unserem Kollektiv damit erneut als zuverlässiger Marker einer Fernmetastasierung bestätigt werden. Dabei liegen die zu erwartenden Werte bei Patienten mit aktuellen Fernmetastasen meist deutlich über dem festgelegten oberen Normwert (25. Perzentile 9,96 ng/ml, 50. Perzentile 26,47 ng/ml, 75. Perzentile 62,41 ng/ml).

Demgegenüber fand sich im Stadium III nur in 13 von 69 Fällen eine MIA-Erhöhung. Daraus ergibt sich eine Sensitivität von 18,84%. Dieser Wert liegt deutlich unter den in der Literatur publizierten Daten. Hier wurden bei Patienten mit lokoregionärer Metastasierung Sensitivitäten zwischen 46 und 100% gefunden (Bosserhoff *et al.* 2000 und 1997b, Dreau *et al.* 1999, Guba *et al.* 2002; Juergensen *et al.* 2001, Schmitz *et al.* 2000). Unterteilt man das Stadium III weiter in seine Untergruppen (A, B und C), fällt eine Sensitivität von 0% in der Gruppe von Patienten, bei denen lediglich eine Mikrometastasierung im regionären Lymphabflussgebiet (Mikrometastasen im Sentinellymphknoten) entsprechend dem Stadium IIIA vorlag, auf. Aber auch bei Patienten mit klinisch manifesten lokoregionären Metastasen im Stadium IIIB und IIIC zeigte sich mit 24,24% bzw. 22,73% im Vergleich zu den anderen Studien eine niedrigere Sensitivität. Aufgrund unterschiedlicher oberer Normwerte sind die Ergebnisse allerdings nicht voll vergleichbar.

In der vorliegenden Untersuchung wurde bei neu aufgetretenen Metastasen zudem strikt nur ein Wert eingeschlossen. Mehrfachbestimmungen in anderen Arbeitsgruppen, könnten zu einer Verschiebung der Ergebnisse geführt haben. Leider lässt sich hierüber anhand der vorliegenden Publikationen zumeist keine Aussage treffen.

Vergleicht man die Patienten im Stadium III mit aktueller Tumorlast mit der Gruppe klinisch tumorfreier Patienten, findet sich rein rechnerisch unter Verwendung des Mann-Whitney-U-Tests ein signifikanter Unterschied. Es ist jedoch fraglich, ob dieser von klinischer Relevanz ist. Es fällt auf, dass bei einzelnen Patienten des Stadium III zum Teil hohe, mit dem Stadium IV vergleichbare Werte, von bis zu 43,83 ng/ml vorliegen, die zumeist eine ausgedehnte lokoregionäre Metastasierung widerspiegeln. Die 75. Perzentile liegt mit 9,01 ng/ml hingegen noch unterhalb des oberen Normwertes. Trotz der statistischen Signifikanz liegen die Mediane der beiden Gruppen mit 7,73 ng/ml für das Stadium III bzw. 6,46 ng/ml für tumorfreie Patienten im Stadium III oder IV relativ nah beieinander und zudem deutlich unter dem oberen Normwert von 9,8 ng/ml. In diesem Bereich sind Schwankungen im klinischen Alltag nur eingeschränkt beurteilbar.

Aufgrund dieser Ergebnisse scheint MIA daher insgesamt zur frühzeitigen Detektion von lokoregionären Haut- und Lymphknotenmetastasen entsprechend dem Stadium III wenig geeignet. Hier hat sich in den letzten Jahren die Lymphknotensonographie als sensitive Methode im Rahmen der Tumornachsorge bewährt (Korting und Sterry 1997). Sie sollte unseres Erachtens in dieser Indikation weiter als Standard angesehen werden.

Die Spezifität lag in den unterschiedlichen Gruppen zwischen 97,67% und 100%. Dadurch wird die auch in anderen Studien dokumentierte hohe Spezifität von MIA erneut unterstrichen (Bosserhoff *et al.* 1997b, Djukanovic *et al.* 2000). Wagner *et al.* fanden erhöhte Serumwerte bei Patienten in fortgeschrittenen Stadien von Gastrointestinalen Karzinomen (Wagner *et al.* 2000). In einer großen Studie mit 270 Serumproben von Patienten mit fortgeschrittenen (Stadium III und IV) epithelialen und mesenchymalen Tumoren sowie Gliomen waren jedoch nur in einem geringen Anteil (0-17%) positive MIA-Serumwerte messbar (Bosserhoff *et al.* 1997b), so dass zum jetzigen Zeitpunkt von einer sehr hohen Spezifität von MIA für das maligne Melanom ausgegangen werden muss.

Aufgrund seiner Expression in Knorpelzellen (Bosserhoff *et al.* 1997a, Dietz *et al.* 1996) muss bei einer Erhöhung der MIA-Serumwerte, die nicht durch ein tumoröses Geschehen erklärbar ist, differentialdiagnostisch zusätzlich an Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises, die mit Gelenkdestruktionen einhergehen, gedacht werden (Müller-Ladner *et al.* 1999).

5.2. MIA als Kontrollparameter unter Therapie

Als wichtige Voraussetzung für den Einsatz eines Tumormarker als Verlaufsparemeter unter Therapie gilt die Korrelation mit der Tumormasse. Nur wenn diese gewährleistet ist, lässt sich aus den Serumwerten eine Aussage über Erfolg oder Misserfolg einer Behandlung treffen. Ein Spiegelabfall sollte mit einer partiellen oder vollständigen Remission einhergehen, bei Spiegelanstieg wäre von einer Progression auszugehen und stabile Werte würden eine konstante Tumormasse widerspiegeln.

In der Literatur finden sich mehrere Berichte über eine Korrelation von MIA mit der Tumormasse. Wiederholt konnte ein Abfall der Serumwerte infolge chirurgischer Therapie nachgewiesen werden (Bosserhoff *et al.* 1997b und 2000, Guba *et al.* 2002, Juergensen *et al.* 2000, Stahlecker *et al.* 2000). Dies bestätigt sich auch in unserer Untersuchung und gilt im Besonderen für Patienten mit positiven MIA-Serumwerten vor Therapie als auch für Patienten im Stadium IV. Hier zeigte sich in 86,7% bzw. 89% der Fälle ein als signifikant definierter Rückgang der Serumwerte um mehr als 10% nach Therapie. In der Gruppe der Patienten im Stadium III war dies immerhin in 65% der Fälle gegeben.

Auch bei MIA-Serumwerten $< 9,8 \mu\text{g/ml}$ können Reduktionen der Tumormasse Änderungen von mehr als 10% nach sich ziehen. Dies gilt vor allem bei Resektion von Fernmetastasen, wo dieses Phänomen in 75% der Fälle zu beobachten war. In allen untersuchten Kollektiven unterschieden sich die Werte vor und nach Metastasenreduktion signifikanter voneinander. Insgesamt zeigt sich somit eine enge Korrelation von MIA mit der Tumormasse, allerdings sind Schwankungen der Serumwerte unterhalb des cut-offs nur eingeschränkt beurteilbar.

Legt man die Korrelation eines Tumormarkers mit der Tumormasse zu Grunde, sollte sich der Erkrankungsverlauf unter systemischer Therapie gut anhand seiner Serumwerte verfolgen lassen.

Von den 25 Patienten, bei denen MIA-Serumwerte wiederholt unter Chemoimmuntherapie bestimmt wurden, fand sich bei 20 Patienten eine enge Korrelation des Krankheitsgeschehens mit dem Verlauf der MIA-Serumwerte. Bei zwei Patienten war diese Korrelation zunächst gegeben, verlor sich dann aber im Lauf der Behandlung. Eine Erklärung für dieses Phänomen gibt es zum jetzigen Zeitpunkt nicht. Möglicherweise führen durch die Therapie induzierte Alterationen der Melanomzellen zu diesen divergierenden Ergebnissen.

Ein weiterer Patient präsentierte persistierend hohe MIA-Serumwerte, obwohl mittels bildgebender Verfahren keine Metastasen nachweisbar waren. Letztlich ist aufgrund eines

relativ kurzen Nachbeobachtungszeitraumes noch unklar, ob es sich hierbei um falsch positive Werte oder eine klinisch noch inapparente Metastasierung handelt. Solche Patienten sollten aufgrund der oben erwähnten hohen Spezifität von MIA engmaschig kontrolliert werden.

Auch in anderen Studien wurde wiederholt auf den engen Zusammenhang von MIA mit dem Krankheitsverlauf hingewiesen (Bosserhoff *et al.* 1997b und 2000, Deichmann *et al.* 2001, Dreau *et al.* 1999, Juergensen *et al.* 2001, Stahlecker *et al.* 2000). In einer Studie von Meral *et al.* war das Gesamtüberleben bei Patienten, deren MIA-Werte unter Therapie absanken, größer als bei denen mit gleich bleibenden oder steigenden MIA-Werten unter Therapie (Meral *et al.* 2001).

Somit erscheint MIA zum jetzigen Zeitpunkt als ein in den meisten Fällen für das Therapiemonitoring geeigneter Parameter, dessen Einsatz helfen könnte, nichtwirksame Behandlungen wie z.B. Chemotherapien frühzeitig zu erkennen und daraus entstehende Nachteile für den Patienten (unnötige Nebenwirkungen, nichterkannte Progression der Erkrankung) zu verhindern.

5.3. MIA als möglicher prognostischer Faktor

Zur Einschätzung des individuellen Risikos einer Progression der Krebserkrankung sollte ein Tumormarker Patienten mit einem größeren Risiko unabhängig von anderen klinischen Parametern identifizieren und somit dem Arzt die Möglichkeit geben, diese Patienten in intensiverer Weise in Nachsorgeprogramme zu integrieren oder aggressiveren Therapieformen zuzuführen.

Während in der oben erwähnten Studie von Meral *et al.* ein Absinken der MIA-Serumwerte unter Therapie als positives prognostisches Zeichen für das Gesamtüberleben bei diesen Patienten gezeigt worden war (Meral *et al.* 2001), hatten andere Studien zum Ziel, den Einsatz von MIA als prognostischen Marker für das Auftreten von Metastasen zu untersuchen. Hierbei fanden sich erste Hinweise für eine mögliche prognostische Wertigkeit von MIA (Bosserhoff *et al.* 1997b, Stahlecker *et al.* 2000).

Von einer weiteren Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass im Rahmen der Tumornachsorge in 67,7% der Fälle Metastasen durch eine MIA-Erhöhung mindestens einen Monat früher als mit Hilfe der routinemäßigen Diagnostik gefunden werden können (Juergensen *et al.* 2001). In einer Studie von Matusushita *et al.* fanden sich bei 7 Patienten

erhöhte MIA-Serumwerte 4-53 Monate vor der klinischen Detektion der Filiae (Matusushita *et al.* 2002).

Auch in unserem Kollektiv konnten mittels apparativer Diagnostik in 7 Fällen zwischen 1,5-10 Monate (Median 4 Monate) nach Erhöhung der MIA-Serumwerte Metastasen gefunden werden. Daneben waren in weiteren 16 Fällen MIA-Serumwerte oberhalb des Normwertes diagnostisch wegweisend. Hier konnte die Progression in der unmittelbar anschließend erfolgten apparativen Diagnostik nachgewiesen werden.

Somit konnte eine neu aufgetretene Fernmetastasierung bei unseren Patienten in 63,9% aufgrund der MIA-Erhöhung diagnostiziert werden. Die klinische Bedeutung zeigt sich auch im Vergleich zur Positronen-Emissions-Tomographie (PET), die heute als sensitivste in-vivo Untersuchung gilt. Sie erreicht eine Sensitivität von insgesamt 74-100% bei einer Spezifität von 67-100% (Prichard *et al.* 2002).

Von Garbe *et al.* wurde zuletzt in einer großen Studie an 296 Melanompatienten gezeigt, dass bei Patienten mit erhöhten MIA-Serumwerten das rezidivfreie Überleben signifikant gegenüber denjenigen mit normalen MIA-Werten verkürzt ist (Garbe *et al.* 2003a).

Ergänzend fand sich in einer Studie von Guba *et al.* ein signifikant schlechteres Überleben bei Patienten mit präoperativ erhöhten MIA-Serumwerten im Stadium III im Vergleich zu denjenigen, die vor der Resektion von lokoregionären Metastasen MIA-Serumwerte unterhalb des Normwertes zeigten. Interessanterweise verliefen in der gleichen Studie die Überlebenskurven der Patienten mit positiven präoperativen MIA-Serumwerten unabhängig vom Stadium der Erkrankung und die aller Patienten im Stadium IV nahezu parallel. Gleiches zeigte sich bei Patienten mit nicht erhöhten MIA-Serumwerten und dem Gesamtkollektiv der Patienten im Stadium III (Guba *et al.* 2002).

Bei einem unserer Patienten im Stadium III zeigte sich nach vollständiger Metastasen-Resektion eine nahezu konstante Erhöhung der Serumwerte. Im Verlauf kam es zu einer raschen Progression mit Übergang ins Stadium IV. Möglicherweise deuten erhöhte Werte im Stadium III auf eine klinisch bisher nicht nachweisbare, systemische Manifestation hin. Im Jahr 2000 konnte von der Arbeitsgruppe um Guba *et al.* gezeigt werden, dass Melanomzellen mit einer starken MIA-Expression einen Tumortyp mit gesteigertem Metastasierungspotential widerspiegeln (Guba *et al.* 2000). Daraus ließe sich schlussfolgern, dass erhöhte präoperative Werte im Stadium III eventuell einen solchen aggressiven Tumortyp reflektieren.

Insgesamt scheint MIA bei einem nicht unwesentlichen Anteil der Patienten in der Lage zu sein, die Entwicklung von Metastasen vor den vorhandenen, bildgebenden Verfahren zu erkennen. Dies gilt unter Berücksichtigung der geringen Sensitivität im Stadium III (s.o.) vor allem für Fernmetastasen.

Allerdings könnte die Höhe der MIA-Serumwerte auch im Stadium III zusätzliche Informationen für das Risikoprofil liefern. Damit hätte der Kliniker neben den etablierten Methoden ein weiteres Kriterium zur Hand, unterschiedliche Risikogruppen zu benennen und in seinem therapeutischen Vorgehen abzustimmen.

Patienten, bei denen im Laufe der Tumornachsorge erhöhte MIA-Serumwerte auffallen, sollten aufgrund der bisherigen Erkenntnisse in jedem Fall intensiveren Nachsorgeschemata zugeführt werden.

5.4. MIA im Vergleich mit anderen Tumormarkern

S100 ist momentan der am weitesten verbreitete und verwendete Tumormarker für das maligne Melanom. Zur Validierung von S100 existiert mittlerweile eine große Anzahl von Studien, wobei die Sensitivitäten mit 9-31% bzw. 40-79% (Bonfrer *et al.* 1998, Guo *et al.* 1995, Hauschild *et al.* 1999a, Henze *et al.* 1997, Schultz *et al.* 1998) für das Stadium III und IV im Vergleich zu den für MIA publizierten Daten etwas niedriger liegen. Die von uns für MIA erhobenen Werte von 18,84% im Stadium III sowie 80,70% im Stadium IV deuten auf vergleichbar gute Sensitivitäten beider Marker hin. Eine Pilotstudie zum Vergleich von MIA und S100 fand Sensitivitäten von je 100% im Stadium III und IV für MIA gegenüber 60 und 61% für S100 bei vergleichbarer Spezifität (Bossert *et al.* 1997b). Allerdings ließen sich diese hohen Werte für MIA in anderen Studien ebenso wie bei uns nicht wieder bestätigen. Andere Gruppen fanden auch im direkten Vergleich ähnliche Werte für beide Marker (Djukanovic *et al.* 2000, Juergensen *et al.* 2001, Schmitz *et al.* 2000).

Ähnlich wie für MIA konnte gezeigt werden, dass S-100B-Werte mit Tumorstadium, metastatischer Ausdehnung, Progression und Überleben korrelieren und sich somit zur Verlaufskontrolle im Rahmen der Tumornachsorge und unter Therapie eignen (Bonfrer *et al.* 1997, Bruer *et al.* 1997, Deichmann *et al.* 1999, Guo *et al.* 1995, Hauschild *et al.* 1999a/b/c, Henze *et al.* 1997, Kaskel *et al.* 1999, Milliot *et al.* 1996, Schoultz *et al.* 1996, Schultz *et al.* 1998).

LDH gilt aufgrund mehrerer Studien als ein unabhängiger prognostischer Faktor für Patienten im Stadium IV der Erkrankung (Deichmann *et al.* 1999, Eton *et al.* 1998, Franzke *et al.* 1998, Keilholz *et al.* 1996, Sirott *et al.* 1993) und findet aus diesem Grund auch in der Stadieneinteilung der AJCC von 2001 Berücksichtigung. Allerdings wird von den Autoren darauf hingewiesen, dass durch Mehrfachbestimmungen andere mögliche Ursachen einer LDH-Erhöhung wie z.B. Hämolyse der Blutprobe auszuschließen sind (Balch *et al.* 2001a).

Eine prognostische Wertigkeit konnte, wie bereits erwähnt, auch für S100 und MIA gezeigt werden (Buer *et al.* 1997, Guba *et al.* 2002, Hauschild *et al.* 1999a/b, Juergensen *et al.* 2000, Meral R *et al.* 2001). Dabei zeigte sich in der Untersuchung von Buer *et al.* LDH in einer Multiregressionsanalyse im Gegensatz zu S100 als unabhängiger prognostischer Faktor, bei Hauschild *et al.* fanden sich jedoch umgekehrte Verhältnisse (Buer *et al.* 1997, Hauschild *et al.* 1999b). Eine entsprechende Studie zu MIA existiert zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht.

In einer Studie von Garbe *et al.* zeigte sich eine deutlich höhere Sensitivität von S100 bzw. MIA (29% bzw. 22%) gegenüber LDH (2%) bei vergleichbar hohen Spezifitäten von 93%, 97% bzw. 90%. Ergänzend konnte für S100 und MIA gezeigt werden, dass bei erhöhten im Vergleich zu normalen Werten das rezidivfreie Überleben signifikant verkürzt ist. Für eine LDH-Erhöhung zeigte sich im Vergleich zu normalen Werten keine wesentliche Änderung in den Kaplan-Meier-Kurven (Garbe *et al.* 2003). Auch in einer weiteren Studie zeigte sich im Vergleich zu S-100B und MIA eine geringere Sensitivität von LDH bei neu aufgetretenen Metastasen im Stadium III und IV (86% und 80% vs. 48%) (Krähn *et al.* 2001). Insgesamt erscheint LDH als sinnvoller Parameter für Patienten mit manifesten Fernmetastasen. Zur Detektion von Metastasen im Rahmen von Nachsorgeprogrammen erscheint die Bestimmung anders als bei S100 und MIA jedoch wenig geeignet.

Auch andere Moleküle wurden auf ihre mögliche Relevanz als Tumormarker für das maligne Melanom untersucht, konnten sich aber aus unterschiedlichen Gründen bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht im klinischen Alltag durchsetzen.

Der Nachweis von Tyrosinase, eines Schlüsselenzyms der Melaninsynthese, mittels RT-PCR erbrachte stark schwankende Ergebnisse. Hier zeigten sich Sensitivitäten zwischen 13-100% (Battayani *et al.* 1995, Brossart *et al.* 1993 und 1995; Gläser *et al.* 1997, Kunter 1996, Mellado *et al.* 1996, Pittmann *et al.* 1996, Reinhold *et al.* 1997). Dies mag unter anderem an dem nicht genau standardisierten und z.B. durch Kontamination anfälligen Nachweisverfahren

liegen. Insgesamt scheint die Tyrosinase RT-PCR daher aus heutiger Sicht keinen verlässlichen Marker für das maligne Melanom darzustellen.

Für 5-S-Cysteinylidopa (5-S-CD) konnte in einigen Studien eine Korrelation mit dem Tumorstadium gezeigt werden. Außerdem wurde eine prognostische Relevanz i.S. einer nachweisbaren der Metastasierung vorausgehenden Erhöhung beschrieben (Hirai *et al.* 1997, Horokoshi *et al.* 1994, Peterson *et al.* 1988, Wimmer *et al.* 1997). Als Metabolit des Melaninstoffwechsels zeigten sich jedoch in der kaukasischen Bevölkerung zum Teil erhebliche Schwankungen in Abhängigkeit von der Jahreszeit und den unterschiedlichen ethnischen Gruppen, so dass sich die Frage nach einem sinnvollen, einheitlichen Grenzwert stellt. Ebenso scheint der Nachweis mittels High-Performance Liquid Chromatographie (HPLC) für die tägliche Routine als wenig geeignet (Hauschild *et al.* 2001). In einer vergleichenden Studie lag die Sensitivität von MIA zur Detektion von neu aufgetretenen Metastasen im Stadium III und IV mit 64% deutlich über der von 5-S-CD mit 21% (Matsushita *et al.* 2002)

Das in Neuronen und neuroendokrinen Zellen vorkommende Enzym Neuronen spezifische Enolase (NSE) ist als Tumormarker für das Neuroblastom und das kleinzellige Bronchialkarzinom etabliert. Die Sensitivität war mit 32-34,8% im Stadium III und/ oder IV auch im Vergleich zu S100 eher gering (Guo *et al.* 1995, Tofani *et al.* 1997, Wibe *et al.* 1992). Insgesamt erscheint der klinische Nutzen dieses Markers nicht zuletzt aufgrund der eher geringen Spezifität für das maligne Melanom daher auch im Vergleich zu MIA fraglich.

Zu Lipid-bound sialic acid (LASA-P) existieren nur wenige Studien. Die Sensitivität lag hier zwischen der von NSE und S100. Eine Assoziation mit dem Wiederauftreten von Metastasen oder dem Überleben konnte nicht nachgewiesen werden (Miliotes *et al.* 1996, Reintgen *et al.* 1992), so dass zum jetzigen Zeitpunkt ein zusätzlicher Benefit von LASA-P im Vergleich zu MIA oder S100 nicht gegeben scheint.

Schlußfolgernd kann gesagt werden, dass MIA und S100 als etwa gleichwertige Tumormarker für das maligne Melanom anzusehen sind. Beide sind sowohl zur Detektion von Metastasen als auch zur Verlaufskontrolle unter Therapie geeignet und bieten dem behandelnden Arzt eine zusätzliche Möglichkeit, die Prognose einzelner Patienten besser einschätzen zu können. Ihr Nutzen im Vergleich zu anderen prognostischen Parametern sollte jedoch in weiteren multifaktoriellen Untersuchungen überprüft werden.

In der Studie von Juergensen *et al.* konnte durch die parallele Bestimmung beider Marker im Stadium IV eine Sensitivität von fast 100% erreicht werden (Juergensen *et al.* 2001). Sollte sich dies auch in anderen Studien bestätigen lassen, könnten möglicherweise durch diese Kombination noch aussagekräftigere Ergebnisse erzielt und den Patienten weitere Untersuchungen erspart bleiben.

Andere Tumormarker erscheinen zum jetzigen Zeitpunkt im Vergleich dazu für das maligne Melanom weniger geeignet. Lediglich LDH konnte mehrfach als guter Parameter im Stadium der Fernmetastasierung bestätigt werden.

6. Zusammenfassung

MIA ist ein von Melanomzellen sezerniertes Protein, dass durch interzelluläre Wechselwirkungen die Bindung der Tumorzellen zur umgebenden Matrix verringert und so deren Motilität und damit Metastasierungspotential vergrößert. Da MIA regelmäßig in malignen Melanomen, aber nur vereinzelt in anderen Tumorarten nachweisbar war, wurde es schon bald als potentieller Tumormarker für das maligne Melanom postuliert.

Nach Entwicklung eines Nachweisverfahrens von MIA im Serum (ELISA) ergab eine erste Studie einen signifikanten Anstieg von MIA im Serum von Patienten mit malignem Melanom im Stadium III und IV

Ausgehend von diesem ermutigenden Ergebnis sollte in der vorliegenden Arbeit der klinische Nutzen von MIA als Tumormarker des malignen Melanoms am Patientenkollektiv der Dermatologischen Klinik der Technischen Universität München überprüft werden. Im speziellen sollte die Eignung von MIA zur Detektion von Metastasen, zur Verlaufskontrolle unter Therapie und als prognostischer Marker beurteilt werden. Hierzu wurden Patienten mit metastasiertem, malignem Melanom zwischen 1997-2003 systematisch in ihrem Verlauf der MIA-Serumwerte untersucht. Die Bestimmungen erfolgten im Rahmen der Tumornachsorge, vor und nach tumorreduzierenden Eingriffen sowie unter Therapie. Insgesamt wurden 1361 Serumproben von 120 Patienten eingeschlossen.

Im Stadium IV zeigte sich ein Anstieg von MIA über den aus der 97. Perzentile eines Normalkollektivs berechneten Grenzwert bei 46 von 57 Patienten mit aktuell nachweisbaren Metastasen. Dies entsprach einer Sensitivität von MIA im Stadium IV von 80,7%.

Die MIA-Werte innerhalb dieser Gruppe waren signifikant erhöht im Vergleich zu denjenigen von tumorfreien Patienten im Stadium III und IV, als auch zu denjenigen von Patienten mit aktueller Metastasierung entsprechend dem Stadium III. Somit konnte MIA als zuverlässiger Marker einer Fernmetastasierung entsprechend dem Stadium IV bestätigt werden.

Hingegen lag die Sensitivität für das Stadium III bei lediglich 18,9 %. Zwar unterschieden sich in der Gruppe der Patienten mit lokoregionärer Metastasierung im Stadium III die Werte signifikant von der tumorfreien Kontrollgruppe, sie lagen jedoch zumeist unterhalb des oberen Normwertes und damit in einem Bereich, in dem Schwankungen im klinischen Alltag nur eingeschränkt beurteilbar sind. Daher erscheint MIA zur Diagnostik von lokoregionären Metastasen wenig geeignet.

Die Spezifität von MIA war insgesamt mit 98,9 % sehr hoch, aufgeschlüsselt auf die einzelnen Stadien lag sie zwischen 97,7 % für das Stadium IIIB bis 100 % für das Stadium IV. Falsch positive Werte sollten daher im klinischen Alltag keine wesentliche Rolle spielen.

Im Rahmen der Tumornachsorge war eine MIA-Erhöhung in 63,9% der Fälle der erste Hinweis für eine neu aufgetretene Fernmetastasierung. In der unmittelbar darauf angeschlossenen bildgebenden Diagnostik konnten bei 16 von 36 Fällen (44,4%) Metastasen detektiert werden. Bei 7 Patienten (19,4%) ging der MIA-Anstieg der klinischen Manifestation 1,5-10 Monate (Median 4 Monate) voraus. Hier konnten die Metastasen erst durch wiederholte Staging-Untersuchungen gefunden werden. Erhöhte Serumwerte können somit dem Auftreten neuer Metastasen vorangehen. Sie deuten damit möglicherweise im Sinne einer Prognoseverschlechterung auf ein verringertes rezidivfreies Überleben hin. Unter Berücksichtigung der hohen Spezifität von MIA sollten sie daher Anlass zu engmaschigen Kontrollen der betroffenen Patienten geben.

Bei MIA-Bestimmungen vor und nach metastasenreduzierender Therapie zeigte sich eine deutliche Korrelation von MIA mit der Tumormasse. Ebenso fand sich bei 20 von 25 Patienten ein enger Bezug zwischen der Höhe der Serumwerte und dem Krankheitsverlauf unter Therapie. MIA eignet sich somit bei der Mehrzahl der Patienten als Parameter zum Therapiemonitoring.

Als Tumormarker des malignen Melanoms ist MIA in seiner Aussagekraft mit der derjenigen von S100 vergleichbar. Andere Parameter erscheinen im Gegensatz zu MIA aus unterschiedlichen Gründen weniger geeignet.

Zusammenfassend stellt MIA für den klinischen Alltag einen sinnvollen Serumparameter zur Detektion von Fernmetastasen und zur Verlaufskontrolle unter Therapie dar. Durch die Bestimmung der MIA-Serumwerte könnten Patienten mit malignem Melanom in Zukunft wiederholte, belastende, apparative Untersuchungen erspart bleiben.

7. Abkürzungsverzeichnis

5-S-CD	5-S-Cysteinyldopa
ABTS	(2,2'-Azino-di-[3-ethylbenz-thiazolinsulfonat]
AJCC	American Joint Committee on Cancer
ALM	Akrolentiginöses Melanom
bzw.	beziehungsweise
ELISA	Enzym-Linked Immunosorbent Assay
i.S.	im Sinne
LDH	Lactatdehydrogenase
LASA-P	Lipid-bound sialic acid
LMM	Lentigo-maligna-Melanom
MAB	englisch= monoclonal antibody, deutsch= monoklonaler Antikörper
MIA	Melanoma Inhibitory Activity
mRNS	messenger Ribonucleinsäure
MW	Mittelwert
NMM	Noduläres malignes Melanom
NSE	Neuronen spezifische Enolase
POD	Peroxidase
PBS	englisch= Phosphat buffered saline, deutsch= Phosphatgepufferte Salzlösung
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
RPM	englisch= rounds per minute, deutsch= Umdrehungen pro Minute
RT- PCR	Reverse Transcription-Polymerase chain reaction
SSM	Superfiziell spreitendes Melanom
z.B.	zum Beispiel

8. Verzeichnis der Abbildungen

- Abbildung 1 komplementäre DNS Sequenz des humanen MIA-Proteins
Abbildung 2 Schematische Darstellung der MIA-Funktion
Abbildung 3 Schematische Darstellung des MIA-ELISA
Abbildung 4 MIA-Serumwerte bei gesunden Kontrollpersonen
Abbildung 5 Verteilung der MIA-Serumwerte in unterschiedlichen Patientengruppen
Abbildung 6 Veränderung der MIA-Serumwerte (Mediane) in unterschiedlichen
Patientenkollektiven durch Reduktion der Tumormasse
Abbildung 7 P1 weiblich, 31 Jahre
Abbildung 8 P2 männlich, 58 Jahre
Abbildung 9 P3 weiblich, 71 Jahre
Abbildung 10 P4 weiblich, 45 Jahre
Abbildung 11 P5 männlich, 81 Jahre

9. Verzeichnis der Tabellen

- Tabelle 1 Einteilung des malignen Melanoms nach der TNM-Klassifikation der AJCC 2001
Tabelle 2 Klinische und pathologische Stadieneinteilung des malignen Melanoms nach der Klassifikation der AJCC von 2001
Tabelle 3 Nachsorgeschema für Patienten mit malignem Melanom nach den Empfehlungen der DDG von 1994
Tabelle 4 Anzahl (n) klinisch-histologischer Typen
Tabelle 5 Verteilung der eingeschlossenen Patienten mit malignem Melanom gemäß der AJCC-Stadien bei Erstvorstellung
Tabelle 6 Sensitivität und Spezifität von MIA im Serum von Melanompatienten
Tabelle 7 MIA-Serumwerte vor / nach Therapie

10. Literaturverzeichnis

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

Balch CM, Buzaid AC, Soong S-J, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG, Fleming ID, Gershenwald JE, Houghton A Jr, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MC, 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* 19:3635-3648, 2001a

Balch CM, Soong S-J, 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 P-Y, 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* 19:3622-3634, 2001b

Barth A, Wanek LA, Morton DL. Prognostic factors in 1 521 melanoma patients with distant metastases. *J Am Coll Surg* 181:193-201, 1995

Basseres N, Grob JJ, Richard MA, Thirion X, Zarour H, Noe C, Collet-Vilette AM, Lota I, Bonerandi JJ. Cost-effectiveness of surveillance of stage I melanoma. A retrospective appraisal based on a 10-year experience in a dermatology department in France. *Dermatology* 191:199–203, 1995

Bataille V, Bishop JA, Sasieni P, Swerdlow Aj, Pinney E, Griffiths K, Cuziack J. Risk of cutaneous melanoma in relation to the numbers, types and sites of naevi: a case-control study. *Br J Cancer* 73:1605-1611, 1996

Battayani Z, Grob JJ, Xerri L, Noe C, Zarour H, Houvaeneghel G, Delpero JR, Birnbaum D, Hassoun J, Bonerandi JJ. Polymerase chain reaction detection of circulating melanocytes as a prognostic marker in patients with melanoma. *Arch Dermatol* 131:443-447, 1995

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

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 research* 49:5358-5363,1989

Bonfrer JMG, Korse CM, Nieweg OE, Rankin EM. The luminescence immunoassay S-100. A sensitive test to measure circulating S-100B. Its prognostic value in malignant melanoma. *Br J Cancer* 77:2210-2214, 1998

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* 11:417-421, 2001

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* 114:395-396, 2000

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

Bosserhoff AK, Golob M, Buettner R, Landthaler M, Hein R. MIA (Melanoma Inhibitory Activity): Biologische Funktionen und klinische Relevanz beim malignen Melanom. *Hautarzt* 49:762-769, 1998.

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 localisation and expression in cartilage and chondrosarcoma. *Dev Dyn* 208 516-525, 1997a

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 Research* 57:3149-3153, 1997b

Bosserhoff AK, Hein R, Bogdahn U, Buettner R. Structure and promotor analysis of the gene encoding the human Melanoma-Inhibiting-Protein, MIA. *J Biol Chem* 271:490-495, 1996

Breslow A. Cross-sectional area and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg* 172:902-908, 1970

Brogelli L, Umberto MR, Moretti S, Urso C. The prognostic significance of histologic regression in cutaneous melanoma. *Melanoma Res* 2:87-89, 1992

Brossart P, Schmier JW, Krüger S, Willhauck M, Scheibenbogen C, Möhler T, Keilholz U. A polymerase chain reaction-based semiquantitative assessment of malignant melanoma cells in peripheral blood. *Cancer Res* 55:4065-4068, 1995

Brossart P, Keilholz U, Willhauck M, Scheibenbogen C, Möhler T, Hunstein W. Hematogenous spread of malignant melanoma cells in different stages of disease. *J Invest Dermatol* 10:887-889, 1993

Bruer J, Probst M, Franzke A, Duensing S, Haindl J, Volkenandt M, Wittke F, Hoffmann R, Ganser A, Atzpodien J. Elevated serum levels of S100 and survival in metastatic melanoma. *Br J Cancer* 75:1375-1376, 1997

Buzaid AC, Ross MI, Balch CM, Soong S, 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 of Cancer staging system for cutaneous melanoma and proposal of a new staging system. *J Clin Oncol* 15:1039-1051, 1997

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* 13:2361-2368; 1995

Buzaid AC, Sandler AB, Hayden CL, Scinto J, Poo WJ, Clark MB, Hotchkiss S. Neuron-specific enolase as a tumor marker in metastatic melanoma. *Am J Clin Oncol* 17:430-431, 1994

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

Cho KH, Hashimoto K, Taniguchi Y, Pietruk T, Zarbo RJ, An T. Immunohistochemical study of melanocytic nevus and malignant melanoma with monoclonal antibodies against S-100 subunits. *Cancer* 66:765-771, 1990

Clark W, Elder DE, Guerry D, Braitman LE, Trock BJ, Schultz D, Synnestvedt M, Halpern AC. Model for predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. *J Natl Cancer Inst* 81:1893-1904, 1989

Clark W, From L, Bernadino E, Mihm MC. The histiogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanoma of the skin. *Cancer Res* 29:705-726, 1969

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

Couvreur R, Joos G, Geerts ML, Lambert J, Naeyaert JM. Neuron-specific enolase as a serum marker for malignant melanoma. *Lancet* 342:985, 1993

Craig LS jr., Vollmer RT, Seigler HF. Multiple primary melanoma: Incidence and risk factors in 283 patients. *Surgery* 113:330-339, 1993

Day CL, Mihm MC, Sober AJ. Prognostic factors for melanoma patients with lesions 0,76-1,69mm in thickness: an appraisal of 'thin' level IV lesions. *Ann Surg* 195:44-49, 1982

Deichmann M, Benner A, Kuner N, Wacker J, Waldmann V, Näher H. Are responses to therapy of metastasized malignant melanoma reflected by decreasing serum values of S100 β or melanoma inhibitory activity (MIA)? *Melanoma Research* 11:291- 296, 2001

Deichmann M, Brenner 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: 1891-1896, 1999

Djukanovic D, Hofmann U, Sucker A, Rittgen W, Schadendorf D. Comparison of S100 protein and MIA protein as serum markers for malignant melanoma. *Anticancer Research* 20:2203-2208, 2000

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

Donato R. Perspectives in S100-protein biology. Review article. *Cell Calcium* 12:713-726, 1991

Dreau D, Bosserhoff AK, White RL, Buettner R, Holder WD. Melanoma-inhibitory activity protein, a useful marker to monitor melanoma patients treated with immunotherapy. *Oncol Res* 11:55-61, 1999

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

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* 16:1103-1111, 1998

Fallowfield ME, Cook MG. Vascular invasion in malignant melanomas: an independent prognostic variable? *Am J Surg Pathol* 13:217-220, 1989

Finck SJ, Giuliano AE, Morton DL. LDH and melanoma. *Cancer* 51:840-843, 1983

Franzke A, Probst-Kepperer M, Buer J, Duensing S, Hoffmann R, Wittke F, Volkenandt M, Ganser A, Atzpodien J. Elevated pretreatment serum levels of soluble vascular cell adhesion molecule 1 and lactate dehydrogenase as predictors of survival in cutaneous metastatic malignant melanoma. *Br J Cancer* 78:40-45, 1998

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

Gamel JW, George SI, Stanley WE, Seigler HF. Skin melanoma. Cured fraction and survival time as functions of thickness, site, histologic type, age and sex. *Cancer* 72:1219-23, 1993

Garbe C, Leiter U, Ellwanger U, Blaheta HJ, Meier F, Rassner G, Schittek B. Diagnostic value and prognostic significance of protein S100 β , Melanoma-Inhibitory-Activity and Tyrosinase/MART-1 reverse Transcription-polymerase chain reaction in the follow-up of high-risk melanoma patients. *Cancer* 97:1737-1745, 2003a

Garbe C, Paul A, Kohler-Sp ath H, Ellwanger U, Stroebel W, Schwarz M, Schlagenhauff B, Meier F, Schittek B, Blaheta H-J, 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* 21:520–529, 2003b

Garbe C, Blum A. Epidemiology of cutaneous melanoma in Germany and worldwide. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 14:280-90, 2001

Garbe C, B uttner P, Bertz J, Burg G, d'Hoedt B, Drepper H, Guggenmoos-Holtmann I, Lechner W, Lippold A, Orfanos CE, Peters A, Rassner G, Stadler R, Stroebel W. Primary cutaneous melanoma: Identification of prognostic groups and estimation of individual prognosis for 5093 patients. *Cancer* 75:2484-2491, 1995

Garbe C. Sonne und malignes Melanom. *Hautarzt* 43:251-257, 1992

Gaynor R, Irie R, Morton D, Herschmann HR. S100 protein is present in cultured human malignant melanomas. *Nature* 286:400-401, 1980

Gläser R, Rass K, Seiter S, Hauschild A, Christophers E, Tilgen W. Detection of circulating melanoma cells by specific amplification of tyrosinase complementary DNA is not a reliable tumor marker in melanoma patients: a clinical two-center study. *J Clin Oncol* 15:2818-2825, 1997

Göhl J, Meyer T, Haas C, Altendorf-Hofmann A, Hohenberger W: Ist die chirurgische Therapie von Fernmetastasen maligner Melanome sinnvoll? *Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd* 113:122–126, 1996

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

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: 1216-1222, 2000

Guo HB, Stoffel-Wagner B, Bierwirth T, Mezger J, Klingmöler D. Clinical significance of serum S100 in metastatic malignant melanoma. *Eur J Cancer* 31:924-928, 1995

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

Hauschild A, Gläser R, Christophers E. Quantification of melanoma-associated molecules in Plasma/Serum of melanoma patients. *Recent Results in Cancer Research*, Vol. 158, Springer Verlag Berlin Heidelberg 2001

Hauschild A, Engel G, Brenner W, Gläser R, Mönig H, Henze E, Christophers E. S100B protein detection in serum is a significant prognostic factor in metastatic melanoma. *Oncology* 56:338-344, 1999a

Hauschild A, Michaelsen J, Brenner W, Rudolph P, Glaser R, Henze E, Christophers E. Prognostic significance of serum S100B detection compared with routine blood parameters in advanced metastatic melanoma patients. *Melanoma Research* 9:155-161, 1999b

Hauschild A, Engel G, Brenner W, Gläser R, Mönig H, Henze E, Christophers E. Predictive value of serum S-100B for monitoring patients with metastatic melanoma during chemotherapy and/or immunotherapy. *Br J Dermatol* 140:1065-1071, 1999c

Hendrickson MR, Ross JC. Neoplasms arising in giant congenital naevi. *Am J Surg Pathol* 5:109-135, 1981

Henze G, Dummer R, Joller-Jemelka H, Böni R, Burg G. Serum S100 - a marker for disease monitoring in metastatic melanoma. *Dermatology* 194:208-212, 1997

Hill BR, Levi C. Elevation of serum component in neoplastic disease. *Cancer* 14:513-515, 1954

Hirai S, Kageshita T, Kimura T, Tsujisaki M, Imai K, Wakamatsu K, Ito S, Ono T. Serum levels of sICAM-1 and 5-S-cysteinyldopa as markers of melanoma progression. *Melanoma Res* 7:58-62, 1997

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* 87:151–157, 2002

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

Hornef S, Kux J, Rassner G. Neuronen-spezifische Enolase (NSE)- ein geeigneter Tumormarker des malignen Melanoms? *Hautarzt* 43:77-80, 1992

Horokoshi T, Wakamatsu K, Onodera H, Eguchi H. Evaluation of melanin-related metabolites as markers of melanoma progression. *Cancer* 73:629-636, 1994

Juergensen 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: 54-58, 2001

Jung FA, Buzaid AC, Woods KV, Ross M, Grimm EA. Detection of melanoma cells in peripheral blood using reverse transcription polymerase chain reaction assay for tyrosinase mRNA. *Cancer Surv* 26:251-256, 1996

Kaskel P, Berking C, Sander S, Volkenandt M, Peter RU, Krähn G. S100 protein in peripheral blood: a marker for melanoma metastases. A prospective 2-center study of 570 patients with melanoma. *J Am Acad Dermatol* 41:962-969, 1999

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

Kligman D, Hilt DC. The S100 protein family. *Trends Biochem Sci* 13:437-443, 1988

Koehler MR, Bosserhoff AK, von Beust G, Bauer A, Blesch A, Buettner R, Schlegel J, Bodahn U, Schmid M. Assignment of the human melanoma inhibitory activity gene (MIA) to 19q13.4 by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Genomics* 35:265-267, 1996

Korting HC, Sterry W (Hrsg.). Diagnostische Verfahren in der Dermatologie. Blackwell Wissenschafts-Verlag Berlin, Wien 1997, S. 25

Krähn G, Kaskel P, Sander S, Weizenhöfer JP, Wortmann S, Leiter U, Peter RU. S100 β is a more reliable tumor marker in the peripheral blood for patients with newly occurred melanoma metastases compared with MIA, Albumin and Lactat-Dehydrogenase. *Anticancer Research* 21:1311-1316, 2001

Kunter U, Buer J, Probst M, Duensing S, Dallmann I, Grosse J, Kirchner H, Schluepen EM, Volkenandt M, Ganser A, Atzpodien J. Peripheral blood tyrosinase messenger RNA detection and survival in malignant melanoma. *J Natl Cancer Inst* 88:590-594, 1996

Levy E, Silverman MK, Vossaert KA, Kopf AW, Bart RS, Golomb FM, Levenstein MJ. Late recurrence of malignant melanoma: a report of five cases, a review of the literature and a study of associated factors. *Melanoma Res* 1:63-67, 1991

Mackie R. Risk factors for the development of primary cutaneous malignant melanoma. *Dermatol Clin* 20:597-600, 2002

Mackie R. Incidence, risk factors and prevention of melanoma. *Eur J Cancer* 34, Suppl 3:S3-S6, 1998

Mackie R, Aitchinson T, Sirel JM, McLaren K, Watt DC. Prognostic models for subgroups of melanoma patients from Scottish Melanoma Group database 1979-86 and their subsequent validation. *Br J Cancer* 71:173-176, 1995

Matusushita 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- cysteinyl-dopa. *Melanoma Research* 12:319-323, 2002

Meier F, Will S, Ellwanger U, Schlagenhauff B, Schitteck B, Rassner G, Garbe C. Metastatic pathways and time courses in the orderly progression of cutaneous melanoma. *Br J Dermatol* 147:62-70, 2002

Mellado B, Colomer D, Castel T, Munoz M, Carballo E, Galan M, Mascaro JM, Vives-Corrons JL, Grau JJ, Estape J. Detection of circulating neoplastic cells by reverse transcriptase polymerase chain reaction in malignant melanoma: association with clinical stage and prognosis. *J Clin Oncol* 14:2091-2097, 1996

Meral R, Duranyildiz D, Tas F, Camalica H, Yasasever V, Kurul S, Dalay N. Prognostic significance of melanoma inhibiting activity levels in malignant melanoma. *Melanoma Research* 11: 627-632, 2001

Miliotes G, Lyman GH, Cruse CW, Puelo C, Albertini PA, Rapaport D, Glass F, Fenske N, Soriano T, Cuny C, van Voorhis N, Reintgen D. Evaluation of new putative tumor markers for melanoma. *Am Surg Oncol* 3:558-563, 1996

Moore BW. A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem Biophys Res Comm* 19:739-744, 1965

Morton DL, Wanek L, Nizze JA, Elashoff RM, Wong JH. Improved long-term survival after lymphadenectomy of melanoma metastatic to regional nodes. Analysis of prognostic factors in 1134 patients from the John Wayne Cancer Clinic. *Ann Surg* 214:491-499, 1991

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

Österlind 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* 42:319-324, 1988

Orfanos CE, Jung HG, Wolff HH, Garbe C. Stellungnahme und Empfehlungen der Kommission malignes Melanom der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft zur Diagnostik, Behandlung und Nachsorge des malignen Melanoms der Haut- Stand 1993/94. *Hautarzt* 45: 285-291, 1994

Overett TK, Shiu MH. Surgical treatment of distant metastatic melanoma. Indications and results. *Cancer* 56:1222–1230, 1985

Perez R, Abu-hadid M, Zhang P, Bosserhoff Ak, Buettner R. Expression of melanoma inhibitory activity (MIA) in melanoma and non-melanoma tissue specimens. *Human Pathol* 31:1381-1388, 2000

Peterson LL, Woodward WR, Fletcher WS, Palmquist M, Tucker MA, Ilias A. 5-S-Cysteinyldopa differentiates patients with primary and metastatic melanoma from patients with dysplastic nevus syndrom and normal subjects. *J Am Acad Dermatol* 19:509-515, 1988

Pittman K, Burchill S, Smith B, Southgate J, Joffe J, Gore M, Selby P. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction for expression of tyrosinase to identify malignant melanoma cells in peripheral blood. *Ann Oncol* 7:297-301, 1996

Prichard RS, Hill AD, Skehan SJ, O'Higgins NJ. Positron emission tomography for staging and management of malignant melanoma. *British Journal of Surgery* 89:389-396, 2002

Reinhold U, Lüdtke-Handjery HC, Schnautz S, Kreysel HW, Abken H. The analysis of tyrosinase-specific mRNA in blood samples of melanoma patients by RT-PCR is not a useful test for metastatic tumor progression. *J Invest Dermatol* 108:166-169, 1997

Reintgen DS, Cruse CW, Wells, KE, Saba HL, Fabri PJ. The evaluation of putative tumor markers for malignant melanoma. *Ann Plast Surg* 28:55-59, 1992

Reintgen DS, Vollmer R, Tso CY, Seigler HF. Prognosis for recurrent stage I malignant melanoma. *Arch Surg* 122:1338-1342, 1987

Ridgeway CA, Hieken TJ, Ronan SG, Kim DK, Das Gupta TK. Acral lentiginous melanoma. Arch Surg 130:88-92, 1995

Rigel DS, Friedmann FJ. The rationale of the ABCDs of early melanoma. J Am Acad Dermatol 29:1060-1061, 1993

Ronan SG, Eng AM, Briele HA, Shioura NN, Da Gupta TK. Thin malignant melanoma with regression and metastases. Arch Dermatol 123:1326-1330, 1987

Sakano S, Zhu Y, Sandell LJ. Cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein and type II collagen expression during fracture healing are potential targets for Sox 9 regulation. J Bone Miner Res 14: 1891-1901, 1999

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 Research 20:5059-5063, 2000

Schmoeckel C, Kavini Nejad K, Braun-Falco O. Der prognostische Index beim malignen Melanom. Eine verbesserte Methode zur Einschätzung des Metastasierungsrisikos. Der Pathologe 1:71-78, 1980

Schoultz von E, Hansson LO, Djureen E, Hansson J, Känel R, Nilsson B, Stigbrand T, Ringborg U. Prognostic value of serum analyses of S-100 β protein in malignant melanoma. Melanoma Res 6:133-137, 1996

Schulthess von GK, Steinert HC, Dummer R, Weder W. Cost-effectiveness of whole-body PET imaging in non-small cell lung cancer and malignant melanoma. Acad Radiol 5:S300-S302, 1998

Schultz ES, Diepgen TL, von den Driesch P. Clinical and prognostic relevance of S-100 β in malignant melanoma. Br J Dermatol 138:426-430, 1998

Sirrot MN, Bajorin DF, Wong GY, Tao Y, Chapman PB, Templeton MA, Houghton AN. Prognostic factors in patients with metastatic malignant melanoma. A multivariate analysis. Cancer 72:3091-3098, 1993

Smith B, Selby P, Southgate J, Pittmann K, Bradley C, Blair GE. Detection of melanoma cells in peripheral blood by means of reverse transcriptase and polymerase chain reaction. *Lancet* 338:1227-1229, 1991

Snels DG, Hille ET, Gruis NA, Bergmann W. Risk of cutaneous malignant melanoma in patients with nonfamilial atypical nevi from a pigmented lesions clinic. *J Am Acad Dermatol* 40:686-693, 1999

Stahlecker J, Gauger A, Bosserhoff A, Buettner R, Ring J, Hein R. MIA as a tumor marker in the serum of patients with malignant melanoma. *Anticancer Research* 20:5041-5044, 2000

Stidham K, Johnson JI, Seigler HF. Survival superiority of females with melanoma: a multivariate analysis of 6383 patients exploring the significance of gender in prognostic outcome. *Arch Surg* 129:316-324, 1994.

Stoll R, Renner C, Zweckstetter M, Bruggert M, Ambrosius D, Palme S, Engh RA, Golob 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* 20:340-349, 2001

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

Sverdlow AJ, English J, MacKie R, O'Doherty CJ, Hunter JA, Clark J, Hole DJ. Benign melanocytic naevi as a risk factor for melanoma. *BMJ* 292:1555-1559, 1986

Tofani A, Cioffi RP, Scuito R, Rea S, Festa A, Di Filippo F, Cavaliere R, Maini CI. S-100 and NSE as serum markers in melanoma. *Acta Oncologica* 36:761-764, 1997

Tronnier M, Garbe C, Bröcker EB, Stadler R, Steinkraus V, Soyer HP, Wolff HH. Standards der histopathologischen Diagnose maligner Melanome. *Hautarzt* 48:720-729, 1997

Van Groningen JJ, Bloemers HP, Swart GW. 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* 55:6237-6243, 1995

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

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

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* 274:1703–1705, 1995

Weiß J, Garbe 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. Ergebnisse einer multizentrischen Fall-Kontroll-Studie. *Hautarzt* 41:309-313, 1990

Wibe E, Hannisdal E, Paus E, Aamdal S. Neuron-specific enolase as a prognostic factor in metastatic malignant melanoma. *Eur J Cancer* 28:1692-1695, 1992

Wimmer I, Meyer JC, Seifert B, Dummer R, Flace A, Burg G. Prognostic value of serum 5-S-Cysteinyldopa for monitoring human metastatic melanoma during immunochemotherapy. *Cancer Res* 57:5073-5076, 1997

11. Lebenslauf

Name: Stahlecker

Vorname: Julia Annabelle

Geburtsdatum: 13.12.1970

Geburtsort: Göttingen

Anschrift: Matthias-Grünewald-Str. 20

79100 Freiburg

Familienstand: ledig

Eltern: Christiana Rühmkorf-Haarstick geb. Rühmkorf, Ärztin

Boto Albrecht Stahlecker, Dipl. Ing. agr.

Schulbildung:

1977-1981	Grundschule Sarstedt
1981-1987	Gymnasium Marienschule Hildesheim
1987-1990	Gymnasium Michelsenschule Hildesheim
	Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulbildung:

1990-1991	Studium der Biologie an der Georg-August Universität in Göttingen
1991-1997	Studium der Medizin an der Georg-August Universität in Göttingen

Berufserfahrung:

1998-1999	Ärztin im Praktikum, Klinik für Dermatologie und Allergologie in Augsburg (Chefarzt: Prof. Dr. med. B.-R. Balda)
6/2000-12/2000	Assistenzärztin in der Hautarztpraxis Dr. med. R. Krieger in Schwäbisch-Hall
1/2001-10/2004	Assistenzärztin an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Technischen Universität München (Direktor: Prof. Dr. med. Dr. med phil. J. Ring)

12. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Dr. phil. Johannes Ring danke ich für die Möglichkeit, meine Untersuchungen in der von ihm geleiteten Klinik durchzuführen.

Mein herzlicher Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Rüdiger Hein, für die Überlassung des Themas sowie die fachliche Betreuung und Hilfestellung der letzten Jahre.

Außerdem möchte ich Frau Diana Maatzen und Frau Heidi Log-Weigand für die technische Aufarbeitung der Proben danken.

Zu danken habe ich ferner Herrn Dr. med. Stefan Weidinger für die freundliche Unterstützung bei den statistischen Berechnungen.