

Prognostische Bedeutung der Dynamik zirkulierender tumorverdächtiger Zellen beim malignen Melanom

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae Dr. med.

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich- Schiller-Universität Jena

von Thomas Stauch
geboren am 29.07.1980 in Jena

Gutachter

1. Prof. Dr. med. Andreas Hochhaus
2. PD Dr. med. Oliver Frey
3. Prof. Dr. med. Martin C. Müller

Tag der öffentlichen Verteidigung: 02.06.2015

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	1
2	Zusammenfassung	3
3	Einleitung	5
3.1	Malignes Melanom	5
3.1.1	Definition	5
3.1.2	Epidemiologie und Ätiologie	6
3.1.3	Stadien und Prognose	7
3.1.4	Metastasierung	11
3.1.5	Diagnostik	11
3.1.6	Therapie	14
3.2	Zirkulierende Tumorzellen	18
3.2.1	Geschichte und klinische Bedeutung	18
3.2.2	Aktuelle Nachweisverfahren	20
4	Zielstellung	24
5	Material und Methoden	25
5.1	Patientenkollektiv	25
5.2	Labordiagnostische Methodik	27
5.3	Detektion der zirkulierenden tumorverdächtigen Zellen	27
5.4	Statistische Methodik	30
6	Ergebnisse	31
6.1	Kasuistik 1	31
6.2	Überleben der Patienten	32
6.3	Korrelationen der einzelnen Messwerte	33

6.4	Zusammenhang zwischen den Zellzahlen und dem Verlauf der Tumorerkrankung.....	34
6.5	Perioperative Analyse	37
6.5.1	Übersicht	37
6.5.2	Kasuistik 2: Perioperative Messwerte.....	39
6.6	Zellzahlveränderungen der palliativ behandelten Patienten.....	41
6.6.1	Übersicht	41
6.6.2	Kasuistik 3: Palliativ behandelter Patient.....	42
6.6.3	Überlebensraten.....	44
6.7	Therapieansprechen der metastasierten Patienten	45
6.7.1	Übersicht	45
6.7.2	Kasuistik 4: Patient mit Fernmetastasen	45
6.8	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	47
7	Diskussion.....	49
8	Schlussfolgerungen.....	55
9	Literaturverzeichnis	57
10	Anhang.....	73
10.1	Lebenslauf.....	73
10.2	Danksagung	74
10.3	Ehrenwörtliche Erklärung	75

1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
AJCC	American Joint Committee on Cancer
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V.
bzw.	beziehungsweise
cm	Zentimeter
CT	Computertomographie
d	Tage
DTIC	Dimethyl-trizeno-imidazol-Carboxamid (Dacarbazin)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMA	European Medicines Agency (Arzneimittelzulassungsbehörde)
EPCAM	Epithelial Cell Adhesion Molecule
FDA	Food and Drug Administration (Arzneimittelzulassungsbehörde)
GEM	2',2'-Difluordesoxycytidin (Gemcitabin)
HEA	Human epithelial antigen
IL	Interleukin
IU	Internationale Einheit
kg	Kilogramm
l	Liter
LDH	Lactatdehydrogenase
LMM	Lentigo maligna Melanom
LSC®	Laser Scanning Cytometrie
M	Fernmetastasen
MART 1	melanoma-associated antigen recognized by T-cells
Mel A	Melan A
mg	Milligramm
M+H	Melan A + HEA - Färbung

MHC	major histocompatibility complex
MIA	melanoma inhibitory activity
mm	Millimeter
m ²	Quadratmeter
mRNA	messenger Ribonucleic acid (Boten-Ribonukleinsäure)
MRT	Magnetresonanztomographie
MTS	Metastase
N	Befall der Lymphknoten
ng	Nanogramm
NM	Noduläres Melanom
n.s.	nicht signifikant
OP	Operation
p	Signifikanzniveau
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
pH	pondus hydrogenii, Wasserstoffionenkonzentration
PR	Partielle Remission
pT	Histopathologische Klassifikation des Tumors
Rad	Radiatio (Bestrahlung)
REZ	Rezidiv
RT-PCR	Reverse Transkription Polymerase-Kettenreaktion
SD	Stabile Erkrankung
SSM	Superfiziell spreitendes Melanom
u.a.	unter anderem
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
UV	Ultraviolettstrahlung
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
z.B.	zum Beispiel

2 Zusammenfassung

Der wichtigste prognostische Faktor bei soliden Tumoren ist die hämatogene und lymphogene Streuung und die daraus folgende Metastasierung. Das gilt auch für das maligne Melanom. Für das frühe Stadium der Erkrankung beträgt die 10-Jahres-Überlebensrate 75-85%, das 5-Jahres-Überleben für Patienten mit Fernmetastasen beträgt ca. 20%. Ein Tumorprogress wird bei 1/3 aller Patienten, die an einem primären Melanom erkrankt sind, beobachtet. Die aktuelle Leitlinie der AWMF (Pflugfelder et al. 2013) empfiehlt in der initialen Ausbreitungsdiagnostik, neben der konventionellen radiologischen Diagnostik, die Bestimmung des Tumormarkers S100 und der Aktivität der LDH. Weitere Serummarker, wie beispielsweise MIA und andere, zur Abschätzung von Langzeitverläufen können bisher nicht standardisiert empfohlen werden. Auch moderne diagnostische Verfahren zum Nachweis zirkulierender Tumorzellen beim malignen Melanom konnten bisher keine eindeutige Verbesserung der Prognosebewertung bewirken. Derzeit existieren verschiedene Methoden zur Zellzahlbestimmung, wie das Immunzytometrie-basierte Cell Search System und der Nachweis mittels RT-PCR. Eine neuartige Methode zur Messung zirkulierender Tumorzellen im Blut ist das MAINTRAC[®]-Verfahren. Hiermit wurden seit 2005 zirkulierende Tumorzellen beim Mammakarzinom, Schilddrüsenkarzinom und Bronchialkarzinom bestimmt. Insbesondere beim Mammakarzinom konnte gezeigt werden, dass ein Anstieg der Anzahl zirkulierender Tumorzellen mit einem ungünstigen Verlauf korreliert ist.

Fragestellung und Ziele:

In der hier vorgestellten Arbeit wurde der Nachweis und die Quantifizierung tumorverdächtiger epithelialer Zellen im peripheren Blut von Patienten mit Malignem Melanom und der Zusammenhang mit dem validierten Tumormarker S100, der Therapie und dem Krankheitsverlauf im Hinblick auf die Progression der Erkrankung untersucht. Mit dem MAINTRAC[®]-Verfahren werden vitale epitheliale tumorverdächtige Zellen mithilfe von fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen die Oberflächenmarker EPCAM und MelanA, mit Erythrolyse ohne Anreicherung unter den gesamten weißen Blutzellen nachgewiesen und automatisiert mithilfe von Bildanalyse quantifiziert. Von Dezember 2002 bis November 2011 wurden von 99

Patienten insgesamt 396 peripher-venöse Blutproben entnommen. 30 Mal erfolgte die erste Blutentnahme vor der Exzision des Primärtumors, in allen weiteren Fällen im Median 13 Monate (Bereich 1 - 241 Monate) nach der Primärdiagnose im Rahmen der Tumornachsorge bzw. der Interferon-alpha- oder Chemotherapie. Die Messwerte von 61 Männern und 38 Frauen im medianen Alter von 62 (18-85) Jahren für EPCAM positive Zellen, Mel A positive Zellen, M+H positive Zellen und S100-Proteine wurden zusammen mit den klinischen Daten zu Tumorstadium, Behandlung und Verlauf in eine SPSS®-Datei übertragen.

Ergebnisse und Diskussion

Alle nicht-okkulten Melanome wurden chirurgisch entfernt, bei 13, 47 und 20 Patienten erfolgte zusätzlich eine Strahlen-, Interferon-alpha- oder Chemotherapie in adjuvanter oder in palliativer Intention. Jeweils 25, 37, 28 bzw. 2 Patienten wurden den TNM-Stadien I, II, III und IV zugeordnet. 1, 2, 3, 4, 5 bzw. 6 Messwerte lagen von 99, 98, 87, 59, 33 bzw. 22 Patienten vor. Die mediane Zellzahl der EPCAM-positiven Zellen war bei den 176 Messpunkten mit Tumornachweis im Mittel signifikant höher als bei den 220 Messungen ohne Tumornachweis. Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Menge der zirkulierenden EPCAM positiven Zellen und dem Tumorstadium konnte nicht festgestellt werden. Ebenso zeigte die Therapie keinen signifikanten Einfluss auf die gemessenen Zellzahlen der EPCAM positiven Zellen. Der Median der gemessenen Zellzahlen der EPCAM positiven Zellen bei 50 Patienten mit einem Rezidiv-Tumor im Verlauf lag deutlich höher als bei den 49 nach der Primärtherapie stets tumorfreien Patienten. Aufgrund der starken Streuung der Messwerte erreichten die Differenzen nicht zu allen Messzeitpunkten statistische Signifikanz.

Schlussfolgerung

Mit MAINTRAC® wurde die Anzahl zirkulierender tumorverdächtiger Zellen im Blut bei Patienten mit Malignen Melanom bestimmt. Es konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Tumorlast und der Anzahl zirkulierender Zellen im Blut gezeigt werden. Ob die Methode im Einzelfall zur Früherkennung von Tumorrezidiven geeignet ist, lässt sich anhand der vorliegenden Daten nicht abschließend feststellen.

3 Einleitung

3.1 Malignes Melanom

3.1.1 Definition

Das maligne Melanom ist ein von den Melanozyten ausgehender bösartiger Tumor, der sich primär überwiegend an der Haut manifestiert. Weiterhin wurden Melanome der Augen, insbesondere der Uvea, der Konjunktiva und des Ziliarkörpers, der Meningen und verschiedener Schleimhäute beschrieben. Gewöhnlich ist das Melanom stark pigmentiert, es treten aber auch amelanotische Formen auf.

Die relative ungünstige Prognose beruht auf der Tendenz, frühzeitig Metastasen auszubilden. Das maligne Melanom ist für etwa 90 % der Mortalität an kutanen Tumoren verantwortlich.

Klinisch und histopathologisch lassen sich vier verschiedene Subtypen des Melanoms unterscheiden (McGovern et al. 1973). Das superfiziell spreitende Melanom, welches die häufigste Form darstellt, beginnt mit einem intraepidermalen, horizontalen oder radialen Wachstumsphase. Es manifestiert sich als unscharf begrenzter und unregelmäßig pigmentierter Fleck, welcher sich langsam zu einer Plaque entwickelt. Der Häufigkeitsgipfel ist jenseits des 50. Lebensjahrs. Histologisch charakteristisch ist die pagetoide Ausbreitung der malignen Melanozyten am intraepidermalen Tumor-Randbereich.

Im Kontrast dazu imponiert das noduläre Melanom primär knotig, exophytisch, braunschwarz, oft erosiv-blutig. Charakteristisch ist eine aggressive vertikale Phase. Die horizontale Wachstumsphase fehlt oder ist nur sehr kurz ausgeprägt, so dass eine frühzeitige Erkennung in einem intraepidermalen Stadium oft unmöglich ist. Es tritt gehäuft ab dem 55. Lebensjahr auf.

Das Lentigo-maligne-Melanom (LMM) entsteht oft erst nach Jahren aus einer Lentigo maligna, zu über 90% lokalisiert in der von der Sonne geschädigten

Gesichtshaut älterer Menschen. Es wächst zunächst vor allem radial und horizontal. Sein Aussehen ist durch große, teils erhabene, unregelmäßige Flecken gekennzeichnet. Es wächst recht langsam und erst nach Jahren vertikal, weshalb es eine relativ günstige Prognose hat.

Das Aussehen des akrolentiginösen Melanoms ähnelt dem Aussehen des LMM, es wächst aber deutlich schneller und aggressiver. In der frühen intraepidermalen Phase ist es charakterisiert von irregulärer Pigmentierung. Später signalisieren die knotigen Anteile das invasive Wachstum. Meist ist dieser Tumor an den Handflächen beziehungsweise Fußsohlen, aber auch unter den Nägeln lokalisiert.

Weiterhin existieren noch verschiedene sehr seltene Varianten des Melanoms. Klinische Sonderformen sind zum Beispiel die desmoplastischen, amelanozytären und polypoiden Melanome, die weniger als 5% der Fälle repräsentieren.

3.1.2 Epidemiologie und Ätiologie

Weltweit ist ein rapider Anstieg der Inzidenz des malignen Melanoms in der weißen Bevölkerung zu beobachten. Diese Zunahme ist, mit Ausnahme der Lungenkrebsentität bei Frauen, die schnellste aller malignen Neoplasien (Ries et al. 2000). Die höchsten Inzidenzraten werden wegen der reduzierten Ozon-Konzentration der Stratosphäre aus Australien (50-60 Fälle auf 100000) und Süd-Amerika berichtet (Garbe, 2001). Die Inzidenzraten in Deutschland sind signifikant niedriger. Dabei war ein Anstieg der Fälle, bezogen auf 100000 Einwohner, von 3 auf 21 pro Jahr zu verzeichnen (Kaatsch P 2012). In den Krebsstatistiken der Vereinigten Staaten von Amerika wird eine vergleichbare Verdreifachung der Inzidenz von 6 auf 18 während der letzten drei Dekaden angegeben (Garbe, 2009).

Das Verhältnis von an Melanom erkrankten Frauen zu Männern differiert im Ländervergleich. In Ländern mit einer hohen Inzidenzrate sind mehr Männer betroffen, (Marks, 2002) wohingegen in Ländern mit einer niedrigen Inzidenzrate

mehr Frauen an Melanom erkranken (Mackie, 2002). In Deutschland veränderte sich das Verhältnis durch das Ansteigen der Inzidenz in den letzten Dekaden. Waren in den 1970er Jahren etwa 2/3 der Melanom-Patienten Frauen, so war die Geschlechterverteilung in den 1990er Jahren nahezu ausgeglichen (Buettner, 2005).

Ungefähr 5-10% aller malignen Melanome treten, infolge einer polygenetisch vermittelten Disposition, familiär gehäuft auf. Individuen, mit einer großen Anzahl an Nävuszellnävi, angeborenem Nävi oder dysplastischen Nävi, haben ein erhöhtes Risiko an einem Melanom zu erkranken (Holly, 1987; Bauer, 2003).

Die UV-Strahlung ist als wichtigster exogener Risikofaktor anerkannt. Hierbei ist vor allem die wiederholte akute UV-Belastung mit UV-A und UV-B auf nicht vorgebräunter Haut von entscheidender Bedeutung (de Vries, 2003; Jhappan, 2003). Da auch an nicht sonnenexponierten Hautarealen und Schleimhäuten die Erkrankungszahl an malignen Melanomen zugenommen hat, kann das UV-Licht nicht als alleinige Ursache verantwortlich gemacht werden.

Als weitere Kofaktoren werden toxische, medikamentöse oder endokrine Ursachen diskutiert. Außerdem ist bekannt, dass immunkompromittierte Patienten häufiger als immunkompetente Personen Melanome entwickeln.

Ein malignes Melanom geht zu 60 % aus einem seit langen bestehenden Nävuszellnävi hervor. Zu 20% entstehen maligne Melanome auf gesunder Haut. Weitere 10% entwickeln sich aus einer melanotischen Präkanzerose (Lentigo), die erst nach vielen Jahren bis Jahrzehnten in ein malignes Melanom übergeht.

3.1.3 Stadien und Prognose

Etwa 90% der Melanome werden als primäre Tumoren diagnostiziert, ohne Nachweis von Metastasen. Für dieses frühe Stadium beträgt die 10-Jahres-Überlebensrate 75-85% (Garbe et al. 2010). Ein Tumorprogress wird bei 1/3 aller Patienten, die an

einem primären Melanom erkrankt sind, beobachtet (Reintgen et al. 1992, Soong et al. 1998, Cohn-Cedermark et al. 1999, Fusi et al. 1993, Markowitz et al. 1991).

In großen Patientenkollektiven wurde belegt, dass die Tumordicke den wichtigsten Faktor für die Entstehung von Metastasen darstellt (Leiter et al. 2004, Garbe et al. 2002). Dabei nimmt das Risiko einer Metastasenentwicklung bis zu einer Tumordicke von 6mm nahezu linear zu (Buettner et al. 1997). Die vertikale Tumordicke wird mit einem optischen Mikrometer gemessen und nach dem Pathologen Alexander Breslow eingeteilt.

Die TNM – Klassifikation der AJCC aus dem Jahr 2009 (Balch et al. 2009) umfasst als weitere Kriterien, den metastastatischen Befall der Lymphknoten (N) und das Vorhandensein von Fernmetastasen (M).

Tabelle 1: Stadieneinteilung des Melanoms nach (Long et al. 2012)

	Primärtumor	Regionale Lymphknoten)	Fernmeta- stasen (M)
Stadium 0	In Situ Tumor	Keine	keine
Stadium IA	T1a <= 1mm; keine Ulzeration	keine	keine
Stadium IB	T1b <= 1mm; mit Ulzeration T2a >1 - 2 mm; ohne Ulzeration	Keine	keine
Stadium IIA	T2b >1 - 2 mm; mit Ulzeration T3a >2 - 4 mm; ohne Ulzeration	Keine	keine
Stadium IIB	T3b >2 – 4 mm; mit Ulzeration T4a >4 mm; ohne Ulzeration	Keine	keine
Stadium IIC	T4b >4 mm; mit Ulzeration	Keine	Keine
Stadium IIIA	Jede Tumordicke, ohne Ulzeration	Mikrometastasen	keine
Stadium IIIB	Jede Tumordicke, mit Ulzeration Jede Tumordicke, ohne Ulzeration Jede Tumordicke ± Ulzeration	Mikrometastasen Bis zu 4 Makrometastasen Keine, aber Satelliten ± in- transit-Metastasen	keine
Stadium IIIC	Jede Tumordicke, mit Ulzeration Jede Tumordicke, ± Ulzeration	Bis zu 4 Makrometastasen 4 oder mehr Makrometassen, oder kapselüberschreit ende LK- Metastasen , oder Satelliten ± in- transit-Metastasen mit LK-Beteiligung	keine
Stadium IV	Jedes Tumordicke	Jedes N	Fernme- tastase

Eine weitere Einteilung folgt den anatomischen Schichten der Haut. Entsprechend wird diese in 5 Level (I-V) angegeben. Aus der regional unterschiedlichen Dicke und Struktur von Epidermis und Kutis ergibt sich, dass in dünner Haut schon kleine

Tumore ein Level V erreichen, in dicker Haut noch sehr große Tumoren ein Level IV aufweisen können.

Die Überlebenswahrscheinlichkeit differiert grundlegend und ist dabei abhängig von der Lokalisation der Metastasen mit einem 5-Jahres-Überleben von 55% für lokale Metastasen, 51% für regionale Lymphknoten-Metastasen und 20% für Fern-Metastasen (Manola et al. 2000).

Für das primär metastasierte Melanom ergibt sich eine schlechte Prognose mit einer medianen Überlebenszeit von 6-8 Monaten und einem 5-Jahres-Überleben von 5-6% (Tafra et al. 1995, Barth et al. 1995, Roses et al. 1991). Jedoch wird das mediane Überleben von subkutanen, intradermalen und Lungenmetastasen mit bis zu 2 Jahren angegeben, wohingegen Patienten mit Leber-, Knochen- und Gehirnetastasen selten länger als 6-8 Monate überleben (Balch 1992, Barth et al. 1995). Weiterhin gelten, die Geschwindigkeit des Tumorwachstums, das männliche Geschlecht, ein schlechter Performance-Status sowie die erhöhte Serum-Laktat-Dehydrogenase als wesentliche Faktoren für eine schlechte Prognose (Manola et al. 2000, Presant und Bartolucci 1982).

Tabelle 2: M-Klassifikation für Fernmetastasen nach (Long et al. 2012)

M-Klassifikation	Typ der Fernmetastasen	LDH-Level
M1a	Haut, subkutanes Gewebe oder Lymphknoten	Normal
M1b	Lunge	Normal
M1c	Alle anderen Fernmetastasen	Erhöht

3.1.4 Metastasierung

Der wichtigste prognostische Faktor bei soliden Tumoren, darüber besteht Einigkeit in der Literatur, ist die hämatogene und lymphogene Streuung und die daraus folgende Metastasierung (Glaves 1983, Pachmann et al. 2001, Riethdorf et al. 2008, Pantel et al. 2008, Eccles und Welch 2007).

Beim malignen Melanom wurden drei Metastasierungs-Wege beschrieben: (i) Satelliten-Metastasen, (ii) regionale Lymphknoten-Metastasen oder (iii) die direkte Fernmetastasierung. Etwa 50% der Erstmetastasierung sind regionale Lymphknoten-Metastasen, 20% sind lokale-, Satelliten- oder In-transit-Metastasen und circa 30% sind Fernrezidive (Meier et al. 2002, Soong et al. 1998). Satelliten-Metastasen werden definiert als Metastasen im Abstand von 2 cm um den Primärtumor und In-transit-Metastasen als kutane oder subkutane Metastasen zwischen dem Primärtumor und der regionären Lymphknotenstation. Direkte Fernmetastasen können im Median nach 25 Monaten nachgewiesen werden, obgleich regionale Lymphknotenmetastasen im Median nach 16 Monaten manifestieren (Meier et al. 2002). Eine Besonderheit ist dabei die Häufigkeit (28%) an Herzmetastasen die auf das maligne Melanom zurückzuführen sind (Bussani et al. 2007).

3.1.5 Diagnostik

Das klinische Erscheinungsbild des Melanoms unterscheidet sich entsprechend des jeweiligen Subtyps. Die A-B-C-D Regel ist nützlich zur Beurteilung von suspekten Pigmentläsionen.

- A - **Asymmetrie** des Aufbaus
- B – **Begrenzung** unregelmäßig
- C – **Colorit** (Färbung) inhomogen
- D – **Durchmesser** größer 5mm

Die Sensitivität wird von erfahrenen Dermatologen mit etwa 70% angegeben. Zur weiteren Abklärung der Pigmentläsionen ist die Dermatoskopie hilfreich. In einer Meta-Analyse wurde gezeigt, dass Experten durch die Verwendung dieser Technik eine Sensitivität von 89% erreichen (Kittler et al. 2002). Die sequenzielle digitale Dermatoskopie erweitert die Methode um die digitale Speicherung und Analyse. In verschiedenen Studien konnten im Vergleich zur Dermatoskopie eine weitere Verbesserung der Sensitivität gezeigt werden (Haenssle et al. 2006). Beide Verfahren werden in der aktuellen S3-Leitlinie „Malignes Melanom“ mit einem Evidenzlevel von 1b oder 2b in der Primärdiagnostik empfohlen (Pflugfelder et al. 2013).

Suspekte Pigmentläsionen bedürfen zwingend einer histologischen Diagnostik. Das maligne Melanom ist sowohl klinisch als auch histologisch schwierig zu diagnostizieren. Deshalb ist es erforderlich, die Probe von einem in der histologischen Beurteilung von pigmentierten Hautveränderungen erfahrenen Dermatopathologen analysieren zu lassen. Dabei sollte der histopathologische Primärbefund folgende Information beinhalten:

- Diagnose und den pathologischen Melanomtyp
- die Tumordicke in mm nach Breslow
- Ulzerationen
- seitliche und tiefe Exzisionsgrenzen
- Mitoserate bei Tumordicke < 1mm (Azzola et al. 2003)

Bei unklarer histologischer Diagnose, amelanotischen Tumoren oder vermuteten Melanommetastasen können immunophänotypische Verfahren (S100 Protein, HMB-45 Antigen, Melan A und MIB-1 als Proliferationsmarker) hilfreich sein (Garbe et al. 2007). Die Ausbreitungsdiagnostik beim asymptomatischen Patienten vom Stadium IB bis Stadium IIB umfasst die regionale Lymphknotenultraschalluntersuchung und die Bestimmung des Proteins S100.

Weitere Untersuchungen können in den lokalen Stadien anhand der S3-Leitlinie nicht empfohlen werden.

Im Stadium IIC-III (lokoregionäre Metastasierung) werden ein Magnetresonanztomogramm des Kopfes, eine Schnittbildgebung (Ganzkörper ohne Kopf), die Lymphknotenultraschalluntersuchung sowie die Untersuchungen auf S100 und LDH, im Stadium IV (fernmetastasiertes Stadium) zusätzlich noch die Skelettszintigraphie und die Abdomensonographie, sowie bei potentiell resektablen Metastasen eine PET-CT-Diagnostik, empfohlen.

Zusätzlich wird ab dem Stadium IIIB die molekularpathologische Diagnostik auf BRAF-V600E-Mutationen, welche bei etwa 50% der Melanompatienten nachweisbar sind (Goel et al. 2006), sowie bei akralen und mukosalen Melanomen auf c-kit-Mutationen, welches bei etwa 5% der Melanompatienten nachweisbar sind, angeraten. Durch die Aktivierung des RAF-MEK-ERK-Signaltransduktionsweges oder der Tyrosinkinase KIT werden Angiogenese, Tumorentwicklung- und Progression gesteuert.

Eine entsprechend der Mutation gerichtete Behandlung kann sehr gute objektive Ansprechraten, die denen einer standardisierten Chemotherapie deutlich überlegen sind, aufzeigen (Chapman et al. 2011, Carvajal et al. 2011).

N-RAS-Mutationen lassen sich in circa 15% der Melanome nachweisen. Bei aktuell nicht zugelassener therapeutischer Interaktion wird eine standardisierte Testung nicht empfohlen.

3.1.6 Therapie

Die Therapie umfasst die drei wesentlichen Säulen: operative Entfernung des Tumors, Strahlen- und medikamentöse Therapie.

Die primäre Behandlung des Melanoms ist die chirurgische Exzision (Roberts et al. 2002). Nach der exzisionalen Biopsie sollte innerhalb von 4-6 Wochen die endgültige chirurgische Exzision, mit entsprechend dem Breslow-Index empfohlenem Sicherheitsabstand, erfolgen.

Tabelle 3: Empfohlene Exzisionsabstände nach (Garbe et al. 2012)

Tumordicke (Breslow)	Exzisionsabstand (cm)
In situ	0,5
≤ 2mm	1
> 2mm	2

Die Entfernung der tiefen Faszie führt nicht zu einer Verbesserung des Gesamtüberlebens (Kenady et al. 1982). Internationalen Empfehlungen folgend wird ab einer Tumordicke von 1mm, nach präoperativer Lymphoszintigraphie, der erstdrainierende Lymphknoten („sentinel lymph node“) entfernt und histologisch und immunologisch untersucht (Morton et al. 1992). Bei metastatischem Befall wird die Ausräumung der gesamten Lymphknoten-Station befürwortet (Morton et al. 1991). Solitäre Metastasen können, auch wiederholt, exstirpiert werden.

Die alleinige Strahlentherapie spielt in der primär-kurativen und adjuvanten Therapie aktuell keine Rolle mehr, wird jedoch bei palliativer Fragestellung, insbesondere schmerzhafter Skelettmetastasen, multipler Hirnmetastasen oder regional disseminierter Hautmetastasen, zur Symptomkontrolle durchgeführt. Bei isolierten, inoperablen Hirnmetastasen sollte zunächst eine stereotaktische

Konvergenzbestrahlung erfolgen. Eine Ganzhirnbestrahlung ist bei multiplen Hirnmetastasen die ultima ratio.

Die adjuvante Chemotherapie hat in einer Vielzahl von Studien keinen therapeutischen Vorteil gezeigt, so dass außerhalb von Studien keine Empfehlung gegeben werden kann (Garbe et al. 2008). Aktuell wird eine risikoadaptierte adjuvante Interferon α - Therapie bei Patienten mit einer Tumordicke größer als 1,5 mm empfohlen. In einer von Garbe publizierten Metaanalyse wurde diesbezüglich ein signifikanter Vorteil im krankheitsfreien Überleben und ein Trend zur Verbesserung des Gesamtüberlebens aufgezeigt (Garbe und Eigentler 2007). Möglicherweise stellt pegyliertes Interferon alpha eine Alternative zur bisherigen Therapie dar. Allerdings sind weitere Vergleichs-Studien erforderlich (Bottomley et al. 2009).

Im metastasierten Stadium (Stadium IV) ohne Möglichkeit einer operativen Kuration besteht die Indikation einer medikamentösen Therapie. Der Algorithmus wird zum einen durch das Vorliegen von molekularpathologischen Mutationen, zum anderen durch die Höhe der Tumorlast beeinflusst. Über 3 Jahrzehnte hatte es keinen großen Fortschritt in der systemischen Therapie des metastasierten Melanoms gegeben. Die systemische Standardtherapie war die Chemotherapie mit Dacarbazin. Seit 2011 wurden von der FDA und der EMA die Immuntherapie mit Ipilimumab, die BRAF-Inhibitoren Vemurafenib und Dabrafenib sowie der MEK-Inhibitor Trametinib zur Erstlinientherapie bei fortgeschrittenem Melanom zugelassen. Bei einer niedrigen Tumorlast sollte die Option einer Immuntherapie mit Ipilimumab geprüft werden. Dieser sogenannte Immun-Checkpoint-Inhibitor ist ein über eine CTLA-4-Blockade wirkenden T-Zellaktivator. In einer Phase III Studie konnte bei inoperablen vorbehandelten Patienten im Stadium III-IV eine signifikante Verlängerung des Gesamtüberlebens von 6,4 auf 10,1 Monate aufgezeigt werden (Hodi et al. 2010). Die Zulassung einer Immuntherapie mit Ipilimumab besteht sowohl als Monotherapie als auch in Kombination mit Dacarbazin.

Bei Patienten mit einer hohen Tumorlast und Nachweis einer BRAF-Inhibitor-sensitiver BRAF-Mutation wird zu einer BRAF-Inhibitor-Therapie geraten. Mutationen

im BRAF Onkogen sind bei ungefähr 50% der Melanom-Patienten nachweisbar. Dabei liegen etwa 95% als BRAF V600E- oder V600K –Mutationen vor. Diese Mutationen aktivieren MEK (MEK1 und 2; Tyrosin/Threonin Kinasen). Dies führt zu Phosphorylierung und Aktivierung von Mitogen aktivierende Kinasen (MAPK), die unter anderem an der Regulation der Embryogenese, der Zelldifferenzierung, des Zellwachstums und des programmierten Zelltodes Anteil haben. In einer Phase-III Studien mit Vemurafenib, einem selektivem Inhibitor der BRAF^{V600E}-Kinaseinhibitor, konnte ein im Vergleich zu Dacarbazin um 43% höheres objektives Ansprechen von 48% (Chapman et al. 2011), in einer weiteren Phase-III Studie mit Dabrafenib, einem unselektiven Inhibitor einiger Subgruppen der BRAF-Kinasen, ein um 45% höheres objektives Ansprechen von 50% aufgezeigt werden (Hauschild et al. 2012). Weiterführend konnten signifikant höhere Überlebensraten nach 6 Monaten dargestellt werden.

Ein weiterer Therapieansatz ist die selektive Inhibition der MEK1 und MEK2-Aktivierung und Kinaseaktivität durch Trametinib. In einer Phase III Studie konnte bei Patienten mit metastasiertem Melanom und nachgewiesener BRAF^{V600} Mutation eine signifikante Verlängerung des progressionsfreien Überlebens und des Gesamtüberlebens gegenüber einer Chemotherapie mit Dacarbazin oder Paclitaxel gezeigt werden (Flaherty et al. 2012).

Die Dauer des Ansprechens der Therapie mit Inhibitoren der BRAF-Kinasen oder des MEK-Signalweges ist durch die Ausbildung von Resistenzmechanismen meist auf ca. 5-7 Monate eingeschränkt. In der aktuellen Forschung werden Kombinationen von BRAF-Kinase Inhibitoren und Inhibitoren der MEK untersucht. So konnte in einer Phase I/II Studie eine signifikante Verlängerung des progressionsfreien Überlebens von 5,8 auf 9,4 Monate gezeigt werden, welches zu einer Zulassung der Kombinationstherapie durch die FDA im Januar 2014 führte. Die Kombination wird aktuell in Phase III Studien untersucht.

Der Nachweis der BRAFV600E Mutation konnte auch an zirkulierenden Melanomzellen (CMC) erbracht werden. So gelang bei 85% der Patienten mit

histologisch nachgewiesen BRAFV600E mutierten Melanom der immunozytometrische Nachweis der BRAFV600E Mutation anhand CMCs (Hofman et al. 2013). Aus dieser Arbeit lässt sich folgern, dass zirkulierende Melanomzellen als Verlaufsparemeter und Therapiesurrogatparameter einer modernen Therapie, wie der in dieser Arbeit untersuchten Hemmung des BRAF/MEK Signalweges, dienen können.

Bei Melanom-Patienten mit KIT-Mutationen, welche bei etwa 1-5% der Patienten beobachtet werden, wurde eine Gesamt-Ansprechrare von 23,3% unter Imatinib in einer Phase-II Studie beschrieben (Guo et al. 2011).

Für Patienten mit großer Tumorlast und ohne das Vorliegen von o.g. molekularbiologische Mutationen besteht die Option einer konventionellen Chemotherapie. Da die Behandlung primär palliativen Aspekten folgt, sind die therapeutischen Bemühungen im Hinblick auf die Erhaltung der Lebensqualität kritisch abzuwägen. Im Stadium IV wird ein komplettes Ansprechen der Therapie sehr selten beobachtet, so dass zwei andere Hauptziele der systemischen Therapie vordergründig sind:

- die Verlängerung des Überlebens
- die Verminderung der Tumor-Größe oder -Last und damit einer Verlängerung der symptomfreien Zeit oder eine Verminderung der Symptome

Die am besten untersuchte und etablierte Monochemotherapie ist Dacarbazin (DTIC) mit Ansprechraren von 10-12% (Middleton et al. 2000). Bei Hirnmetastasen werden die liquorgängigen Chemotherapeutika Fotemustin oder Temozolamid eingesetzt.

Die Kombination von Zytostatika und Zytokinen als auch die Kombination von verschiedenen Zytostatika oder Zytokinen erhöht die Ansprechraren im Vergleich zu Monotherapien. Allerdings konnte keine Studie eine Verbesserung des Gesamtüberlebens demonstrieren (Eigentler et al. 2003).

Polychemotherapie-Protokolle bieten höhere Ansprechraten, ohne dass eine signifikante Verlängerung des Gesamtüberlebens gezeigt werden konnte. In einem 7 randomisierten Studien umfassenden Review zum Vergleich von verschiedenen Polychemotherapie-Protokollen mit Dacarbazin aus dem Jahre 2003, konnte keine Verlängerung des Gesamtüberlebens bei deutlich vermehrter Toxizität erreicht werden. Als Standardtherapie sind daher Polychemotherapien nicht zu empfehlen.

Tumorvakzinations- und Gentherapieprotokolle sowie Therapien mittels tumorinfiltrierender Lymphozyten und Lymphokin-aktivierender Killerzellen sind aktuell in der klinischen Erprobung. Weiterhin sind weitere Signalwege, wie zum Beispiel der PI3/AKT - Signalweg, Angiogenese-Faktoren sowie das Hitzeschock-Protein 90 (HSP90), das Ziel von klinischen Studien. Ergebnisse werden in den nächsten Jahren erwartet.

Weiterführend sollte ein Einschluss von Patienten in adjuvanter Situation oder im metastasierten Stadium in klinische Studien stets geprüft werden.

3.2 Zirkulierende Tumorzellen

3.2.1 Geschichte und klinische Bedeutung

Die Prävention disseminierter Erkrankungen würde einen großen Fortschritt in der Verbesserung von Morbidität und Mortalität darstellen. Zum Prozess der Metastasierung werden disseminierte Tumorzellen erzeugt, welche, vom Primärtumor ausgehend, zu weiteren Lokalisationen streuen (Bluemke et al. 2009).

Disseminierte Tumorzellen im Blut, so genannte *zirkulierende Tumorzellen*, können bei Patienten mit soliden Tumoren nachgewiesen werden (Pantel et al. 2008, Beitsch und Clifford 2000, Zach et al. 1999, Mocellin et al. 2006, Pachmann et al. 2001). Bereits vor über einem Jahrhundert wurden Tumorzellen im Leichenblut erkannt (Ashworth 1869). Auch über den sporadischen Nachweis von Tumorzellen im

strömenden Blut finden sich in der älteren Literatur Angaben (Ward 1918, Schleip 1906, Marcus 1917). Zur weiteren Optimierung der Nachweisverfahren suchte man nach Methoden, die eine Anreicherung eventuell vorhandener Tumorzellen ermöglichen sollten. Zunächst von Paraffinserienschnitten des Blutes gemäß den histologischen Techniken (Pool 1934, Engell 1955) über hämatologische Verfahren mit Sedimentierung der Erythrozyten und anschließenden Zentrifugieren oder Filtrieren (Moore 1957, Spriggs 1959) bis zu den sogenannten Flotationsverfahren, bei denen sich die spezifisch leichteren Tumorzellen nach dem Zentrifugieren an der Oberfläche des Flotationsmediums sammelten (Seal 1956). Allerdings wurden quantitativ sicher verwertbare Ergebnisse durch diese Techniken nicht ausreichend geliefert. Bei den Untersuchungen von Pool und Dunlop (Pool 1934) an 40 Patienten mit fortgeschrittenen Krebsleiden, wurden in 17 von diesen Tumorzellen festgestellt. Moore (Moore 1957) gelang eine Identifikation von Tumorzellen in 93 (52%) von 179 Fällen.

Während die ersten Untersuchungen zu zirkulierenden Tumorzellen im Leichenblut und histologischen Schnitten durchgeführt wurden, werden heute zum einen mit immunozytochemischen Analysen epitheliale oder Tumor-assoziierte Antigene (Gebauer et al. 2001, Pantel et al. 2008, Pachmann et al. 2001), zum anderen PCR-basierte Analysen zum Nachweis von tumorzellenspezifischen Gentranskripten, (Datta et al. 1994, Schoenfeld et al. 1997, Smith et al. 2000) verwendet.

In verschiedenen Studien konnte nachgewiesen werden, dass epitheliale Zellen im Blut (Brandt et al. 1996, Martin et al. 1998, Pachmann et al. 2005b) und Knochenmark (Forus et al. 1999, Muller et al. 1996) bei Tumorpatienten vorhanden sind. Braun (Braun et al. 2005) stellte fest, dass die Anwesenheit von Tumorzellen im Knochenmark mit einer schlechten Prognose assoziiert ist. Jedoch war eine Beurteilung des Krankheitsverlaufs und des Erfolgs einer therapeutischen Intervention, auf Grund ihrer langen Überlebenszeit und Therapieresistenz, nicht ausreichend möglich (Braun et al. 2000).

In longitudinalen Studien über die Anzahl im Blut zirkulierender epithelialer Zellen konnte hingegen die Korrelation mit der Tumorlast und dem Therapieansprechen aufgezeigt werden (Terstappen et al. 2000, Pachmann et al. 2005a). Fehm (Fehm et al. 2002) verglich die Aneusomie vom Primärtumor mit denen der zirkulierenden Epithelzellen und schlussfolgerte, dass eine Vielzahl der zirkulierenden epithelialen Zellen vom Primärtumor abgeleitet sind. Die biologische Bedeutung dieser Zellen wird aber noch sehr unterschiedlich betrachtet. Pretlow (Pretlow et al. 2000) konnte in tierexperimentellen Studien durch Injektion von zirkulierenden Tumorzellen Metastasenwachstum induzieren. Allerdings entwickeln sich nur aus einem geringen Anteil Metastasen (Chambers et al. 2000). Ein zeitlicher Zusammenhang zwischen Zellinjektion und Metastasenbildung kann noch nicht hergestellt werden.

3.2.2 Aktuelle Nachweisverfahren

Durch verschiedene Fortschritte in immunologischen Techniken und quantitativen real-time PCR (q-PCR) - Analysen ist es möglich, eine zirkulierende Tumorzelle in 10^6 - 10^7 normalen Blutzellen nachzuweisen (Pantel et al. 2008).

In der Verwendung der quantitativen PCR wurden in mehreren Veröffentlichungen, technische Probleme mit validen Detektionen beschrieben (Zheng et al. 2007, van Houten et al. 2000, Benoy et al. 2006). Darüber hinaus variiert das Expressionslevel aller bekannten Marker-Gene sowohl zwischen Tumoren von verschiedenen Patienten als auch zwischen Zellen desselben Tumors. Diese Heterogenität führte zur Entwicklung von multiplen mRNA - Markern (Xi et al. 2007). Die Suche nach dem spezifischsten Marker ist derzeit noch nicht abgeschlossen. Auch ist das Problem bekannt, dass dieses hoch sensitive Verfahren zu falsch-positiven Ergebnissen führen kann.

In unserer Arbeitsgruppe wurde mit Hilfe der Laser Scanning Cytometrie (LSC®), eine Methode erforscht, die quantitative und qualitative Erfassung auch geringster Mengen tumorverdächtiger Zellen im Blut zu ermöglichen (Pachmann et al. 2001,

Pachmann et al. 2005b). Die LSC® kombiniert den geringen Zeitaufwand der Fluss-Zytometrie mit der Potenz, jedes positive Event auf dessen Eigenschaften zu überprüfen. Dabei können in 30 Minuten bis zu 50.000 Zellen analysiert werden. Der erfolgreiche Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen wurde beim Mamma- und Lungenkarzinom mittels LSC® bereits erfolgreich durchgeführt (Pachmann et al. 2005b). Um die klinische Relevanz zirkulierender Tumorzellen im peripheren Blut besser beurteilen zu können, sind Untersuchungen zusätzlicher Tumorentitäten nötig.

In der vorliegenden Arbeit wurden dazu das panepitheliale Antigen EPCAM (epithelial cell adhesion molecule), das spezifische melanozytäre transmembrane Antigen Melan A und das S100-Protein zur Identifizierung der zirkulierenden Tumorzellen herangezogen.

Das S100-Protein hat ein niedriges Molekulargewicht von 21 kDa und ist ein thermolabiles Calcium-bindendes Protein, dessen Name sich von der Löslichkeit in 100% gesättigtem Ammoniumsulfat bei neutralen pH-Wert ableitet (Jackel et al. 1999).

Das Molekül besteht aus zwei Untereinheiten, α und β , wobei alle drei Kombinationen (S-100 $\alpha\alpha$, S-100 $\alpha\beta$, S-100 $\beta\beta$) möglich sind. Es sind 21 verschiedenen S100-Proteine bekannt, die nahezu alle in einem engen Gen-Cluster auf Chromosom 1q21 kodiert sind. Das S100-Protein wird auf einer Vielzahl von Geweben exprimiert, so z.B. in Gliazellen, Schwann'schen Zellen, Herzmuskelzellen, und Melanomzellen. Es wird davon ausgegangen, dass es an verschiedenen Prozessen, wie der Beweglichkeit, Exo- und Endozytose, Proteinsynthese, Membranpermeabilität und Apoptose (Schafer und Heizmann 1996) beteiligt ist.

Beim Melanom korreliert die β -Untereinheit sowohl mit der Invasivität, als auch mit den verschiedenen Stadien der Erkrankung (Kaskel et al. 1999). In einer Vielzahl an Studien wurde weiterhin nachgewiesen, dass das S100 - Serumlevel mit dem Ausmaß der Metastasierung (Schultz et al. 1998), mit der Tumoraktivität (Seregini et

al. 1998) und mit der Rezidiv-/ Progress-Wahrscheinlichkeit sowie dem Überleben (Hauschild et al. 1999), korreliert. Zum immunhistochemischen Nachweis werden routinemäßig polyklonale Antikörper eingesetzt. Die Sensitivität wird dabei, abhängig vom klinischen Stadium, zwischen etwa 50% (Stadium III) und etwa 75% (Stadium IV) angegeben (Juergensen et al. 2000).

Das humane epitheliale Zelladhäsionsmolekül (EPCAM), auch als KS1/4, gp40, GA733-2, 17-1A, und TROP-1 benannt, ist ein homophiles, in der lateralen Zellmembran von Epithelzellen vorkommendes, Ca^{2+} -unabhängiges Adhäsionsmolekül (Litvinov et al. 1994), das von einer Vielzahl epithelialer, vor allem adenomatöser Gewebe exprimiert wird. Es wird codiert vom GA733-2 Gen auf Chromosom 4. Man vermutet eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung und Wachstum von epithelialen Zellen. Die in vivo Expression ist verbunden mit einer verstärkten epithelialen Proliferation und korreliert negativ mit der Zelldifferenzierung. Balzar berichtete, dass eine Neoplasie bzw. Karzinogenese dieser Gewebe jedoch mit einer starken Überexpression dieses Moleküls assoziiert ist (Balzar et al. 1999). Went (Went et al. 2004) analysierte 131 verschiedene Tumorarten und fand bei 98 eine EPCAM-Überexpression. Der Grad der Dysplasie dieser Karzinome korrelierte dabei mit der EPCAM-Proteinmenge (Litvinov et al. 1996).

Melan A oder MART-1 wurde von zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander, zur gleichen Zeit, durch die Nutzung von zytolytischen T-Lymphozyten, entwickelt (Chen et al. 1996, Kawakami et al. 1997). Es gehört zur Gruppe der Differenzierungs-Antigene, wie auch die Tyrosinase, gp100 und gp75. Es ist ein spezifisches melanozytäres transmembranes Antigen, welches aus 118 Aminosäuren besteht.

Die Protein-Expression beim metastasierten Melanom wurde sowohl mit immunochemischen als auch mit PCR-Techniken nachgewiesen (Hofbauer et al. 1998, Fetsch et al. 1997). Hofbauer (Hofbauer et al. 1998) gibt eine Sensitivität von 88% in Formalin fixierten primären und metastasierten Melanomen an. Dabei war eine Abnahme der Sensitivität entlang des Tumorstadiums auffällig (100% bei Stadium I gegenüber 75% bei Stadium IV). Außer in Melanozyten wurde Melan A in

steroidproduzierendem Gewebe, Klarzelltumoren der Lunge und Angiomyolipomen nachgewiesen (Stewart et al. 2000, Coulie et al. 1994).

4 Zielstellung

Ziel dieser Arbeit ist der immunfluorimetrische Nachweis zirkulierender Tumorzellen im peripheren-venösen Blut bei Patienten mit malignem Melanom.

Es wird analysiert, in wie fern EPCAM und Melan A mit dem Nachweisverfahren der Laser Scanning Cytometrie (LSC[®]) als Marker für zirkulierende tumorverdächtige Zellen verwendet werden können. Ferner wird analysiert, wie sich die Zellzahlen unter adjuvanter und palliativer Therapie ändern und ob sich Korrelationen mit dem Oberflächenprotein S100 ergeben.

Desweiteren wird untersucht, ob sich das Risiko für das Auftreten von Rezidiven oder Metastasen im weiteren Verlauf der Erkrankung durch Änderung der Zellzahl zirkulierender Tumorzellen ableiten lässt.

5 Material und Methoden

5.1 Patientenkollektiv

Von Dezember 2002 bis November 2011 wurden von 99 Patienten, die sich in der Melanomsprechstunde ambulant vorstellten bzw. sich in stationärer Betreuung in der Klinik für Hautkrankheiten der Friedrich-Schiller-Universität Jena befanden, insgesamt 421 peripher-venöse Blutproben entnommen. Den Patienten wurde nach Aufklärung über den Zweck der Analyse, mit ihrem Einverständnis, 20ml peripher-venöses entnommen. Auf Grund des retrospektiven Charakters dieser Arbeit, der sie als Beobachtungsstudie klassifiziert, erfolgten die Messungen dabei nicht zu fest definierten Messzeitpunkten, sondern richteten sich nach den jeweiligen Verlaufskontrollen des malignen Melanoms im Rahmen der ambulanten oder stationären Vorstellung.

Die zustimmende Bewertung durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der FSU Jena erfolgte am 13.09.2002.

Tabelle 4 zeigt die klinischen Daten und der Nachbeobachtungszeitraum der 99 untersuchten Patienten.

Tabelle 4: Klinische Daten und Nachbeobachtungszeitraum

	Parameter	Anzahl
Alter (Jahre)	Median (Range)	65 (18 – 85)
Geschlecht	männlich	62
	weiblich	38
pT- Kategorie Primärtumor	T1/T2	43
	T3/T4	48
	TX	8
pN- Kategorie Primärtumor	N0	67
	N+	29
	NX	3
M- Kategorie Primärtumor	M0	93
	M1	6
Lokalisation des Primärtumors	Haut	91
	Rektum	1
	Paranasal	1
	Vulva	1
	Penis	1
	Okular	1
	Okkult	3
Rezidiv im Beobachtungszeitraum	nein	49
	ja	50
Todesursache	Lebend	61
	Malignes Melanom	31
	Andere	5
	Unbekannt	2
Beobachtungszeitraum (Monate)	Median (Range)	56 (4 - 294)

Die wesentlichen Merkmale der 99 Patienten sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Dabei fällt insbesondere auf, dass bei der primären Diagnose 93 Patienten ein nicht-metastasiertes Stadium aufwiesen. Je 98, 85, 59, 33 und 22 Patienten wurden zweimal, dreimal, viermal, fünfmal oder sechsmal untersucht. Im Verlauf der Beobachtung (Mediane Nachbeobachtungszeit 56 Monate, Range 4 – 294 Monate) blieben 49 Patienten immer tumorfrei, bei 50 zeigte sich ein Tumorrezidiv. 12 Patienten wurden über 10 Jahre ab Diagnosezeitpunkt beobachtet.

5.2 Labordiagnostische Methodik

In der Klinik für Hautkrankheiten des Universitätsklinikums Jena wurden, nach schriftlicher Einwilligung den Patienten, 8 ml venöses EDTA-antikoaguliertes Blut entnommen. 1 ml Blut wurde mit 9 ml Erythrozyten-Lyse-Puffer versetzt. Anschließend wurde die Probe exakt nach 10 min bei Raumtemperatur, 10 min bei 1200 Umdrehungen pro Minute und 14 °C zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde verworfen und das zurückbleibende Zellpellet, mit den darin befindlichen Tumorzellen und Leukozyten, mit 500 µl PE-Puffer (Phosphat-EDTA-Puffer) resuspendiert. Anschließend wurden 100 µl der Resuspension aufgenommen, in ein Mikrotube pipettiert und 2,5 µl EPCAM-Antikörper und 2 µl Mel-A-PE hinzugefügt. Die Proben wurden für 15 min bei 4 C im Kühlschrank inkubiert. Folgend wurden die Proben mit je 455 µl PE-Puffer aufgefüllt. Abschließend wurden 20 µl Zellsuspension und 160 µl PE auf einem Objektträger aufgetragen.

5.3 Detektion der zirkulierenden tumorverdächtigen Zellen

Die automatische Detektion der auf dem Objektträger aufgetragenen markierten Tumorzellen erfolgte durch das Laser-Scanning-Cytometer (LSC® CompuCyte Cambridge Mass). Das Laser-Scanning-Cytometer (LSC) von CompuCyte basiert auf einem BX50 Fluoreszenzmikroskop von Olympus. Die von einem Argon-Ionen-Laser (488 nm) erzeugten Laserstrahlen werden über einen oszillierenden Spiegel abgelenkt und tasten den zu untersuchenden Bereich auf dem Objektträger ab. Der Nachweis der Zellen erfolgte in der von uns verwendeten Methode über fluorchrommarkierte Antikörper an vitalen Zellen.

Durch Vorwärtsstreulicht wurden die auf dem Objektträger befindlichen Zellen detektiert. Über Areale von 0,5 µm wurde die Intensität jeder Zelle punktförmig gemessen und als Pixel gespeichert (ca. 200 Messungen pro Zelle).

In dem aufgezeigten x-y-Koordinatensystem (Abbildung 1) repräsentierte jeder weiße Punkt eine Zelle. Die Intensitätsverteilung ist in der rechten Punktwolke dargestellt.

Die Intensitätswerte konnten als maximale Intensität oder als Integral der über die Zelle gemessenen Intensität dargestellt werden. Gleichzeitig ist jede Zelle mit einem bestimmten Intensitätswert einzeln relokalisier- und mikroskopierbar. Damit werden nur vitale Zellen mit einer Oberflächenfluoreszenz gezählt (Pachmann et al. 2001). Die Verteilung der Zellen bezüglich der Fluoreszenz-Intensität wurde in einem Histogramm dargestellt.

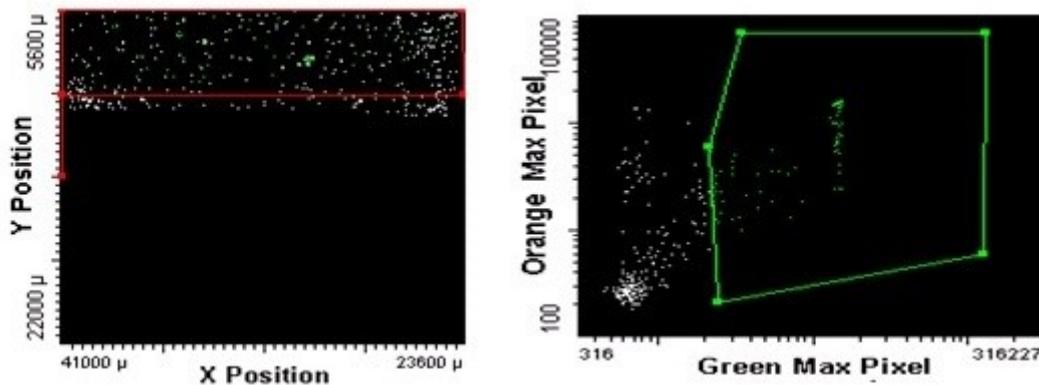


Abbildung 1: Typisches Histogramm von Melan A- und EPCAM-Antikörper markierter Zellen in der Laser Scanning Cytometrie. Mit freundlicher Genehmigung Pachmann (Pachmann et al. 2008).

Der überwiegende Anteil der Zellen waren Blutzellen, v.a. Leukozyten, die EPCAM negativ und Melan A negativ sind. Zellen, die das humane epitheliale Zelladhäsionsmolekül (EPCAM) aufweisen, sind in Abbildung 2 hervorgehoben.

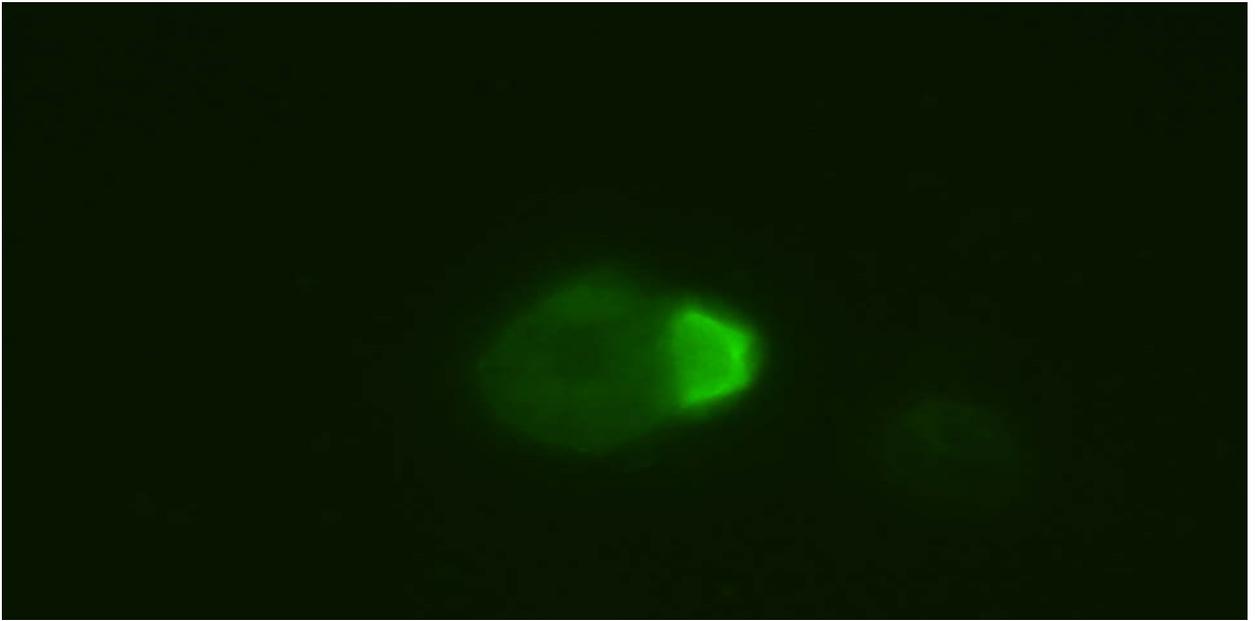


Abbildung 2: Vitale epitheliale Zellen zeigen eine typische kappenförmige Oberflächenmarkierung von grüner (EPCAM positive Zellen) Fluoreszenz („Cap“).

Zeitgleich zu den Messungen der Zellzahlen erfolgte 376 Mal auch eine Messung des Tumormarkers S100. Die gemessenen Zellzahlen und die Werte des Tumormarkers S100 wurden mit den klinischen Daten zu Tumorstadium, Behandlung und Verlauf, welche aus dem Klinischen Krebsregister des UniversitätsTumorCentrums Jena und aus den Patientenunterlagen der Klinik für Hautkrankheiten gewonnen wurden, in Excel in tabellarischer Form eingearbeitet.

5.4 Statistische Methodik

Verteilungsunterschiede wurden mittels χ^2 -Test (Exakter Test nach Fisher, zweiseitig) oder dem Mediantest unabhängiger Stichproben auf statistische Signifikanz geprüft. Beobachtete Überlebensraten wurden nach Kaplan-Meier berechnet. Als Ereignis wurde der Tod jeder Ursache gewertet, Startpunkt war der Diagnosezeitpunkt, Endpunkt das Todesdatum oder das Datum der letzten Beobachtung im Jahr 2014. Der Einfluss der Merkmale auf das beobachtete 5-Jahres-Überleben wurde mittels Log-rank-Test geprüft. Ein statistisch signifikanter Einfluss wurde bei $p < 0,05$ angenommen. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels SPSS V20.

6 Ergebnisse

6.1 Kasuistik 1

In der Abbildung 3 wird ein typischer Zellzahlverlauf und Tumormarker S100 – Verlauf bei einer Patientin unter multimodaler Therapie dargestellt. Die Erstdiagnose erfolgte im Juli 2004. Ein malignes Melanom der Wange im Stadium IIIc (pT4N3M0) wurde mit Nachresektion im August 2004 operiert. Postoperativ war ein Anstieg der EPCAM positiven Zellen zu verzeichnen. Es traten mehrere Rezidive im Beobachtungszeitraum von 1132 Tagen auf. Im August 2005 erfolgte die Operation von Satellitenmetastasen sowie im August 2006 die Lungenteilresektion bei pulmonalen Metastasen. Bei erneutem Progress der Erkrankung, einhergehend mit einem Anstieg der EPCAM positiven und Mel A positiven Tumorzellen, erfolgte vom September bis November 2006 die Chemotherapie mit DTIC. Unter dieser Therapie stiegen die Zellzahlen weiter an und die Patientin erlitt im November 2006 einen Progress der Erkrankung. Es erfolgte die Umstellung der Therapie auf Gemcitabin/Treosulfan. Initial zeigte sich ein Abfall der Zellzahlen und darauffolgend ein leichter Wiederanstieg bis zum erneuten Progress im April 2007. Vor dem tumorbedingten Tod der Patientin war ein Anstieg des Tumormarkers S100 zu beobachten. Insgesamt zeigten die Zellzahlverläufe von EPCAM und M+H jeweils einen Anstieg im Bezug zum Progress. Allerdings ist auch die insgesamt hohe Zahl der zirkulierenden Tumorzellen im Vergleich zu anderen untersuchten Patienten auffällig.

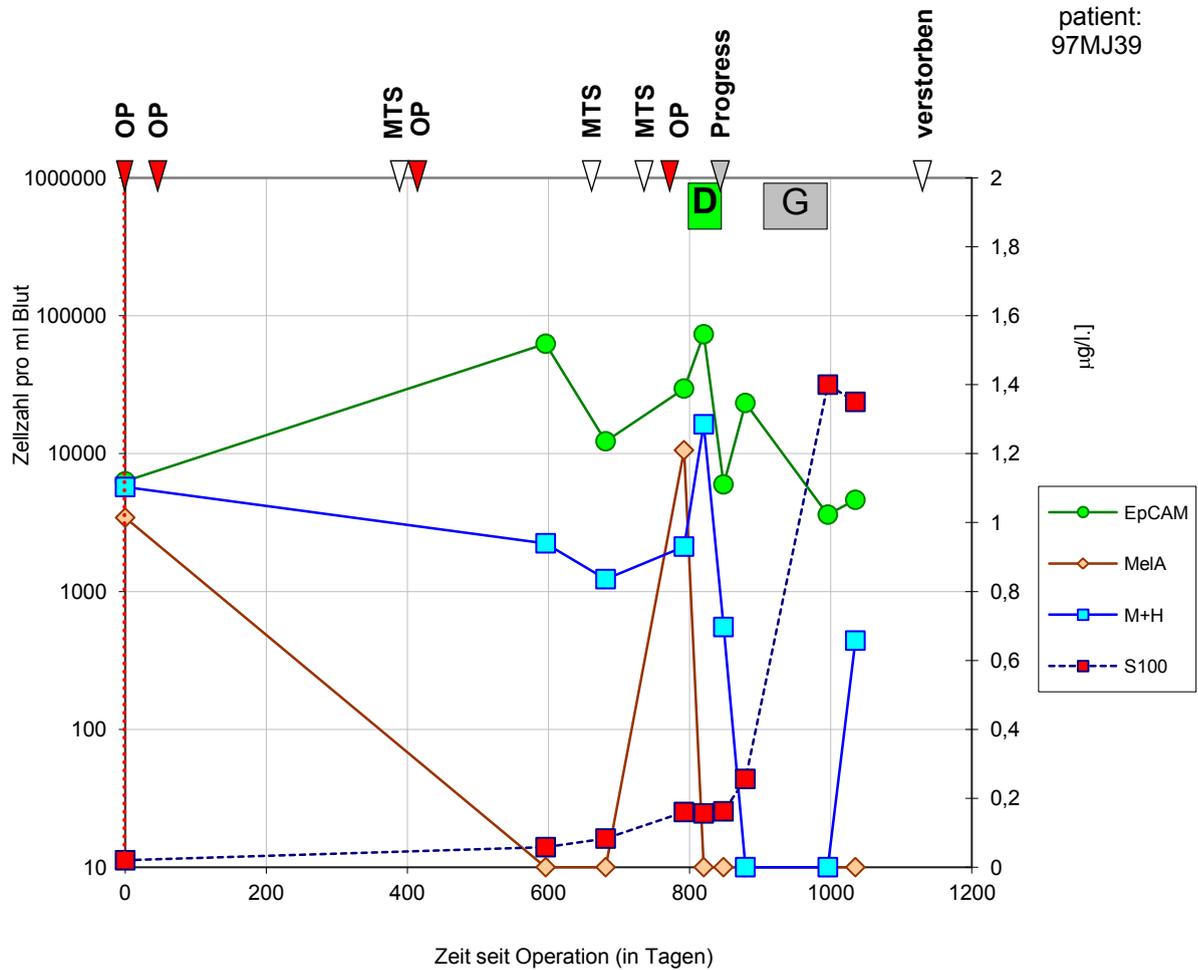


Abbildung 3: Verlauf der Anzahl zirkulierender Tumorzellen/ml einer Melanom-Patientin unter multimodalen Therapien

6.2 Überleben der Patienten

Die Abbildung 4 zeigt die Überlebenskurve nach Kaplan-Meier aller 99 beobachteten Patienten. Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt 73%, die 10-Jahres-Überlebensrate 64%.

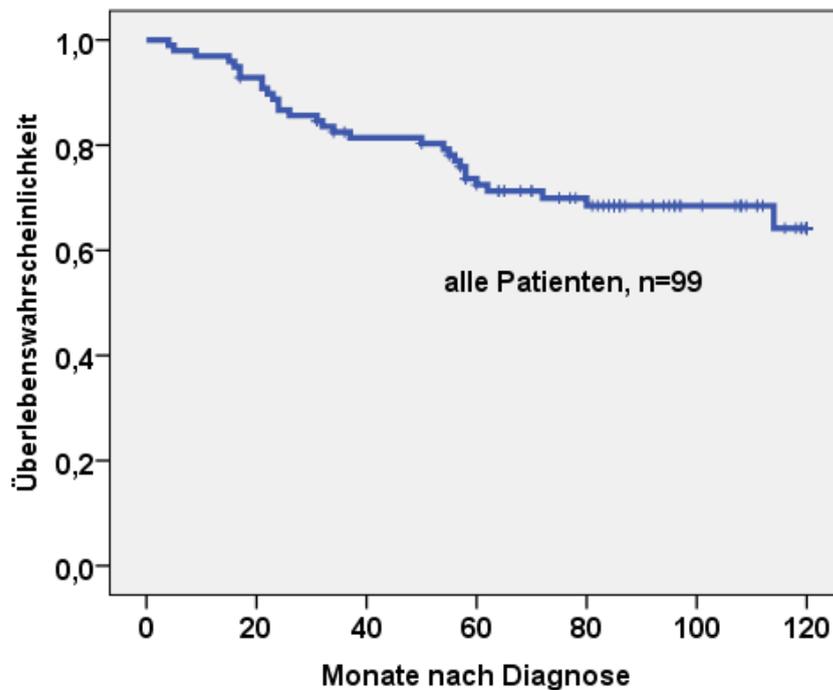


Abbildung 4: Überlebenskurve aller untersuchten Melanom-Patienten

6.3 Korrelationen der einzelnen Messwerte

Bei allen 396 Messungen wurden EPCAM positive Zellen gefunden, 376 Mal wurde gleichzeitig der S100-Wert bestimmt. In 96 Fällen konnten auch Melan A positive Zellen nachgewiesen werden; M+H positive Zellen wurden bei 245 Messungen gefunden. Die Anzahl der EPCAM positiven Zellen wurden mit der Anzahl der Mel A positiven Zellen, dem Verlauf der M+H positiven Zellen, dem Verlauf der S100-Proteine korreliert (Abbildung 5). Signifikante Korrelationen fanden sich zwischen der Anzahl EPCAM positiver Zellen und der Anzahl Mel A positiver Zellen und der Anzahl M+H positiver Zellen (Spearman $\rho = 0,461$ bzw. $0,590$, $p < 0,001$), zwischen der Anzahl Mel A positiver Zellen und der Anzahl M+H positiver Zellen ($\rho = 0,568$; $p < 0,001$) und zwischen der Anzahl M+H positiver Zellen und der Höhe von S100 ($\rho = 0,174$; $p = 0,008$).

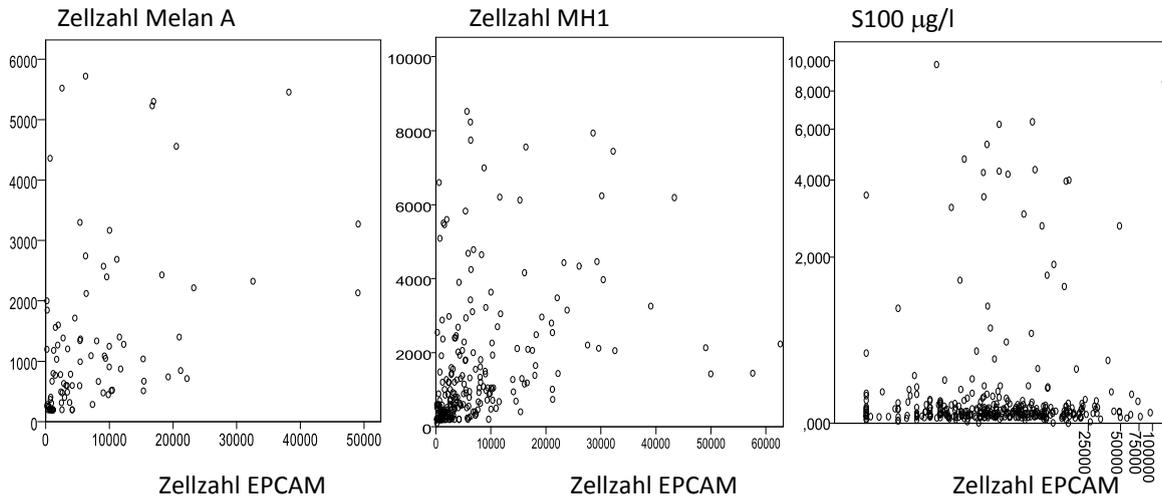


Abbildung 5: Korrelation der Zahl positiver zirkulierender Zellen nach Antigen; EPCAM und. Melan A, EPCAM und M+H, Melan A und M+H

6.4 Zusammenhang zwischen den Zellzahlen und dem Verlauf der Tumorerkrankung

Insgesamt wurden 176 Messungen bei Patienten vorgenommen, die im weiteren Verlauf (median 7Jahre, Bereich 1-12) tumorfrei blieben und 220 Messungen bei Patienten, die ein Rezidiv erlitten. Auf Grund des retrospektiven Charakters dieser Beobachtungsstudie variieren die Zeitpunkte der Messungen der folgenden Ergebnisse.

Die Anzahl Mel A positiver Zellen zeigte weder insgesamt noch zu einzelnen Messzeitpunkten einen Zusammenhang mit dem Verlauf der Tumorerkrankung. Dagegen war, wie in Abbildung 6 abzulesen ist, die mediane Zellzahl EPCAM positiver Zellen, M+H positiver Zellen und die Höhe von S100 bei Patienten mit Rezidiv stets höher als bei immer rezidivfreien Patienten. Diese Unterschiede erreichten nicht zu allen Messzeitpunkten statistische Signifikanz. Die große Ausprägung der Standardabweichungen der einzelnen Messwerte, insbesondere zu

den späteren Messzeitpunkten, zeigte die immense Spannweite der intraindividuellen Messdaten.

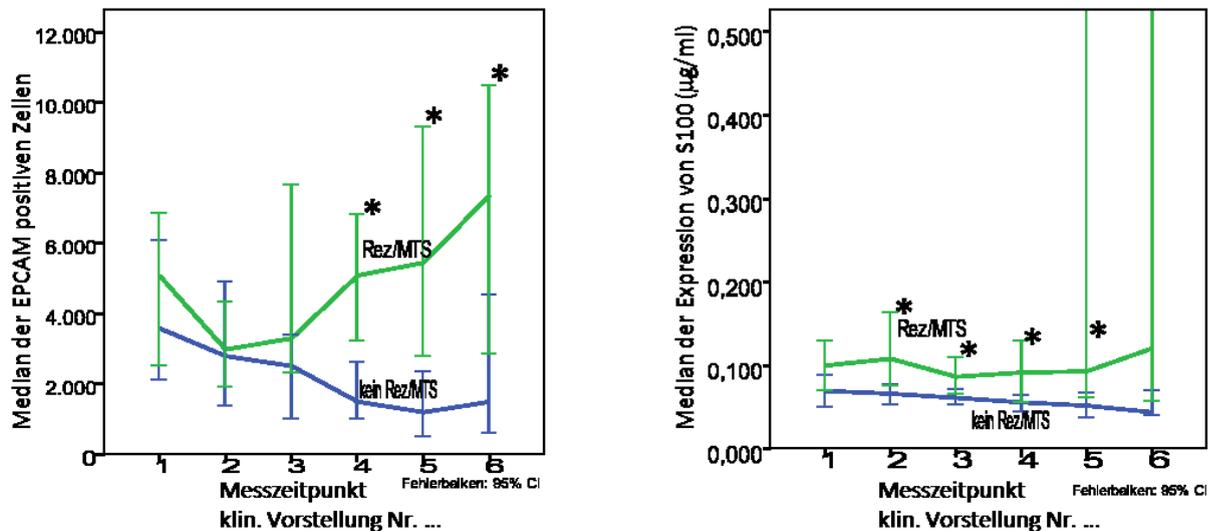


Abbildung 6: Mediane Zellzahl der EPCAM positiven Zellen und der S100 Expression in Abhängigkeit vom Rezidivstatus * = statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0.005$), die Balken zeigen das 95% Konfidenzintervall

In Tabelle 5 sind die medianen Messwerte der ersten 6 Messzeitpunkte bei Patienten mit und ohne Rezidiv dargestellt. Dabei zeigten sich insbesondere in der Gruppe der EPCAM-Messwerte und der S100-Werte statistisch signifikante Unterschiede zu verschiedenen Messzeitpunkten. Für M+H-positive Zellen war ebenfalls die mediane Zellzahl bei Patienten mit Tumor zu jedem Messzeitpunkt höher als für rezidivfreie Patienten. Ein statistisch signifikanter Unterschied in den Verteilungen ergab sich allerdings nur für die Gesamtgruppe aller Messungen.

Tabelle 5: Vergleich der Messwerte im Verlauf

Messung			Ohne Rezidiv bei Messung		Mit Rezidiv bei Messung	p
	Anzahl tu- verdächtige Zellen	N	Median	N	Median	
Erste	EPCAM	49	3600	50	5088	n.s.
Zweite	EPCAM	48	2808	50	2984	n.s.
Dritte	EPCAM	38	2520	47	3304	n.s.
Vierte	EPCAM	26	1500	33	5088	0,006
Fünfte	EPCAM	10	1200	23	5456	0,011
Sechste	EPCAM	5	1500	17	7384	0,035
Total		176	2388	220	4200	0,001
Messung	Anzahl tu- verdächtige Zellen	N	Median	N	Median	
Erste	M+H	35	1272	36	1458	n.s.
Zweite	M+H	30	934	26	1236	n.s.
Dritte	M+H	16	498	31	880	n.s.
Vierte	M+H	13	400	24	1514	n.s.
Fünfte	M+H	8	448	18	848	n.s.
Sechste	M+H	2	300	10	1172	n.s.
Total		101	732	144	1200	0,043
Messung	$\mu\text{g/l}$	N	Median	N	Median	
Erste	S100	48	0,0700	47	0,1000	n.s.
Zweite	S100	46	0,0665	46	0,1080	0,007
Dritte	S100	40	0,0615	44	0,0865	0,028
Vierte	S100	26	0,0560	30	0,0915	0,030
Fünfte	S100	10	0,0520	22	0,0930	0,008
Sechste	S100	5	0,0440	16	0,1205	0,030
Total		172	0,0610	204	0,0950	<0,001

6.5 Perioperative Analyse

6.5.1 Übersicht

Bei 32 Patienten konnten perioperative Daten erhoben werden. Dabei wurden unmittelbar vor der primären Operation oder vor der anschließenden Nachexzision eine Blutentnahme mit der Messung der zirkulierenden Tumorzellen und des S100-Proteins realisiert. Die 2. Messung erfolgte nach spätestens 263 Tagen (Median: 66 Tage); stets unmittelbar vor Beginn einer adjuvanten Therapie. 12 der 32 Patienten entwickelten im Laufe der Beobachtung ein Tumorrezidiv. Die Tabelle 6 stellt die klinischen Daten der untersuchten Patienten dar.

Tabelle 6: Klinische Daten von Patienten mit Beginn der Beobachtung vor der lokalen Exzision des Primärtumors

	Parameter	Perioperative Daten n = 32	Keine Perioperativen Daten n = 67
Alter [Jahre] Median (Range)	Median (Range)	67,5 (18-85)	61 (28-81)
Geschlecht	männlich weiblich	20 12	41 26
pT-Kategorie Primärtumor	T1/T2 T3/T4 TX	11 21 0	32 27 8
pN- Kategorie Primärtumor	N0 N+ NX	24 8 0	43 21 3
Lokalisation des Primärtumors	Haut Paranasal Vulva Penis Okular Okkult	31 0 0 1 0 0	60 1 1 0 1 3
Todesursache	Lebend Tumor Andere	20 9 3	41 22 4
Beobachtungszeitraum (Monate)	Median (Range)	37,5 (4-93)	60 (15-294)

Der Median des Beobachtungszeitraumes ist in der perioperativen Gruppe kleiner, da bei den anderen Patienten die Zeitdifferenz zwischen Erstdiagnose und erster Konsultation in der dermatologischen Poliklinik hinzukommt.

Bei den 20 Patienten, die kein Rezidiv entwickelten, war ein Abfall oder gleichbleiben der EPCAM positiven Zellen 12 mal (60%), bei Melan A positiven Zellen 18 mal (90%) und M+H positiven Zellen 11 mal (55%) nach der Entfernung des Tumors zu beobachten. Ein Abfall der Zellzahl bei den 12 Patienten die ein Rezidiv entwickelten fand sich bei EPCAM positiven Zellen 9 Mal (66%), bei Melan A positiven Zellen 9 Mal (84%) und M+H positiven Zellen ebenfalls 9 Mal (66%). Damit konnte kein statistisch signifikanter Unterschied der beiden Gruppen aufgezeigt werden.

Auch konnten die Untersuchungen der absoluten Zellzahl postoperativ - entsprechend der absoluten Zellzahl vor Beginn einer adjuvanten Therapie - keinen statistischen Zusammenhang belegen. So beträgt, wie in Abbildung 7 aufgezeigt, die absolute Zellzahl der EPCAM positiven Zellen postoperativ im Median bei der Gruppe der Patienten mit Rezidiv 3550 und bei der Gruppe der Patienten ohne Rezidiv 4772. Dabei zeigte sich ein Trend entgegengesetzt zur Hypothese, dass eine niedrige postoperative Zellzahl assoziiert ist mit weniger Rezidiven

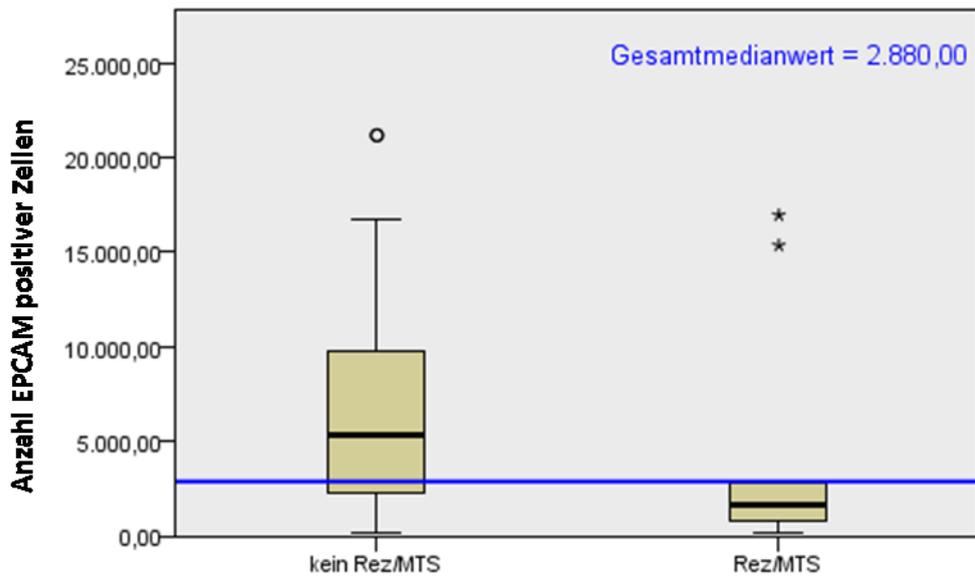


Abbildung 7: Median der postoperativen Zellzahl nach der lokalen Exzision des Primärtumors bei Patienten mit Beginn der Beobachtung vor der lokalen Exzision des Primärtumors (n=32) in Abhängigkeit davon, ob der Patient im Verlauf ein Tumorrezidiv erlitten hat (Rez/MTS) oder nicht (kein Rez/MTS)

6.5.2 Kasuistik 2: Perioperative Messwerte

Abbildung 8 zeigt die Messwerte klinischer Ereignisse eines Patienten mit der Erstdiagnose eines malignen Melanoms im Stadium IIB im November 2004. Es erfolgten Messungen unmittelbar vor und nach Exzision des malignen Melanoms. 17 Tage vor Operation erfolgte die erste Messung und 43 Tage nach Operation die zweite Messung. Im Anschluss erfolgte die adjuvante Interferontherapie von Januar 2005 bis Oktober 2006. Postoperativ war ein leichter Anstieg der EPCAM positiven Zellen sowie ein Abfall der Mel A positiven, der M+H positiven und des S100 zu verzeichnen. Bis zum Oktober 2007, insgesamt 1068 Tage nach Diagnosestellung, wurde kein Rezidiv des malignen Melanoms beobachtet.

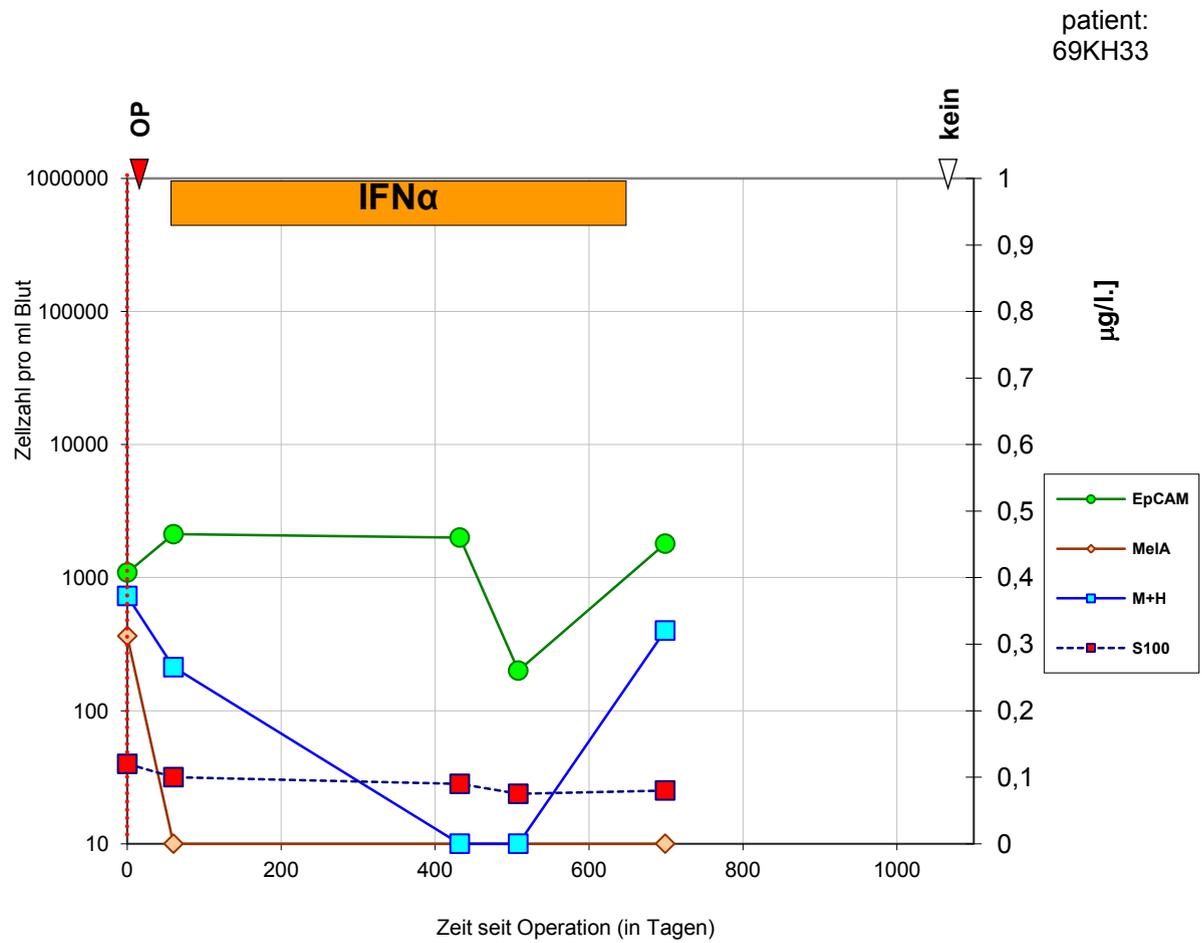


Abbildung 8: Verlauf der Zahl der zirkulierenden Tumorzellen eines Patienten mit perioperativer Zellzahlanalyse

6.6 Zellzahlveränderungen der palliativ behandelten Patienten

6.6.1 Übersicht

Bei 29 Patienten war die Therapie palliativ intendiert. Tabelle 7 zeigt die klinischen Daten der Patientengruppe mit palliativer und kurativer Erkrankungssituation.

Tabelle 7: Klinische Daten von Patienten unter palliativer Chemotherapie

	Parameter	Nicht Palliative Patienten	Palliative Patienten
Alter (Jahre)	Median (Range)	62 (18-85)	64 (28-81)
Geschlecht	männlich	45	16
	weiblich	25	13
pT- Kategorie Primär Tumor	T1/T2	33	10
	T3/T4	33	15
	TX	4	4
pN- Kategorie Primärtumor	N0	56	11
	N+	14	15
	NX	0	3
Lokalisation des Primärtumors	Haut	67	24
	Rektum	0	1
	Paranasal	1	0
	Vulva	1	0
	Penis	0	1
	Okular	0	1
	Okkult	1	2
Todesursache	Lebend	57	4
	Tumor	7	24
	Andere	4	1
	Unbekannt	2	0
Beobachtungszeitraum (Monate)	Median (Range)	57 (4-187)	50 (5-294)

Bei 29 Patienten war die Therapie palliativ intendiert. Der Median der gemessenen Werte lag bei Ihnen für alle vier untersuchte Größen jeweils höher als bei den 70 kurativ intendierten Patienten (Abbildung 9). Die Unterschiede erreichten jedoch nur

für die Messungen der Zellzahl EPCAM positiver Zellen und die Werte von S100 statistische Signifikanz.

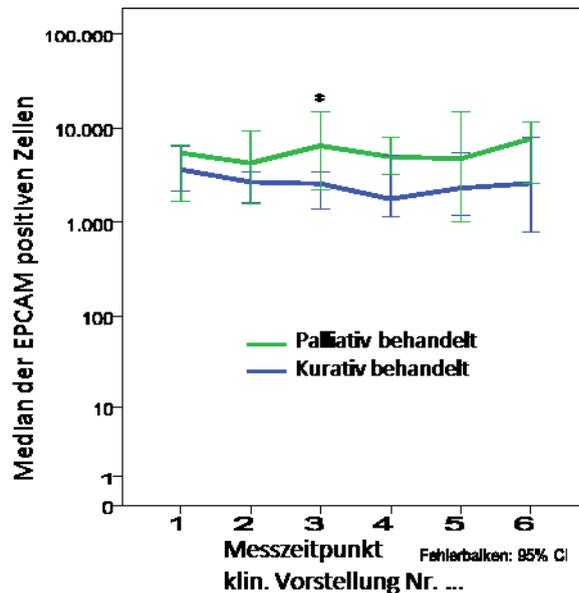


Abbildung 9: Mediane Zellzahl der EPCAM positive Zellen in Abhängigkeit des Vorliegens einer palliative Remissionssituation * = statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0.005$), die Balken zeigen das 95% Konfidenzintervall

6.6.2 Kasuistik 3: Palliativ behandelter Patient

Abbildung 10 stellt die Messwerte und klinischen Ereignisse eines Patienten mit der Erstdiagnose eines malignen Melanoms im Stadium IIIB im Juli 2005 dar. Nach Primärexzision, Nachresektion und radikaler Lymphonodektomie im Juli und August 2005 erfolgte eine adjuvante Interferon-alpha Therapie ab September 2005 bis zum Auftreten einer Lymphknotenmetastase im Dezember 2005. Nach erneuter operativer Therapie erlitt der Patient im Juli 2006 ein erneutes Rezidiv des malignen Melanoms. Bei nicht gegebener Operabilität wurde eine palliativ intendierte Chemotherapie mit DTIC ab August 2006 eingeleitet. Bei im Februar 2007 nachgewiesenen zerebralen Metastasen erfolgte eine Radiatio und ab März 2007 die Umstellung der

Chemotherapie auf Gemcitabin/Treosulfan. Im Juni 2007 verstarb der Patient tumorbedingt. Die Zellzahlen von EPCAM, M+H und Mel A zeigen eine ausgeprägte Varianz. So stiegen die Werte nach der Operation auf das nahezu 100fache an. Der Effekt der Interferontherapie kann nicht abgeschätzt werden, da hier keine Messungen erfolgten. Im Rahmen der DTIC Therapie fiel die Zellzahl wieder ab, trotzdem traten zerebrale Metastasen auf, begleitet von einem erneuten Anstieg der Zellzahl, die dem weiteren Progress voranging. Die Werte von S100 zeigen einen starken Anstieg erst im späten Verlauf mit Fortschreiten der Erkrankung.

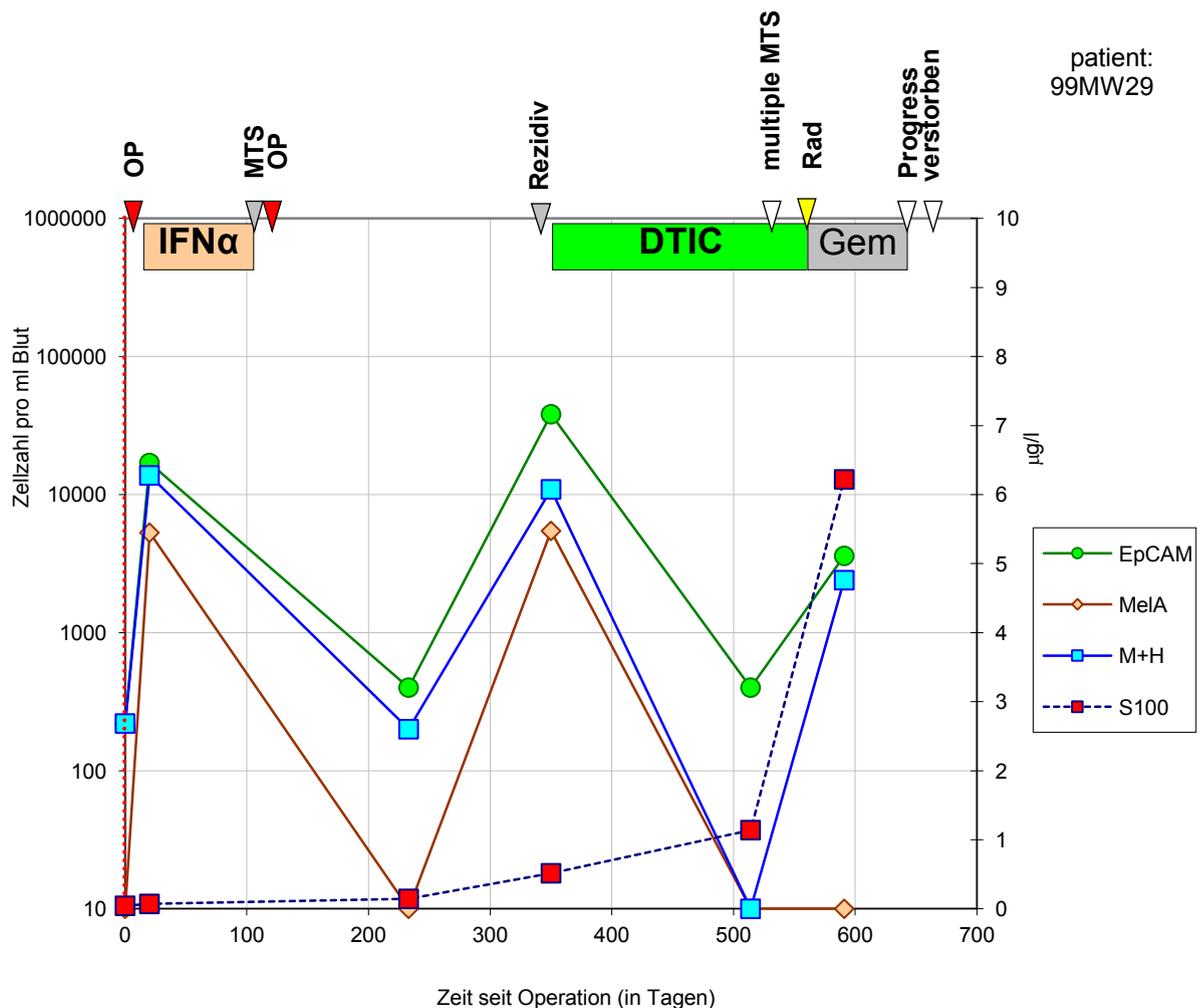


Abbildung 10: Verlauf der Zahl der zirkulierenden Tumorzellen eines Patienten mit palliativer Erkrankung unter Therapie

6.6.3 Überlebensraten

Erwartungsgemäß zeigte die Gruppe der kurativ behandelten Patienten ein statisch signifikant besseres Überleben nach der Diagnosestellung als die Gruppe der palliativ behandelten Patienten (Abbildung 11). Die mediane Überlebenszeit der palliativ behandelten Patienten betrug 50 Monate. Die 5-Jahres-Überlebensraten der beiden Gruppen betragen 89% bzw. 35%, die 10-Jahres-Überlebensraten 87% bzw. 18%.

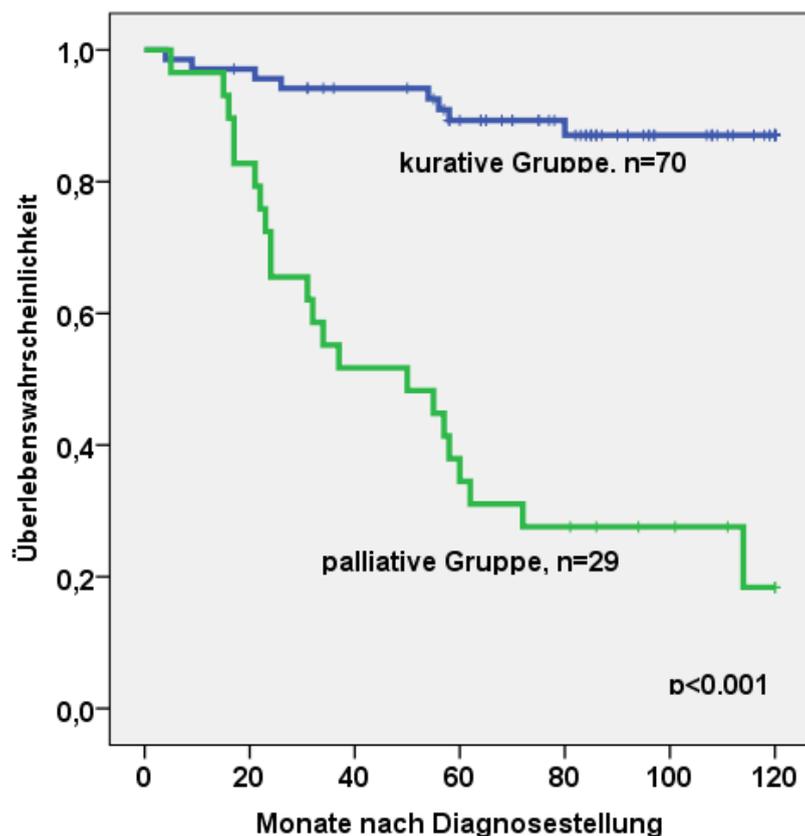


Abbildung 11: Überlebenskurve nach Kaplan-Meier der Patienten in kurativer und palliativer Erkrankungssituation des malignen Melanoms

6.7 Therapieansprechen der metastasierten Patienten

6.7.1 Übersicht

Unter der Therapie mit antineoplastischen Substanzen (17xDTIC, 7xIFN, 1xFotemustin, 1xTrofosamid) wurde bei 4 von 26 Patienten eine Remission nach Recist-Kriterien erreicht. Bei der Messung der EPCAM positiven Zellen konnte eine Reduktion der medianen Zellzahlen von 4336 Zellen auf 4054 Zellen unter Therapie nachgewiesen werden. Diese Unterschiede waren nicht statistisch signifikant (Zweifaktorieller ANOVA). Zwischen der Remission und dem Verhalten der Messwerte konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang aufgezeigt werden.

6.7.2 Kasuistik 4: Patient mit Fernmetastasen

In der Abbildung 12 werden der Zellzahlverlauf, der Verlauf des Tumormarkers S100 und die klinischen Ereignisse eines palliativen Patienten mit Fernmetastasen dargestellt. Es wurde ein Melanom der linken Helix im Juni 2001 primär exzidiert und nachreseziert. Im August 2004 wurde ein pulmonales Rezidiv des malignen Melanoms diagnostiziert. Es erfolgte die Metastastektomie und Lymphonodektomie im September 2004. Anschließend wurden ab November 2004, 18 Zyklen einer Chemotherapie mit DTIC, initial mit einer partiellen Remission und fortan stabiler Erkrankung, bis zum erneuten pulmonalen Rezidiv im April 2006 appliziert. Im Mai 2006 wurde eine atypische Lungenteilresektion durchgeführt. Eine zerebrale Metastasierung wurde im Juni 2006 diagnostiziert. Im Oktober 2006 verstarb der Patient an den Folgen der Progression des malignen Melanoms.

Die Messwerte der Zellzahlen der EPCAM positiven Zellen unterlagen auch in diesem Beispiel großen Schwankungen mit einem sägezahnförmigen, tendenziell abfallenden Verlauf, vor allem im Intervall der stabilen Erkrankungssituation unter Chemotherapie. Vor dem pulmonalen Rezidiv im April 2006 zeigte sich ein Anstieg der EPCAM positiven Zellen und postoperativ ein Abfall der EPCAM positiven Zellen. Die Zellzahlen der M+H positiven und Mel A positiven Zellen zeigten, nach zunächst

parallelem Verlauf, zu den EPCAM positiven Zellen einen vollständigen Rückgang. Das Protein S100 zeigte dagegen im Krankheitsverlauf wenige Veränderungen ohne eindeutigen Bezug zum Krankheitsverlauf.

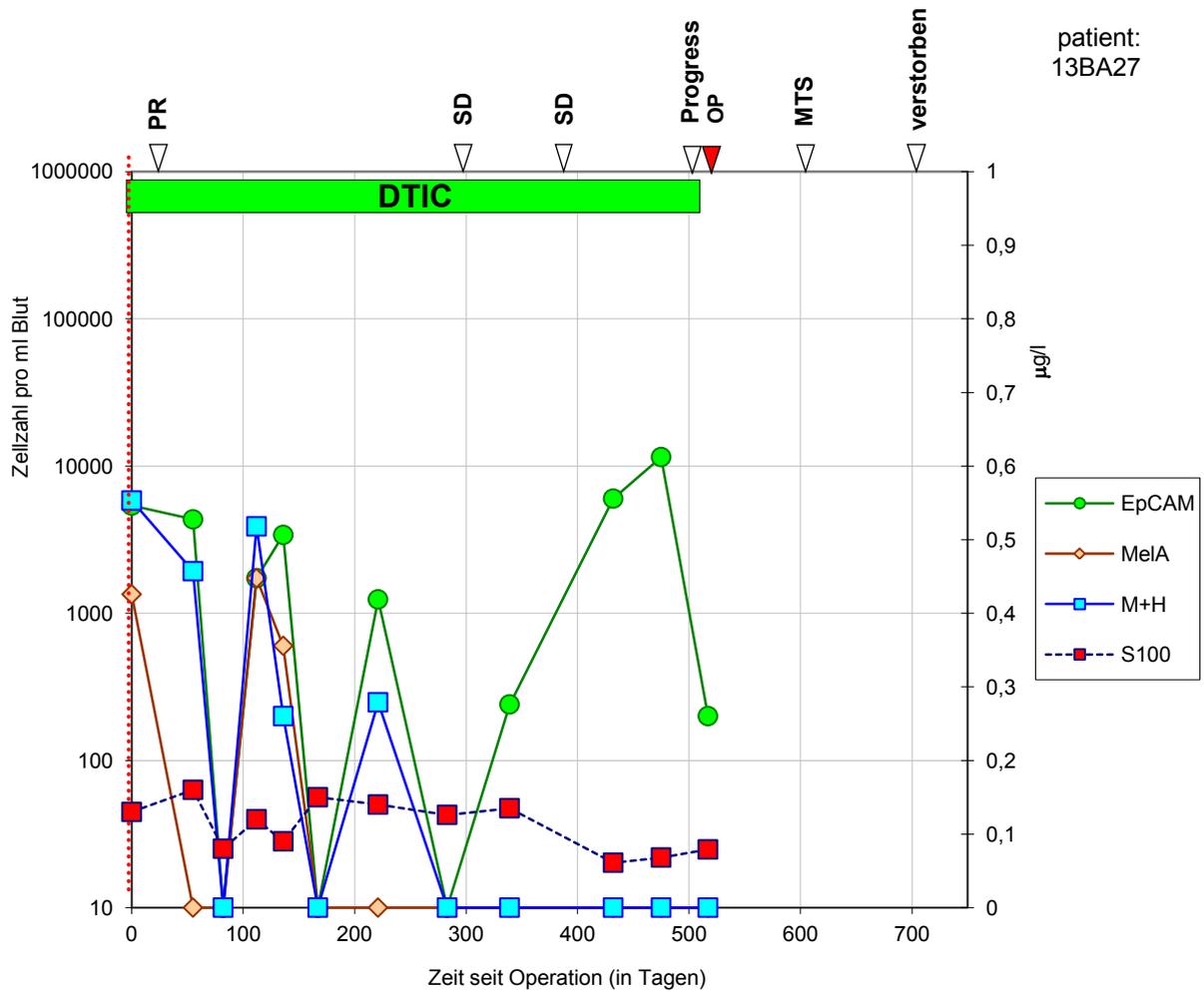


Abbildung 12: Verlauf der Zahl zirkulierender tumorverdächtiger Zellen eines Patienten mit Fernmetastasen

6.8 Zusammenfassung der Ergebnisse

Von Dezember 2002 bis November 2011 wurden von 99 Patienten (61 Männern und 38 Frauen im medianen Alter von 62 (18-85) Jahren) insgesamt 396 peripher-venöse Blutproben entnommen. 30 Mal erfolgte die erste Blutentnahme vor der Exzision des Primärtumors, in allen weiteren Fällen im Median 13 Monate (Bereich 1 - 241 Monate) nach der Primärdiagnose im Rahmen der Tumornachsorge bzw. der Interferon-alpha- oder Chemotherapie. Die Messwerte für EPCAM positive Zellen, Mel A positive Zellen, M+H positive Zellen wurden mit der MAINTRAC[®]-Methode analysiert. Alle nicht-okkulten Melanome wurden chirurgisch entfernt, bei 13, 47 und 20 Patienten erfolgte zusätzlich eine Strahlen-, Interferon-alpha- oder Chemotherapie in adjuvanter oder in palliativer Intention. 1, 2, 3, 4, 5 bzw. 6 Messwerte lagen von 99, 98, 87, 59, 33 bzw. 22 Patienten vor.

Die mediane Zellzahl der EPCAM-positiven Zellen war bei den 176 Messpunkten mit Tumornachweis im Mittel signifikant höher als bei den 220 Messungen ohne Tumornachweis ($p=0,001$). Gleiches galt für die M+H positiven Zellen ($p=0,043$) und den Tumormarker S100 ($p<0,001$). Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Menge der zirkulierenden EPCAM-positiven Zellen und dem Tumorstadium konnte nicht festgestellt werden. Es zeigte sich ein Einfluss der Chemotherapie bei Patienten mit metastasiertem malignen Melanom auf die gemessenen Zellzahlen der EPCAM-, M+H- als auch der Melan A positiven Zellen. Der Median der gemessenen Zellzahlen der EPCAM-positiven Zellen bei 50 Patienten mit einem Rezidiv-Tumor im Verlauf lag deutlich höher als bei den 49 nach der Primärtherapie stets tumorfreien Patienten. Aufgrund der starken Streuung der Messwerte erreichten die Differenzen nicht zu allen Messzeitpunkten statistische Signifikanz. Der Median der gemessenen Werte lag bei den 29 Patienten in palliativer Situation für alle vier untersuchte Größen jeweils höher als bei den 70 Patienten, die in kurativer Situation behandelt wurden. Die Unterschiede erreichten jedoch nur für die Messungen der Zellzahl EPCAM positiver Zellen und die Werte von S100 statistische Signifikanz.

In der untersuchten Gruppe der Patienten mit perioperativen Messwerten zeigte sich keine Korrelation zwischen einer Reduktion der postoperativen Zellzahl der EPCAM-, M+H- als auch der Melan A positiven Zellen und einem verminderten Risiko zur Ausprägung eines Rezidivs. Auch war die Höhe der absoluten Zellzahl postoperativ - entsprechend der absoluten Zellzahl vor Beginn einer adjuvanten Therapie – nicht prädiktiv für die Vorhersage eines späteren Rezidivs des malignen Melanoms.

7 Diskussion

Die Metastasierung beim malignen Melanom stellt den wichtigsten Prognosefaktor dar. So differiert das 5-Jahresüberleben von ca. 90% beim primär nicht metastasierten Melanom bis hin zu ca. 20% beim primär metastasierten Melanom. Der aktuell einzig nach Leitlinie empfohlene Verlaufsmarker der Erkrankung ist das Protein S100, welches einen groben Zusammenhang des Ausmaßes der Metastasierung sowie der Tumoraktivität erlaubt. Effektivere Prognosemethoden und individuelle Rezidiv-Vorhersagen sind notwendig, um das metastatische Potential und minimale Resterkrankungen frühzeitig zu erkennen. Zirkulierende Tumorzellen als „leukämische Phase“ (Mocellin et al. 2006) der soliden Tumoren sind als wesentlicher Surrogatparameter der Metastasierung durch technische Entwicklungen nachweis- und charakterisierbar. Die Fortschritte, die in der Erkennung von zirkulierenden Tumorzellen gemacht wurden, haben zu einer Einführung in internationale *Staging Systeme* geführt (Harris et al. 2007). Es konnte in verschiedenen Arbeiten ein direkter Zusammenhang zwischen einem Anstieg der zirkulierenden Tumorzellen (*Minimal Residual Disease*) und der Zeit bis zur Ausbildung eines Rezidivs bzw. des Risikos der Ausbildung eines Rezidivs belegt werden (Cristofanilli et al. 2004, Pachmann et al. 2008, Bidard et al. 2014). Es wurde angenommen, dass zirkulierende epitheliale Zellen genetische Abnormalitäten (Pantel et al. 2008) und somit Tumorzelleigenschaften aufweisen. Dies konnte durch *Whole Genome Amplification* von einzelnen zirkulierenden Zellen nachgewiesen werden (Pachmann Katharina 2012, Pachmann et al. 2013, Gasch et al. 2013). Bei einer Vielzahl von metastasierten Erkrankungen konnten zirkulierende Tumorzellen dokumentiert werden, hingegen kaum oder gar nicht bei gesunden Vergleichsproben (Allard et al. 2004).

Die meisten Arbeiten über zirkulierende Tumorzellen untersuchten das Blut von Brust-, Kolon-, Prostata- oder Lungenkarzinompatienten mit einer Vielzahl unterschiedlicher Anreicherungsverfahren und Nachweismethoden, sodass eine standardisierte Methode zurzeit nicht etabliert ist. So wurden in der Übersichtsarbeit (Pantel et al. 2008) die verschiedenen immunozytologischen Assays, welche Antikörper direkt gegen Oberflächeneiweiße benutzen und PCR-basierte Methoden,

welche gewebspezifische Transkripte nachweisen, analysiert. Die PCR-basierten Verfahren weisen eine hohe Sensitivität auf, sodass eine Zelle in einer Blutprobe von über 2×10^7 weißen Blutzellen nachgewiesen werden kann. In vielen Arbeiten wurden dagegen die technischen Probleme der Methode v.a. mit falsch positiven Ergebnissen angesprochen, was mit der mangelnden Differenzierung zwischen lebenden und nichtlebenden Tumorzellen zu begründen ist. Zudem besteht eine große genomische Variabilität der interindividuellen und intraindividuellen Tumore, sodass die Notwendigkeit verschiedener mRNA-Marker in den Fokus der Forschung rückte. Multiple Marker-Tests wurden entwickelt, aber die Suche nach den besten Markern hält an und muss in größeren Studien validiert werden. Die immunzytologischen Verfahren unterscheiden sich in immunzytochemische, die zeitaufwendig sind und dem Problem der subjektiven Auswertung unterliegen, und den Immunfluoreszenz Verfahren. Durch Flowcytometrie können fluoreszierende Events in kurzer Zeit gemessen werden. Allerdings hat dies eine große Zahl falsch positiver Messungen zur Folge. Durch automatisierte immunomagnetische Anreicherungsverfahren, wie, dem einzigen durch die US Food and Drug Administration (FDA) anerkannten Verfahren, CellSearch, kann mit Ferrofluidgekoppelten Antikörpern gegen EPCAM eine höhere Spezifität erreicht werden. Größere Studien sind erforderlich, um den klinischen Nutzen dieses Verfahren darzulegen. Kritisch zu bemerken ist, dass, wie in mehreren Arbeiten angegeben (Pachmann et al. 2005b, Benez et al. 1999), durch Anreicherungsverfahren eine Vielzahl zirkulierender Tumorzellen außerhalb der Anreicherungsfraktion detektiert wurden und somit dem darauffolgenden Nachweisverfahren nicht zur Verfügung stehen. Auch in der Erforschung der zirkulierenden Tumorzellen bei malignen Melanom konnte, wie in einer systematischen Übersichtsarbeit (Rodic et al. 2014) demonstriert, die Korrelation von zirkulierenden Melanomzellen (CMC) zu fortgeschrittenen Tumorstadien sowie vermindertem krankheitsfreien und Gesamtüberleben dargestellt werden.

In der von unserer Forschungsgruppe verwendeten Methode wurde mit Hilfe der *Laser Scanning Cytometrie* (LSC[®]) eine Methode verwendet, die quantitative und qualitative Erfassung tumorverdächtiger Zellen im Blut mit einer zur PCR

vergleichbaren Sensitivität ermöglicht (Pachmann et al. 2001, Pachmann et al. 2005b). Im Gegensatz zu anderen Verfahren werden mit dem so genannten *Maintrac® Verfahren* Tumorzellen ohne Anreicherungsverfahren und mit nur einem Zentrifugationsschritt der weiteren Analyse zugeführt, an Fluoreszenzmarker gekoppelt, mithilfe der Laser Scanning Cytometrie automatisiert detektiert und abschließend mikroskopisch validiert. Im Vorteil zu den anderen Verfahren wird durch die Verwendung der Erythrozyten-Lyse als einzigem Separationsschritt und dem Verzicht auf Anreicherungsverfahren der Verlust von Tumorzellen minimiert. Durch die abschließende mikroskopische Validierung werden die unspezifischen Events der Flowcytometrie ausgeschlossen und nahezu ausschließlich vitale zirkulierende Tumorzellen, welche ursächlich für die Metastasierung sind, nachgewiesen. Ferner konnte durch die LSC gezeigt werden, dass zirkulierende Tumorzellen nur bei Patienten mit einer malignen Erkrankung diagnostiziert werden können (Pachmann et al. 2005b) und diese Zellen vitale Tumorzellen darstellen.

Als Marker für die Detektion von Zellen des Melanoms im Blut wurden EPCAM und Melan A gewählt. Das epitheliale Zelladhäsionsmolekül EPCAM wurde immunhistochemisch bei einer Vielzahl epithelialer und adenomatöser Tumorentitäten nachgewiesen und ist eines der am stärksten überexprimierten Antigene in der Onkogenese (Went et al. 2004). Das maligne Melanom bietet als Besonderheit die Ausprägung des Transmembran-Proteins Melan A (Orchard 2000, Hofbauer et al. 1998), welches nahezu ausschließlich von Melanozyten exprimiert und nicht in normalem peripheren Blut entdeckt wird.

In den 396 Messungen bei insgesamt 99 Patienten konnten mit Hilfe der *Laser-Scanning-Cytometrie* immer EPCAM positive Zellen gefunden werden. In 96 Fällen fanden sich auch Melan A positive; M+H positive Zellen wurden bei 245 Messungen gefunden. Wie schon beschrieben, wurden ausschließlich lebende Tumorzellen bewertet. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die mediane Zellzahl der EPCAM positiven Zellen bei den 153 Messpunkten mit Tumornachweis signifikant höher ist als bei den 245 Messungen ohne Tumornachweis. In Analogie zu einer Vielzahl wissenschaftlicher Untersuchungen der zirkulierenden Tumorzellen konnte

ein Zusammenhang zwischen der Zunahme der medianen Zellzahl und des fortgeschrittenen Krankheitsstadium aufgezeigt werden (Freeman et al. 2012, Carrillo et al. 2006, Koyanagi et al. 2005). Ähnlich der Ergebnisse bei EPCAM positiven Zellen, zeigte sich auch der etablierte Tumormarker S100 bei den Patienten mit Tumornachweis signifikant höher als bei den Patienten ohne Tumornachweis. Es war eine große intraindividuelle Spannweite der Zahl der zirkulierenden Tumorzellen und der S100-Werte auffällig. Dies spiegelt sich in einer hohen Standardabweichung wieder, welcher Ausdruck dafür ist, dass einzelne Werte wenig individuelle prognostische Vorhersagekraft haben. So konnten für einzelne Tumorzellzahlmessungen keine statistisch signifikanten Zusammenhänge aufgezeigt werden. Die Hypothese, dass ein postoperativer Zellzahlabfall mit einer niedrigeren Rezidivrate assoziiert ist, konnte sowohl durch die Tumorzellzahlen als auch durch die Werte des S100-Proteins nicht statistisch belegt werden. Allerdings schlossen sich bei einer Reihe von Patienten an die Operation weitere Therapien an, die Einfluss auf den Krankheitsverlauf gehabt haben können. Bei den palliativ behandelten Patienten waren die Zahlen der EPCAM positiven Zellen zu allen Messzeitpunkten höher als bei den kurativ behandelten Patienten. Die Einzelbetrachtungen der klinischen Verläufe der palliativen Patienten zeigten keine Korrelationen zwischen Zellzahlanstieg / Anstieg der Tumormarkers S100, der erst spät bei der Ausbildung eines Rezidivs positiv wurde. Ferner konnte weder für die Zellzahlen der zirkulierenden Tumorzellen als auch für den Tumormarker S100 ein Zusammenhang zwischen einer Remission unter antiproliferativer Therapie und der Ausprägung der Messwerte gezeigt werden. Diese Ergebnisse korrelieren mit der in der Literatur beschriebenen signifikanten Heterogenität der Zellzahl-Messungen von zirkulierenden Tumorzellen im Zusammenhang mit dem Gesamtüberleben und progressionfreien Überleben (Mocellin et al. 2006). Die in der Metaanalyse beobachtete zu geringe Anzahl zirkulierender Tumorzellen im Stadium IV (47,4%) sowie eine zu hohe Anzahl zirkulierender Tumorzellen in Stadium I (18,1%) zeigt, in Analogie zu der hier präsentierten Arbeit, dass einzelne Werte eine zu geringe Sensitivität aufweisen und das vielmehr die Dynamik der Zellen das Ansprechen auf die Therapie zeigen.

Dabei beeinflussen verschiedene Faktoren in der Methodik und der Tumorzellbiologie die Ergebnisse. In den durchgeführten Messungen sind große intraindividuelle Schwankungen der Zellzahlen auffällig. Zum einen besteht durch den retrospektiven Charakter dieser Arbeit eine Heterogenität der Messzeitpunkte. Da die Zahl aber sehr stark durch die jeweilige Therapie beeinflusst wird, ist sie damit nur ganz pauschal mit der Tumorlast korreliert. Möglicherweise besteht auch eine unterschiedliche Ausprägung der Oberflächenproteine in verschiedenen Therapiestadien. Heterogene Ergebnisse könnten auch durch die Maskierung des EPCAM-Proteins durch Glycoproteine oder membrane Lipoproteine, welche die Bindung des Fluoreszenzmarkers verhindern (Hekimian et al. 2012), begründet sein. So konnte gezeigt werden, dass EPCAM auf zirkulierenden Tumorzellen teilweise in maskierter Form vorliegt. Weiterhin ist bekannt, dass im Verlauf der Tumorerkrankungen eine genomische Variabilität mit Veränderungen, welche auch zur Therapieresistenz beitragen können, existiert. Es könnte ein heterogener Pool an zirkulierenden Tumorzellen mit dynamischen Veränderungen von epithelialen zu mesenchymalen Tumorzellen demonstriert werden (Yu et al. 2013). Dabei werden Veränderungen der Oberflächenproteine, wie zum Beispiel die Expression von EPCAM, beschrieben (Went et al. 2004).

Die Therapie des fortgeschrittenen malignen Melanoms hat sich in den letzten 4 Jahren substantiell geändert. Nachdem zuvor mehr als 30 Jahre die Chemotherapie mit Dacarbazin der therapeutische Standard war, konnte durch moderne Therapie sowohl das progressionsfreie Überleben als auch das Gesamtüberleben signifikant verlängert werden. Als neue therapeutische Optionen sind aktuell sowohl von der FDA als auch von der EMA Checkpoint-Inhibitoren (Ipilimumab), BRAF-Inhibitoren (Vemurafenib, Dabrafenib) sowie MEK-Inhibitoren (Trametinib) zur Erstlinientherapie des metastasierten Melanoms zugelassen. Trotz im Vergleich zu Dacarbazin um ca. 30-40% erhöhten Gesamtansprechens, zeigt sich bei einer Vielzahl der Patienten nach ca. 5-7 Monaten die Ausbildung von Resistenzmechanismen. Die Therapiedauer bis zum Progress der Erkrankung beträgt meist nur ca. 5-7 Monate. Patienten mit einer niedrigen Tumorlast scheinen länger von Therapien mit BRAF-Inhibitoren zu profitieren (Amaravadi und Lee 2011) Es konnte ferner gezeigt werden,

dass aus dem peripheren Blut zirkulierende BRAF-mutierte Melanomzellen bei Patienten mit histologisch diagnostizierter BRAF-Mutation nachgewiesen werden können (Hofman et al. 2013). So könnte der strukturierten Messung von zirkulierenden Tumorzellen zum einen als Surrogatparameter der Tumorlast, zum anderen als Surrogatparameter des Therapieansprechens der neuen therapeutischen Medikamente eine wachsende Bedeutung zukommen (Hoshimoto et al. 2012). Dabei könnte insbesondere die zusätzliche Einzelzellanalyse aus dem peripheren Blut die notwendige Verbesserung der Sensitivität und Spezifität der Messung tumorverdächtiger Zellen aus dem peripheren Blut bewirken. So konnte Neugebauer mit der Methode der Raman-Spektroskopie gesunde Zellen von Tumorzellen aus dem peripheren Blut mit einer Sensitivität und Spezifität von über 99% differenzieren (Neugebauer et al. 2010)

Weitere Untersuchungen, insbesondere einer Interventionsstudie mit genau definierten Messzeitpunkten, wären notwendig, um den Einfluss der Ausprägung der Oberflächenproteine zu verschiedenen Zeitpunkten zu eliminieren und eine bessere Aussagekraft der erhobenen Daten zu gewährleisten.

8 Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Arbeit wurde aus dem peripheren Blut von 99 Patienten überprüft, ob mit Hilfe des immunfluorimetrischen Nachweises von zirkulierenden Tumorzellen beim malignen Melanom der Krankheitsverlauf abgeleitet werden kann und ob sich Korrelationen mit dem Oberflächenprotein S100 ergeben.

Bei allen Patienten wurden zirkulierende tumorverdächtige Zellen nachgewiesen. Es konnten signifikante Korrelationen zwischen der Anzahl EPCAM positiver Zellen und der Anzahl Mel A positiver Zellen und der Anzahl M+H positiver Zellen, zwischen der Anzahl Mel A positiver Zellen und der Anzahl M+H positiver Zellen und zwischen der Anzahl M+H positiver Zellen und der Höhe von S100 nachgewiesen werden.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der Median der EPCAM Messwerte und der S100-Werte statistisch signifikante Unterschiede zu verschiedenen Messzeitpunkten für Patienten mit bzw. ohne Rezidiv des malignen Melanoms aufwiesen. Für M+H-positive Zellen war ebenfalls die mediane Zellzahl bei Patienten mit Tumor zu jedem Messzeitpunkt höher als für rezidivfreie Patienten.

Auch konnte bei den Patienten mit einer palliativen Erkrankungssituation statistisch signifikant erhöhte Medianwerte im Unterschied zur kurativen Patientengruppe für die Messungen der Zellzahl EPCAM positiver Zellen und der Werte von S100 nachgewiesen werden. Hingegen konnte kein statistischer Zusammenhang eines postoperativen Zellzahlabfalls mit der Vorhersage eines späteren Rezidivs hergestellt werden. Es zeigten sich ausgeprägte intraindividuelle Schwankungen der Messwerte abhängig von Art und Zeitpunkt der Therapie, sodass möglicherweise die Überwachung im individuellen Krankheitsverlauf möglich werden kann.

Die Aussagekraft der Ergebnisse wird durch den retrospektiven Charakter dieser als Beobachtungsstudie definierten Arbeit mit fehlenden standardisierten Messzeitpunkten limitiert. Zur Etablierung der exakten Messung und Erfassung der prognostischen Relevanz zirkulierender tumorverdächtigter Zellen im peripheren

venösen Blut sind weitere Studien, insbesondere mit standardisierten Therapien und Messzeitpunkten, notwendig.

9 Literaturverzeichnis

- Allard WJ, Matera J, Miller MC, Repollet M, Connelly MC, Rao C, Tibbe AG, Uhr JW, Terstappen LW. 2004. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clin Cancer Res*, 10 (20):6897-6904.
- Amaravadi RK, K.2; Flaherty, K.3; Chapman, P.4; Puzanov, I.5; Sosman, J.5; Ribas, A.6; Lee RN, K.8; McArthur, G.9. 2011. Prolonged responses to vemurafenib in patients with BRAFV600-mutant melanoma with low tumor burden at baseline. *Pigment Cell and Melanoma Research* 245 (Oct 2011), 1024.
- Ashworth T. 1869. A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death. . *Med J* 14: 146–149.
- Azzola MF, Shaw HM, Thompson JF, Soong SJ, Scolyer RA, Watson GF, Colman MH, Zhang Y. 2003. Tumor mitotic rate is a more powerful prognostic indicator than ulceration in patients with primary cutaneous melanoma: an analysis of 3661 patients from a single center. *Cancer*, 97 (6):1488-1498.
- Balch CM. 1992. Cutaneous melanoma: prognosis and treatment results worldwide. *Semin Surg Oncol*, 8 (6):400-414.
- Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, Buzaid AC, Cochran AJ, Coit DG, Ding S, Eggermont AM, Flaherty KT, Gimotty PA, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MC, Jr., Morton DL, Ross MI, Sober AJ, Sondak VK. 2009. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol*, 27 (36):6199-6206.
- Barth A, Wanek LA, Morton DL. 1995. Prognostic factors in 1,521 melanoma patients with distant metastases. *J Am Coll Surg*, 181 (3):193-201.

- Beitsch PD, Clifford E. 2000. Detection of carcinoma cells in the blood of breast cancer patients. *Am J Surg*, 180 (6):446-448; discussion 448-449.
- Benez A, Geiselhart A, Handgretinger R, Schiebel U, Fierlbeck G. 1999. Detection of circulating melanoma cells by immunomagnetic cell sorting. *J Clin Lab Anal*, 13 (5):229-233.
- Benoy IH, Elst H, Van Dam P, Scharpe S, Van Marck E, Vermeulen PB, Dirix LY. 2006. Detection of circulating tumour cells in blood by quantitative real-time RT-PCR: effect of pre-analytical time. *Clin Chem Lab Med*, 44 (9):1082-1087.
- Bidard FC, Peeters DJ, Fehm T, Nole F, Gisbert-Criado R, Mavroudis D, Grisanti S, Generali D, Garcia-Saenz JA, Stebbing J, Caldas C, Gazzaniga P, Manso L, Zamarchi R, de Lascoiti AF, De Mattos-Arruda L, Ignatiadis M, Lebofsky R, van Laere SJ, Meier-Stiegen F, Sandri MT, Vidal-Martinez J, Politaki E, Consoli F, Bottini A, Diaz-Rubio E, Krell J, Dawson SJ, Raimondi C, Rutten A, Janni W, Munzone E, Caranana V, Agelaki S, Almici C, Dirix L, Solomayer EF, Zorzino L, Johannes H, Reis-Filho JS, Pantel K, Pierga JY, Michiels S. 2014. Clinical validity of circulating tumour cells in patients with metastatic breast cancer: a pooled analysis of individual patient data. *Lancet Oncol*, 15 (4):406-414.
- Bluemke K, Bilkenroth U, Meye A, Fuessel S, Lautenschlaeger C, Goebel S, Melchior A, Heynemann H, Fornara P, Taubert H. 2009. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with renal cell carcinoma correlates with prognosis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 18 (8):2190-2194.
- Bottomley A, Coens C, Suci S, Santinami M, Kruit W, Testori A, Marsden J, Punt C, Sales F, Gore M, Mackie R, Kusic Z, Dummer R, Patel P, Schadendorf D, Spatz A, Keilholz U, Eggermont A. 2009. Adjuvant therapy with pegylated interferon alfa-2b versus observation in resected stage III melanoma: a phase III randomized controlled trial of health-related quality of life and symptoms by the European Organisation for Research and Treatment of Cancer Melanoma Group. *J Clin Oncol*, 27 (18):2916-2923.

- Brandt B, Junker R, Griwatz C, Heidl S, Brinkmann O, Semjonow A, Assmann G, Zanker KS. 1996. Isolation of prostate-derived single cells and cell clusters from human peripheral blood. *Cancer Res*, 56 (20):4556-4561.
- Braun S, Kentenich C, Janni W, Hepp F, de Waal J, Willgeroth F, Sommer H, Pantel K. 2000. Lack of effect of adjuvant chemotherapy on the elimination of single dormant tumor cells in bone marrow of high-risk breast cancer patients. *J Clin Oncol*, 18 (1):80-86.
- Braun S, Vogl FD, Naume B, Janni W, Osborne MP, Coombes RC, Schlimok G, Diel IJ, Gerber B, Gebauer G, Pierga JY, Marth C, Oruzio D, Wiedswang G, Solomayer EF, Kundt G, Strobl B, Fehm T, Wong GY, Bliss J, Vincent-Salomon A, Pantel K. 2005. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med*, 353 (8):793-802.
- Buettner P, Garbe C, Guggenmoos-Holzmann I. 1997. Problems in defining cutoff points of continuous prognostic factors: example of tumor thickness in primary cutaneous melanoma. *J Clin Epidemiol*, 50 (11):1201-1210.
- Bussani R, De-Giorgio F, Abbate A, Silvestri F. 2007. Cardiac metastases. *J Clin Pathol*, 60 (1):27-34.
- Carrillo E, Prados J, Marchal JA, Boulaiz H, Martinez A, Rodriguez-Serrano F, Caba O, Serrano S, Aranega A. 2006. Prognostic value of RT-PCR tyrosinase detection in peripheral blood of melanoma patients. *Dis Markers*, 22 (3):175-181.
- Carvajal RD, Antonescu CR, Wolchok JD, Chapman PB, Roman RA, Teitcher J, Panageas KS, Busam KJ, Chmielowski B, Lutzky J, Pavlick AC, Fusco A, Cane L, Takebe N, Vemula S, Bouvier N, Bastian BC, Schwartz GK. 2011. KIT as a therapeutic target in metastatic melanoma. *JAMA*, 305 (22):2327-2334.
- Chambers AF, Naumov GN, Vantyghem SA, Tuck AB. 2000. Molecular biology of breast cancer metastasis. Clinical implications of experimental studies on metastatic inefficiency. *Breast Cancer Res*, 2 (6):400-407.

- Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, Dummer R, Garbe C, Testori A, Maio M, Hogg D, Lorigan P, Lebbe C, Jouary T, Schadendorf D, Ribas A, O'Day SJ, Sosman JA, Kirkwood JM, Eggermont AM, Dreno B, Nolop K, Li J, Nelson B, Hou J, Lee RJ, Flaherty KT, McArthur GA, Group B-S. 2011. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med*, 364 (26):2507-2516.
- Chen YT, Stockert E, Jungbluth A, Tsang S, Coplan KA, Scanlan MJ, Old LJ. 1996. Serological analysis of Melan-A(MART-1), a melanocyte-specific protein homogeneously expressed in human melanomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93 (12):5915-5919.
- Cohn-Cedermark G, Mansson-Brahme E, Rutqvist LE, Larsson O, Singnomklao T, Ringborg U. 1999. Metastatic patterns, clinical outcome, and malignant phenotype in malignant cutaneous melanoma. *Acta Oncol*, 38 (5):549-557.
- Coulie PG, Brichard V, Van Pel A, Wolfel T, Schneider J, Traversari C, Mattei S, De Plaen E, Lurquin C, Szikora JP, Renauld JC, Boon T. 1994. A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J Exp Med*, 180 (1):35-42.
- Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, Reuben JM, Doyle GV, Allard WJ, Terstappen LW, Hayes DF. 2004. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med*, 351 (8):781-791.
- Datta YH, Adams PT, Drobyski WR, Ethier SP, Terry VH, Roth MS. 1994. Sensitive detection of occult breast cancer by the reverse-transcriptase polymerase chain reaction. *J Clin Oncol*, 12 (3):475-482.
- Eccles SA, Welch DR. 2007. Metastasis: recent discoveries and novel treatment strategies. *Lancet*, 369 (9574):1742-1757.

- Eigentler TK, Caroli UM, Radny P, Garbe C. 2003. Palliative therapy of disseminated malignant melanoma: a systematic review of 41 randomised clinical trials. *Lancet Oncol*, 4 (12):748-759.
- Engell HC. 1955. Cancer cells in the circulating blood. *Actu chir stand SuppZ* 201.
- Fehm T, Sagalowsky A, Clifford E, Beitsch P, Saboorian H, Euhus D, Meng S, Morrison L, Tucker T, Lane N, Ghadimi BM, Heselmeyer-Haddad K, Ried T, Rao C, Uhr J. 2002. Cytogenetic evidence that circulating epithelial cells in patients with carcinoma are malignant. *Clin Cancer Res*, 8 (7):2073-2084.
- Fetsch PA, Cormier J, Hijazi YM. 1997. Immunocytochemical detection of MART-1 in fresh and paraffin-embedded malignant melanomas. *J Immunother*, 20 (1):60-64.
- Flaherty KT, Robert C, Hersey P, Nathan P, Garbe C, Milhem M, Demidov LV, Hassel JC, Rutkowski P, Mohr P, Dummer R, Trefzer U, Larkin JM, Utikal J, Dreno B, Nyakas M, Middleton MR, Becker JC, Casey M, Sherman LJ, Wu FS, Ouellet D, Martin AM, Patel K, Schadendorf D, Group MS. 2012. Improved survival with MEK inhibition in BRAF-mutated melanoma. *N Engl J Med*, 367 (2):107-114.
- Forus A, Hoifodt HK, Overli GE, Myklebost O, Fodstad O. 1999. Sensitive fluorescent in situ hybridisation method for the characterisation of breast cancer cells in bone marrow aspirates. *Mol Pathol*, 52 (2):68-74.
- Freeman JB, Gray ES, Millward M, Pearce R, Ziman M. 2012. Evaluation of a multi-marker immunomagnetic enrichment assay for the quantification of circulating melanoma cells. *J Transl Med*, 10:192.
- Fusi S, Ariyan S, Sternlicht A. 1993. Data on first recurrence after treatment for malignant melanoma in a large patient population. *Plast Reconstr Surg*, 91 (1):94-98.
- Garbe C, Eigentler TK. 2007. Diagnosis and treatment of cutaneous melanoma: state of the art 2006. *Melanoma Res*, 17 (2):117-127.

- Garbe C, Ellwanger U, Tronnier M, Brocker EB, Orfanos CE. 2002. The New American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma: a critical analysis based on data of the German Central Malignant Melanoma Registry. *Cancer*, 94 (8):2305-2307.
- Garbe C, Peris K, Hauschild A, Saiag P, Middleton M, Spatz A, Grob JJ, Malvey J, Newton-Bishop J, Stratigos A, Pehamberger H, Eggermont A. 2010. Diagnosis and treatment of melanoma: European consensus-based interdisciplinary guideline. *Eur J Cancer*, 46 (2):270-283.
- Garbe C, Hauschild A, Volkenandt M, Schadendorf D, Stolz W, Reinhold U, Kortmann RD, Kettelhack C, Frerich B, Keilholz U, Dummer R, Sebastian G, Tilgen W, Schuler G, Mackensen A, Kaufmann R. 2007. Evidence and interdisciplinary consensus-based German guidelines: diagnosis and surveillance of melanoma. *Melanoma Res*, 17 (6):393-399.
- Garbe C, Hauschild A, Volkenandt M, Schadendorf D, Stolz W, Reinhold U, Kortmann RD, Kettelhack C, Frerich B, Keilholz U, Dummer R, Sebastian G, Tilgen W, Schuler G, Mackensen A, Kaufmann R. 2008. Evidence-based and interdisciplinary consensus-based German guidelines: systemic medical treatment of melanoma in the adjuvant and palliative setting. *Melanoma Res*, 18 (2):152-160.
- Garbe C, Peris K, Hauschild A, Saiag P, Middleton M, Spatz A, Grob JJ, Malvey J, Newton-Bishop J, Stratigos A, Pehamberger H, Eggermont AM, European Dermatology F, European Association of D-O, European Organization of R, Treatment of C. 2012. Diagnosis and treatment of melanoma. European consensus-based interdisciplinary guideline--Update 2012. *Eur J Cancer*, 48 (15):2375-2390.
- Gasch C, Bauernhofer T, Pichler M, Langer-Freitag S, Reeh M, Seifert AM, Mauermann O, Izbicki JR, Pantel K, Riethdorf S. 2013. Heterogeneity of epidermal growth factor receptor status and mutations of KRAS/PIK3CA in circulating tumor cells of patients with colorectal cancer. *Clin Chem*, 59 (1):252-260.

- Gebauer G, Fehm T, Merkle E, Beck EP, Lang N, Jager W. 2001. Epithelial cells in bone marrow of breast cancer patients at time of primary surgery: clinical outcome during long-term follow-up. *J Clin Oncol*, 19 (16):3669-3674.
- Glaves D. 1983. Correlation between circulating cancer cells and incidence of metastases. *Br J Cancer*, 48 (5):665-673.
- Goel VK, Lazar AJ, Warneke CL, Redston MS, Haluska FG. 2006. Examination of mutations in BRAF, NRAS, and PTEN in primary cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol*, 126 (1):154-160.
- Guo J, Si L, Kong Y, Flaherty KT, Xu X, Zhu Y, Corless CL, Li L, Li H, Sheng X, Cui C, Chi Z, Li S, Han M, Mao L, Lin X, Du N, Zhang X, Li J, Wang B, Qin S. 2011. Phase II, open-label, single-arm trial of imatinib mesylate in patients with metastatic melanoma harboring c-Kit mutation or amplification. *J Clin Oncol*, 29 (21):2904-2909.
- Haenssle HA, Krueger U, Vente C, Thoms KM, Bertsch HP, Zutt M, Rosenberger A, Neumann C, Emmert S. 2006. Results from an observational trial: digital epiluminescence microscopy follow-up of atypical nevi increases the sensitivity and the chance of success of conventional dermoscopy in detecting melanoma. *J Invest Dermatol*, 126 (5):980-985.
- Harris L, Fritsche H, Mennel R, Norton L, Ravdin P, Taube S, Somerfield MR, Hayes DF, Bast RC. 2007. American society of clinical oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 25 (33):5287-5312.
- Hauschild A, Engel G, Brenner W, Glaser R, Monig H, Henze E, Christophers E. 1999. S100B protein detection in serum is a significant prognostic factor in metastatic melanoma. *Oncology*, 56 (4):338-344.

- Hauschild A, Grob JJ, Demidov LV, Jouary T, Gutzmer R, Millward M, Rutkowski P, Blank CU, Miller WH, Jr., Kaempgen E, Martin-Algarra S, Karaszewska B, Mauch C, Chiarion-Sileni V, Martin AM, Swann S, Haney P, Mirakhur B, Guckert ME, Goodman V, Chapman PB. 2012. Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet*, 380 (9839):358-365.
- Hekimian K, Stein EL, Pachmann U, Pachmann K. 2012. Demasking of epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) on circulating epithelial tumor cells by Tween(R)20 treatment in breast cancer patients. *Clin Chem Lab Med*, 50 (4):701-708.
- Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, Gonzalez R, Robert C, Schadendorf D, Hassel JC, Akerley W, van den Eertwegh AJ, Lutzky J, Lorigan P, Vaubel JM, Linette GP, Hogg D, Ottensmeier CH, Lebbe C, Peschel C, Quirt I, Clark JI, Wolchok JD, Weber JS, Tian J, Yellin MJ, Nichol GM, Hoos A, Urba WJ. 2010. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med*, 363 (8):711-723.
- Hofbauer GF, Kamarashev J, Geertsen R, Boni R, Dummer R. 1998. Melan A/MART-1 immunoreactivity in formalin-fixed paraffin-embedded primary and metastatic melanoma: frequency and distribution. *Melanoma Res*, 8 (4):337-343.
- Hofman V, Ilie M, Long-Mira E, Giaccherio D, Butori C, Dadone B, Selva E, Tanga V, Passeron T, Poissonnet G, Emile JF, Lacour JP, Bahadoran P, Hofman P. 2013. Usefulness of immunocytochemistry for the detection of the BRAF(V600E) mutation in circulating tumor cells from metastatic melanoma patients. *J Invest Dermatol*, 133 (5):1378-1381.
- Hoshimoto S, Faries MB, Morton DL, Shingai T, Kuo C, Wang HJ, Elashoff R, Mozzillo N, Kelley MC, Thompson JF, Lee JE, Hoon DS. 2012. Assessment of prognostic circulating tumor cells in a phase III trial of adjuvant immunotherapy after complete resection of stage IV melanoma. *Ann Surg*, 255 (2):357-362.

- Jackel A, Deichmann M, Waldmann V, Bock M, Naher H. 1999. [S-100 beta protein in serum, a tumor marker in malignant melanoma-- current state of knowledge and clinical experience]. *Hautarzt*, 50 (4):250-256.
- Juergensen PH, Murphy AL, Pherson KA, Kliger AS, Finkelstein FO. 2000. Tidal peritoneal dialysis: comparison of different tidal regimens and automated peritoneal dialysis. *Kidney Int*, 57 (6):2603-2607.
- Kaatsch P SC, Katalinic A, Hentschel S, Baras N, Barnes B, et al. 2012. Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes - Krebs in Deutschland 2007/2008. Robert Koch-Institut,.
- Kaskel P, Berking C, Sander S, Volkenandt M, Peter RU, Krahn G. 1999. S-100 protein in peripheral blood: a marker for melanoma metastases: a prospective 2-center study of 570 patients with melanoma. *J Am Acad Dermatol*, 41 (6):962-969.
- Kawakami Y, Battles JK, Kobayashi T, Ennis W, Wang X, Tupesis JP, Marincola FM, Robbins PF, Hearing VJ, Gonda MA, Rosenberg SA. 1997. Production of recombinant MART-1 proteins and specific antiMART-1 polyclonal and monoclonal antibodies: use in the characterization of the human melanoma antigen MART-1. *J Immunol Methods*, 202 (1):13-25.
- Kenady DE, Brown BW, McBride CM. 1982. Excision of underlying fascia with a primary malignant melanoma: effect on recurrence and survival rates. *Surgery*, 92 (4):615-618.
- Kittler H, Pehamberger H, Wolff K, Binder M. 2002. Diagnostic accuracy of dermoscopy. *Lancet Oncol*, 3 (3):159-165.
- Koyanagi K, Kuo C, Nakagawa T, Mori T, Ueno H, Lorico AR, Jr., Wang HJ, Hseuh E, O'Day SJ, Hoon DS. 2005. Multimarker quantitative real-time PCR detection of circulating melanoma cells in peripheral blood: relation to disease stage in melanoma patients. *Clin Chem*, 51 (6):981-988.

- Leiter U, Buettner PG, Eigentler TK, Garbe C. 2004. Prognostic factors of thin cutaneous melanoma: an analysis of the central malignant melanoma registry of the German dermatological society. *J Clin Oncol*, 22 (18):3660-3667.
- Long GV, Trefzer U, Davies MA, Kefford RF, Ascierto PA, Chapman PB, Puzanov I, Hauschild A, Robert C, Algazi A, Mortier L, Tawbi H, Wilhelm T, Zimmer L, Switzky J, Swann S, Martin AM, Guckert M, Goodman V, Streit M, Kirkwood JM, Schadendorf D. 2012. Dabrafenib in patients with Val600Glu or Val600Lys BRAF-mutant melanoma metastatic to the brain (BREAK-MB): a multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol*, 13 (11):1087-1095.
- Manola J, Atkins M, Ibrahim J, Kirkwood J. 2000. Prognostic factors in metastatic melanoma: a pooled analysis of Eastern Cooperative Oncology Group trials. *J Clin Oncol*, 18 (22):3782-3793.
- Marcus H. 1917. Krebszellen im strömenden Blut. *Krebsforsch*, 16:217.
- Markowitz JS, Cosimi LA, Carey RW, Kang S, Padyk C, Sober AJ, Cosimi AB. 1991. Prognosis after initial recurrence of cutaneous melanoma. *Arch Surg*, 126 (6):703-707; discussion 707-708.
- Martin VM, Siewert C, Scharl A, Harms T, Heinze R, Ohl S, Radbruch A, Miltenyi S, Schmitz J. 1998. Immunomagnetic enrichment of disseminated epithelial tumor cells from peripheral blood by MACS. *Exp Hematol*, 26 (3):252-264.
- McGovern VJ, Mihm MC, Jr., Bailly C, Booth JC, Clark WH, Jr., Cochran AJ, Hardy EG, Hicks JD, Levene A, Lewis MG, Little JH, Milton GW. 1973. The classification of malignant melanoma and its histologic reporting. *Cancer*, 32 (6):1446-1457.
- Meier F, Will S, Ellwanger U, Schlagenhauß B, Schitteck B, Rassner G, Garbe C. 2002. Metastatic pathways and time courses in the orderly progression of cutaneous melanoma. *Br J Dermatol*, 147 (1):62-70.

- Middleton MR, Grob JJ, Aaronson N, Fierlbeck G, Tilgen W, Seiter S, Gore M, Aamdal S, Cebon J, Coates A, Dreno B, Henz M, Schadendorf D, Kapp A, Weiss J, Fraass U, Statkevich P, Muller M, Thatcher N. 2000. Randomized phase III study of temozolomide versus dacarbazine in the treatment of patients with advanced metastatic malignant melanoma. *J Clin Oncol*, 18 (1):158-166.
- Mocellin S, Hoon D, Ambrosi A, Nitti D, Rossi CR. 2006. The prognostic value of circulating tumor cells in patients with melanoma: a systematic review and meta-analysis. *Clin Cancer Res*, 12 (15):4605-4613.
- Moore GE, Sandberg, A., Schubarg, J. R. . 1957. *Ann Surg* 1957, 146, 580
- Morton DL, Wanek L, Nizze JA, Elashoff RM, Wong JH. 1991. Improved long-term survival after lymphadenectomy of melanoma metastatic to regional nodes. Analysis of prognostic factors in 1134 patients from the John Wayne Cancer Clinic. *Ann Surg*, 214 (4):491-499; discussion 499-501.
- Morton DL, Wen DR, Wong JH, Economou JS, Cagle LA, Storm FK, Foshag LJ, Cochran AJ. 1992. Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. *Arch Surg*, 127 (4):392-399.
- Muller P, Weckermann D, Riethmuller G, Schlimok G. 1996. Detection of genetic alterations in micrometastatic cells in bone marrow of cancer patients by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet*, 88 (1):8-16.
- Neugebauer U, Bocklitz T, Clement JH, Krafft C, Popp J. 2010. Towards detection and identification of circulating tumour cells using Raman spectroscopy. *Analyst*, 135 (12):3178-3182.
- Orchard GE. 2000. Comparison of immunohistochemical labelling of melanocyte differentiation antibodies melan-A, tyrosinase and HMB 45 with NKIC3 and S100

protein in the evaluation of benign naevi and malignant melanoma. *Histochem J*, 32 (8):475-481.

Pachmann K, Heiss P, Demel U, Tilz G. 2001. Detection and quantification of small numbers of circulating tumour cells in peripheral blood using laser scanning cytometer (LSC). *Clin Chem Lab Med*, 39 (9):811-817.

Pachmann K, Camara O, Kavallaris A, Schneider U, Schunemann S, Hoffken K. 2005a. Quantification of the response of circulating epithelial cells to neoadjuvant treatment for breast cancer: a new tool for therapy monitoring. *Breast Cancer Res*, 7 (6):R975-979.

Pachmann K, Clement JH, Schneider CP, Willen B, Camara O, Pachmann U, Hoffken K. 2005b. Standardized quantification of circulating peripheral tumor cells from lung and breast cancer. *Clin Chem Lab Med*, 43 (6):617-627.

Pachmann K, Pizon M, Zimon D, Stein EL. 2013. MC13-0080 Somatic mutations of the EGFR, KRAS and BRAF genes: Heterogeneity in circulating epithelial tumor cells (CETC) as determined using the Cobas® Z 480 analyzer. *European Journal of Cancer*, 49.

Pachmann K, Camara O, Kavallaris A, Krauspe S, Malarski N, Gajda M, Kroll T, Jorke C, Hammer U, Altendorf-Hofmann A, Rabenstein C, Pachmann U, Runnebaum I, Hoffken K. 2008. Monitoring the response of circulating epithelial tumor cells to adjuvant chemotherapy in breast cancer allows detection of patients at risk of early relapse. *J Clin Oncol*, 26 (8):1208-1215.

Pachmann Katharina AA, Schill Erika, Köhler Katrin, Brede-Hekimian Katya and Debus Jürgen. 2012. Longitudinal monitoring of EGFR mutation and amplification status in circulating epithelial tumor cells (CETC) of lung cancer patients. *Journal of Cancer Science & Therapy*, 10.4172/1948-5956.S1.021.

- Pantel K, Brakenhoff RH, Brandt B. 2008. Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. *Nat Rev Cancer*, 8 (5):329-340.
- Pflugfelder A, Kochs C, Blum A, Capellaro M, Czeschik C, Dettenborn T, Dill D, Dippel E, Eigentler T, Feyer P, Follmann M, Frerich B, Ganten MK, Gartner J, Gutzmer R, Hassel J, Hauschild A, Hohenberger P, Hubner J, Kaatz M, Kleeberg UR, Kolbl O, Kortmann RD, Krause-Bergmann A, Kurschat P, Leiter U, Link H, Loquai C, Loser C, Mackensen A, Meier F, Mohr P, Mohrle M, Nashan D, Reske S, Rose C, Sander C, Satzger I, Schiller M, Schlemmer HP, Strittmatter G, Sunderkotter C, Swoboda L, Trefzer U, Voltz R, Vordermark D, Weichenthal M, Werner A, Wesselmann S, Weyergraf AJ, Wick W, Garbe C, Schadendorf D, German Dermatological S, DermatologicCooperative Oncology G. 2013. Malignant melanoma S3-guideline "diagnosis, therapy and follow-up of melanoma". *J Dtsch Dermatol Ges*, 11 Suppl 6:1-116, 111-126.
- Pool EH, and Dunlop, G. R. . 1934. Cancer cells in the blood stream. *Amer J Cancer*, 21, 99.
- Presant CA, Bartolucci AA. 1982. Prognostic factors in metastatic malignant melanoma: The Southeastern Cancer Study Group Experience. *Cancer*, 49 (10):2192-2196.
- Pretlow TG, Schwartz S, Giaconia JM, Wright AL, Grimm HA, Edgehouse NL, Murphy JR, Markowitz SD, Jamison JM, Summers JL, Hamlin CR, MacLennan GT, Resnick MI, Pretlow TP, Connell CF. 2000. Prostate cancer and other xenografts from cells in peripheral blood of patients. *Cancer Res*, 60 (15):4033-4036.
- Reintgen DS, Cox C, Slingluff CL, Jr., Seigler HF. 1992. Recurrent malignant melanoma: the identification of prognostic factors to predict survival. *Ann Plast Surg*, 28 (1):45-49.
- Ries LA, Wingo PA, Miller DS, Howe HL, Weir HK, Rosenberg HM, Vernon SW, Cronin K, Edwards BK. 2000. The annual report to the nation on the status of cancer, 1973-1997, with a special section on colorectal cancer. *Cancer*, 88 (10):2398-2424.

- Riethdorf S, Wikman H, Pantel K. 2008. Review: Biological relevance of disseminated tumor cells in cancer patients. *Int J Cancer*, 123 (9):1991-2006.
- Roberts DL, Anstey AV, Barlow RJ, Cox NH, Newton Bishop JA, Corrie PG, Evans J, Gore ME, Hall PN, Kirkham N. 2002. U.K. guidelines for the management of cutaneous melanoma. *Br J Dermatol*, 146 (1):7-17.
- Rodic S, Mihalciou C, Saleh RR. 2014. Detection methods of circulating tumor cells in cutaneous melanoma: A systematic review. *Crit Rev Oncol Hematol*.
- Roses DF, Karp NS, Oratz R, Dubin N, Harris MN, Speyer J, Boyd A, Golomb FM, Ransohoff J, Dugan M, et al. 1991. Survival with regional and distant metastases from cutaneous malignant melanoma. *Surg Gynecol Obstet*, 172 (4):262-268.
- Schafer BW, Heizmann CW. 1996. The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology. *Trends Biochem Sci*, 21 (4):134-140.
- Schleip K. 1906. *Z klin Med*59, 261.
- Schoenfeld A, Kruger KH, Gomm J, Sinnott HD, Gazet JC, Sacks N, Bender HG, Luqmani Y, Coombes RC. 1997. The detection of micrometastases in the peripheral blood and bone marrow of patients with breast cancer using immunohistochemistry and reverse transcriptase polymerase chain reaction for keratin 19. *Eur J Cancer*, 33 (6):854-861.
- Schultz ES, Diepgen TL, Von Den Driesch P. 1998. Clinical and prognostic relevance of serum S-100 beta protein in malignant melanoma. *Br J Dermatol*, 138 (3):426-430.
- Seal SH. 1956. *Cancer* 9, 866 (1956).
- Seregini E, Massaron S, Martinetti A, Illeni MT, Rovini D, Belli F, Agresti R, Greco M, Cascinelli N, Bombardieri E. 1998. S100 protein serum levels in cutaneous malignant melanoma. *Oncol Rep*, 5 (3):601-604.

- Smith BM, Slade MJ, English J, Graham H, Luchtenborg M, Sinnett HD, Cross NC, Coombes RC. 2000. Response of circulating tumor cells to systemic therapy in patients with metastatic breast cancer: comparison of quantitative polymerase chain reaction and immunocytochemical techniques. *J Clin Oncol*, 18 (7):1432-1439.
- Soong SJ, Harrison RA, McCarthy WH, Urist MM, Balch CM. 1998. Factors affecting survival following local, regional, or distant recurrence from localized melanoma. *J Surg Oncol*, 67 (4):228-233.
- Spriggs AI. 1959. Meeting Nov 4, 1959.
- Stewart CJ, Nandini CL, Richmond JA. 2000. Value of A103 (melan-A) immunostaining in the differential diagnosis of ovarian sex cord stromal tumours. *J Clin Pathol*, 53 (3):206-211.
- Tafra L, Dale PS, Wanek LA, Ramming KP, Morton DL. 1995. Resection and adjuvant immunotherapy for melanoma metastatic to the lung and thorax. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 110 (1):119-128; discussion 129.
- Terstappen LW, Rao C, Gross S, Weiss AJ. 2000. Peripheral blood tumor cell load reflects the clinical activity of the disease in patients with carcinoma of the breast. *Int J Oncol*, 17 (3):573-578.
- van Houten VM, Tabor MP, van den Brekel MW, Denkers F, Wishaupt RG, Kummer JA, Snow GB, Brakenhoff RH. 2000. Molecular assays for the diagnosis of minimal residual head-and-neck cancer: methods, reliability, pitfalls, and solutions. *Clin Cancer Res*, 6 (10):3803-3816.
- Ward GR. 1918. *Lancet* 1918 I, 676.
- Went PT, Lugli A, Meier S, Bundi M, Mirlacher M, Sauter G, Dirnhofner S. 2004. Frequent EpCam protein expression in human carcinomas. *Hum Pathol*, 35 (1):122-128.

- Xi L, Nicastrì DG, El-Hefnawy T, Hughes SJ, Luketich JD, Godfrey TE. 2007. Optimal markers for real-time quantitative reverse transcription PCR detection of circulating tumor cells from melanoma, breast, colon, esophageal, head and neck, and lung cancers. *Clin Chem*, 53 (7):1206-1215.
- Yu M, Bardia A, Wittner BS, Stott SL, Smas ME, Ting DT, Isakoff SJ, Ciciliano JC, Wells MN, Shah AM, Conannon KF, Donaldson MC, Sequist LV, Brachtel E, Sgroi D, Baselga J, Ramaswamy S, Toner M, Haber DA, Maheswaran S. 2013. Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition. *Science*, 339 (6119):580-584.
- Zach O, Kasparu H, Krieger O, Hehenwarter W, Girschikofsky M, Lutz D. 1999. Detection of circulating mammary carcinoma cells in the peripheral blood of breast cancer patients via a nested reverse transcriptase polymerase chain reaction assay for mammaglobin mRNA. *J Clin Oncol*, 17 (7):2015-2019.
- Zheng S, Lin H, Liu JQ, Balic M, Datar R, Cote RJ, Tai YC. 2007. Membrane microfilter device for selective capture, electrolysis and genomic analysis of human circulating tumor cells. *J Chromatogr A*, 1162 (2):154-161.

10 Anhang

10.1 Lebenslauf

Name: Thomas Stauch
Geburtstag: 29.07.1980
Geburtsort: Jena
Adresse: Am Planetarium 29, 07743, Jena

Tel.: 0178/7237979
Email: stauch.thomas@gmx.de

Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Vater: Klaus-Jürgen Stauch, Rechtsanwalt
Mutter: Dr. Martina Stauch, Fachärztin für Innere Medizin – Hämatologie und
internistische Onkologie

Schulbildung:

1987 - 1993 Grundschule, Jena
1993 - 2000 Ernst-Haeckel-Gymnasium, Jena
Leistungskurse: Mathe, Chemie Fremdsprachen: Englisch, Latein

01.11.00 - 31.08.2001 Sanitätssoldat im Standortsanitätszentrum München

Studienverlauf:

01.10.2001 eingeschrieben im Bereich Humanmedizin, Friedrich-Schiller-Universität Jena
September 2003 Bestehen der ärztlichen Vorprüfung, Jena
November 2007 Bestehen der ärztlichen Prüfung (M2)

Assistenzarztzeit:

01.04.2008-31.03..2010 Robert Koch Krankenhaus Apolda, Innere Medizin

01.04.2010-30.06.2010 Promotionstätigkeit , Friedrich-Schiller-Universität Jena

01.07.2010-30.06.2014 Universitätsklinikum Jena, Klinik für Innere Medizin II, Abteilung
Hämatologie/Onkologie

Thomas Stauch

10.2 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Andreas Hochhaus, Direktor der Abteilung Hämatologie / Internistische Onkologie des Universitätsklinikums Jena und Frau PD Dr. Katharina Pachmann, ehemalige Leitende Professorin der Onkologischen Abteilung des Forschungszentrums Lobeda des Universitätsklinikums Jena, für die Überlassung des Themas und die Betreuung während der Erstellung der Arbeit.

Für die labortechnische Unterstützung bedanke ich mich bei Conny Jörke, medizinisch technische Assistentin des onkologischen Forschungslabors.

Frau PD Dr. Annelore Altendorf-Hofmann danke ich besonders, für die wertvolle Beratung und umfangreiche Hilfe in der statistischen Auswertung meiner gewonnenen Daten.

Herrn PD Dr. Martin Kaatz, Chefarzt an der Klinik für Hautkrankheiten am SRH Wald-Klinikum Gera, danke ich für die kooperative Zusammenarbeit und Organisation der Probenentnahmen.

Desgleichen bedanke ich mich bei Herrn Dr. Steven Götze, Oberarzt der Klinik für Hautkrankheiten des Universitätsklinikums Jena, für die freundliche Kooperation.

Ein besonderer Dank gilt meiner Mutter Dr. Martina Stauch und meinem Vater Klaus-Jürgen Stauch, für die Motivation und für die Unterstützung diese Arbeit voranzutreiben.

Mein liebevoller Dank gilt meiner Freundin Franziska, die mich mit aufmunternden Worten unterstützte und somit wesentlich am Voranschreiten und am Erfolg dieser Arbeit beteiligt ist.

Abschließend gilt mein Dank meinen Freunden die mich immer ermutigten und mit zahlreichen Ratschlägen zur Seite standen.

10.3 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind, mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. Andreas Hochhaus, PD Dr. Annelore Altendorf-Hofmann, PD Dr. Katharina Pachmann.

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Unterschrift des Verfassers