

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. T. Ruzicka

**Wertigkeit des Serumpeptidprofils
für die Diagnostik und Prognose
beim malignen Melanom**



Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnheilkunde
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Susanne Ertl

aus
München
2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Berichterstatter: PD Dr. Michael Flaig

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Monika-H. Schmid-Wendtner

Mitbetreuung durch den
Promovierten Mitarbeiter: PD Dr. rer. nat. Rene Krieg †

Dekan: Prof. Dr. med. Dr.h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 01.08.2014

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Textpassagen, die wörtlich oder dem Sinn nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit wurde bisher keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und auch noch nicht veröffentlicht.

Landsberg am Lech, 12.11.2013

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	6
1.1	Malignes Melanom	6
1.1.1	Inzidenz.....	6
1.1.2	Melanomtypen	7
1.1.2.1	Superfiziell spreitendes Melanom	7
1.1.2.2	Noduläres malignes Melanom	7
1.1.2.3	Lentigo-maligna-Melanom	8
1.1.2.4	Akrolentiginöses Melanom.....	8
1.1.2.5	Unklassifizierbare Melanome	8
1.1.3	Risikofaktoren.....	9
1.1.4	Stadieneinteilung.....	10
1.1.5	Prognosefaktoren	15
1.1.6	Diagnostik	15
1.1.6.1	Klinische Primärdiagnostik.....	15
1.1.6.2	Histologische Diagnostik	16
1.1.6.3	Klinische Nachsorgediagnostik	17
1.1.7	Therapie	17
1.1.8	Nachsorge	18
1.2	Molekulare Diagnostik	20
1.2.1	Das Genom.....	20
1.2.2	Das Proteom.....	20
1.2.3	Proteomics.....	21
1.2.4	Tumormarker	22
1.2.5	Beispiele für erfolgreiche Anwendung	23
2	Zielsetzung.....	25
3	Material und Methoden.....	26
3.1	Patientenkollektiv	26
3.2	Analyse der Seren	29
3.2.1	Vorbereitung der Proben.....	29
3.2.2	Grundprinzip der TOF-(time of flight) Massenspektrometrie	30
3.2.3	MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation).....	30

3.2.4	SELDI-TOF-MS (surface enhanced laser desorption ionisation time-of-flight-mass-spectrometry)	31
3.2.5	Durchführung der SELDI-TOF-MS mit den Melanomseren.....	32
3.2.6	Definitionen	34
3.2.6.1	Spezifität	34
3.2.6.2	Sensitivität	35
3.2.6.3	Cross Validation (Vergleichsprüfung).....	35
3.2.6.4	Recognition Capability (Erkennungsfähigkeit)	36
4	Ergebnisse	37
4.1	Auswertung mit der Software ProteinChip 3.0 (CIPHERGEN)	37
4.2	Auswertung mit der Software ClinProTools 2.0 (Bruker Daltonik, Bremen).....	38
4.2.1	Vergleich der Melanomseren mit den Lymphomseren.....	38
4.2.2	Vergleich der Melanomseren mit anderen Erkrankungen (= Kontrollen und Lymphome).....	40
4.2.3	Vergleich der Melanomseren untereinander	43
5	Diskussion.....	45
6	Zusammenfassung	48
7	Literaturverzeichnis	49
8	Tabellenverzeichnis	62
9	Abbildungsverzeichnis.....	63
10	Danksagung	64

1 Einleitung

1.1 Malignes Melanom

Das maligne Melanom, der schwarze Hautkrebs, ist ein bösartiger Tumor, der sich überwiegend in der Haut manifestiert. Seltener Lokalisationen sind Schleimhäute, Hirnhäute oder das Auge.

Der Tumor geht vom melanozytären Zellsystem der basalen Epidermisschichten aus und ist verantwortlich für ca. 90% der Mortalität an Hautkrebs.

Zumeist ist das maligne Melanom stark pigmentiert, es treten aber auch amelanotische Formen auf.

1.1.1 Inzidenz

In den letzten Jahrzehnten wurde eine stetige Zunahme des malignen Melanoms beobachtet. Weltweit ist die Inzidenz stark steigend, insbesondere bei der hellhäutigen weißen Bevölkerung mit starker Sonnenexposition [9], [60]. Ferner hat das maligne Melanom die am schnellsten steigende Inzidenz maligner Erkrankungen [104].

In Mitteleuropa beträgt die Inzidenz 10 bis 12 Fälle pro 100.000 Einwohner und Jahr, in den USA 10 bis 25 Fälle und am höchsten ist sie in Australien mit 50 bis 60 Fällen pro 100.000 Einwohner und Jahr [94].

Bei stärker pigmentierten Populationen ist das Melanom selten, mit Lokalisation fast ausschließlich an Schleimhäuten oder palmoplantar.

Auffällig sind die unterschiedlichen Häufigkeiten der Lokalisation zwischen den Geschlechtern. Bei Männern finden sich mehr als die Hälfte der Tumoren am Stamm, bei Frauen dagegen nur rund ein Viertel. Während sich bei Frauen circa ein Drittel der Melanome an den unteren Extremitäten bildet, ist es beim Mann nur etwas mehr als ein Fünftel.

Besonders gefährdet sind Menschen mit einer hohen Anzahl von Nävuszellnävi, dysplastischen Nävuszellnävi oder großen kongenitalen Nävuszellnävi und Personen mit häufigen und schweren Sonnenbränden in der Kindheit [104].

1.1.2 Melanomtypen

1.1.2.1 Superfiziell spreitendes Melanom

Das superfiziell spreitende Melanom (SSM) ist mit ca. 57% die häufigste Form des malignen Melanoms.

Es entsteht langsam, meist über einen Zeitraum von einigen Jahren. Es wächst zunächst horizontal in der Epidermis und zeigt sich klinisch als unregelmäßig pigmentierter, unscharf begrenzter Fleck. Es können depigmentierte Inseln entstehen, die Regressionszonen entsprechen können. Später wachsen SSM auch in vertikaler Richtung, klinisch zeigen sich dann palpable Erhabenheiten.

Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 51 Jahren, bevorzugte Lokalisation ist der Rumpf [22], [94], [104].

1.1.2.2 Noduläres malignes Melanom

Das noduläre maligne Melanom (NMM) ist charakterisiert durch sein schnelles, überwiegend vertikales Wachstum. Sein Anteil beträgt ca. 21% aller Melanome.

Hierbei handelt es sich um die aggressivste Form des Melanoms. Es ist braun bis tiefschwarz, die Oberfläche ist glatt oder ulzeriert, es blutet leicht.

Das mediane Alter liegt bei 40 bis 50 Jahren, die Anamnese ist kurz [104], [94], [22].

1.1.2.3 Lentigo-maligna-Melanom

Das Lentigo-maligna-Melanom (LMM) entwickelt sich aus einer Lentigo maligna, die häufig schon Jahre besteht. Es wächst vornehmlich horizontal.

Klinisch dominieren flächige, teils erhabene und unregelmäßig pigmentierte, unscharf begrenzte Flecken. Es entsteht fast ausschließlich an chronisch lichtexponierten Körperstellen, bevorzugt in der Kopf-Hals-Region.

Das Durchschnittsalter der Patienten liegt bei 68 Jahren, die Häufigkeit beträgt ungefähr 9% aller malignen Melanome [22], [94], [104].

1.1.2.4 Akrolentiginöses Melanom

Das akrolentiginöse Melanom (ALM) ähnelt vom Aussehen dem LMM, wächst aber deutlich schneller und aggressiver.

Es entsteht meist an Plantae und Palmae, oder sub- und periungual. Es tendiert zu Erosionen mit Blutungen und kann unter Finger- und Fußnägeln eine Nagelablösung auslösen. Dieser Typ betrifft vorzugsweise die dunkelhäutige Bevölkerung.

Seine Häufigkeit beträgt nur ca. 5% der Melanomerkrankungen in Deutschland, in Asien und Afrika ist es dagegen die häufigste Form [22], [94], [104].

1.1.2.5 Unklassifizierbare Melanome

Die unklassifizierbaren Melanome können auch als Varianten der malignen Melanome gesehen werden. Dazu zählen das maligne Melanom der Schleimhäute, das Melanom auf großen kongenitalen Nävuszellnävi, das desmoplastische Melanom, der maligne blaue Nävus, amelanotische maligne Melanome. Auf diese Sonderformen soll hier nicht näher eingegangen werden.

1.1.3 Risikofaktoren

Das relative Risiko für Menschen mit Hauttyp I oder II ist im Vergleich zu Hauttyp III oder IV leicht erhöht.

Eine stärkere Korrelation als zur Hautfarbe scheint mit der Haarfarbe zu bestehen. Für Patienten mit rotblonden Haaren ist das Risiko gegenüber Schwarzhaarigen fast fünfmal so hoch. Das Risiko blonder Menschen gegenüber braunhaarigen ist jedoch nicht wesentlich erhöht [104].

Die Gesamtzahl melanozytärer Nävuszellnävi gilt als Indikator für ein erhöhtes Melanom-Risiko. Personen mit mehr als 100 Nävuszellnävi haben im Vergleich zu Patienten mit weniger als 10 Nävuszellnävi ein 7,6-fach erhöhtes Risiko [104]. Aber nur bei ca. 22% der malignen Melanome liegt ein histologischer Zusammenhang mit einem vorbestehenden Nävus vor; die meisten Tumoren entstehen de novo und ohne Assoziation zu einem bestehenden Nävus [145].

Besondere Risikofaktoren sind sogenannte dysplastische oder atypische Nävuszellnävi. Darunter versteht man Pigmentmale, die klinisch und histologisch Anzeichen der Atypie aufweisen, histologisch jedoch noch keinem Melanom entsprechen.

Auch große kongenitale melanozytäre Nävuszellnävi gehören zu den Risikofaktoren.

Bezüglich der Risikohöhe und der Frage, inwieweit Größe mit Risiko assoziiert ist, herrscht Uneinigkeit. Große klinische Relevanz hat jedoch die Tatsache, dass Melanome in stärker pigmentierten kongenitalen Nävuszellnävi oft erst in späteren Stadien, d.h. mit großer Tumordicke entdeckt werden [104].

Bei großen Nävuszellnävi sollte daher eine frühzeitige chirurgische Entfernung anvisiert werden. Auch bei kleineren atypischen Nävuszellnävi sollte die Entfernung angestrebt werden, jedoch kann bei regelmäßiger klinischer Kontrolle auch zunächst ein abwartendes Vorgehen gerechtfertigt sein.

Auch immunologische Faktoren können eine Rolle spielen. So haben, verglichen mit der Normalbevölkerung, immunsupprimierte Patienten ein 3- bis 6-fach höheres Melanom-Risiko. Zu den Immunsupprimierten gehören zum Beispiel

Organtransplantierte, Patienten unter Chemotherapie, mit Immundefizienzsyndromen oder mit chronisch lymphatischer Leukämie [69].

Des Weiteren scheint die Prognose bei derartigen Patienten, die zu adäquaten entzündlichen Immunreaktionen nicht in der Lage sind, verschlechtert [69], [106]. In einer prospektiven Studie wird von Rasokat et al. über eine deutlich gesteigerte Inzidenz von Melanomen bei HIV-Infizierten gegenüber der Normalbevölkerung berichtet [127].

Unter den exogenen Risikofaktoren scheint die UV-Exposition, zumindest bei einem Teil der Melanome, eine große Rolle zu spielen. Eine amerikanische und dänische Fall-Kontroll-Studie machte deutlich, dass starke, kurzfristige, intermittierende Sonnenexpositionen vor dem 20. Lebensjahr, gemessen an der Anzahl der erlittenen Sonnenbrände, ein wesentliches Risiko für die Melanomentstehung darstellt [156], [114], [66].

1.1.4 Stadieneinteilung

Erforderlich für das weitere therapeutische Vorgehen und das Abschätzen der Prognose ist die Einordnung eines Melanoms anhand einer entsprechenden klinischen Klassifikation, die das Ausmaß der Tumorausbreitung berücksichtigt. Entsprechend der wichtigsten Prognosefaktoren Tumordicke (T), metastatischer Befall der regionären Lymphknoten (N) sowie Fernmetastasierung (M) wurde die TNM-Klassifikation wie in den Tabellen 1-3 dargestellt entwickelt.

Tabelle 1: T-Klassifikation nach Balch et al. 2009 [13]

T-Klassifikation	Tumordicke	Weitere prognostische Parameter
<i>T_{is}</i> <i>T_x</i>	<i>keine Angabe</i>	<i>Melanoma in situ, keine Tumorinvasion</i> <i>Stadium nicht bestimmbar</i>
<i>T₁</i>	$\leq 1,0$ mm	<i>a: ohne Ulzeration, keine Mitosen</i> <i>b: mit Ulzeration oder Mitoserate $\geq 1/\text{mm}^2$</i>
<i>T₂</i>	1,01 - 2,0 mm	<i>a: ohne Ulzeration</i> <i>b: mit Ulzeration</i>
<i>T₃</i>	2,01 - 4,0 mm	<i>a: ohne Ulzeration</i> <i>b: mit Ulzeration</i>
<i>T₄</i>	$>4,0$ mm	<i>a: ohne Ulzeration</i> <i>b: mit Ulzeration</i>

Die Dickenmessung des Primärtumors erfolgt am histologischen Präparat. Hierbei wird die Dicke in Form des Breslow-Index, definiert durch den Abstand zwischen dem Stratum granulosum der Epidermis und der am tiefsten im Gewebe liegenden Melanomzelle, gemessen.

Tabelle 2: N-Klassifikation nach Balch et al. 2009 [13]

N-Klassifikation	Zahl befallener Lymphknoten	Ausmaß der Lymphknotenmetastasierung
<i>N₁</i>	<i>1 Lymphknoten</i>	<i>a: Mikrometastasierung</i> <i>b: Makrometastasierung</i>
<i>N₂</i>	<i>2-3 Lymphknoten</i>	<i>a: Mikrometastasierung</i> <i>b: Makrometastasierung</i> <i>c: Satelliten oder In-Transit-Metastasen</i>
<i>N₃</i>	≥ 4 Lymphknoten, <i>Satelliten oder In-Transit-Metastasen plus Lymphknoten-beteiligung</i>	

Als Satelliten-Metastasen werden Metastasen bezeichnet, die bis zu 2 cm vom Primärtumor entfernt sind.

Unter In-transit-Metastasen versteht man Metastasen in Haut oder Subkutis, die mehr als 2 cm vom Primärtumor entfernt, aber noch diesseits der regionären Lymphknoten liegen.

Die regionären Lymphknoten entsprechen den Regionen des primären Lymphabflusses des jeweiligen Melanoms. Aufgrund der Einführung der Sentinel-Lymphknotenbiopsie und zunehmend feinerer Möglichkeiten der bildgebenden Diagnostik, sollte die Art der Nachweismethode von Lymphknotenmetastasen angegeben werden: klinisch, sonographisch, durch CT oder histologisch.

Als Sentinel-Lymphknoten (Wächterlymphknoten) wird derjenige Lymphknoten bezeichnet, der zuvorderst im Lymphabstromgebiet des Malignoms liegt und mittels einer Farb- und/oder Radionuklidmarkierung erkannt wird. Dieser ist von einer Metastasierung am ehesten betroffen.

Hierzu wird zur Lymphabstrom-Szintigraphie ein radioaktiv markiertes Kolloid in unmittelbarer Tumornähe appliziert. Dieser Marker fließt über die Lymphabflusswege ab und reichert sich zuerst im Wächterlymphknoten an. Diese Anreicherung wird dabei mit szintigraphischen Aufnahmen und intraoperativ unter Zuhilfenahme einer Sonde dargestellt. Dieser Lymphknoten wird gezielt entfernt und der Lymphknotenstatus histopathologisch ermittelt.

Ist der Sentinel-Lymphknoten nicht befallen, so ist die Wahrscheinlichkeit sehr hoch, dass die folgenden Lymphknoten auch nicht befallen sind. Auf die prophylaktische Ausräumung eines ganzen Gebietes kann somit verzichtet werden. Da Malignome der Kopf-Hals-Region oder des Stammes in verschiedene anatomische Regionen drainieren können, kommt der Sentinel-Technik eine besondere Bedeutung zu. Auch therapeutisch wird zwischen einer Sentinel- und einer regionalen Lymphknotendisektion unterschieden, der therapeutische Nutzen der beiden Techniken wird kontrovers diskutiert. [50], [91], [92], [147], [154], [163].

Tabelle 3: M-Klassifikation nach Balch et al. 2009 [13]

<i>M-Klassifikation</i>	<i>Art der Fernmetastasierung</i>	<i>LDH</i>
<i>M1a</i>	<i>Haut, subkutan oder Lymphknoten</i>	<i>Normal</i>
<i>M1b</i>	<i>Lunge</i>	<i>Normal</i>
<i>M1c</i>	<i>Alle anderen Organmetastasen, jede Art von Fernmetastasierung</i>	<i>Normal/ erhöht</i>

Fernmetastasen sind Metastasen jenseits der regionären Lymphknoten.

Ein weiteres Klassifikationssystem, der Clark-Level, folgt den anatomischen Schichten der Haut und der darauf bezogenen Eindringtiefe.

Die Stadieneinteilung des malignen Melanoms kann Tabelle 4 entnommen werden.

Tabelle 4: Stadieneinteilung des malignen Melanoms [Balch et al. 2009] [13]

<i>Stadium</i>	<i>Primärtumor (pT)</i>	<i>Regionäre Lymphknotenmetastasen (N)</i>	<i>Fernmetastasen</i>
<i>0</i>	<i>In situ Tumoren</i>	<i>Keine</i>	<i>Keine</i>
<i>IA</i>	<i>≤1,0mm, keine Ulzeration</i>	<i>Keine</i>	<i>Keine</i>
<i>IB</i>	<i>≤1,0mm mit Ulzeration oder Mitoserate >-1/mm²</i>	<i>Keine</i>	<i>Keine</i>
	<i>1,01-2,0mm, keine Ulzeration</i>	<i>Keine</i>	<i>Keine</i>
<i>IIA</i>	<i>1,01-2,0mm mit Ulzeration</i>	<i>Keine</i>	<i>Keine</i>
	<i>2,01-4,0mm, keine Ulzeration</i>	<i>Keine</i>	<i>Keine</i>
<i>IIB</i>	<i>2,01-4,0mm mit Ulzeration</i>	<i>Keine</i>	<i>Keine</i>
	<i><4,0mm, keine Ulzeration</i>	<i>Keine</i>	<i>Keine</i>
<i>IIC</i>	<i><4,0mm mit Ulzeration</i>	<i>Keine</i>	<i>Keine</i>
<i>IIIA</i>	<i>Jede Tumordicke, keine Ulzeration</i>	<i>Mikrometastasen</i>	<i>Keine</i>
<i>IIIB</i>	<i>Jede Tumordicke mit Ulzeration</i>	<i>Mikrometastasen</i>	<i>Keine</i>
	<i>jede Tumordicke, keine Ulzeration</i>	<i>Bis zu 3 Makrometastasen</i>	<i>Keine</i>
	<i>Jede Tumordicke +- Ulzeration</i>	<i>Keine, aber Satelliten- und/oder In-Transit Metastasen</i>	<i>Keine</i>
<i>IIIC</i>	<i>Jede Tumordicke mit Ulzeration</i>	<i>bis zu 3 Makrometastasen</i>	<i>Keine</i>
	<i>Jede Tumordicke +- Ulzeration</i>	<i>4 oder mehr Makrometastasen oder kapselüberschreitender Lymphknotenbefall oder Satelliten und/oder In- Transit Metastasen mit Lymphknotenbefall</i>	<i>Keine</i>
<i>IV</i>			<i>Fernmetastasen</i>

1.1.5 Prognosefaktoren

Es gibt verschiedene Faktoren, die die Prognose eines Melanoms wesentlich beeinflussen. Die wichtigsten Prognosefaktoren sind nachfolgend zusammengefasst.

- Tumordicke (Breslow)
- Subtyp
- Ulzeration
- Mitoserate
- Invasionslevel (Clark-Level)
- Lokalisation
- Geschlecht
- Nachweis von Metastasierung

Die tumorspezifische 10-Jahres-Überlebensrate nimmt mit zunehmender vertikaler Tumordicke nach Breslow deutlich ab.

Männer haben eine schlechtere Prognose als Frauen und bei der Lokalisation haben Tumoren an Hals, Oberarm oder oberem Stamm eine ungünstigere Prognose [12], [104].

1.1.6 Diagnostik

1.1.6.1 Klinische Primärdiagnostik

In der klinischen Diagnostik des malignen Melanoms gibt es viele verschiedene Aspekte, hier soll nur auf einige wesentliche eingegangen werden.

Pigmentierte Hautläsionen werden klinisch makroskopisch, das heißt mit freiem Auge, nach der ABCD-Regel beurteilt, um sie klinisch als malignes Melanom zu erkennen, oder davon abzugrenzen [75]:

- A = Asymmetrie der Aufbau
- B = Begrenzung unregelmäßig
- C = Colores (Mehrfarbigkeit)
- D = Durchmesser > 6mm

Die größte Bedeutung ist der Asymmetrie zuzuschreiben. Je mehr der genannten Kriterien erfüllt sind, desto dringender besteht der Verdacht auf ein malignes Melanom und die Hautveränderung sollte als Ganzes entfernt und der Histologischen Diagnostik zugeführt werden.

Zur klinischen Differentialdiagnostik wird des Weiteren die Dermatoskopie hinzugezogen. Sie dient zum einen dazu, melanozytäre Neoplasien von nicht-melanozytären abzugrenzen, zum anderen kann man damit präziser als mit dem freien Auge die Mikrostruktur melanozytärer Tumore beurteilen und somit zuverlässiger zwischen harmlosen und auffälligen Pigmentmalen unterscheiden. Wertvoll kann hier auch eine Verlaufsbeobachtung mit computergestützter Dermatoskopie sein. Chronologische Veränderungen der Pigmentläsionen können so leichter erkannt und bewertet werden.

Ein klinischer Malignitätsverdacht ist regelhaft histologisch abzuklären. Es sollte darauf geachtet werden, dass insbesondere pigmentierte Läsionen vollständig exzidiert werden, um die histologische Beurteilung nicht zu kompromittieren, da die Silhouette ein ganz wesentliches histologisches Kriterium darstellt. Nur in speziellen Fällen wird auch eine Inzisionsbiopsie indiziert sein.

1.1.6.2 Histologische Diagnostik

Die Histologie dient in erster Linie der exakten nosologischen Einordnung einer Neoplasie. Im Speziellen, bei melanozytären Tumoren, der Abgrenzung maligner Melanome von als gutartig angesehenen Nävuszellnävus. Der histologische Befund maligner Melanome sollte folgende Informationen liefern:

- Melanomtyp
- Tumordicke in mm nach Breslow
- Eindringtiefe nach Clark
- Ulzeration
- Mitoserate dermalen Melanomzellen
- Regression
- Einbruch in Lymph- und Blutgefäße sowie in Perineuralscheiden
- Mikrosatelliten
- Resektionsverhältnisse

1.1.6.3 Klinische Nachsorgediagnostik

Die klinische Nachsorgediagnostik dient dem frühzeitigen Erkennen eines Rezidivs oder einer klinischen Progression, das heißt einer Metastasierung, sowie der Diagnostik von Zweitmelanomen und nicht-melanozytären Tumoren wie z. B. Basalzellkarzinomen oder Plattenepithelkarzinomen.

1.1.7 Therapie

Die Standardtherapie eines malignen Melanoms besteht aus der vollständigen operativen Entfernung. Hierbei wird ein operativer Sicherheitsabstand von den sichtbaren Tumorrändern eingehalten, der sich im Wesentlichen nach der präoperativen sonographisch bestimmbarer Tumordicke richtet. Die überwiegende Zahl operativer Eingriffe zur Entfernung des Primärtumors lässt sich in Lokalanästhesie durchführen. Die Defekte können meist durch lokale Verschiebe- oder Lappenplastiken geschlossen werden [62]. In ausgewählten Lokalisationen können Spalthaut- oder Vollhauttransplantate notwendig werden.

Des Weiteren wird die Wächterlymphknotenbiopsie bei Tumoren ab einer Dicke von 1,0 mm nach Breslow als Staging-Verfahren empfohlen. Beim Vorliegen weiterer ungünstiger Prognoseparameter (Clark-Level IV/V; Ulzeration des Primärtumors) wird auch bei geringeren Tumordicken eine Wächterlymphknotenbiopsie in Betracht gezogen.

Bei Wächterlymphknotenbiopsie-negativen Patienten werden bezüglich der nachgeschalteten Lymphknotenstationen keine weiteren Maßnahmen durchgeführt; ist die Biopsie jedoch positiv, wird eine regionale radikale Lymphadenektomie angeraten.

Bei klinisch manifester Lymphknotenmetastasierung ist die primäre radikale Lymphknotenektomie das Standardvorgehen [104].

Die alleinige Strahlentherapie ist nur in den Fällen sinnvoll, in denen ein operativer Eingriff unmöglich oder nicht sinnvoll ist. Die Entscheidung über Zielvolumen, Zielvolumendosis und Bestrahlungstechnik ist individuell zu treffen [101].

Grundsätzlich findet die Chemotherapie Einsatz bei inoperablen Primär- oder Rezidivtumoren und bei inoperablen Metastasen. Da die Behandlung überwiegend palliativ erfolgt, soll eine sorgfältige Nutzen-Schaden-Analyse stattfinden. Unterschieden werden kann hier zwischen Mono- und Polychemotherapien.

Nach Studien ergibt eine adjuvante Chemotherapie keine bessere Prognose im Vergleich zu unbehandelten Patienten. Derzeit wird außer in kontrollierten Studien keine Indikation für die adjuvante Chemotherapie gesehen [90], [94], [146], [151].

Eine adjuvante Immuntherapie ist bei Melanompatienten mit hohem Metastasierungsrisiko von Bedeutung, doch auch hier wird die Indikation kritisch in Bezug zur Lebensqualität des Patienten gestellt.

Außer bei der Behandlung mit Interferon-alpha wird bei der adjuvanten Immuntherapie kein entscheidender Vorteil gegenüber Unbehandelten festgestellt, so dass der Einsatz außerhalb von Studien nicht empfohlen wird [94].

Neueste Therapieansätze die dem Konzept der „targeted therapy“ folgen, beruhen auf der gezielten Beeinflussung molekulargenetischer Aberrationen, wie der in vielen Fällen des Melanoms vorhanden BRAF- oder der deutlich selteneren c-Kit Mutation.

1.1.8 Nachsorge

Wie das therapeutische Vorgehen orientiert sich die Tumornachsorge in Umfang und Frequenz am initialen Tumorstadium. Da in den ersten fünf Jahren ca. 90% der Metastasen auftreten, ist in diesem Zeitraum die Nachsorge besonders engmaschig zu gestalten.

Weil zudem auch Spätmetastasen ebenso wie Zweitmelanome auftreten können, wird eine Nachsorge über zehn Jahre empfohlen.

Die Nachsorge hat zum Ziel:

- Feststellung der Tumorfreiheit sowie Früherkennung von Progression
- Überwachung zur Früherkennung von Zweitmelanomen / Melanomvorläufern / Zweitmalignomen
- Dokumentation des Krankheitsverlaufs
- Durchführung / Überwachung adjuvanter Therapien
- Psychosoziale Betreuung

Im Jahr 1994 wurde von der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft ein Nachsorgeschema mit umfangreichen Kontrollen empfohlen [113]. Allerdings wurde in den letzten Jahren der Wert der Nachsorge zunehmend kritisch beurteilt [87].

In jüngster Zeit wurden die Empfehlungen überarbeitet und sind der nachfolgenden Tabelle zu entnehmen.

Tabelle 5: Empfehlungen für die Nachsorge kutaner maligner Melanome (Intervalle in Monaten) [Garbe & Schadendorf 2003, [94]]

Stadium und Tumordicke	Körperliche Untersuchung 1.-5. Jahr	Körperliche Untersuchung 6.-10. Jahr	Lymphknoten-sonographie 1.-5. Jahr	Blutuntersuchung Protein S 100 1.-5. Jahr	Bildgebende Untersuchung 1.-5. Jahr
<i>I, ≤1mm</i>	6	12	Keine	Keine	Keine
<i>I+II, <1mm</i>	3	6-12	6	3-6	Keine
<i>III</i>	3	6-12	6	3-6	6
<i>IV</i>	<i>Individuell</i>				

1.2 Molekulare Diagnostik

1.2.1 Das Genom

Das Genom ist die Gesamtheit der Gene eines Individuums, also die Gesamtheit der zellulären Erbinformation. Es liegt als Desoxyribonukleinsäure (DNS) in jedem Zellkern vor und kann als Bauplan für Proteine gesehen werden.

Die Basenfolge der DNS kodiert letztlich die Reihenfolge der Aminosäuren im Protein. Eine Voraussage, ob das entsprechende Protein dann funktionell aktiv sein wird, ist auf dieser Ebene kaum möglich.

Beim malignen Melanom finden sich in den Tumorzellen häufig Abweichungen im Chromosom 1 sowie Veränderungen in den Chromosomen 6, 7, 9, 10, 11 und 22. Auch scheint das Y-Chromosom verstärkt betroffen [82]. In jüngerer Zeit sind insbesondere Mutationen im BRAF, NRAS-, KRAS- und C-Kit-Gen bekannt geworden [20].

1.2.2 Das Proteom

Analog zum Genom versteht man unter dem Proteom die Gesamtheit aller exprimierten Proteine in einem Lebewesen, einem Gewebe oder einer Zelle. Der Bau der Proteine aus den Aminosäuren entsprechend der Vorgabe der DNS erfolgt in mehreren Schritten. Zunächst wird die Basensequenz der DNS in die Basensequenz der sogenannten „Messenger-Ribonukleinsäure“ (mRNS) übersetzt. Anschließend wird die Sequenz der mRNS in die Aminosäuren-Sequenz des Proteins übertragen.

Genetische Mutationen sowie posttranslationale Modifikationen wie Spaltung oder Dimerisierung nach der Proteinsynthese können zu veränderten Funktionen eines Proteins führen.

Physiologischerweise besteht ein Gleichgewicht zwischen ständiger Neusynthese von Proteinen und dem gleichzeitigen Abbau von nicht mehr benötigten Proteinen. Im Proteom spiegelt sich somit der physiologische, aber auch pathologische Funktionszustand eines Organismus wider. Im Speziellen haben Faktoren wie Umwelt, Krankheit oder auch Medikamente direkten Einfluss auf das Proteom.

Krankheiten können als Alterationen der Proteine oder Proteinfunktionen angesehen werden, wären somit prinzipiell auf Proteomebene diagnostizierbar und auch therapeutisch beeinflussbar [57], [89], [95].

1.2.3 Proteomics

Unter dem Begriff Proteomics versteht man die wissenschaftliche Disziplin, die das Proteom, also die Gesamtheit aller von einer biologischen Einheit (Zelle, Organ, Organismus) exprimierten Proteine, untersucht.

Sie gewinnt zunehmend in vielen Bereichen der medizinischen Forschung an Bedeutung [4], [7], [19], [149].

Die Untersuchung des Proteoms (Proteomics, in Anlehnung an den Begriff Genomics) hat zum Ziel, ein besseres Verständnis dafür zu entwickeln, zu welchem Zeitpunkt, unter welchen Umständen und in welchen der Organellen Proteine miteinander in Interaktion treten und so zelluläre Funktionen vermitteln oder ausführen [149].

Diese Denkweise wurde in den letzten Jahren vermehrt in der Krebsforschung aufgegriffen. Neben der Untersuchung der mRNA (Transcriptomics) steht nun auch das Proteinprofil eines Tumors im Mittelpunkt des Interesses. Man erhofft sich, unter anderem, sogenannte Tumormarker für eine frühe und sensitive Diagnose, Marker zur Klassifikation, Prognose und Therapie zu entdecken, aber auch neue therapeutische Ansätze auf molekularer Ebene zu finden [89], [99], [124].

Für die Erforschung des Proteoms stehen verschiedene Techniken zur Verfügung. Unterschieden wird dabei zwischen Methoden für die Separation der einzelnen Proteingruppen und Methoden für die Charakterisierung und Identifizierung der Proteine. Bei der Separation stehen Chromatographie, Gelfiltration sowie Elektrophorese zur Verfügung. Für die Identifizierung bieten sich Massenspektrometrie, Sequenzierung sowie der direkte Nachweis mittels Immunhistochemie, beispielsweise am Gewebeschnitt oder der Western-Blot am Lysat, und andere Verfahren an [89], [124].

1.2.4 Tumormarker

Ein Tumormarker ist ein Molekül, das auf das Vorhandensein eines Tumors hinweisen kann.

Üblicherweise können diese Moleküle in einer gewissen, meist sehr geringen Konzentration physiologischerweise in Körperflüssigkeiten (meist Blut) nachgewiesen werden, auch wenn kein Tumor vorhanden ist. Die Konzentrationen sind aber unter bestimmten Bedingungen signifikant erhöht, z.B. wenn zelluläre Bestandteile von Tumorzellen in größerem Maße freigesetzt werden, oder wenn Tumorzellen beispielsweise die Antikörper- oder Zytokinproduktion stimulieren. Diese Situation ist dann diagnostisch nutzbar. Tumormarker werden häufig als Diagnose- oder Verlaufspareter bestimmt (Beispielsweise das S-100 Protein beim malignen Melanom). Das heißt, dass bei einem bislang unbekanntem Malignom die zugehörigen Tumormarker bereits signifikant erhöht sein können, obschon die Neoplasie weder symptomatisch geworden, noch bildgebend erfasst ist, so zum Beispiel der PSA-Wert beim Prostatakarzinom [48].

Sind einer oder sogar mehrere der Marker zum Zeitpunkt der Diagnose erhöht, dann macht eine Kontrolle der Werte nach der Behandlung als Verlaufspareter Sinn. Nach der Behandlung (Operation, Chemotherapie, Strahlentherapie) sollten die Marker auf ein Maß fallen, welches in einem gesunden Körper gemessen werden kann. Ein Anstieg im Verlauf kann dann auf ein Rezidiv oder eine Progression der Erkrankung hindeuten; wie es zum Beispiel beim S100-Protein beim malignen Melanom der Fall ist [17], [96]. Wiederum kann der Anstieg der Tumormarker der klinischen Symptomatik vorangehen und im optimalen Falle eine frühestmögliche spezifische Diagnostik und Therapie bedingen.

In der Vergangenheit wurde bei der Suche nach Tumormarkern meist nach signifikanten Unterschieden in der Proteinexpression von Tumorgewebe und gesundem Gewebe gesucht [86], [33]. Da auch Tumorproteine einem ständigen Umsatz unterliegen, neu synthetisiert und abgebaut werden, finden sich im Blutserum eines Patienten diese Proteine als Ganzes oder in Teilstücken wieder. In gewissen Grenzen spiegelt also das Serum-Proteom das gesamte Proteom des Patienten, aber auch das tumorspezifische Proteom wider. Insofern ist auch das

Blutserum ein vielversprechendes Medium auf der Suche nach Tumormarkern: hier finden sich unzählige lösliche und an Trägerproteine gebunden Proteine und Peptide.

Das Blutserum enthält jedoch meist nur geringe Konzentrationen eines Markerproteins. Zum Nachweis bislang unbekannter Marker sind somit hochsensitive Methoden notwendig [5], [123]. Die in dieser Arbeit verwendete Massenspektrometrie basierte „Surface Enhanced Laser Desorption Ionisation“-Technik (SELDI) ist hierfür sehr gut geeignet, da die Nachweisempfindlichkeit für Peptide im Femtomolbereich liegt. Theoretisch kann jede Probe die Proteine enthält analysiert werden. Nicht nur Gewebebiopsien sondern auch Abstriche, Urin oder eben auch Serum [161].

Da das Proteom sehr komplex ist, werden bei den Analysen mehrheitlich Proteine oder Peptide gefunden werden, die nicht tumorspezifisch sind.

Bei proteomischen Analysen gilt das Augenmerk jedoch nicht nur einzelnen krankheitsspezifischen Proteinen/Peptiden sondern Gruppen von Proteinen/Peptiden (Cluster), die mit einer gewissen Häufigkeit auftreten. Diese können mit biostatistischen Methoden identifiziert werden und sollen später dazu dienen, Aussagen über die Wahrscheinlichkeit des Vorhandenseins eines Tumors bei einem Patienten zu machen.

Solche Marker-Cluster könnten wie Serummarker verwendet werden, um ganze Bevölkerungsschichten einem effizienten Screening zu unterziehen. Ferner könnten Marker identifiziert werden, die mit Therapieversagen/-erfolg assoziiert sind oder im Therapiemonitoring eingesetzt werden.

1.2.5 Beispiele für erfolgreiche Anwendung

Petricoin et al. wandte die Technik der SELDI-TOF-MS erstmals erfolgreich zur Analyse von Seren von Patientinnen mit Ovarialkarzinom an. Mittels eines Suchalgorithmus wurden Proteincluster (Muster) erkannt, die eine Unterscheidung von Patienten mit und ohne Ovarialkarzinom in den meisten Fällen ermöglichten [121], [97], [99].

Es folgten weitere Arbeiten über das Screening von Patientinnen mit Zervixkarzinom und Mammakarzinom [161], [122], [79]. Eine Stratifizierung von Patienten mit und ohne Prostatakarzinom war relativ zuverlässig möglich [3], [139], [124].

Diese Technik findet weitere Anwendung zum Beispiel in der Früherkennung von Endometriose, der Präeklampsie, dem HELLP-Syndrom, bei Blasenkrebs sowie bei der Alzheimer Erkrankung [78], [161].

2 Zielsetzung

Ziel der im Folgenden dargestellten Untersuchung ist die Antwort auf die Frage, ob ein Melanom anhand von Serumproben diagnostiziert werden kann. Diese Fragestellung soll hier modellhaft an archivierten Serumproben von Melanompatienten bearbeitet werden. Hierzu sollten die Serumpeptidprofile von Melanompatienten mit den Serumpeptidprofilen von Lymphompatienten und einer Kontrollgruppe verglichen und auf differentielle Expressionen untersucht werden.

Im Speziellen sollte untersucht werden, ob bei Patienten mit malignem Melanom eine prognostische Aussage über den weiteren Verlauf aus dem Serumprofil heraus möglich ist. Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose ist bislang keine sichere Prognose möglich. So überleben beispielsweise etwa ein Drittel der Patienten mit einem Melanom des Level IV diese Erkrankung, während etwa zwei Drittel Metastasen entwickeln und am Melanom versterben. So ergibt der Nachbeobachtungszeitraum von 5 Jahren ein beobachtetes Überleben von 47,3%, nach 10 Jahren liegt die Überlebensrate noch bei 34,1% [151]. Abgesehen von der Sentinel-Lymphknoten Untersuchung existiert bislang kein verlässlicher prognostischer Parameter, der einen Hinweis geben könnte, welcher der betroffenen Patienten ein hohes oder niedriges Risiko hat, an seinem Level IV Melanom zu versterben. Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit geprüft, im Speziellen, ob die Serumpeptidprofile retrospektiv innerhalb der Melanomgruppe eine Aussage bezüglich der Unterscheidung von verstorbenen und überlebenden Patienten ermöglichen.

3 Material und Methoden

3.1 Patientenkollektiv

Die Serumproben der Melanom-Patienten der vorliegenden Untersuchungen entstammen einer Studie über Interferon-Therapie bei Patienten mit malignem Melanom, durchgeführt an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig-Maximilians-Universität München. Hierfür wurden in den Jahren 1995 bis 1997 standardisiert Serumproben von Melanom-Patienten entnommen.

Aus dieser Studie waren noch 43 Patientenserumproben vorhanden. Nach profunder Aktenrecherche, schriftlicher und telefonischer Nachforschungen bei nachbehandelnden Ärzten und Patientenangehörigen konnten 31 Patienten mit geeignetem, das heißt langfristig dokumentiertem Krankheitsverlauf von mindestens 5 Jahren, in die Studie eingeschlossen werden. Patienten mit unbekanntem Verlauf, mehr als einem Melanom, seltenen Melanomlokalisationen (Auge) oder Zweitmalignomen wurden ausgeschlossen.

Aus dem verbliebenen Patientenkollektiv wurden zwei Gruppen gebildet (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6: Patientenkollektiv Melanompatienten

	Gruppe 1: verstorben (n=16)	Gruppe 2: überlebt (n=15)
<i>Mittleres Erkrankungsalter</i>	<i>49,8 Jahre</i>	<i>57,1 Jahre</i>
<i>Spanne Erkrankungsalter</i>	<i>21 - 81 Jahre</i>	<i>33 - 82 Jahre</i>
<i>Mittlere Überlebenszeit</i>	<i>5,01 Jahre</i>	<i>entfällt</i>
<i>Spanne Überlebenszeit</i>	<i>1-25 Jahre</i>	<i>entfällt</i>

Die erste Gruppe besteht aus 16 Patienten, die Melanom-abhängig verstorben sind (siehe Tabelle 7). Die mittlere Erkrankungsdauer betrug 5,01 Jahre mit einer Überlebenszeit von 1 bis 25 Jahren. Das mittlere Erkrankungsalter betrug 49,8 Jahre mit einer Spanne von 21 bis 81 Jahren.

Tabelle 7: Spezielle Daten Gruppe 1 (Melanom-abhängig verstorben)

<i>Nr.</i>	<i>Melanomtyp</i>	<i>Lokalisation</i>	<i>Tumordicke</i>	<i>Clark-Level</i>	<i>Metastasen</i>
1	<i>ALM</i>	<i>Daumen</i>	7	<i>IV</i>	<i>Ja</i>
2	<i>NMM</i>	<i>Rücken</i>	11	<i>IV</i>	<i>Ja</i>
3	<i>NMM</i>	<i>Oberschenkel</i>	7	<i>IV</i>	<i>Ja</i>
4	<i>NMM</i>	<i>Fußsohle</i>	6	<i>IV</i>	<i>Ja</i>
5	<i>NMM</i>	<i>Rücken</i>	7	<i>IV</i>	<i>Ja</i>
6	<i>NMM</i>	<i>Rücken</i>	3,6	<i>IV</i>	<i>Ja</i>
7	<i>NMM</i>	<i>Peniswurzel</i>	3,4	<i>IV</i>	<i>Ja</i>
8	<i>SSM</i>	<i>Unterschenkel</i>	2,8	<i>IV</i>	<i>Ja</i>
9	<i>SSM</i>	<i>Unterschenkel</i>	3	<i>IV</i>	<i>Ja</i>
10	<i>NMM</i>	<i>Unterschenkel</i>	1,8	<i>IV</i>	<i>Ja</i>
11	<i>SSM</i>	<i>Rücken</i>	1,8	<i>IV</i>	<i>Ja</i>
12	<i>NMM</i>	<i>Kniekehle</i>	1,5	<i>IV</i>	<i>Ja</i>
13	<i>NMM</i>	<i>Oberarm</i>	1,3	<i>IV</i>	<i>Ja</i>
14	<i>ALM</i>	<i>Daumen</i>	1,2	<i>IV</i>	<i>Ja</i>
15	<i>nävöides MM</i>	<i>Schulter</i>	1,25	<i>IV</i>	<i>Ja</i>
16	<i>Lentigo maligna</i>	<i>Occipital</i>	0,6	<i>IV</i>	<i>Ja</i>

Die zweite Gruppe besteht aus 15 Patienten, die entweder Tumor-unabhängig verstarben oder zum heutigen Zeitpunkt noch am Leben sind. Hier betrug das mittlere Erkrankungsalter 57,13 Jahre, mit einer Spanne von 33 bis 82 Jahren (siehe hierzu Tabelle 8).

Tabelle 8: Spezielle Daten Gruppe 2 (Tumor-unabhängig verstorben oder zum heutigen Zeitpunkt noch am Leben)

<i>Nr.</i>	<i>Melanomtyp</i>	<i>Lokalisation</i>	<i>Tumordicke</i>	<i>Clark-Level</i>	<i>Metastasen</i>
1	<i>SSM</i>	<i>Rücken</i>	<i>12,1</i>	<i>IV</i>	<i>Nein</i>
2	<i>SSM</i>	<i>Unterschenkel</i>	<i>1,8</i>	<i>III</i>	<i>Nein</i>
3	<i>SSM</i>	<i>Capillitium</i>	<i>1,3</i>	<i>IV</i>	<i>Nein</i>
4	<i>Lentigo maligna</i>	<i>Wange</i>	<i>0,15</i>	<i>II</i>	<i>Nein</i>
5	<i>NMM</i>	<i>Oberarm</i>	<i>16,7</i>	<i>IV</i>	<i>Ja</i>
6	<i>amelanotisches MM</i>	<i>Unterschenkel</i>	<i>3,6</i>	<i>III</i>	<i>Ja</i>
7	<i>SSM</i>	<i>Oberarm</i>	<i>2,09</i>	<i>IV</i>	<i>Ja</i>
8	<i>SSM</i>	<i>Oberschenkel</i>	<i>1,8</i>	<i>IV</i>	<i>Ja</i>
9	<i>SSM</i>	<i>Ohrläppchen</i>	<i>1,5</i>	<i>IV</i>	<i>Ja</i>
10	<i>SSM</i>	<i>Unterschenkel</i>	<i>1,2</i>	<i>III</i>	<i>Ja</i>
11	<i>NMM</i>	<i>Unterschenkel</i>	<i>0,8</i>	<i>IV</i>	<i>Ja</i>
12	<i>SSM</i>	<i>Unterarm</i>	<i>0,6</i>	<i>III</i>	<i>Ja</i>
13	<i>SSM</i>	<i>Rücken</i>	<i>1,1</i>	<i>IV</i>	<i>Ja</i>
14	<i>NMM</i>	<i>Knie</i>	<i>1,5</i>	<i>IV</i>	<i>Ja</i>

Mit Hilfe der Krankenakten konnte der klinische Verlauf der Erkrankung weitgehend nachvollzogen werden, da sich die meisten Patienten über lange Zeit in der Tumornachsorge befanden. Ergänzende Informationen wurden schriftlich oder telefonisch über Patienten, Angehörige oder weiterbehandelnde Ärzte eingeholt. Im Zentrum des Interesses stand der derzeitige Gesundheitszustand der noch lebenden

Patienten. Bei den Verstorbenen war insbesondere die Todesursache von zentraler Bedeutung.

Als Vergleichsgruppe standen Serumproben von 102 Lymphompatienten zur Verfügung, die zwischen 1978 und 2002 ebenfalls in der Klinik und Poliklinik der LMU München im Rahmen der Diagnostik ihres kutanen Lymphoms entnommen wurden.

Die Kontrollgruppe umfasste Serumproben von 18 Patienten, die weder an einem malignen Melanom noch an einem kutanen Lymphom erkrankt waren.

3.2 Analyse der Seren

3.2.1 Vorbereitung der Proben

Die bei -80°C gelagerten Serumproben wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und in 100 μl Eppendorf-Tubes aliquotiert. Jedes Eppendorf-Tube wurde mit einer dem Patienten zugeordneten Nummer beschriftet und somit für weitere Analysen anonymisiert. Anschließend wurden die Proben bis zur weiteren Analyse bei -80°C gelagert.

Zunächst werden die in den Seren enthaltenen Proteine mittels eines Lysepuffers in Lösung gebracht, welcher aus einem Gemisch aus Substanzen besteht, die an verschiedenen Stellen der dreidimensional verknäulten Proteine angreifen:

Detergentien (Natriumdodecylsulfat SDS, 3-[(Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propane-sulfonate hydrate CHAPS, Nonident NP40, Deoxycholsäure DCA) vergrößern die Hydratationshülle der Aminosäuren, wodurch sich die Löslichkeit erhöht.

Reduktionsmittel (z.B. β -Mercaptoethanol, Dithiotreitol) öffnen die Disulfidbrücken, welche die Aminosäuren quervernetzen. Chaotrope Salze (Harnstoff, Guanidinhydrochlorid) reduzieren die Proteinverknäuelung weiter. Als Puffer dient Tris-hydroxymethyl-aminomethan (TRIS), phosphate buffered saline (PBS), Dieser Lysepuffer inaktiviert auch die Proteasen. Nach erfolgter Lyse wird das Lysat zentrifugiert um die ungelösten Bestandteile wie Membranen oder Polysaccharide zu

sedimentieren. Der Überstand wird bei -80 C gelagert und steht für die eigentliche Analyse zur Verfügung.

3.2.2 Grundprinzip der TOF-(time of flight) Massenspektrometrie

Das Grundprinzip der TOF-(time of flight) Massenspektrometrie wird im Folgenden kurz erläutert. Die zu analysierenden Moleküle werden ionisiert und dadurch elektrisch geladen. Im elektrischen Feld erfahren die Moleküle in Abhängigkeit von ihrer Masse und ihrer elektrischen Ladung eine Beschleunigung, worauf die ionisierten Moleküle eine festgelegte Distanz durchfliegen und auf einen Detektor treffen. Die Flugzeit wird gemessen, welche mit der Geschwindigkeit und der erfahrenen Beschleunigung korreliert. Über einen Abgleich mit bekannten Datenbanken, kann auf das Molekül zurückgeschlossen werden.

Des Weiteren kann durch Fragmentierung einzelner Peptidionen die Aminosäuresequenz des jeweiligen Peptids abgeleitet werden.

Der Nachteil dieses Verfahrens ist, dass zur Ionisation die Probe fein verteilt vorliegen muss und die Ionisation durch Elektronenbeschuss erfolgen muss.

Folglich funktioniert die traditionelle Massenspektrometrie mit biologisch besonders interessanten Molekülen nicht sehr gut, da diese häufig eine sehr hohe Masse haben und den Elektronenbeschuss auch nur in Grenzen überstehen.

Um diese Schwierigkeiten zu überwinden, wurde ein neues Verfahren, die sogenannte matrix assisted laser desorption ionisation (MALDI) entwickelt.

3.2.3 MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation)

Der deutsche Begriff für matrix assisted laser desorption ionisation ist Matrix unterstützte Laser-Desorption/-Ionisierung.

Bei diesem Verfahren wird die Probe in Lösung mit einer Matrix versehen und gemeinsam auf einen Träger aufgebracht. Probe und Matrix lässt man nun auf dem Träger co-kristallisieren. Die Matrix ist im Überschuss vorhanden und umgibt das

einzelne Molekül. Die Matrix hat die Fähigkeit im festen Zustand andere Substanzen mit elektrischer Ladung zu versehen, indem ein Wasserstoff-Ion übertragen wird. Dies stellt zwar keine echte Ionisation wie oben beschrieben dar, dennoch erfolgt aber eine echte Ladungsübertragung. Anschließend wird das Matrix-Analyt-Gemisch mit einem UV-Laser beschossen. Dabei absorbiert die Matrix die Lichtenergie und verdampft. Die Matrixhülle bricht auf, zurück bleiben Matrixdämpfe und die positiv geladenen einzelnen Moleküle der Probe. Im Anschluss erfolgt dann eine TOF-MS, wie oben beschrieben.

Ein Nachteil dieses Verfahrens kann sein, dass nicht alle Proteine detektiert werden, weil zu viele verschiedene Proteine im Analysat enthalten sind. Dann kann es zu unerwünschten Phänomenen kommen, wie dem Verlust an Ionenübertragungsvermögen oder dazu, dass gering konzentrierte Proteine durch die „Nachbarschaft“ eines stark exprimierten Proteins maskiert werden.

Folglich ist es günstig, die Anzahl der verschiedenen Moleküle in der Probe auf reproduzierbare Weise zu verringern (fraktionieren). Hierzu hat die Firma Ciphergen nun die Möglichkeit mit dem SELDI-Verfahren geschaffen, welches ein apparativ und anwendungstechnisch verändertes MALDI darstellt.

3.2.4 SELDI-TOF-MS (surface enhanced laser desorption ionisation time-of-flight-mass-spectrometry)

Das Grundprinzip des SELDI-TOF-MS entspricht dem Grundprinzip von MALDI.

Das Besondere hierbei ist jedoch die Fraktionierung der Proben bei sehr geringer Proteinausgangsmenge. Bisher wurde die Anzahl der verschiedenen Moleküle einer Probe durch die Verwendung chromatographischer Techniken reduziert. Aber erst durch die Einführung des ProteinChips konnte dieser Vorgang erheblich miniaturisiert werden. Der ProteinChip besteht aus einem Aluminiumstreifen (ca. 1x10cm), der 8 oder 16 oberflächenaktive Spots (3mm) besitzt. Diese aktiven Oberflächen können als Ionentauscher mit unpolaren Wechselwirkungen oder auch mit gezielt biologisch aktiven Bindungskapazitäten verstanden werden und besitzen somit dieselben Eigenschaften wie die bekannten Chromatographiesäulen.

Bereits 1-2 μl Lysat sind ausreichend, um den Spot zu benetzen. Direkt auf dem Chip finden nun alle weiteren Fraktionierungsschritte statt. Aufgrund der definierten chemischen Eigenschaften werden bestimmte Proteinklassen der Probe von den oberflächenaktiven Spots zurückgehalten. Nicht-gebundene Proteine werden durch Waschung entfernt. Die auf dem Spot verbliebene Fraktion wird mit EAM versehen und dann im SELDI-TOF Massenspektrometer vermessen.

Nach der Fraktionierung auf dem Chip findet im Wesentlichen ein klassisches MALDI-MS statt.

Nach der Messung der Probe entsteht für jede Probe und jede Fraktion ein Massenspektrogramm. Jeder Peak darin entspricht im Idealfall der Masse genau eines ionisierten Peptids oder Proteins.

Durch Software-gestützte Algorithmen können mehrere solcher Spektren miteinander verglichen werden. Ein Peak, der in vielen Proben nachgewiesen wird, kann einen Tumormarker darstellen. Sein spezifisches Auftreten im Spektrum ist prinzipiell als diagnostischer Test für nachfolgende Proben einsetzbar.

3.2.5 Durchführung der SELDI-TOF-MS mit den Melanomseren

Verwendet wurde ein Chip mit 8 reaktiven Spots (A-H) und WCX-Oberfläche (=CM10, weak cation exchange).

Die Chipoberfläche wird vor dem Auftragen der Proben konditioniert. Die WCX-Oberfläche wird zunächst 5 Minuten mit 10 mM HCl gewaschen, danach drei Mal für je 10 Sekunden mit aqua bidest und abschließend für 5 Minuten mit Chipbindepuffer (10 mM NH_4 -acetat, 0,1% Triton X100).

Das Waschen erfolgt in 15-ml-Falcontubes auf dem Schüttler.

Im Anschluss wird von jeder Serumprobe 10 μl in ein beschriftetes 500 μl -Eppendorfcup aliquotiert.

Die Zwischenlagerung der vorbereiteten Proben erfolgt bei -20 C.

Bei allen Arbeitsschritten wurde penibel darauf geachtet, die Chipoberfläche weder mit Fingern noch mit der Pipettenspitze zu berühren.

Während der Chip an der Luft trocknet, wird eine feuchte Kammer vorbereitet, in die der Chip dann mit den Spots nach oben eingebracht wird. Zeitgleich werden je acht Melanomseren im Wasserbad bei Zimmertemperatur aufgetaut.

Von allen acht aufgetauten Proben werden jeweils 2 µl auf die Spots pipettiert. Hierbei ist zu beachten, dass die Tropfen weder verlaufen noch eintrocknen.

Der Chip wird 30 Minuten in der geschlossenen feuchten Kammer inkubiert.

Die Matrixlösung wird unter einem Abzug aus 2500µl aqua bidest, 25 µl Trifluoressigsäure und 2475 µl Acetonitril in einem 15 ml Falcontube gemischt. Von dieser Lösung werden 150 µl in ein 1,8 ml Eppendorf Cup mit Schraubdeckel pipettiert. Es werden 4 mg Matrixsubstanz (CHCA) hinzugegeben und das Ganze für 5 Minuten auf den Schüttler gestellt.

Anschließend wird 5 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand stellt die gebrauchsfertige Matrixlösung dar und muss dunkel aufbewahrt werden.

Der ProteinChip wird drei Mal für jeweils 2 Minuten mit PBS (phosphate buffered saline) und drei Mal für jeweils 2 Minuten mit aqua bidest gewaschen, dann vollständig an der Luft getrocknet. Anschließend erfolgt das Auftragen von 0,8 µl Matrixlösung auf jeden Spot. Nach erneutem Trocken an der Luft werden wiederum 0,8 µl Matrixlösung auf jeden Spot aufgetragen.

Der nun fertig präparierte ProteinChip wird dunkel und staubgeschützt bei Raumtemperatur bis zur Messung mit dem SELDI PBS IIc Massenspektrometer (Ciphergen) aufbewahrt.

Die Messung eines ProteinChips dauert ungefähr 8 Minuten. Dazu werden optimierte Meßprotokolle verwendet, welche über die gesamte Dauer konstant gehalten wurden. Von jedem Spot werden 150 Einzelspektren gewonnen und zu einem Sammelspektrum summiert (Software Ciphergen ProteinChip 3.0).

Die generierten Spektren aus der Ciphergen Software werden in die Auswertungssoftware ClinProTools 2.0 (Bruker Daltonics, Bremen) importiert.

Da nur in den seltenen Fällen ein einzelnes Protein als möglicher Tumormarker identifiziert werden kann und es wesentlich wahrscheinlicher ist, auf eine häufiger wiederkehrende Expression einer kleineren Anzahl verschiedener Proteine (sogenannte Cluster) mit wechselnder Expression zu stoßen, müssen komplexe Algorithmen (pattern recognition algorithm, data mining, cluster analysis) benutzt werden, die eigenständig diese komplexen Datensätze auswerten können.

Die Software ClinProTools erfüllt diese Anforderungen mit folgenden Algorithmen, welche selbständig nach solchen komplexen Expressionsmustern suchen können: „genetic algorithm“ (GA), „support vector machine“ (SVM) und „quick classifier“ (QC). In der vorliegenden Arbeit wurde der „genetic algorithm“ (GA, genetischer Algorithmus) angewandt.

Der genetische Algorithmus wählt willkürlich fünf Massenpeaks aus. Im zweiten Schritt wird untersucht, ob anhand dieser fünf in vordefinierte Gruppen korrekt unterschieden werden können. Ist das nicht der Fall, wird einer der Peaks „ausgewechselt“. Es folgt eine erneute Prüfung. Diese Zyklen werden solange wiederholt, bis ein Muster aus fünf Peaks gefunden wurde, welches eine Klassifizierung mit definierter statistischer Güte erzielt.

3.2.6 Definitionen

3.2.6.1 Spezifität

In der Statistik bezeichnet die Spezifität (Richtignegativ-Rate) die Wahrscheinlichkeit, einen tatsächlich negativen Sachverhalt auch durch ein negatives Testergebnis zu erkennen.

Die Spezifität eines diagnostischen Testverfahrens gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass tatsächlich Gesunde, die nicht an der betreffenden Erkrankung leiden, im Test auch als gesund erkannt werden.

Sie ist definiert als der Quotient aus richtig negativen Testergebnissen und der Summe aus falsch positiven und richtig negativen Ergebnissen, also der Summe der Testergebnisse, bei denen tatsächlich keine Erkrankung zugrunde liegt.

Die Spezifität wird als Prozentsatz angegeben und gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der ein Gesunder als gesund erkannt wird.

3.2.6.2 Sensitivität

In der Statistik bezeichnet die Sensitivität (Richtigpositiv-Rate) die Wahrscheinlichkeit, einen tatsächlich positiven Sachverhalt auch durch ein positives Testergebnis zu erkennen.

Die Sensitivität eines diagnostischen Testverfahrens gibt an, zu welchem Prozentsatz bei erkrankten Personen die Krankheit durch den Test tatsächlich erkannt wird, also ein positives Testresultat auftritt.

Sie ist definiert als der Quotient aus richtig positiven Testergebnissen und der Summe aus richtig positiven und falsch negativen Testergebnissen.

Angegeben wird also die Wahrscheinlichkeit, mit der ein Kranker als krank erkannt wird.

Je höher die Sensitivität eines Tests ist, desto sicherer wird die Erkrankung erfasst.

3.2.6.3 Cross Validation (Vergleichsprüfung)

Die Vergleichsprüfung ist ein Testverfahren zur Überprüfung der Verlässlichkeit des angewandten Modells bzw. Tests.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten für eine Vergleichsprüfung. Das allgemeine Prinzip beruht auf einer automatischen Aufteilung eines bestimmten Datensatzes in eine Modell- („model-generation-set“) und eine Versuchsreihe („test-set“). Die Modellreihe dient dazu, durch ausgewählte Untergruppen ein Modell festzulegen. Die Versuchsreihe wird dann dazu benutzt, das erhaltene Modell zu beurteilen und die Vorhersagefähigkeit zu bestimmen. Dieses Vorgehen wird mehrfach wiederholt, die absoluten Vorhersagefähigkeiten akkumuliert und letztlich zur relativen

Vorhersagefähigkeit reduziert. Die spezifische Methode der Prüfung bestimmt die Art und Weise der Aufteilung zwischen Modell- und Versuchsreihe sowie die Art der Wiederholung.

Zu beachten ist, dass eine Vergleichsprüfung für eine sehr kleine Probenanzahl nicht besonders aussagekräftig ist und möglicherweise unbrauchbare Resultate liefert. Daher wird die Cross Validation in ClinProTools nur berechnet, wenn mindestens 20 nicht ausgegrenzte Spektren über alle Gruppen verfügbar sind.

Für detaillierte Informationen zur Vergleichsprüfung wird auf M.J. Kearns, Y. Mansur, A.Y. Ng and D. Ron, „An experimental and theoretical comparison of model selection methods“, Machine Learning 1997; 27, 7-50 verwiesen.

3.2.6.4 Recognition Capability (Erkennungsfähigkeit)

Die Erkennungsfähigkeit ist ein Maß für das Verhalten einer Untergruppe. Sie wird für ein bestimmtes Modell als die relative Zahl von mithilfe der Untergruppen korrekt zugeordneten Datenpunkten berechnet. Voraussetzung ist, dass alle getesteten Daten zuvor zur Modellbestimmung oder zum Training der Untergruppe genutzt wurden.

Die Erkennungsfähigkeit zeigt also an, wie gut das vorgegebene Modell in der Lage ist, Daten zu klassifizieren.

Ist die Erkennungsfähigkeit gering, dann war es nicht möglich in der Untergruppe die differenzierenden Datenmerkmale zu erkennen. Das könnte der Fall sein, wenn es nicht möglich ist, eine Beziehung zwischen den Dateneigenschaften und der vorgegebenen Kennzeichnung herzustellen. Eine große Erkennungsfähigkeit bedeutet dagegen nicht zwangsläufig, dass die Daten trennbar sind oder das Modell sehr gut ist. Wenn beispielsweise alle Daten auswendig gelernt sind, fällt es leicht, die Klassenbezeichnung für diese Daten vorherzusagen, werden jedoch unbekannte Daten präsentiert, dürfte es dem Modell misslingen, eine richtige Zuordnung zu treffen.

4 Ergebnisse

4.1 Auswertung mit der Software ProteinChip 3.0 (CIPHERGEN)

Die mit dem SELDI (Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionisation) Time-of-Flight Massenspektrometer vermessenen ProteinChips lieferten von jeder einzelnen Probe 150 Einzelspektren. Diese wurden mithilfe der Software Protein Chip 5.0 (CIPHERGEN) jeweils zu einem Summenspektrum aufsummiert.

Abbildung 1 zeigt ein Beispiel für ein Summenspektrum von fünf verschiedenen Proben (Patienten) (A-E).

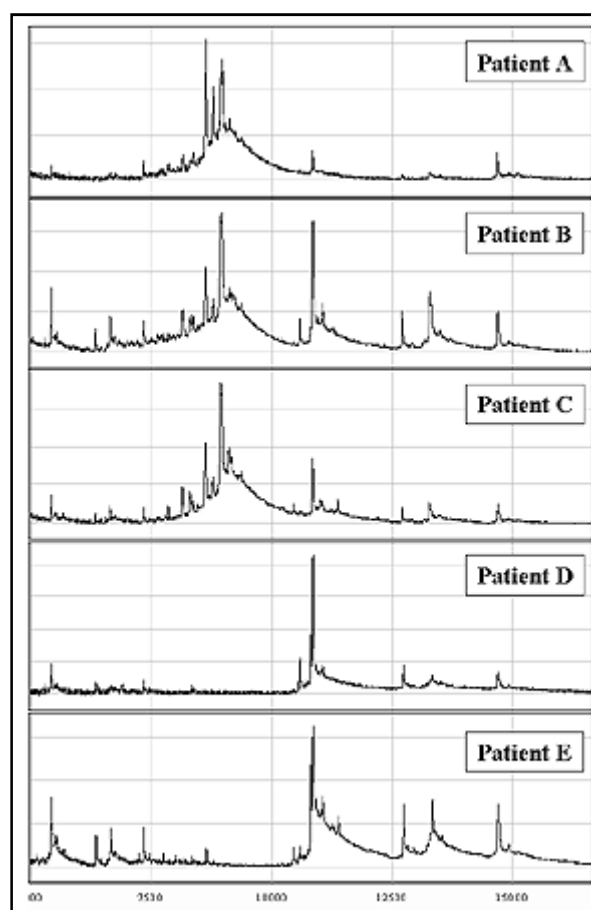


Abbildung 1: Summenspektrum, Beispiel

Diese Spektren wurden im Anschluss in die Auswertungssoftware ClinProTools 2.0 (Bruker Daltonics, Bremen) importiert und nach krankheitsspezifischen Gruppen sortiert.

4.2 Auswertung mit der Software ClinProTools 2.0 (Bruker Daltonik, Bremen)

Die Güte des Algorithmus wird von der Software als „Recognition Capability“ und „Cross Validation“ angegeben. Die Angabe erfolgt jeweils einzeln („for each class“) und insgesamt („overall“) für die beiden untersuchten Gruppen.

Die „Cross Validation“ entspricht Sensitivität und Spezifität.

4.2.1 Vergleich der Melanomseren mit den Lymphomseren

Untersucht wurde, ob es möglich ist, Melanomseren von Lymphomseren zu unterscheiden.

Zur Verfügung standen 31 Melanomseren und 102 Lymphomseren.

Das Ergebnis dieser Auswertung zeigt Abbildung 2, dargestellt als relative Verteilung der Proteine in Abhängigkeit von Größe und Ladung.

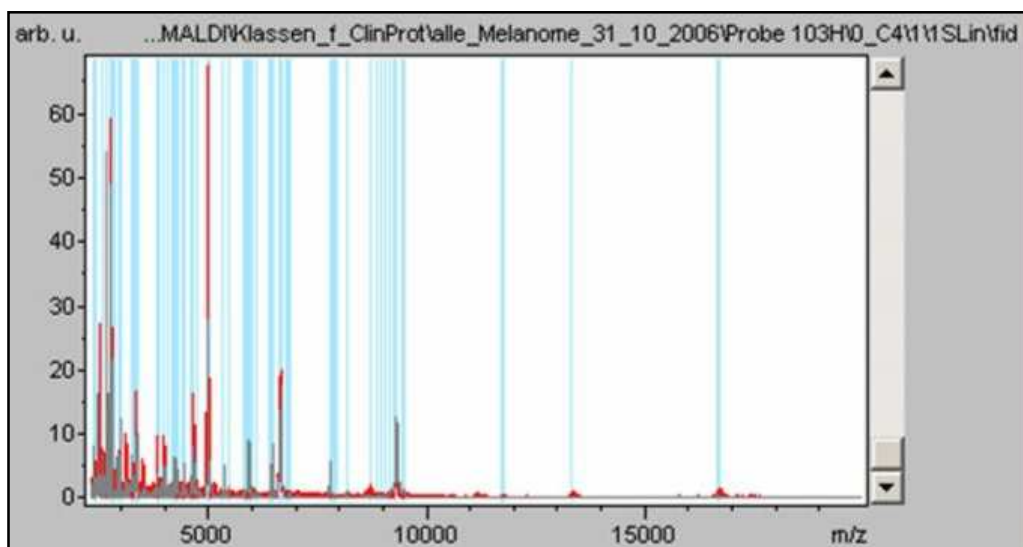


Abbildung 2: Abhängigkeit der Flugzeit von der Masse (m/z-Darstellung); relative Verteilung der Proteine in Abhängigkeit von ihrer Größe und Ladung

Wie der Abbildung 3 zu entnehmen ist, zeigt sich im Auswertungsalgorithmus eine klare Unterscheidbarkeit von Melanomen und Lymphomen. Die Datenpunkte der jeweiligen Entitäten, Melanome hier rot und Lymphome grün dargestellt, liegen zwar relativ nahe beieinander, jedoch gibt es keine Überschneidungen der beiden Datensätze.

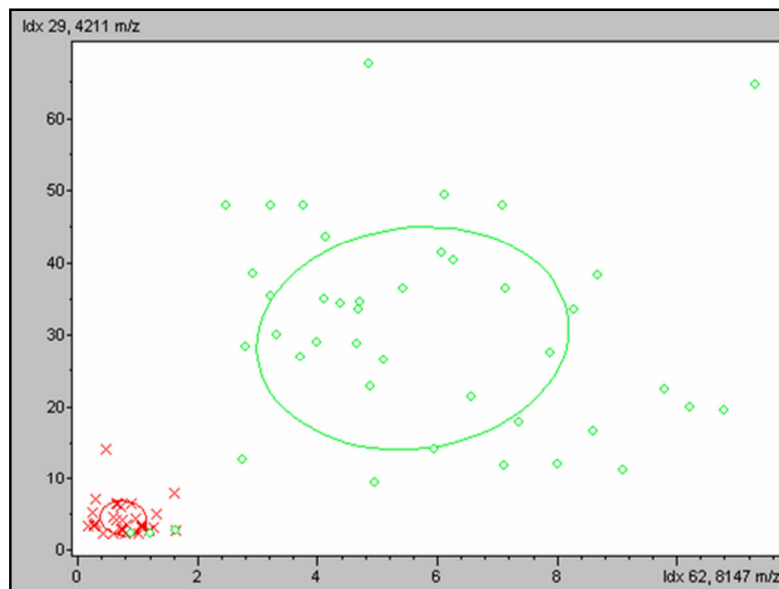


Abbildung 3: Graphische zweidimensionale Darstellung des Auswertungsalgorithmus: rot = Melanome, grün = Lymphome

Die Gesamtergebnisse für „Cross Validation“ und „Recognition Capability“ lassen sich der Abbildung 4 entnehmen.

Cross Validation	
Percent Leave Out:	20 %
Number of Iterations:	10
Overall:	91.24 %
Class 1:	90.91 %
Class 2:	91.58 %
Recognition Capability	
Overall:	100 %
Class 1:	100 %
Class 2:	100 %

Abbildung 4: Melanome vs. Lymphome; Einzelergebnisse Cross Validation und Recognition Capability

Die Angabe erfolgt jeweils insgesamt (overall) und für jede Erkrankungsgruppe (Class 1/ Class 2).

Die „Cross Validation“ beträgt insgesamt (overall) 91,24%. Dies ist ein gemittelter Wert für Sensitivität (90,91%) und Spezifität (91,58%).

„Class 1“ entspricht der Melanomgruppe, „Class 2“ der Lymphomgruppe.

Im vorliegenden Fall gibt die Spezifität die Wahrscheinlichkeit an, mit der ein nicht-Melanom-Patient (hier also ein Lymphom-Patient) als solcher erkannt wird. Die Spezifität wurde mit 91,58% berechnet.

Die Sensitivität, also die Wahrscheinlichkeit mit der ein Melanom-Patient als solcher erkannt wird, wurde mit 90,91% berechnet.

Die „Recognition Capability“ wird ebenfalls jeweils insgesamt (overall) und für jede Gruppe einzeln (each class) angegeben. Im vorliegenden Fall beträgt der Wert sowohl insgesamt als auch für die Untergruppen 100%. Die Aussagefähigkeit der „Recognition Capability“ ist allerdings gering und wird nur der Vollständigkeit halber angegeben.

4.2.2 Vergleich der Melanomseren mit anderen Erkrankungen (= Kontrollen und Lymphome)

Weiter wurde untersucht, ob die Melanomseren von anderen Erkrankungen, also der Kontrollgruppe inklusive Lymphomseren unterschieden werden können.

Zur Verfügung standen 31 Melanomseren, 18 Kontrollseren, sowie 102 Lymphomseren.

Abbildung 5 zeigt das Ergebnis der Auswertung.

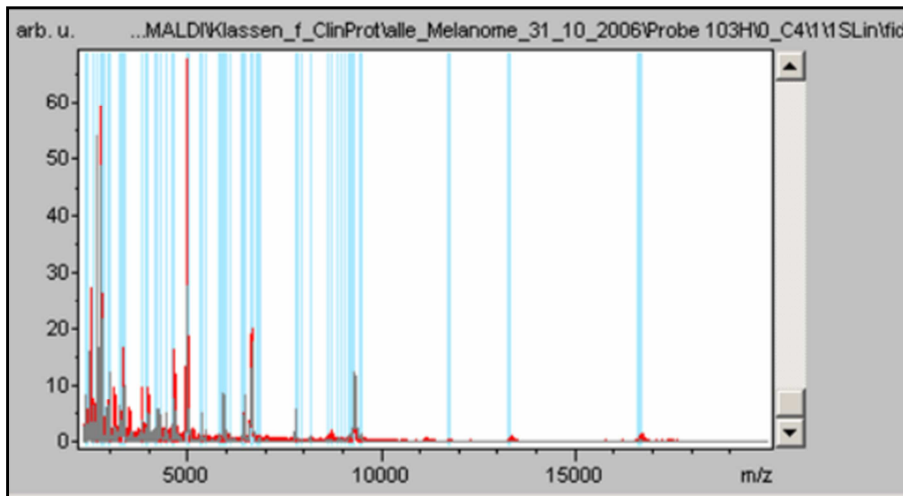


Abbildung 5: Massenspektren: Abhängigkeit der Flugzeit von der Masse (m/z-Darstellung); relative Verteilung der Proteine in Abhängigkeit von ihrer Größe und Ladung

Auch in diesem Fall kann anhand der graphischen Darstellung des Auswertungsalgorithmus in Abbildung 6 die deutliche Unterscheidung der Melanome von den anderen Erkrankungen gezeigt werden. Die Datenpunkte der Melanome sind rot, die der anderen Erkrankungen grün dargestellt. Die Datenpunkte der Melanomseren und die der anderen Kontrollen liegen zwar jeweils eng beieinander, es gibt jedoch keine Überschneidungen der Datensätze.

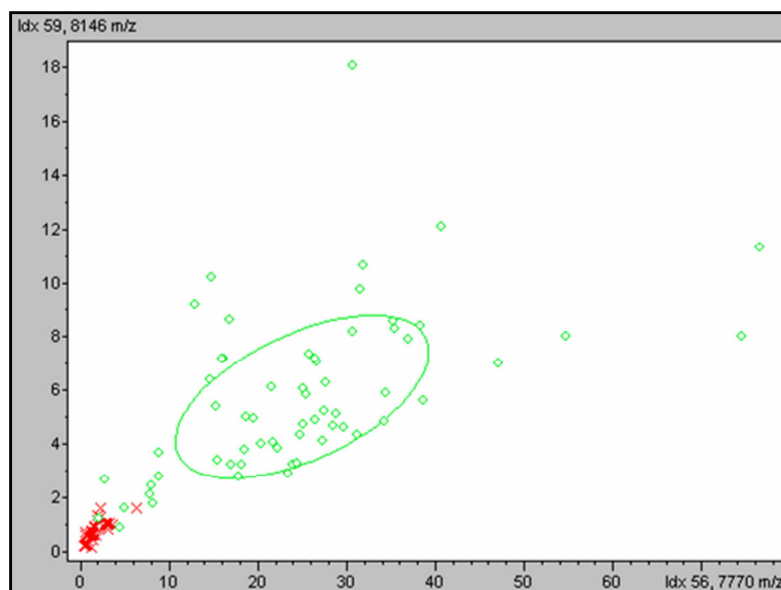


Abbildung 6: Graphische zweidimensionale Darstellung des Auswertungsalgorithmus: rot = Melanome, grün = alle anderen Erkrankungen

Für die Untersuchung der Melanomseren im Vergleich zu allen anderen Erkrankungen ergibt sich eine „Cross Validation“ von 90,74%. Dieser Wert setzt sich zusammen aus dem Wert für die Sensitivität mit 87,04% und dem Wert für die Spezifität mit 94,44%. Abbildung 7 zeigt die Darstellung der Einzelergebnisse.

Cross Validation				
Percent Leave Out:	20 %			
Number of Iterations:	10			
Overall:	90.74 %			
Class 1:	87.04 %			
Class 2:	94.44 %			
Recognition Capability				
Overall:	100 %			
Class 1:	100 %			
Class 2:	100 %			
Integration Regions used for Classification				
Index	Mass	Start Mass	End Mass	Weight
6	2751.94	2742.33	2762.46	1.77
56	7769.92	7751.64	7793.65	1.63

Abbildung 7: Darstellung der Einzelergebnisse für Cross Validation und Recognition Capability

Im gegebenen Fall wird also mit einer Wahrscheinlichkeit von 94,44% ein Patient innerhalb der untersuchten Erkrankungsgruppen (Melanome und andere Erkrankungen) in Bezug auf das Melanom als gesund erkannt werden können. Das bedeutet, dass diese Patienten nicht an einem Melanom erkrankt sind, jedoch an einer anderen Erkrankung leiden können. Die Sensitivität gibt an, dass hier mit einer Wahrscheinlichkeit von 87,04% ein Patient, der an einem Melanom leidet, als solcher erkannt wird.

Auch hier wird die „Recognition Capability“ wegen der geringen Aussagekraft nur zur Vervollständigung angegeben. Für die untersuchten Entitäten ergab sich ein Wert von 100%.

4.2.3 Vergleich der Melanomseren untereinander

Die letzte Analyse befasst sich mit der Frage, ob eine Aussage bezüglich der Prognose innerhalb der Melanomgruppe möglich ist. Hierzu wurden die Melanome in zwei Gruppen geteilt: Gruppe 1 beinhaltet die melanomabhängig verstorbenen Patienten, Gruppe 2 die noch lebenden oder unabhängig vom Melanom verstorbenen Patienten.

In Gruppe 1 standen 16 Patienten zur Verfügung, in Gruppe 2 15 Patienten.

Abbildung 8 zeigt das Ergebnis der Auswertung mit der Software ClinProTools 2.0 für die genannten Entitäten.

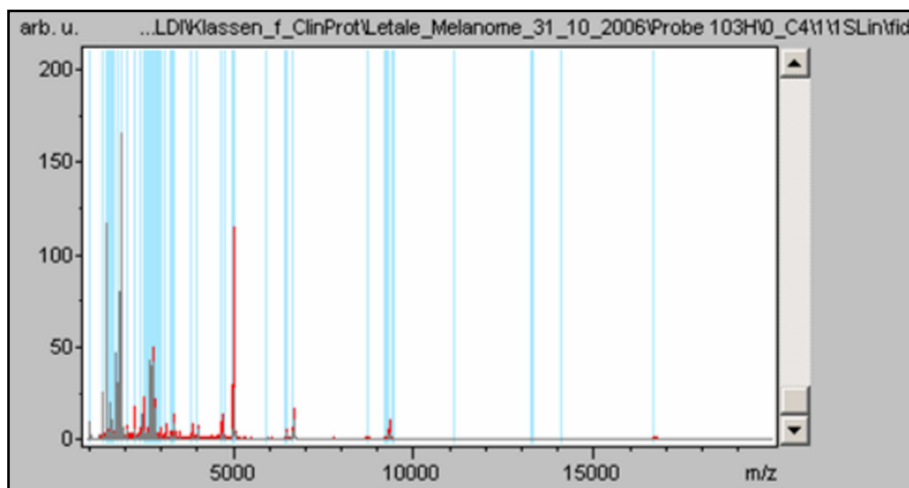


Abbildung 8: Massenspektren: Abhängigkeit der Flugzeit von der Masse (m/z-Darstellung); relative Verteilung der Proteine in Abhängigkeit von ihrer Größe und Ladung

In diesem Fall ist, wie Abbildung 9 zeigt, keine sichere Unterscheidung möglich.

Die Datenpunkte liegen recht dicht beieinander und die Datensätze überschneiden sich fast gänzlich. Eine sichere Unterscheidung im Sinne von „verstorben“ oder „überlebt“ ist nicht möglich.

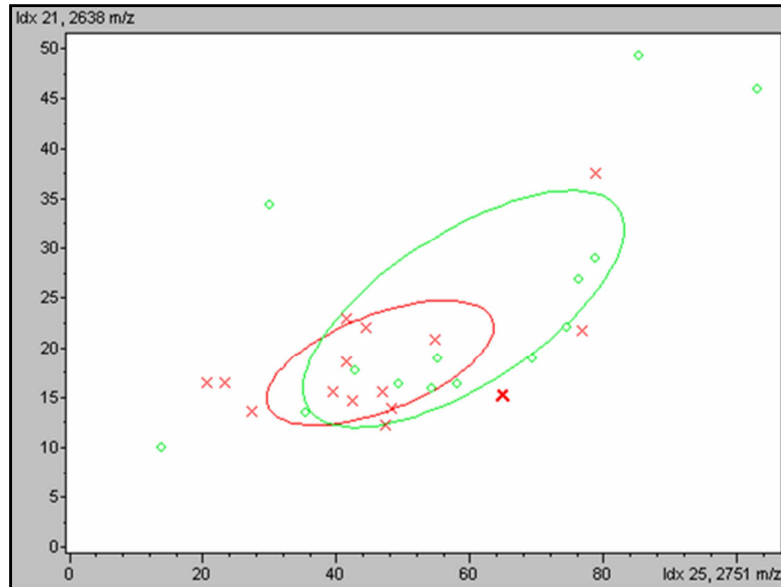


Abbildung 9: Graphische zweidimensionale Darstellung des Auswertungsalgorithmus: rot = letale Melanome, grün = überlebte Melanome

Gleiches stellt auch die statistische Analyse dar. Die „Cross Validation“ beträgt im konkreten Fall 48,57%, zusammengesetzt aus den Werten für Sensitivität mit 60% und Spezifität mit 37,14%, Werte also, die keine sinnvolle Aussage erlauben.

Auch hier wird die „Recognition Capability“ mit 82,38% (overall) nur als weiteres Detail erwähnt. Die Einzelergebnisse zeigt Abbildung 10.

Cross Validation	
Percent Leave Out:	20 %
Number of Iterations:	10
Overall:	48.57 %
Class 1:	60 %
Class 2:	37.14 %
Recognition Capability	
Overall:	82.38 %
Class 1:	93.33 %
Class 2:	71.43 %

Abbildung 10: Melanome lebt gegen verstorben; Einzelergebnisse Cross Validation und Recognition Capability

5 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen, ob sich im Blutserum Hinweise auf das Vorhandensein eines malignen Melanoms finden lassen, und zweitens, ob sich eine Prognose ableiten lässt.

Für diese Studie konnten Seren von 31 Patienten mit langfristig dokumentiertem Krankheitsverlauf, sowie 102 Seren von Patienten mit kutanen Lymphomen, sowie 18 Seren von Patientinnen und Patienten mit anderen Erkrankungen eingeschlossen werden. Die Proben wurden mittels SELDI-TOF-MS vermessen und die erhaltenen Spektren mit der Software ClinProTools 2.0 (Bruker Daltonics, Bremen) anhand des „genetic algorithm“ (GA) ausgewertet.

Im Vergleich der Melanomseren mit den Lymphomseren zeigte sich eine außerordentlich gute Unterscheidungsmöglichkeit der beiden Erkrankungen mit einer Spezifität von 91,58% und einer Sensitivität von 90,91%. Diese Werte sind annähernd vergleichbar mit den in der Literatur beschriebenen Werten für die erste erfolgreiche Anwendung dieser Technik beim Ovarialkarzinom [118], [161]. Auch wenn weitere Kontrollseren in die Vergleichsgruppe aufgenommen werden zeigte sich eine sehr gute Unterscheidungsmöglichkeit zwischen den verschiedenen Entitäten. Im vorliegenden Fall ergab sich für das richtige Erkennen eines Melanompatienten aus dem Serum, d.h. für die Sensitivität des Tests, ein Wert von 87,04% bei einer Spezifität von 94,44%. Das sind für einen Screeningtest ausgezeichnete Resultate.

Weiterhin stellte sich die Frage, ob innerhalb der Melanompatienten eine Unterscheidung zwischen verstorbenen und überlebenden Patienten möglich sei. Dafür wurden 16 Seren von am Melanom verstorbenen Patienten mit 15 Seren von Patienten, die ihre Erkrankung überlebt haben verglichen. Die Werte für Sensitivität mit 60% und für Spezifität mit 37% zeigen, dass eine Unterscheidung im angewandten Testsystem nicht sinnvoll vorzunehmen ist. Ein möglicher Grund ist hier in erster Linie in der wohl zu geringen Fallzahl zu suchen. Mit der Erhöhung der Fallzahl wächst die Komplexität der Auswertung rapide an, jedoch werden dadurch die Ergebnisse in der biostatistischen Analyse auch signifikant stichhaltiger.

Ein anderer Erklärungsansatz könnte in den chemischen Eigenschaften des ProteinChips zu suchen sein. Dieser Chip stellt die Grundlage der SELDI-TOF-MS dar. Seine oberflächenaktiven Spots halten aufgrund bestimmter chemischer Eigenschaften bestimmte Proteinklassen der aufgetragenen Proben zurück, während die nicht-gebundenen Proteine durch Waschung entfernt werden. Es wäre also denkbar, dass andere ProteinChips mit anderer Fraktionierung zu aussagekräftigeren Ergebnissen führen.

Auch könnte ein anderer Auswertalgorithmus eine gegebenenfalls vorhandene „Signatur“ erkennen.

Eine weitere Ursache kann auch in der biologischen Heterogenität der Melanome an sich begründet sein. In jüngster Zeit wird immer häufiger diskutiert, dass das Melanom nicht als eine einheitliche Neoplasie anzusehen ist, vielmehr wohl eine Gruppe verschiedener maligner melanozytärer Tumoren umfasst mit ganz unterschiedlicher Ätiopathogenese. Insofern würde es nicht überraschen, wenn sich innerhalb dieser kleinen Serie an Melanompatienten keine reproduzierbare Signatur zeigt, die mit der Aggressivität der Tumoren korreliert, oder aber zu viele verschiedene Muster vorliegen, die bei der kleinen Fallzahl nicht erkannt werden können.

Diverse andere Arbeitsgruppen versuchten bei Patienten mit malignem Melanom Serummarker zu identifizieren.

So verglich die Arbeitsgruppe um E. Ragazzi Seren von 10 gesunden Patienten und 27 Melanompatienten aller Stadien. Diese Studie arbeitete mit der MALDI-Technik und zeigte keine deutliche Unterscheidbarkeit beider Gruppen [127].

S. Mian et al untersuchten 101 Melanompatienten im Frühstadium I und 104 im Spätstadium IV sowie 55 Seren von Patienten nach Lymphknotendisektion. Ziel war eine Unterscheidung zwischen Früh- und Spätstadium treffen zu können sowie die Vorhersage von Verlauf bzw. Progression. Hier konnten 88% richtig zugeordnet werden [108].

Eine relativ gute Erkennung von Rezidivpatienten gelang der Gruppe um LL. Wilson. Sie arbeitete mit 24 Seren rezidivfreier Patienten und 25 Seren von Patienten

mit Rezidiv (Follow-up über 5 Jahre). Benutzt wurde die SELDI-Technik, wobei zwei verschiedenen Proteinchips (WXC2 und IMAC3-Cu) sowie unterschiedliche Software (Biomarker Wizard Software, Biomarker Pattern Software) genutzt wurde. Erzielt wurde eine Sensitivität von 72% sowie eine Spezifität von 75% bei der Unterscheidung von Patienten mit Rezidiv von Patienten ohne Rezidiv [159].

Der Arbeitsgruppe um Findeisen konnte Serum Amyloid A als prognostischen Marker identifizieren. Zur Verfügung standen 596 Serumproben von Melanompatienten (Stadium I und IV). Mithilfe der MALDI-TOF-Technik konnten die beiden Stadien durch einen Massenausschlag unterschieden werden, welcher anschließend als Serum Amyloid A identifiziert wurde. Verwendet wurde eine c18-Oberfläche (Bruker Daltonics) sowie die Software Autoflex II (ebenfalls Bruker Daltonics) [53].

Zusammenfassend konnte in der hier vorliegenden Studie gezeigt werden, dass es prinzipiell möglich ist kutane Neoplasien am Blutserum zu diagnostizieren, andererseits gelang es nicht einen Prognosefaktor für das maligne Melanom zu identifizieren.

6 Zusammenfassung

Maligne Melanome sind von zunehmender klinischer Bedeutung, da ihre Inzidenz in den letzten Jahren deutlich angestiegen ist.

Die derzeitige Diagnostik umfasst Anamnese, klinische und dermatoskopische Untersuchung, Histologie mit Immunhistologie, sowie bildgebende Verfahren. Da die Prognose der Patienten entscheidend von Tumordicke, Invasionslevel sowie Metastasierung bestimmt wird, ist eine Verbesserung der Prognose im Wesentlichen nur durch Früherkennung oder durch effektivere Therapien möglich.

Jedoch ist die Prognose innerhalb einer klinischen Gruppe nicht weiter abschätzbar; so überleben z. B. bei Patienten mit einem Melanom mit Clark Level IV in etwa ein Drittel der Fälle die Erkrankung, aber zwei Drittel versterben [104], [12]. Aus diesem Grund versucht die vorliegende Studie mittels Serumproteinanalyse hier einen klinisch relevanten Marker zu identifizieren.

In der Vergangenheit wurde mehrfach gezeigt, dass proteomische Methoden in der Diagnostik erfolgreich eingesetzt werden können [95].

Ziel der vorliegenden Arbeit war zu untersuchen, ob es möglich ist, anhand des Serums Melanompatienten zu identifizieren und ob sich in deren Serum Marker finden lassen, die mit dem Überleben oder Versterben korrelieren.

Hierzu wurde die „Surface enhanced laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry“ an Blutseren angewendet. Die biostatistische Auswertung erfolgte mit der Software ClinProTools 2.0. Es zeigte sich eine sehr gute Unterscheidbarkeit von Melanomseren und Lymphomseren. Die Sensitivität von 90,91% und eine Spezifität von 91,58% sind vielversprechende Werte, die sich bei Hinzunahme von weiteren Kontrollseren nicht wesentlich änderten. Jedoch konnte keine Signatur gefunden werden, die einen prognostischen Hinweis auf tumorabhängiges Versterben zum Zeitpunkt der Erstdiagnose gegeben hätte.

7 Literaturverzeichnis

- 1 Ackerman AB, Cerroni L, Kerl H. Pitfalls in histopathologic diagnosis of malignant melanoma. 1994; Lea&Febiger, Philadelphia
- 2 Adam BL, Qu V, Davis JW et al. Serum protein fingerprinting coupled with a pattern matching algorithm distinguishes prostate cancer from benign prostate hyperplasia and healthy men. *Cancer Res* 2002; 62:3609-3614
- 3 Ahram M, Best CJ, Flaig MJ, Gillespie JW, Leiva IM, Chuaqui RF, Zhou G, Shu H, Duray PH, Linehan WM, Raffeld M, Ornstein DK, Zhao Y, Petricoin EF, Emmert-Buck MR. Proteomic analysis of human prostate cancer. *Mol Cancering* 2002; 33:9-15
- 4 Ahram M, Emmert-Buck MR. Approaches to proteomic analysis of human tumors. *Methods Mol Biol* 2003; 222:375-384
- 5 Alaiya AA, Franzen B, Auer G, Linder S. Cancer proteomics: From identification of novel markers to creation of artificial learning models for tumor classification. *Electrophoresis* 2002; 21:1210-1217
- 6 Alayia A, Al-Mohanna M, Linder S. Clinical Cancer Proteomics: Promises and Pitfalls. *J Proteome Res* 2005:Jul-Aug; 4:1213-22
- 7 Anderson NL, Anderson NG. Proteome and proteomics: new technologies, new concepts and new words. *Electrophoresis* 1998; 19:1853-1861
- 8 Argenyi ZB, Cain C, Bromley C, Nguyen AV, Abraham AA, Kerschmann R, LeBoit PE. S-100 protein-negative malignant melanoma: Fact or fiction? A light microscopic and immunohistochemical study. *Am J Dermatopathol* 1994; 16:233-240
- 9 Armstrong BK, Krickler A. Cutaneous melanoma. *Cancer Surv* 1994; 19-20:219-240
- 10 Auslender S, Barzilai A, Goldberg I, Kopolovic J, Trau H. Lentigo maligna and superficial spreading melanoma are different in their situ phase: an immunohistochemical study. *Human Pathology* 2002; 33, No.10:1001-1005
- 11 Balch CM, Houghton AN, Milton GW, Sober AJ, Soong S-J (Hrsg). *Cutaneous melanoma*. 1992; Lippincott, Philadelphia London New York Hagerstown
- 12 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, Bryd 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. *Journal of Clinical Oncology* 2001; 19, No.16:3622-3634
- 13 Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol* 2009; 27:6199-206
- 14 Balch CM, Soong SJ, Shaw HM, Urist MM, McCarthy WH. An analysis of prognostic factors in 8500 patients with malignant melanoma. In: Balch CM, Houghton AN, Milton GW, Sober AJ, Soons SJ (eds) *Cutaneous melanoma*, 1992; 2nd ed. Lippincott, Philadelphia, pp 165-187
- 15 Bastian BC, Kashani-Sabet M, Hamm H, Godfrey T, Moore DH, Bröcker EB. Gene amplifications characterize acral melanoma and permit the detection of occult tumor cells in the surrounding skin. *Cancer Research* 2002; 60:1968-1973
- 16 Battayani Z, Grob JJ, Xerri L, Noe C, Zarour K, Houvaenaghel G, Delpero JR, Birnbaum D, Hassoun J, bonerandi JJ. Polymerase chain reaction detection of circulating melanocytes as a prognostic marker in patients with melanoma. *Arch Dermatol* 1995; 131:443-447
- 17 Berking C, Schlüpen EM, Schrader A, Atzpodien J, Volkenandt M. Tumor markers in peripheral blood of patients with malignant melanoma: Multimarker RT-Pcr versus a luminoimmunometric assay for S-100. *Arch Dermatol Res* 1999; 291:479-484
- 18 Best CJ, Gillespie JW, Englert CR, Swalwell JI, Pfeifer J, Krizman DB, Petricoin EF, Liotta LA, Emmert-Buck MR. New approaches to molecular profiling of tissue samples. *Anal Cell Pathol* 2000; 20:1-6
- 19 Bichsel VE, Liotta LA, Petricoin EF. Cancer proteomics: from biomarker discovery to signal pathway profiling. *Cancer J* 2001; 7:69-78
- 20 Bittner ML, Meltzer P, Chen Y, Jiang Y, Seftor E, Handrix M et al. Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling. *Nature* 2000; 406:536-540
- 21 Braun-Falco O, Landthaler M, Hölzel D. Klassifizierung, Diagnose und Differentialdiagnose maligner Melanome. *Chirurg* 1986; 57:593-600
- 22 Braun-Falco O, Plewig G, Wolff HH, Burgdorf WHC, Landthaler M (Hrsg). *Dermatologie und Venerologie*. Springer Medizin Verlag Heidelberg 5. Auflage 2005. ISBN 978-3-540-40535-2
- 23 Braun-Falco O, Plewig G, Wolff HH. *Dermatology*. Springer Verlag Heidelberg 2. Auflage 2000. ISBN 3-540-16672-6

- 24 Brawer MK. Prostate-Specific Antigen: Current Status. *CA Cancer J Clin* 1999; 49:264-281
- 25 Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg* 1970; 172:902-908
- 26 Breslow A. Tumor thickness, level of invasion and node dissection in stage I melanoma. *Ann Surg* 1975; 175:182;572-575
- 27 Brossart P, Keilholz U, Scheibenbogen C, Mohler T, Willhauck M, Hunstein W. Detection of residual tumor cells in patients with malignant melanoma responding to immunotherapy. *J Immunother* 1994; 15:38-41
- 28 Brossart P, Schmier JW, Kruger S, Willhauck M, Scheibenbogen C, Mohler T, Keilholz U. A polymerase chain reaction-based semiquantitative assessment of malignant melanoma cells in peripheral blood. *Cancer Res* 1995; 55:4065-4068
- 29 Büttner P, Garbe C, Bertz J, Burg G, d'Hoedt B, Drepper H, Guggenmoos-Holzmann I, Lechner W, Lippold A, Orfanos CE, et al. Primary cutaneous melanoma. Optimized cutoff points of tumor thickness and importance of Clark's level for prognostic classification. *Cancer* 1995; 75:2499-2506
- 30 Buttner P, Garbe C, Bertz J, et al. Primary cutaneous melanoma: Optimized cutoff points of tumor thickness and importance of Clark's level for prognostic classification. *Cancer* 1995; 75:2499-2506
- 31 Buzaid A, Ross M, Soong S. Classification and Staging. In: Balch CM, Houghton AN, Sober AJ, Soong S (Hrsg): *Cutaneous melanoms*. Quality Medical Publishing, St. Louis, 1998; pp 37-50
- 32 Buzaid AC, Anderson CM. The Changing Prognosis of Melanoma. *Current Oncology Reports* 2000; 2:322-328
- 33 Caputo E, Lombardi ML, Luongo V, Moharram R, Tornatore P, Pirozzi G, Guardiola J, Martin BM. Peptide profiling in epithelial tumor plasma by the emerging proteomic techniques. *J Chromatogr. B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2005; 819:59-66
- 34 Caron J, Mange A, Guillot B, Solassol J. Highly sensitive detection of melanoma based on serum proteomic profiling. *J Cancer Res Clin Oncol* 2009; 135 (9):1257-64
- 35 Celis JE, Kruhoffer M, Gromova I, Frederiksen C, Ostergaard M, Thykjaer T, Gromov P, Yu J, Palsdottir H, Magnusson N, Orntoft TF. Gene expression profiling: monitoring transcription and translation products using DNA microarrays and proteomics. *FEBS Lett.* 2000; 480:2-16

- 36 Chen L, Fatima S, Peng J, Leng X. SELDI protein chip technology for the detection of serum biomarkers for liver disease. *Protein Pep Lett* 2009; 16(5):467-72
- 37 Clark WH Jr., From L., Bernardino EA., Mihm MC. The histogenesis and biologic behaviour of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res* 1969; 29:705-727
- 38 Cohen IM. Lentigo maligna and lentigo maligna melanoma. *J Am Acad Dermatol* 1995; 33:923-936
- 39 Coldiron BM. Thinning of the ozone layer: facts and consequences. 1990; 49th annual meeting AAD, Atlanta Dec 1-6
- 40 Conelly J, Smith JL Jr. Malignant blue nevus. *Cancer* 1991; 67:2653-2657
- 41 Creco M, De Mitri M, Chiriaco F, Leo G, Brienza E, Maffia M. Serum proteomic profile of cutaneous malignant melanoma and relation to cancer progression: Association to tumor derived alpha-N-acetylgalactosaminidase activity. *Cancer Letters* 2009; 283:222-229
- 42 Curry BJ, Smith MJ, Hersey P. Detection and quantitation of melanoma cells in the circulation of patients. *Melanoma Res* 1996; 6:45-54
- 43 De Bock, de Senry D, Meuwis MA, Chapelle JP, Lovis E, Malaise M, Merville MP, Fillet M. Challenges for biomarker discovery in body fluids using SELDI-TOF-MS. *J Biomed Biotechnol* 2010; 906082, Epub 2009 Dec 6
- 44 DeDavid M, Orlow SJ, Provost N, Marghoob AA, Rao BK, Huang CL, Wasti Q, Kopf AW, Bart RS. A study of large melanocytic nevi and associated malignant melanomas: Review of cases in the New York University Registry and the world literature. *J Am Acad Dermatol* 1997; 36:409-416
- 45 Devaray VS, Moss AL, Briggs JC. Desmoplastic melanoma: a clinico-pathological review. *Br J Plast Surg* 1992; 45:595-598
- 46 Drier JK, Swanson PE, Cherwitz DL, Wick MR. S-100 protein immunoreactivity in poorly differentiated carcinomas: Immunohistochemical comparison with malignant melanoma. *Arch Pathol Lab Med* 1987; 111:447-452
- 47 Dubow BE., Acherman AB. Ideas in pathology. Malignant melanoma in situ: the evolution of a concept. *Mod Pathol* 1990; 3:734-744
- 48 Eide IA, Angelsen A. Prostate-specific antigen. *Tidsskr Nor Laegeforen* 2000; 120: 2528-31

- 49 Ellis DL. Pregnancy and sex steroid hormone effects on nevi of patients with dysplastic nevus syndrome. *J Am Acad Dermatol* 1991; 25:467-482
- 50 Elsaesser O, Leiter U, Buettner P, Eigentler Th et al. Prognosis of sentinel node staged patients with primary cutaneous melanoma. *PLoS ONE* 2012; e29791
- 51 Espejel F, Roa JC. Surface enhanced laser desorption/ionisation (SELDI): proteomics technology and its application in oncology. *Med Clin* 2008; 131(8):312-7
- 52 Espina V, Mehta AI, Calvert V, Wulfkühle J, Perticoin EF 3rd, Liotta LA. Protein microarrays: molecular profiling technologies for clinical specimens. *Proteomics* 2003; 3:2091-2100
- 53 Findeisen P, Zapatka M, Pecarella T, Matzk H, Neumaier M, Schadendorf D, Ugurel S. Serum amyloid A as a prognostic marker in melanoma identified by proteomic profiling. *J Clin Oncol* 2009; 27:2199-208
- 54 Florenes VA, Maelandsmo GM, Faye R, Nesland JM, Holm R. Cyclin a expression in superficial spreading malignant melanomas correlates with clinical outcome. *J Pathol* 2001; 195:530-536
- 55 Foss AJ, Guille MJ, Occleston NT, Hykin PG, Flungedord JL, Lightman S. The detection of melanoma cells in peripheral blood by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Br J Cancer* 1995; 72:155-159
- 56 Francischetto T, Spector N, Neto Rezende JF, de Azevedo AM, de Oliviera RS, Small IA, Gil FC. Influence of sentinel lymph node tumor burden on survival in melanoma. *Ann Surg Oncol* 2010; 17:1152-8
- 57 Gadher SJ, Martinkova J, Drahos L, Vekey K, Allmaier G, Kovarova H. The third Central and Eastern European Proteomic Conference. *Expert Rev Proteomics* 2010; 7:15-7
- 58 Gallagher RP, McLean DI, Yang CP, Coldman AJ, Silver HKB, Spinelli JJ, Beagrie M. Suntan, sunburn, and pigmentation factors and the frequency of acquired melanocytic nevi in children. Similarities to melanoma: The Vancouver Mole Study. *Arch Dermatol* 1990; 126:770-776
- 59 Garrisi VM, Abbate I, Quaranta M, Mangia A, Tommasi S, Paradiso A. SELDI-TOF serum proteomics and breast cancer: which perspective? *Expert Rev Proteomics* 2008; 5:779-85
- 60 Garbe C, Blum A. Epidemiology of cutaneous melanoma in Germany and worldwide. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2001; 14:280-290
- 61 Garbe C, Büttner P, Bertz J et al. Primary cutaneous melanoma. Prognostic classification of anatomic location. *Cancer* 1995; 75:2492-2498

- 62 Garbe C, Drummer R, Kaufmann R, Tilgen W (Hrsg). Dermatologische Onkologie. Springer Verlag Berlin 1997. ISBN 3-540-61933
- 63 Garbe C, Eigentler TK, Bauer J, Blödorn-Schlicht N et al. Histopathol. Befundung maligner Melanome in Übereinstimmung mit der AJCC-Klassifikation 2009: Literaturübersicht und Empfehlungen zum praktischen Vorgehen. JDDG 2011; 9:690-700
- 64 Garbe C, Schaumburg-Lever G. Klinik und Histologie des malignen Melanoms. In: Garbe C, Drummer R, Kaufmann R, Tilgen W (Hrsg): Dermatologische Onkologie. 1997; Springer, Heidelberg, pp 247-270
- 65 Garbe C. Primäre Diagnostik, Ausbreitungsdiagnostik und Prognoseschätzung des malignen Melanoms. Onkologie 196; 2:441-448
- 66 Garbe C. Sonne und malignes Melanom. Hautarzt 1992; 43:251-257
- 67 Gauwerky KJ, Kunte C, Geimer T, Baumert J, Flaig MJ, Ruzicka T, Schmidt-Wendtner MH, Berking C. The outcome of patients with melanoma is not associated with the time point of lymphatic mapping with respect to excisional biopsy of the primary tumor. Dermatology 2010; 220: 355-62
- 68 Gillespie JW, Gannot G, Tangrea MA, Ahram M, Best CJ, Bichsel VE, Petricoin EF, Emmert-Buck MR, Chuaqui RF. Molecular profiling of cancer. Toxicol Pathol 2004; 32:67-71
- 69 Greene MH, Young TI, Clark Wh Jr. Malignant melanoma in renal-transplan recipients. Lancet 1981:1196-1999
- 70 Günther K, Fleischer R, Buettner R, Bosserhoff AK. Detection of invasion-related chromosomal changes in highly and weakly invasive melanoma cell clones by a modified comparative genomic hybridization approach. Melanoma Res 2001; 11:105-115
- 71 Häffner AC, Garbe C, Burg G, Büttner P, Orfanos CE, Rassner G. The prognosis of primary and metastasing melanoma. An evaluation of the TNM classification in 2495 patients. Br J Cancer 1992; 66:856-861
- 72 Hancock W, Apffel A, Chakel J, Hahnenberger K, Choudhary G, Traina JA, Pungor E. Integrated Genomic/Proteomic Analysis. Anal Chem 1999; 71:742a-748a
- 73 Haynes PA, Gygi SP, Figeys D, Aebersold R. Proteome analysis: biological assay or data archive? Electrophoresis 1998; 19:1862-1871
- 74 Herrmann PC, Liotta LA, Petricoin EF. Cancer proteomics: the state of the art. Disease Markers 2001; 17:49-57

- 75 Hersey P, Zhang XD. How melanoma cells evade trail-induced apoptosis. *Nature* 2001; 1:142-150
- 76 Hölzel D, Klamert A, Schmidt M. Krebs - Häufigkeiten, Befunde und Behandlungsergebnisse. W. Zuckerschwerdt München 1996. ISBN 3-886003-575-1
- 77 Hölzle E, Kind P, Plewig G, Burgdorf W. Malignant melanoma - diagnosis and differential diagnosis. Schattauer, Stuttgart 1993
- 78 Issaq HJ, Veenstra TD, Conrads TP, Felschow D. The SELDI-TOF MS approach to proteomics: protein profiling and biomarker identification. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002; 292:587-592
- 79 Jones MB, Krutsch H, Shu H, Zhao Y, Liotta LA, Kohn E, Petricoin EF 3rd. Proteomic analysis and identification of new biomarkers and therapeutic targets for invasive ovarian cancer. *Proteomics* 2002; 2:76-84
- 80 Kato T, Takematsu H, Tomita Y et al. Malignant melanoma of mucous membranes. *Arch Dermatol* 1987; 123:216-220
- 81 Kaufman R, Tilgen W, Garbe C. Malignes Melanom. In: Garbe C (Hrsg): Diagnostische und therapeutische Standards in der Dermatologischen Onkologie. Zuckschwert, München, 1998; pp33-57
- 82 Kim C, Reintgen DS, Yeatman TJ. The promise of microarray technology in melanoma care. *Cancer Control* 2002; 9:49-53
- 83 Kneisel L, Strebhardt K, Bernd A, Wolter M, Binder A, Kaufmann R. Expression of polo-like kinase (PLK1) in thin melanomas: a novel marker of metastatic disease. *J Cutan Pathol* 2002; 29:354-358
- 84 Koh H. Cutaneous melanoma. *New Engl J Med* 1991; 325:171-182
- 85 Kopf AW; Gross DF, Rogers GS, et al. Prognostic index for malignant melanoms. *Cancer* 1987; 59:1236-1241
- 86 Krieg RC, Fogt F, Braunschweig T, Herrmann PC, Wollscheidt V, Wellmann A. ProteinChip Array Analysis of Micodissected Colorectal Carcinoma and Associated Tumor Stroma Shows Specific Protein Bands in the 3.4 to 3.6 kDa Range. *Anticancer Research* 2004; 24:1791-1796
- 87 Krieg RC, Gaisa NT, Paweletz CP, Knuechel R. Proteomic analysis of human bladder tissue using SELDI approach following microdissection techniques. *Methods mol Biol* 2005; 293:255-267
- 88 Krieg RC, Knuechel R, Schiffmann E, Liotta LA, Petricoin EF, Herrmann PC. Mitochondrial proteome: Cancer-altered metabolism associated with cytochrome c oxidase subunit level variation. *Proteomics* 2004; 4:2789-2795

- 89 Krieg RC, Paweletz CP, Liotta LA, Petricoin EF. Clinical Proteomics for Cancer Biomarker Discovery and Therapeutic Targeting. *Technology in Cancer Research & Treatment* 2002; 4:1-10
- 90 Krieg RC, Uihlein D, Murthum T, Endlicher E, Hausmann F, Messmann H, Knuechel R. Improving the use of 5-Aminolevulinic Acid (ALA)-induced protoporphyrin IX (PRIX) for the gastrointestinal tract by esterification- an in vitro study. *Cell. Mol. Biol.* 2002; 48:917-923
- 91 Kunte C, Geimer T, Baumert J, Konz B, Volkenandt M, Flaig M, Ruzicka T, Berking C, Schmidt-Wendtner MH. Prognostic factors associated with sentinel lymph nodes positivity and effect of sentinel status on survival: analysis of 1049 patients with cutaneous melanoma. *Melanoma Res* 2020; 20:330-7
- 92 Kunte C, Geimer T, Baumert J, Konz B, Volkenandt M, Flaig M, Ruzicka T, Berking C, Schmidt-Wendtner. Analysis of predictive factors for the outcome of complete lymph node dissection in melanoma patients with metastatic sentinel lymph nodes. *J Am Acad Dermatol* 2011; 64:655-62
- 93 Krieg, R. Praktikumsanleitung für Biologen; Versuch 3: Proteomics in der onkologischen Forschung
- 94 Leitlinie Malignes Melanom, Vers. 15, 02/2005
- 95 Li J, Zhang Z, Rosenzweig J, Wang YY, Chan D. Proteomics and bioinformatics approaches for identification of serum biomarkers to detect breast cancer. *Clin. Chem.* 2002; 48:1296-1304
- 96 Li N, Mangini J, Bhawan J. New prognostic factors of cutaneous melanoma: a review of the literature. *J Cutan Pathol* 2002; 29:324-340
- 97 Liotta L, Petricoin E. Molecular profiling of human cancer. *Nat Rev Genet* 2000; 1:48-56
- 98 Liotta LA, Ferrari M, Petricoin E. Clinical proteomics: written in blood. *Nature* 2003; 425:905
- 99 Liotta LA, Kohn EC, Petricoin EF. Clinical Proteomics: personalized molecular medicine. *JAMA* 2001; 286: 2211-2214
- 100 Liotta LA, Petricoin EF. Serum peptidome for cancer detection: spinning biologic trash into diagnostic gold. *Journal of Clinical Investigation* 2006, 116:26-30
- 101 Lobo PA, Liebner Ej, Chao JJH, Kanji AM. Radiotherapy in the management of malignant melanoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1981; 7:21-6

- 102 Lotspeich F, Zorbas H (Hsrg). Bioanalytik. 1998; Spektrum Akadem. Verlag, Heidelberg, Berlin
- 103 Lowenthal MS, Metha AI, Frogale K, Bandle RW, Araujo RP, Hood BL, Veenstra TD, Conrads TP, Goldsmith P, Fishman D, Petricoin EF 3rd, Liotta LA. Analysis of albumin-associated peptides and proteins from ovarian cancer Patients. Clin Chem 2005; 51:1933-1945
- 104 Manual Maligne Melanome, Tumorzentrum München 2000
- 105 Marghoob AA, Schoenbach SP, Kopf AW, Orlow SJ, Nossa R, Bart RS. Large congenital melanocytic nevi and the risk for the development of malignant melanoma. A prospective study. Arch Dermatol 1996; 132:170-175
- 106 McGregor JM, Newell M, Ross J, Kirkham N, McGibbon DH, Darleys C. Cutaneous malignant melanoma and human immunodeficiency virus (HIV) infection: a report of three cases. Br J Dermatol 1992; 126:516-519
- 107 McGuire JN, Overgaard J, Pociot F. Mass spectrometry is only one piece in the puzzle in clinical proteomics. Brief Funct Genomic Proteomic 2008; 7:74-83
- 108 Mian S, Urugel 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; 23:5088-93
- 109 Mullner S, Neumann T, Lottspeich F. Proteomics - a new way for drug target discovery. Arzneimittelforschung 1998; 48:93-95
- 110 Nast-Kolb D, Landthaler M, Schweiberer L, Braun-Falco O. Anorektale Melanome. Chirurg 1985; 56:100-104
- 111 NIH Consensus Conference. Precursors to melanoma. JAMA 1984; 251:1864-1867
- 112 Norman J, Cruse CW, Wells KE, Saba HI, Reintgen DS. Metastatic melanoma with an unknown primary. Ann Plast Surg 1992; 28:81-84
- 113 Orfanos CE, Jung EG, Rassner G, Wolff HH, Garbe C. A112
Stellungnahme und Empfehlungen der Kommission malignes Melanom der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft zur Diagnostik, Behandlung und Nachsorge des malignen Melanoms der Haut. Hautarzt 1998; 45:285-291
- 114 Österlind A, Tucker MA, Stone BJ, Jensen OM. The Danish case-control study of cutaneous malignant melanoma. II. Importance of UV-light exposure. Int J Cancer 1988; 42:319-324

- 115 Ostmeier H, Fuchs B, Otto F, Mawick R, Lippold A, Krieg V, Suter L. Can immunohistochemical markers and mitotic rate improve prognostic precision in Patients with primary melanoma? *Cancer* 1999; 85:2391-2399
- 116 Ostmeier H, Fuchs B, Otto F, Mawick R, Lippold A, Krieg V, Suter L. Prognostic immunohistochemical markers of primary human melanomas. *British Journal of Dermatology* 2001; 145:203-209
- 117 Pappin D. Peptide mass fingerprinting using MALDI-TOF mass spectrometry. *Methods Mol Biol* 1997; 64:165-73
- 118 Paul E, Mullhofer R. Das metastasierende Melanom bei unbekanntem Sitz des Primärtumors. *Hautarzt* 1990; 41:432-437
- 119 Paweletz CP, Liotta LA; Petricoin EF 3rd. New technologies for biomarker analysis of prostate cancer progression: Laser capture microdissection and tissue proteomics. *Urology* 2001; 57:160-163
- 120 Petres J, Kunze J, Müller RPA (Hrsg). *Onkologie der Haut*. Grosse Verlag Berlin 1984. ISBN 3-88040-038-5
- 121 Petricoin E, Wulfskuhle J, Espina V, Liotta LA. Clinical proteomics: revolutionizing disease detection and patient tailoring therapy. *J Proteome Res* 2004; 3:209-217
- 122 Petricoin EF, Ardekani AM, Hitt BA, Levine PJ, Fusaro VA, Steinberg SM, Mills GB, Simone C, Fishman DA, Kohn EC, Liotta LA. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet* 2002; 359:572-577
- 123 Petricoin EF, Liotta LA. SELDI-TOF-based serum proteomic pattern diagnostics for early detection of cancer. *Curr Opin Biotechnol* 2004; 15:24-30
- 124 Petricoin EF, Ornstein DK, Paweletz CP, Ardekani A, Hackett PS, Hitt BA, Velasco A, Trucco C, Wiegand L, Wood K, Simone CB, Levine PJ, Linehan WM, Emmert-Buck MR, Steinberg SM, Kohn EC, Liotta LA. Serum proteomic patterns for detection of prostate cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 2002; 94:1576-1578
- 125 Piris A, Mihm MG, Duncan LM. AJCC melanoma staging update: impact on dermatopathology practice and patient management. *J Cutan Pathol* 2011
- 126 Pollock PM, Trent JM. The genetics of cutaneous melanoma. *Clinics in Laboratory Medicine* 2000; 20:667-690
- 127 Ragazzi E, Vogliardi S, Allegri G, Costa CVL, Lise M, Rossi CR, Seraglia R, Traldi P. Cluster analysis of serum proteins in malignant cutaneous

- melanoma: search for disease markers. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2003; 17:1511-1515
- 128 Rasokat H, Steigleder GK, Bendick C, Müller S, Meller M. Malignes Melanom und HIV-Infektion. *Z Hautkr* 1989; 64:581-587
- 129 Reed JA, Albino AP. Update of diagnostic and prognostic markers in cutaneous malignant melanoma. *Clinics in Laboratory Medicine* 2000; 20:817-838
- 130 Ridgeway CA., Hieken TJ., Ronan SG:, Kim DK., Das Gupta TK. Acral lentiginous melanoma. *Arch Surg* 1995; 130:88-92
- 131 Rigel DS., Friedman FJ. The rationale of the ABCDs of early melanoma. *J Am Acad Dermatol* 1993; 29:1060-1061
- 132 Rosenblatt KP, Bryant-Greenwood P, Killian JK, Metha A, Geho D, Espina V, Petricoin EF 3rd, Liotta LA. Serum proteomics in cancer diagnosis and management. *Annu Rev Med* 2004; 55:97-112
- 133 Ruiter DJ, Spatz A, van den Oord JJ, Cook MG. Microstaging in cutaneous melanoma. *J Pathol* 2001; 195:525-529
- 134 Ruiter DJ, Spatz A, van den Oord JJ, Cook MG. Pathologic Staging of Melanoma. *Seminars in Oncology* 2002; 29:370-381
- 135 Rütger TM, Bröcker EB. Genetische Faktoren bei der Entstehung und Progression maligner Melanome. *Hautarzt* 1995; 46:394-399
- 136 Schmid-Wendtner MH, Baumert J, Schmidt M, Plewig G, Volkenandt M, Hölzel D. Prognostic index for cutaneous melanoma: an analysis after follow-up of 2715 patients. *Melanoma Research* 2001; 11:619-626
- 137 Schmoeckl C, Braun-Falco O. Prognostic index in malignant melanoma. *Arch Dermatol* 1978; 114:871-873
- 138 Schwamborn K, Cuprioli RM. Molecular imaging by mass-spectrometry – locking beyond classical histology. *Nat Rev Cancer* 2010; 10:639-46
- 139 Schwamborn K, Krieg RC, Grosse J, Reulen N, Weiskirchen R, Knuechel R, Jakse G, Henkel C. Serum proteomic profiling in patients with bladder cancer. *Eur Urol* 2009; Mar 6
- 140 Schwamborn K, Krieg RC, Reska M, Jakse G, Knuechel R, Wellmann A. Identifying prostate carcinoma by MALDI-Imaging. *International Journal of Molecular Medicine* 2007; 20:155-159
- 141 Shina P, Kohl S, Fischer J, Hütter G, Kern M, Köttgen E, Dietel M, Lage H, Schnölzer M, Schadendorf D. Identification of novel proteins associated with the development of chemoresistance in malignant

- melanoma using two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 2000; 21:3048-3057
- 142 Sidransky D. Emerging molecular markers of cancer. *Nature* 2002; 2:210-219
- 143 Srinivasan R. Ablation of polymers and biological tissue by ultraviolet lasers. *Science* 1986; 234:667-669
- 144 Stenman UH, Leinonen J, Zhang WM, Finne P. Prostate-specific antigen. *Semin Cancer Biol* 1999; 9:83-93
- 145 Stolz W, Landthaler M. Klassifikation, Diagnostik und Differentialdiagnostik des malignen Melanoms. *Chirurg* 1994; 64:145-152
- 146 Stolz W, Schmoeckel C, Landthaler M, Braun-Falco O. Association of early malignant melanoma with nevocytic nevi. *Cancer* 1989; 63:550-555
- 147 Thomas JM. Sentinel lymph node biopsy in patients with thin melanoma. *BMJ* 2008; 336:902-3
- 148 Tilgen, W. Adjuvante und palliative Therapie des Melanoms. *Chirurg* 1994; 65:153-163
- 149 Tronnier M, Garbe C, Bröcker EB, Stadler R, Steinkraus V, Soyer HP, Wolff HH. Standards der histopathologischen Diagnose maligner Melanome. *Hautarzt* 1997; 48:720-729
- 150 Tyers M, Mann M. From genomics to proteomics. *Nature* 2003; 422:193-197
- 151 Voigt H, Kleeberg UR (Hrsg). *Malignes Melanom*. Springer Verlag Heidelberg 1986. ISBN 3-540-15377-2
- 152 Volkenandt M., Schmidt M., Konz B., Gummer M., Hein R., Plewig G., Hölzel D. Klinisch-epidemiologische Daten von Patienten mit malignen Melanomen aus dem Bereich des Tumorzentrums München von 1977 bis 1997. *Hautarzt* 1999; 50:470-478
- 153 Voss N, Kim SC. Radiotherapy in the treatment of dermatologic malignancies. *Dermatol Clin* 1998; 16:313-320
- 154 Vuylsteke RJ, Borgstein PJ, van Leeuwen PA, Gientema HA et al. Sentinel lymph node tumor load: an independent predictor of additional lymph node involvement and survival in melanoma. *Ann Surg Oncol* 2005; 12:440-8
- 155 Wang E, Marincola FM. A natural history of melanoma: serial gene expression analysis. *Viewpoint immunology today* 2000; 21: 619-623

- 156 Wang E, Miller LD, Ohnmacht GA, Mocellin S, Perez-Diez A, Petresen D, Zhao Y, Simon R, Powell JI, Asaki E, Alexander HR, Duray PH, Herlyn M, Restifo NP, Liu ET, Rosenberg SA, Marincola FM. Prospective molecular profiling of melanoma metastases suggests classifiers of immune responsiveness. *Cancer Research* 2002; 62:3581-3586
- 157 Weinstock MA, Colditz GA, Willett WC, Stampfer MJ, Bronstein BR, Mihm MC, Speozer FE. Nonfamilial cutaneous melanoma incidence in women associated with sun exposure before 10 years of age. *Pediatrics* 1989; 84:199-204
- 158 Westphal G, Burgemeister R, Friedemann G et al. Noncontact laser catapulting: a basic procedure for functional genomics and proteomics. *Methods Enzymol* 2002; 356:80-99
- 159 Wilson LL, Tran L, Morton DL, Hoon DS. Detection of differentially expressed proteins in early-stage melanoma patients using SELDI-ToF mass-spectrometry. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1022:317-22
- 160 Wiltshire RN, Duray P, Bittner ML, Visakorpi T, Meltzer PS, Tuthill RJ, Liotta LA, Trent JM. Direct visualization of the clonal progression of primary cutaneous melanoma: application of tissue microdissection and comparative genomic hybridization. *Cancer research* 1995; 55:3954-3957
- 161 Wlotzke U, Hohenleutner U, Hein R, Szeimies RM, Landthaler M. Maligner infiltrierender blauer Nävus vom Plaque-Typ. Fallbericht und Übersicht. *Hautarzt* 1995; 46:860-864
- 162 Wölfler MM, Krieg RC, Braunschweig T, Rath W, Wellmann A. Proteomics - neue Möglichkeiten zur Diagnose gynäkologischer und geburtshilflicher Erkrankungen. *Geburtsh Frauenheilk* 2007; 67:7-10
- 163 Wright BE, Scheri RP, Ye X, Faries MB et al. Importance of sentinel lymph node biopsy in patients with thin melanoma. *Arch surg* 2008; 143:892-9
- 164 Yazdi AS, Puchta U, Flaig MJ, Sander CA. Laser capture microdissection: applications in routine molecular dermatopathology. *J Cutan Pathol* 2004; 31:465-470

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: T-Klassifikation nach Balch et al. 2009 [13].....	11
Tabelle 2: N-Klassifikation nach Balch et al. 2009 [13]	11
Tabelle 3: M-Klassifikation nach Balch et al. 2009 [13].....	13
Tabelle 4: Stadieneinteilung des malignen Melanoms [Balch et al. 2009] [13].....	14
Tabelle 5: Empfehlungen für die Nachsorge kutaner maligner Melanome (Intervalle in Monaten) [Garbe & Schadendorf 2003, [94]].....	19
Tabelle 6: Patientenkollektiv Melanompatienten	26
Tabelle 7: Spezielle Daten Gruppe 1 (Melanom-abhängig verstorben)	27
Tabelle 8: Spezielle Daten Gruppe 2 (Tumor-unabhängig verstorben oder zum heutigen Zeitpunkt noch am Leben)	28

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Summenspektrum, Beispiel	37
Abbildung 2:	Abhängigkeit der Flugzeit von der Masse (m/z-Darstellung); relative Verteilung der Proteine in Abhängigkeit von ihrer Größe und Ladung	38
Abbildung 3:	Graphische zweidimensionale Darstellung des Auswertungsalgorithmus: rot = Melanome, grün = Lymphome	39
Abbildung 4:	Melanome vs. Lymphome; Einzelergebnisse Cross Validation und Recognition Capability	39
Abbildung 5:	Massenspektren: Abhängigkeit der Flugzeit von der Masse (m/z-Darstellung); relative Verteilung der Proteine in Abhängigkeit von ihrer Größe und Ladung	41
Abbildung 6:	Graphische zweidimensionale Darstellung des Auswertungsalgorithmus: rot = Melanome, grün = alle anderen Erkrankungen	41
Abbildung 7:	Darstellung der Einzelergebnisse für Cross Validation und Recognition Capability	42
Abbildung 8:	Massenspektren: Abhängigkeit der Flugzeit von der Masse (m/z-Darstellung); relative Verteilung der Proteine in Abhängigkeit von ihrer Größe und Ladung	43
Abbildung 9:	Graphische zweidimensionale Darstellung des Auswertungsalgorithmus: rot = letale Melanome , grün = überlebte Melanome	44
Abbildung 10:	Melanome lebt gegen verstorben; Einzelergebnisse Cross Validation und Recognition Capability	44

10 Danksagung

Ich möchte Herrn Prof. Dr. Christian Sander und Herrn Professor Dr. med. Dr. h.c. Thomas Ruzicka, Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig-Maximilians-Universität München, für die Ermöglichung dieser Studie herzlich danken.

Mein Dank gilt ebenso Herrn PD Dr. Michael Flaig für die Überlassung des Themas, die geduldvolle Betreuung meiner Arbeit, die vielen Hinweise und Ratschläge sowie die Durchsicht der Arbeit.

Bedanken möchte ich mich auch besonders bei Herrn PD Dr. rer. nat. Rene Krieg für die umfangreiche technische und freigiebige Unterstützung.

Frau Ursula Puchta und allen Mitarbeitern der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwigs-Maximilians-Universität München, die mir bei der Beschaffung der Arbeitsmittel behilflich waren und mir immer weitergeholfen haben, danke ich.

Dank geht auch an meine ganze Familie, die immer für mich da war und mich unterstützt und begleitet hat.

Meinem Mann und meinen Kindern möchte ich von Herzen für ihre Unterstützung und Geduld danken. Sie haben mich immer wieder motiviert und mir die nötige Ausdauer gegeben.