

Aus dem Lehrstuhl der Klinik und Poliklinik für
Dermatologie
Direktor: Prof. Dr. Mark Berneburg
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

**Etablierung eines Melanom Tissue Microarrays: Bio-
marker in Korrelation mit klinischen Verlaufsdaten**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Susanne Gantner

2014

Aus dem Lehrstuhl der Klinik und Poliklinik für
Dermatologie
Direktor: Prof. Dr. Mark Berneburg
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

**Etablierung eines Melanom Tissue Microarrays: Bio-
marker in Korrelation mit klinischen Verlaufsdaten**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Susanne Gantner

2014

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten Reichert
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Christian Hafner
2. Berichterstatter:	PD Dr. Petra Rümmele
Tag der mündlichen Prüfung:	24.09.2014

Inhaltsverzeichnis

Etablierung eines Melanom Tissue Microarrays: Biomarker in Korrelation mit klinischen Verlaufsdaten

1.	<i>Einleitung</i>	4
2.	<i>Das maligne Melanom</i>	
2.1.	Epidemiologie	4-5
2.2.	Ätiologie und Pathogenese	5-6
2.3.	Klinik	6-9
2.4.	Diagnostisches Vorgehen und Differentialdiagnosen	9-10
2.5.	Therapie	10-15
2.6.	Molekularbiologische Grundlagen	15-19
2.7.	Verlauf und Prognose	19-10
2.8.	Nachsorge	20-22
3.	<i>Material und Methoden</i>	
3.1.	Projekt: Mehrdimensionale Melanombiomarker Initiative Regensburg - Hamburg - Zürich	
3.1.1.	Ideen und Ziele	23-24
3.1.2.	Erstellung des Regensburger Patientenkollektivs	25-26
3.1.3.	Zusammenstellung der Patientenverlaufsdaten	26-28
3.1.4.	Vervollständigung und Abgleich der Daten mit Patientenakten	29-31
3.2.	Erstellung eines Melanom Tissue Microarrays	
3.2.1.	Zusammenstellen und Sichten des vorhandenen histologischen Materials	32-33
3.2.2.	Abgleich der Patientenverlaufsdaten mit vorhandenem histologischem Material	33-34
3.2.3.	Zusammenstellung und Sichten von fremden histologischen Präparaten	34-35
3.2.4.	Zusammenstellung des Ausgangsmaterials	36-37
3.2.5.	Tissue Microarray- Erstellung und Ordnungsprinzipien	37-40
3.3.	Immunhistochemie	
3.3.1.	Grundprinzip	41-42
3.3.2.	Methylthioadenosinphosphorylase	42-43
3.3.3.	Färbung	43-44
3.4.	Auswertung des Melanom Tissue Microarrays	
3.4.1.	Digitalisierung der histologischen Präparate	44-45
3.4.2.	Auswertung des Tissue Microarrays	45-47

4.	<i>Ergebnisse</i>	
4.1.	Statistik	48
4.2.	Auswertung am Beispiel von MTAP	48-59
4.3.	Zusammenfassung am Beispiel von MTAP	60
5.	<i>Diskussion</i>	61-74
6.	<i>Zusammenfassung</i>	75-76
7.	<i>Anhang</i>	
7.1.	Abkürzungsverzeichnis	77-78
7.2.	Literaturverzeichnis	79-91
7.3.	Abbildungsverzeichnis	92-93
7.4.	Lebenslauf	95
7.5.	Danksagung	96

1. Einleitung

Die Inzidenz des malignen Melanoms nimmt in den letzten Jahren zu. Daher sind neben Vorsorge und Früherkennung maligner Melanome auch Methoden und Verfahren zur Risikostratifizierung von Patienten mit malignen Melanomen nötig. Durch die erweiterte Kenntnis der molekularen Vorgänge ergeben sich neue Möglichkeiten zur Prognoseabschätzung und Therapieoptimierung. Hierfür stehen eine Reihe von potentiellen Biomarkern zur Auswahl. Im Rahmen der mehrdimensionalen Melanom-Biomarker Initiative Regensburg-Hamburg-Zürich sollte eine Vielzahl potentieller Biomarker mithilfe eines Tissue Microarrays an möglichst vielen Fällen analysiert und sowohl einzeln als auch in Kombination verschiedene Biomarker hinsichtlich des rezidivfreien Überlebens, des Gesamtüberlebens und der Ansprechraten auf eine Interferontherapie ausgewertet werden. Ziel dieser Dissertation war die Erstellung des Melanom Tissue Microarrays im Rahmen der genannten Initiative sowie die Korrelation klinischer Verlaufsdaten mit den Ergebnissen des Tissue Microarrays „am Beispiel“ von *Methyladenosinphosphorylase* (MTAP) und *Signal transducer and activator of transcription 1* (STAT1).

2. Das maligne Melanom

2.1. Epidemiologie

Jedes Jahr erkranken etwa 11.500 Menschen in Deutschland am malignen Melanom (Breitbart et al., 2010). Damit zählt das maligne Melanom zu den häufigsten Tumorerkrankungen. Frauen erkranken dabei etwa 1,3 mal häufiger als Männer. Die Inzidenz des malignen Melanoms nahm seit Beginn des letzten Jahrhunderts stark zu. Betrug in den 70er Jahren die Inzidenz noch etwa 3 pro 100.000/Jahr, so schätzt man sie derzeit auf 11-12 pro 100.000/Jahr (Breitbart et al., 2010). Im europaweiten Vergleich der Melanommorbidität belegt Deutschland bei den Männern den dritten Rang, bei den Frauen den vierten. Dabei lässt sich ein gewisses Nord - Süd Gefälle feststellen. Während in Skandinavien Melanome deutlich häufiger auftreten als in Deutschland, ist die Morbidität in Griechenland viel geringer. Dieses Nord -

Süd Gefälle gilt mit Einschränkungen auch innerhalb Deutschlands. So führt beispielsweise Schleswig Holstein die Inzidenzrangliste der Bundesländer an. Als Erklärungen wird vor allem der hellere Hauttyp in nördlicheren Regionen genannt. Das durchschnittlich Erkrankungsalter bei Frauen beträgt etwa 59 Jahre, bei Männern 61 Jahre (Bertz et al.,2006). Mit zunehmendem Alter steigt das Erkrankungsrisiko an und erreicht in der 6. Lebensdekade ihren Höhepunkt. Neben der steigenden Inzidenz des malignen Melanoms besteht eine erhebliche Mortalität. Etwa 20 % aller Melanompatienten versterben im Verlauf der Erkrankung. Somit werden 1% der jährlichen Krebstodesfälle durch maligne Melanome verursacht. Trotz Sensibilisierung der Bevölkerung für die Erkrankung, verbesserter Diagnostik und Verringerung der Tumordicke zum Diagnosezeitpunkt in den letzten 30 Jahren ist die Mortalität im selben Zeitraum annähernd gleich geblieben (Bertz et al., 2006).

2.2. Ätiologie und Pathogenese

Epidemiologische Studien zeigten vielfach einen Zusammenhang zwischen Melanomentstehung und UV-Licht (Herz, 2005). Dabei scheint die kumulative Dosis eine geringere Rolle zu spielen als intermittierend hohe Dosen von UV-Licht. Dies untermauert vor allem die Verteilung der Melanome. Am häufigsten treten Melanome am Stamm oder den Extremitäten auf, die bis auf gelegentlich hohe Sonnenlichtexpositionen von Kleidung bedeckt sind. Andererseits finden sich relativ selten Melanome im Gesicht und an den Händen in Arealen mit hoher kumulativer Belastung. Neuere Daten zeigen auch, dass es keinen wesentlichen Unterschied zwischen UV-A und UV-B Strahlen gibt (Volkenandt, 2005). Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen chronischer UV-Lichtexposition und Melanomentstehung konnte bisher nur für das Lentigo-maligna Melanom bewiesen werden. Das Lentigo-maligna Melanom stellt eine Sonderform dar, da es vor allem bei älteren Frauen im Gesicht auftritt (Herz, 2005). Neben dem UV-Licht spielen der Hauttyp und die Haarfarbe eine ebenfalls wichtige Rolle als Risikofaktor. So ist beispielsweise das Risiko der Entstehung eines Melanoms für rothaarige Menschen 4,7-fach höher

als für dunkelhaarige. Da Menschen mit Hauttyp I oder II bei gleicher Strahlendosis schneller Sonnenbrände erleiden als dunkelhäutige, korreliert auch die Zahl blasiger, kindlicher Sonnenbrände mit dem Melanomentstehungsrisiko. Einen weiteren Risikofaktor stellt die Anzahl melanozytärer Nävi dar. Obwohl nur etwa 30-40% der malignen Melanome auf vorbestehenden melanozytären Nävi entstehen, ist eine Anzahl von mehr als 50 Nävi mit einem 4,8-fach erhöhtem Risiko im Vergleich zu Menschen mit weniger als 10 Nävi verbunden (Volkenandt, 2005). Endokrine Faktoren wie eine Schwangerschaft können die Entstehung von Melanomen begünstigen. Außerdem entwickeln sich bei immundefizienten Patienten, beispielsweise an Aids erkrankten Personen oder unter immunsuppressiver Therapie, häufiger Melanome als bei Immunkompetenten (Herz, 2005).

2.3. Klinik

Beim malignen Melanom handelt es sich nicht um ein einheitliches Krankheitsbild, vielmehr lassen sich klinisch und heute auch molekular verschiedene Formen unterscheiden. Klinisch unterteilt man das Melanom in das superfiziell spreitende maligne Melanom (SSM), das primär noduläre maligne Melanom (NMM), das Lentigo-maligna Melanom (LMM), sowie das akrolentiginöse Melanom (ALM). Daneben werden noch Sonderformen wie das amelanotische maligne Melanom beschrieben (Herz, 2005).

Das superfiziell spreitende Melanom zählt zum führenden Melanomtyp. Im Jahr 2004 waren von allen Melanomdiagnosen 54,6% superfiziell spreitende maligne Melanome (Sebastian, Herrmann, 2006). Der Tumor wächst radiär und horizontal. Zunächst beschränkt sich der Tumor noch auf die Epidermis, durch Invasion und Übergang ins vertikale Wachstum können sich auch knotige Anteile bilden (Sebastian, Stein, 2000). Als Zeichen der Immunantwort finden sich regressive und weißliche Bereiche, die histologisch Rundzellinfiltrate und eine Vielzahl von Melanophagen zeigen (Herz, 2005).

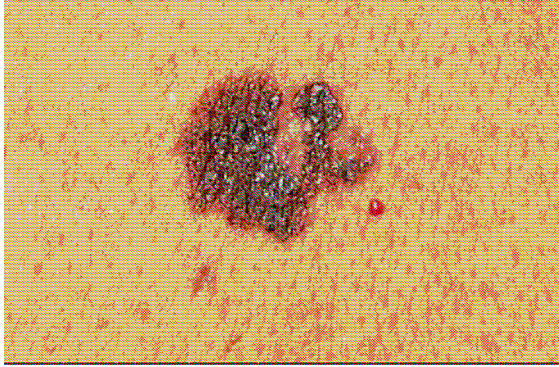


Abbildung 2.1.: Superfiziell spreitendes malignes Melanom

Das primär noduläre maligne Melanom ist mit 18,3% die zweithäufigste Melanomentität (Sebastian, Herrmann, 2006). Charakteristisch für das noduläre Melanom sind vor allem das frühe und rasche vertikale Wachstum (Porras, Cockerell, 1997). Wegen des relativ raschen vertikalen Wachstums kommt es oft früh zur prognostisch ungünstigen Ulzeration des Tumors (Sebastian, Herrmann, 2006). Der Tumor ist zur gesunden Haut hin scharf begrenzt und infiltriert relativ rasch in die Dermis (Herz, 2005).



Abbildung 2.2.: noduläres malignes Melanom

In etwa 9% der Diagnosen eines malignen Melanoms handelt es sich um ein Lentigo-maligna Melanom. Das Lentigo-maligna Melanom nimmt eine Sonderstellung ein, da es sich aus einer Präkanzerose, der Lentigo-maligna, entwickelt und wahrscheinlich die kumulative Sonnenexposition für die Entstehung verantwortlich ist. Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen malignen Melanomen, die vor allem am Rücken und an den Unterschenkeln lokalisiert sind, treten Lentigo-maligna Melanome fast ausschließlich im Ge-

sichtsbereich auf. Außerdem ist das mittlere Alter bei Diagnosestellung bei Lentigo-maligna Melanomen mit 72 Jahren deutlich höher als bei den übrigen Melanomentitäten. Kennzeichnend für das Lentigo-maligna Melanom ist die langsame, meist mehrere Jahre dauernde Entwicklung (Sebastian, Herrmann, 2006).

Zu den akrolentiginösen Melanomen werden alle Melanome gezählt, die sich im Bereich der Phalangen, der Handflächen, der Fußsohlen, der Schleimhäute oder am Übergangsbereich von Haut zu Schleimhaut befinden (Herz, 2005). Der Tumor wächst zunächst radiär und hyperkeratotisch, später zunehmend weich. Dadurch kommt es bei mechanischer Beanspruchung leicht zu Erosionen und Ulzerationen. Die Melanome des Nagelbettes und der Nagelmatrix wachsen rasch knotig (Sebastian, Herrmann, 2006). Histologisch ähnelt das akrolentiginöse Melanom dem Lentigo-maligna Melanom, jedoch ist es viel aggressiver und metastasiert schneller als das Lentigo-maligna Melanom (Herz, 2005).

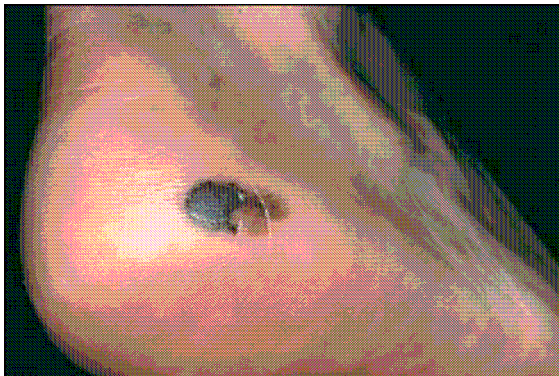


Abbildung 2.3.: Akrolentiginöses malignes Melanom

Neben den vier oben genannten Typen werden noch einige Sonderformen beschrieben. Zu diesen zählt das amelanotische Melanom, eine Unterform des nodulären Melanoms, dem die Eigenschaft zur Melaninsynthese fehlt (Herz, 2005). Das desmoplastische Melanom entwickelt sich wie das Lentigo-maligna Melanom auf lichtvorgeschiedigter Haut und ist ebenfalls häufig mit der Präkanzerose Lentigo-maligna vergesellschaftet (Hessel, Byers,

2000). Andere seltene Formen sind das okuläre Melanom, Melanome auf kongenitalen melanozytären Riesennävi und maligne blaue Nävi (Sebastian, Herrmann, 2006).

2.4. Diagnostisches Vorgehen und Differentialdiagnosen

Jeder neu aufgetretene, wachsende oder sich farblich verändernde Pigmenttumor ist melanomverdächtig und sollte abgeklärt werden. Der erste Schritt in der Diagnosefindung besteht in der klinischen Beurteilung. Diese erfolgt zu meist mit der ABCD Regel, wobei A für Asymmetrie, B für unregelmäßige Begrenzung, C für Colorit und D für Durchmesser größer als 5mm steht (Herz, 2005). Jedoch erweist sich die Beurteilung vieler Pigmentveränderungen allein mit klinischen Aspekten als schwierig und nicht genügend sensitiv. Hierbei kann der Einsatz des Dermatoskops den Prozess der Diagnosefindung erleichtern. Mit dem Dermatoskop ist eine Sensitivität von 89% und eine Spezifität von 79% zu erreichen (Kittler et al., 2002).

Sollte trotz Einsatz des Dermatoskopes die Diagnose nicht sicher sein, muss eine möglichst kleine, aber vollständige Exzision durchgeführt werden. Durch die histologische Aufarbeitung kann meist eine eindeutige Diagnose gestellt werden (Herz, 2005). Ist die Wahrscheinlichkeit für die Diagnose eines malignen Melanoms groß, kann präoperativ mit Hilfe der Hochfrequenzsonographie mit 20MHz die Tumordicke abgeschätzt werden. Diese Untersuchung leistet einen wichtigen Beitrag zur Operationsplanung, da der Sicherheitsabstand je nach Tumordicke variiert. Außerdem muss das gesamte Integument nicht nur nach Satelliten- oder In-Transit Metastasen abgesucht werden, sondern auch nach weiteren Melanommanifestationen. Eine palpatorische und sonographische Kontrolle der Lymphknotenstationen ist ebenfalls obligat. Zum präoperativen Nachweis von Lymphknoten- und/oder Fernmetastasen wird die Computertomographie (CT) des Thorax und des Abdomens eingesetzt (Volkenandt, 2005). Wegen der höheren Sensitivität bei der Erkennung von Lymphknoten- und auch Fernmetastasen kann die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) zur Anwendung kommen (Weiss, Hahn,

2000). Ist von einem sehr hohen Metastasierungspotential auszugehen, sollte eine Kernspintomographie (MRT) des Gehirns erfolgen. Neben apparativen und klinischen Untersuchungen erscheint eine ausgewählte Labordiagnostik, beispielsweise LDH, Blutbild und Differentialblutbild, sinnvoll (Volkenandt, 2005). Als Tumormarker steht derzeit S-100-B zur Verfügung. S-100-B kann nicht zur Diagnose des malignen Melanoms herangezogen werden, ist jedoch als Verlaufsparemeter gut geeignet (Hein, Bosserhof, Degitz, 2000). Obwohl das maligne Melanom von erfahrenen Dermatologen in etwa 80% der Fälle richtig diagnostiziert wird, kann es durch Versagen der Auflichtmikroskopie und der ABCD Regel vor allem bei akrolentiginösen Melanomen und nodulären Melanomen zu falsch negativen Befunden kommen (Grant-Kels et al., 1999). Typische Lokalisationen bei denen es zur verzögerten Diagnosestellung kommt, beschreibt die TANS Regel. Dabei steht T für trunk, A für arm, N für neck und S für scalp (Burg, 1998).

2.5. Therapie

Nach wie vor stellt die Exzision die Therapie der Wahl beim malignen Melanom dar. Während von 1907 bis zum Beginn der 80er Jahre des letzten Jahrhunderts die Sicherheitsabstände um den Primärtumor über 5 cm betragen, ist mittlerweile bekannt, dass ein Sicherheitsabstand über 2 cm nicht sinnvoll ist und zu keiner Verbesserung der Prognose führt (Hauschild, 2001; Hauschild, Egbert, Kaufmann, 2006). Heute wird nach den Richtlinien der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft je nach geschätzter oder vorbekannter Tumordicke exzidiert. Besteht lediglich ein geringem Malignitätsverdacht, sollte der Tumor mit einem Sicherheitsabstand von unter 0,5 cm entfernt werden und gegebenenfalls nach histologischer Diagnosesicherung mit ausreichendem Sicherheitsabstand nachexzidiert werden. Ebenso muss bei malignen Melanomen, die unter Verkennung der Diagnose mit zu geringem Abstand entfernt wurden, eine Nachexzision mit dem nötigen Sicherheitsabstand erfolgen. Beträgt die geschätzte Tumordicke nach Breslow unter 2 mm, sollte der Sicherheitsabstand 1 cm betragen. Lokalisationsadaptierte Sicher-

heitsabstände unter 1 cm sind in Ausnahmefällen möglich. Außerdem muss bei der Entnahme darauf geachtet werden, dass nicht nur Kutis und Subkutis, sondern auch das komplette subkutane Fettgewebe bis zur Muskelfaszie entfernt wird. Alle Tumore, deren Breslowdicke über 2 mm geschätzt wird, sollten mit einem Sicherheitsabstand von 2 cm exzidiert werden (Herz, 2005). Die operative Versorgung kann gewöhnlich in Lokalanästhesie erfolgen. Zur Deckung des Hautdefektes werden Verfahren wie der primäre Wundverschluss, die Dehnungs-, Lappen-, oder Verschiebeplastik und die Hauttransplantation angewandt (Konz, 2000). Bei einer Tumordicke nach Breslow über 1 mm oder über 0,75 mm und einem zusätzlichen Risikofaktor wird eine Sentinel-Lymphknotenexstirpation empfohlen. Der Sentinel-Lymphknoten wird präoperativ nuklearmedizinisch identifiziert und markiert. Dadurch kann er intraoperativ mittels einer Messsonde aufgefunden und exzidiert werden. Finden sich im Sentinel-Lymphknoten Mikrometastasen, so kann zweizeitig eine Lymphknotendisektion des gesamten regional drainierenden Gebietes erfolgen. Allen Patienten ohne Tumorbefall des Sentinel-Lymphknotens kann diese Prozedur erspart werden (Bachter, Konz, 2000). In seltenen Einzelfällen ist eine operative Entfernung des Melanoms nicht möglich oder nicht sinnvoll. Eine alleinige Bestrahlung kann dort versucht werden (Seegenschmiedt et al., 1999). Nach der Entfernung des Primärtumors zeigen 90% der Patienten keinen Hinweis auf eine Metastasierung. In etwa 1/4 der Fälle, die klinisch als metastasenfrei erscheinen, muss nach der histologischen Aufarbeitung des Sentinel-Lymphknotens das Tumorstadium nach oben korrigiert werden. Prinzipiell kann bei jedem Patienten im tumorfreien Zustand an eine adjuvante Therapie gedacht werden. In der adjuvanten Therapie des malignen Melanoms wurden bereits eine Reihe von systemischen Therapien wie beispielsweise verschiedene Chemotherapieschemata mit einer oder der Kombination aus mehreren Substanzen, Interleukin-2, Mistellektin Iscador M, BCG, Corynebakterium parvum oder Interferon γ versucht. Diese Substanzen zeigten jedoch keine Vorteile im rezidivfreien Überleben oder im Gesamtüberleben (Hill et al., 1981, Karg et al., 1990, Hauschild et al., 2003, Kleeberg et al., 2004, Veronesi et al., 1982). GM-CSF

zeigte in ersten Studien einen Vorteil im medianen Überleben, jedoch sind die Ergebnisse noch zurückhaltend zu bewerten, da diese Ergebnisse erst in prospektiven randomisierten Studien verifiziert werden müssen (Spitler et al., 2000). Die zurzeit einzige zugelassene Substanz zur Behandlung des malignen Melanoms in einer adjuvanten Situation stellt Interferon α dar. Diese Substanz zeigte in prospektiven randomisierten Studien einen Überlebensvorteil (Kirkwood, 1996). Zur Zeit wird Patienten mit einer Tumordicke über 2,01 mm ohne Kontraindikationen und ohne Nachweis von Metastasen eine Therapie mit Interferon α drei mal wöchentlich 3 Millionen internationale Einheiten (IE) über 18 Monate empfohlen. Bei einer Tumordicke zwischen 1,01 und 2 mm mit Ulzeration kann eine Interferontherapie überlegt werden. Eine Verlängerung der Therapie auf 60 Monate zeigte keine Vorteile im rezidivfreien Überleben (Hauschild, Volkenandt, Garbe, 2006, Malignes Melanom Leitlinie, 2013). Nicht nur zur adjuvanten Therapie ohne Metastasen-nachweis kann Interferon α verwendet werden, sondern auch zur adjuvanten Therapie beim Nachweis von Lymphknotenmetastasen nach operativer Sanierung. In diesem Zusammenhang werden in erster Linie Schemata mit hochdosiertem Interferon α angewandt (Hauschild, Volkenandt, Garbe, 2006). Jedoch zeigte auch die niedrigdosierte Standardtherapie mit dreimal wöchentlich 3 Millionen IE über 2 Jahre einen signifikanten Überlebensvorteil (Garbe et al., 2002). Pegylierte Interferone wirkten sich vorteilhaft auf die Lebensqualität der Patienten aus, da sie wegen der längeren Halbwertszeit nur einmal wöchentlich appliziert werden mussten (Hauschild, Volkenandt, Garbe, 2006). In Studien wird derzeit eine Kombination aus BRAF- und MEK-Inhibitoren zur adjuvanten Therapie bei Hochrisikopatienten untersucht. Die Therapie des metastasierten Melanoms ist schwierig und wenig erfolgversprechend, da maligne Melanome schlecht auf Chemotherapie ansprechen. Eine Chemotherapie ist in der metastasierten Situation meist rein palliativ. Standard war bis vor wenigen Jahren die Monochemotherapie mit Dacarbazin (DTIC), da die Kombinationstherapie keine Vorteile gegenüber der Monotherapie brachte und Dacarbazin nur geringe toxische Eigenschaften besitzt. Neben Dacarbazin sind als Monochemotherapie noch Cisplatin und

Vindesin zugelassen. Jedoch beträgt die Ansprechrate auf die Therapie unter 20%. Polychemotherapieschemata können im Einzelfall, nach vorausgegangener frustraner Monochemotherapie, bei Patienten mit Therapiewunsch eingesetzt werden. Jedoch ist zu bedenken, dass wegen der höheren Toxizität die Lebensqualität stärker eingeschränkt ist und eine totale Remission bis auf seltene Ausnahmefälle nicht erreicht wurde (Hauschild, Volkenandt, Garbe, 2006). Eine Kombination aus Chemotherapie und Zytokinen, die sogenannte Chemoimmuntherapie, schien bei der Publikation 1997 sehr vielversprechend. Es zeigte sich jedoch bei der Endauswertung in einem Nachbeobachtungszeitraum von 6 Jahren, dass es keinen signifikanten Unterschied zur alleinigen Therapie mit Zytokinen festgestellt werden konnte (Keilholz et al., 2005). Da das Melanom zu den immunologisch kontrollierten Tumoren gehört und eine große Anzahl von Tumorantigenen und Peptiden charakterisiert wurden, wird seit Jahren versucht, Vakzine gegen das maligne Melanom zu entwickeln. Es wurden verschiedenste Konzepte entwickelt, beispielsweise mit unterschiedlichen Viren als Vektoren, die eine T-Zell vermittelte Immunantwort gegenüber Klasse 1 HLA Tumorantigenen hervorrufen sollten. Jedoch ist die klinische Wirksamkeit bislang noch reichlich unbefriedigend (Dummer, Schadendorf, 2006). Neben der Vakzinierung werden derzeit einige Therapiekonzepte mit molekularen Zielstrukturen untersucht. Durch Inhibition verschiedener Signaltransduktionswege, durch Proteasominhibitoren, Antiangiogenese und andere Konzepte versucht man, das Tumorstadium zu beeinflussen. Die bisher veröffentlichten Ergebnisse sind teilweise vielversprechend, müssen aber in randomisierten und kontrollierten Studien erst überprüft werden (Becker, Schrama, Bröcker, 2006). Erstmals konnte vor kurzem mit Ipilimumab, einem CTLA-4 Antikörper, ein verbessertes Überleben bei Patienten mit metastasiertem malignem Melanom im Vergleich zu Decarbazin gezeigt werden. Durch Blockade von CTLA, einem Rezeptor auf T-Zellen, kommt es zu einer gesteigerten Immunantwort. Bei einzelnen Patienten konnte ein Langzeitüberleben festgestellt werden (Hodi et al., 2010). Durch das Verständnis grundlegender Signaltransduktionswege, wie im nächsten Kapitel beschrieben, ergaben sich viele neue potentielle zielgerich-

tete Therapiemöglichkeiten. Antiapoptotische Faktoren wie bsw. Bcl-2 oder Bcl-xL sind in malignen Melanomen überexprimiert (Bush , Li, 2003). Oblimersen stellt eine Substanz dar, die gegen mitochondriales bcl gerichtet ist. Jedoch konnte in einer Studie keine statistisch signifikante Verlängerung des Gesamtüberlebens festgestellt werden. Die Aussagekraft der Studie ist zum einen aufgrund der Schwierigkeiten, die bcl-2 Expression zu messen, zum anderen durch die fehlende Evidenz, dass bcl-2 oder Bcl-xL Schlüsselmoleküle in der Apoptoseregulation sind, eingeschränkt (Bedikian, Milward et al., 2006). Da in sehr vielen malignen Melanomen Mutationen im RAS/RAF Signalweg vorliegen, stellen Substanzen, die in diesen Signaltransduktionsweg eingreifen, eine mögliche Therapieoption dar (Garnett, Marais, 2004). In Studien konnte gezeigt werden, dass Sorafinib, ein Serin/Threonin- und Rezeptor-kinaseinhibitor, zu einer vermehrten Tumorkontrolle führte (Amaravadi, Schuchter, et al., 2007). Diese Resultate führten zur Entwicklung eines selektiven BRAF-Inhibitors (Vemurafenib), der zur Therapie des metastasierten malignen Melanoms zugelassen wurde (Wellborck, Hurlstone et al., 2010). Seit kurzem steht mit Dabrafenib ein zweiter BRAF-Inhibitor zur Verfügung. Zudem laufen Studien zur Kombination von BRAF-Inhibitoren und MEK-Inhibitoren mit sehr vielversprechenden Ergebnissen. Mit der Bestimmung von Mutationen im BRAF Gen (bspw. V600E) liegt erstmalig auch ein Biomarker für das Ansprechen auf die Therapie vor (Wellborck, Hurlstone et al., 2010). Daneben werden Inhibitoren gegen NRAS, Wachstumsfaktoren, c-KIT und viele andere Moleküle erprobt (Lorigan, Eisen et al., 2008). Da im Falle einer Metastasierung alle Therapien palliativ sind, sollte eine möglichst gute Lebensqualität des Patienten ein Hauptziel sein. So helfen verschiedene supportive Therapien, die Lebensqualität entscheidend zu verbessern (Clemm, Schmid, Angerer, 2000).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass derzeit und in Zukunft verschiedene neue Therapiekonzepte etabliert werden, die jedoch zumeist lediglich lebensverlängernd sind. Nur in wenigen Ausnahmefällen wird ein Langzeitüberleben im Sinne einer kurativen Behandlung berichtet (Hodi et

al., 2010). Daher ist es wünschenswert, die molekulare Analytik soweit zu verfeinern, dass sich daraus Aussagen zum Ansprechen der Therapie aber auch zu Nebenwirkung und Risiken ableiten lassen.

2.6. Molekularbiologische Grundlagen

Neben den klassischen Prognosefaktoren wie der Tumordicke nach Breslow, der Mitoserate und dem Vorhandensein einer Ulzeration wurden in den letzten Jahrzehnten weitere molekulare und genetische Faktoren zur Prognoseabschätzung gesucht. Obwohl eine Vielzahl von Studien einen Zusammenhang zwischen molekularen Besonderheiten und klinischen Verläufen oder möglichen Therapieoptionen herstellten, verhalf bis auf wenige Ausnahmen (z.B. BRAF) dies keinem molekularen Marker zum Durchbruch. Jedoch wurde der genetische Rahmen für die Entstehung maligner Melanome abgesteckt, Hinweise für mögliche Therapien gegeben, aber auch die Vielzahl der Einflussfaktoren aufgezeigt (Fecher, Cummings, et al., 2007).

Der mitogen-activated protein kinase (MAPK) Signalweg ist Objekt vieler onkologischer Studien. Dieser Signalweg reguliert normalerweise Zellwachstum, Überleben und Invasion. Durch Bindung von extrazellulärer Matrix, Rezeptor Tyrosin Kinase bindende Liganden oder Integrine wird an der Zellmembran RAS-GTPase aktiviert. GTP bindet an RAS und dieses an Effektorproteine (Giehl, 2005). Das bekannteste Effektorprotein für RAS ist RAF und die Phosphatidylinositol 3- Kinase (Beeram, Patnaik, Rowinsky, 2005). Aktiviertes RAF aktiviert die MAPK/ERK Kinase. Dadurch wird extracellular signal-regulated kinase, das einzige Substrat für MEK angehäuft (Kohne, Pouyssegur, 2006).

RAS Mutationen sind häufig in Tumoren (Giehl, 2005). Neben K-RAS Mutationen sind auch N-RAS Mutationen beschrieben (Fecher, Cummings, et al., 2007). Jedoch finden sich nur in 15% der malignen Melanome der Haut RAS Mutationen (Ball, Yohn, et al., 1994). Isolierte RAS Mutationen können keine malignen Melanome hervorrufen, jedoch konnten in Kombination mit anderen

Mutationen im Mausmodell maligne Melanome erzeugt werden (Chin, Pomerantz et al., 1997).

In bis zu 66% der malignen Melanome konnten somatische BRAF Mutationen nachgewiesen werden. In den allermeisten Fällen handelt sich um eine bestimmte Punktmutation (V600E). Diese Mutation führt zu einer konstitutionellen Kinaseaktivität (Davies, Bignelli, et al., 2002). Jedoch konnten auch BRAF Mutationen in melanozytären Nävi nachgewiesen werden. Mit den BRAF-Inhibitoren Vemurafenib und Dabrafenib haben Medikamente gegen molekulare Strukturen Einzug in die Therapie gefunden. Daneben steht mit der Bestimmung von Mutationen im BRAF Gen ein Biomarker für das Ansprechen auf die Therapie zur Verfügung (Wellborck, Hurlstone et al., 2010, Velho, 2012). Der MAPK Signalweg spielt daher eine wichtige Rolle in der Entstehung von malignen Melanomen (sogenannte Driver-Mutationen), ist jedoch nicht notwendigerweise an der malignen Transformation beteiligt (Pollock, Harper et al., 2003).

Eine Schlüsselfunktion in der Karzinogenese spielt die Zellzykluskontrolle (Fecher, Cummings, et al., 2007). Die Zellproliferation wird durch Cyclin-abhängige Kinasen (CDK) reguliert. Dabei unterscheidet man aktivierende und hemmende ($p16^{\text{ink4a}}$, p21) CDKs. Cyclin und Cyclin-abhängige Kinase bilden jeweils ein Paar. In jeder einzelnen Phase des Zellzyklus spielen bestimmte CDKs eine Rolle. So wird bspw. der Übergang der G1 in die S Phase von Cyclin E/CDK2 und Cyclin D/CDK4 reguliert. Durch Phosphorylierung und Inaktivierung des Retinoblastom Proteins (Rb) kommt es zum Fortschreiten im Zellzyklus (Sherr, 1994).

Wichtige Faktoren im Retinoblastom Signalweg sind $p16^{\text{ink4a}}$ und CDKN2a. $p16^{\text{ink4a}}$ bindet und inhibiert den Cyclin D/CDK4 Komplex und verhindert somit die Phosphorylierung von Rb (Smith-Sorensen, Hovig, 1996). Mutationen in $p16^{\text{ink4a}}$ sind die häufigste Ursache für familiäre maligne Melanome (Bataille, 2000). In bis zu 40% der familiären malignen Melanome wird eine $p16^{\text{ink4a}}$ Keimbahnmutation gefunden (Newton Bishop, Harland, et al., 1999). Daneben kann es bei den sporadischen malignen Melanomfällen durch Hypermethylierung der Promoterregion zur Ausschaltung von $p16^{\text{ink4a}}$ kommen.

Auch konnte eine Korrelation zwischen niedriger Expression von p16^{ink4a} und einer Zunahme der Zellproliferation sowie einer verschlechterten Prognose festgestellt werden (Marini, Mirmohammadsadegh, 2006).

Der p53 Signalweg spielt eine entscheidende Rolle bei zellulären Einflüssen auf DNA Replikation, Stabilität des Genoms, Chromosomentrennung und Zellteilung. p53 ist ein Transkriptionsfaktor der unter Einfluss von Stressfaktoren Gene der DNA Reparatur, des Zellzyklusarrests oder der Apoptose induziert (Sherr, McCormick, 2002). Zu diesen Stressfaktoren gehören bspw. UV-Strahlung. Da p53 eine wichtige Rolle für die genetische Integrität einer Zelle spielt, ist es nicht überraschend, dass die Regulierung der Aktivität von p53 komplex ist (Giacci, Kastan, 1998). Ein Regulator von p53 ist MDM2. Dieser bindet an p53, blockiert die Transkription und macht es angreifbar für Ubiquitin-abhängige Proteasen (Harris, Levine, 2005). Ein weiterer wichtiger Faktor ist p14/p19^{ARF}. p14/p19^{ARF} bindet an MDM2 und stabilisiert so p53 (Lowe, Sherr, 2003). Obwohl p53 Mutationen in vielen Tumoren beschrieben wurden, finden sich diese selten in malignen Melanomen (bis zu 25%) (Asklen, Monstas, et al., 1998). Jedoch konnte eine Korrelation zwischen einer erhöhten Konzentration von MDM2 und dem Tumorprogress festgestellt werden (Hernber, Turunen, et al., 1998).

Der Phosphatidylinositol-3-Kinase Signalweg (PI3K) ist einer der wichtigste Signalwege in Tumoren (Cully, You et al., 2006). PI3K phosphoryliert Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP3) (Robertson, 2005). Der PI3K Signalweg wird durch RAS aktiviert, interagiert mit vielen anderen Signalwegen und führt in der Zelle zu verschiedensten Funktionen wie Proliferation, Apoptose oder auch Chemo-resistenz (Cully, You et al., 2006). PTEN reguliert den PI3K pathway herunter (Rao, Windschnitl et al., 2006)). Mutationen in Untereinheiten von PI3K werden selten in malignen Melanomen gefunden (Granville, Memmott et al., 2006).

PTEN ist ein Tumorsuppressorgen und für viele zelluläre Funktionen verantwortlich, bspw. die Inhibition des MAPK Signalwegs oder für den Zellzyklusarrest (Slipicevic, Holm et al., 2005; Wu, Goel, Haluska, 2003). PTEN Keim-

bahnmutationen verursachen das Cowden-Syndrom, eine autosomal-dominant vererbte Erkrankung mit einem erhöhten Risiko für maligne Melanome (Slipicevic, Holm et al., 2005). In etwa 5 – 20% der primären malignen Melanome lässt sich ein Verlust von PTEN Aktivität nachweisen (Wu, Goel, Haluska, 2003). Zusätzlich konnten PTEN Mutationen häufig in Zusammenhang mit BRAF Mutationen nachgewiesen werden (Tsao, Goel et al., 2004). Microphthalmia-associated transcription factor (MITF) gehört zur Gruppe der Transkriptionsfaktoren (Malik SM, Collins B et al., 2006). Eine Unterform MITF-M ist essentiell für die Entstehung von Melanozyten (Goding, 2000). MITF induziert Gene, die für die Melaninsynthese wichtig sind (Widlung, Fisher, 2003). MITF reguliert den beta-Catenin pathway herunter und den CDK2 pathway hinauf, was zu einer Zellzyklusprogression führt (Goding, Meyskens, et al., 2006). In in vitro Studien konnte gezeigt werden, dass MITF Überexpression in Kombination mit anderen Mutationen zu einer Zunahme der zellulären Transformation führt. Zusätzlich konnte in 10% der primären malignen Melanome und in 20% der metastasierten malignen Melanome eine Genamplifikation nachgewiesen werden (Davis, Kim et al, 2006). Weiterhin wurde gezeigt, dass zirkulierende MITF Produkte mit einem höheren TNM-Stadium assoziiert sind (Koyanagi, O`Day et al., 2005).

Einen Tyrosinkinase Inhibitor stellt c-KIT dar. C-KIT wird durch MAPK und PI3K herunterreguliert, ebenso wie durch Phosphorylase C oder MITF. Dieser Signalweg ist essentiell für die Entwicklung von Melanozyten, der Differenzierung, der Proliferation sowie dem Überleben und der Migration von Zellen. Das Überleben von Melanozyten ist vom c-KIT Signalweg abhängig, jedoch haben melanozytäre Nävi diese Eigenschaft verloren (Grichnik, 2006). Die Expression von c-KIT in malignen Melanomen wurde vielfach untersucht und lieferte verschiedenste Auskünfte. Jedoch konnte kein Zusammenhang zwischen der c-KIT Expression und anderen malignen Melanomparametern gefunden werden. C-KIT hat als einzelner Faktor betrachtet keine prognostische Bedeutung hinsichtlich des progressionsfreien Überlebens (Janku, Novotny et al., 2005) (Fecher, Cummings et al., 2007).

Die Erfolge hinsichtlich der Erforschung verschiedenster Signaltransduktionswege und deren Interaktion war nur durch moderne biotechnologische Verfahren möglich. Jedoch sind weitere Anstrengungen notwendig, um die Interaktionen und Einflussfaktoren auf die Signaltransduktion sowie deren möglichen therapeutischen Nutzen zu erforschen. Tissue Microarrays können in diesem Zusammenhang sehr hilfreich sein, da auf Proteinebene eine Vielzahl von Material gleichzeitig untersucht werden kann.

2.7. Verlauf und Prognose

Nicht nur für die Therapieentscheidung, sondern auch für den weiteren Verlauf sind Klassifikationen sinnvoll. Sie helfen, das Ausmaß der Erkrankung und die Prognose abzuschätzen. Die Bestimmung der Tumordicke nach Breslow ist zur Zeit der wichtigste Parameter zur Einschätzung der Prognose und des Überlebens. Neben dem Breslow Index entwickelte Clark 1967 noch eine eigene Klassifikation, die die Eindringtiefe der Melanomzellen in die unterschiedlichen Schichten der Haut beschreibt (Volkenandt, 2005). Fast alle soliden Tumoren werden nach der TNM - Klassifikation eingeteilt. Sie unterteilt je nach Tumordicke, Anzahl der von Metastasen befallenen Lymphknoten und nach Fernmetastasen. Anhand der TNM - Klassifikation kann der Tumor in verschiedene Stadien eingeteilt werden, die sowohl prognostisch als auch therapeutisch relevant sind.

80% der Patienten haben nach der Exzision des Primärtumors keine weiteren Folgen der Erkrankung. Bei den restlichen 20% der Patienten finden sich zum Zeitpunkt der Diagnosestellung oder im Verlauf Lymphknoten- und oder Fernmetastasen. (Volkenandt, 2005). Grundsätzlich gilt, dass eine Metastasierung noch nach Jahren oder Jahrzehnten möglich ist (Weide, 2006). Prognose des malignen Melanoms ist sehr unterschiedlich. So variiert die 10-Jahresgesamtüberlebensrate zwischen 3% und 97%. Die individuelle Prognose kann anhand der Tumordicke nach Breslow, der Eindringtiefe nach Clark, der Anzahl der Mitosen und dem Vorhandensein einer Ulzeration eingeschätzt werden. Grundsätzlich gilt: Je höher die Tumordicke, desto

schlechter ist die Prognose des Patienten. So besteht zwischen der Tumordicke 0 bis 4 mm ein fast linearer Zusammenhang mit der Prognose des Patienten. Ab einer Tumordicke von 4 mm fehlt jegliche Korrelation (Balch et al., 2001). Auch das Vorhandensein einer Ulzeration verschlechtert die 10-Jahresüberlebenswahrscheinlichkeit. Daneben sind auch Faktoren wie die Lokalisation des Melanoms von Bedeutung. So haben Melanome an den Extremitäten eine bessere Prognose als Melanome am Kopf oder Stamm (Herz., 2005). Schon seit einiger Zeit wird versucht, neben der Tumordicke und dem Grad der Metastasierung neue Parameter für die Prognoseabschätzung zu finden.

Stadium	Primärtumor	Prognose (10-Jahres-Überlebensrate)
0	Melanoma in situ	100%
I		90-97%
II		28-67%
III		19-28%
IV		3%

Abbildung 2.5.: Prognose des malignen Melanoms

2.8. Nachsorge

In den letzten Jahren wurde die Nachsorge bei Patienten mit malignen Melanomen in Frage gestellt. Einerseits wird kritisiert, dass die Untersuchungen für den Patienten zeitaufwendig und psychisch belastend seien. Zum anderen sei bisher kein Nachweis für den Nutzen und die Verbesserung des Gesamtüberlebens erbracht worden. Jedoch können andererseits tumor- oder therapieassoziierte Probleme eher festgestellt und behandelt werden. Für viele Patienten stellt die Nachsorge auch eine Beruhigung dar. Daneben kann eine Progression der Erkrankung früher erkannt werden, Zweitmelanome frühzeitig entdeckt und therapiert und eine adjuvante Therapie eingeleitet und überwacht werden. Je nach Tumorstadium und Dicke sind unterschiedliche Nachsorgeschemata festgelegt worden. Sie beruhen auf der Auswertung

epidemiologischer Daten, wonach eine Progression der Erkrankung meist 2 bis 3 Jahre nach Diagnosestellung erfolgt. Außerdem treten in den ersten Jahren die meisten therapieassoziierten Probleme auf. Neben einer ausführlichen Anamnese und klinischen Untersuchung werden je nach Stadium Laboruntersuchungen, Lymphknotenultraschall, NMR des Schädels, CT von Thorax und Abdomen angefertigt, sowie PET-CT Untersuchungen. Im Folgenden sind die derzeitigen Nachsorgeschemata dargestellt.

Tabelle 2.6. Empfehlungen für die Nachsorge

Stadium	körperliche Untersuchung (1.-5. Jahr)	körperliche Untersuchung (6.-10. Jahr)	Lymphknotenultraschall (1.-5-Jahr)	Blutuntersuchung, S100 (1.-5. Jahr)	bildgebende Untersuchung (1.-5. Jahr)
Ia	6	6 - 12	keine	keine	keine
Ib+IIb	3	6 -12	6	3	keine
IIc-IV	3	6	3 - 6	3 - 6	6

Da auch noch nach Jahrzehnten Metastasen auftreten können, ist eine Nachsorge lebenslang erforderlich (Gummer, Schmid, Clemm, Volkenandt, 2000). Jedoch sollte wie bei anderen Tumoren die Nachsorgestrategie überdacht werden. So wurden beispielsweise in der Brustkrebsnachsorge die Intervalle verlängert, keine apparativen Methoden mehr eingesetzt und auf die Bestimmung von Tumormarkern verzichtet, da die frühzeitige Metastasendiagnostik keinen Vorteil im Überleben brachte, sondern nur den Zeitraum zwischen Erstdiagnose und Progress verkürzt (Kreienberg et al., 2004).

Das maligne Melanom stellt sowohl in der adjuvanten wie auch in der metastasierten Situation eine Herausforderung dar. Aufgrund der molekularen und genetischen Erkenntnisse ist eine weitere Differenzierung, Individualisie-

rung und Stratifizierung der Patienten, aber auch der Therapiemöglichkeiten zu erwarten. Daher müssen weitere Parameter und Instrumente gefunden werden, um dies zu ermöglichen. Der Tissue Microarray stellt eine Möglichkeit dar, um an einer großen Zahl von Patienten verschiedenste potentielle Biomarker zu überprüfen.

3.1. Projekt: Mehrdimensionale Melanombiomarker - Initiative Regensburg-Hamburg-Zürich

3.1.1. Ideen und Ziele

Die Prognose eines Patienten mit malignem Melanom lässt sich nur bedingt von histologischen und klinischen Parametern ableiten. Seit Jahrzehnten wird versucht, von der Tumordicke unabhängige Prognosefaktoren zu finden, um eine individualisierte Therapie der Erkrankung zu ermöglichen. Bisherige Versuche, geeignete Marker zu finden, waren aufgrund der zu geringen Fallzahlen, fehlender klinischer Patientendaten oder der fehlenden Vernetzung zwischen Genom- und Proteinebene erfolglos. In der mehrdimensionalen Melanombiomarker - Initiative Regensburg - Hamburg - Zürich wurde der Versuch unternommen, durch Kooperation verschiedener Hochschulen, Abteilungen und Arbeitsbereiche bisher aufgetretene Schwierigkeiten zu beheben und somit eine höhere Aussagekraft der Ergebnisse zu erreichen. Im Rahmen dieser Dissertation sollte ein 1500 Fälle umfassender Melanom-Tissue Microarray (TMA) mit vollständig dokumentierten klinischen Langzeitverläufen erstellt werden. Durch die Zusammenarbeit der Klinik und Poliklinik für Dermatologie der Universität Regensburg und der Universitätshautklinik Hamburg-Eppendorf sollten für die Erstellung des Tissue Microarrays ungefähr 1500 Melanom Paraffinblöcke sowie die dazugehörigen vollständig dokumentierten Langzeitverläufe zur Verfügung stehen. 850 Fälle sollten hierfür aus Regensburg beigesteuert werden, 650 Fälle aus Hamburg. Die ursprünglich zu testenden 52 Proteine wurden aufgrund von Forschungsergebnissen der Arbeitsgruppe von Prof. Vogt, Ergebnissen der Kooperationspartner und intensiver Literaturrecherche ausgewählt. Die Funktionen dieser Proteine finden sich im Zellzyklus, der Apoptose, der Signaltransduktion, sowie der Melanomdifferenzierung. Darüber hinaus werden auch Proteine der Angiogenese und Lymphangiogenese untersucht. In der untenstehenden Tabelle sind eine Auswahl der untersuchten Proteine und ihrer Funktion aufgelistet. Seit Juni 2007 wurde die Tumor – Genomik - Ebene von der Abtei-

lung für Onkogenomik der Universität Regensburg an Melanommetastasen untersucht. Diese Untersuchung diente in erster Linie dem Auffinden von Amplikons als Hinweis für mögliche Biomarker. Die Keimbahn – Genomik - Ebene, die am Institut für Pharmazeutische Wissenschaften der ETH Zürich erforscht wurden, korrelierte SNP Untersuchungen mit der Expression der betreffenden Proteine. Die umfangreichen Daten und Ergebnisse wurden am Zentrum für Klinische Studien der Universität Regensburg statistisch ausgewertet. Ziel der mehrdimensionalen Melanombiomarker Initiative Regensburg – Hamburg - Zürich, die in diesem Umfang bisher nicht durchgeführt wurde, ist es, eine Serie biologischer Marker zu finden, die von prognostischer oder therapeutischer Relevanz sind. Zudem sollten bisherige Ergebnisse an einem größeren Kollektiv validiert werden. Durch integrale Datenarbeit sollten Markerkonstellationen ermittelt werden, die es ermöglichen, das individuelle Progressrisiko besser abzuschätzen und somit zukünftig eine Optimierung der Therapiekonzepte zu begünstigen.

Tumorbiologische Funktion:	Proteine:
Apoptoseinhibitoren:	Akt3, Bcl2, Bclx-L, Survivin
Proto-Onkogene:	Bcl6, B-Raf, C-kit, C-myc
Zell-Zykluskontrollproteine:	Cyclin A, Cyclin D1, Cyclin D3, Cyclin E, CDK1, CDK2, CDK4, CDK6, Hdm2, P14, P16, P21, P27, P53, Rb, Rb P, SKP 2
Proangiogenetische Proteine:	COX2, PIGF, VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3
DNA-Reperaturproteine:	MLH 1, MSH 2
Transkriptionsfaktoren:	MUM-1, NFKappaB, STAT1, Phospho-β-Catenin,
Andere:	Bmi 1, Caveolin, ephrin-B2, Ki-67, MTAP, MEL 18, N-RAS, P-cadherin, PPARγ, PTEN, TGF-β1, Topoisomerase lia

Abbildung 3.1.: Untersuchte Proteine und ihre Funktion

3.1.2. Erstellung des Regensburger Patientenkollektivs

Für die Erstellung des Tissue Microarrays wurden Patienten mit malignen Melanomen ausgewählt, denen im Zeitraum von 1999 bis 2005 eine Blutprobe im Rahmen einer vorausgegangenen Studie zur Bestimmung der genomischen DNA entnommen worden war. Aus diesem Patientenkollektiv wurden diejenigen ausgewählt, deren Paraffinblock verfügbar war. Alle Patienten, die mit der Verdachtsdiagnose malignes Melanom, Rezidiv eines malignen Melanoms, Metastase oder zur Nachexzision bei vorbekanntem malignen Melanom stationär aufgenommen wurden, wurde im Rahmen der Studie 10ml EDTA Blut entnommen. Im Anschluss wurden die persönlichen Daten der Patienten pseudonymisiert. Dabei nummerierte eine Mitarbeiterin der Klinik für Dermatologie die Blutproben mit einer Identifikationsnummer gemäß der Reihenfolge des Eingangs der Blutprobe und des jeweiligen Jahres durch. Gleichzeitig wurde eine Liste erstellt, die es ermöglichte, die Blutprobe der jeweiligen Person zuzuordnen. In dieser Liste wurde neben der Identifikationsnummer auch das Entnahmehjahr, der Vor - und Zuname des Patienten, dessen Geburtsdatum sowie das Entnahmedatum der Blutprobe registriert. Ein entsprechender Ethikantrag wurde positiv beschieden (07/093). Da es sich als unpraktikabel erwies, die Identifikationsnummer auf ein Jahr zu beschränken wurde ab dem Jahr 2000 rückwirkend für alle bereits auf der Liste vorhandenen Patienten und alle neu hinzukommenden eine fortlaufende sogenannte „neue Nummer“ vergeben. So entstand ein gewachsenes Kollektiv mit 968 Patienten und den dazugehörigen Blutproben. Wegen anfänglicher Probleme bei der Materialgewinnung sowie bei der Bearbeitung der Daten und der Liste beschloss die Studienleitung, das Patientenkollektiv auf Proben und Daten zu beschränken, die ab dem 1. Januar 2000 gewonnen worden waren. Das Kollektiv umfasste nunmehr 842 Datensätze. Zusätzlich wurden noch 12 Patienten aus dem Jahr 1999 ausgewählt, die wegen einer raschen Progredienz der Erkrankung oder mehrerer separater Melanome von besonderem Interesse waren. Der untenstehenden Graphik ist die Verteilung der einzelnen Patienten auf das jeweilige Jahr zu entnehmen. Im Dezember 2005 wurde das Kollektiv mit

Im Dezember 2005 wurde das Kollektiv mit einem Umfang von 854 Patienten für die mehrdimensionale Melanombiomarker Initiative geschlossen.

Verteilung der gesammelten Patienten über die Jahre

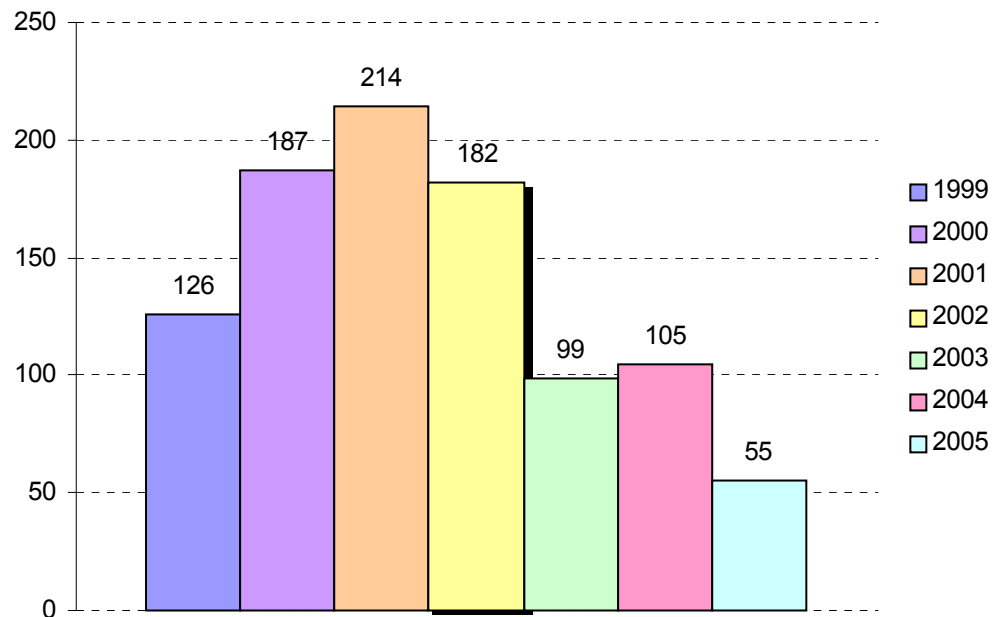


Abbildung 3.2.: Verteilung der Anzahl der Studienpatienten von 1999-2005

3.1.3. Zusammenstellung der Patientenverlaufsdaten

Die so gewonnenen Patientendaten sollten mithilfe der Datenbank des Tumorzentrum Regensburg und mittels Aktenstudium zu einem umfangreichen Patienten Follow up ergänzt werden. Das Tumorzentrum Regensburg erstellte dabei anhand der Liste des Ursprungskollektivs ein Patienten Follow up aus der Datenbank des Tumorzentrum. Die Daten des Tumorzentrum Regensburgs stammen aus Arztbriefen und Dokumentationsbögen, die für jeden Patienten im Raum Niederbayern/Oberpfalz mit einer bösartigen Tumorerkrankung ausgefüllt werden müssen. Auch alle Folgebriefe und Todesbescheinigungen werden an das Tumorzentrum weitergeleitet. Damit ist eine nahezu lückenlose Dokumentation des Krankheitsverlaufs möglich. Der

Nachbeobachtungszeitraum endete am 31.07.2006. Damit beträgt der minimale Nachbeobachtungszeitraum 6 Monate, der maximale 186 Monate. Das mediane Follow up belief sich auf 51,5 Monate. Neben Angaben des Vor- und Zunamens, des Geburtsdatums, der neuen Nummer und des Abnahmedatums der Blutprobe, die bereits bei der Erstellung des Patientenkollektivs dokumentiert wurden, enthält das Follow up auch die exakte Diagnose, Grad und Lokalisation der Metastasierungen, sowie die durchgeführten Therapien. Zur Berechnung des mittleren Erkrankungsalters, des rezidivfreien Überlebens und des Gesamtüberlebens, mussten zusätzlich zum Geburtsdatum noch der derzeitige Status des Patienten, d.h. ob der Patient am Ende des Nachbeobachtungszeitraums noch lebte oder bereits verstorben war, eventuell das Todesdatum, das Erstdiagnosedatum und das Rezidivdatum festgehalten werden. Angaben zur genauen Diagnose, zur Haupt- und Seitenlokalisation, sowie die primäre TNM - Klassifikation, das Stadium, der Clark-Level und die Tumordicke ermöglichen Aussagen, ob ein Patientenkollektiv repräsentativ ist. Weitere wichtige Informationen liefern die Anzahl und der Zeitpunkt des Auftretens von Metastasen und deren Lokalisation. Aus diesen Daten kann der Zeitraum zwischen der Erstdiagnose und dem Lokalrezidiv, bzw. dem Progress berechnet werden. Angaben hinsichtlich der Metastasierung, dem Auftreten eines Progresses und dessen Ausmaß sind für eine Studie mit der Zielsetzung, neue von der Tumordicke unabhängige Biomarker für die Vorhersage eines Progresses und das Ansprechen einer Therapie zu finden, unerlässlich. Das Follow up dokumentiert nicht nur die primäre Therapie, sondern auch die Folgetherapien, wie zum Beispiel Chemo- oder Immuntherapien, den Zeitpunkt des Therapiebeginns, das Therapieschema und den Einschluss in Studien. Weitere maligne Erkrankungen wurden im Patienten Follow up ebenso angegeben, da sie Hinweise auf zusätzliche Einflussfaktoren liefern könnten, aber auch je nach Erkrankung die Überlebenszeit beeinflussen. Fehlende bzw. lückenhaft vorhandene Daten wurden mithilfe der stationären und ambulanten Patientenakten der Klinik und Poliklinik für Dermatologie der Universität Regensburg so weit möglich vervollständigt. Da die Erstellung des Patienten Follow up in Zusammenarbeit mit einer Stu-

die zur Genotypisierung verschiedener SNPs von Dr. Christoph Wissmann (ETH Zürich) geschah, wurden zunächst nur 730 der ursprünglich 854 Patientenfälle in dieser ausführlichen Form dokumentiert.

3.1.4. Vervollständigung und Abgleich der Daten mit Patientenakten

Wie bereits erwähnt, musste das Patienten Follow up durch Daten aus den ambulanten und stationären Patientenakten vervollständigt werden. Der Schwerpunkt lag dabei auf der Ergänzung der TNM Klassifikation, des Tumorstadiums, des Clark-Levels, sowie der Tumordicke. Diese Informationen geben wichtige Hinweise, inwieweit das Patientenkollektiv repräsentativ für die Gesamtheit aller Melanompatienten ist und ermöglichen eine Einordnung der verschiedenen Schweregrade der Erkrankung. Das Aktenstudium war hauptsächlich bei Primärtumoren mit einem älteren Erstdiagnosedatum notwendig, da in den Arztbriefen nicht immer vollständige Angaben festgehalten worden waren. Dabei fehlte dem Tumorzentrum Regensburg 49- mal die Einordnung des Tumors, 39- mal die Einordnung des Lymphknotenstatus und 35- mal die Einordnung des Grads der Fernmetastasierung in die TNM Klassifikation. Innerhalb dieser drei Gruppen ergaben sich Überschneidungen, was bedeutete, dass die Patienten mit fehlenden Angaben häufig identisch waren. Des Weiteren fehlten Angaben zur Tumordicke in 73 und des Clark Levels in 44 Fällen. Diese Daten konnten durch Durchsicht der histologischen Befunde in einer Vielzahl der Fälle eruiert werden, wie die untenstehenden Graphiken beweisen. Das Tumorzentrum Regensburg identifizierte 16 Patienten ohne Nachweis eines Melanoms. Des weiteren waren 60 Patienten im Tumorzentrum Regensburg nicht registriert. Dafür sind zwei mögliche Ursachen verantwortlich. Zum Einen werden im Tumorzentrum Regensburg ausschließlich Patienten aus dem Raum Niederbayern/Oberpfalz gemeldet, zum anderen befanden sich auf der Ausgangsliste auch Patienten ohne malignes Melanom, da Patienten zum Teil bereits vor der histologischen Sicherung der Diagnose in die Studie eingeschlossen worden waren. Im ersten Fall konnten durch Aktenstudium der Ambulanz- oder Stationsakte

der Klinik und Poliklinik für Dermatologie der Universität Regensburg fehlende Angaben aus den jeweiligen Patientenakten ergänzt werden. Bei allen anderen nicht registrierten Patienten wurde mit Hilfe des digitalen Histologiearchives oder ebenfalls mit Patientenakten versucht, die endgültige Diagnose zu sichern. Im Histologiearchiv werden alle dermatohistologischen Befunde der Klinik und Poliklinik für Dermatologie der Universität Regensburg gespeichert und können mit Hilfe von Name und Geburtsdatum des Patienten abgerufen werden. Von den 60 nicht gemeldeten Patienten wurde bei 52 Patienten kein malignes Melanom, sondern beispielsweise ein Nävuszellnävus oder eine Lentigo maligna diagnostiziert. Bei den übrigen Patienten wurde ein Melanoma in situ diagnostiziert, das wegen der fehlenden Metastasierungstendenz nicht immer an das Tumorzentrum gemeldet wird. 16-mal musste die neue Nummer korrigiert werden, da die Patienten doppelt in der Ausgangsliste geführt worden waren. In vielen Fällen war die umfangreiche Suche und Ergänzung des Patienten Follow ups erfolgreich. Sehr selten konnte aufgrund fehlender Informationen der Datensatz letztlich nicht vervollständigt werden. Ein komplett vollständiger Datensatz konnte von 638 Patienten erhoben werden.

Verteilung der fehlenden Angaben zur Tumordicke

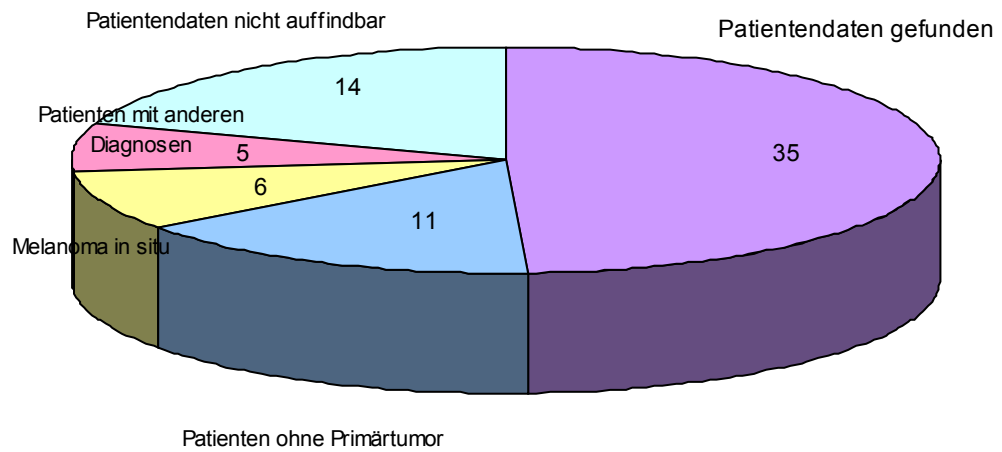


Abbildung 3.3.: Ergebnisse der Datensuche für die Tumordicke

Verteilung der fehlenden Angaben zur T Stadium der TNM Klassifikation

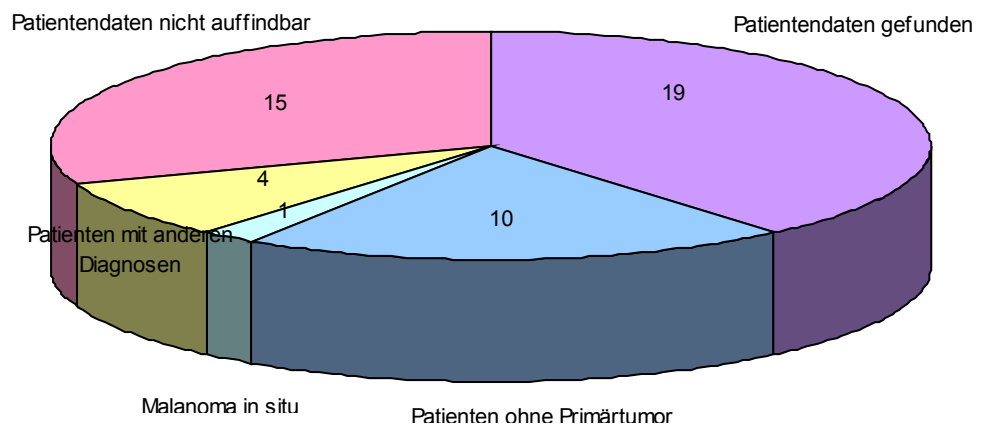


Abbildung 3.4.: Ergebnisse der Datensuche für das Tumorstadium der TNM Klassifikation

Verteilung der fehlenden Angaben zum N Stadium der TNM Klassifikation

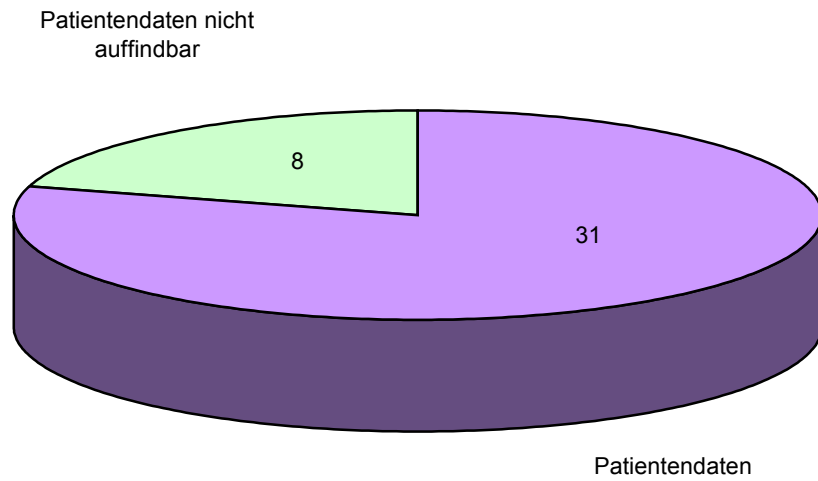


Abbildung 3.5.: Ergebnisse der Datensuche für den Lymphknotenstatus der TNM Klassifikation

Verteilung der fehlenden Angaben zum M Stadium der TNM Klassifikation

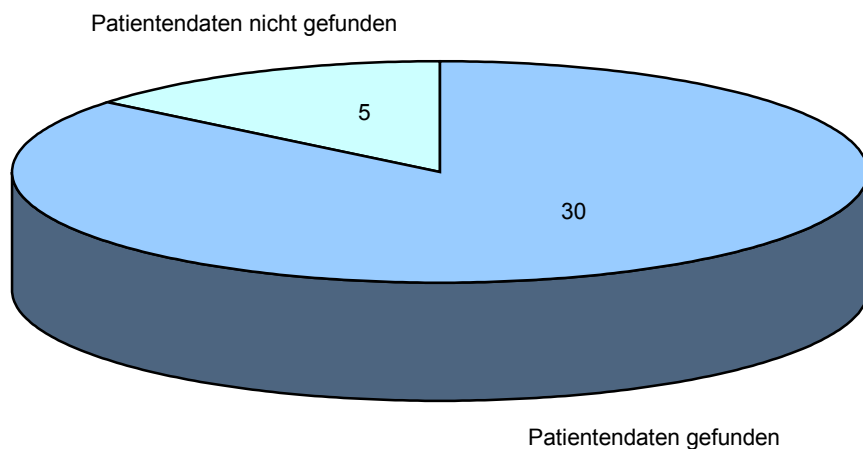


Abbildung 3.6. Ergebnisse der Datensuche für den Metastasenstatus der TNM Klassifikation

3.2. Erstellung eines Melanom Tissue Microarrays

3.2.1. Zusammenstellen und Sichten des vorhandenen histologischen Materials

Zur Erstellung eines Tissue Microarrays wurden sowohl die in Paraffin eingebetteten Gewebestücke als auch die dazugehörigen HE Schnitte benötigt. Zunächst musste zu jedem der auf der Liste befindlichen Patienten der histologische Befund mit der Histologienummer des Präparates herausgesucht werden. Dies erfolgte zum einen durch das digitale Histologiearchiv der Klinik und Poliklinik für Dermatologie der Universität Regensburg, zum anderen durch Aktenstudium. Hierfür wurde die Ausgangsliste Patient für Patient abgearbeitet und alle histologischen Befunde mit der Diagnose eines primären malignen Melanoms ausgedruckt. Es zeigte sich hierbei, dass bei einem Teil der Patienten eine andere Diagnose gestellt worden war. Außerdem fanden sich bei 237 Patienten zunächst nur histologische Befunde über Reste eines malignen Melanoms bzw. Narben nach Exzision eines malignen Melanoms. Nach dem Ausdrucken der histologischen Befunde wurden jeweils die zur Histologienummer passenden Paraffinblöcke und HE Schnitte aus dem histologischen Archiv der Dermatologie der Universitätsklinik Regensburg herausgesucht. Das histologische Archiv der Klinik und Poliklinik für Dermatologie der Universität Regensburg umfasst alle dort gewonnenen histologischen Gewebe sowie die dazu angefertigten Schnittpräparate der letzten zehn Jahre. Es stellte sich heraus, dass bei 60 Patienten der Paraffinblock fehlte und bei 21 Patienten der HE Schnitt. Durch intensive Suche in für andere Studien zusammengestellten Kohorten konnten noch weitere Paraffinblöcke gefunden werden. Es blieben jedoch 27 Paraffinblöcke unauffindbar. War der Paraffinblock vorhanden und es fehlte lediglich der HE Schnitt, so wurden von den Paraffinblöcken neue HE Schnitte angefertigt. Die herausgesuchten Paraffinblöcke und HE Schnitte wurden nach nochmaliger Kontrolle der Histologienummern und des Histologiejahrs nach der neuen Nummer sortiert und in Versandboxen zwischengelagert. Die dazugehörigen Histologiebefunde versah man dafür mit der aus der Ursprungsliste stammenden „neuen Nummer“.

Außerdem wurden die Histologiebefunde je nach Vorhandensein von Paraffinblock und HE Schnitt geordnet. Einige Paraffinblöcke waren aufgrund des schlechten Zustandes des histologischen Materials bzw. der Größe des Materials nicht für die Erstellung des Tissue Microarrays geeignet. Darüber hinaus konnte nicht jedem Patienten ein Paraffinblock und ein HE Schnitt zugeordnet werden. In einem Teil der Fälle wurden bei einem Patienten mehrere verschiedene einzelne Melanome exzidiert. Diese wurden alle, wenn vorhanden, zur Erstellung des Tissue Microarrays verwendet, da eine mögliche Übereinstimmungen oder Unterschiede in der Expression von Antigenen ebenso untersucht werden sollten. Zum anderen waren einer Histologienummer mehrere Paraffinblöcke und HE Schnitte zuzuordnen. Wegen der Größe des Präparates war in diesen Fällen das Gewebestück nicht auf einem Paraffinblock angeordnet, sondern auf mehrere (bis 20) einzelne Paraffinblöcke verteilt worden. Auch hier wurden alle zur Verfügung stehenden histologischen Materialien verwendet. Neben den aus dem Archiv der Klinik und Poliklinik für Dermatologie der Universität Regensburg stammenden Paraffinblöcken und HE Schnitten konnten noch zu 11 Patienten Paraffinblöcke und HE Schnitte aus dem Archiv des pathologisch-anatomischen Instituts der Universität Regensburg gefunden werden.

3.2.2. Abgleich der Patientenverlaufsdaten mit dem vorhandenen histologischen Material

Nach dem Erstellen und Vervollständigen des Patienten Follow ups und dem Abschluss der histologischen Materialgewinnung sollten nun alle bisher gewonnenen Informationen miteinander abgeglichen werden. Dafür mussten zunächst die im Patienten Follow up aufgeführte „neue Nummer“, der Vor- und Zuname und das Geburtsdatum mit den Daten auf den histologischen Befunden verglichen werden. Hierdurch konnte ausgeschlossen werden, dass es zu einer Verwechslung von Patientendaten und histologischem Material gekommen war. Anschließend wurden die Histologienummern, die auf dem histologischen Befund vermerkt sind, mit der Nummer verglichen, die

sich auf dem Paraffinblock, bzw. auf dem HE Schnitt befindet. In 12 Fällen stimmten die Histologienummern nicht überein. Daraufhin wurden die falschen Paraffinblöcke und HE Schnitte ausgetauscht. In den meisten Fällen handelte es sich um Fehler bei der Ablesung der Histologienummer oder des Histologiejahres. Außerdem wurden nach Übereinstimmungen bei fehlenden Paraffinblöcken und fehlenden Daten im Follow up gesucht. Nur in wenigen Fällen ergaben sich Übereinstimmungen. Aufgrund des Fehlens von verwertbarem histologischem Material, konnten weitere 57 Patientendatensätze nicht ausgewertet werden. Die Studie umfasste nunmehr 581 Patientendaten. Das histologische Material stammte bis dato aus dem Archiv der Dermatologie der Universitätsklinik Regensburg und es fehlten noch 237 Paraffinblöcke und HE Schnitte anderer pathologischer, bzw. dermatohistologischer Institute bzw. niedergelassener Pathologen.

3.2.3. Zusammenstellung und Sichten von fremden histologischen Präparaten

Da zu 237 Patienten das histologische Material in anderen pathologischen oder dermatohistologischen Abteilungen befundet worden war, wurden die histologischen Befunde mit der Diagnose malignes Melanom aus den Patientenakten herausgesucht und ausgedruckt. Die vorhandenen Befunde mussten wiederum mit der „neuen Nummer“ versehen und nach dieser sortiert werden. Danach wurden Listen von Patienten erstellt, deren histologische Befunde aus der selben Praxis, bzw. aus einem Institut stammten. Die Diagnosen waren sowohl von niedergelassenen Pathologen, Dermatohistopathologen als auch von pathologisch-anatomischen und dermatologisch-pathologischen Instituten aus Deutschland und Österreich erstellt worden. In Zusammenarbeit mit der Studienleitung wurde ein Serienbrief angefertigt, indem kurz die Ziele, Inhalte und bisherigen Forschungsergebnisse dargelegt und die niedergelassenen Ärzte, bzw. die Leiter der Institute gebeten wurde, die entsprechenden Paraffinblöcke und HE Schnitte an die Klinik und Poliklinik für Dermatologie der Universität Regensburg zu versenden. Der Brief er-

läuterte auch, dass Paraffinblöcke durch Gewebstanzen, die für die Erstellung des Tissue Microarrays notwendig sind, beschädigt werden. Anbei befand sich auch eine Liste mit den jeweiligen Patientennamen, Geburtsdaten und soweit vorhanden, den Histologienummern der jeweiligen Praxis, bzw. des jeweiligen Institutes. Die Briefe wurden von der Studienleitung unterzeichnet und versandt. Mitte Januar 2007 wurden 39 Briefe verschickt und die Antworten darauf gingen bis April 2007 ein. Zu 81 Patienten erhielten die Studienleitung histologisches Material, zum Teil Paraffinschnitte und dazupassende HE Schnitte, zum Teil lediglich Paraffinblöcke. Auch hierunter fanden sich zu vielen Patienten mehrere Paraffinblöcke, die alle für die Erstellung des Tissue Microarrays verwendet wurden. Da Paraffinblöcke nur wenige Jahre aufgehoben werden müssen, war es nicht möglich, von allen Patienten histologisches Material zu erhalten. Die Paraffinblöcke und HE Schnitte wurden ausgepackt und eine Eingangsliste erstellt. Darauf sind neue Nummer, Name und Geburtsdatum des Patienten, der Absender, sowie die Anzahl der Paraffinblöcke und HE Schnitte jedes Patienten vermerkt. Bei allen Paraffinblöcken, zu denen kein HE Schnitt mitgesandt worden war, fertigte eine Mitarbeiterin der Klinik und Poliklinik für Dermatologie noch einen neuen HE Schnitt an. Das histologische Material wurde mit einem orangen Klebepunkt und der neuen Nummer versehen. Wegen der besseren Übersicht wurde anschließend das zugesandte Material nach der neuen Nummer sortiert und in Aufbewahrungsboxen gelagert. Um Fehler auszuschließen, wurde im Anschluss noch einmal neue Nummer, Name, Geburtsdatum, Histologienummer, Anzahl des histologischen Materials und der Einsender miteinander verglichen. Die Eingangsliste enthält neben dem Absender auch dessen Adresse, sodass bei der Rücksendung nicht noch einmal die richtige Anschrift gesucht werden musste.

3.2.4. Zusammenstellung des Ausgangsmaterials

Das Ausgangsmaterial für die Erstellung des Tissue Microarray war somit vorhanden, jedoch musste es noch sortiert, kontrolliert und beschriftet werden. Zunächst wurden alle Paraffinblöcke und HE Schnitte mit der neuen Nummer beschriftet, falls das noch nicht geschehen war. Auch erhielten alle zugesandten Paraffinblöcke einen orangen, alle aus dem Archiv der Dermatologie stammenden Paraffinblöcke einen weißen Klebepunkt. Dadurch können die Präparate besser unterschieden werden und das Zurücksenden des Materials an die Einsender wurde erleichtert. Im Anschluss wurden alle Paraffinblöcke nach der neuen Nummer sortiert und in großen Aufbewahrungsboxen eingeordnet. Die HE Schnitte wurden ebenfalls sortiert, wobei man im gleichen Arbeitsschritt noch den jeweils zum Paraffinblock passenden HE Schnitt heraussucht, mit dem Paraffinblock verglich und überzählige Schnitte separat aufbewahrte. Diese Maßnahme war notwendig geworden, da alle histologischen Schnitte zur jeweiligen Histologienummer aus dem Archiv herausgesucht worden waren. Darunter befanden sich auch immunhistochemische Färbungen, die für die Erstellung des Tissue Microarrays ungeeignet waren. Schließlich wurden auch die HE Schnitte nach der neuen Nummer geordnet und sicher aufbewahrt. Zur Anfertigung des Tissue Microarrays mussten nun auf den Paraffinblöcken repräsentative Areale des malignen Melanoms markiert werden, da ansonsten möglicherweise kein Tumorgewebe im Tissue Microarray enthalten gewesen wäre und falsche Ergebnisse entstanden wären. Dafür wurden die HE Schnitte von Dr. Stefanie Meyer und Dr. Peter Wild unter dem Mikroskop geprüft und relevante Stellen mit Folienstiften markiert. Nachfolgend kontrollierte Prof. Vogt die Markierungen und korrigierte sie gegebenenfalls. Da jedoch Gewebe aus den Paraffinblöcken entnommen werden sollte, mussten die Markierungen von dem jeweils passenden HE Schnitt auf den Paraffinblock übertragen werden. Dafür wurden zunächst die auf dem HE Schnitt und Paraffinblock vorhandenen neuen Nummern und Histologienummern verglichen, anschließend der HE Schnitt auf den Block gelegt, um eine Übereinstimmung zwischen Schnitt

und Block festzustellen. Nach diesem Kontrollvorgang konnte die Markierung vom HE Schnitt auf den Paraffinblock übertragen werden. Nachdem nun das histologische Material vollständig und für die Anfertigung des Tissue Microarrays vorbereitet war, wurde eine Tabelle erstellt, die alle Patienten enthielt, deren histologisches Material vollständig vorhanden war. Auf dieser Tabelle sind neben der neuen Nummer, der Histologienummer, des Namens und des Geburtsdatums auch aufgeführt, woher die Probe stammt und wie viele Paraffinblöcke und HE Schnitte pro Patient verwendet wurden. Insgesamt konnte zu 464 Patienten histologisches Material gefunden werden. Dabei handelt es sich um 675 Paraffinblöcke und ebenso viele HE Schnitte. Aufgrund der Größe der einzelnen Spots, der Gesamtgröße des Tissue Microarrays oder zu wenig verwertbarem Material der Paraffinblöcke konnten lediglich 368 einzelne Spots für die Verwendung des Tissue Microarrays berücksichtigt werden. Neben diesem Tissue Microarray, der Gewebestücke für die Untersuchung von Biomarkern enthält, wurde ein zweiter Tissue Microarray erstellt. Dieser umfasste 101 Gewebeproben (62 Nävuszellnävi und 39 Melanommetastasen). Dabei handelt es sich neben Positiv- und Negativkontrollen, um eine weitere Kontrollgruppe. Diese sollte eine bessere Differenzierung zwischen zellulären Veränderungen gut- bzw. bösartiger Zellen ermöglicht werden.

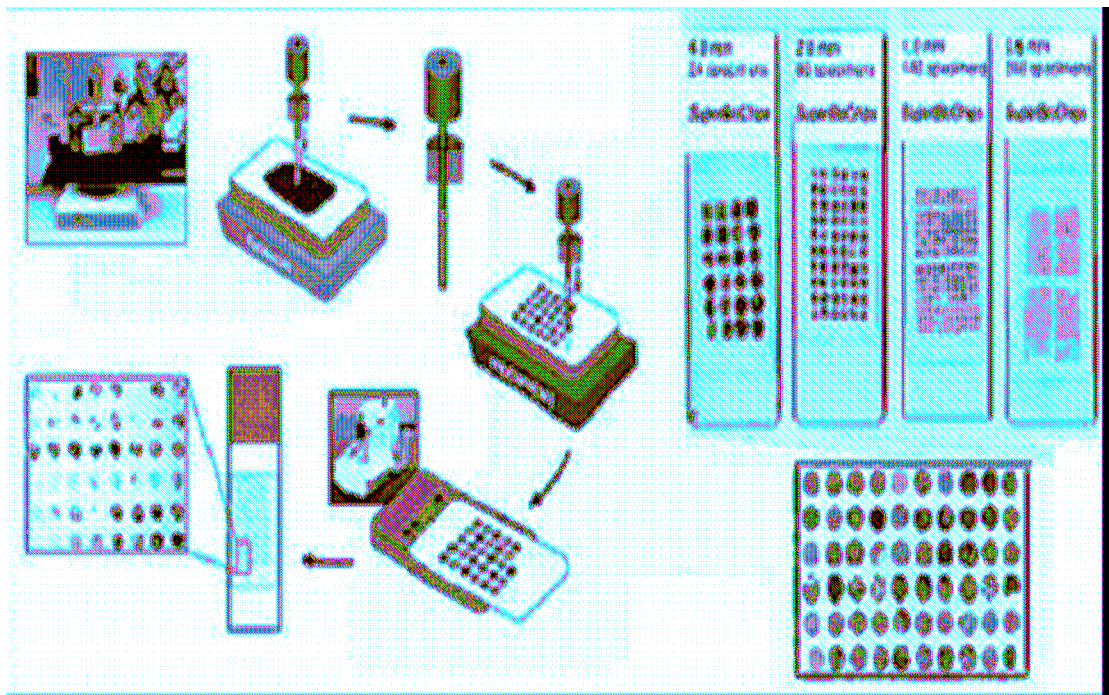
3.2.5. Tissue Microarray - Erstellung und Ordnungsprinzip

Der Tissue Microarray wurde zum ersten Mal von Kononen 1996 an Brustkrebsgewebe verwendet (Kononen et al., 1998). Heute wird der Tissue Microarray in vielen Bereichen der Krebsforschung eingesetzt, wenn es sich um teure und aufwendige Tests, wie die in situ Hybridisierung oder die Genom-austestung handelt (Lang, 2006). Aber auch immunhistochemische Färbungen sind möglich. Durch den Einsatz des Tissue Microarray können bis zu 1000 paraffinfixierte Gewebesteile in einem Arbeitsabschnitt analysiert werden. Es muss nicht jedes Präparat einzeln gefärbt werden. Die zu untersu-

chenden Paraffinblöcke werden als Donorblöcke bezeichnet, da Gewebeteile entnommen werden. Aus dem Donorblock wird eine für das ganze Gewebe repräsentative, zylinderförmige Gewebestanzungen mit einem Durchmesser zwischen 0,6 und 2 mm gewonnen (Datta, Kajdacsy-Balla, 2007). Der Durchmesser ist zum einen von der Anzahl der zu analysierenden Donorblöcke, zum anderen von der Größe der Gewebeteile abhängig. Je größer dabei die Anzahl der Blöcke und je kleiner die Gewebeteile sind, desto kleiner kann auch der Durchmesser gewählt werden. Dafür werden die Donorblöcke mit dem jeweiligen HE Schnitt verglichen und wichtige, repräsentative und interessante Areale markiert. Neben dem Durchmesser spielt auch die Dicke des Präparates eine wichtige Rolle. Auf allen Donorblöcken sollte eine Dicke des eingebetteten Gewebes von 3 mm nicht unterschritten werden. Vorteilhaft, wenn auch nicht zwingend erforderlich, ist eine ähnliche Stärke aller Präparate (Kallioniemi, Wagner, Kononen, Sauter, 2001). Die markierten Areale können entweder von Hand, mit Hilfe eines Stereomikroskops oder vollautomatisiert gestanzt werden (Sapino, et al., 2006, Manley, Mucci, de Marzo, Rubin, 2001). Die so erhaltenen Stanzzyylinder werden nach einem vorgegebenem Schema in den Rezipientenblock eingefügt. Als Rezipientenblock wird ein Paraffinblock bezeichnet, der nur aus Paraffin und Trägermaterial besteht. In den Rezipientenblock sind Zylinder mit dem gleichen Durchmesser und der selben Tiefe gestanzt, wie sie die Gewebezyylinder aus dem Donorblock besitzen. Im Anschluss werden die Gewebezyylinder aus dem Donorblock in die dafür vorgesehenen Öffnungen auf dem Rezipientenblock eingebracht. Um die Verbindung des Paraffins von Rezipientenblock und Gewebezyylinder zu verbessern und damit die Bearbeitung zu erleichtern, wird der Tissue Microblock für 20 Minuten bei 45° Celsius inkubiert. Nach einer kurzen Abkühlzeit kann der Tissue Microblock weiter verwendet werden (Sapino et al., 2006). Das Schema zur Einbettung der Gewebestücke kann nach unterschiedlichen Auswahlkriterien erfolgen. In einigen Fällen werden zufällig Zylinder nebeneinander angeordnet, meist werden die Gewebeteile jedoch in einer vorher festgelegten Ordnung eingebracht. Zusätzlich müssen, je nachdem im Anschluss verwendeten Antikörper, passende Positiv- und Negativ-

kontrollen eingebracht werden. Werden an einem Microarrayblock verschiedenen Antikörper getestet, müssen zu jedem einzelnen verwendeten Antikörper Positiv- und Negativkontrollen bei der Herstellung des Microarrayblockes bedacht werden. Vorteile des Tissue Microarrays im Vergleich zur Einzelschnittfärbung sind die Einsparung teurer Materialien und Reagenzien. Auch kann ein Donorblock mehrfach verwendet und damit wertvolles Gewebe für verschiedene Studienzwecke genutzt werden. Durch die einheitliche Färbetechnik aller Gewebeteile sind die Ergebnisse besser miteinander vergleichbar sowie Fehler und Artefakte einfacher zu erkennen (Lang, 2006). Andererseits ist zum Teil durch die Größe der Stanzzylinder die Aussagekraft eingeschränkt (Kim, Paik, 2006). Wegen der großen Fallzahl und der größeren Erfahrung erfolgte die Herstellung des Tissue Microarrays am Institut für Pathologie der Universität Zürich.

A:



B:

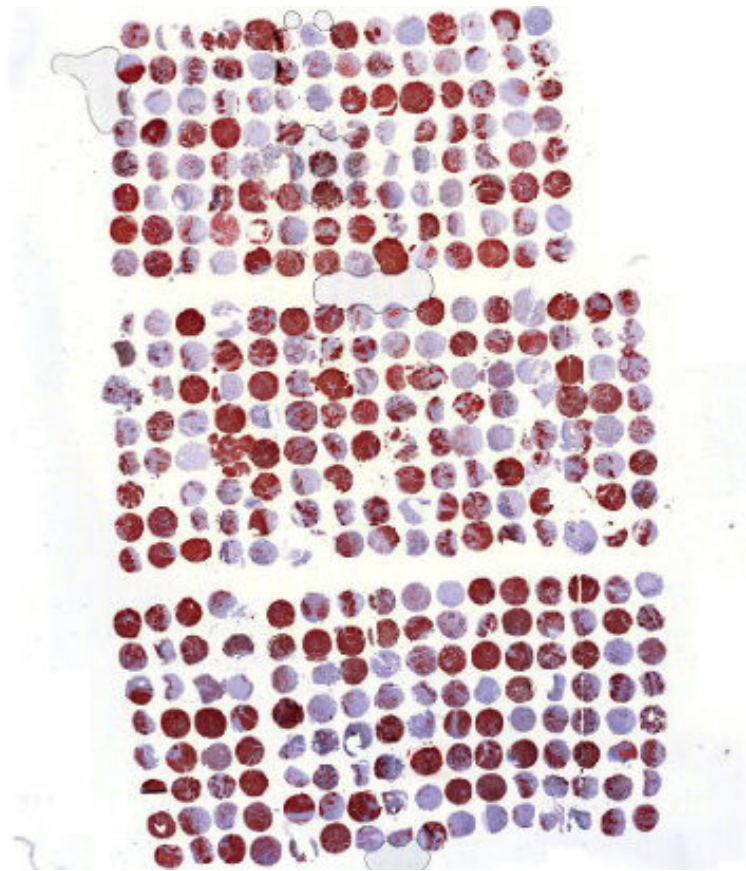


Abbildung 3.7. Erstellung des Tissue Microarrays

A: technisches Vorgehen bei der Erstellung eines Tissue Microarrays: Zunächst wird repräsentatives Gewebe mithilfe eines Stanzzylinders manuell oder automatisch aus dem Donorblock entnommen (Bildausschnitt oben links). Im weiteren Verlauf werden die Gewebezylinder in den Rezipientenblock eingebracht. Dieser Vorgang wird wiederholt bis sich alles zu verwendende Material auf den Rezipientenblock befindet (Bildausschnitt unter links). Im Anschluss kann der Tissue Microarray geschnitten und mit verschiedenen Antikörpern gefärbt werden (Bildausschnitt rechts).

B: Tissue Microarray gefärbt mit S100 (Positivkontrolle)

3.3. Immunhistochemie

3.3.1. Grundprinzip

Der erstellte Tissue Microarray konnte nachfolgend geschnitten und immunhistochemisch gefärbt werden. Die Grundlagen der Immunhistochemie gehen auf Antigen - Antikörper Reaktionen zurück, die bereits seit den 60er Jahren des letzten Jahrhunderts bekannt sind. Seit Mitte der 80er Jahre hat die Immunhistochemie Einzug in die Routinediagnostik gefunden, da Sensitivität und Spezifität für viele Tests sehr gut sind. In erster Linie in der Tumordiagnostik und Therapie spielen immunhistochemische Methoden eine wichtige Rolle. Durch jahrelange Forschung konnten Antikörper gefunden werden, die spezifisch gegen Tumorzellen gerichtet sind. Die Immunhistochemie basiert auf einer Wechselwirkung zwischen Antigen und Antikörper. Als Antigene bezeichnet man die Oberflächenstrukturen auf Zellen oder Geweben. Die gegen die Antigene gerichteten Antikörper sind je nach Verwendungszweck mono- oder polyklonal und können bei verschiedenen Firmen bestellt werden. Vor den eigentlichen Versuchen muss der Antikörpertiter, also diejenige Konzentration mit optimalem spezifischen Färbeergebnis, bestimmt werden. Dies erfolgt durch Verdünnen des Antikörpers mit Verdünnungslösungen wie Tris-Puffer oder PBS. Auch die Einhaltung von Temperatur und Zeit sind von entscheidender Bedeutung. Werden Informationen diesbezüglich nicht vom Hersteller mitgeliefert, müssen sie in verschiedenen Vorversuchsserien selbst getestet werden (Lang, 2006). Sind wie in unserem Fall bereits in Paraffin eingebettete Blöcke vorhanden, müssen diese noch geschnitten werden. Dazu wird der Paraffinblock ca. für 15 Minuten auf eine -10 bis -15° Celsius kalte Kühlplatte gelegt. Gleichzeitig kann je nach Art des Schneidegerätes das Messer eingespannt, das Wasserbad auf 45° Celsius erwärmt und die Adhäsiv-Objektträger beschriftet werden. Im Anschluss wird mithilfe eines Schlitten- oder Rotationsmikrotoms der Paraffinblock zunächst grob geschnitten, d.h. die Oberfläche geglättet. Anschließend werden zwischen 20 und 40 µm dicke Schnitte angefertigt und mit einem Pinsel vorsichtig ins Wasserbad befördert. Von dort werden diese mit dem Adhäsiv-

Objektträger entnommen und trocknen entweder an der Luft oder bei etwa 60° Celsius für eine Stunde im Ofen (Lang, 2006). Nach dem Schneiden müssen die angefertigten Schnitte entparaffiniert werden. Dies erfolgt üblicherweise mit Xylol. Nach dem Entparaffinieren werden die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe bis zum Aqua dest. rehydriert. Durch verschiedenen Verfahren wie proteolytisches Andauen, Hitze, ect. können Antigene demaskiert und somit besser nachweisbar gemacht werden. Im Anschluss beginnt die Anfärbung des Gewebes.

In der Literatur werden verschiedene immunhistochemische Färbemethoden beschrieben. Bei der LAB/LSAB- Methode, wie sie für unsere Versuche verwendet wurde, wird die starke Affinität zwischen Avidin bzw. Streptavidin und Biotin genutzt. Nach der Bindung des Primärantikörpers bindet der mehrfach biotinylierte Sekundärantikörper an das Enzym-konjugierte Avidin bzw. Streptavidin. Hierdurch kommt es zu einem Verstärkereffekt und somit zu einer besseren Sichtbarkeit einer positiven Reaktion. Nach Abschluss der vorher beschriebenen Abläufe wird mit Hämalaun gegengefärbt um die Morphologie der Kerne besser darzustellen (Lang, 2006).

3.3.2. Methylthioadenosinphosphorylase

Die Methylthioadenosinphosphorylase (MTAP) spielt eine wichtige Rolle im Polyaminmetabolismus. Dabei katalysiert MTAP die Phosphorylierung von Methylthioadenosin (MTA), einem Nebenprodukt der Polyaminsynthese. Methylthioadenosin hemmt sehr potent die Polyaminaminopropyltransferase und die Methyltransferase (Behrmann et al., 2003). Zusätzlich ist MTAP essentiell sowohl für die Synthese von Adenin als auch für Methionin. Adenin wird im Folgenden zu AMP umgewandelt, einer für die Energieversorgung der Zellen wichtigen Verbindung (Marce et al., 2006). Das MTAP Gen besteht aus 8 Exons und 7 Introns und ist auf dem Chromosom 9p21 lokalisiert. In unmittelbarer Nachbarschaft zum MTAP Gen finden sich die Gene für p15, p16, IFNA und IFNB (Behrmann et al., 2003). In allen Zellen und Geweben wird MTAP exprimiert (Marce et al., 2006). Maligne Melanome weisen eben-

so wie andere Tumore selektive Mutationen in diesen Regionen auf. Dadurch kann die Expression von MTAP verringert werden. Jedoch kann diese Verringerung auch durch eine Hypermethylierung dieser Region verursacht sein (Wild et al., 2006). Es konnte gezeigt werden, dass eine Verringerung der Expression von MTAP zu einer Progression melanozytärer Tumore führt. Dabei zeigte sich ein Expressionsverlust von gutartigen Nävuszellnävus zur Melanommetastase hin (Behrmann et al., 2003). Darüber hinaus hat MTAP Einfluss auf die STAT1 Aktivität. STAT1 ist ein essentieller Aktivator für den Interferon γ Signalweg. Daraus kann ein Zusammenhang zwischen der MTAP Expression und dem Ansprechen einer Interferontherapie über STAT1 hergestellt werden (Mowen et al., 2001). Diese Genprodukte sollten exemplarisch die Tauglichkeit der Färbung, des Tissue Microarrays und deren Auswertbarkeit belegen.

3.3.3. Färbung

Die immunhistochemische Färbung des Tissue Microarray erfolgte nach der LAB/LSAB Methode. Dafür wurden die Schnitte des Tissue Microarrays zunächst mit Xylol entparaffiniert und anschließend mit einer absteigenden Alkoholreihe rehydratisiert. Danach wurden die Schnittpräparate mit dem Primärantikörper inkubiert. Es handelte sich hierbei um einen polyklonalen Huhn Anti-MTAP Antikörper, sowie um einen polyklonalen Kaninchen Anti-STAT1 Antikörper. Der polyklonale Huhn Anti-MTAP Antikörper wurde von Dr. D. Carson, University of California zur Verfügung gestellt. Der polyklonale Kaninchen Anti-STAT1 Antikörper stammt von der Firma Abcam. Der Huhn Anti-MTAP Antikörper wurde in einer Konzentration von 1: 1.500, der Kaninchen Anti-STAT1 Antikörper in einer Konzentration von 1:100 verwendet. Beide wurden auf dem jeweiligen Präparat über Nacht bei 4°Celsius inkubiert. Nach einem Waschschrift wurde der Sekundärantikörper aufgebracht. Dafür wurde biotinylierter Antihuhnantikörper der Firma Jackson ImmunoResearch Laboratories Ltd., West Grove, PA in einer Konzentration von 1:1.000, sowie biotinylierter Antikaninchenantikörper der Firma Zytomed Sys-

tems, Berlin, Germany ebenfalls mit einer Konzentration von 1:1.000 verwendet. Der Sekundärantikörper wurde jeweils für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift erfolgte die Inkubation mit Streptavidin-Peroxidase der Firma Dako Cytomation GmbH, Germany für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Um die Antikörperbindung sichtbar zu machen wurde AEC Lösung der Firma Dako verwendet. Zuletzt wurden die Präparate mit Hämalaun gegengefärbt und getrocknet. Als Positivkontrolle für den MTAP Antikörper diente ein Präparat eines Plattenepithelkarzinoms der Haut. Als Positivkontrolle für den STAT1 Antikörper diente ein Präparat eines Mammakarzinoms. Die Positivkontrollen wurden parallel zum Tissue Microarray Präparat gefärbt. Es wurden gleiche Reagenzien und Inkubationszeiten eingehalten. Als Negativkontrolle diente ein Schnitt des Tissue Microarrays. Dieser wurde mit allen Reagenzien außer dem Primärantikörper, wie oben beschrieben behandelt.

3.3. Auswertung des Melanom Tissue Microarrays

3.3.1. Digitalisierung der histologischen Präparate

Nach dem Schneiden und Färben der aus dem Tissue Microarray gewonnenen Schnittpräparate, begann die Auswertung. Ein zunächst unternommener Versuch, die Präparate unter dem Lichtmikroskop auszuwerten, scheiterte, da aufgrund der Vergrößerung die Übersicht und die Zuordnung der Spots zur Auswertungsmatrix erschwert war. Des Weiteren war wegen der Vielzahl der Spots diese Auswertung nicht möglich, da es zur Verwechslung einzelner Spots kam. Daher wurden die Schnitte digitalisiert (Miramax Scanner), auf den Computer übertragen und konnten dort ausgewertet werden. Die benötigte Kamera und Software wurde vom Caritas Krankenhaus Sankt Josef in Regensburg und dem Institut für Pathologie der Universitätsklinik Regensburg zu Verfügung gestellt. Dafür wurden die auf Objektträger aufgebrauchten Präparate digital fotografiert und in den Computer eingelesen. Mit dem Programm MIRAX Viewer Version 1,9,25,0 von Carl Zeiss MicroImaging konnte im Anschluss daran mit der Auswertung begonnen werden. Dafür wurde je-

des gefärbte und auf Objektträger aufgebrachte Präparat eingelese und nach dem jeweiligen Antikörper benannt, mit dem dieser Schnitt gefärbt worden war. Zusätzlich wurde der Tissue Microarray zur Analyse von Biomarkern ZTMA 95, der Kontrolltissue Microarray mit Nävuszellnävi und Metastasen ZTMA 102 benannt. Daraus ergibt sich, dass zu jedem potentiellen Biomarker zwei Tissue Microarrayschnittpräparate vorhanden sind. Die Vergrößerungsfunktion des Auswerteprogramms ermöglichte einen besseren Überblick über die Spots, so dass Verwechslungen minimiert werden konnten. Außerdem konnten Details wegen der bis zu 40fachen Vergrößerung besser dargestellt werden. Jedoch stellte sich heraus, dass durch die Digitalisierung die Färbung wesentlich intensiver sichtbar wurde. Auf der einen Seite wurde hierdurch die Auswertung erleichtert, auf der anderen Seite besteht die Gefahr falsch-positiver Auswertergebnisse und Bewertungen. Darüber hinaus mussten die Schnitte vor der Digitalisierung gründlich gereinigt werden, da ansonsten die Verschmutzung den Spot überdeckte.

3.4.2. Auswertung des Tissue Microarrays

Die Auswertung des Tissue Microarrays erfolgte wie oben beschrieben am Computer. Dafür wurde eine Maske angefertigt, auf der die einzelnen Spots des Tissue Microarrays eingezeichnet und nummeriert waren. Diese Maske wurde vervielfältigt und mit dem jeweiligen Antikörper und der Tissue Microarray Nummer beschriftet. So entstand für jede Färbung und für jeden Tissue Microarray eine Vorlage. Mit diesen Vorlagen begann die Auswertung des Tissue Microarrays. Dafür wurde zunächst der mit S100 gefärbte Tissue Microarray ausgewertet um zu garantieren, dass es sich bei den Spots tatsächlich um Gewebe eines malignen Melanoms, bzw. eines Nävuszellnävus, bzw. einer Melanommetastase handelte. Für die Auswertung wurden fünf verschiedene Zeichen benützt. Ein Strich (/) bedeutete, dass der Spott nicht vorhanden war. Dabei handelte es sich um Spots, die beim Schneiden und Färben des Tissue Microarrays abgeschwommen waren. War der Spot vorhanden, konnte dieser negativ (0), einfach (+), zweifach (++) oder dreifach

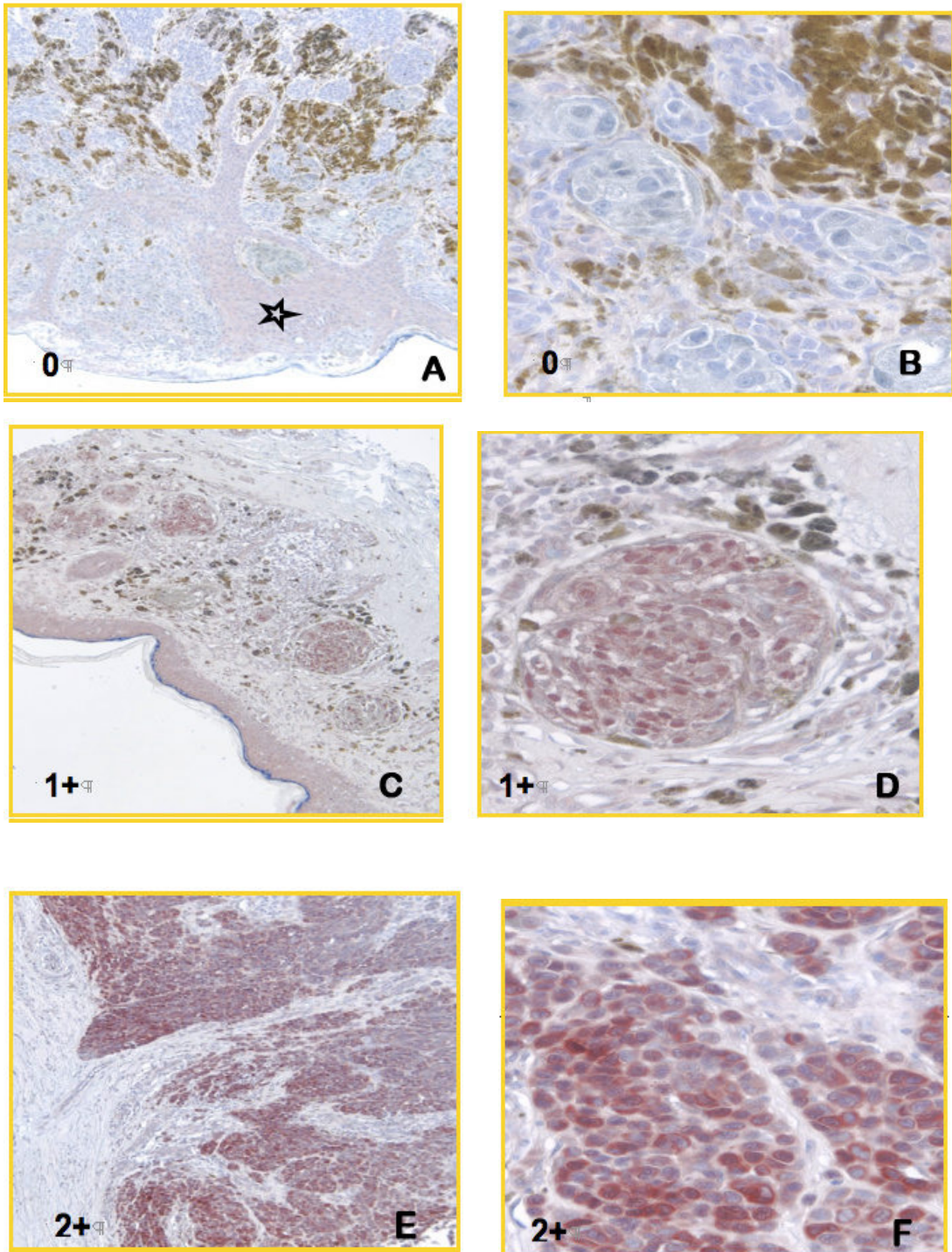


Abbildung 3.8.: MTAP Färbung einzelner Spots

A und B: keine positive Färbereaktion

C und D: einfach positive Färbereaktion

E und F: zweifach positive Färbereaktion

4. Ergebnisse

4.1. Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software SPSS in der Version 15.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). Es wurden sämtliche Gewebeproben des Tissue Microarrays voneinander unabhängig betrachtet. Ein statistischer Zusammenhang zwischen klinisch-pathologischen Daten und immunhistochemischen Parametern wurde mit Kontingenztabellenanalyse, zweiseitigen Chi - Quadrat und Fischer-Exakt-Tests untersucht. Lediglich Patienten mit einem Follow up über 6 Monate konnten berücksichtigt werden. Die Überlebenskurven für das Gesamtüberleben und das rezidivfreie Überleben wurden nach Kaplan und Meier berechnet, wobei eine Abschätzung des statistischen Unterschiedes mit zweiseitigem Log Rank - Test erfolgte. Als rezidivfreies Überleben wurde die Zeit von der Erstdiagnose bis zum letzten gemeldeten Kontrolltermin definiert. Die Zeit zwischen Erstdiagnose und letztem gemeldetem Kontrolltermin oder dem nicht Melanom-assoziierten Tod legten wir als Gesamtüberleben fest. Als signifikant galt ein p-Wert von $<0,05$. Die unabhängige prognostische Relevanz von MTAP und STAT1 wurde mit Hilfe des multivariablen Cox Regressionsmodells ermittelt. Dabei war die Tumordicke eine konstanter Faktor, die Interferontherapie eine variable Größe. Weitere Modelle, die einen Zusammenhang zwischen MTAP bzw. STAT1 Expression und Interferontherapie finden sollten, wurden angewandt. Auf eine multivariate Testung wurde wegen der geringen Fallzahl verzichtet.

4.2. Auswertung des Tissue Microarrays am Beispiel von Methylthioadenosinphosphorylase

Es sollte durch die Auswertung des Tissue Microarrays die Frage beantwortet werden, ob es sich bei MTAP oder STAT1 um Tumordicke-unabhängige Faktoren hinsichtlich des rezidivfreien Überlebens und des Gesamtüberlebens handelt und eine Vorhersage hinsichtlich des Nutzens einer adjuvanten Interferon α -Therapie zu treffen sind. Zudem wollten wir nachweisen, ob ein

Zusammenhang zwischen der Expression von MTAP und der Entwicklung vom melanozytären Nävus zum malignen Melanom besteht. Die Auswertung der Ergebnisse des Tissue Microarrays für MTAP war in 392 von 461 Fällen erfolgreich. Dies entspricht einem prozentualen Anteil von 85%. Im Falle von STAT1 konnten 440 von 461 Fällen ausgewertet werden. Der prozentuale Anteil beträgt 95%. 69 bzw. 21 Fällen konnten wegen Fehlen des Spots auf dem Tissue Microarray, unauswertbarer Spots oder dem Fehlen wichtiger Informationen des Follow ups nicht ausgewertet werden. Eine Expression von MTAP konnte in 81%, das heißt in 317 von 392 Spots nachgewiesen werden. Hingegen betrug die Expression von STAT1 lediglich 37%. Es waren 164 von 440 Spots positiv für STAT1. Eine signifikante Reduktion ($p < 0.001$) der MTAP Expression in primären malignen Melanomen und Melanommetastasen im Vergleich zu benignen Nävuszellnävi konnte festgestellt werden. Im Gegensatz dazu zeigte sich eine signifikante Steigerung ($p < 0.001$) der Expression von STAT1 in primären Melanomen und Melanommetastasen.

Tabelle 4.1. Klinisch-pathologische Daten und Expression

A: von MTAP
B: von STAT

A:

Melanozytäre Veränderungen (n=461)	MTAP	Expression		
	Untersuchte Spots (n) ³	Negative Spots (n)	Positive Spots (n)	P ¹
Total	392	75	317	
Primäre maligne Melanome ²	297	55	242	
Melanonmetastasen	34	19	15	<0.001
Nävuszellnävi	61	1	60	

¹ Chi²- Test

² nur initiale und unifokale Melanome

B:

Melanozytäre Ver- änderungen (n=461)	STAT1	Expression		P ¹
		Untersuchte Spots (n) ⁴	Negative Spots (n)	
Total		440	276	164
Primäre maligne Melanome		341	194	147
Melanommetastasen		39	24	15
Nävuszellnävi		60	58	2

³ fehlende Daten: n=69

⁴ fehlende Daten: n=21

Zusätzlich wurden klinisch-pathologische Daten mit den immunhistochemischen Ergebnissen verglichen. Dabei war die Reduktion der Expression von MTAP in primären malignen Melanomen signifikant mit einem höheren Clark Level ($p < 0.05$) und einer Zunahme der Tumordicke ($p < 0.01$) korreliert. Eine Zunahme der STAT1 Expression korrelierte mit dem weiblichen Geschlecht ($p < 0.05$) und der Tumordicke zwischen 1,5 und 4 mm ($p < 0.05$). Unterschiede in der Expression von MTAP und STAT1 innerhalb der Nävi, zum Beispiel zwischen dermalen Nävi und Compoundnävi konnten nicht festgestellt werden.

Tabelle 4.2. Untersuchung der MTAP und STAT1 Expression melanozytärer Tumore mithilfe des Tissue Microarray

A: für MTAP

B: für STAT1

A:

Primäre maligne Melanome ²			MTAP Untersuchte Spots (n)	Expression Negative Spots (n)	(n=358) ⁴ Positive Spots (n)
	Alter				
		< 60	152	28	124
		>60	145	27	118
	Geschlecht				
		weiblich	141	26	115
		männlich	156	29	127
	Clark Level ³				
		I	1	0	1
		II	61	4	57
		III	90	15	75
		IV	119	29	90
		V	13	4	9
	Tumordicke				
		< 1.5 mm	172	22	150
		1.5 – 4 mm	78	18	60
		> 4mm	41	13	28
	Lymphknotenstatus				
		pN0	261	48	213
		pN1	9	0	9
		pN2	5	2	3
		pN3	4	2	2
Nävuszellnävi					
	Compondnävi		35	1	34
	Dermale Nävi		26	0	26

B:

Primäre maligne Melanome ²			STAT1 Untersuchte Spots (n)	Expression Negative Spots (n)	(n=401) ⁵ Positive Spots (n)	P ¹
	Alter					
		< 60	172	92	80	0.229
		>60	169	102	67	
	Geschlecht					
		weiblich	157	80	77	<0.05
		männlich	184	114	70	
	Clark Level ³					
		I	1	1	0	0.078
		II	68	44	24	
		III	101	62	39	
		IV	142	68	74	
		V	12	8	4	

	Tumordicke					
		< 1.5 mm	198	121	77	<0.05
		1.5 – 4 mm	89	40	49	
		> 4mm	48	29	19	
	Lymphknotenstatus					
		pN0	298	169	129	0.953
		pN1	11	6	5	
		pN2	6	4	2	
		pN3	4	2	2	
	Nävuszellnävi					
	Compoundnävi		34	32	2	0.5
	Dermale Nävi		26	26	0	

¹ Fischer Exakttest (2-seitig) für 2x2 Tabellen, ansonsten Chi²- Test

² nur initiale und unikokale Melanome

³ Sobin, Wittekind:TNM Classification of malignant Tumors. 6th ed. New York, NY: John Wiley & Sons Inc.; 2002

⁴ fehlende Daten n=69

⁵ fehlende Daten n=21

MTAP positive und negative, bzw. STAT1 positive und negative Fälle wurden hinsichtlich des Gesamtüberlebens und des rezidivfreien Überlebens mit Hilfe von univariaten Log Rank - Tests überprüft. Dabei ergab sich eine signifikante Übereinstimmung zwischen der MTAP Expression in primären malignen Melanomen, dem Gesamtüberleben ($p < 0.01$) und dem rezidivfreien Überleben ($p < 0.05$). Für STAT1 konnte keine Korrelation mit dem Gesamtüberleben ($p = 0.160$) und dem rezidivfreiem Überleben ($p = 0.492$) gefunden werden. Daraus lässt sich eine prognostische Relevanz von MTAP, nicht jedoch von STAT1 ableiten.

Tabelle 4.3 Cox Regressionsmodell für das rezidivfreie Überleben von Patienten mit primären malignen Melanomen (n=174)¹

	P	Hazard Ratio	Hazard Ratio (95% Konfidenzintervall)	
			Untergrenze	Obergrenze
MTAP Expression ² (negative versus positiv)	0.007	0.361	0.172	0.758
Interferontherapie ²	0.002	2.878	1.477	5.609
Tumordicke ³	0.001	1.164	1.063	1.274
STAT1 Expression ² (negativ versus positiv)	0.930	1.030	0.531	1.998

¹ fehlende Daten n=82, 104 Fälle herausgenommen

² dichotome Variable

³ konstante Variable

Tabelle 4.4. Cox Regressionsmodell für das Gesamtüberleben von Patienten mit primären malignen Melanomen (N= 282)¹

	P	Hazard Ratio	Hazard Ratio (95% Konfidenzintervall)	
			Untergrenze	Obergrenze
MTAP Expression ² (negativ versus positiv)	0.036	0.554	0.319	0.962
Interferontherapie ²	0.028	1.797	1.065	3.033
Tumordicke ³	0.000	1.133	1.057	1.214
STAT1 Expression ² (negativ versus positiv)	0.293	0.776	0.485	1.244

¹ fehlende Daten n=78

² dichotome Variable

³ konstante Variable

Tabelle 4.5. Univariable Analyse der klinisch-pathologischen Daten und des rezidivfreien Überlebens, bzw. Gesamtüberlebens von Patienten mit primären malignen Melanomen (n=360)

	Rezidiv			P ²	Tumorbedingter Tod		
	n	Ereignisse			n	Ereignisse	P ²
Alter bei Diagnose							
	< 60	176	33	0.202	178	42	0.124
	> 60	180	20		182	3	
Geschlecht							
	weiblich	164	20	0.914	168	32	0.003
	männlich	192	33		192	63	
Clark Level ³							
	I	1	0	<0.001	1	0	<0.001
	II	74	2		75	8	
	III	106	6		106	11	
	IV	143	34		146	59	
	V	14	5		14	11	
Tumordicke							
	< 1.5 mm	206	9	<0.001	209	24	<0.001
	1.5 - 4mm	96	22		96	35	
	> 4mm	48	20		49	33	
Lymphknotenstatus							
	pN0	314	42	<0.01	317	74	<0.001
	pN1	11	6		11	8	
	pN2	6	2		6	5	
	pN3	4	2		4	3	
MTAP Expression							
	negativ	53	11	<0.05	55	19	<0.01
	positiv	240	36		242	63	
STAT1 Expression							
	negativ	192	31	0.492	194	57	0.160
	positiv	145	19		147	32	

¹ nur initiale und unifokale Melanome

² Log rank Test (2- seitig)

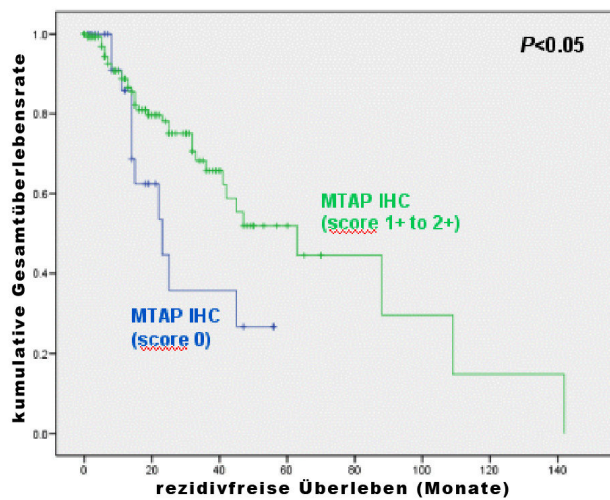
³ Sobin, Wittekind:TNM Classification of malignant Tumors. 6th ed. New York, NY: John Wiley & Sons Inc.; 2002

Im Cox Regressionsmodel mit variabler Selektion zeigte sich die MTAP Expression als unabhängiger prognostischer Marker sowohl für das Gesamtüberleben (Hazard Ratio 0.554; 95% Konfidenzintervall: 0.319-0.962;

$p < 0.05$), als auch für das rezidivfreie Überleben (Hazard Ratio 0.361; 95% Konfidenzintervall: 0.172-0.758; $p < 0.01$). Im Gegensatz dazu konnte kein Zusammenhang zwischen STAT1 Expression, Gesamtüberleben und rezidivfreiem Überleben belegt werden. Beide Cox Regressionsmodelle wurden von Interferontherapie und Tumordicke beeinflusst. Zusätzlich wurden Cox Regressionsmodelle mit variabler Selektion durchgeführt. Dabei wurden MTAP bzw. STAT1 Expression mit Interferontherapie korreliert. Es konnte kein signifikanter Zusammenhang hergestellt werden.

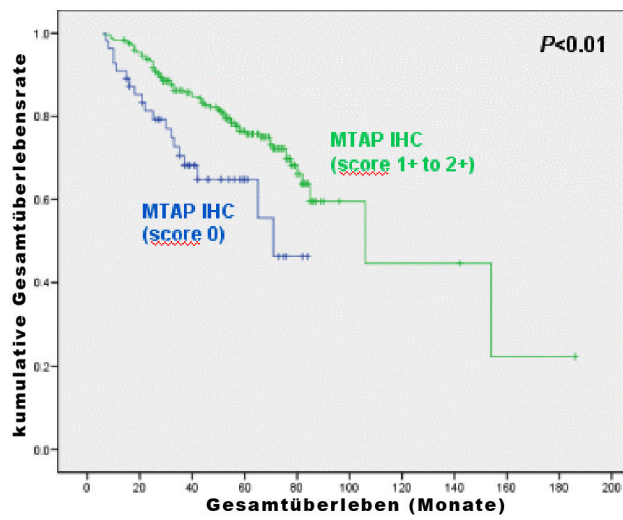
Um gegebenenfalls einen therapeutischen Vorteil einer Therapie mit Interferon α zu sehen, wurde aus Patienten, deren primäres malignes Melanom eine Tumordicke zwischen 1.5 und 4 mm besaß, ein neues Kollektiv gebildet. Interferon α wird als adjuvante Therapie bei Patienten mit Tumordicke über 2mm oder nach Lymphknotenmetastasen eingesetzt. Man verwendet zu meist 3 Millionen IE Interferon, das dreimal wöchentlich für 24 Monate subkutan injiziert wird (Hausschild et al., 2008). Diese Gruppe wurde ausgewählt, da sie repräsentativ für Patienten mit adjuvanter Therapie war. In dieser Subgruppe zeigten Patienten mit einem MTAP positiven primären malignen Melanom und adjuvanter Interferon α Therapie ein signifikant längeres rezidivfreies Überleben ($p < 0.05$) als Patienten mit MTAP negativen primären malignen Melanomen mit adjuvanter Therapie. Außerdem ließ sich eine Tendenz dazu feststellen, dass MTAP positive primäre Melanome mit adjuvanter Interferontherapie ein längeres Gesamtüberleben aufwiesen. Das mittlere Gesamtüberleben lag in der MTAP positiven Gruppe bei 80 Monaten, im Vergleich zu 35 Monaten in der MTAP negativen Gruppe ($p = 0.119$). Im Vergleich zwischen MTAP positiven und MTAP negativen Primärtumoren ohne Interferontherapie ließ sich kein Unterschied im Gesamtüberleben ($p = 0.241$) und im rezidivfreien Überleben ($p = 0.836$) feststellen. Patienten mit STAT1 positiven Primärtumoren und Interferon α Therapie zeigten kein verlängertes rezidivfreies Überleben ($p = 0.074$), jedoch ein errechnetes verlängertes Gesamtüberleben ($p < 0.05$). Wiederum zeigt sich kein Unterschied zwischen STAT1 positiven und negativen Primärtumoren ohne Interferontherapie im Hinblick auf Gesamtüberleben ($p = 0.512$) und rezidivfreies Überleben

($p=0.203$). Maligne Melanome mit einer Tumordicke über 4 mm mit oder ohne Interferontherapie zeigten weder für MTAP noch für STAT1 eine signifikante Verlängerung im Gesamtüberleben noch im rezidivfreien Überleben.



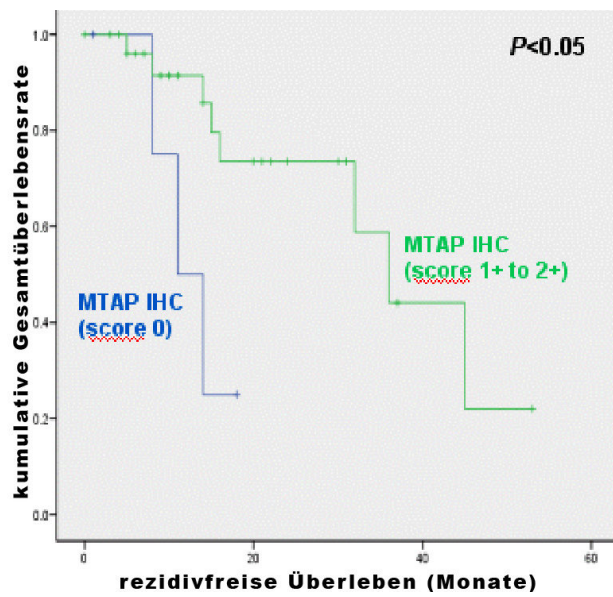
Anzahl der Patienten	0	20	40	60	80	100	120	140
Zeit (Monate)	0	20	40	60	80	100	120	140
MTAP negativ	53	8	4	0	0	0	0	0
MTAP positiv	240	59	21	8	3	2	1	1

Abbildung 4.6. Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit von MTAP



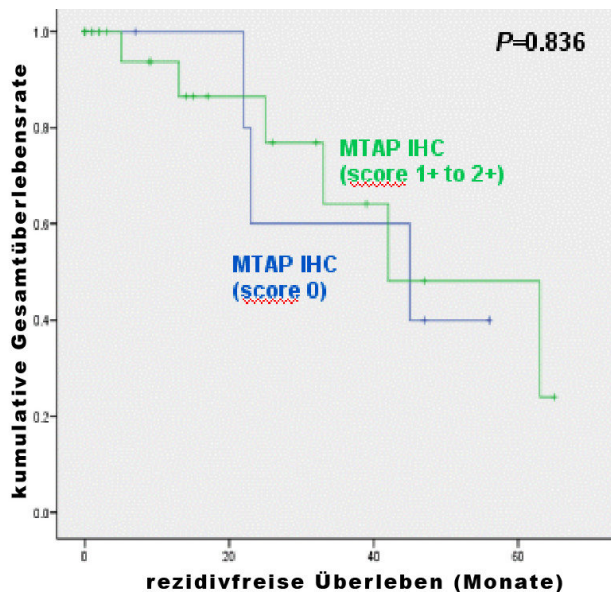
Anzahl der Patienten										
Zeit (Monate)	0	20	40	60	80	100	120	140	160	180
MTAP negativ	55	44	23	9	2	0	0	0	0	0
MTAP positiv	242	228	172	116	33	4	3	3	1	1

Abbildung 4.7. Gesamtüberleben in Abhängigkeit von MTAP



Anzahl der Patienten			
Zeit (Monate)	0	20	40
MTAP negativ	5	0	0
MTAP positiv	29	12	2

Abbildung 4.8. Rezidivfreies Überleben mit Interferontherapie in Abhängigkeit von MTAP



Anzahl der Patienten				
Zeit (Monat)	0	20	40	60
MTAP negativ	13	5	3	0
MTAP positiv	31	9	4	2

Abbildung 4.9. Rezidivfreies Überleben ohne Interferontherapie in Abhängigkeit von MTAP

4.3. Zusammenfassung am Beispiel von Methylthioadenosinphosphorylase

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass der Tissue Microarray geeignet ist, prognostisch und therapeutisch relevante Erkenntnisse zu gewinnen. Die MTAP Expression ist sowohl von prognostischer als auch von prädiktiver Relevanz. So war eine Expression von MTAP mit einem signifikant verlängerten Gesamtüberleben und rezidivfreien Überleben korreliert. Patienten mit MTAP positiven Tumoren haben unter Interferontherapie eine bessere Prognose hinsichtlich des rezidivfreien Überlebens als MTAP negative Patienten. Ob Patienten mit MTAP positiven Tumoren generell von einer Interferontherapie profitieren bleibt ungewiss. Für einen Zusammenhang zwischen STAT1 Expression und Verlängerung des rezidivfreien Überlebens, bzw. des Gesamtüberlebens konnte kein Hinweis gefunden werden. Auch Vorteile im rezidivfreien Überleben hinsichtlich der STAT1 Expression und Interferontherapie konnten nicht gezeigt werden. Gleichzeitig stellte sich heraus, dass es von Nävi beginnend über primäre maligne Melanomen zu Melanommetastasen eine Abnahme der MTAP Expression und eine Zunahme der STAT1 Expression gibt. Darüber hinaus war die MTAP Expression mit dem Clark-Level und der Tumordicke, die STAT1 Expression mit dem weiblichen Geschlecht und der Tumordicke korreliert. Daraus lässt sich schließen, dass sowohl MTAP als auch STAT1 keine Tumordicke-unabhängigen Prognosefaktoren sind (Meyer et al., 2009). Bereits in einer zuvor durchgeführten Studie von Wild et al. konnte die Prognoserelevanz von MTAP und der prädiktive Wert von MTAP im Hinblick auf eine Interferontherapie ermittelt werden. Jedoch waren die Fallzahlen verhältnismäßig für diese spezifische Fragestellung zu gering, so dass eine Überprüfung der Ergebnisse und eine Ausweitung der statistischen Analysen notwendig wurden (Wild et al., 2006). In der neuen Studie diente ein wesentlich größeres Patientenkollektiv als Basis für die Untersuchungen.

5. Diskussion

Der Tissue Microarray wird in der Tumorforschung zur Beurteilung verschiedenster Tumorentitäten eingesetzt. Als vorteilhaft hat sich erwiesen, dass neben immunhistochemischen Färbungen auch Fluoreszenz in situ Hybridisierungen oder mRNA in situ Hybridisierungen möglich sind (Kallioniemi et al., 2001). Bei Brustkrebspräparaten konnte gezeigt werden, dass ein 0,6 mm großes Gewebestück repräsentativ für das Gesamtpräparat ist (Zhang et al., 2003). Da normalerweise bei der Gewebeanalyse keine Veränderung der Hybridisierungs- und Färbeprotokolle im Vergleich zu herkömmlichen histologischen Präparaten notwendig ist, stellt der Tissue Microarray ein sehr effektives Verfahren da (Nocito et al. 2001). Jedoch besteht im Ausgangsmaterial eine große Heterogenität. Diese betrifft nicht nur die Tumordicke, sondern auch das Alter und den Zustand des Ausgangsmaterials. Zudem wird zumeist Tumormaterial von verschiedenen Patienten mit dem gleichen Tumor untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Unterschiede in den einzelnen Spots keinen Einfluss auf die Ergebnisse der Auswertung des Tissue Microarrays haben (Bubendorf et al., 2004). Auch Sapino et al. konnten zeigen, dass ein Stanzzyylinder in 90% der Fälle repräsentativ für das gesamte histologische Präparat ist (Sapino et al., 2006). Alter und Fixierung des Ausgangsmaterials spielen lediglich für die mRNA in situ Hybridisierung eine Rolle, da es zu Degeneration des Materials kommen kann. Obwohl eine maximale Zahl von 2400 Spots pro Tissue Microarray theoretisch möglich ist, enthalten Tissue Microarrays im Allgemeinen nicht mehr als 1000 Spots. In diesem Zusammenhang spielt vor allem die Größe des einzelnen Spots eine Rolle. Je mehr Spots auf einem Tissue Microarray platziert werden, desto geringer ist die Größe des einzelnen Spots (Kallioniemi et al., 2001). Durch die Entnahme eines kleinen Stanzzyinders bleiben große Teile des Donorblocks für weitere histologische Untersuchungen erhalten. Jedoch sinkt mit der Größe des einzelnen Spots die Aussagekraft und die Repräsentativität hinsichtlich des gesamten Tumors. Des Weiteren kann durch die Anwendung der Tissue Microarray Technik eine verbesserte Vergleichbarkeit der

Präparate erreicht werden. So kann es zu Färbeartefakten bei Einzelfärbungen an jedem Objektträger kommen. Da bei Tissue Microarrays pro Antikörper nur ein Objektträger verwendet wird, sind die Ergebnisse der einzelnen Spots besser miteinander vergleichbar. Darüber hinaus werden bei Tissue Microarrays weniger Reagenzien und Materialien verbraucht, so dass die Untersuchungen weniger kostenintensiv sind. Da nach der Erstellung des Tissue Microblocks für jede Färbung mit einem Antikörper nur ein histologischer Schnitt zu schneiden und anzufärben ist, kann vor allem der Einsatz teurer Antikörper minimiert werden (Lang, 2006). Nach Entwicklung der ersten Tissue Microarrays erwartete man eine Revolution in der Entwicklung und Durchführung von Biomarkerstudien. Zudem war die Hoffnung groß, zusätzlich zu neuen Biomarkern auch mögliche therapeutische Zielstrukturen zu erkennen, neue Therapiestrategien zu finden und zu erproben. Jedoch hat sich dies nicht bewahrheitet. Unterschiedliche Gründe sind hierfür verantwortlich. Zum einen ist die Entwicklung neuer Antikörper für immunhistochemische Färbungen schwierig und teuer, zum anderen haben sich große Schwierigkeiten bei der Erstellung und Aktualisierung von Patientenverlaufdaten ergeben (Kim, Paik, 2006). Einerseits stellte sich die Tissue Microarraytechnik als aufwendig heraus, andererseits gewannen genetische Analysen immer mehr an Einfluss. Durch Gensequenzierung, cDNA Microarrays und Genexpressionsstudien konnten eine große Zahl relevanter Gene und Genprodukte identifiziert werden (Herlyn, 2005). Zudem ist für genetische Analysen wenig Tumormaterial notwendig, die Analysen sind schnell durchführbar, zum Großteil automatisiert und aussagekräftig (Wilson, Nathanson, 2012). Somit stellen genetische Analyseverfahren eine Konkurrenz zu immunhistochemischen Methoden und dem Tissue Microarray dar. Genetische Untersuchungsmethoden liefern eine große Datenmenge, die im Anschluss interpretiert werden muss. So stellt sich bspw. bei Aberrationen im Gensequenzierungsverfahren die Frage, ob es sich bei den gefundenen Veränderungen um Mutationen oder ob es sich um SNPs handelt. Des Weiteren bedeutet nicht jede Mutation eine Veränderung auf Proteinebene, so dass häufig weiterführende Untersuchungen zur Klärung der Relevanz der gefundenen

Ergebnisse von Nöten sind (Zhang et al.,2011). Andererseits können nach dem Erstellen eines Tissue Microarrays eine Vielzahl von Fragen zeitnah untersucht werden, da der größte Zeitaufwand mit der Erstellung des Tissue Microarrays und des Patienten Follow ups verbunden ist. Je nach Fragestellung, Zielsetzung und Praktikabilität haben sowohl genetische Verfahren aber auch Tissue Microarrays ihren Stellenwert.

Bereits 2001 wurde von Mowen et al. ein Zusammenhang zwischen MTAP Expression und dem Ansprechen auf Interferontherapie über STAT1 hergestellt. Eine Reduktion von MTAP führt zu einem Anhäufen von MTA in den Zellen. Dieses wiederum hemmt sehr potent Methyltransferasen. Eine dieser Methyltransferasen, nämlich die Arginin N-Methyltransferase 2 methyliert das Arginin 31 von STAT1, was zu einer Modifizierung des Proteins führt. Unterbleibt diese Modifikation, binden Proteininhibitoren an aktiviertes STAT und STAT1, sodass die DNA Bindung von STAT1 nicht stattfindet. STAT1 ist ein sehr wichtiges Protein in der Signaltransduktion und in der Modulation der Interferon α/β Transkription. Durch die Verringerung der MTAP Expression unterbleibt die wichtige Modifikation, in deren Folge STAT1 nicht an die DNA binden kann. Dies ist die wahrscheinlichste Ursache für das schlechtere Ansprechen MTAP negativer Primärtumore auf eine Interferontherapie. Jedoch stellte sich heraus, dass MTAP sowohl ein prognostischer wie auch ein prädiktiver Marker ist, dies jedoch nicht für das in der Signaltransduktionskaskade nachfolgende STAT1 gilt (Meyer et al., 2009). Ebenso konnte STAT3 als potentieller Biomarker identifiziert werden. Dabei ist das Gleichgewicht zwischen pSTAT1 und pSTAT3 für die Differenzierung in vivo von entscheidender Bedeutung. Auch kann STAT3 durch Interferon moduliert werden (Wang et al., 2008).

In dem jetzigen Tissue Microarray konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen MTAP Expression und Prognose sowohl für das rezidivfreie als auch für das Gesamtüberleben hergestellt werden. Diese Übereinstimmung konnte nicht für STAT1 gezeigt werden. Außerdem lässt sich eine Korrelation zwischen MTAP positiven Tumoren und einem besseren Ansprechen der

Interferontherapie hinsichtlich rezidivfreiem Überleben und Gesamtüberleben nachweisen. Wiederum gilt dies nicht in diesem Maße für STAT1. Da STAT1 MTAP in der Signaltransduktionskaskade nachfolgt, können weitere Einflussfaktoren auf STAT1 wirken. Dies könnte dafür verantwortlich sein, dass die STAT1 Expression und eine Interferontherapie nicht mit einer signifikanten Zunahme im rezidivfreiem Überleben korreliert sind. Jedoch lässt sich erstaunlicherweise ein Zusammenhang zwischen STAT1 Expression, Interferontherapie und verlängertem Gesamtüberleben herstellen. Diese Tatsache erscheint paradox, da die Zeit bis zum Eintreten eines Melanomrezidives nicht verlängert ist. Daher handelt es sich am wahrscheinlichsten um einen rein rechnerischen Zusammenhang. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass es eine biologische Erklärung gibt.

Weder MTAP noch STAT1 stellen einen tumordickeunabhängigen Prognosefaktor dar, da beide signifikant mit der Tumordicke assoziiert sind. Daneben war die Reduktion der Expression von MTAP mit einem höheren Clark Level, die verstärkte STAT1 Expression mit dem weiblichen Geschlecht assoziiert. Da mit Zunahme der Tumordicke auch der Clark Level zunimmt, verwundert diese Korrelation auch im Zusammenhang mit einer verminderter MTAP Expression nicht. Auch in anderen Tumoren konnte eine geschlechterspezifische Modifikationen nachgewiesen werden. Beispielsweise konnten bestimmte Polymorphismen des Apolipoproteins E mit einem erhöhten Risiko für das Kolonkarzinom bei Männer assoziiert werden, nicht jedoch bei Frauen (Watson et al., 2003). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Besiedelung von cagA-positivem *Helicobacter pylori* bei Männern deutlich häufiger gefunden wird als bei Frauen, was den Inzidenzunterschied des Magenkarzinoms erklären könnte (Al-Marhoon, Nunn, Soames, 2006).

Für Patienten, die einen Primärtumor mit einer Tumordicke zwischen 1,5 und 4 mm aufwiesen und eine adjuvante Interferontherapie erhalten hatten, zeigte sich, dass MTAP positive Tumore mit einem signifikant längeren rezidivfreiem Überleben assoziiert waren als MTAP negative Tumore. In der Tendenz verbesserte sich auch das Gesamtüberleben, war jedoch nicht statistisch signifikant. Hingegen zeigten Patienten mit STAT1 positiven Tumoren

und Interferontherapie keine Verlängerung im rezidivfreien Überleben, jedoch im Gesamtüberleben. Interferon α stellt derzeit die einzige zugelassene Substanz in der adjuvanten Therapie des malignen Melanoms dar. Eine Verlängerung im rezidivfreien Überleben konnte in prospektiven randomisierten Studien nachgewiesen werden (Lens et al., 2002). Interferon α kann derzeit bei malignen Melanomen mit einer Tumordicke über 1,0 mm und Ulzeration oder einer Tumordicke über 2,01 mm ohne Ulzeration eingesetzt werden und sollte bei malignen Melanomen mit einer Tumordicke über 2,1 mm und Ulzeration bzw. beim Auftreten von Lymphknotenmetastasen eingesetzt werden, wenn keine Kontraindikationen vorliegen. Jedoch sind unerwünschte Arzneimittelwirkungen wie grippale Symptome bis hin zu Depressionen und Suiziden nicht ausgeschlossen. Eine Therapie mit Interferon α sollte daher gut überdacht werden und die Vorteile gegenüber den Nachteilen überwiegen (AWMF Leitlinie zum Malignen Melanom 2013). MTAP könnte einen Beitrag zur Therapientscheidung leisten. Daraus lässt sich schließen, dass die MTAP Expression ein vielversprechender Biomarker zur Abschätzung der Effektivität einer Interferontherapie ist. Somit handelt es sich bei MTAP nicht nur um einen prädiktiven sondern auch einen prognostisch relevanten Tumormarker. Einschränkend ist zu sagen, dass bisher nicht prospektiv und randomisiert untersucht wurde, ob MTAP positive Patienten mit einer Interferontherapie ein verlängertes Überleben aufweisen.

In primären malignen Melanomen mit einer Tumordicke über 4 mm zeigte sich keine Korrelation zwischen verringerter MTAP Expression, Interferontherapie und Verlängerung des rezidivfreien, bzw. Gesamtüberlebens. Ebenso gilt für STAT1. Damit stellt MTAP für primäre maligne Melanome mit einer Tumordicke über 4 mm keinen prädiktiven Faktor dar. Tumoren mit einer Tumordicke über 4 mm sind nur sehr spärlich bisher untersucht worden (Lasithiotakis et al., 2008). Darüber hinaus ist bereits bekannt, dass eine lineare Korrelation zwischen Tumordicke und melanombedingter Sterblichkeit ab einer Tumordicke über 4 mm nicht mehr vorhanden ist (Balch et al., 2001). Bisher fehlt ein grundsätzliches Verständnis der molekularen und genetischen Veränderungen bei dicken Melanomen. Daher ist zu überlegen, ob

eine Interferontherapie bei Patienten mit primären malignen Melanomen und einer Tumordicke über 4 mm sinnvoll ist. Hier sollte je nach Vorerkrankungen eine individuelle Entscheidung getroffen werden.

Eine mögliche therapeutische Option für MTAP negative Tumore wurde bereits in Mantelzellymphomen beschrieben. Patienten mit MTAP negativen Lymphomen wiesen dabei eine schlechtere Prognose auf als MTAP positive Tumore. Es konnte gezeigt werden, dass L-Alanosin, ein Inhibitor der de novo AMP Synthese, in MTAP negativen Tumoren zu einer Zunahme der Zytotoxizität und Erhöhung der Apoptoserate führt (Marce et al., 2006). Eine weitere denkbare Therapieoption stellen demethylierende Substanzen dar, da neben der Deletion als Ursache für den Verlust der Expression von MTAP auch eine Hypermethylierung der Promotorregion auftreten (Wild et al., 2006). Derzeit stellt Interferon α die einzige in Deutschland zugelassene Therapie zur Behandlung maligner Melanome in der adjuvanten Situation dar. Ab dem Stadium II wird eine low dose Interferontherapie mit 3x 3 Millionen IE pro Woche über 18 Monate empfohlen, im Stadium III eine high dose Interferontherapie (Davar et al., 2013). Neuere Therapieansätze in der adjuvanten Situation wie Vakzinierungen mit dem MAGE-A3 Protein, einem ausschließlich auf Tumorzellen exprimierten Antigen, wurden in klinischen Prüfungen getestet, haben jedoch noch keinen Einzug in die klinische Routine gefunden (Peled et al., 2009). Studien zum Einsatz von Substanzen, die bisher in der Therapie des metastasierten malignen Melanoms eingesetzt wurden, wie Ipilimumab und Vemurafenib, sind in Planung. Es laufen bereits Studien zur Kombination eines BRAF-Inhibitors und eines MEK-Inhibitors in der adjuvanten Situation. Man erhofft sich hierdurch, eine Metastasierung zu verhindern, bzw. das Fortschreiten einer Metastasierung frühzeitig aufzuhalten. Für Vemurafenib, einem BRAF-Inhibitor, ist die Bestimmung der BRAF Mutation als prognostischer Marker zwingend erforderlich, da ohne Vorliegen einer Mutation die spezifische Therapie mit Vemurafenib zu keinem Erfolg führt (Chapman et al., 2011). Für die Therapie mit Ipilimumab, einem CTLA-4-Antikörper, liegt kein vergleichbarer Biomarker vor. Eine Behandlung mit Ipilimumab stellt eine sehr nebenwirkungsreiche Therapie dar, deren An-

sprechrates etwa 20% beträgt (Hodi et al. 2010). Die Etablierung weiterer Substanzen zur adjuvanten Therapie des malignen Melanoms ist wünschenswert, um ein Fortschreiten der Erkrankung zu verhindern. Darüber hinaus ist die Entwicklung weiterer potentieller Biomarker sowohl für prognostische als auch therapeutische Belange eminent wichtig, um Patienten nicht wirksame und nebenwirkungsreiche Therapien zu ersparen, bzw. Patienten bessere Therapieempfehlungen geben zu können.

Es konnten bereits potentielle Biomarker mit Hilfe der Tissue Microarraytechnik und histochemischen Verfahren gefunden und zum Teil validiert werden. So fand sich eine vermehrte Expression von Hsp90 in malignen Melanomen im Vergleich zu melanozytären Nävi sowie bei metastasierten Melanomen im Vergleich zu Primärtumoren. Zusätzlich zeigte sich eine Korrelation zwischen der Zunahme der Expression, der Tumordicke nach Breslow und dem Clark Level. Jedoch konnte kein Zusammenhang zwischen der vermehrten Expression von Hsp90 und dem Überleben festgestellt werden (McCarthy, Pick et al., 2008). Daneben konnte zwischen RGS1, der Zunahme der Tumordicke, dem erhöhten Clark Level und einer vaskulären Beteiligung eine Korrelation hergestellt werden. RGS1 war mit einer Reduzierung des progressfreien Überlebens und des Gesamtüberlebens assoziiert (Rangel, Nosrati, 2008). Einen prädiktiven Marker für das Auftreten von Metastasen im Sentinellymphknoten stellt Osteopontin dar. Zusätzlich ist Osteopontin mit der Zunahme der Tumordicke, dem erhöhten Clark Level und dem mitotischen Index korreliert. Eine Zunahme von Osteopontin bedingt darüber hinaus ein erniedrigtes progressfreies- und Gesamtüberleben (Rangel, Nosrati et al., 2008). HER3 hingegen ist mit einer Zunahme der Zellproliferation, der Tumorprogression und einer Verringerung des Überlebens korreliert (Raschke, Nihic-Probst et al., 2008). Eine Steigerung von MCM4 und MCM6 korrelieren mit einem verringertem progressfreiem und Gesamtüberleben (Winnepenninckx, Lazar et al., 2006). Auch eine Zunahme von NCOA3 steht in Zusammenhang mit einem verringertem progressfreiem und Gesamtüberleben. Darüber hinaus nimmt mit der vermehrten Expression von NCOA3 die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen von Sentinellymphknoten-Metastasen zu

(Rangel, Torbian et al., 2006). Hingegen ist die Reduktion der nukleären Expression von ING3 mit einem schlechteren Gesamtüberleben assoziiert. ING3 stellt darüber hinaus einen unabhängigen prognostischen Faktor für die Vorhersage für das Überleben der Patienten dar (Wang, Dai et al., 2007). Die Reduktion von ING4 ist mit einer Erhöhung der Tumordicke nach Breslow, dem vermehrten Auftreten von Ulzeration und folglich mit einem verringertem progressfreien und Gesamtüberleben assoziiert, da Tumordicke und Ulzeration unabhängig voneinander und von anderen Faktoren mit einem verringertem progressfreien und Gesamtüberleben korreliert sind (Li, Martinka, Li, 2008; Gogas, Eggermont et al., 2009). All diesen potentiellen Biomarkern ist gemeinsam, dass sie in kleineren Fallstudien gefunden und teilweise die Ergebnisse in größeren Studien bestätigt werden konnten. Bisher haben alle potentiellen neuen Biomarker keine Relevanz in der klinischen Routine. Jedoch sollten weitere Studien angestrebt werden, um mögliche Fehlerquellen auszuschließen und die genauen Anwendungsmöglichkeiten zu erkennen. Neben diesen potentiellen histologischen Biomarkern werden seit langer Zeit Serumbiomarker wie LDH, S100B und MIA zur Prognoseabschätzung eingesetzt (Gogas, Eggermont et al., 2009). So konnte gezeigt werden, dass LDH ein Indikator für das Vorliegen einer Lebermetastasierung ist und mit einer Verringerung des Gesamtüberlebens korreliert ist. Daher stellt LDH einen signifikanten Marker für eine metastasierte Tumorerkrankung dar (Finck, Giuliano, Morton, 1983; Campora, Repetto et al., 1988). Zu den bestuntersuchten Serumbiomarkern gehört S100B. Es konnte gezeigt werden, dass der Ausgangswert von S100B mit dem Tumorstadium und der Prognose korreliert ist. Ein Anstieg der Konzentration zeigte einen Progress der Erkrankung, ein Absinken von S100B eine Remission oder ein Ansprechen auf die Therapie an (Hauschild, Engel et al., 1999). MIA stellt einen weiteren Serumbiomarker dar. Es konnte gezeigt werden, dass 13% bzw. 23% der Patienten im Stadium I oder II erhöhte MIA Werte aufwiesen, jedoch 100% der Patienten im Stadium III und IV (Bosserhoff, Kaufmann et al., 1997). Allen Serummarkern ist gemeinsam, dass sie einen mehr oder weniger großen prognostischen Wert haben. Vorteilhaft ist in erster Linie die unkomplizierte Gewinn-

nung, die den Einsatz in der Routinediagnostik und Nachsorge erleichtert. Jedoch ist ihre Aussagekraft bezüglich der Entstehung von Metastasen limitiert. Im Stadium IV, das bedeutet beim Vorliegen einer Fernmetastasierung, sind die therapeutischen Optionen limitiert. Mögliche neue Serumbiomarker stellen TA90IC und YKL-40 dar. Es konnte nachgewiesen werden, dass TA90IC einen unabhängigen Prädiktor für das Überleben darstellt (Faries, Gupta et al., 2007). Der Ausgangswert zum Zeitpunkt der Diagnosestellung von YKL-40, ein Heparin- und Chitinbindendes Lectin, stellt einen unabhängigen prognostischen Faktor für das progressfreie und Gesamtüberleben dar (Johansen, Jensen et al., 2006). Diese potentiellen neuen Biomarker müssen hinsichtlich ihrer Aussagekraft in weiteren Studien validiert werden.

Fortschritte in der Proteomik und Bioinformatik konnten zum Teil sehr genaue Vorhersagen eines Progresses machen (Mian, Ugurel et al., 2005). Jedoch handelte es sich hierbei um ein Pilotprojekt, weitere Untersuchungen zur Durchführbarkeit und Kraft der Vorhersagen sind notwendig. Bisher wurden wenige Untersuchungen zur Vorhersagekraft von Biomarkern hinsichtlich Ansprechen auf eine Therapie durchgeführt. Neben der Korrelation des Vorhandenseins einer Ulzeration und dem Ansprechen auf eine Therapie mit pegyliertem Interferon (Eggermont, Suciú et al., 2008), konnte ein Zusammenhang zwischen dem LDH Wert und dem Ansprechen auf eine Oblimersentherapie (Bedikian, Millward et al., 2006) und das Vorhandensein von Autoantikörpern und dem Ansprechen auf eine Hochdosis Interferontherapie festgestellt werden (Gogas, Ioannovich et al., 2006). Somit stellt MTAP einen der wenigen prädiktiven Faktoren für das Ansprechen einer Interferontherapie dar.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass Biomarker eine sehr heterogene Gruppe von Molekülen darstellen. Aufgrund der Vielzahl der Patienten, der hohen Nebenwirkungsraten der adjuvanten und metastasierten Therapiekonzepte und möglicher Prognoseabschätzung besteht ein großer Bedarf für mögliche Biomarker. Jedoch konnten sich wenige Biomarker in der Routinediagnostik etablieren, weil sie bisher nicht genügend validiert sind oder die

Durchführung zu aufwendig ist. Daher sind weitere Studien notwendig, um mögliche prognostische und prädiktive Biomarker zu finden.

Kritisch an der von uns durchgeführten Studie ist vor allen Dingen die geringe Fallzahl in den einzelnen Untergruppen zu sehen. Trotz der großen Gesamtzahl der Spots des Tissue Microarrays ergab sich bei der Auswertung der univariablen Analyse des rezidivfreien Überlebens beispielsweise lediglich 11 Patienten, die MTAP negativ waren. Weitere Studien mit größerer Fallzahl sind nötig, um die Zusammenhänge noch deutlicher herauszuarbeiten. Im Hinblick auf die gesamte Studie müsste mehr histologisches Material zur Auswertung gebracht werden. Dafür sollte das histologische Material sofort nach Einschluss des Patienten in die Studie gesammelt werden. Es könnte durch diese Maßnahme auch viel früher ein Aussortieren von ungenügendem oder ungeeignetem Material stattfinden, ohne die Fallzahl zu senken. Auch sollten Patienten mit Melanometastasen in größerer Anzahl in der Studie vertreten sein, um zelluläre Veränderungen besser herausarbeiten zu können. Zur Vereinfachung des Patienten Follow ups müssen beispielsweise in jedem Arztbrief die genaue Klassifikation, Lokalisation und das Erstdiagnosedatum enthalten sein. Die Auswertung wird somit erleichtert, da das aufwendige Aktenstudium entfällt. Des Weiteren ist eine engere Kooperation mit den Tumorzentren bzw. der Tumorzentren untereinander von Nöten. Bisher fehlt eine Kommunikation der Tumorzentren. Im Falle, dass eine Patient selbst innerhalb Bayerns in eine andere Region zieht, erfolgt keine Datenübermittlung an das neue zuständige Tumorzentrum. Somit kann keine lückenlose Dokumentation von Patientenverläufen erfolgen. Zudem sollte die Zusammenarbeit niedergelassener Ärzte und Kliniken mit den Tumorzentren verbessert werden. Zertifizierte Tumorzentren sind zur Meldung von Tumorpatienten verpflichtet. Jedoch erfolgt nur in Ausnahmefällen eine Tumormeldung bzw. eine Verlaufsmeldung oder eine Todesmeldung durch niedergelassene Ärzte oder Kliniken an die Tumorzentren. Ein Großteil der palliativen Patienten, aber auch der Langzeitüberlebenden in den Stadien I, II und III

werden heimnah versorgt. Der Status des Patienten, das heißt ob ein Patient noch lebt oder bereits verstorben ist, ist nicht immer zu erheben.

Neben MTAP und STAT1 können aufbauend auf dieser Arbeit noch weitere potentielle Biomarker untersucht werden. Daraus ergibt sich die Chance, weitere mögliche prognostisch und prädiktiv relevante Faktoren zu finden. Auch aus der Kombination mehrerer Marker könnten sich neue Erkenntnisse für Prognose und Therapie ergeben. Ziel einer derartigen Studie ist eine individualisierte Therapie anhand des Tumorexpressionsmusters zu erstellen.

Mit MTAP konnte ein prognostischer Marker für das maligne Melanom, ebenso wie ein prädiktiver Marker hinsichtlich der Durchführung einer Interferontherapie gefunden werden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine Kombination aus vier Tumormarkern (Ki67, p16^{INK4a}, p21^{CIP1} und BCL-6) mit einem verringertem Gesamtüberleben bei nodulären malignen Melanomen korreliert ist. Jedoch wurden in dieser Studie lediglich 72 Patienten mit nodulären malignen Melanomen untersucht. Auch die Anzahl der Antikörper war mit 39 im Vergleich zu allen im Rahmen der mehrdimensionalen Melanombiomarker Initiative Regensburg – Hamburg – Zürich untersuchten Antikörper geringer (Alonso et al., 2004). In anderen Studien wurde zur Prognoseabschätzung neben immunhistochemischen Markern auch chromosomale Veränderungen, histologische Kriterien, klinische Kriterien und Blutuntersuchungen herangezogen. Jedoch wurden alle Parameter einzeln hinsichtlich des diagnostischen Nutzens und der prognostischen Aussagekraft hin untersucht (Carlson et al., 2005). Es fand keine Kombinationsanalyse der einzelnen Faktoren statt. Eine Vielzahl von Einzelanalysen und erhobener Daten zur Prognoseabschätzung verringert die klinische Einsatzfähigkeit. In einer Metaanalyse zur prognostischen Aussagekraft wurden in 37 Studien 62 potentielle Biomarker gefunden. Hierunter waren Zelladhäsionsmoleküle, Matrixmetalloproteinasen, Ki67, Proliferationsantigene und p16^{INK4a} (Gould Rothberg et al., 2009). Jedoch erfolgte auch in dieser Studie keine Kombination mehrerer Faktoren. Darüber hinaus konnte bei Patienten mit malignen Melanomen im Stadium II gezeigt werden, dass eine Einordnung in Risikogruppen

möglich ist. Hierfür wurden fünf Tumormarker (ATF2, p21^{WAF1}, p16^{INK4a}, β -Catenin und Fibronectin) untersucht. Waren weniger als drei Marker vorhanden, zeigte sich ein signifikant verringertes Überleben. Darüber hinaus wurden die gefundenen Ergebnisse prospektiv an einem weiteren Tissue Microarray mit 246 primären malignen Melanomen validiert (Gould Rothberg et al., 2009). Somit konnte eine Prognoseabschätzung nicht nur retrospektiv gezeigt, sondern auch prospektiv bestätigt werden. Kritisch anzumerken ist die klinische Anwendbarkeit der gefundenen Ergebnisse. Die Bestimmung von fünf oder mehr Proteinen zur Risikoabschätzung scheint bei der Vielzahl der Patienten und der geringen therapeutischen Interventionsmöglichkeiten wenig praktikabel.

Trotz der Abnahme der Tumordicke ist eine weiterreichende Forschung im Bereich sehr dicker Tumoren in Zukunft nötig um eine gezieltere Therapie zu ermöglichen. Mit MTAP konnte ein prognostischer Marker für das Überleben, ebenso wie ein prädiktiver Marker hinsichtlich der Durchführung einer Interferontherapie gefunden werden. Es muss sich in weiterführenden Studien zeigen, ob dies von tatsächlicher klinischer Relevanz ist. Auch andere Faktoren spielen für den Einzug in die Routinediagnostik eine entscheidende Rolle.

In den letzten Jahren konnte erstmalig nach langer Zeit ein Fortschritt in der Therapie des metastasierten malignen Melanoms gemacht werden. Erstmals konnte mit dem CTLA-4 Antikörper Ipilimumab in prospektiven kontrollierten Phase III Studien ein Überlebensvorteil von Patienten mit metastasiertem malignem Melanom nachgewiesen werden. Zur Aktivierung von T-Zellen muss neben der Aktivierung des T-Zell-Rezeptors noch eine kostimulatorische Signaltransduktion über CD28 oder B7 erfolgen. Nach einer Aktivierung exprimiert die T-Zelle CTLA-4, das eine T-Zell-Aktivierung verhindert. Durch Blockade mit einem CTLA-4 Antikörper kommt es zu einer Verstärkung der T-Zell-Antwort (Hodi et al., 2010). Der CTLA-4 Antikörper Ipilimumab ist in Deutschland zur Behandlung des malignen Melanoms für die first- und second-line Therapie zugelassen. Es werden 4 Zyklen Ipilimumab alle 3 Wochen in einer Dosierung von 3mg/kg Körpergewicht intravenös verabreicht.

Typische Nebenwirkungen einer Therapie mit Ipilimumab sind immunvermittelte Nebenwirkungen. Hierzu zählen die Autoimmunkolitis, die Autoimmunhepatitis, Immunreaktion an der Haut und die Hypophysitis. Die Ansprechrate auf die Therapie mit Ipilimumab beträgt etwa 20%, die Nebenwirkungsrate liegt bei etwa 50% (Archarya et al., 2013). Somit handelt es sich bei Ipilimumab um eine wirksame, jedoch nebenwirkungsreiche Therapie. Es ist kein Biomarker zur Abschätzung des Ansprechens auf eine Therapie verfügbar, ebenso wenig zum möglichen Auftreten von zum Teil schweren lebensbedrohlichen Nebenwirkungen. Derzeit werden PD-1 und PD-1L- Antikörper in klinischen Studien zur Therapie des metastasierten malignen Melanoms untersucht. Es zeigte sich in ersten Auswertungen ein verbessertes Ansprechen und weniger Nebenwirkungen im Vergleich zu Ipilimumab. Weitere Auswertungen sind abzuwarten. Auch Kombinationstherapie zwischen PD-1, bzw. PDL-1- Antikörpern und Ipilimumab sind angedacht. Mit der Bestimmung von PDL-1 steht darüber hinaus ein potentieller Biomarker für das Ansprechen der Therapie zur Verfügung. Jedoch muss dieser noch validiert werden (Mereki et al., 2014).

Mit dem BRAF Inhibitor Vemurafenib steht erstmalig ein Therapeutikum zur Behandlung des metastasierten malignen Melanoms zur Verfügung, dessen Einsatz auf das Vorhandensein einer genetischen Mutation basiert. In der zur Zulassung führenden Studie konnte ein deutlich verbessertes Gesamtüberleben und eine Verbesserung des progressionsfreien Überlebens im Vergleich zu Dacarbazin gezeigt werden (Chapman et al., 2011). Neben Arthralgien und Photosensitivität sind auch die Entstehung von Keratoakanthomen und Plattenepithelkarzinomen beschrieben (Ribas et al., 2011). Vemurafenib wird in einer Dosis von 960mg zweimal täglich oral verabreicht. Neben Vemurafenib wurde ein weiterer BRAF Inhibitor (Dabrafenib) zugelassen. Bei Vemurafenib handelt es sich somit erstmalig um ein Medikament zur Behandlung des metastasierten malignen Melanoms, dessen Einsatz vom Vorhandensein eines Biomarkers abhängig ist. Somit ist der erste Schritt hin zur individualisierten Therapie getan.

Auch eine Kombinationstherapie zwischen Ipilimumab und Vemurafenib ist angedacht, da eventl. synergistische Effekte durch Reduktion der Tumorlast und gleichzeitige Freisetzung antigenen Materials theoretisch denkbar sind. Weitere Ergebnisse auch zu Nebenwirkungen und Sicherheit beider Substanzen sind abzuwarten.

Erste Studien zur Kombination eines BRAF Inhibitors mit einem MEK1/2 Kinase Inhibitor wurden bereits veröffentlicht. Einerseits konnten synergistische Effekte bei der Inhibition des RAS/RAF/MEK/ERK Signaltransduktionsweges festgestellt werden, andererseits sollten Resistenzbildungen, wie sie bei der Monotherapie berichtet werden, vermindert werden. Darüber hinaus erhofft man sich eine niedrigere Inzidenz von Plattenepithelkarzinomen und Keratoakanthomen im Vergleich zur Monotherapie. In ersten veröffentlichten Ergebnissen konnten Remissionsraten von bis zu 77% und eine Tumorkontrolle in 99% der Fälle erreicht werden. Auch die erwartete geringere Inzidenz von hyperproliferativen Hautveränderungen konnte gezeigt werden (Infante et al., 2011).

Durch molekulare Untersuchung konnten neben BRAF auch RAS, c-KIT und TP53 Mutationen bei Melanomen nachgewiesen werden. Therapeutische Ansätze an diesen potentiellen Targets sind denkbar, auch wenn aufgrund der Verteilung wahrscheinlich ein wesentlich geringerer Anteil an Patienten profitieren würde (Cheng et al., 2011).

Die Entwicklung neuer zielgerichteter Therapien zur Behandlung des malignen Melanoms hat durch die Untersuchung genetischer Veränderungen einen großen Schritt in Richtung einer individualisierten Therapie getan. Neben bereits eingesetzten und potentiellen genetischen Targets sollten mögliche epigenetische Ansätze nicht vernachlässigt werden. Weiterhin sind sehr wenige prospektive und prognostische Biomarker sowohl in der adjuvanten wie auch in der metastasierten Therapie bekannt, um ein mögliches Ansprechen einer Therapie und das Auftreten von Nebenwirkungen abzuschätzen. Die Tissue Microarray Technik kann bei der Suche nach potentiellen Biomarkern hilfreich sein.

6. Zusammenfassung

Die Inzidenz maligner Melanome hat in den letzten Jahren stark zugenommen. Neben der chirurgischen Exzision sind derzeit einzelne erfolgversprechende Behandlungskonzepte des metastasierten malignen Melanoms bekannt. In der adjuvanten Behandlung ist zur Zeit lediglich Interferon α zugelassen. Jedoch ist das Ansprechen dieser Therapie sehr begrenzt (Herz, 2005). Neue prognostische und prädiktive Marker, um das Metastasierungsrisiko und das Ansprechen auf eine Interferon α Therapie vorherzusagen, wären wünschenswert.

Die Melanom Biomarker Initiative Regensburg – Hamburg – Zürich hat sich zum Ziel gesetzt, einen oder eine Kombination aus Biomarkern mithilfe der Tissue Microarray Technik zu finden, um die Progression der Erkrankung und das Ansprechen auf eine Therapie abschätzen zu können. Somit soll eine individualisierte Risikoabschätzung und Therapie maligner Melanome ermöglicht werden.

Hierfür wurden aus einem Patientenkollektiv von 968 Patienten diejenigen herausgefiltert, bei denen sowohl histologisches Material des Primärtumors als auch Verlaufsdaten des Patienten vorhanden waren. Letztlich konnte aus dem Material von 368 Patienten ein Tissue Microarray erstellt werden. Zusätzlich wurde ein zweiter Tissue Microarray mit 62 Nävuszellnävi und 39 Melanommetastasen zur Kontrolle angefertigt.

Der Tissue Microarray wurde mit Antikörpern gegen Transkriptionsfaktoren, Apoptoseinhibitoren, Proto-Onkogene, Zell-Zykluskontrollproteine, proangiogenetische Proteine und DNA-Reparaturproteine gefärbt. Im Rahmen dieser Doktorarbeit erfolgte die Datenacquire, Erstellung und pilotprojektartige Auswertung des Tissue Microarrays bzgl. MTAP und STAT1. Viele weitere Analysen sind aufbauend auf dieser Arbeit in Gang gekommen.

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die MTAP Expression sowohl von prognostischer als auch von prädiktiver Relevanz ist. So war eine Expression von MTAP mit einem signifikant verlängerten Gesamtüberleben und rezidivfreien Überleben korreliert. Zusätzlich wurde deutlich, dass Patienten

mit MTAP positiven Primärtumoren unter einer Interferontherapie eine bessere Prognose haben als Patienten mit MTAP negativen Tumoren, da das rezidivfreie Überleben verlängert wird (Meyer et al., 2009).

Weitere Erkenntnisse aus der mehrdimensionalen Melanom Biomarker Initiative Regensburg – Hamburg - Zürich konnten zusätzliche Möglichkeiten der Risikostratifizierung und Therapieoptimierung von Melanompatienten aufzeigen. Die Ergebnisse könnten einen Beitrag leisten zu einer individualisierten Therapie anhand des molekularen Risikoprofils.

7.1. Abkürzungsverzeichnis

bzw	beziehungsweise
SSM	superfiziell spreitendes Melanom
NMM	primär noduläres Melanom
LMM	Lentigo maligna Melanom
ALM	akrolentigiöses Melanom
DPW	dermatoskopischer Punktwert
CT	Computertomographie
MRT	Kernspintomographie
PET	Positronen Emissions Tomographie
MIA	Melanoma Inhibitory Activity
TRANS Regel	<u>t</u> runk, <u>a</u> rm, <u>n</u> eck, <u>s</u> calp Regel
BCG	Bacille Calmette Guerin
GM-CSF	Granulozyten - Makrophagen - Kolonie stimulierender Faktor
IE	internationale Einheit
DTIC	Decarbazin
TNM	Tumor, Node, Metastasis
AJCC	American Joint Committee on Cancer
d.h.	das heißt
EMT	Epithelial mesenchymal transition
RAS	Rat sarcoma
TP53/p53	Tumor protein 53
PTEN	phosphatase and tensin homolog
SNPs	single nucleotide polymorphisms
FLT 1	FMS- like tyrosine kinase
NRP 2	Neuropilin 2
CDKN	Cyclin dependent kinase inhibitor

CDK	Cyclin dependent kinase
CTLA	Cytotoxic T- Lymphocyte antigen
TMA	Tissue Microarray
ml	Milliliter
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
PBS	Phosphate buffered saline
Ect.	etcetera
ABC- Methode	Avidin- Biotin- Complex Methode
LAB- Methode	Labelled Avidin Methode
LSAB- Methode	Labelled Streptavidin Methode
P16	Protein 16
MTAP	Methylthioadenosinphosphorylase
P15	Protein 15
INFA	Interferon α
INFB	Interferon β
STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1
AMP	Adenosinmonophosphat
AEC	3- Amino-9-Ethylcarbazol
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
RAS GTPase	Rat sarcoma Guanidintriphosphatase
RAF	Rapidly accelerated fibrosarcoma
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
MITF	Microphthalmia-associated transcription factor
c-KIT	Tyrosinkinaseinhibitor

7.2. Literaturverzeichnis

Acharya UH, Jeter JM: Use of Ipilimumab in the treatment of melanoma. Clin Pharmacol 2013; 5: 21-27

Akslen LA, Monstad SE, Larsen B, Straume O, OGREID D: Frequent mutations of the p53 gene in cutaneous melanoma of the nodular type. Int J Cancer 1998; 79: 91-95

Al-Marhoon MS, Nunn S, Soames RW: Colonization of cagA-positive Helicobacter pylori is significantly greater in infected human males than females. A possible factor in distal gastric cancer gender. Saudi Med J 2006; 6: 898-900

Alonso SR, Tracey L, Ortiz P, Perez- Gomez B, Palacios J, Pollan M, Linares J, Serrano S, Saez- Castillo AI, Sanchez L, Pajares R, Sanchez- Aguilera A, Artiga MJ, Piri MA, Rodriguez- Peralto JL: A high- throughput study in melanoma identifies epithelial- mesenchymal transition as a major determinant of metastasis. Cancer Res 2007; 67: 3450-3460

Alonso SR, Ortiz P, Pollan M, Perez-Gomez B, Sanchez L, Acuna MJ, Pajares R, Martinez-Tello FJ, Hortelano CM, Piri MA, Rodriguez-Peralto JL: Progression in cutaneous malignant melanoma is associated with distinct expression profiles. Am J Pathol 2004; 164: 193-203

Amaravadi R, Schuchter L, McDermott D. : Update results of a randomised phase II study comparing two schedules of temozolomide in combination with sorafenib in patients with advanced melanoma. J Clin Oncol 2007; 25: 8527

AWMF , Deutsche Krebsgesellschaft e.V., Deutsche Krebshilfe (Hrsg.): S3 Leitlinie „ Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms. Fassung vom Februar 2013 unter www.leitlinienprogramm-onkologie.de

Bachter D, Konz B: Indikation und Technik der Sentinel- Lymphknoten- Ektomie. Tumorzentrum München (Hrsg.): Manual Maligne Melanome. Zuckschwerdt Verlag München Bern Wien New York 5. Auflage 2000; 46-48

Balch CH, Soong SJ, Gershenwals JE, Thompson JF, Reintgen DS, Cascinelli N, Urist M, McMathers KM, Ross MI, Kirkwood JM, Atkins MB, Thompson JA, Coit DG, Byrd D, Desmond R, Zhang Y, Liu PY, Lyman GH, Morabito A: Prognostic factors analysis of 17.600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. J Clin Oncol 2001; 19: 3622-3624

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

Ball NJ, Yohn JJ, Morelli JG, Norris DA, Golitz LE, Hoeffler JP: Ras mutations in human melanoma: A marker of malignant progression. *J Invest Dermatol* 1994; 102: 285-290

Bataille V: Genetics of familial and sporadic melanoma. *Clin Exp Dermatol* 2000; 25: 464-470

Becker JC, Schrama D, Bröcker EB: Neue Therapiekonzepte mit molekularen Strategien. Garbe (Hrsg.): *Management des Melanoms*. Springer Verlag Berlin Heidelberg New York 2006; 316-326

Bedikian A, Millward M, Pehamberger H, Conry R, Gore M, Trefzer U, Pevlick AC, DeCorti R, Hersh EM, Hersey P, Kirkwood JM, Haluska FG: Bcl-2 antisense (olimersen sodium) plus dacarbazine in patients with advanced melanoma: the Oligomersen Melanoma Study Group. *J Clin Oncol* 2006; 24: 4738-4745

Beeram M, Patnaik A, Rowinsky EK: Raf: A strategic target for therapeutic development against cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 6771-6790

Behrmann I, Wallner S, Komyod W, Heinrich PC, Schuierer M, Buettner R, Bosserhoff AK: Characterization of Methyladenosin Phosphorylase (MTAP) expression in malignant melanoma. *American Journal of Pathology* 2003; 2: 683-690

Bertz J, Giersiepen K, Haberland J, Henschel S, Kaatsch P, Katalinic A, Stabenow R, Stegmaier Ch, Ziegler H: Malignes Melanom. Gesellschaft des epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. in Zusammenarbeit mit dem Robert Koch Institut (Hrsg.), 48-52. Online- Publikation des Robert Koch Institutes www.rki.de Stand: 25.11.2007

Bosserhoff AK: Novel biomarkers in malignant melanoma. *Clin Chim Acta* 2006; 367: 28-36

Bosserhoff AK, Kaufmann M, Kaluza B, Bartke I, Zirngibl H, Hein R, Stolz W, Buettner R: Melanoma-inhibiting activity, a novel serum marker for progression of malignant melanoma. *Cancer Res* 1997; 15: 3149-3153

Breitbart EW, Wende A, Mohr P, Greinert R, Volmer B: Hautkrebs. Robert Koch-Institut (Hrsg.), 2010: 1-35. Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Heft 22

Bubendorf L, Nocito A, Moch H, Sauter G: Tissue microarray (TMA) technology: minimaturized pathology archives for high-throughput in situ studies. *J Pathol* 2001; 195: 72-79

Burg G: Prognostische Faktoren. Burg G (Hrsg.): Hautkrebs: das maligne Melanom. Fakten und Handlungsbedarf. Bundesamt für Gesundheit. Schweizerische Krebsliga 1998; 28-31

Bush J, Li G: The role of Bcl-2 family members in the progression of cutaneous melanoma. *Clin Exp Metastasis* 2003; 20: 531-539

Campora E, Repetto L, Giuntini P, Bertelli G, Amoroso D, Sertoli MR, Rosso R: LDH in the follow-up of stage I malignant melanoma. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1988; 24: 277-278

Carlson JA, Ross JS, Sloinski A, Linette G, Mysliborski J, Hill J, Mihm M: Molecular diagnostics in melanoma. *J Am Acad Dermatol* 2005; 5: 743-775

Chin L, Pomerantz J, Polsky D, Jacobson M, Cohen C, Cordon-Cardo C, Horner JW 2nd, DePinho RA: Cooperative effects of INK4a and ras in melanoma susceptibility in vivo. *Genes Dev* 1997; 11: 2822-2834

Clemm CH, Schmid L, Angerer J: Supportive Therapie. Tumorzentrum München (Hrsg.): Manual Maligne Melanome. Zuckschwerdt Verlag München Bern Wien New York 5. Auflage 2000; 84-92

Cranmer LD, Hersh E: The role of the CTLA4 Blockade in the treatment of malignant melanoma. *Cancer Invest* 2007; 25: 613-631

Cully M, You H, Levine AJ, Mak TW: Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 184-192

Dadras SS, Lange-Aschenfeldt B, Velasco P, Nguyen L, Vora A, Muzikansky A, Jahnke K, Hauschild A, Hirakawa S, Mihm MC, Detmar M: Tumor lymphangiogenesis predicts melanoma metastasis to sentinel lymph nodes. *Mod Pathol* 2005; 18: 1232-1242

Datta MW, Kajdacsy-Balla AA: Tissue Microarrays in Prostate Cancer Research. Chung LWK, Isaacs WB, Simons JW (Hrsg.): Prostate Cancer. Humana Press 2nd Edition 2007; 50-62

Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterso BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA: Mutations of BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002; 417: 949-954

Davis IJ, Kim JJ, Oszolak F, Widlund HR, Rozenblatt-Rosen O, Granter SR, Du J, Fletcher JA, Denny CT, Lessnick SL, Linehan WM, Kung AL, Fisher DE: Oncogenic MITF dysregulation in clear cell sarcoma: Defining the MIT family of human cancers. *Cancer Cell* 2006; 9: 473-484

Davar D, Tarhini AA, Kirkwood JM: Adjuvant immunotherapy of melanoma and development of new approaches using neoadjuvant approaches. *Clin Dermatol* 2013; 31: 235-250

Dummer R, Schadendorf D: Vakzinierungsstrategien mit Hilfe der Gentherapie. Garbe (Hrsg.): Management des Melanoms. Springer Verlag Berlin Heidelberg New York 2006; 298-302

Eggermont AM, Suci S, Santinami M, Testori A, Kruit WH, Marsden J, Punt CJ, Sale's F, Gore M, Mackie R, Kusic Z, Dummer R, Hauschild A, Musat E, Spatz A, Keilholz U: Adjuvant therapy with pegylated interferon alfa-2b versus observation alone in resected stage III melanoma: final result of EORTC 18991, a randomised phase III trial. *Lancet* 2008; 372: 117-1126

Faries MB, Gupta RK, Ye X, Lee C, Yee C, Leopoldo Z, Essner R, Foshag LJ, Elashoff D, Morton DL: A Comparison of 3 tumor markers (MIA, TA90IC, S100B) in stage III melanoma patients. *Cancer Invest* 2007; 25 : 285-293

Farshad A, Burg G, Panizzon R, Dummer R: A retrospective study of 150 patients with lentigo maligna and lentigo maligna melanoma and the efficacy of radiotherapy using Grenz or soft- X- rays. *Br J Dermatol* 2002; 146: 1042-1046

Fercher LA, Cummings SD, Keefe MJ, Alani RM: Toward a molecular classification of melanoma. *J Clin Oncol* 2007; 25: 1606-1620

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

Garbe C, Hauschild A, Linse R: Adjuvant treatment of patients with cutaneous melanoma and regional node metastasis with low dose interferon or interferon plus DTIC versus observation alone. Preliminary evaluation of a randomized multicenter DeCOG trial. *Melanoma Res* 2002; 12: A13-A14

- Garnett MJ**, Marais R: Guilty as charged: B-RAF is a human oncogen. *Cancer Cell* 2004; 6: 313-319
- Giaccia AJ**, Kastan MB: The complexity of p53modulatio: Emerging patterns from divergent signals. *Genes Dev* 1998; 12: 2973-2983
- Giehl K**: Oncogenic ras in tumor progression and metastasis. *Biol Chem* 2005; 386; 193-205
- Goding C**, Meyskens FL Jr: Microphthalmic-associated transcription factor integrates melanocyte biology and melanoma progrssion. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 1069-1073
- Goding CR**: Mitf from neural crest to melanoma: signal transduction and transcription in the melanocte lineage. *Genes Dev* 2000; 14: 1712-1728
- Gogas H**, Eggermont AM, Hauschild A, Hersey P, Schadendorf D, Spatz A, Dummer R: Biomarker in melanoma. *Annals of Oncology* 2009; 20:vi22-vi29
- Gould Rothberg BE**, Berger AJ, Molinaro AM, Subtil A, Krauthammer MO, Camp RL, Bradley WR, Ariyan S, Kluger HM, Rimm DL: Melanoma prognostic model using tissue Microarrays and genetiv algorithms. *J Clin Oncol* 2009; 27: 5772-5780
- Gould Rothberg BE**, Bracken MB, Rimm DL: Tissue biomarkers for prognosis in cutaneous melanoma: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 2009; 101: 452-474
- Grant-Kels JM**, Bason ET, Grin CM: The misdiagnosis of malignant melanoma. *J Am Acad Dermatol* 1999; 40: 539-548
- Granville CA**, Memmott RM, Gills JJ, Dennis PA: Handicapping the race to develop inhibitors of the phosphoinositide 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin pathway. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 679-689
- Grichnik JM**: Kit and melanocyte migration. *J Invest Dermatol* 2006; 126: 945-947
- Gummer M**, Schmid L, Clemm CH, Volkenandt M: Nachsorge bei Patienten mit malignen Melanomen. *Tumorzentrum München (Hrsg.): Manual Maligne Melanome*. Zuckschwerdt Verlag München Bern Wien New York 5. Auflage 2000; 124-129
- Harris SL**, Levine AJ: The p53 pathway: Positive and negative feedback loops. *Oncogene* 2005; 24: 2899-2908
- Hauschild A**, Egberts F, Kaufmann R: Operative Therapie des primären Melanoms. *Garbe (Hrsg.): Management des Melanoms*. Springer Verlag Berlin Heidelberg New York 5. Auflage 2005; 198-202

Hauschild A, Eiling S, Lischner S, Haacke TC, Christophers E: Sicherheitsabstände bei der Exzision des primären malignen Melanoms. *Hautarzt* 2001; 52: 1003-1110

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* 1999; 56: 338-344

Hauschild A, Gogas H, Tarhini A, Middleton MR, Testori A, Dreno B, Kirkwood JM: Practical guidelines for the management of interferon- α -2b side effects in patients receiving adjuvant treatment for melanoma. *American Cancer Society* 2008; 10: 982-994

Hauschild A, Volkenandt M, Garbe C: Adjuvante medikamentöse Therapie des malignen Melanoms. Aktueller Wissensstand und der derzeitige Multizenterstudien in den deutschsprachigen Ländern. *Dtsch Med Wochenschr* 2000; 125: 1272-1278

Hauschild A, Volkenandt M, Garbe C: Adjuvante medikamentöse Therapie des Melanoms. Garbe C(Hrsg.): *Management des Melanoms*. Springer Verlag Berlin Heidelberg New York 2006; 276-282

Hein R, Bosserhoff A, Degitz K: Tumormarker des malignen Melanoms. *Tumorzentrum München (Hrsg.): Manual Maligne Melanome*. Zuckschwerdt Verlag München Bern Wien New York 5. Auflage 2000; 36-39

Herlyn M: Molecular targets in melanoma: strategies and challenges for diagnosis and therapy. *Int J Cancer* 2006; 118: 523-526

Hernberg M, Turunen JP, von Boguslawsky K, Muhonen T, Pyrhönen S: Prognostic value of biomarkers in malignant melanoma. *Melanoma Res* 1998; 8: 283-291

Herz E: Maligne Tumoren und Paraneoplasien. Moll I (Hrsg.): *Duale Reihe Dermatologie*. Thieme Verlag 6. Auflage 2005; 323-336

Hessel AC, Byers RM: Desmoplastic melanoma of the lip. *Head Neck* 2002; 24: 605-608

Hill GJ, Moss SE, Golomb FM, Grage TB, Fletcher WS, Minton JP, Kremenz ET: DTIC and combination therapy for melanoma III, DTIC surgical adjuvant study COG protocol 7040. *Cancer* 1981; 47: 2556- 2562

Hodi GJ, O'Day SF, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, Gonzales R, Robert C, Schadendorf D, Hassel JC, Akerley W, van den Eertwegh AJM, Lutzky J, Lorigan P, Vaubel JM, Linette GP, Hogg D, Ottensmeier CH, Lebba C, Peschel C, Quirt I, Clark JI, Wolochok JD, Weber JS, Tian J, Yellin MJ, Nichol GM, Hoos CBA, Urban WJ: Improves survival with Ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2010; 363: 711-723

Janku F, Novotny J, Julis I, Julisova I, Pecen L, Tomancova V, Kocmanova G, Krasna L, Krajsova I, Stork J, Prtruzelka L: KITreceptor is expressed in more than 50% of early-stage malignant melanoma: A retrospective study of 261 patients. *Melanoma Res* 2005; 15: 251-252

Johansen JS, Jensen BV, Roslind A, Nielsen d, Price PA: Serum YKL-40, a new prognostic biomarker in cancer patients? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15: 194-202

Kallioniemi OP, Wagner U, Kononen J, Sauter G: Tissue microarray technology for high- throughput molecular profiling of cancer. *Human Molecular Genetics* 2001; 7: 657-662

Karg C, Garbe C, Orfanos CE: Chemotherapie des malignen Melanoms - aktueller Stand. *Hautarzt* 1990; 41: 56-65

Keilholz U, Punt CJ, Gore M, Kruit W, Patel P, Lienard D, Thomas J, Proebstle TM, Schmittel A, Schadendorf D, Velu T, Negrier S, Kleeberg U, Lehman F, Suci S, Eggermont AM: Dacarbazine, cisplatin and interferon- alpha- 2b with or without interleukin-2 in metastatic melanoma: a randomized phase III trial (18951) of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer Melanoma Group. *J Clin Oncol* 2005; 23: 6747-6755

Kim C, Paik S: Tissue microarrays. Gasparini G, Hayes Df (Hrsg.): *Biomarkers in Breast Cancer* 2007; 31-44

Kirkwood JM, Strawderman MH, Ernsthoff MS, Smith TJ, Borden EC, Blum RH: Interferon alpha- 2b adjuvant therapy of high- risk resected cutaneous melanoma. The Eastern Cooperative Oncology Group Trial EST 1684. *J Clin Oncol* 1996; 14: 7-17

Kittler H, Pehamberger H, Wolff K, Binder M: Diagnostic accuracy of dermatoscopy. *Lancet Oncol* 2002; 3: 59-165

Kleeberg UR, Suci S, Brocker EB, Riuter DJ, Cartier C, Lienard D, Marsden J, Schadendorf D, Eggermont AM: Final results of the EORTC 18871/DKG80-1 randomized phase III trial: rIFN- α 2b versus rIFN- γ versus ISCADOR M versus observation after surgery in melanoma patients with either high- risk primary (thickness ≥ 3 mm) or regional lymph node metastasis. *Eur J Cancer* 2004 ; 40 : 390-402

Kohno M, Pouyssegur J: Targeting the ERK signaling pathway in cancer therapy. *Ann Med* 2006; 38: 200-211

Kononen J, Bubendorf M, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP : Tissue microarrays for high- throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat. Med.* 1998; 4: 844-847

Konz B: Operative Therapie des primären malignen Melanoms der Haut. Tumorzentrum München (Hrsg.): Manual Maligne Melanome. Zuckschwerdt Verlag München Bern Wien New York 5. Auflage 2000; 44-45

Koops HS, Vaglini M, Suciu S, Kroon BD, Thompson JF, Gohl J, Eggermont AM, Di Filippo F, Kremetz ET, Ruitter D, Lejeune FJ: Prophylactic isolated limb perfusion for localized high- risk limb melanoma: results of a multicenter randomized phase III trial. J Clin Oncol 1998; 16: 2906-2912

Kovanagi K, O`Day SJ, Gonzalez R, Lewis K, Robinson WA, Amatruda TT, Kuo C, Wang HJ, Milford R, Morton DL, Hoon DS: Microphthalmia transcription factor as a molecular marker for circulating tumor cell detection in blood of melanoma patients. Clin Cancer Res 2006; 15: 1137-1143

Krauze MT, Tarhini A, Gogas H, Kirkwood JM: Prognostic significance of autoimmunity during treatment of melanoma with interferon. Semin Immunopathol 2011; 33: 385-391

Kreienberg R, Kopp I, Lorenz W, Budach W, Dunst J, Lebeau A, Lück H-J, v.Mickwitz G, Possinger K, Sauerbrei W, Sauerland S, Souchon R, Thomssen C, Untch M, Volm T, Weis J, Schmitt- Reißer B, Koller M, Heilmann V: Diagnostik, Therapie und Nachsorg des Mammakarzinoms der Frau. Deutsche Krebshilfe e.V. (Hrsg.) 2004; 42-45

Lang G: Einbettungsprozess. Lang G (Hrsg.): Histotechnik. Springer Verlag Wien New York 2006; 88-121

Lang G: Immunhistochemie. Lang G (Hrsg.): Histotechnik. Springer Verlag Wien New York 2006; 258-292

Lang G: Mikrotomie. Lang G(Hrsg.): Histotechnik. Springer Verlag Wien New York 2006; 124-157

Lasithiotakis K, Leitner U, Meier F, Eigentler T, Metzger G, Moerhle M, Breuninger H, Garbe C: Age and gender are significant independent predictors of survival in primary mcutaneous melanoma. Cancer 2008; 19: 1795-1804

Lens MB, Dawnes M: Interferon alfa therapy for malignant melanoma: a systematic review of randomised controlled trials. J Clin Onkol 2002; 20: 1818-1825

Li J, Martinka M, Li G: Role of ING4 in human melnoma cell migration, invasion and patient survival. Carcinogenesis 2008; 29: 1373-1379

Lorigan P, Eisen T, Hauschild A: Systemic therapy for metastati malignant melanoma – from deeply disappointing to bright future?. Exper Dermatol 2008; 17: 383-394

Lowe SW, Sherr CJ: Tumor suppression by Ink4a-arf: Progress and puzzles. *Curr Opin Genet Dev* 2003; 13: 77-83

Manley S, Mucci NR, de Marzo AM, Rubin MA: Relational database structure to manage high- density tissue microarray data and images for pathology studies focusing an clinical outcome. *American Journal of Pathology* 2001; 159: 837-843

Malik SM, Hwang J, Marhall J: Phase I study of RX-0201 in patients with advanced or metastatic solid tumors. *J Clin Oncol* 2006; 24: 18

Marce A, Balague O, Colomo L, Martinez A, Holler S, Villamor N, Bosch F, Ott G, Rosenwald A, Leoni L, Esteller M, Fraga MF, Montserrat E, Colomer P, Campo E: Lack of Methylthioadenosine phosphorylase expression in mantle cell lymphoma is associated with shorter survival: Implications for a potential targeted therapy. *Cli Cancer Res* 2006; 12: 3754-3761

Marini A, Mirmohammadsadeh A, Nambiar S, Gustrau A, Ruzicka T, Hengge UR: Epigenetic inactivation of tumor suppressor genes in serum of patients with cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol* 2006; 126: 422-431

McCarthy MM, Pick E, Kluger Y, Gould-Rothberg B, Lazova R, Camp RL, Rimm DL, Kluger HM: HSP90 as a marker of progression in melanoma. *Annals of Oncology* 2008; 19: 590-594

Mereki B, Massi D, Cottaneo L, Mandala M: Targeting the PD1/PDL-1 axis in melanoma: biological rationale, clinical challenges and opportunities. *Crit Rev Oncol Hematol* 2014; 89: 140-165

Meyer S, Wild PJ, Vogt T, Bataille F, Ehert C, Gantner S, Landthaler M, Klinkhammer-Schalke M, Hofstädter F, Bosserhof AK: Methylthioadenosine phosphorylase represents a predictive marker for response to adjuvant interferon therapy in patients with malignant melanoma. *Exp Dermatol* 2010; 19: 251-257

Mian S, Ugurel S, Parkinson E, Schlenzka I, Dryden I, Lancashire L, Ball G, Creaser C, Rees R, Schadendorf D: Serum proteomic fingerprinting discriminates between clinical stages and predicts disease progression in melanoma patients. *J Clin Oncol* 2005; 23: 5088-5093

Mowen KA, Tang J, Zhu W, Schurter BT, Shai K, Herschman HR, David M: Arginine methylation of STAT1 modulates INFalpha/beta- induced transcription. *Cell* 2001; 104: 731-741

Natkunam Y, Warnke RA, Montgomery K, Falini B, van de Rijn M: Analysis of MUM1/IRF4 protein expression using tissue microarrays and immunohistochemistry. *Mod Pathol* 2001; 14: 686-694

Nocito A, Kononen J, Kallioniemi OP, Sauter G: Tissue Microarrays (TMAs) for high-throughput molecular pathology research. *Int J Cancer* 2001; 94: 1-5

Newton Bishop JA, Harland M, Bennett DC, Battaile V, Goldstein AM, Tucker MA, Ponder BA, Cuzick J, Selby P, Bishop DT: Mutation testing in melanoma families: INK4A, CDK4 and INK4D. *Br J Cancer* 1999; 80: 295-300

Overgaard J, Gonzalez Gonzalez D, Hulshof MC, Arcangeli G, Dahl O, Mella O, Bentzen SM: Hyperthermia as an adjuvant to radiation therapy of recurrent or metastatic malignant melanoma. A multicentre randomised trial by the European Society for Hyperthermic Oncology. *Int J Hyperthermia* 1996; 12 (1): 3-20

Peled N, Oton AB, Hirsch FR, Bunn P: MAGE A3 antigen-specific cancer immunotherapeutic. *Immunotherapy* 2009; 1: 19-25

Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, Yudt LM, Stark M, Robbins Cm, Moses TY, Hostetter G, Wagner U, Kakareka J, Salem G, Pohida T, Heenan P, Duray P, Kallioniemi O, Hayward NK, Trent JM, Meltzer PS: High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet* 2003; 33: 19-20

Porras BH, Cockerell CJ: Cutaneous malignant melanoma: classification and clinical diagnosis. *Semin Cutan Med Surg* 1997; 16: 88-96

Rangel J, Nosrati M, Leong SP, Haqq C, Miller JR 3rd, Sagebiel RW, Kashani-Saber M: Novel role for RGS1 in melanoma progression. *Am J Surg Pathol* 2008; 32: 1207-1212

Rangel J, Nosrati M, Torabian S, Shaikh L, Leong SP, Haqq C, Miller JR 3rd, Sagebiel RW, Kashani-sabet M: Osteopontin as a molecular prognostic marker for melanoma. *Cancer* 2008; 112: 144-150

Rangel J, Torabian S, Shaikh L, Nosrati M, Baehner FL, Haqq C, Leong SP, Miller JR 3rd, Saegebiel RW, Kashani-Sabet M: Prognostic significance of nuclear receptor coactivator-3-overexpression in primary cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 2006; 24: 4565-4569

Reschke M, Mihic-Probst D, van der Horst EH: HER3 is a determinant for poor prognosis in melanoma. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 5188-5197

Roa RD, Windschnitl HE, Allred JB: Phase II trial of the mTOR inhibitor everolimus (RAD-001) in metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 2006; 24: 18

Robertson GP: Functional and therapeutic significance of Akt deregulation in malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev* 2005; 2: 273-285

Sapino A, Marchio C, Senetta R, Castellano I, Macri L, Cassoni P, Ghisolfi G, Cerrato M, D'Ambrosio E, Bussolati G: Routine assessment of prognostic factors in breast cancer using a multicore tissue microarray procedure. *Virchows Arch* 2006; 449: 288-296

Sebastian G, Stein A: Das maligne Melanom der Haut. UNI-MED Bremen, 42-43

Sebastian G, Herrmann A: Klinik des primären Melanoms. Garbe K (Hrsg.): Management des Melanoms. Springer Verlag Berlin Heidelberg New York 2006; 106-124

Seegenschmiedt MH, Keilholz L, Altendorf-Hofmann A, Schell H, Hohenberger W, Sauer R: Palliative radiotherapy for recurrent and metastatic malignant melanoma: prognostic factors for tumor response and long-term outcome: a 20-year experience. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1999; 44(3): 607-618

Sharpless E, Chin L: The INK4a/ARF locus in melanoma. *Oncogene* 2003; 22: 3092-3098

Sherr CJ: The ins and outs of RB: Coupling gene expression to the cell cycle clock. *Trends Cell Biol* 1994; 4: 15-18

Sherr CJ, McCormick F: The RB and p53 pathway in cancer. *Cancer Cell* 2002; 2: 103-112

Slipicevic A, Holm R, Nguyen MT, Bøhler PJ, Davidson B, Flørenes VA: Expression of activated Akt und PTEN in malignant melanomas: relationship with clinical outcome. *Am J Clin Pathol* 2005; 124: 528-526

Smith-Sorensen B, Hovig E: CDKN2A (p16INKA4a) somatic and germline mutations. *Hum Mutat* 1996; 7: 294-303

Spitler LE, Grossbard ML, Ernsthoff MS, Silver G, Jacobs M, Hayes FA, Soong SJ: Adjuvant therapy of stage III and IV malignant melanoma using granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *J Clin Oncol* 2000; 18: 1614-1621

Tsao H, Goel V, Wu H, Yang G, Haluska FG: Genetic interaction between NRAS und BRAF mutations and PTEN/MMAC1 inactivation in melanoma. *J Invest Dermatol* 2004; 122: 337-341

Velho TR: Metastatic melanoma-a review of current and future drugs. *Drugs Context* 2012: 212242

Veronesi U, Adamus J, Aubert C, et al: A randomized trial of adjuvant chemotherapy and immunotherapy in cutaneous melanoma. *N Engl J Med* 1982; 307: 913-916

Volkenandt M: Maligne Melanome. Braun Falco O, Plewig G, Wolff HH, Burgdorf WHC, Landthaler M (Hrsg.): Dermatologie und Venerologie. Springer Verlag Berlin Heidelberg New York 5. Auflage 2005; 1313-1323

Wang W, Edington HD, Roa UN, Jukic DM, Wang H, Shipe-Spotloe JM, Kirkwood JM: STAT3 as a biomarker of progression in atypical nevi of patients with melanoma: dose-response effects of systemic IFNalpha therapy. J Invest Dermatol 2008; 128: 1997-2002

Wang Y, Dai DL, Martinka M, Li G: Prognostic significance of nuclear ING3 expression in human cutaneous melanoma. Clin Cancer Res 2007; 13: 4111-4116

Watson MA, Gay L, Stebbings WS, Speakman CT, Bingham SA, Loktionov A: Apolipoprotein E gene polymorphism and colorectal cancer: gender-specific modulation of risk and prognosis. Clin Sci 2003; 5: 537-545

Weide B: Immunologie des Melanoms. Garbe (Hrsg.): Management des Melanoms. Springer Verlag Berlin Heidelberg New York 2006; 38-44

Weigert U, Stolz W: Dermatoskopische Diagnose pigmentierter Hauttumoren. Garbe (Hrsg.): Management des Melanoms. Springer Verlag Berlin Heidelberg New York 2006; 128-136

Weiss M, Hahn K: Positronen- Emissions- Tomographie (PET). Tumorzentrum München (Hrsg.): Manual Maligne Melanome. Zuckschwerdt Verlag München Bern Wien New York 5. Auflage 2000; 40-41

Wellbrock C, Hurlstone A: BRAF as a therapeutic target in melanoma. Biochemical Pharmacol 2010; 80: 561-567

Widlund HR, Fisher DE: Microphthalmia-associated transcription factor: a critical regulator of pigment cell development and survival. Oncogene 2003; 20: 3035-3041

Wild PJ, Meyer S, Bataille F, Woenckhaus M, Ameres M, Vogt T, Landthaler M, Pauer A, Klinkhammer-Schalke M, Hofstädter F, Bosserhoff AK: Tissue microarray analysis of methylthioadenosin phosphorylase protein expression in melanocytic skin tumors. Arch Dermatology 2006; 142: 471-476

Wilson MA, Nathanson KL: Molecular testing in melanoma. Cancer J 2012; 18: 117-123

Winnepenninckx V, Lazar V, Michiels S, Dessen P, Stas M, Alonso SR, Avril MF, Ortiz Romero PL, Robert T, Balacescu O, Eggermont AM, Lenoir G, Sarasin A, Tursz T, van den OordJJ, Spatz A: Gene expression profiling of primary cutaneous melanoma and clinical outcome. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98: 472-482

Wissmann C, Detmar M: Pathways targeting tumor lymphangiogenesis. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 6865-6868

Wu H, Goel V, Haluska FG: PTEN signalling pathway in melanoma. *Oncogene* 2003; 22: 3113-3122

Zhang D, Salto-Tellez M, Putti CH: Reliability of tissue microarray in detecting protein expression and gene amplification in breast cancer. *Mod Pathol* 2003; 16: 1679-1684

Zhang X, Li M, Zhang XJ: Exome sequencing and its application. *Yi Chuan* 2011; 33: 847-856

7.3. Tabellen und Abbildungen

- 2.1. Superfiziell spreitendes malignes Melanom; Volkenandt M: Malignes Melanom. Braun-Falko O, Plewig G, Wolff HH, Burgdorf WHC, Landthaler M (Hrsg): Dermatologie und Venerologie 5. Auflage, Springer Medizin Verlag Heidelberg 2005, 1313-1325
- 2.2. Noduläres malignes Melanom; Volkenandt M: Malignes Melanom. Braun-Falko O, Plewig G, Wolff HH, Burgdorf WHC, Landthaler M (Hrsg): Dermatologie und Venerologie 5. Auflage, Springer Medizin Verlag Heidelberg 2005, 1313-1325
- 2.3. Akrolentiginöses malignes Melanom; Volkenandt M: Malignes Melanom. Braun-Falko O, Plewig G, Wolff HH, Burgdorf WHC, Landthaler M (Hrsg): Dermatologie und Venerologie 5. Auflage, Springer Medizin Verlag Heidelberg 2005, 1313-1325
- 2.4. Malignes Melanom, S3 Leitlinie „Diagnostik, Therapie und Nachsorge des malignen Melanoms, aktuell Version vom Februar 2013 unter http://www.awmf.org/uploads/tx_s3leitlinien/032-024k_S3_Melanom_Diagnostik_Therapie_Nachsorge_2013-02.pdf
- 2.5. Prognose des malignen Melanoms
- 3.1. Untersuchte Proteine und ihre Funktion
- 3.2. Verteilung der Anzahl der Studienpatienten von 1999 - 2005
- 3.3. Ergebnisse der Datensuche für die Tumordicke
- 3.3. Ergebnisse der Datensuche für das Tumorstadium der TNM Klassifikation
- 3.5. Ergebnisse der Datensuche für den Lymphknotenstatus der TNM Klassifikation
- 3.6. Ergebnisse der Datensuche für den Metastasenstatus der TNM Klassifikation
- 3.7. Erstellung des Tissue Microarrays
A: technisches Vorgehen bei der Erstellung, Lang G: Einbettungsprozess (Tissue Microarray). Lang G (Hrsg.): Histotechnik. Springer Verlag Wien New York 2006, 88-121
B: Tissue Microarray gefärbt mit S100 (Positivkontrolle)
- 3.8. MTAP Färbung einzelner spots
A: keine positive Färbereaktion; Vergrößerung 1:100
B: keine positive Färbereaktion; Vergrößerung 1:400
C: einfach positive Färbereaktion; Vergrößerung 1:100

D: einfach positive Färbereaktion; Vergrößerung 1:400

E: zweifach positive Färbereaktion; Vergrößerung 1:100

F: zweifach positive Färbereaktion; Vergrößerung 1:400

- 4.1. Klinisch-pathologische Daten und Expression
 - A: von MTAP
 - B: von STAT1
- 4.2. Untersuchung der MTAP und STAT1 Expression melanozytärer Tumore mithilfe des Tissue Microarrays
 - A: von MTAP
 - B: von STAT1
- 4.3. Cox Regressionsmodell für das rezidivfreie Überleben von Patienten mit primären malignen Melanomen (n=174)
- 4.4. Cox Regressionsmodell für das Gesamtüberleben von Patienten mit primären malignen Melanomen (n=282)
- 4.5. Univariable Analyse der klinisch-pathologischen Daten und des rezidivfreien Überlebens, bzw. Gesamtüberlebens von Patienten mit primären malignen Melanomen (n=360)
- 4.6. Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit von MTAP
- 4.7. Gesamtüberleben in Abhängigkeit von MTAP
- 4.8. Rezidivfreies Überleben mit Interferontherapie in Abhängigkeit von MTAP
- 4.9. Rezidivfreies Überleben ohne Interferontherapie in Abhängigkeit von MTAP

Hiermit bestätige ich, dass die vorliegende Dissertation allein und nur unter Zuhilfenahme der aufgeführten Hilfsmittel angefertigt wurde. Außerdem bestätige ich, dass diese Arbeit über vollständige Literaturangaben verfügt und bisher von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Regensburg, den 17.04.2014

Susanne Gantner

7.4. Lebenslauf

Name: Susanne Gantner

Wohnort: Gertrud-von-le-Fort Str. 5
93051 Regensburg
0941/6903908

Geburtsdatum: 13.07.1983

Geburtsort: Landshut

Eltern: Dr. Herbert Gantner (Lehrer)
Gerlinde Gantner (Hausfrau)

Schulbildung: 1990 – 1994 Grundschule Mainburg
1994 – 2003 Gabelsberger Gymnasium Mainburg

Studium: ab Oktober 2003 Humanmedizin
(Universität Regensburg)
Oktober 2005 Ärztliche Vorprüfung
November 2009 Staatsexamen

Praktisches Jahr: Universitätsklinikum Regensburg Abteilung Chirurgie/Unfallchirurgie
August – Dezember 2008

Universitätsklinikum Regensburg Abteilung Dermatologie
Dezember – April 2009

Universitätsklinikum Regensburg Abteilung Innere
Medizin I und II
April – Juli 2009

Weiterer Werdegang: Assistenzärztin Universitätsklinikum Regensburg
Abteilung Dermatologie
seit November 2009

7.5. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. T. Vogt für die Überlassung des interessanten Dissertationsthemas und seine immer freundlichen Ratschläge während des Fortganges der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. C. Hafner möchte ich für die weitere Betreuung der Dissertation nach dem Ausscheiden von Prof. Dr. Vogt danken.

Frau PD Dr. S. Meyer danke ich für die Betreuung meiner Arbeit und ihre Unterstützung bei allen aufkommenden Fragen und Problemen. Insbesondere möchte ich mich für die vielen Tipps beim Auswerten des Tissue Microarrays bedanken.

Außerdem danke ich MTLA Lydia Künzel für ihre Hilfe bei der Vorbereitung und Herstellung der TMAs und Frau Tatjana Schifferstein für ihrer Hilfe bei der Auswertung des TMAs.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinem Bruder Johannes, der mir in technischen Fragen immer zur Seite stand und stets ein offenes Ohr und zumeist eine Lösung für meine Probleme hatte.

Ich möchte mich zuletzt bei meinen Eltern für ihre Unterstützung und Motivation, für den Beistand und das Ertragen meiner Launen bedanken.