Aus der Universitäts-Hautklinik Tübingen
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Röcken
Sektion für Dermatologische Onkologie
Leiter: Professor Dr. C. Garbe

Luminometrische Bestimmung von Protein S100 bei malignem Melanom

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Simon Reichenauer
aus
Berlin-Schöneberg

2006

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen
1. Berichterstatter: Professor Dr. C. Garbe
2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. P. Brossart

Meinen Eltern, meinem Bruder und
meiner Freundin

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1

1.1. Das maligne Melanom 1
1.2. Tumormarkerdefinition 2
1.3. Tumormarker für das maligne Melanom 2
1.3.1. Melanoma Inhibitory Activity (MIA) 2
1.3.2. Melaninmetabolite 4
1.3.3. Genmarker als Tumormarker, gemessen mit der reversen transkriptions-Polymerasekettenreaktion (rt-PCR) 5
1.3.4. Neuronenspezifische Enolase (NSE) 6
1.3.5. Laktatdehydrogenase (LDH), C-reaktives Protein (CRP), Albumin und alkalische Phosphatase (AP) 6
1.3.6. Zytokine, Zytokinrezeptoren, Zelladhäsionsmoleküle und Melanozyten stimulierendes Hormon (MSH) 8
1.4. Charakterisierung des S100-Proteins 9
1.5. Funktion des S100-Proteins 10
1.6. Vorkommen des S100-Proteins 10
1.7. Protein S100 beim malignen Melanom 11
1.8. Fragestellung 14

2. Material und Methoden 15

2.1. Material 15
2.1.1. Patienten 15
2.1.2. Einteilung des malignen Melanoms 16
2.1.3. Tumordicke des Primärtumors 17
2.1.4. Stadieneinteilung und TNM-Klassifikation 17
2.1.5. Reagenzien 22
2.1.6. Geräte 24
2.2. Methoden 25
2.2.1. Dokumentation der Daten 25
2.2.2. Probenvorbereitung 26
2.2.3. Bestimmung des S100 mit dem Elecsys®S100 26
2.2.4. Untersuchung der Reproduzierbarkeit 27
2.2.5. Bestimmung des S100 mit dem LIA-mat®Sangtec®100 28
2.2.6. Statistische Verfahren 29

3. Ergebnisse 31

3.1. Deskription des Patientenkollektivs 31
3.1.1. Geschlechterverteilung und Altersaufbau bei Diagnosestellung 31
3.2. Typ und Lokalisation des Primärtumors 31
3.2.1. Lokalisation des Primärtumors 31
3.2.2. Typ des Primärtumors 32
3.3. Stadienverteilungen der Patienten und deren Blutabnahmen 33
3.3.1. Stadienverteilung der Blutabnahmen 33
3.3.2. Verteilung der Proben auf die Metastasengruppen 35

3.4. Werteverteilung der Protein-S100-Bestimmungen in den Tumorstadien und Metastasengruppen 36
3.4.1. Werteverteilung der Protein-S100-Bestimmungen in den einzelnen Tumorstadien..... 36
3.4.2. Werteverteilung der Protein-S100-Bestimmungen in den einzelnen Metastasengruppen..... 43
3.5. Reproduzierbarkeit..... 49
3.6. Spezifität und Sensitivität..... 52
3.6.1. ROC-Kurven der Ergebnisse des Sangtec®100-Testes in den verschiedenen Metastasengruppen..... 53
3.6.2. ROC-Kurven der Ergebnisse des Elecsys®S100-Testes in den verschiedenen Metastasengruppen..... 55
3.6.3. Vergleich der ROC-Kurven des Elecsys®S100-Testes und des Sangtec®100-Testes in den einzelnen Metastasengruppen..... 56
3.6.4. Kombinierte ROC-Kurven für die Metastasengruppen 2, 3 und 4 für beide Testverfahren..... 60
3.7. Findung eines geeigneten cut-off-Wertes und Sensitivität und Spezifität des Elecsys®-Immunoassays 61

4. Diskussion 63

4.1. Merkmale des Patientenkollektivs und der Primärtumore 64
4.2. Werteverteilung der Protein-S100-Bestimmungen der beiden Testverfahren..... 65
4.2.1. Ergebnisse der Protein-S100-Messungen mit dem Sangtec®100-Testverfahrens..... 65
4.2.2. Ergebnisse der Protein-S100-Messungen mit dem Elecsys®S100-Testverfahren und Vergleich des Elecsys®S100 mit dem Sangtec®100 68
4.3. Reproduzierbarkeit des Elecsys®S100..... 71
4.4. Sensitivität und Spezifität beider Testverfahren und Findung eines geeigneten cut-off-Wertes für den Elecsys®S100-Immunoassay 72

5. Zusammenfassung und Schlussfolgerung 76

6. Literaturverzeichnis 78

7. Anhang 90
7.1. Erfassungsbogen 90

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Reaktionsprinzip des Elecsys®S100-Testverfahrens 27
Abbildung 2: Tumorstadienverteilung der Blutabnahmen 34
Abbildung 3: Verteilung der Patientenproben auf die Metastasengruppen 35
Abbildung 4: Boxplots der Protein-S100-Bestimmungen des Elecsys®S100 in den Tumorstadien Ia-IV 38
Abbildung 5: Boxplots der Protein-S100-Bestimmungen <0,661µg/l des Elecsys®S100 in den Tumorstadien Ia-IV 39
Abbildung 6: Boxplots der Protein-S100-Bestimmungen des Sangtec®100 in den Tumorstadien Ia-IV 41
Abbildung 7: Boxplots der Protein-S100-Bestimmungen <1,47µg/l des Sangtec®100 in den Tumorstadien Ia-IV 42
Abbildung 8: Boxplots der Protein-S100-Bestimmungen in den Metastasengruppen (Met.-Gr.) 1-4 des Elecsys®S100 45
Abbildung 9: Boxplots der Protein-S100-Bestimmungen <0,661 µg/l in den Metastasengruppen (Met.-Gr.) 1-4 des Elecsys®S100 46
Abbildung *10*: *Boxplots der Protein-S100-Bestimmungen in den Metastasengruppen (Met.-Gr.) 1-4 des Sangtec®100* 48
Abbildung 11: Boxplots der Protein-S100-Bestimmungen <1,47 µg/l in den Metastasengruppen (Met.-Gr.) 1-4 des Sangtec®100 49
Abbildung 12: Passing/Bablok-Analysen (P/B-Analysen) für die Messreihen 1 und 2 50
Abbildung 13: Passing/Bablok-Analysen (P/B-Analysen) für die Messreihen 1 und 3 50
Abbildung 14: Passing/Bablok-Analysen (P/B-Analysen) für die Messreihen 2 und 3 51
Abbildung 15: ROC-Kurven des Sangtec®100-Testes für die Metastasengruppen (Met.-Gruppen) 2-4 53
Abbildung 16: ROC-Kurven des Elecsys®S100-Testes für die Metastasengruppen (Met.-Gruppen) 2-4 55
Abbildung 17: Vergleich der ROC-Kurven der beiden Testverfahren für die Metastasengruppe (Met.-Gruppe) 2 57
Abbildung 18: Vergleich der ROC-Kurven der beiden Testverfahren für die Metastasengruppe (Met.-Gruppe) 3 58
Abbildung 19: Vergleich der ROC-Kurven der beiden Testverfahren für die Metastasengruppe (Met.-Gruppe) 4 59
Abbildung 20: Zusammenfassende ROC-Kurven von beiden Testverfahren für die Metastasengruppen 2,3, und 4 60

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Aufschlüsselung der S100-Subtypen im Gewebe 11
Tabelle 2: Anzahl der Probenabnahmen pro Patient 16
Tabelle 3: Klinische und histologische Einteilung des malignen Melanoms unter Angabe der ungefähren Häufigkeit 16
Tabelle 4: Tumordicke des Primärtumor (T) nach Breslow 17
Tabelle 5: TNM-Klassifikation der UICC von 1987 und 1997 19
Tabelle 6: Stadieneinteilung nach der AJCC und Studienklassifikation 20
Tabelle 7: Codierung der Metastasierung 21
Tabelle 8: Strukturierung der gesammelten Daten 25
Tabelle 9: Verteilung der Geschlechter in der Studienpopulation 31
Tabelle 10: Lokalisation des Primärtumors in der Studienpopulation 32
Tabelle 11: Klinischer und histologischer Typus des Primärtumors 33
Tabelle 12: Tumorstadienverteilung der Blutabnahmen 34
Tabelle 13: Verteilung der Patientenproben auf die Metastasengruppen 35
Tabelle 14: Werteverteilung des Protein S100 beim Elecsys®S100-Test in den Tumorstadien 37
Tabelle 15: Werteverteilung des Protein S100 beim Sangtec®100-Test in den Tumorstadien 40
Tabelle 16: Werteverteilung des Protein S100 beim Eelcsys®S100-Test in den Metastasengruppen 43
Tabelle 17: Werteverteilung des Protein S100 beim Sangtec®100-Test in den Metastasengruppen 47
Tabelle 18: AUC-Werte in den Metastasengruppen vom Elecsys®S100 und Sangtec®100 54
Tabelle 19: AUC-Werte der kombinierten ROC-Kurven von beiden Testverfahren 61
Tabelle 20: Mögliche cut-off-Werte des Elecsys®S100 mit Sensitivitäten und Spezifitäten 61

Abkürzungsverzeichnis

5-S-CD	5-S-Cysteinyldopa
6H5MI2C	6-Hydroxy-5-Methoxyindol-2-Carbolsäure
Abb.	Abbildung
ADO	Arbeitsgemeinschaft für Dermatologische Onkologie
AJCC	American Joint Committee on Cancer
ALM	akrolentiginöses Melanom
AP	alkalische Phosphatase
arith.	arithmetisch
BE	Blutentnahme
CRP	C-reaktives Protein
Elec.	Elecsys®S100
Geb.Dat.	Geburtsdatum
IL	Interleukin
IQA	Interquartilenabstand
kDa	kiloDalton
LDH	Laktatdehydrogenase
Lfd. Nr.	laufende Nummer
LK	Lymphknoten
LMM	lentigo-maligna Melanom
Met.-Gr.	Metastasengruppe
MIA	Melanom inhibitory activity
MSH	melanozyten stimulierendes Hormon
N	Anzahl
NM	noduläres Melanom
NSE	neuronenspezifische Enolase
Pat. Nr.	Patientennummer
P/B-Analyse	Passing/Bablok-Analyse
Perz.	Perzentile
rt-PCR	reverse transkriptions-Polymerasekettenreaktion
ROC	receiver operating characteristic
Sang.	Sangtec®100
Schf.	Schiefekoeffizient
Snr.	Serumnummer
SSM	superfiziell spreitendes Melanom
TD	Tumordicke
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
ZNS	Zentralnervensystem

1. Einleitung

1.1. Das maligne Melanom

Das maligne Melanom ist ein von Melanozyten ausgehender maligner Hauttumor. Durch sein invasives Wachstum und seine Neigung zur frühen Metastasierung gilt das Melanom als der aggressivste Hauttumor. Aufgrund seiner Entstehung aus Melanozyten, treten über 90% der Melanome in der Haut auf. Da Melanozyten auch an der Retina, an Schleimhäuten, am Innerohr und an den Meningen vorkommen, entwickeln sich in seltenen Fällen auch dort maligne Melanome. In den letzten Jahrzehnten ist weltweit ein stetiges Ansteigen der Inzidenz zu beobachten [Garbe & Blum 2001, Garbe 2000, Brochez & Naeyaert 2000, Salopek et al. 1995, Garbe et al. 1995]. Die Metastasierung des malignen Melanoms erfolgt zu ca. 70% primär lymphogen und zu ca. 30% primär hämatogen. Das Auftreten von Metastasen verschlechtert die Prognose der Erkrankung erheblich, wobei der Zeitpunkt der Metastasenentdeckung einen wesentlichen Einfluss auf die Gesamtüberlebensrate hat [Garbe et al. 2003b]. So sinkt die 10-Jahresüberlebensrate von 50-90% (je nach Tumordicke des Primarius) ohne Metastasen auf ca. 20% bei regionären Lymphknotenmetastasen und bis auf ca. 3% bei Fernmetastasen. Da der Früherkennung von Metastasen daher eine besondere Bedeutung zukommt, sollte sich der Patient in der 10 Jahre umfassenden Tumornachsorgezeit regelmäßig zu Kontrolluntersuchungen vorstellen. Je nach Tumorstadium wird der Patient klinisch untersucht, ein sonographischer Lymphknotenstatus erhoben und eine Blutuntersuchung durchgeführt. Zusätzlich kommen diverse bildgebende Verfahren zum Einsatz. [Garbe et al. 2003b].

Für die Nachsorge forscht man nach laborchemischen Parametern, die die Früherkennung von Metastasen verbessern sollen. Im Idealfall könnte ein solcher Tumormarker die Progression der Erkrankung erkennen, noch bevor dies mit meist aufwendigen, bildgebenden Verfahren der Fall wäre.

1.2. Tumormarkerdefinition

Tumormarker sind Proteine, die im gesunden Menschen physiologisch nicht oder nicht in erhöhter Konzentration vorkommen. Die Proteinstruktur besitzt im Allgemeinen einen Kohlenhydrat- und einen Lipidanteil. Der Ursprung des Markers kann im Tumor selbst liegen, indem er ihn entweder eigens synthetisiert und sezerniert oder der Marker wird beim Zerfall von Tumorzellen freigesetzt. Er kann aber auch von gesundem Gewebe als Reaktion auf den Tumor gebildet werden [Thomas 1995].

In den letzten Jahren wurden viele laborchemische Parameter auf ihre Eignung als Melanommarker überprüft. Im Folgenden sollen davon einige vorgestellt und ihre Relevanz als Tumormarker für das maligne Melanom erläutert werden.

1.3. Tumormarker für das maligne Melanom

1.3.1. Melanoma Inhibitory Activity (MIA)

Bei der Melanom Inhibitory Activity (MIA) handelt es sich um ein lösliches, 11 KiloDalton (kDa) schweres Protein. Es wurde in vitro erstmals aus dem Überstand einer menschlichen HTZ-19 Melanomzelllinienkultur isoliert [Apfel et al. 1992]. Zuerst wurde das Protein als autokrin sezernierter Tumorwachstumshemmer identifiziert [Bogdahn et al. 1989]. Nähere Untersuchungen führten aber zu der Erkenntnis, dass MIA durch Bindung an Laminin und Fibronektin die Verankerung von Melanomzellen an der extrazellulären Matrix lockert [Bosserhoff et al. 1998]. Dies führt durch eine Abrundung der Melanomzellen zu einer verminderten Gewebsadhäsion [Bosserhoff et al. 1996], was wiederum eine verstärkte Tumorinfiltration und Metastasierung begünstigen kann [Bosserhoff et al. 1998].

Die Exprimierung von MIA korreliert mit der Malignität von Hautgewebe. So fand sich in gesunder Haut, in benignen Melanozyten und benignen Naevi keine

oder eine wesentlich weniger stark ausgeprägte Exprimierung von MIA, als in malignen Melanomzellen [Bosserhoff et al. 1996]. Davon abgeleitet wurde MIA als Serummarker für das maligne Melanom etabliert [Bosserhoff et al. 1997].

Außer beim malignen Melanom wurden erhöhte MIA-Serumwerte auch bei Ovarialkarzinomen, Pankreaskarzinomen, Mammaneoplasien und Kolonkarzinomen gemessen [Bosserhoff et al. 1997]. In nicht-neoplastischem Gewebe wurde MIA in höherer Konzentration im Knorpel nach gewiesen [Dietz & Sandell 1996], wodurch sich MIA auch als potentieller Marker für die rheumatoide Arthritis anzubieten scheint [Muller-Ladner et al. 1999].

MIA und der in Kapitel 1.3. beschriebene Tumormarker S100 wurden bereits mehrmals in Studien verglichen und meist als gleichwertig beurteilt, z.B. in der Nachsorge, für das Therapiemonitoring oder als Progressionsmarker [Juergensen et al. 2001, Deichmann et al. 2001, Djukanovic et al. 2000, Schmitz et al. 2000, Deichmann et al. 1999]. MIA wurde teilweise in Untersuchungen eine höhere Spezifität [Bosserhoff et al. 1997] oder höhere Sensitivität [Tas et al. 2004] zugeschrieben. Neuere Untersuchungen sehen jedoch die Vorteile auf der Seite der S100-Bestimmung, einerseits aufgrund höherer Spezifität [Krahn et al. 2001], andererseits zeigte S100 eine bessere diagnostische Sensitivität [Garbe et al. 2003a]. Da Untersuchungen jedoch belegen, dass die MIA-Serumkonzentration, nach chirurgischer Behandlung des malignen Melanoms, eine prognostische Relevanz für die Erkrankung und die Überlebenszeit hat [Guba et al. 2002, Matsushita et al. 2002], stellt MIA dennoch einen geeigneten Tumormarker für das maligne Melanom dar, vor allem bezüglich der Aussagekraft im Bereich der Früherkennung von Metastasen, beim Therapiemonitoring und in der Prognoseabschätzung der Erkrankung.

1.3.2. Melaninmetabolite

Die Metabolite des Melaninstoffwechsels 5-S-Cysteinyldopa(5-S-CD) und 6-Hydroxy-5-Methoxyindol-2-Carbolsäure(6H5MI2C) wurden als potentielle Tumormarker beim malignen Melanom untersucht. Diese beiden Metabolite können sowohl im Serum als auch im Urin physiologisch nachgewiesen werden.

Bei Melanompatienten erwies sich 6H5MI2C als Tumormarker in mehreren Studien als unzureichend. Weder die Serum-, noch die Urinmessungen ließen eine Aussage bezüglich Metastasenfrüherkennung oder Krankheitsprogression zu. Die Konzentration von 6H5MI2C stieg in Serum und Urin entweder nicht oder sehr spät an [Horikoshi et al. 1994, Horikoshi & Ito 1992]. 5-S-CD war der 6H5MI2C in Vergleichsstudien über die Überlebensrate und Krankheitsprogression bei der Melanomerkrankung überlegen [Karnell et al. 1997, Horikoshi et al. 1994].

5-S-CD ist ein Präkursor des Phäomelanins und lässt sich im 24-Stunden-Sammelurin und im Serum nachweisen. Vorteile der Messung von 5-S-CD im Serum gegenüber der Messung im Urin sind, neben der leichteren Gewinnung, geringere Konzentrationsschwankungen und die weniger starke Beeinflussung durch das Patientenalter [Horikoshi et al. 1994]. Nachteilig ist die Beeinflussung der 5-S-CD-Konzentration durch UV-Licht, woraus sich jahreszeitliche Schwankungen ergeben [Horikoshi et al. 1994]. Eine weiteres Problem stellt bei amelanotischen Metastasen die oft fehlende Erhöhung von 5-S-CD im Serum dar [Hirai et al. 1997, Hasegawa et al. 1997, Peterson et al. 1988]. Davon unabhängig konnten bei Melanompatienten im Stadium der Fernmetastasierung anhand des 5-S-CD-Wertes Aussagen bezüglich der Überlebensrate und des Sterberisikos gemacht werden [Banfalvi et al. 2003, Wimmer et al. 1997, Sasaki et al. 1997, Horikoshi et al. 1994], deren Interpretationsmöglichkeiten jedoch durch die kleinen Patientenkollektive der Studien eingeschränkt werden.

1.3.3. Genmarker als Tumormarker, gemessen mit der reversen transkriptions-Polymerasekettenreaktion (rt-PCR)

Mit der reversen transkriptions-Polymerasekettenreaktion (rt-PCR) ist es möglich, anhand eines oder mehrerer Genmarker, Tumorzellen im peripheren Blut zu detektieren. Als Marker wurden viele Substanzen getestet, unter anderem gp100, p97, MAGE-3 und MUC 18 [Berking et al. 1999, Palmieri et al. 1999, Hoon et al. 1995]. Aufgrund zu geringer Sensitivität waren die Ergebnisse mit diesen Genmarkern jedoch nicht zufrieden stellend. Bessere Ergebnisse ergab die Tyrosinase, ein Schlüsselenzym der Melaninbiosynthese [Hoon et al. 2000, Palmieri et al. 1999, Keilholz et al. 1998]. Die Tyrosinase-spezifische rt-PCR wurde erstmals von Smith et al. (1991) beschrieben. Die Sensitivität und Spezifität waren derzeitig allerdings noch zu gering oder die PCR neigte zu vielen falsch positiven Messungen, so dass je nach Studie der Nachweis zirkulierender Tumorzellen in 0 bis 100% der Patienten gelang. Neuere Studien zeigten durch die Kombination mehrerer Marker, wie z.B. Tyrosinase und MelanA/MART-1 günstigere Ergebnisse [Brownbridge et al. 2001, Curry et al. 1999, Schittek et al. 1999b]. Mit dieser Kombination fand Schittek et al. (1999) eine ca. 30%ige Erhöhung der Sensitivität gegenüber der alleinigen Messung von Tyrosinase oder MelanA, so dass im Stadium der Fernmetastasierung positive Werte bei bis zu 52% der Patienten erzielt werden konnten. Es war jedoch nach wie vor unklar, inwieweit die rt-PCR-Analyse Aussagen bezüglich Überlebensrate, Erkrankungsprogression oder Therapiemonitoring zulässt. Reynolds et al. (2003) deutete sie dennoch als gute Methode für die Kontrolle der Effektivität seines Melanomtherapieprotokolls. Osella-Abate et al. (2003) hielt den Nachweis von Tyrosinase-mRNA für einen Progressionsindikator bei Hochrisiko-Melanompatienten. Die meisten neueren Untersuchungen sprechen aber gegen eine gute Einsatzmöglichkeit der rt-PCR bei der Melanomnachsorge und Vorhersage der Prognose [Palmieri et al. 2003, Warr et al. 2003]. Garbe et al. (2003) zeigte in einer neueren Studie mit 296 Patienten im Krankheitsstadium II oder III einen fehlenden signifikanten Zusammenhang zwischen der Detektion von peripheren Tumorzellen durch rt-PCR-Nachweis von Tyrosinase und MelanA/MART-1 und der Prognose der Patienten.

1.3.4. Neuronenspezifische Enolase (NSE)

Die Enolase ist ein aus zwei Dimeren bestehendes Enzym. Es existieren drei verschiedene Untereinheiten: α, β und γ. Die Kombinationen αγ und γγ werden aufgrund ihres Vorkommens in Neuronen und neuroendokrinen Zellen als neuronenspezifische Enolase (NSE) bezeichnet. NSE ist ein bereits etablierter Marker des kleinzelligen Bronchialkarzinoms [Cooper 1985] und des Neuroblastoms [Zeltzer et al. 1983]. Eine Erhöhung von NSE im Serum wurde auch bei apoplektischen Insulten und Kopfverletzungen beobachtet [Schaarschmidt et al. 1994, Skogseid et al. 1992].

Bei Melanompatienten, vor allem im Stadium der Fernmetastasierung, wurde eine Korrelation zwischen Tumorlast und NSE beschrieben [Buzaid et al. 1994, Couvreur et al. 1993, Hornef et al. 1992].

Die Sensitivität von S100 und NSE soll insgesamt, bezogen auf alle Tumorstadien, vergleichbar sein [Bonfrer et al. 1997]. Jedoch zeigt S100 im Stadium der Fernmetastasierung eine deutlich bessere Sensitivität und ein besseres Diskriminationsvermögen gegenüber den Stadien ohne Fernmetastasierung [Tofani et al. 1997, Guo et al. 1995].

1.3.5. Laktatdehydrogenase (LDH), C-reaktives Protein (CRP), Albumin und alkalische Phosphatase (AP)

1954 wurden erstmals Laktatdehydrogenase(LDH)-Erhöhungen bei malignen Melanomen festgestellt [Hill & Levi 1954]. Seitdem wird versucht LDH als Tumormarker zu etablieren. Es wurde berichtet, dass infolge einer LDH-Erhöhung Rückschlüsse bezüglich der Prognose und Tumorlast im fortgeschrittenem Stadium der Fernmetastasierung getroffen werden können [Balch et al. 2003, Deichmann et al. 1999], was zur Aufnahme der LDH-Messung in das aktuelle Klassifikationssystem des American Joint Committee on Cancer (AJCC) geführt hat. In diesem Stadium scheint vor allem das Vorhandensein von Lebermetas-

tasen zu erhöhten LDH-Werten zu führen [Finck et al. 1983]. Deichmann et. al. (1999) beurteilte LDH im Vergleich mit MIA und S100 als den besten Parameter in der Vorhersage von Restaging-Ergebnissen. Eine Studie über S100 zeigte dagegen bessere Ergebnisse bezüglich der Spezifität, der Sensitivität und dem positiven Vorhersagewert [Banfalvi et al. 2002].

Für das frühe Entdecken von neu aufgetretenen Metastasen erwies sich LDH als nicht geeignet und scheint daher nur als zusätzlicher Verlaufsparameter im fortgeschrittenen Melanomstadium in Frage zu kommen [Krahn et al. 2001]. Eine weitere Schwierigkeit stellt die Unspezifität der LDH dar, da bei vielen pathologischen Prozessen die mit Zellzerfall einhergehen, wie Hämolyse, Herzinfarkt und andere Malignome, eine Erhöhung auftreten kann. Zusätzlich kann LDH bei entzündlichen Prozessen wie Hepatitis und Myokarditis erhöht sein. Zusammengefasst liegt der Schwerpunkt der Bedeutung von LDH im späteren Krankheitsstadium, obwohl in einer neueren Studie über Tumornachsorge bei malignem Melanom auch schon für frühere Stadien eine LDH-Bestimmung, in Kombination mit anderen Parametern, empfohlen wurde [Garbe et al. 2003b].

Der Entzündungsparameter C-reaktives Protein (CRP) scheint laut einer neueren Studie dem LDH bei Patienten im Stadium der Fernmetastasierung überlegen zu sein [Deichmann et al. 2004]. Bereits in einer früheren Studie hatten Deichmann et al. (2001) die Überlegenheit von CRP über LDH im Therapiemonitoring erkannt. Sollten sich noch andere Studien diesen Resultaten anschließen, könnte CRP in Zukunft eine Alternative zu LDH darstellen.

Albumin, ein Serumprotein, wurde bei vielen malignen Erkrankungen als Tumormarker in Betracht gezogen. Sirott et al. (1993) berichtete, dass die Kombination von LDH und Albumin, nach der Behandlung von Melanomen, eine Vorhersage über die Überlebenswahrscheinlichkeit zulässt. Eton et al. (1998) beschrieb diese Kombination ebenfalls als unabhängigen Prognoseparameter im Stadium der Fernmetastasierung. Insgesamt scheint Albumin aber nur in Kombination mit LDH geeignet und selbst in dieser Kombination nicht zur Detektion neuer Metastasen [Krahn et al. 2001].

Die alkalische Phosphatase (AP), ein Routinelaborparameter z. B. in der Diagnostik von Gallenwegserkrankungen, wurde ebenfalls auf seine Relevanz als Tumormarker beim malignen Melanom untersucht. Einerseits als Parameter für das Tumorstaging [Gershenwald et al. 2000], andererseits in der Tumornachsorgezeit [Garbe et al. 2003a]. Die AP ist in ihrer Sensitivität und Spezifität dem Protein S100 jedoch deutlich unterlegen und die Bestimmung scheint höchstens in Kombination mit anderen Markern sinnvoll zu sein [Garbe et al. 2003b, Mohammed et al. 2001].

1.3.6. Zytokine, Zytokinrezeptoren, Zelladhäsionsmoleküle und Melanozyten stimulierendes Hormon (MSH)

Bei Melanomen wurde über erhöhte Werte des löslichen Zytokins Interleukin (IL)-2 Rezeptors (sIL-2R) und der IL-6, -8 und -10 berichtet [Boyano et al. 1997, Sato et al. 1996, Scheibenbogen et al. 1995]. Boyano et al. (1997) beschrieb eine signifikante Korrelation zwischen der sIL-2R-Konzentration und der metastatischen Progression des Melanoms. Eine Untersuchung von Vuoristo et al. (2000) ergab erhöhte Werte von IL-6 und IL-8 bei der Metastasierung. Zwei andere Studien erkannten eine Korrelation dieser beiden Interleukine mit der Tumorlast und der Zeit bis zur Tumorprogression [Mouawad et al. 2002, Mouawad et al. 1996]. Für IL-10 konnten zwar erhöhte Werte gemessen werden, allerdings bezogen auf die Metastasierung mit zu geringer Sensitivität [Sato et al. 1996]. Zusammenfassend haben die Zytokine in der Melanomdiagnostik und –nachsorge wegen zu geringer Sensitivität und Spezifität keinen Stellenwert.

Zelladhäsionsmoleküle wie das soluble cell adhesion molecule 1 (sVCAM-1) und das soluble intracellular cell adhesion molecule 1 (sICAM-1) wurden von Francke et. al. (1998) und Hirai et al. (1997) bezüglich ihrer Aussagekraft getestet. Erhöhte sVCAM-1-Werte ließen mit erhöhten LDH-Werten auf eine ungünstige Prognose schließen [Franzke et al. 1998], erhöhte sICAM-1-Werte schienen dagegen beim Monitoring von Melanompatienten hilfreich zu sein [Hirai et al. 1997]. Für beide Moleküle reichen jedoch aktuell Spezifität und Sensitivität

nicht aus, um als Tumormarker des malignen Melanoms eine Bedeutung zu besitzen.

Das Melanozyten stimulierende Hormon (MSH) erwies sich als Tumormarker beim malignen Melanom aufgrund geringer Sensitivität als ungeeignet [Schwartze & Fiedler 1994].

1.4. Charakterisierung des S100-Proteins

Das Protein S100 ist ein 21 kDa schweres Protein. Es ist löslich, sauer und thermolabil. Erstmals wurde es von Moore (1965) im Nervensystem von Rindern nachgewiesen. Die Namensgebung basiert auf der Eigenschaft des S100, selbst bei 100% gesättigter Ammoniumsulfatlösung bei neutralem pH in Lösung zu bleiben [Moore 1965]. S100 ist ein Dimer mit den zwei möglichen Untereinheiten α und β. Folglich sind die Kombination αα (S100ao), αβ (S100a), und ββ (S100b) möglich. Das Molekulargewicht der α-Untereinheit beträgt 10400 Dalton, das der β-Untereinheit 10500 Dalton [Isobe et al. 1981, Isobe & Okuyama 1981b, Isobe & Okuyama 1978, Isobe et al. 1978]. Hauptunterschied der beiden Untereinheiten α und β ist die Tryptophan-Aminosäure der α-Einheit an der 90. Stelle der 93 Aminosäuren [Isobe & Okuyama 1981a]. Die Untereinheiten werden von nicht-kovalenten Kräften zusammengehalten und zeigen zu 58% denselben Aufbau. Weiterhin teilen sich die beiden Untereinheiten die Kalziumbindungsstelle des Proteins [Isobe & Okuyama 1981b]. Die S100-Proteine bilden innerhalb der kalziumbindenden, so genannten EF-Hand-Proteine die größte Unterfamilie. Ebenfalls zu dieser Familie gehören gut charakterisierte und definierte Proteine wie das Calmodulin und Troponin C [Zimmer et al. 1995]. Als EF-Hand bezeichnet man den kalziumbindenden Bereich, dessen Helices E und F Kalzium mit hoher Affinität binden können [Schafer & Heizmann 1996]. Der S100-Protein-Familie werden mittlerweile insgesamt 17 Proteine zugerechnet, wie S100A1-A13, S100B, S100C und S100P [Schafer & Heizmann 1996, Zimmer et al. 1995].

1.5. Funktion des S100-Proteins

Obwohl die Funktion des S100 noch nicht endgültig geklärt ist, konnten einige wichtige Eigenschaften analysiert werden. So zeigte sich, dass S100 über seine kalziumbindende Eigenschaft bei wichtigen Schritten in der Zellproliferation und -differenzierung eine Rolle spielt. Dazu zählen intrazelluläre Prozesse wie Exo- und Endozytose, die Modulation von Enzymaktivitäten und die Polymerisation, bzw. Depolymeristaion des Zytoskeletts, hier speziell der Mikrotubuli [Schafer & Heizmann 1996, Kligman & Hilt 1988]. Extrazellulär ist S100 an der Apoptose, Chemotaxis und Aktivierung von Kalziumkanälen beteiligt [Schafer & Heizmann 1996, Zimmer et al. 1995]. Der zugrunde liegende Mechanismus beruht auf einer Konformationsänderung des S100 durch die Bindung von Kalzium [Clapham 1995]. Baudier et al. (1992) beobachteten in vitro eine Interaktion des S100 mit dem Tumorsuppressorprotein p53. S100 bindet an einer C-terminale Domäne des p53, wodurch dessen Phosphorylierung durch die Proteinkinase C inhibiert wird [Baudier et al. 1992]. Dadurch kann durch Unterdrückung der p53-Tumorsuppression ein Malignomwachstum begünstigt werden.

1.6. Vorkommen des S100-Proteins

Das Protein S100 wurde bereits von Moore (1965) aus dem Zentralnervensystem (ZNS) isoliert. Innerhalb des ZNS konnte S100 in Astrozyten, Oligodendrozyten, Neuronen und im peripheren Nervensystem (PNS) in Schwann-Zellen nachgewiesen werden [Stefansson et al. 1982a, Ludwin et al. 1976, Matus & Mughal 1975]. Außerdem wurde S100 in Neoplasien der genannten Nervenzelltypen, wie z. B. Schwannomen, Astrozytomen und Glioblastomen entdeckt [Fagnart et al. 1988, Van Eldik et al. 1986]. In nicht-nervalem Gewebe konnten S100 Proteine in Chondrozyten [Stefansson et al. 1982b], Langerhans-Zellen [Cho et al. 1990], Adipozyten [Hidaka et al. 1983], quergestreifter Muskulatur [Zimmer 1991], Herzmuskelzellen, in Nierenzellen [Kato & Kimura 1985]

und in T-Lymphozyten [Takahashi et al. 1985] nachgewiesen werden. Molina et al. (2002) beschrieb S100-Werte über 0,2 µg/l bei Leberzirrhose, Nierenversagen und bei von diesen Geweben ausgehenden Neoplasien. Weiterhin wurden bei zerebrovaskulären Ischämien hohe S100-Serumwerte beobachtet [Fagnart et al. 1988]. Bei Zentralnervensystem(ZNS)-Traumen, ZNS-Blutungen und bei zerebralen Ischämien wurden im Liquor hohe Protein-S100-Werte ermittelt, die mit dem Ausmaß der zerebralen Schädigung korrelierten [Hardemark et al. 1989, Aurell et al. 1989, Persson et al. 1988].

In der Haut kommt Protein S100 vor allem in junktionalen und Compound-Nävi vor, sowie in höheren Konzentrationen bei dysplastischen Nävus-Varianten [Cho et al. 1990].

Für die Unterscheidung von Tumoren und Gewebearten die S100 exprimieren, ist es wichtig zu wissen, welche Kombinationen der Untereinheiten in welchem Gewebe vorkommen. Diese Aufschlüsselung zeigt Tabelle 1 [Cochran et al. 1993].

Tabelle 1: Aufschlüsselung der S100-Subtypen im Gewebe

Gewebe	S100α	S100β
Schwann-Zellen	-	+
Neuronen	+	-
Neurofibrome	-	+
Langerhans Zellen	-	+
Interdigitierende Zellen	-	+
Malignes Melanom	+	+
Melanozytäre Nävi	+	+

- = Subtyp nicht vorhanden + = Subtyp vorhanden

1.7. Protein S100 beim malignen Melanom

1980 wies Gaynor et al. Protein S100 in 6 von 9 kultivierten Melanomzelllinien nach. Anschließend gelang ihm 1981 dieser Nachweis durch einen Immunfluoreszenztest in Melanomgewebe [Gaynor et al. 1981].

In nachfolgenden Untersuchungen wurde die Eignung des Protein S100 als diagnostischer immunhistochemischer Marker, im Speziellen auch für das amelanotische Melanom nachgewiesen [Cho et al. 1990, Cochran et al. 1982, Nakajima et al. 1982, Stefansson et al. 1982a].

Im Rahmen einer Studie über die Relevanz von Protein S100 im Serum bei Patienten mit neurologischen Tumoren und Ischämien, waren 20 Patienten mit malignem Melanom, davon 11 mit Metastasen, eingeschlossen. Hier beobachtete man erstmals bei neun von elf der Melanompatienten Erhöhungen von S100 in Serum über 0.3 µg/l [Fagnart et al. 1988]. In auf dieser Entdeckung basierenden Studien wurde S100 als aussagekräftiger prognostischer Serummarker bei Patienten mit malignem Melanom im Metastasenstadium bestätigt und erzielte im Vergleich mit anderen möglichen Tumormarkern bessere Ergebnisse bezüglich der Korrelation mit Tumorstadium und der Überlebenszeit, zeigte höhere Spezifität und Sensitivität und lieferte einen besseren prognostischen Vorhersagewert [Banfalvi et al. 2003, Garbe et al. 2003a, Krahn et al. 2001, Miliotes et al. 1996, Guo et al. 1995].

Im Folgenden werden die Einsatzmöglichkeiten von S100 im Rahmen der Melanomerkrankung aufgezeigt. Es wurde versucht, S100 als einen Tumormarker für das Melanomscreening, d. h. für die Diagnostik eines bisher unerkannten Melanomprimärtumors, zu etablieren. Die Sensitivität und Spezifität in den Stadien ohne Metastasierung war dafür jedoch nicht ausreichend [Henze et al. 1997, Guo et al. 1995]. Es wurde jedoch schon in mehreren Untersuchungen eine gute Korrelation der Serum-S100-Konzentration mit dem jeweiligen klinischen Tumorstadium nachgewiesen [Martenson et al. 2001, Kaskel et al. 1999, Guo et al. 1995]. Bei Leber- und Skelettmelanommetastasen wurden die höchsten S100-Werte gemessen [Hauschild et al. 1999c]. Dagegen waren sie in S100-positiven Patienten mit Hautmelanommetastasen niedriger [Kaskel et al. 1999]. Bei Patienten im Stadium der Fernmetastasierung zeigten erhöhte S100-Werte eine signifikante Korrelation mit der Überlebenszeit [Garbe et al. 2003a, Martenson et al. 2001]. Zudem erwies sich Protein S100 als guter Parameter zur Therapiekontrolle. Bei Patienten, die auf eine Chemotherapie ansprachen, sank der Wert, hingegen stieg er bei Therapieresistenz [Hauschild et al. 1999a,

Henze et al. 1997]. Eine wichtige Funktion hat das S100 in der Nachsorgezeit der Melanompatienten, indem es das Auftreten von Metastasen, schon vor klinischer Manifestation, anzeigen kann [Garbe et al. 2003a, Schlagenhauff et al. 2000]. In einer neueren, größeren Studie über die Tumornachsorge wird daher empfohlen, den Serum-S100-Wert regelmäßig zu bestimmen [Garbe et al. 2003b].

Im klinischen Bereich wird zur Protein-S100-Bestimmung bereits der Sangtec®100-Test der Firma Byk-Sangtec Diagnostica (inzwischen Teil der DiaSorin Diagnostika Gruppe) eingesetzt. In der klinischen Praxis ließen sich die erhobenen S100 Werte jedoch oftmals schlecht reproduzieren. Erhöhte Protein-S100-Werte ziehen Kontrollmessungen, klinische Untersuchung und meist auch bildgebende Diagnostik, wie die Ganzkörpercomputertomographie oder die Magnetresonanztomographie nach sich. So sorgen nicht-reproduzierbare Ergebnisse für Verunsicherung beim Patienten und führen oftmals zu den beschriebenen Folgeuntersuchungen. Daher ist eine gute Testreproduzierbarkeit in der Tumornachsorgezeit von erheblicher Bedeutung.

Weiterhin ist für die Etablierung eines Testverfahrens eine gute Sensitivität und Spezifität notwendig. Eine zu niedrige Sensitivität kann durch falsch negative Ergebnisse zum Übersehen einer eventuellen Krankheitsprogression führen. Dagegen hat eine zu niedrige Spezifität falsch positive Ergebnisse, also erhöhte S100-Werte, mit den oben beschriebenen Konsequenzen, zur Folge.

1.8. Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit soll die diagnostische Bedeutung des neuen Testverfahrens Elecsys®S100 von der Firma Roche Diagnostics anhand der Testreproduzierbarkeit und anhand der Spezifität und Sensitivität im Vergleich zum Sangtec®100LIA-mat®-System beurteilt werden.

Eine Schwierigkeit betrifft die Festlegung eines sinnvollen cut-off-Wertes. Der Wert wird als Grenzwert zwischen normalen und pathologischen Werten gesetzt. Bei seiner Festlegung geht man einen Kompromiss zwischen bestmöglicher Sensitivität und Spezifität ein. Je höher man den cut-off-Wert setzt, desto besser wird die Spezifität und desto niedriger die Sensitivität. Wird der cut-off-Wert zu niedrig gesetzt, ist die Sensitivität besser, jedoch auf Kosten der Spezifität.

Zu folgenden Fragestellungen soll in dieser Arbeit Stellung genommen werden:

1. Wie gut ist die Reproduzierbarkeit des Elecsys®S100-Testverfahrens?
2. Wo sollte ein cut-off-Wert des Elecsys®S100-Testverfahrens für normale und pathologische Werte gesetzt werden?
3. Wie sind Spezifität und Sensitivität des Elecsys®S100-Immunoassays im Hinblick auf Diagnostik und Melanommetastasen?

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Patienten

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Serumproben stammen aus der Universitäts-Hautklinik Tübingen. Es wurden 944 Seren von 449 am malignen Melanom erkrankten Patienten untersucht. Die Blutabnahmen wurden in der Zeit vom 29.09.1997 bis 17.11.1999 im Rahmen der Tumornachsorge vorgenommen. Bei der Probenentnahme wurden die Patienten über die Verwendung ihres Blutes zu Studienzwecken aufgeklärt.

Die für diese Arbeit benötigten klinischen Daten der Patienten wurden dem Zentralregister malignes Melanom der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft und den Krankenakten der Patienten entnommen. Die bereits vorhandenen Werte des Sangtec®100LIA-mat®-Systems entstammen den Patientenakten.

In die Studie aufgenommen wurden die sich im oben genannten Zeitraum in der Melanomnachsorge der Universitäts-Hautklinik Tübingen befindenden Patienten. Es wurden nur Blutproben von Patienten in die Studie eingeschlossen, bei denen der Blutabnahme mindestens ein zweimonatiger Nachsorgezeitraum vorausging und sich anschloss. Somit war es möglich, eine eventuelle mit der Blutprobe assoziierte Metastasierung zu erfassen und der Blutprobe zuzuordnen. Von der Studie ausgeschlossen wurden Patienten, in deren Krankheitsgeschichte Hinweise auf eine der folgenden Erkrankungen gefunden wurden: Schädel-Hirn-Trauma, Schlaganfall, Hirntumor, Hirnblutung, Neoplasien der Niere oder Leber, neurodegenerative Erkrankung oder Hirnschädigungen andere Genese, z. B. hypoxisch als OP-Komplikation.

Die Anzahl der Blutentnahmen verteilen sich auf die Patienten wie in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Anzahl der Blutentnahmen pro Patient

Anzahl der Blutent-nahmen	Anzahl der Patienten	Häufigkeit (in %)
1	174	38,8
2	139	31,0
3	82	18,3
4	36	8,0
5	10	2,2
6	5	1,1
7	2	0,5
8	1	0,2

2.1.2. Einteilung des malignen Melanoms

Klinisch und histologisch wird das maligne Melanom in die in Tabelle 3 aufgeführten Kategorien eingeordnet:

Tabelle 3: Klinische und histologische Einteilung des malignen Melanoms unter Angabe der ungefähren Häufigkeit

Name	Abkürzung	Häufigkeit (%)
superfiziell spreitendes Melanom	SSM	58
noduläres Melanom	NM	21
lentigo-maligna Melanom	LMM	9
akrolentiginöses Melanom	ALM	4
Sonderformen		5

2.1.3. Tumordicke des Primärtumors

Die Tumordicke nach Breslow ist der wichtigste Parameter für die Prognose der Erkrankung und fließt in die Stadieneinteilung mit ein (siehe Tabelle 4). Die Messung erfolgt vertikal, von der oberen Grenze des Stratum granulosum oder bei ulzerierten Tumoren von der Oberfläche des Ulkus, bis zu den am tiefsten gelegen Tumorzellen.

Tabelle 4: Tumordicke des Primärtumor(T) nach Breslow

T	Primärtumor
T1	Tumordicke ≤ 0,75 mm
T2	Tumordicke 0,76-1,5 mm
T3	Tumordicke 1,51-4,0 mm
T4	Tumordicke >4,0 mm
Ta	Satelliten-Metastasen innerhalb von 2cm vom Primär-tumor
Tb	In-transit-Metastasen vor der regionären Lymphknotenstation

2.1.4. Stadieneinteilung und TNM-Klassifikation

International hat sich zur Tumorklassifikation das TNM-System bewährt. Es beinhaltet die Ausbreitung des Primärtumors (T), den Befall von Lymphknoten (N) sowie das Auftreten von Fernmetastasen (M).

2.1.4.1. TNM-Klassifikation

Die von der Union Internationale Contre le Cancer (UICC) 1979 veröffentlichte Klassifikation orientierte sich eng an anatomischen Gesichtspunkten der Tu-

morausbreitung. Da diese Klassifikation hinsichtlich einer Aussage über die Prognose unzureichend war, schlug die UICC 1987 und unverändert 1997 die in Tabelle 5 dargestellte Einteilung vor. Inzwischen besteht eine vom American Joint Committee on Cancer (AJCC) 2001 weiterentwickelte TNM-Klassifikation, die in den T-Stadien noch Ulzerationen der Primärtumore erfasst, in den N-Stadien in Mikro- und Makrometastasierung aufschlüsselt und in den M-Stadien die viszerale Metastasierung weiter unterteilt. In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch die bis dahin gültige UICC-Einteilung verwendet, da im Nachhinein eine Übertragung aus den Krankenakten auf die neue Klassifikation nicht möglich war.

Tabelle 5: TNM-Klassifikation der UICC von 1987 und 1997

T	Primärtumor
T1	Tumordicke ≤ 0,75 mm
T2	Tumordicke 0,76-1,5 mm
T3a	Tumordicke 1,51-3,0 mm
T3b	Tumordicke 3,01-4,0 mm
T4a	Tumordicke >4,0 mm
T4b	Satellitenmetastasen innerhalb 2cm vom Primärtumor
N	regionäre Lymphknotenmetastasierung
N0	keine regionäre Lymphknotenmetastasierung
N1	regionäre Lymphknoten (LK)-Metastase(n) ≤3,0 cm
N2	regionäre Lymphknoten-Metastase(n) >3,0 cm und/oder In-transit-Metastase(n)
N2a	regionäre Lymphknotenmetastase(n) >3cm
N2b	In-transit-Metastase(n)
N2c	regionäre Lymphknotenmetastase(n) >3cm und In-transit-Metastase(n)
M	Fernmetastasierung
M0	keine Fernmetastasierung
M1a	Fernmetastasen von Haut, Subkutis oder nicht-regionären Lymphknoten
M1b	viszerale Fernmetastasen

2.1.4.2. Stadieneinteilung der American Joint Committee on Cancer(AJCC)

Von der UICC wurde anhand dieser TNM-Klassifikation das Krankheitsgeschehen in vier Stadien eingeteilt. In der vorliegenden Studie wurde jedoch wegen der Möglichkeit der differenzierteren Betrachtung die weiterentwickelte folgende Einteilung des AJCC verwendet.

Generell werden Patienten in diesem System nicht mehr zurückgestuft. Auch bei teilweiser oder kompletter Remission der Erkrankung bleibt der Patient infolgedessen in dem Stadium, in das er vor der Remission eingestuft wurde.

Tabelle 6: Stadieneinteilung nach der AJCC und Studienklassifikation

Stadium	Primärtumor	Lymphknotenbefall	Fernmetastasen
Ia	pT1	N0	M0
Ib	pT2	N0	M0
IIa	pT3	N0	M0
IIb	pT4	N0	M0
IIIa	pTa, pTb	N0	M0
IIIb	jedes pT	N1, N2	M0
IV	jedes pT	jedes N	M1

2.1.4.3. Metastasierungsgruppen

In der hier vorliegenden Studie wurden anhand des Metastasierungsmusters die in Tabelle 7 abgebildeten vier Metastasengruppen gebildet. Da in der Stadieneinteilung der AJCC, wie bereits im vorigen Abschnitt beschrieben, Remissionen nicht berücksichtigt werden, war eine weitere Codierung des Krankheitsverlaufs notwendig. Befand sich beispielsweise ein Patient mit AJCC-Stadium IV nach chirurgischer und/oder Chemotherapie in Vollremission, wurde er in der Einteilung nach der Metastasierung als metastasenfrei, also in Metastasengruppe 1 geführt und nicht mehr im Stadium IV. Auf diese Weise konnte die aktuelle Krankheitssituation der Patienten genauer abgebildet und das Ergebnis der Protein-S100-Messung danach beurteilt werden.

Tabelle 7: Codierung der Metastasierung

Codeziffer der Metastasengruppe	Metastasierung
1	keine Metastasen
2	regionäre Lymphknoten-Metastasen
3	Fernmetastasen in der Haut und/oder nicht regionärem Lymphknoten
4	viszerale Fernmetastasen

2.1.5. Reagenzien

2.1.5.1. Reagenzien des Elecsys®S100-Immunoassay

biotinilierter monoklonaler anti-S100-Antikörper (Maus)

monoklonaler Ruthenium-Komplex-gekoppelter Antikörper (Maus)

Assay Cup

Assay Tip

CalSet
Kalibrationsset

CleanCell

Control(1+2)

Mikropartikel, streptavidin-umhüllt

PreciControl

ProCell

RackPack

SysWash

Alle hier aufgeführten Reagenzien stammen von:

Roche Diagnostics,
Mannheim, Germany

2.1.5.2. Reagenzien des Sangtec®100-Immunoassays

Anti-S-100B-Antikörper-beschichtete Röhrchen
beschichtet mit monoklonalem anti-S-100B-Mausantikörper

Anti-S-100B-Tracerkonjugat, lumineszenzmarkiert, monoklonal (Maus)

Katalysator-Stammlösung

Kontrollen, hoch und niedrig

Lichttest-Reagenz

Natronlauge

Peroxid-Tabletten
zur Herstellung der alkalischen Peroxid-Lösung

Waschlösung

Alle hier aufgeführten Reagenzien stammen von:

Byk-Sangtec Diagnostica
Dietzenbach, Germany
(inzwischen Teil der DiaSorin Diagnostik Gruppe, Dietzenbach, Germany)

2.1.6. Geräte

Für die Aufbereitung der Blutproben für beide Testverfahren wurden folgende Geräte und Materialien verwendet:

Kryotubes	Greiner Labortechnik, Frickenhaussen, Germany
Mikropipetten	Eppendorf Wesseling-Berzdorf, Germany
Mikropipettenspitzen	Eppendorf
PCR-Tubes	Biozym Scientific, Oldendorf, Germany
Zentrifuge	Hettich, Vertrieb Karl Kolb KG, Dreieich, Germany

2.1.6.1. Geräte für den Elecsys®S100-Immunoassay

Elecsys® 2010	Roche Diagnostics, Mannheim, Germany

2.1.6.2. Geräte für den Sangtec®100-Immunoassay

LIA-mat® System 300	Byk-Sangtec Diagnostica Dietzenbach, Germany

2.2. Methoden

2.2.1. Dokumentation der Daten

Die Dokumentation der Patientendaten wurde nach dem im Anhang angefügten Muster durchgeführt. Die Datenbank wurde nach den in Tabelle 8 aufgeführten Gesichtspunkten strukturiert.

Tabelle 8: Strukturierung der gesammelten Daten

Spaltenkennzeichnung	Spalteninhalt
Pat. Nr.	Patientennummer, für diese Studie zugeteilt
Snr	Serumnummer (Snr) der Probe
Lfd. Nr.	laufende Nummer (Lfd. Nr.) des Patienten im Melanom-Zentralregister
Name	Name des Patienten
Geschlecht	Patientengeschlecht: 1=männlich, 2=weiblich
Geb.dat.	Geburtsdatum (Geb.dat.) des Patienten
Datum BE	Datum der Blutabnahme (BE)
Stadium	Tumorstadium des Patienten zum Zeitpunkt der Blutabnahme
S100 (µg/l) Sang.	S100 (in µg/l), gemessen mit Sangtec®100
S100 (µg/l) Elec.	S100 (in µg/l), gemessen mit Elecsys®S100
Typ	histologischer Typ des Melanoms
TD	Tumordicke (TD) in mm
OP-Monat	Operationsmonat: Monat der Exzision des Primärtumors
Lokal.	Lokalisation (Lokal.) des Primärtumors
Met.-Gr.	Metastasierungsgruppe (Met.-Gr.)

2.2.2. Probenvorbereitung

Nach der Abnahme werden die Blutproben 5 min bei 4000 Umdrehungen/Minute bei Zimmertemperatur zentrifugiert. Das Serum wird abpipettiert und, falls es in der Routine in der nächsten 4 Wochen verarbeitet wird, bei -20ºC in Kryotubes eingefroren. Werden die Proben, wie in der vorliegenden Untersuchung beim Elecsys®S100, erst später verwendet, werden sie in 250µl PCR-Tubes aliquotiert und bei -80℃ eingefroren. Das Auftauen der Proben geschieht in beiden Fällen bei Zimmertemperatur. Nach dem vortexen werden die aufgetauten Seren in die zu dem jeweiligen Test gehörigen Tubes umpipettiert.

2.2.3. Bestimmung des S100 mit dem Elecsys®S100

Das Testprinzip des Immunoassays Elecsys®S100 beruht auf einem Sandwich-Verfahren. Das im Folgenden beschriebene Testprinzip ist in Abbildung 1 illustriert.

Zuerst werden 20µl der Serum-Probe, ein biotinilierter monoklonaler S100-spezifischer Antikörper und ein, an einen Ruthenium-Komplex gekoppelter, S100-spezifischer Antikörper, inkubiert. Die beiden Antikörper binden an das in der Serum-Probe vorhandene S100-Protein und bilden so den Sandwich-Komplex. Im nächsten Inkubationsschritt werden Streptavidin-umhüllte Mikropartikel dazugegeben. Diese werden durch Interaktion von Biotin und Streptavidin an den Sandwich-Komplex gebunden. Das Reaktionsgemisch wird nun in die Messzelle gesaugt. Dort binden die Mikropartikel magnetisch an die Oberfläche einer Elektrode. Ungebundene Substanzen werden nun durch Waschen mit ProCell-Lösung entfernt. Das Anlegen von Spannung an der Elektrode führt dann zu chemoluminiszenten Emissionen, die durch einen Photomultiplier gemessen werden. Das Ergebnis wird mittels Abgleich an einer für das Gerät spezifischen Kalibrationskurve bestimmt. Der Hersteller geht von einer Messbreite von 0,002 µg/l bis 39 µg/l aus. Ein vom Hersteller empfohlener cut-off-Wert e-

xistiert bisher noch nicht. Für die vorliegende Arbeit wurde daher vorläufig der vom Hersteller des Sangtec®100-Immunoassays vorgeschlagene cut-off-Wert von 0,12 µg/l übernommen.

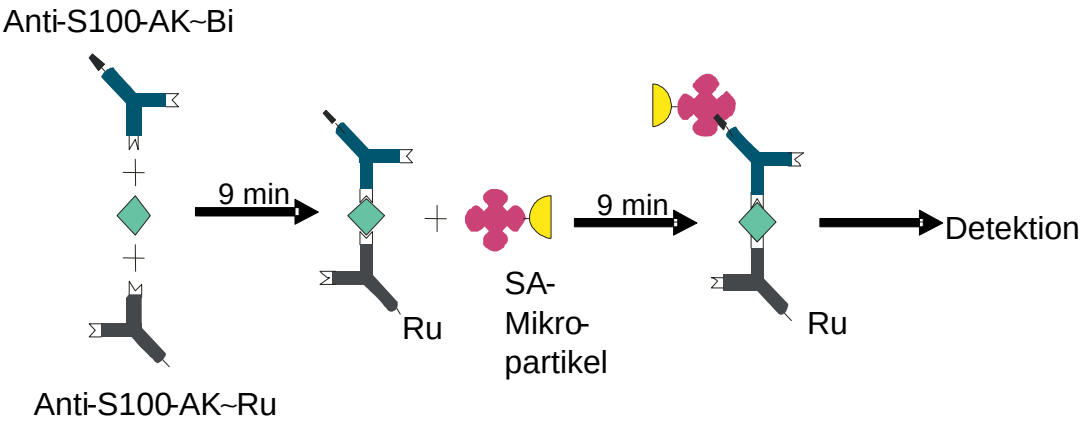


Abbildung 1: Reaktionsprinzip des Elecsys®S100-Testverfahrens; Anti-S100-AK~Bi: biotinilierter monoklonaler S100-spezifischer Antikörper; Anti-S100-AK~Ru: S100-spezifischer Antikörper, Ruthenium-Komplex gekoppelt; Ru: Ruthenium; SA-Mikropartikel: Streptavidin-umhüllte Mikropartikel

2.2.4. Untersuchung der Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit wurde in einer eigenen eintägigen Versuchsreihe ermittelt. Dazu wurden aus den 944 Seren der Studie zufällig 103 Seren herausgegriffen. Diese 103 Seren wurden dreimal in aufeinander folgenden Testreihen gemessen, wobei wichtig war, dass die 103 Seren komplett durchgemessen wurden und vor jeder Testreihe eine Kalibration des Elecsys® 2010 stattfand. Um die Reproduzierbarkeit auch bei einem Chargenwechsel zu untersuchen, wurde bei jeder Testreihe eine andere Charge der Messlösung verwendet.

2.2.5. Bestimmung des S100 mit dem LIA-mat®Sangtec®100

Außer dem LIA-mat®-Immunoassay sind noch weitere, ältere Verfahren im klinischen Einsatz. Verbreitet sind vor allem ein weiterer luminometrischer Assay, der LIASON® und das IRMA®-Testverfahren, mit radioaktiv markierten Antikörpern. Aufgrund der höchsten Sensitivität hat sich in der klinischen Routine inzwischen der LIA-mat®-Assay durchgesetzt.

Der LIA-mat®Sangtec®100 arbeitet, ähnlich dem Elecsys®S100, auch mit dem Sandwich-Prinzip. Der Test wird durch die Antikörper SMST 12, SMSK 25 und SMSK 28 definiert, welche nur an die β-Untereinheit des S100 binden. Das in der Probe vorhandene S100 bindet im ersten Schritt an einen an der Röhrchenwand immobilisierten Antikörper. Überschüssiges Material wird durch Waschen entfernt. Im Anschluss folgt die zweite Inkubation, wo nach Zugabe des anti-S100B-Tracerkonjugats, der Tracerantikörper mit dem bereits gebundenen S100 reagiert. Der entstandene Komplex wird als Tracer-S100-Komplex bezeichnet. Das anti-S100-Tracerkonjugat besteht aus dem Antikörper und einem kovalent gebundenen Isoluminolderivat. Der Überschuss an Tracerantikörper wird mittels Waschen entfernt. Nach der automatischen Injektion von alkalischer Peroxidlösung und Katalysatorlösung wird das Isoluminol oxidiert. Bei dieser Oxidation kommt es zur Emission von Photonen. Diese lichterzeugende Reaktion klingt innerhalb von nur 20s wieder ab und wird deshalb bereits in dem im LIA-mat®System 300 integrierten Luminometer gestartet. Das entstehende Lichtsignal wird mit einem Photomultiplier gemessen und ist direkt proportional zur Menge an Protein S100 in der Probe. Laut Hersteller können Konzentrationen von 0,2µg/l bis 20µg/l gemessen werden. Werte oberhalb 20µg/l können nur in einer Nachmessung mit verdünntem S100-Diluent ermittelt werden. Für die Studie wurde der vom Hersteller empfohlene cut-off-Wert von 0,12µg/l verwendet.

2.2.6. Statistische Verfahren

Für die statistische Auswertung der Daten wurden die Programme Excel, CutNROC, SPSS und SAS 8.2 (Statistical Analysis Systems) verwendet. Die weitgehend deskriptive Statistik, wie z. B. die Ermittlung der N-Zahlen, wurde mit dem Programm SAS durchgeführt.

Die receiver-operating-characteristic-Kurven (ROC-Kurven) und die darauf basierende Berechnung von Sensitivitäten und Spezifitäten ermittelte das Programm CutNROC. ROC-Kurven sind eine graphische Darstellung aller möglicher Wertepaare Sensitivität und 1-Spezifität in Abhängigkeit des jeweils zugrunde gelegten cut-off-Wertes. Im Idealfall liegt die ROC-Kurve auf der linken und oberen Begrenzungsseite des umschließenden Quadrats.

Für die Berechnung der Reproduzierbarkeit des Elecsys®S100 wurden die Regressionsgeraden und der Korrelationskoeffizient nach der Methode von Passing&Bablok ermittelt. Bei dieser Methode werden Extrema weniger stark gewichtet als bei den klassischen Berechnungsmodellen, d. h. einzelne Extrema haben weniger Einfluss auf die Berechnung der Regressionsgeraden und der Korrelation. Ein wichtiger Vorteil der Passing/Bablok-Methode betrifft die Behaftung mit Fehlern. Bei der klassischen Berechnung wird davon ausgegangen, dass die eine Methode fehlerfrei ist und die andere mit Fehlern behaftet sein darf. Bei der Passing/Bablok dürfen beide Methoden mit Fehlern behaftet sein.

Um die Ergebnisse der beiden Testverfahren Elecsys®S100 und Sangtec®100 möglichst gut vergleichen zu können, wurde neben den deskriptiven Standardparametern wie arithmetischer Mittelwert, Median, Perzentilen und Quartile auch der Schiefekoeffizient bestimmt. Er gibt an, ob eine Häufigkeitsverteilung von einer symmetrischen Verteilung (Normalverteilung) abweicht. Der Schiefekoeffizient ist null bei einer Normalverteilung, größer null bei einem Häufigkeitsgipfel, der unter dem arithmetischen Mittelwert liegt und kleiner null wenn der Häufigkeitsgipfel über dem arithmetischen Mittelwert liegt. Bei einer Schiefe > 0 spricht man von einer linkssteilen, bzw. rechtsschiefen Verteilung, bei einer Schiefe < 0 von einer rechtssteilen, bzw. linksschiefen Verteilung.

Die Boxplots mit Whiskers wurden mit dem Programm SPSS erstellt. Die untere Begrenzung der grauen Box wird durch die untere Quartile, die obere Begrenzung durch die obere Quartile gebildet. Die Linie zwischen den Quartilenbegrenzungen repräsentiert den Median. Die von den grauen Boxplots entspringenden senkrechten Linien enden in waagrechten Linien, den sogenannten oberen und unteren Whiskers. Wenn oberhalb des oberen Whiskers noch Ausreißer bestehen, wird der obere Whisker durch den Wert obere Quartile+1,5*Interquartilenabstand (IQA) berechnet, dementsprechend der untere Whisker durch die untere Quartile-1,5*IQA. Gibt es keine Ausreißer, bilden die Whiskers jeweils den niedrigsten oder höchsten Wert des Datensatzes ab.

3. Ergebnisse

3.1. Deskription des Patientenkollektivs

3.1.1. Geschlechterverteilung und Altersaufbau bei Diagnosestellung

In der Studie wurden 944 Seren von 449 Patienten untersucht. Der Abnahmezeitraum erstreckte sich vom 29.09.1997 bis 17.11.1999. Die Anzahl der Abnahmen pro Patient zeigt Tabelle 1 unter 2.1.1. Bei Diagnosestellung war der jüngste Patient 13 Jahre, der älteste 90 Jahre alt. Der Altersdurchschnitt betrug 56,2 Jahre.

Die in Tabelle 9 aufgeführte Geschlechterverteilung zeigt ein leichtes Überwiegen des weiblichen Geschlechts unter den Patienten.

Tabelle 9: Verteilung der Geschlechter in der Studienpopulation

Geschlecht	Anzahl	Häufigkeit (in %)
männlich (m)	209	46,4
weiblich (w)	240	53,6

3.2. Typ und Lokalisation des Primärtumors

3.2.1. Lokalisation des Primärtumors

Tabelle 10 zeigt die Lokalisation des Primärtumors bei Diagnose. Am häufigsten waren demnach die Lokalisationen Bein (23,64%) und Rücken (22,46). Bei 25 Patienten fehlte die Angabe der Lokalisation.

Tabelle 10: Lokalisation des Primärtumors in der Studienpopulation; unter Sonstige werden Melanome der inneren Häute subsumiert z. B. der Meningen, Schleimhäute oder Aderhaut

Lokalisation	Anzahl	Anzahl (in %)
Bein	100	22,7
Rücken	95	21,6
Sonstige	61	13,6
Arm	47	10,5
Fuß	40	8,9
Kopf/Hals	38	8,5
fehlende Angabe	25	5,6
Brust	23	5,1
Bauch	13	2,9
Hand	6	1,3

3.2.2. Typ des Primärtumors

Wie bereits in Kapitel 2.1.2 beschrieben, werden die malignen Melanome klinisch und histologisch in verschiedene Typen eingeteilt. In Tabelle 11 sind die Häufigkeiten dieser einzelnen Melanomtypen in der vorliegenden Arbeit aufgelistet. Das SSM mit 51,36% und das NM mit 26,94% sind die Melanomtypen mit dem häufigsten Auftreten innerhalb der Studienpopulation. Bei 52 Patienten fehlten die Angaben über den histologischen Typus des Primärtumors.

Tabelle 11: Klinisch und histologischer Typus des Primärtumors

Typ	Geschlecht m	w	Total	Total (in %)
SSM	104	121	225	50,1
NM	56	62	118	26,3
ALM	13	14	27	6,0
LMM	9	6	15	3,3
Sonderformen	4	8	12	2,7
unbekannt	24	28	52	11,6
Total	210	239	449	

3.3. Stadienverteilungen der Patienten und deren Blutabnahmen

3.3.1. Stadienverteilung der Blutabnahmen

Zum Zeitpunkt der Blutabnahmen befanden sich die Patienten in den in Tabelle 12 aufgeführten Tumorstadien. Die Einteilungskriterien in diese Tumorstadien sind in Kapitel 2.1.4.2 beschrieben.

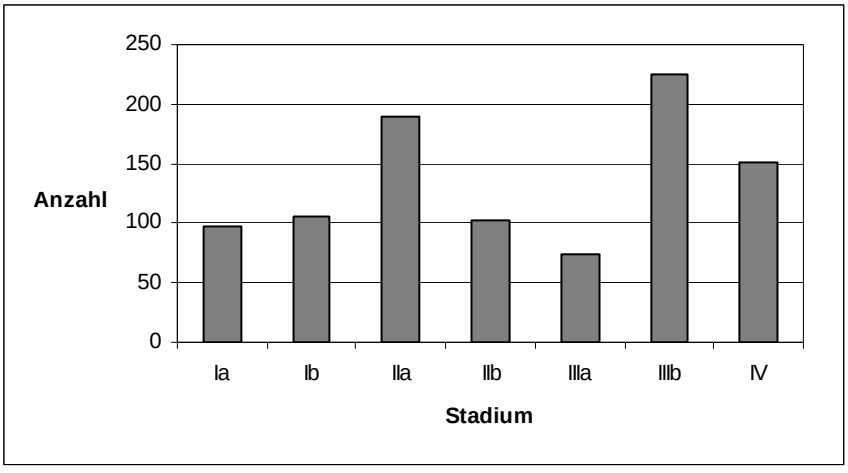
Die Stadien mit der größten Häufigkeit – IIa, IIIb und IV – umfassen 564 der 944 Proben. Die restlichen Stadien besitzen annähernd ähnliche Probenzahlen, die zwischen 74 und 105 liegen.

Tabelle 12: Tumorstadienverteilung der Blutabnahmen

Stadium	Anzahl	Häufigkeit (in %)
Ia	98	10,4
Ib	105	11,1
IIa	189	20,0
IIb	103	10,9
IIIa	74	7,8
IIIb	224	23,7
IV	151	16,0
Total	944	

In Abbildung 2 ist die Verteilung der Blutabnahmen auf die Tumorstadien graphisch dargestellt.

Abbildung 2: Tumorstadienverteilung der Blutabnahmen



3.3.2. Verteilung der Proben auf die Metastasengruppen

Die Verteilung der Proben auf die in Kapitel 2.1.4.4 beschriebenen Metastasengruppen ist in Tabelle 13 dargestellt. Die weitaus größte Gruppe bildet die tumorfreie Metastasengruppe 1 mit 821 Proben (86,97%). Die Gruppen 2 (regionäre Lymphknotenmetastasen) und 3 (Fernmetastasen in Haut/Lymphknoten) sind mit 32 (3,39 %) bzw. 21 (2,2%) Proben schwächer vertreten. Die Gruppe 4 (viszerale Fernmetastasen) besitzt mit 70 Proben einen Anteil von 7,42%.

Tabelle 13: Verteilung der Patientenproben auf die Metastasengruppen

Metastasengruppe	Anzahl	Anzahl (in %)
keine Metastasen	821	86,97
regionäre LK-Metastasen	32	3,39
Fernmetastasen in Haut/LK	21	2,2
viszerale Fernmetastasen	70	7,42

In Abbildung 3 wird durch die graphische Darstellung die Dominanz der metastasenfreien Probengruppe 1 nochmals deutlich.

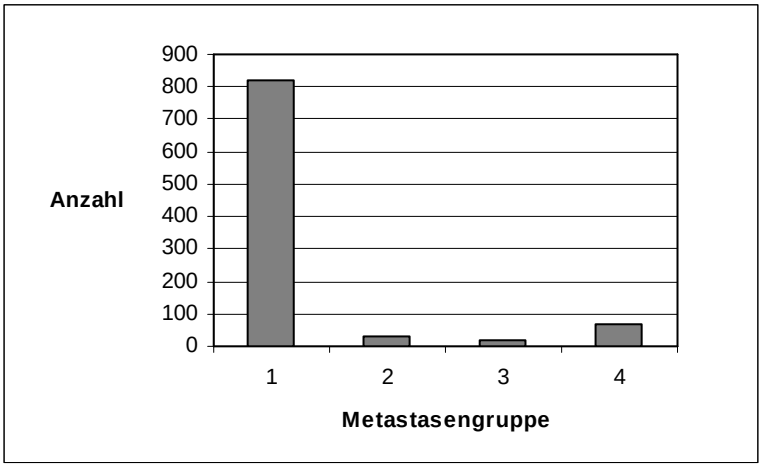


Abbildung 3: Verteilung der Patientenproben auf die Metastasengruppen; Met.-Gr. 1: metastasenfrei; Met.-Gr. 2: regionäre LK-Metastasen; Met.-Gr. 3: Fernmetastasen in Haut/LK; Met.-Gr. 4: viszerale Metastasen

3.4. Werteverteilung der Protein-S100-Bestimmungen in den Tumorstadien und Metastasengruppen

3.4.1. Werteverteilung der Protein-S100-Bestimmungen in den einzelnen Tumorstadien

3.4.1.1. Werteverteilung der Protein-S100-Bestimmugen des Elecsys®S100

Tabelle 14 zeigt, aufgeschlüsselt nach den Tumorstadien, die wichtigsten deskriptiven Daten der Messungen des Elecsys®S100. Betrachtet man die Ergebnisse stadienunabhängig, zeigt sich eine Spannbreite der Werte von 0 µg/l bis 5,01 µg/l. Der Schiefekoeffizient mit einem Wert von 14,43 belegt, dass der Häufigkeitsgipfel der gemessenen Daten unter dem arithmetischen Mittelwert von 0,077 µg/l liegt und daher eine rechtsschiefe Verteilung existiert. In den einzelnen Stadien liegen die Schiefekoeffizienten zwischen 2,49 und 11,29, sie sind also durchweg positiv, wodurch in allen Stadien eine rechtsschiefe Verteilung besteht. Die Ursache dafür liegt zum großen Teil in stark positiven Ausreißern, die das arithmetische Mittel vom Median divergieren lassen.

Tabelle 14: Werteverteilung des Protein S100 beim Elecsys®S100-Test in den Tumorstadien; arith. Mittel: arithmetischer Mittelwert; Perz.: Perzentile; Schf.: Schiefekoeffizient; Angabe der Werte in µg/l

Stadium	Anzahl	Maximum	arith. Mittel	Minimum	10. Perz.	untere Quartile	Median	obere Quartile	90. Perz.	Schf.
Ia	98	5,010	0,098	0,011	0,022	0,031	0,046	0,059	0,085	9,71
Ib	105	0,302	0,046	0,003	0,016	0,027	0,038	0,055	0,068	3,98
IIa	189	0,254	0,053	0,007	0,020	0,028	0,041	0,061	0,093	2,49
IIb	103	0,240	0,049	0,000	0,022	0,033	0,048	0,062	0,076	3,05
IIIa	74	1,150	0,083	0,014	0,029	0,037	0,048	0,063	0,096	5,31
IIIb	224	2,520	0,069	0,004	0,017	0,026	0,043	0,058	0,088	11,29
IV	151	2,980	0,144	0,000	0,027	0,035	0,057	0,110	0,265	6,75
alle Stadien	944	5,010	0,077	0,000	0,020	0,030	0,045	0,063	0,104	14,41

Im Stadium Ia fällt die große Spannweite (Spannweite=Maximum-Minimum) von 4,999 µg/l auf. Wie in den Boxplots (Abb. 4 und 5) ersichtlich, ist dafür ein Ausreißer verantwortlich, der auch den Maximalwert aller Stadien mit 5,010 µg/l bildet. Der arithmetische Mittelwert des Stadiums Ia von 0,098 µg/l ist verglichen mit denen der restlichen Stadien hoch und wird nur noch durch den des Stadiums IV übertroffen. Wie auch in den Boxplots gut zu erkennen, zeigen sich die ersten 4 Stadien als insgesamt sehr homogen verteilt, wohingegen die Stadien IIIa, IIIb und IV stärker durch Ausreißer beeinflusst sind. Während die Stadien Ia-IIIb in den oberen Quartilen und den 90. Perzentilen nur geringe Schwankungen zeigen, besteht jeweils eine deutliche Erhöhung dieser Parameter vom Stadium IIIb zum Stadium IV. Da im Stadium IV bereits eine Fernmetastasierung, z.B. in innere Organe besteht, ist hier eine Häufung von höheren S100-Werten zu erwarten gewesen. Auch das arithmetische Mittel ist im Stadium IV am größten, jedoch ist aufgrund der hier bestehenden symmetrischeren

Verteilung der Werte, die Differenz zwischen dem Median des Stadiums IV und dem der anderen Stadien gering.

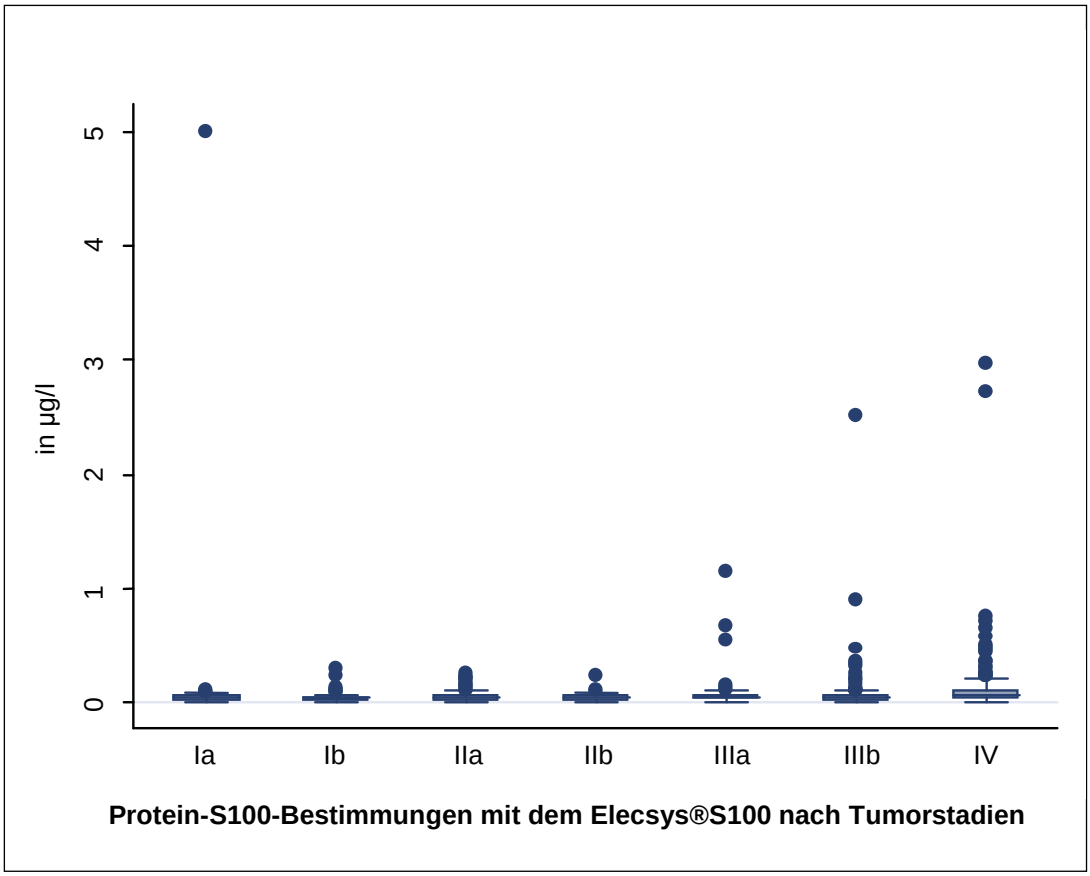


Abbildung 4: Boxplots der Protein-S100-Bestimmungen des Elecsys®S100 in den Tumorstadien Ia-IV

Um die Anschaulichkeit zu erhöhen, zeigt Abb. 5 die Boxplots aus Abb. 4 nur mit den Werten bis 0,661µg/l, der 99. Perzentile der Protein-S100-Bestimmungen. Dadurch werden die starken Ausreißer ausgeschlossen und der Fokus auf den niedrigen Wertbereich gerichtet, in welchem eine starke Wertekonzentration besteht. Auf diese Weise lässt sich der kleine IQA der Stadien Ia-IIIb, also der Wertbereich zwischen der oberen und unteren Quartile in dem 50% der Werte liegen, gut erkennen.

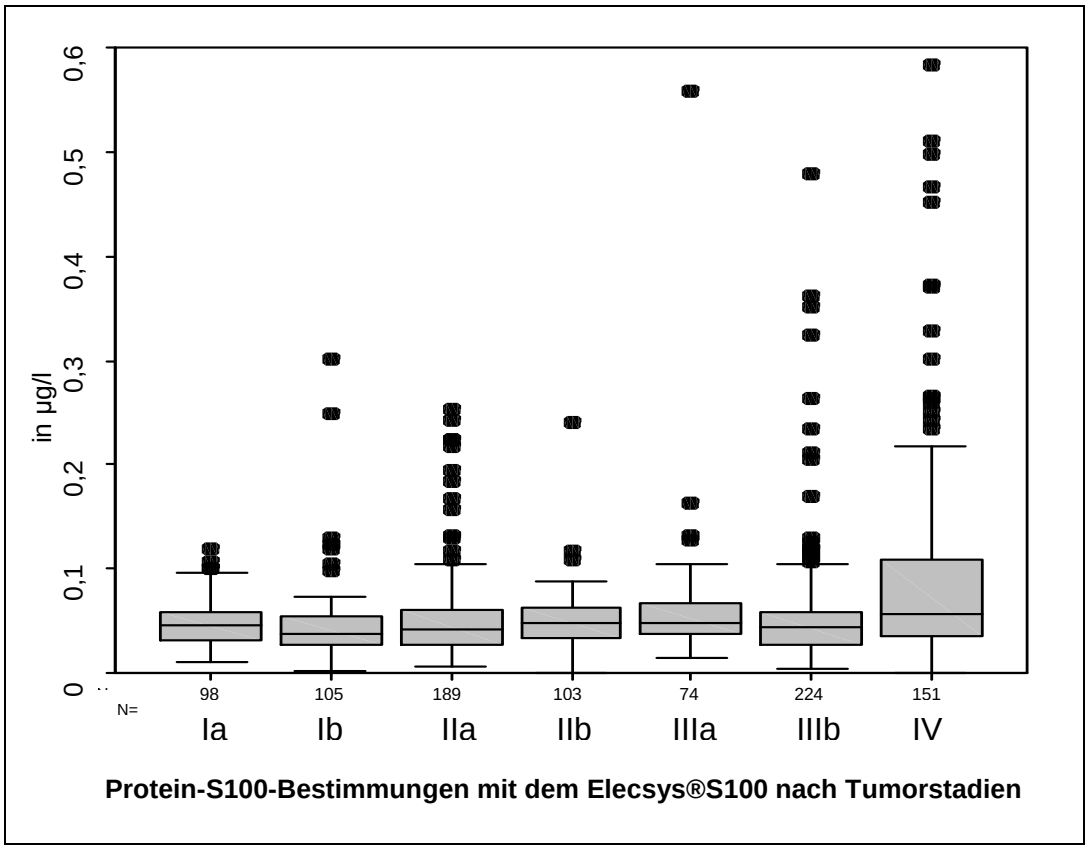


Abbildung 5: Boxplots der Protein-S100-Bestimmungen <0,661µg/l des Elecsys®S100 in den Tumorstadien Ia-IV; N: Anzahl

3.4.1.2. Werteverteilung der Protein-S100-Bestimmungen des Sangtec®100 in den Tumorstadien und Vergleich mit dem Elecsys®S100

Die wichtigsten deskriptiven Ergebnisse der Protein-S100-Bestimmungen des Sangtec®100 zeigt die Tabelle 15. Die Spannbreite der Werte aller Stadien reicht von 0 µg/l bis 9,87 µg/l. Mit dem Schiefekoeffizienten von 14,57 ist die Häufigkeitsverteilung der des Elecsys®S100 sehr ähnlich, und weist auch hier auf einen Häufigkeitsgipfel unter dem stadienunabhängigen arithmetischen Mittelwert des Sangtec®100 von 0,1 µg/l hin.

Tabelle 15: Werteverteilung des Protein S100 beim Sangtec®100-Test in den Tumorstadien; arith. Mittel: arithmetischer Mittelwert; Perz.: Perzentile; Angabe der Werte in µg/l; Schf.: Schiefekoeffizient

Stadium	An-zahl	Maxi-mum	arith. Mittel	Mini-mum	10. Perz.	untere Quar-tile	Me-dian	obere Quar-tile	90. Perz.	Schf.
Ia	98	0,840	0,054	0,000	0,000	0,010	0,030	0,070	0,111	6,21
Ib	105	0,170	0,030	0,000	0,000	0,000	0,020	0,040	0,074	2,09
IIa	189	0,270	0,041	0,000	0,000	0,000	0,020	0,060	0,115	1,89
IIb	103	0,220	0,044	0,000	0,000	0,010	0,030	0,070	0,096	1,77
IIIa	74	1,760	0,105	0,000	0,000	0,010	0,030	0,063	0,145	4,52
IIIb	224	5,360	0,100	0,000	0,000	0,000	0,020	0,060	0,120	9,73
IV	151	9,870	0,289	0,000	0,000	0,020	0,050	0,160	0,714	7,76
alle Stadien	944	9,870	0,100	0,000	0,000	0,010	0,030	0,068	0,130	14,57

Mit diesen 0,1 µg/l liegt der Sangtec®100-Durchschnittswert um 30% höher als der Durchschnitt des Elecsys®S100 von 0,077 µg/l. Dies gilt aber nicht generell für alle Stadien. In den Stadien Ia-IIb liegt der Elecsys®S100 sogar um 81%, 53%, 29% bzw. 11% höher als der Sangtec®100. Das Ausmaß der Erhöhung nimmt aber von Stadium Ia-IIb kontinuierlich ab, bis es im Stadium IIIa zum Umschlag kommt und nun der Sangtec®100 um 27% höher liegt. Dieser Trend setzt sich, noch verstärkt, in den Stadien IIIb und IV fort, wo der Sangtec®100 dann 45% bzw. 101% höher als der Elecsys®S100 liegt.

Die 10. Perzentile aller Stadien, sowie die unteren Quartilen der Stadien Ib, IIa und IIIb liegen beim Sangtec®100 bei 0,00 µg/l. Da auch die unteren Quartilen der restlichen Stadien Ia, IIb und IIIa mit 0,01 µg/l und Stadium IV mit 0,02relativ niedrig liegen, charakterisieren diese Umstände insgesamt eine Ballung der Testergebnisse im niedrigen Wertebereich. Tatsächlich ergab der Sangtec®100-Test bei 228 der 944 Proben, das entspricht 24,2%, den Wert

0,00 µg/l. Demgegenüber stehen nur 2 Proben, also 0,2% der Gesamtprobenzahl, denen durch den Elecsys®S100 0,000 µg/l zugeordnet wurden.

Die Mediane des Sangtec®100 liegen in allen Stadien zwischen 12,3% im Stadium IV und 53,5% im Stadium IIIb unter den Medianen des Elecsys®S100. Die oberen Quartilen beider Testverfahren differieren nicht mehr so stark: In den Stadien Ib, IIa und IIIb, besitzt der Elecsys®S100 noch um 37,5%, 1,7% bzw. 3,4% höhere obere Quartilen. Im Stadium IIIa sind sie identisch und in den Stadien Ia, IIb und IV ist der Sangtec®100 in seinen oberen Quartilen um 18,6%, 12,9% bzw. 45,5% höher als der Elecsys®S100. Bei der 90. Perzentile liegt der Sangtec®100 in allen Stadien höher, am deutlichsten um 169,4% im Stadium IV. Dies lässt sich durch die in der Abb. 6 gut zu erkennende, um 50% höhere Ausreißerquote und das allgemein höher Ergebnisniveau des Sangtec®100 vor allem in diesem Stadium erklären.

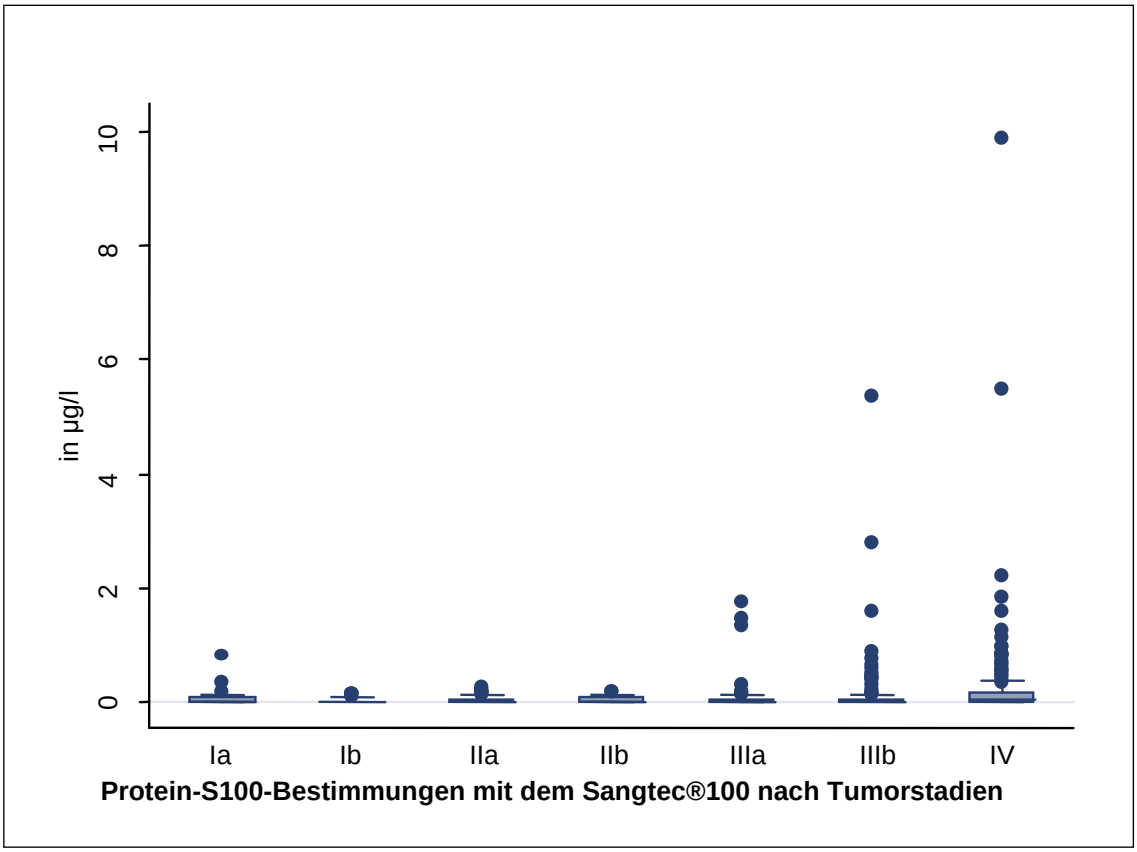


Abbildung 6: Boxplots der Protein-S100-Bestimmungen des Sangtec®100 in den Tumorstadien Ia-IV

Ähnlich wie beim Elecsys®S100 befindet sich beim Sangtec®100 der Großteil der gemessenen Werte im niedrigeren Bereich, deshalb werden die Ergebnisse bis zur 99. Perzentile, die 1,47 µg/l beträgt, nochmals gesondert in der Abb. 7 dargestellt. Verglichen mit der Abb. 5 des Elecsys®S100-Testes, sind auch beim Sangtec®100 die IQAs in den ersten 6 Stadien klein. Jedoch liegen diese jeweiligen 50% der Werte auf einem niedrigeren Niveau als beim Elecsys®S100, so dass sich in den Stadien Ib, IIa und IIIb kein unterer Whisker bilden kann. Verantwortlich ist dafür vor allem die hohe Anzahl der Messungen von 0,00 µg/l Protein S100 des Sangtec®100.

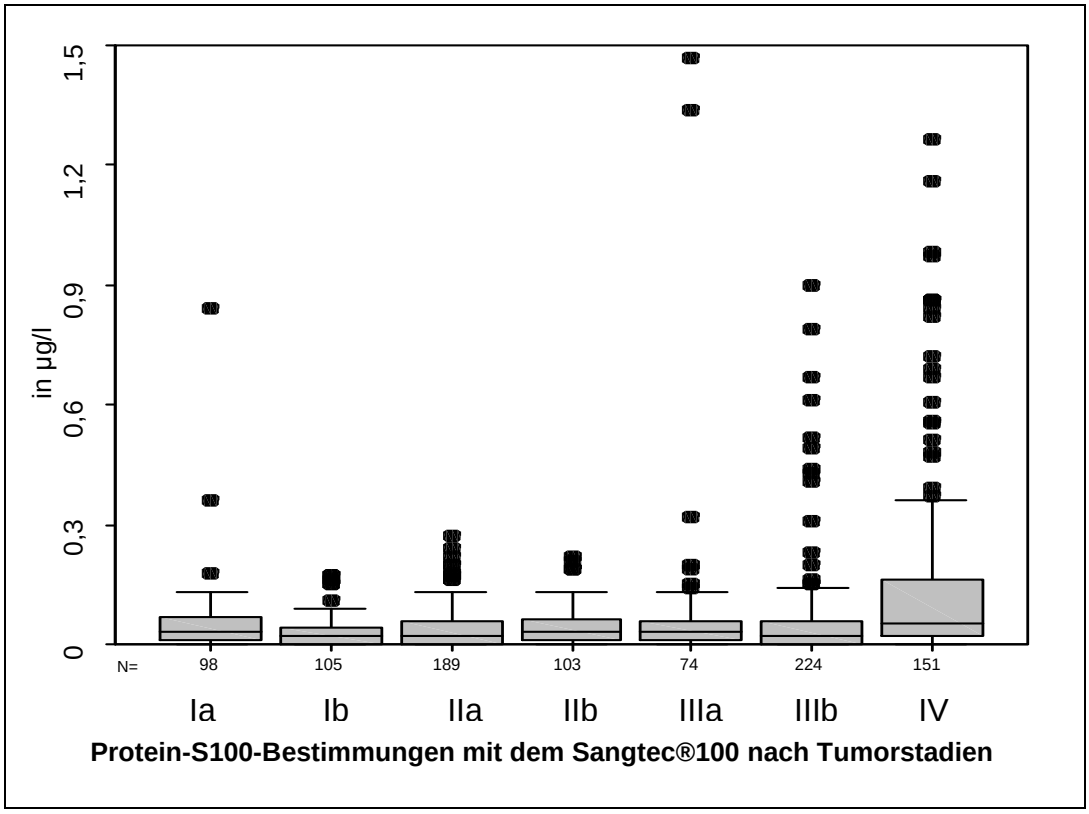


Abbildung 7: Boxplots der Protein-S100-Bestimmungen <1,47µg/l des Sangtec®100 in den Tumorstadien Ia-IV; N: Anzahl

3.4.2. Werteverteilung der Protein-S100-Bestimmungen in den einzelnen Metastasengruppen

Um eine Aussage über die S100-Serumwerte beim metastasierten malignen Melanom zu bekommen, wurden die Messergebnisse nach der Zugerhörigkeit zu den in Kapitel 2.1.4.3 beschriebenen Metastasengruppen aufgeschlüsselt.

3.4.2.1. Werteverteilung der Protein-S100-Bestimmungen des Elecsys®S100 in den einzelnen Metastasengruppen

In Tabelle 16 sind die wichtigsten deskriptiven Parameter der Protein-S100-Bestimmungen des Elecsys®S100 in den Metastasengruppen dargestellt.

Tabelle 16: Werteverteilung des Protein S100 beim Eelcsys®S100-Test in den Metastasengruppen; Met.-Gr.: Metastasengruppe; Met.-Gr.1: metastasenfrei; Met.-Gr.2: regionäre LK-Metastasen; Met.-Gr.3: Fernmetastasen in Haut/LK; Met.-Gr.4: viszerale Fernmetastasen; arith. Mittel: arithmetischer Mittelwert; Perz.: Perzentile; Schf.: Schiefekoeffizient; Angabe der Werte in µg/l

Met.-Gr.	An-zahl	Maxi-mum	arith. Mittel	Minimum	10. Perz.	untere Quartile	Median	obere Quartile	90. Perz.	Schf.
1	821	5,010	0,058	0,000	0,020	0,030	0,044	0,060	0,082	24,92
2	32	2,52	0,131	0,008	0,012	0,033	0,047	0,068	0,112	5,25
3	21	0,511	0,173	0,027	0,027	0,054	0,116	0,278	0,441	0,98
4	70	2,980	0,238	0,012	0,027	0,032	0,089	0,237	0,523	4,48
alle Stadien	944	5,010	0,077	0,000	0,020	0,030	0,045	0,063	0,104	14,41

Bei Betrachtung der arithmetischen Mittelwerte zeigt sich bei aufsteigenden Metastasengruppen, anders als in den Einteilungen nach Tumorstadien in den Kapiteln 3.4.1.1 und 3.4.1.2, ein fortlaufender, relativ kontinuierlicher Anstieg. Abweichend verhalten sich die Mediane, da sie in den Metastasenstadien 1 (metastasenfrei) und 2 (regionäre LK-Metastasen) annähernd gleich groß sind, dann von der Gruppe 2 auf 3 (Fernmetastasen in Haut/LK) um 147% steigen, aber von der Gruppe 3 auf 4 (viszerale Fernmetastasierung) um 23% abfallen.

Interessanterweise sind in der Metastasengruppe 3 nicht nur der Median, sondern auch die untere und obere Quartile größer als in der Metastasengruppe 4 (Abb. 8 und 9). Ursache ist teilweise das Fehlen von Ausreißern und die symmetrischere Verteilung der Ergebnisse in der 3. Gruppe. Erkennbar ist diese Symmetrie unter anderem an der mit 0,484 µg/l kleinsten Spannweite aller 4 Gruppen und am Schiefekoeffizient, der mit 0,98 zwar wie in allen Metastasengruppen positiv, und damit auf eine rechtssteile Verteilung hinweisend ist, aber dennoch deutlich unter dem der Gruppe 4 mit 4,48 liegt. Das im Vergleich zur 3. Gruppe höhere arithmetische Mittel der Metastasengruppe 4 kommt vor allem durch einige Ausreißer zustande.

In der oberen Quartile und der 90. Perzentile unterscheiden sich jeweils die Metastasengruppen 1 und 2 und die Gruppen 3 und 4 nur geringfügig. Aber bei beiden Parametern gibt es zwischen der noch fernmetastasenfreien Gruppe 2 und der bereits fernmetastasierten Gruppe 3 einen Sprung von 309% bei der oberen Quartile bzw. 294% bei der 90. Perzentile.

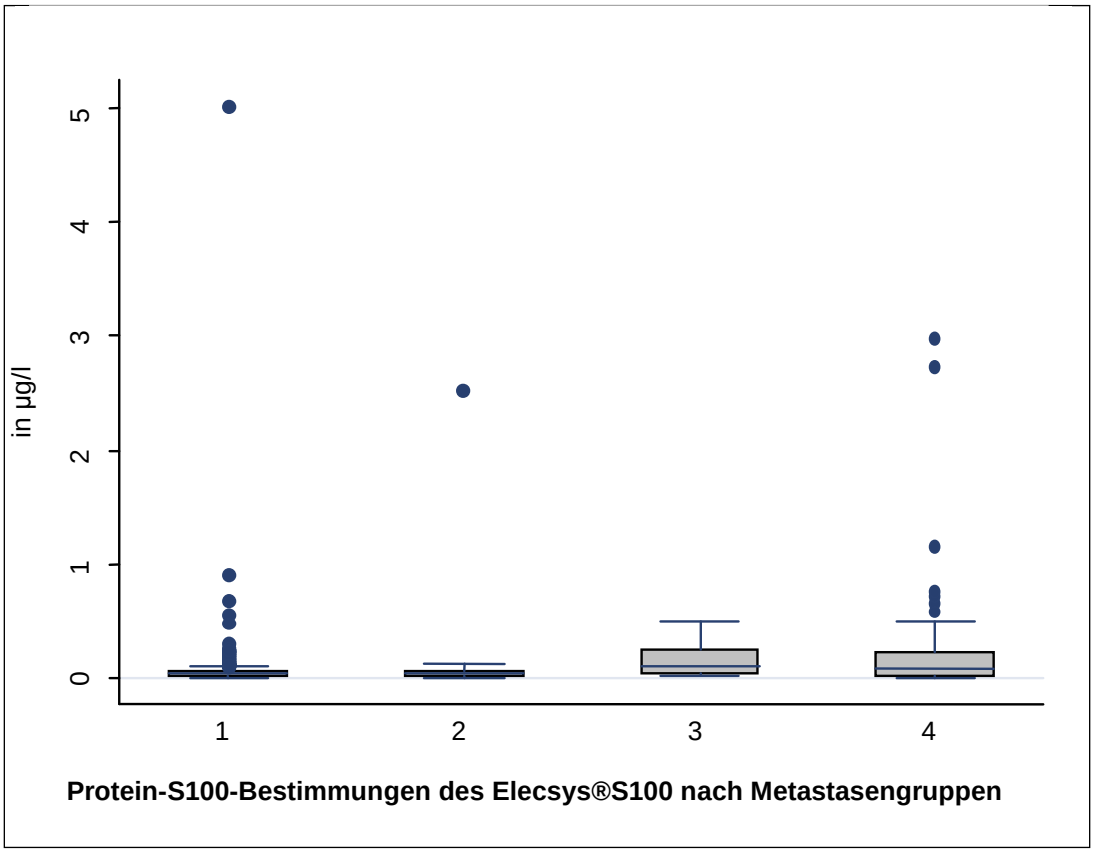


Abbildung 8: Boxplots der Protein-S100-Bestimmungen in den Metastasengruppen (Met.-Gr.) 1-4 des Elecsys®S100;
Met.-Gr.1: metastasenfrei; Met.-Gr.2: regionäre LK-Metastasen; Met.-Gr.3: Fernmetastasen. in Haut/LK; Met.-Gr.4: viszerale Fernmetastasen

Abb. 9 zeigt die Protein-S100-Werte nochmals im Boxplot bis zur 99. Perzentile, beinhaltet also alle Werte unterhalb 0,661µg/l. In dieser Ausschnittsvergrößerung lassen sich besonders gut die Verhältnisse im unteren Wertebereich erkennen. Die mit 821 Proben größte Gruppe 1 zeigt eine offensichtliche Konzentration der Werte um 0,05 µg/l. So liegen allein 50% aller Werte der Gruppe zwischen 0,03 µg/l und 0,06 µg/l und nur 10% befinden sich unter 0,02 µg/l, bzw. über 0,082 µg/l. Der stark positive Schiefekoeffizient von 24,92 bestätigt die Erwartung einer ausgeprägt rechtsschiefen Verteilung mit einem Häufigkeitsgipfel unter dem arithmetischen Mittel von 0,058 µg/l.

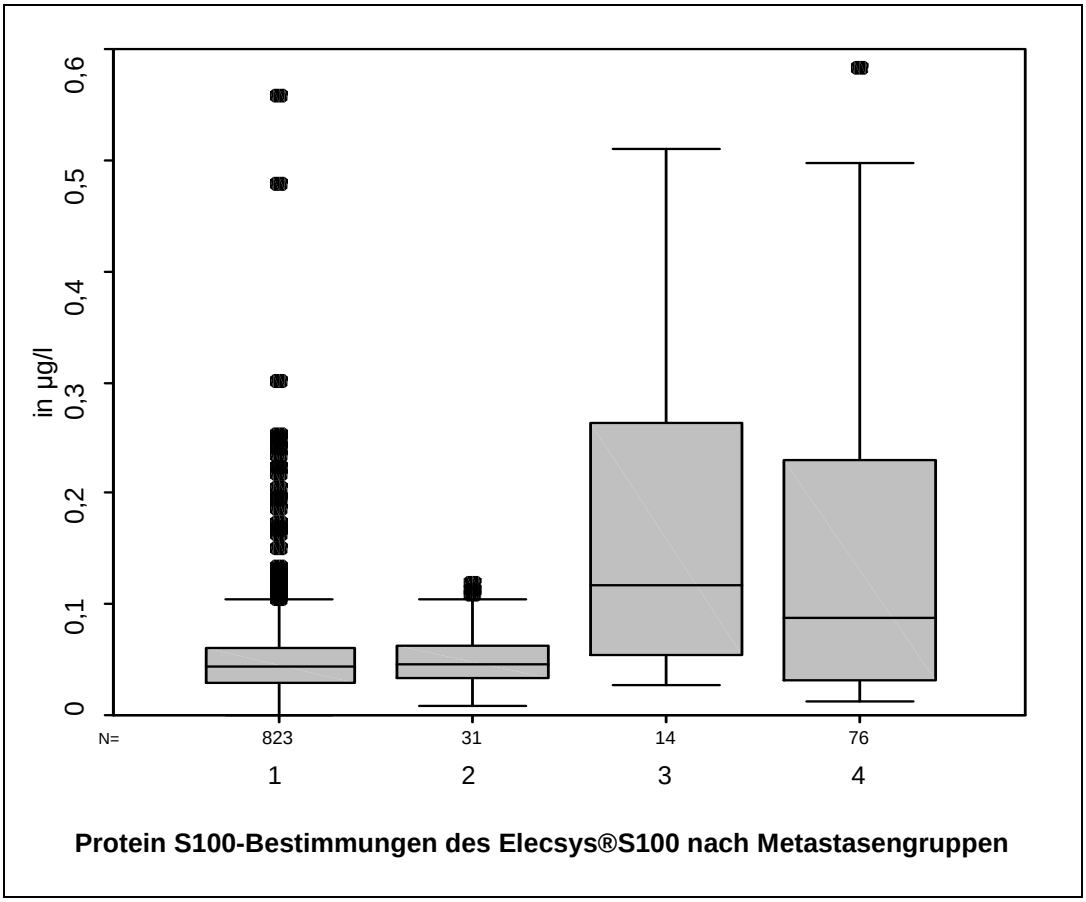


Abbildung 9: Boxplots der Protein-S100-Bestimmungen <0,661 µg/l in den Metastasengruppen(Met.-Gr.) 1-4 des Elecsys®S100; N: Anzahl; Met.-Gr.1: metastasenfrei; Met.-Gr.2: regionäre LK-Metastasen; Met.-Gr.3: Fernmetastasen. in Haut/LK; Met.-Gr.4: viszerale Fernmetastasen

Ähnlich verhält es sich In der Metastasengruppe 2, die mit 32 Proben wesentlich kleiner ist. Dort sind 50% der Bestimmungen zwischen 0,033 µg/l und 0,068 µg/l, die Häufigkeitsverteilung ist mit einem Schiefekoeffizient von 5,25 ebenfalls rechtsschief. Der Interquartilenabstand (IQA), der sich aus der Subtraktion der oberen von der unteren Quartilen ergibt, ist dementsprechend für die Metastasengruppe 1 0,03 µg/l und die Gruppe 2 0,035 µg/l. Die Gruppen 3 und 4 besitzen verglichen damit wesentlich größere IQAs von 0,224 µg/l und 0,205 µg/l, auch gut an den größeren Boxplots dieser Gruppen in Abb. 9 zu erkennen.

3.4.2.2. Werteverteilung der Protein-S100-Bestimmungen des Sangtec®100 in den einzelnen Metastasengruppen und Vergleich mit dem Elecsys®S100

Für den Sangtec®-Test sind die wichtigsten deskriptiven Parameter der Metastasengruppen in der Tabelle 17 dargestellt.

Tabelle 17: Werteverteilung des Protein S100 beim Sangtec®100-Test in den Metastasengruppen; Met.-Gr.: Metastasengruppe; Met.-Gr.1: metastasenfrei; Met.-Gr.2: regionäre LK-Metastasen; Met.-Gr.3: Fernmetastasen in Haut/LK; Met.-Gr.4: viszerale Fernmetastasen; arith. Mittel: arithmetischer Mittelwert; Perz.: Perzentile; Schf.: Schiefekoeffizient; Angabe der Werte in µg/l

Met.-Gr.	Anzahl	Maximum	arith. Mittel	Minimum	10. Perz.	untere Quartile	Median	obere Quartile	90. Perz.	Schf.
1	821	2,800	0,053	0,000	0,000	0,000	0,020	0,060	0,100	11,01
2	32	5,360	0,221	0,000	0,000	0,000	0,020	0,090	0,138	5,25
3	21	0,970	0,299	0,020	0,020	0,038	0,170	0,490	0,880	0,96
4	70	9,870	0,517	0,000	0,000	0,030	0,160	0,518	1,034	5,58
alle Stadien	944	9,870	0,100	0,000	0,000	0,010	0,030	0,068	0,130	14,57

Wie bereits im Kapitel 3.4.1.2 für die Tumorstadien Ia-IIIb beschrieben, ordnet der Sangtec®100 auch aufgeschlüsselt nach den Metastasengruppen vielen Proben den Wert 0,00 µg/l zu. Dies betrifft vor allem die Metastasengruppen 1 und 2. In der Met.-Gruppe 1 sind es 210 der 821 Proben (25,6%) und in der Met.-Gruppe 2 10 der 32 Proben (31,3%). In beiden Gruppen befinden sich 50% der Werte unterhalb 0,02 µg/l. Als Vergleich sind beim Elecsys® in der Met.-Gruppe 1 nur 10% und der Met.-Gruppe 2 nur 16% der Werte unter 0,02 µg/l. Ein Messergebnis von 0,00 µg/l wurde in der 1. Gruppe des Elecsys®S100 nur bei 2 Proben, also 0,2% und in der 2. Gruppe bei keiner Probe bestimmt.

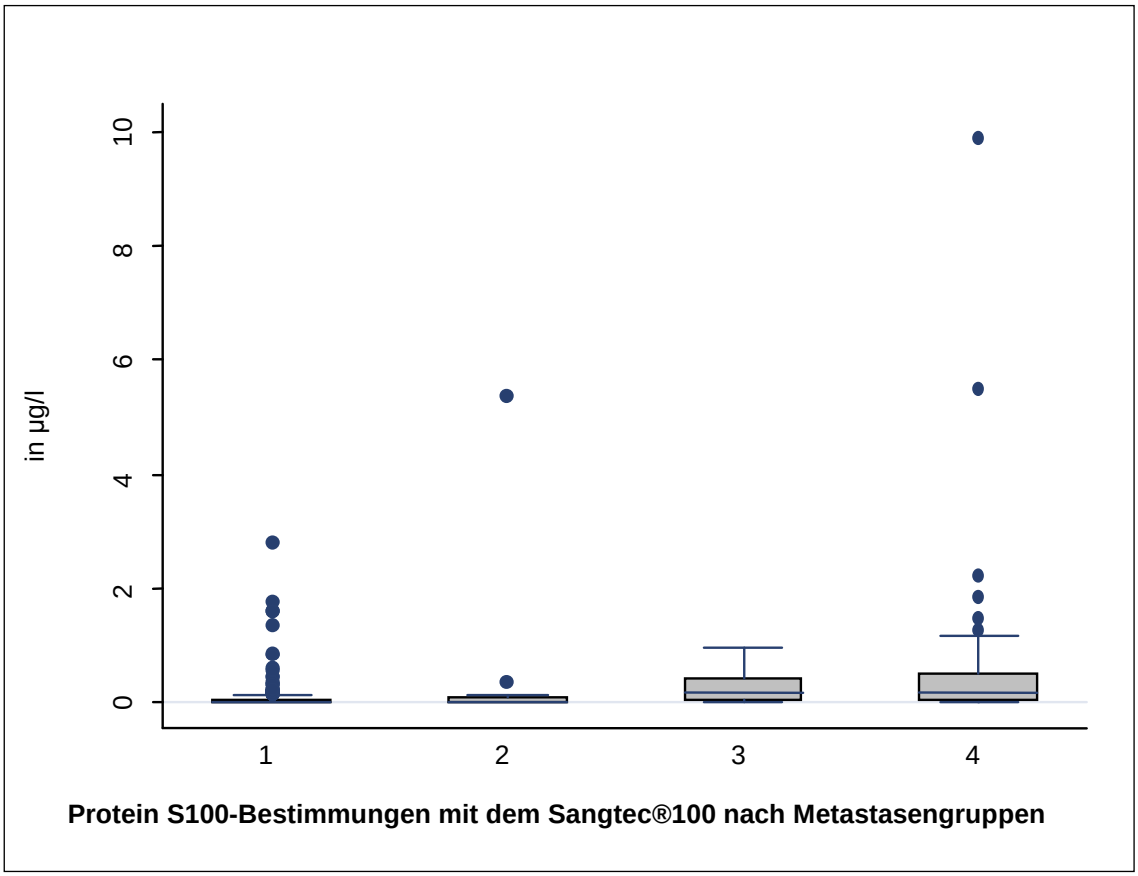


Abbildung 10: Boxplots der Protein-S100-Bestimmungen in den Metastasen-gruppen(Met.-Gr.) 1-4 des Sangtec®100; Met.-Gr.1: metastasenfrei; Met.-Gr.2: regionäre LK-Metastasen; Met.-Gr.3: Fernmetastasen. in Haut/LK; Met.-Gr.4: viszerale Fernmetastasen

In den Abbildungen 10 und 11, die die Ergebnisse für den Sangtec®100 als Boxplots darstellen, kann man gut erkennen, dass der Median, die obere Quartile und der IQA von der fernmetastasenfreien Gruppe 2 zur fernmetastasierten Gruppe 3 deutlich ansteigen. Der Median liegt sowohl in der Gruppe 3 mit 0,17 µg/l, als auch in der Gruppe 4 mit 0,16 µg/l bereits über dem cut-off-Wert. Wie in der Einteilung nach Tumorstadien sind die Mediane der ersten beiden Met.-Gruppen des Sangtec®100 niedriger als die des Elecsys®S100 und zwar um 54,5% bzw. 57,4%. Da in den Metastasengruppen 3 und 4 die Mediane des Sangtec®100 jedoch um 46,6% bzw. 79,8% über die des Elecsys®S100 ansteigen, scheint er auf Metastasen überschießender zu reagieren.

Die Schiefekoeffizienten des Sangtec®100-Testes sind, äquivalent zum Elecsys®S100-Test, in allen Stadien positiv, es liegt also auch hier ein asymmet-

risches Verteilungsmuster vor, wobei der Häufigkeitsgipfel jeweils unter dem arithmetischen Mittelwert liegt.

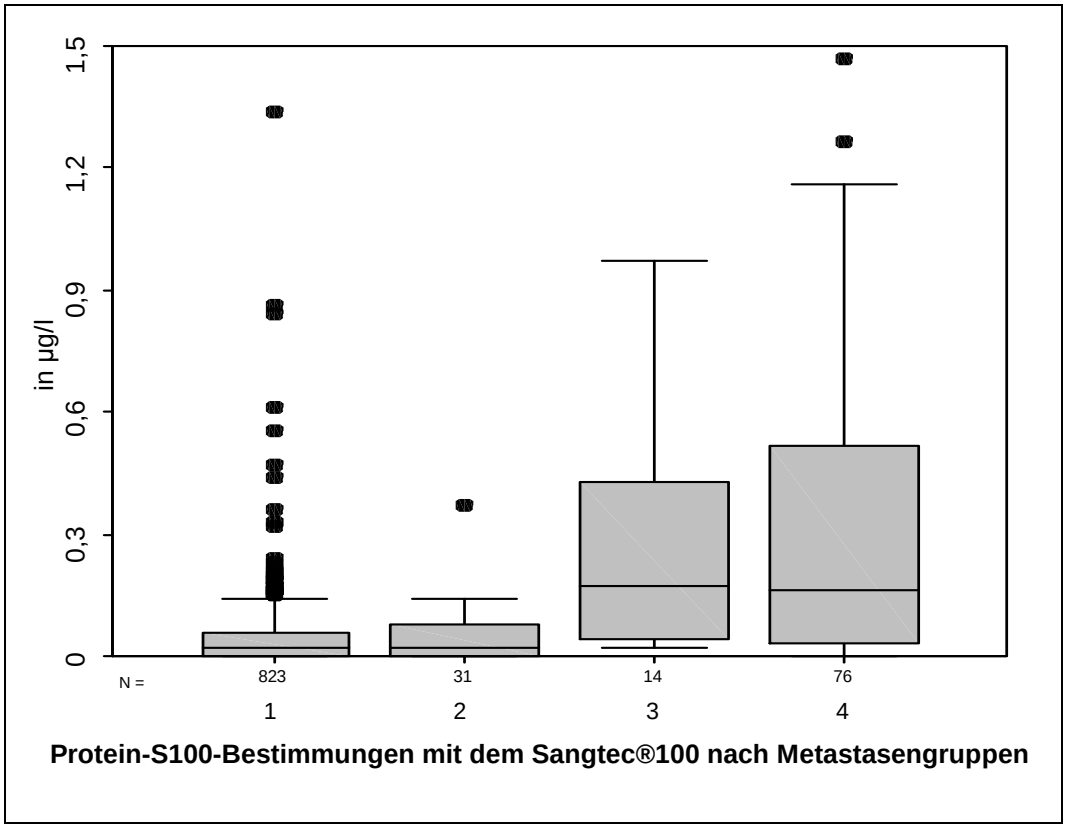


Abbildung 11: Boxplots der Protein-S100-Bestimmungen <1,47 µg/l in den Metastasengruppen(Met.-Gr.) 1-4 des Sangtec®100; N: Anzahl; Met.-Gr.1: metastasenfrei; Met.-Gr.2: regionäre LK-Metastasen; Met.-Gr.3: Fernmetastasen. in Haut/LK; Met.-Gr.4: viszerale Fernmetastasen

3.5. Reproduzierbarkeit

Um die Reproduzierbarkeit des Elecsys®-Testverfahrens zu ermitteln wurde der in Kapitel 2.2.4 beschriebene Testaufbau verwendet. Mit den Ergebnissen aus den drei, mit jeweils unterschiedlichen Chargen, durchgeführten Messreihen wurden nach dem Modell von Passing/Bablok die Regressionsgeraden erstellt und die Korrelationskoeffizienten berechnet. Die Ergebnisse von jeweils zwei der drei Messreihen wurden miteinander verglichen und die Korrelation berechnet. In den Abbildungen 12-14 sind die Analysen dargestellt.

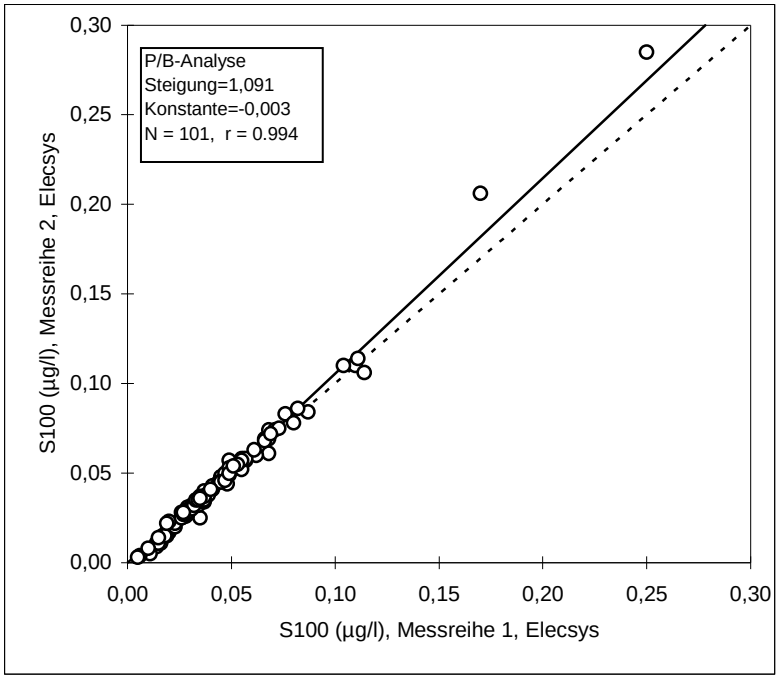


Abbildung 12: Passing/Bablok-Analysen(P/B-Analysen) für die Messreihen 1 und 2 mit jeweils unterschiedlichen Chargen zur Ermittlung der Reproduzierbarkeit; N=Anzahl, r=Korrelationskoeffizient

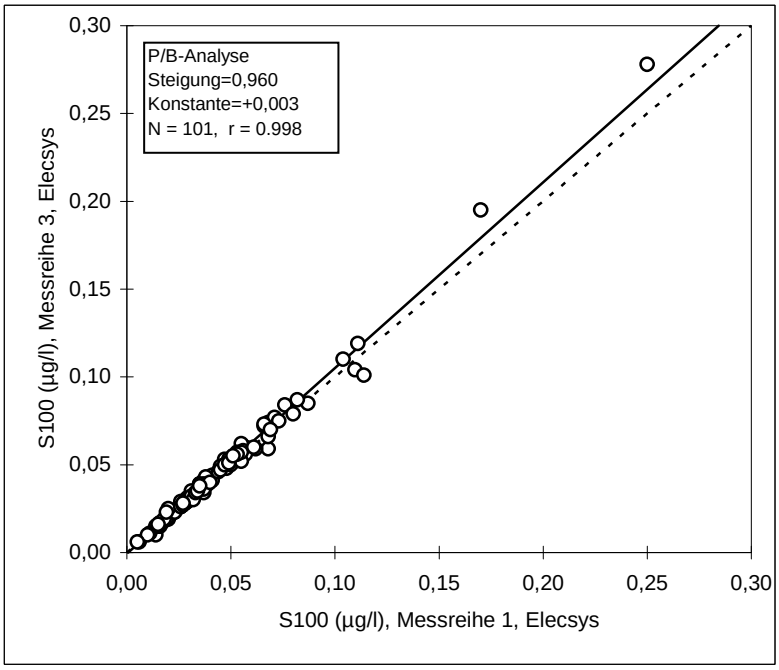


Abbildung 13: Passing/Bablok-Analysen(P/B-Analysen) für die Messreihen 1 und 3 mit jeweils unterschiedlichen Chargen zur Ermittlung der Reproduzierbarkeit; N=Anzahl, r=Korrelationskoeffizient

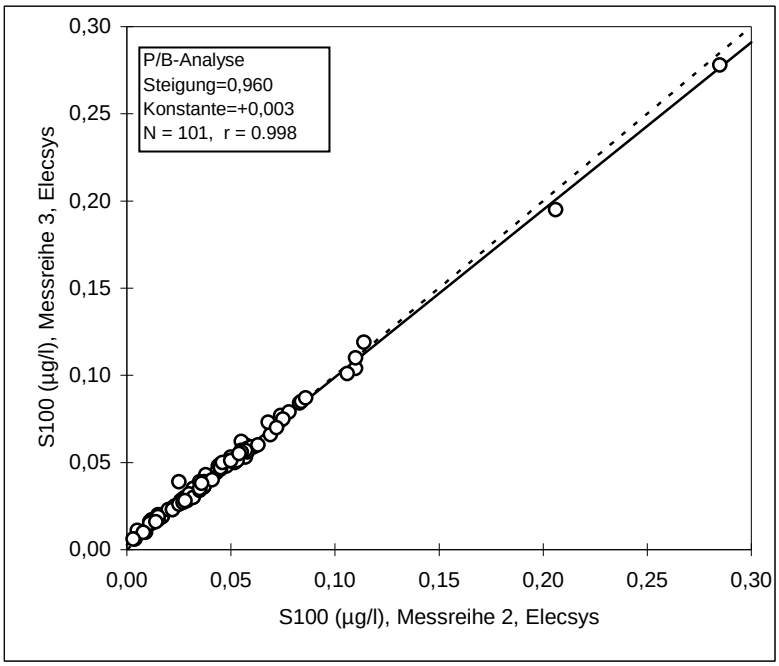


Abbildung 14:Passing/Bablok-Analysen(P/B-Analysen) für die Messreihen 2 und 3 mit jeweils unterschiedlichen Chargen zur Ermittlung der Reproduzierbarkeit; N=Anzahl, r=Korrelationskoeffizient

Für eine ideale Reproduzierbarkeit müsste die Steigung der Regressionsgeraden 1, die Konstante 0 und der Korrelationskoeffizient r 1 betragen. Wie in den Grafiken ersichtlich, ergeben die Vergleiche der 3 Messreihen untereinander Steigungen von 1,091 bzw. zweimal 0,960. Die Konstanten betragen -0,003 bzw. zweimal +0,003 und liegen damit nahe dem erwünschten Nullpunkt. Damit übereinstimmend bestätigen die Korrelationskoeffizienten von 0,994 und zweimal 0,998 die Annahme einer guten Reproduzierbarkeit des Elecsys®S100-Testverfahrens.

3.6. Spezifität und Sensitivität

Die Grundlage der Berechnungen der ROC-Kurven sind die Ergebnisse der Metastasengruppenaufteilung. In den ROC-Kurven werden die Wertepaare von Spezifität und Sensitivität für alle möglichen cut-off-Werte innerhalb des Messbereichs aufgetragen. Entlang der Abszisse werden die Werte 1-Spezifität angezeigt, entlang der Ordinate die Sensitivitäten. Durch eine winkelhalbierende Gerade durch den Nullpunkt wird das Schaubild in zwei Dreiecke unterteilt. Unterscheidet sich die Kurve von der Diagonalen und verläuft im oberen der beiden gebildeten Dreiecke des Schaubildes, weist der Test Trennschärfe auf. Je größer der Abstand der ROC-Kurve von der Diagonalen desto größer ist die Trennschärfe. Die Idealkurve mit 100% Trennschärfe verläuft demnach an der rechten und oberen Begrenzung des Diagramms.

Ein Maß für die Güte des Testes ist die so genannte area under the curve (AUC), die Fläche unterhalb der ROC-Kurve. Die AUC kann Werte zwischen 0,5 und 1 annehmen, je näher der Wert an 1 liegt, desto besser ist die Testgüte und damit das Differenzierungsvermögen des Testes zwischen gesunden und kranken Patienten.

Im Folgenden werden die ROC-Kurven der beiden Testverfahren Sangtec®100 und Elecsys®S100 und die Ergebnisse der Spezifitäten- und Sensitivitäten-Berechnung dargestellt.

3.6.1. ROC-Kurven der Ergebnisse des Sangtec®100-Testes in den verschiedenen Metastasengruppen

In Abbildung 15 sind die ROC-Kurven für den Sangtec®100-Test dargestellt.

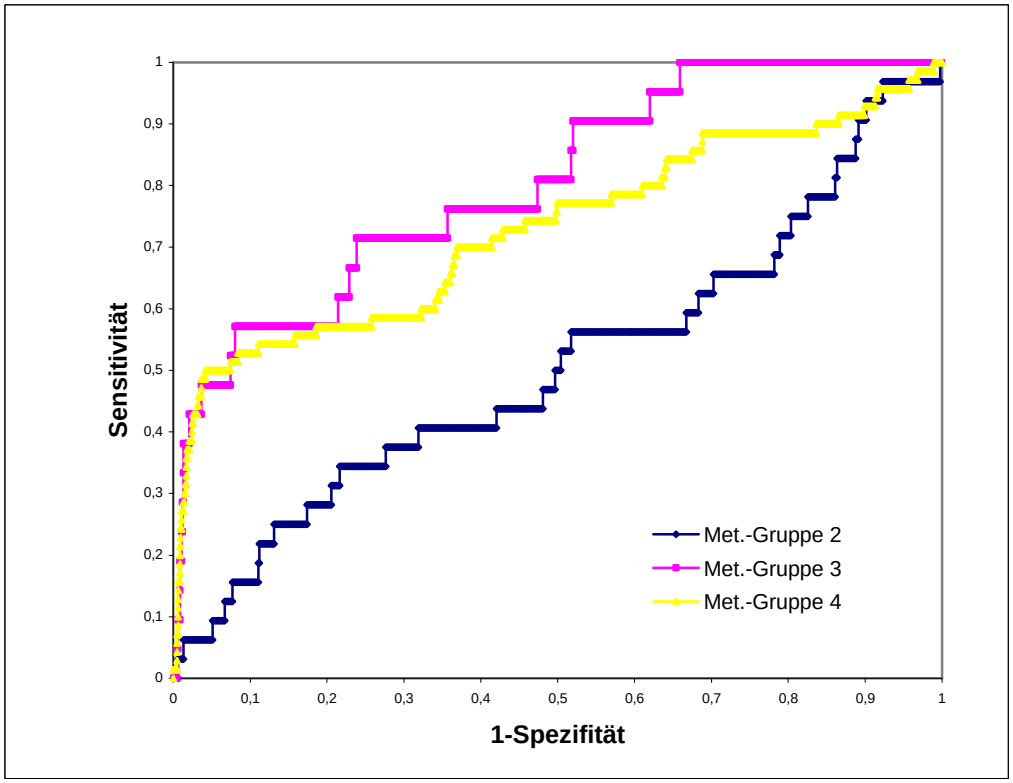


Abbildung 15: ROC-Kurven des Sangtec®100-Testes für die Metastasengruppen(Met.-Gruppen) 2-4

Die Kurve der Metastasierungsgruppe 2 liegt überwiegend auf der Diagonalen des Diagramms. Dies deutet auf eine geringe Trennschärfe hin. Da die AUC für diese Metastasierungsgruppe, wie in Tabelle 18 ersichtlich, nur 0,56 beträgt, kann man von einer geringen Testgüte für diese Gruppe ausgehen.

Den günstigsten Kurvenverlauf zeigt die ROC-Kurve der Metastasierungsgruppe 3. Sie weicht am stärksten von der Diagonalen ab und verläuft am deutlichsten der dargestellten ROC-Kurven am linken und oberen Diagrammrand, das heißt sich nähert sich am deutlichsten dem idealen Kurvenverlauf an.

Durch den beschrieben guten Kurvenverlauf ist die AUC mit 0,82 auch die Höchste der ermittelten ROC-Kurven.

Für die Metastasierungsgruppe 4 stellt sich die ROC-Kurve im Anfangsteil, also bei hoher Spezifität, vergleichbar der Kurve für die Metastasierungsgruppe 3 dar, das heißt dass sie ebenfalls ähnlich steil ansteigt und bei steigender Sensitivität eine gute Spezifität beibehält. Bei einer Sensitivität von circa 50% zeigt sich jedoch ein starker Knick der Kurve und sie verläuft anschließend flacher, was einen raschen Abfall der Spezifität in diesem Bereich zur Folge hat.

Tabelle 18: AUC-Werte in den Metastasengruppen vom Elecsys®S100 und Sangtec®100

Kurve	AUC
Metastasengruppe 2 Elecsys®	0,53
Metastasengruppe 3 Elecsys®	0,78
Metastasengruppe 4 Elecsys®	0,68
Metastasengruppe 2 Sangtec®	0,56
Metastasengruppe 3 Sangtec®	0,82
Metastasengruppe 4 Sangtec®	0,76

3.6.2. ROC-Kurven der Ergebnisse des Elecsys®S100-Testes in den verschiedenen Metastasengruppen

Die ROC-Kurven des Elecsys®S100-Testes bezogen auf die einzelnen Metastasierungsgruppen zeigt die Abbildung 16.

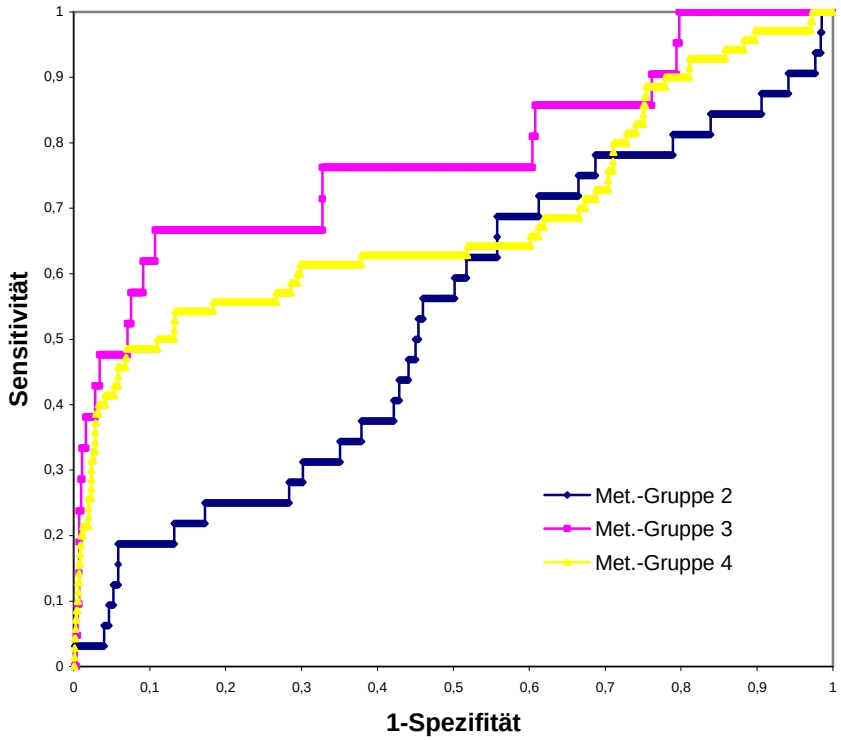


Abbildung 16: ROC-Kurven des Elecsys®S100-Testes für die Metastasengruppen(Met.-Gruppen) 2-4

Die Kurve der Metastasierungsgruppe 2 verläuft im Bereich höherer Spezifitäten überwiegend auf der Diagonalen, im Bereich niedriger Spezifitäten verläuft die Kurve leicht oberhalb von der Diagonalen. Insgesamt ist die Trennschärfe dementsprechend niedrig. Die AUC von 0,53 befindet sich an der Untergrenze der möglichen AUC-Werte (Untergrenze=0,5) und spricht daher für eine schwache Testgüte in dieser Met.-Gruppe.

Die Kurve der Metastasengruppe 3 ist in ihrem Verlauf günstiger. Sie zeigt am Kurvenbeginn einen steilen Anstieg, welcher ab einer Spezifität von unge-

fähr 90% stark abflacht. Die gute Diskriminierung von der Diagonalen wird auch durch eine AUC von 0,78 bestätigt.

Für die Metastasengruppe 4 besteht ebenfalls bei hohen Spezifitäten ein steiler Anstieg der Kurve, jedoch mit einem nachfolgenden raschen Abfall der Steigung bei circa 92% Spezifität. Bei niedrigen Spezifitäten besteht ein zweiter Wendepunkt in der Kurve, dadurch zeigt sie hier nochmals eine Steigerung der Steigung. Die relativ niedrige AUC von 0,68 resultiert teilweise aus dem beschriebenen, zu frühen ersten Steigungsabfall.

3.6.3. Vergleich der ROC-Kurven des Elecsys®S100-Testes und des Sangtec®100-Testes in den einzelnen Metastasengruppen

In diesem Kapitel sollen für die entsprechenden Metastasengruppen die jeweiligen ROC-Kurven der beiden Testverfahren miteinander verglichen werden.

3.6.3.1. Vergleich für die Metastasengruppe 2

In Abbildung 17 wird der Vergleich der beiden Kurven der Metastasengruppe 2 dargestellt, in der sich Patienten im Stadium der regionären Lymphknotenmetastasierung befinden.

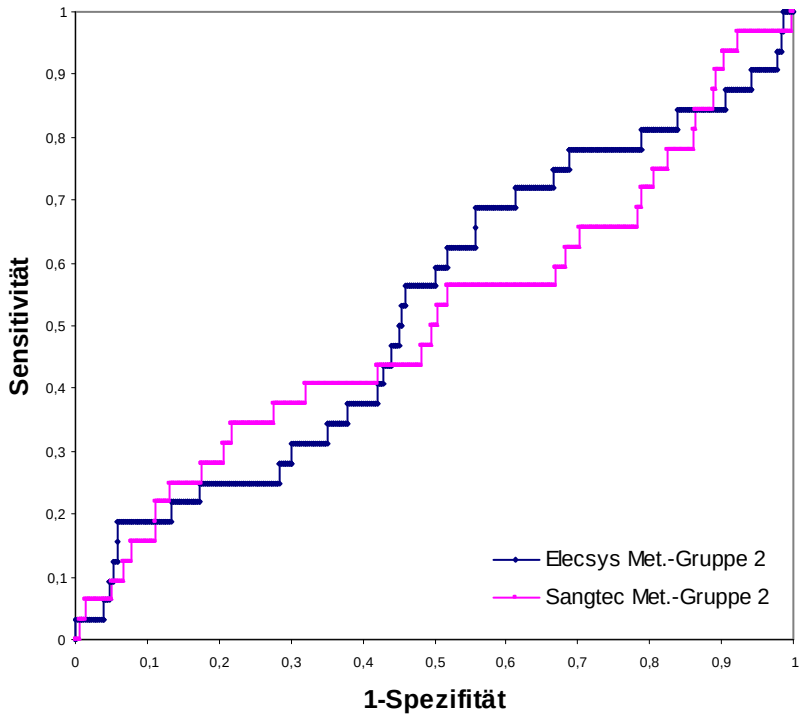


Abbildung 17: Vergleich der ROC-Kurven der beiden Testverfahren für die Metastasengruppe(Met.-Gruppe) 2

Im Anfangsteil zeigen beide Kurven einen ähnlichen Anstiegsverlauf, wobei die Kurve des Elecsys® geringfügig steiler beginnt, dann jedoch stärker abfällt als die Kurve des Sangtec®. Die Elecsys®-Kurve verläuft bis zum Schnittpunkt der beiden Kurven, bei einem Abszissenwert von circa 0,45, näher an der Diagonalen als die Sangtec®-Kurve. Nach diesem Schnittpunkt diskriminiert sich die Elecsys®-Kurve besser von der Diagonalen als die Sangtec®-Kurve, bis es kurz vor dem Kurvenende, bei einem Abszissenwert von circa 0,9, zu einem erneuten Schnittpunkt der Kurven kommt.

Beide Kurven verlaufen insgesamt zu nahe an der Diagonalen, es besteht damit für diese Metastasengruppe eine zu geringe Trennschärfe. Auch die AUC-Werte von 0,53 für den Elecsys® bzw. 0,56 für den Sangtec®, sind für eine ausreichende Testgüte zu niedrig. Eine Differenzierung zwischen normalen und pathologischen Werten ist somit in der Metastasengruppe 2 mit beiden Testverfahren nicht möglich.

3.6.3.2. Vergleich für die Metastasengruppe 3

In der Metastasengruppe 3 befinden sich Patienten mit Fernmetastasen in der Haut oder Lymphknotenmetastasen in nicht-regionären Lymphknoten. Den Vergleich der ROC-Kurven zeigt die Abbildung 18.

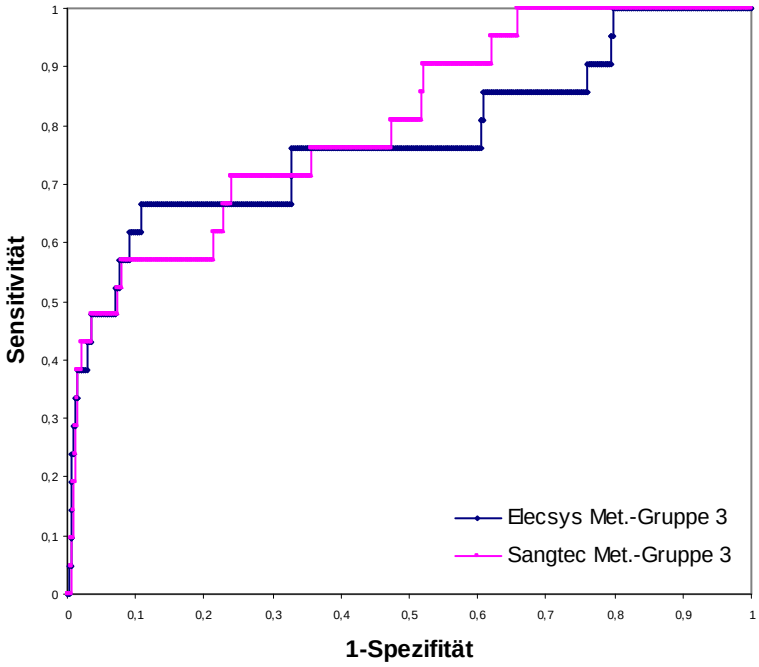


Abbildung 18: Vergleich der ROC-Kurven der beiden Testverfahren für die Metastasengruppe(Met.-Gruppe) 3

Anders als in der Metastasengruppe 2 zeigen die Kurven der Gruppe 3 einen deutlich näher an der Idealkurve liegenden Verlauf. Während im Anfangsbereich zwischen 0,08 und 0,22 der Abszisse der Elecsys®-Test eine bessere Sensitivität aufweist, gelingt dies zwischen 0,46 und 0,79 der Abszisse dem Sangtec®-Test. Die AUC-Werte von 0,78 für den Elecsys®, bzw. 0,82 für den Sangtec® weisen bei beiden Testverfahren auf eine gute Testgüte hin.

3.6.3.3. Vergleich für die Metastasengruppe 4

Für die Metastasengruppe 4 ist der Vergleich der beiden Tests in der Abbildung 19 wiedergegeben. Dieser Gruppe wurden Patienten mit viszeralen Fernmetastasen zugerechnet.

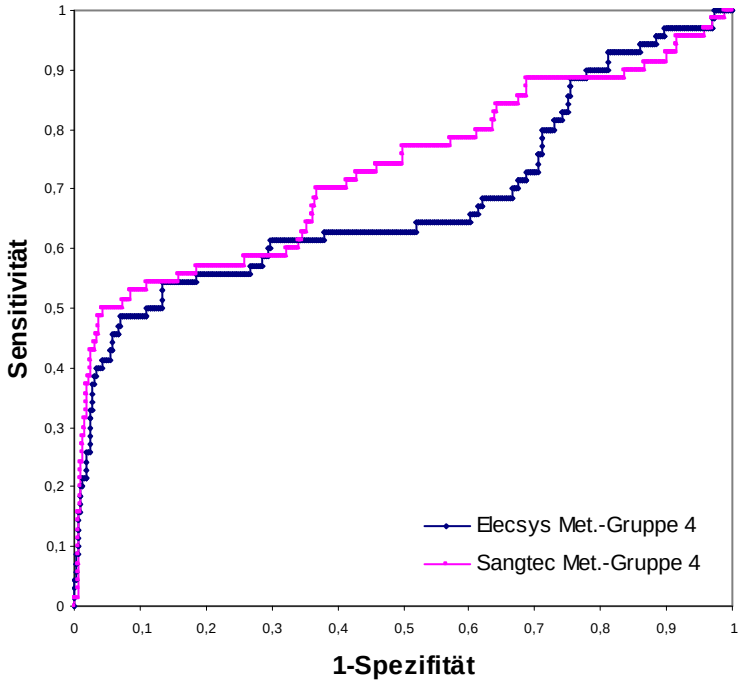


Abbildung 19: Vergleich der ROC-Kurven der beiden Testverfahren für die Metastasengruppe(Met.-Gruppe) 4

Beide Tests besitzen bis zu einer Sensitivität von circa 40% sehr gute Spezifitätswerte von über 96%. Danach verlaufen beide ROC-Kurven bis zu einem 1-Spezifitätswert von 0,61 sehr ähnlich. Ab hier besteht allerdings eine deutliche Diskrepanz, da der Sangtec® sein Steigungsverhalten verstärkt, während die Kurve des Elecsys® weiter abflacht und erst später wieder ansteigt. Dies führt zu einem Knick in der Elecsys®-Kurve, der ihre AUC kleiner als die des Sangtec® werden lässt. So ergibt sich für den Elecsys® eine AUC von 0,68, im Gegensatz zum Sangtec® mit 0,76. Die Differenz von 0,08 dieser AUC-Werte ist

größtenteils in dem Flächenverlust durch die schwächere Steigung zwischen den 1-Sensitivitätswerten von 0,61 bis 0,75 des Eleysys®-Testes begründet.

3.6.4. Kombinierte ROC-Kurven für die Metastasengruppen 2, 3 und 4 für beide Testverfahren

In Abbildung 20 wird für alle Metastasengruppen, deren Patienten Metastasen aufwiesen, also kombiniert für die Gruppen 2, 3 und 4, anhand der ROC-Kurven der Vergleich zwischen dem Sangtec®- und dem Elecsys®-Test gezogen.

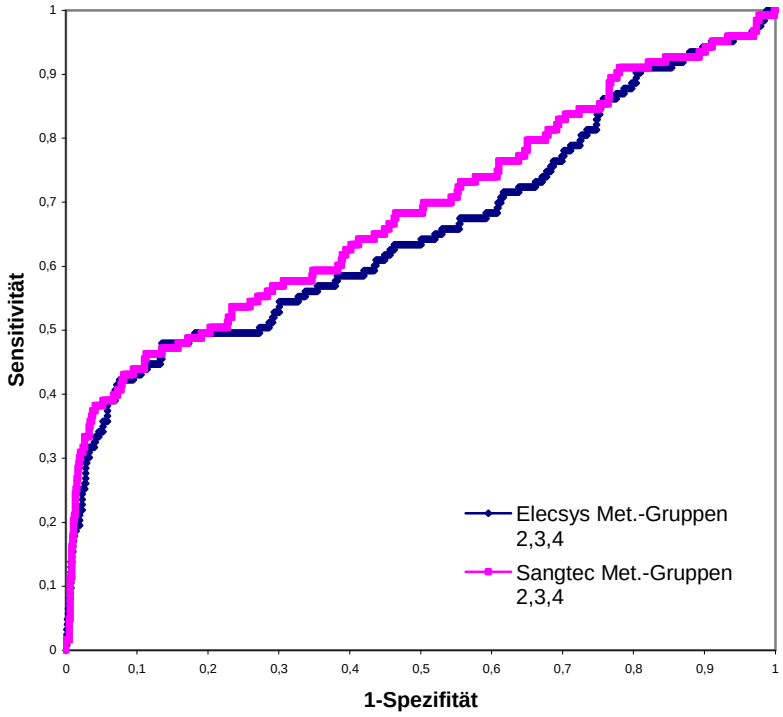


Abbildung 20: Zusammenfassende ROC-Kurven von beiden Testverfahren für die Metastasengruppen 2,3, und 4

Bis zu einem Wert von 0,193 auf der x-Achse verlaufen beide Kurven ähnlich, dabei verläuft in der steilen Anstiegsphase die Kurve des Sangtec® geringfügig vorteilhafter. Ab 0,193 bis 0,745 auf der x-Achse hat jedoch der Sang-

tec®-Test einen weiteren Abstand zur Diagonalen und damit den idealeren Kurvenverlauf. Im darauf folgenden letzten Kurvenabschnitt zeigen beide Tests im Verlauf wieder den annähernd gleichen Kurvenverlauf. Der Vorteil des Sangtec® im beschriebenen mittleren Kurventeil bedingt die etwas bessere Gesamt-AUC von 0,72 gegenüber 0,66 des Elecsys® (siehe Tabelle 19).

Tabelle 19: AUC-Werte der kombinierten ROC-Kurven von beiden Testverfahren

Kurve	AUC
Metastasengruppe 2, 3 + 4 Elecsys®	0,66
Metastasengruppe 2, 3 + 4 Sangtec®	0,72

3.7. Findung eines geeigneten cut-off-Wertes und Sensitivität und Spezifität des Elecsys®-Immunoassays

Um einen geeigneten cut-off-Wert zu ermitteln, wurden für verschiedene mögliche cut-off-Werte Spezifität und Sensitivität errechnet. Das Ergebnis ist in Tabelle 20 wiedergegeben.

Tabelle 20: Mögliche cut-off-Werte des Elecsys®S100 mit Sensitivitäten und Spezifitäten

cut-off-Wert (µg/l)	Sensitivität	Spezifität
0,07	0,48	0,83
0,08	0,45	0,89
0,09	0,43	0,93
0,10	0,41	0,94
0,11	0,36	0,95
0,12	0,34	0,96
0,13	0,33	0,97
0,14	0,32	0,97
0,15	0,31	0,97
0,16	0,28	0,97
0,17	0,27	0,98
0,18	0,27	0,98

Die erste Spalte zeigt die möglichen cut-off-Werte von 0,07 µg/l bis 0,18 µg/l. Kleinere oder größere cut-off-Werte als die des in Tabelle 19 dargestellten Wertebereichs sind aufgrund viel zu niedriger Sensitivität oder Spezifität als mögliche cut-off-Werte nicht relevant.

In den beiden Spalten Sensitivität und Spezifität zeigt sich die bereits beschrieben gegenläufige Beziehung: Je höher der cut-off-Wert angesetzt wird, desto niedriger wird die Sensitivität bei steigender Spezifität. Demnach wird in Abhängigkeit von der Gewichtung dieser beiden Parameter der cut-off-Wert festgelegt.

Für den in der vorliegenden Arbeit verwendeten cut-off-Wert von 0,12 µg/l, welcher in Anlehnung an den vom Hersteller des Sangtec®100 empfohlenen cut-off-Wert gewählt wurde, ergeben sich für den Elecsys®S100 eine Sensitivität von 34% und eine Spezifität von 96%. Gegenüber dem Sangtec®100, der bei seinem cut-off-Wert von 0,12 µg/l, eine Sensitivität von 44% und eine Spezifität von 92% aufweist, zeigt der Elecsys®S100 zwar eine um 4% höhere Spezifität, allerdings bei einer um 10% niedrigeren Sensitivität. Wird für den Elecsys®S100 ein cut-off-Wert von 0,10 µg/l gewählt, besteht bereits eine Sensitivität von 41% bei einer Spezifität von 94%.

4. Diskussion

Dem malignen Melanom wird aufgrund seiner Aggressivität und der weltweit steigenden Inzidenz eine besondere Aufmerksamkeit entgegengebracht. Da eine Metastasierung die Prognose bezüglich der Überlebenszeit der Patienten deutlich verschlechtert, ist eine frühzeitige Erkennung und Behandlung der Metastasen von besonderer Relevanz [Garbe et al. 2003b]. Daher wird intensiv der Einsatz von Tumormarkern untersucht, die hier eine entscheidende Hilfe darstellen können.

Das Protein S100 als Tumormarker beim malignen Melanom war bereits Gegenstand zahlreicher Studien unterschiedlicher Fragestellungen. Ein gut evaluiertes Einsatzfeld des S100 ist das Therapiemonitoring. Es konnte gezeigt werden, dass unter Chemotherapie sinkende S100-Werte ein Ansprechen auf die Therapie bedeuten, wohingegen ein unveränderter oder steigender S100-Spiegel mit Therapieresistenz oder Krankheitsprogression assoziiert war [Harpio & Einarsson 2004, Hamberg et al. 2003, Juergensen et al. 2001, Deichmann et al. 2001, Hauschild et al. 1999a, Henze et al. 1997]. Bei Melanompatienten im Stadium der Fernmetastasierung eignet sich die S100-Serumkonzentration zur Einschätzung der Überlebensprognose. Erhöhte S100-Werte bedeuten, im Gegensatz zu normwertigen S100-Werten, eine eingeschränktere Prognose bezüglich der Überlebenszeit [Martenson et al. 2001, Hauschild et al. 1999b, Schultz et al. 1998, Hansson et al. 1997]. Besondere Bedeutung besitzt die S100-Messung aber im Bereich der Tumornachsorge von Melanompatienten. Hier bietet sich das Protein S100 als Verlaufsparameter zur Früherkennung einer Krankheitsprogression, im Sinne eines Melanomrezidives bzw. einer Metastasierung, an [Banfalvi et al. 2003, Bottoni et al. 2003, Garbe et al. 2003a, Jury et al. 2000, Schlagenhauff et al. 2000]. Aufgrund einer neueren Untersuchung mit Fokus auf die Tumornachsorge des malignen Melanoms wurde S100 von der Arbeitsgemeinschaft für Dermatologische Onkologie (ADO)

für den Nachsorgezeitraum als Rezidivparameter empfohlen [Garbe et al. 2003b].

In die vorliegende Arbeit wurden 944 Serumproben von 449 Patienten eingeschlossen. Es handelte sich hierbei um Patienten, die sich im Zeitraum vom 29.09.1997 bis 17.11.1999 in der Tumornachsorge der Universitäts-Hautklinik Tübingen befanden und keine der in Kapitel 2.1.1 genannten Ausschlusskriterien erfüllten. Weiterhin mussten sich die Patienten vor und nach der Blutentnahme mindestens zwei Monate in der Tumornachsorge der Universitäts-Hautklinik Tübingen befinden, um der Serumprobe eine eventuelle Krankheitsprogression zuordnen zu können.

Ziel der Protein-S100-Messung war die Evaluierung von Reproduzierbarkeit, Spezifität, Sensitivität und möglichen cut-off-Werten des Elecsys®S100-Immunoassays.

4.1. Merkmale des Patientenkollektivs und der Primärtumore

Von den 449 eingeschlossenen Patienten waren 209 männlichen (46,4%) und 240 weiblichen (53,6%) Geschlechts. Diese Häufigkeitsverteilung deckt sich mit einer großen Studie über die Epidemiologie des malignen Melanoms in Deutschland und weltweit. Dort wird ein leichtes Überwiegen des Anteils weiblicher Patientin mit ca. 55% gegenüber dem Anteil männlicher Patienten mit ca. 45% bis ins Jahr 2001 beschrieben [Garbe & Blum 2001]. Das Durchschnittsalter der Studienpopulation betrug 56,2 Jahre und lag damit geringfügig um 2,7 Jahre höher als in einer 45 483 Melanompatienten umfassenden Studie [Buettner et al. 2005] und befand sich im genannten Zeitraum der oben zitierten Untersuchung über die Epidemiologie des malignen Melanoms [Garbe & Blum 2001].

In der vorliegenden Arbeit waren die Hauptlokalisationen des Primärtumors die untere Extremität (23,6%) und der Rücken (22,5%). Dies stimmt mit der Studie von Buettner et al. (2005) überein, wo unter Berücksichtigung des Geschlechts, diese Lokalisationen ebenfalls am häufigsten waren.

In Bezug auf die histologische Typisierung entspricht die Verteilung in der Studienpopulation weitgehend den in Kapitel 2.1.2 genannten allgemeinen Häufigkeiten. Die größten Gruppen bilden mit Abstand das SSM (51,4%) und das NM 26,9%).

4.2. Werteverteilung der Protein-S100-Bestimmungen der beiden Testverfahren

4.2.1. Ergebnisse der Protein-S100-Messungen mit dem Sangtec®100-Testverfahrens

Beim Sangtec®100LIA-mat®-Test muss beachtet werden, dass verschiedene Sangtec®-Assays zum Protein-S100-Nachweis zur Verfügung stehen. Neben einem radioaktiven Test, dem Sangtec®100 IRMA, sind gegenwärtig hauptsächlich zwei immunoluminometrische Assays im Einsatz, der Sangtec®100 LIA-mat® und der Sangtec®100 LIAISON®. Teilweise besitzen diese Systeme unterschiedliche Messbereiche und cut-off-Werte, was beim Vergleichen von Studien die mit verschiedenen Sangtec®100-Assays erstellt wurden beachtet werden muss. Die Protein-S100-Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden durch das LIA-mat®-System detektiert, das seit 1997 eingesetzt wird und für den die Herstellerfirma einen Messbereich von 0,02-20 µg/l und einen cut-off-Wert von 0,12 µg/l angibt. Der LIA-mat®-Assay erzielte in Studien eine höhere Sensitivität und machte zuverlässigere Angaben über die progressionsfreie Überlebenszeit als der IRMA®-Assay [Curry et al. 1999, Bonfrer et al. 1998].

Die Protein-S100-Messung beim malignen Melanom wurde bereits in zahlreichen Studien zu verschiedenen Fragestellungen betrachtet. Im Folgenden soll die Verteilung der Protein-S100-Bestimmungen der vorliegenden Arbeit mit denen der aktuellen Studienlage verglichen werden. Dafür wurden nur Arbeiten herangezogen, in welchen auch der Sangtec®100LIA-mat®-Assay Verwendung fand.

Der Sangtec®100 zeigt in allen Stadien eine ausgeprägt rechtsschiefe Verteilung, das bedeutet der Häufigkeitsgipfel der Werte befindet sich unterhalb des jeweiligen arithmetischen Mittelwerts. Diese Mittelwerte liegen in den Stadien Ia-IIb zwischen 0,03 µg/l und 0,054µg/l, steigen in den Stadien IIIa und IIIb auf 0,105µg/l bzw. 0,1µg/l und im Stadium IV auf 0,289µg/l. Der arithmetische Mittelwert aller Sangtec®100-Messungen beträgt 0,1µg/l. Die Mediane liegen in den Stadien Ia-IIIb bei 0,02µg/l oder 0,03µg/l. Erst im Stadium IV kommt es zu einem erkennbaren Anstieg auf 0,05µg/l. Diese Daten heben, vor allem in den fernmetastasenfreien Stadien, die deutliche Konzentration der Sangtec®100-Bestimmungen im niedrigen Wertebereich unter 0,05µg/l hervor. Bestätigt werden diese Beobachtungen durch die aktuelle Studienlage. So ermittelte Deichmann et al. (2001) bei 25 Patienten mit metastasiertem Melanom, aber ohne Krankheitsprogression, eine untere Quartile von 0,00 µg/l und einen arithmetischen Mittelwert von 0,02 µg/l. In einer größeren Studie mit 478 Melanompatienten (Stadien I-IV), lag der Median der Patienten im Stadium I bei 0,03 µg/l und der arithmetische Mittelwert bei 0,05 µg/l. Anders als bei den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit stiegen Median und arithmetischer Mittelwert in den folgenden Stadien II und III kontinuierlicher an, um dann im Stadium IV überschießend auf 0,24 µg/l bzw. 2,07 µg/l zu klettern [Banfalvi et al. 2003]. Demnach reagierte hier der Sangtec®100 bei Banfalvi et al. (2003) v.a. in den Stadien I-III empfindlicher, mit einer besser erkennbaren Steigerung sowohl der arithmetischen Mittelwerte, als auch der Mediane.

In einer Untersuchung über die prädiktive Aussagekraft der S100-Messung, in der Vorhersage von Mikrometastasen in regionären Lymphknoten, beschrieb Acland et al. (2002) bei den beteiligten 31 Patienten im Krankheitsstadium Ia, IIIa und IIIb einen arithmetischen Mittelwert von 0,04 µg/l. Da der arithmetische Mittelwert für die Patienten im Stadium IIIa mit 0,045 µg/l höher lag als der von Patienten im Stadium IIIb mit 0,027 µg/l, vermutete Acland et al., dass maligne Melanome mit der Neigung zur Metastasierung weniger S100 produzieren als solche ohne Metastasierungstendenz [Acland et al. 2002]. Diese Annahme deckt sich nicht mit der vorliegenden Untersuchung, in welcher in den entsprechenden Tumorstadien IIIa und IIIb fast identische untere und obere Quartile,

Mediane und arithmetischen Mittelwerte vorliegen. Allgemein lagen die arithmetischen Mittelwerte in der Arbeit von Acland et al. in diesen Stadien um mehr als 50% niedriger. Die Ursache dieser divergenten Ergebnisse liegt möglicherweise in der mit 31 Patienten geringen Probandenanzahl in seiner Studie. Stoitchkov et al. (2002) beschreibt als Ergebnis seiner Studie über Protein S100 bei Patienten mit Melanomprogression, Mediane zwischen 0,10 µg/l und 0,14 µg/l in den Stadien I-III und einen Median von 0,71 µg/l im Stadium IV. Demnach befinden sich im Vergleich die Resultate seiner Untersuchung also auf einem deutlich höheren Werteniveau. Die Arbeit von Vuoristo et al. (2000) über den Wert der Messung von Protein S100 und verschiedener Interleukine bei Melanompatienten im Stadium der Fernmetastasierung ergab einen arithmetischen S100-Mittelwert von 0,36µg/l und stellen sich damit ähnlich den vorliegenden Ergebnisse (0,289µg/l) in diesem Stadium dar. Da Wollina et al. (2000) zur Veranschaulichung seiner Ergebnisse ebenfalls Boxplots und Whiskers wählte, eignet sich seine Untersuchung über die Protein-S100-Bestimmung mit dem Sangtec®100LIA-mat®-System, besonders gut für einen Vergleich. Die arithmetischen Mittelwerte und die Häufigkeitsverteilung der unteren vier Stadien sind in beiden Untersuchungen ähnlich. Eine Ausnahme stellt das Stadium IIa von Wollina et al. dar, da hier der arithmetische Mittelwert mit 0,103µg/l mehr als doppelt so hoch ist und auch die Boxplots eine unerwartet abweichende Verteilung aufweisen. Durch die größere vertikale Ausbreitung im Stadium IIb besitzt der Primarius eher die Möglichkeit, Protein S100 in den systemischen Kreislauf abzugeben und so höhere Messergebnisse als im Stadium IIa zu verursachen. Daher wären höhere Werte im Stadium IIb als Stadium IIa zu erwarten gewesen. Das Stadium IIIa liegt dagegen bei Wollina et al. im Mittel um fast die Hälfte tiefer als in vorliegender Arbeit, obwohl bei der hier bereits bestehenden regionären Metastasierung eher höhere Werte zu erwarten gewesen wären. Die Stadien IIIb und IV sind wiederum in beiden Studien ähnlich verteilt.

Insgesamt liegen die Ergebnisse der Protein-S100-Bestimmungen in den vorgestellten Studien tendenziell über denen der hiesigen Untersuchung. Obwohl der Sangtec®100 bereits in vorliegender Studie im Durchschnitt um 30% höhere Protein-S100-Messwerte als der Elecsys®S100 detektiert, wäre da-

durch diese Differenz, bei Zugrundelegung der allgemeinen Studienlage, noch höher.

Ein weiterer Unterschied zwischen dem Elecsys®S100 und dem Sangtec®100 ist die unterschiedliche Verteilung der Protein-S100-Bestimmungen im Messbereich unter 0,1 µg/l, speziell mit dem Augenmerk auf dem 24,2%igen Anteil von Nullmessungen durch den Sangtec®S100-Test. Ähnliches berichtete Djukanovic et al. (2000) über die Kontrollgruppe ihrer Studie, in welcher der Median 0,00 µg/l betrug. Folglich wurde mit dem Sangtec®100 auch hier in mindestens 50% der Proben der Wert 0,00 µg/l gemessen. In der in diesem Kapitel bereits erwähnten Studie von Wollina et al. (2000) ist für den Sangtec®100 in den Boxplots ebenfalls eine Häufung von Werten gleich oder nahe 0,00 µg/l zu erkennen. Ebenso verhält es sich in der bereits genannten Untersuchung von Deichmann et al. (2001) der eine untere Quartile von 0,00 µg/l feststellte. Diese somit nicht nur in der vorliegenden Untersuchung beschriebene Beobachtung überrascht insofern, da das Vorkommen des Protein S100, wie in Kapitel 1.6 beschrieben, nicht ausschließlich auf pathologische Gewebearten beschränkt ist. Demzufolge sind auch beim gesunden Menschen geringe Konzentrationen im Serum zu erwarten. Im Gegensatz zum Elecsys®S100, der diese Konzentrationen im niedrigen Wertebereich gut differenzieren kann, scheint der Sangtec®100 für das Erkennen dieser kleinen Protein-S100-Mengen nicht geeignet zu sein. Ungewissheit besteht noch über den Vorteil dieser Leistung des Elecsys®S100. Als zukünftige Einsatzmöglichkeit könnte sich eine bessere Risikostratifizierung von Subpopulationen, z. B. bezüglich Überlebenszeit oder Metastasierung, erweisen.

4.2.2. Ergebnisse der Protein-S100-Messungen mit dem Elecsys®S100-Testverfahren und Vergleich des Elecsys®S100 mit dem Sangtec®100

Der Elecsys®S100 stellt sich in den Tumorstadien Ia-IIb betreffend Parameter wie arithmetischer Mittelwert, Mediane und Quartilen einheitlich dar. Eine Ausnahme bildet das erste Tumorstadium, in welchem ein Ausreißer mit einem

S100-Wert von 5,010 µg/l v. a. den arithmetischen Mittelwert stark beeinflusst. Eine mögliche Erklärung dieses hohen Wertes könnte das unbekannte Vorliegen einer Zweiterkrankung sein. Aus Untersuchungen ist bekannt, das speziell bei Schädigung des Zentralnervensystems hohe S100-Werte auftreten können [Hardemark et al. 1989, Aurell et al. 1989]. In diesem Fall könnte eine unbekannte zerebrale Erkrankung in der Vorgeschichte des Patienten, z. B. ein unbekannter Schlaganfall den Ausreißer erklären.

Im Tumorstadium IIIb liegt die untere und obere Quartile sowie der Median unter dem Niveau der Stadien IIb und IIIa, wofür es keine hinreichende Erklärung gibt. Dass im Stadium IIIb, also zum Zeitpunkt des Befalls regionärer Lymphknoten, weniger S100 vorhanden ist als im Stadium IIIa ohne Lymphknotenbefall, lässt sich aus den erhobenen Daten nicht erklären. In der gängigen Literatur sind die Stadien IIIa und IIIb meistens im Stadium III zusammengefasst, so dass die Anzahl an Vergleichsstudien limitiert ist. Eine davon ist die Untersuchung von Wollina et al., wo die Stadien IIIa und IIIb weder bei den Patienten mit Tumorlast noch bei denen ohne eine der hiesigen Studie vergleichbare Häufigkeitsverteilung aufweisen. Im Gegenteil zeigt das Stadium IIIb bei den Patienten mit Tumorlast einen höheren Median, arithmetischen Mittelwert und obere Quartile als das Stadium IIIa. Da in der vorliegenden Studie auch beim Sangtec®100 das oben beschriebene Phänomen zu beobachten ist, scheint die Ursache nicht am Elecsys®S100-Assay zu liegen.

Das Tumorstadium IV, in dem bereits eine Fernmetastasierung eingetreten ist, grenzt sich hingegen in arithmetischem Mittel, Median, oberer Quartile und 90.Perzentile deutlich von den restlichen Stadien ab. Entsprechendes gilt für den Sangtec®100 bei Betrachtung seiner Ergebnisse in diesem Stadium. Dies deckt sich auch mit Studien über das S100-Protein bei malignem Melanom. Als Beispiele seien hier die Arbeiten von Bánfalvi et al. (2002), Martenson et al. (2001) und Schlagenhauff et al. (2000) genannt. In erstgenannter steigen Median und arithmetischer Mittelwert von 0,07 µg/l bzw. 0,35µg/l im Stadium der regionären Lymphknotenmetastasierung (Stadium III) auf 0,27 µg/l bzw. 1,41 µg/l im Stadium der Fernmetastasierung (Stadium IV). In der bisher patientenstärksten Studie, mit 1007 Patienten, von Martenson et al. (2001) über das Pro-

tein S100 stieg der geometrische Mittelwert von 0,14 µg/l im Stadium der regionären Lymphknotenmetastasierung auf 0,71 µg/l im Stadium der Fernmetastasierung. Bei Schlagenhauff et al. waren die Protein-S100-Werte im Fernmetastasenstadium signifikant höher als in den anderen Stadien und in 29% der über 0,13 µg/l erhöhten S100-Werte war diese Erhöhung das erste Zeichen der Krankheitsprogression, dabei in 7 von 8 Fällen in Form einer Fernmetastasierung.

Vergleicht man die Auswertung der Ergebnisse beider Testverfahren in den Metastasengruppen, zeigen beide den in den Kapiteln 3.4.2.1 und 3.4.2.2 beschrieben Wertesprung zwischen der 2. und 3. Metastasengruppe. Auch nach dieser Einteilung haben also beide Testverfahren die Fähigkeit, zwischen den Stadien ohne und mit Fernmetastasen zu differenzieren. Beim Elecsys®S100-Test fällt jedoch auf, dass in der 3.Gruppe, mit Lymphknoten- und Hautfernmetastasen alle deskriptiven Parameter etwas höher liegen als in der Gruppe 4, mit viszeralen Metastasen. Teilweise ist dafür das Fehlen von Ausreißern und annähernde Normalverteilung der Messergebnisse in der Gruppe 3 verantwortlich. Eine andere Ursache dafür könnte in der geringen Anzahl von 21 Proben in dieser Gruppe zu finden sein, wodurch sie anfälliger für zufällige Fehler wird. Da das Protein S100 hauptsächlich durch Zerfall von Tumorzellen freigesetzt wird [Ghanem et al. 2001] wäre eine andere Erklärungsmöglichkeit eine höhere Protein-S100-Freisetzung durch erhöhten Tumorzellzerfall. In der gängigen Literatur ließ sich jedoch kein Hinweis dafür finden, dass Haut- oder Lymphknotenmetastasen entweder durch erhöhten Zellzerfall oder durch einen anderen Mechanismus mehr Protein S100 freisetzen als viszerale Fernmetastasen. Im Gegensatz dazu wurde über tendenziell niedrigere S100-Werte bei Hautmelanommetastasen berichtet [Kaskel et al. 1999].

Als Fehlermöglichkeiten des Studienprotokolls kommen unter anderem Schwierigkeiten bei der sicheren Zuordnung von Ein- und Ausschlusskriterien in Frage. So besteht die Möglichkeit, dass eine nicht diagnostizierte Zweiterkrankung vorliegt, z.B. ein Zweitmalignom im ZNS-Bereich. Durch die klinische Untersuchung in der Melanomnachsorge kann eine andere Schwachstelle auftreten. So ist es möglich, dass eine Krankheitsprogression zu erhöhten S100-

Werten geführt hat, ohne dass diese im beobachteten viermonatigen Zeitraum klinisch erkannt wurde und es so zur Bewertung der S100-Messung als falsch positiv gekommen ist. Ein weiteres, die Protein-S100-Bestimmung allgemein betreffendes Problem stellt die geringe Stabilität der Protein-S100-Konzentration bei Raumtemperatur dar. Nach einer Lagerungszeit von 3 Stunden bei Raumtemperatur steigt in den Serumproben, über einen bisher nicht bekannten Mechanismus, die S100-Konzentration signifikant an. Durch sofortiges Einfrieren der Proben oder zügiges Verarbeiten kann dies vermieden werden [Djukanovic et al. 2001].

4.3. Reproduzierbarkeit des Elecsys®S100

Aus der klinischen Praxis ist bekannt, dass bei dem Sangtec®100-Testverfahren bezüglich der Reproduzierbarkeit Probleme bestehen. So kommt es bei der Überprüfung pathologischer Ergebnisse häufiger zu starken Abweichungen der Kontrollmessung von der Originalmessung. Befindet sich dabei die Kontrollmessung unterhalb des cut-off-Wertes, führt dies bei Patient und Arzt zu Verwirrung und zieht weitere Messungen nach sich.

Die in Kapitel 3.5 beschrieben Ergebnisse über die Reproduzierbarkeit des Eecsys®S100-Testverfahrens deuten auf einen sehr zuverlässigen Assay hin. Die Steigungen der Regressionsgeraden des Elecsys®S100 lagen nahe 1, die Konstanten nahe 0 und die Korrelationskoeffizienten nahe 1. Zusammenfassend bietet der Elecsys®S100, auch bei einem Wechsel der Charge der Testsubstanzen, eine gute Reproduzierbarkeit.

Für eine noch sicherere Beurteilung der Reproduzierbarkeit müsste sich dem hier durchgeführten Intra-Assy ein Inter-Assay anschließen, bei dem in der täglichen Routine Kontrollen mitlaufen, um auch Schwankungen der S100-Bestimmung durch Lagerung, Einfrieren/Auftauen der Proben, Kalibration und Wartung des Analysengerätes zu erfassen.

4.4. Sensitivität und Spezifität beider Testverfahren und Findung eines geeigneten cut-off-Wertes für den Elecsys®S100-Immunoassay

Um beide Testverfahren adäquat in Sensitivität, Spezifität und möglichen cut-off-Werten vergleichen zu können, wurden für die Ergebnisse der beiden Assays ROC-Kurven berechnet. Sie ordnen jedem möglichen Messwert Sensitivität und Spezifität zu und lassen durch die AUC die diagnostische Güte des Testverfahrens beurteilen. Durch die direkte Gegenüberstellung von Sensitivität und Spezifität in den ROC-Kurven für einen Messpunkt lässt sich deren bestmögliche Kombination, und damit der beste cut-off-Wert für den Test, graphisch gut erkennen. Allgemein gilt der Messwert mit dem größten senkrechten Abstand zur Winkelhalbierenden des ROC-Diagramms als bestmöglicher cut-off-Wert des Testverfahrens. Bezieht man jedoch die unterschiedlichen klinischen Ansprüche an den jeweiligen Tumormarker mit ein, kann der ausgewählte cut-off-Wert durchaus, vom dem durch die eben beschriebene Methode berechneten abweichen.

Für den Sangtec®100LIA-mat® ergaben die S100-Messungen bei einem cut-off-Wert von 0,12µg/, dem vom Hersteller empfohlenen Wert, eine Sensitivität von 44% und eine Spezifität von 92%. In den letzten Jahren wurde in vielen Untersuchungen mit diesem und anderen cut-off-Werten gearbeitet, um auch für den Sangtec®100LIA-mat® die optimale Sensitivität/Spezifität-Kombination zu erhalten.

Banfalvi et al. (2003) beließ den cut-off-Wert auf den vom Hersteller empfohlenen 0,12 µg und erreichte damit bei Patienten im Stadium I-IV eine Sensitivität von 36,8% und eine Spezifität von 74,8%. Bei isolierter Betrachtung des Stadiums IV stiegen diese Parameter auf 58,4% bzw. 100%. In einer früheren Untersuchung desselben Autors, speziell über die prognostische Aussagekraft des S100 bezüglich Überlebenszeit im Stadium IV, lag die Sensitivität mit 70,5%, bei gleicher Spezifität von 100%, noch höher [Banfalvi et al. 2002]. In einer Studie über den Stellenwert von Protein S100 in der Melanomnachsorge und zur Prognoseeinschätzung erreichte S100, wieder bei einem cut-off-Wert von 0,12µg/l, eine Sensitivität von 55,5% im Stadium III und 73,9% im Stadium IV,

jeweils bei einer Spezifität von 80,3% [Juergensen et al. 2001]. Ähnliche Ergebnisse erzielte Tas et al. (2004) in einer Untersuchung über die klinische Bedeutung von S100 und MIA. Hier ergaben sich, bei allerdings sehr kleinen Patientengruppen, Sensitivitäten von 40% im Stadium I+II, 59,1% im Stadium III und 66,7% im Stadium IV. Der cut-off-Wert wurde hier bei 0,09µg/l, also etwas niedriger als vom Hersteller empfohlen, gesetzt. Martenson et al. (2001) legte in einer großen Studie mit 1007 Melanompatienten den cut-off-Wert auf 0,1µg/l und beobachtete damit eine Sensitivität von 12% in den metastasenfreien Stadien, von 51% in den Stadien mit regionärer oder in-transit Metastasierung und von 79% bei vorhandener Fernmetastasierung. In einer weiteren Untersuchung über MIA, LDH und S100 bei Stadium-IV-Melanompatienten, erzielte Deichmann et al. (1999) bei einem cut-off-Wert von 0,12µg/l eine sehr hohe Sensitivität von 91% bei einer im Vergleich niedrigen Spezifität von 76%. Im Gegensatz dazu erhielt Vouristo et al. (2000) mit demselben cut-off, ebenfalls bei Stadium-IV-Patienten, eine niedrigere Sensitivität von 64%. Eine Untersuchung von Garbe et al. (2000) über die prognostische Bedeutung von S100, MIA und PCR bei Stadium II- und III-Patienten, ergab eine 29%ige Sensitivität und 95%ige Spezifität für die Protein-S100-Bestimmung. In einer Vergleichsstudie von MIA und S100 fand Schmitz et al. (2000) für S100, bei einem cut-off-Wert von 0,12µg/l, eine Spezifität von 85,8% und eine Sensitivität von 37,5% in Stadium I/II, von 50% im Stadium III und 80% im Stadium IV. Schmitz et al. empfiehlt jedoch für eine Spezifitätssteigerung auf 94,6% eine Erhöhung des cut-off-Wertes auf 0,2µg/l. Die Optimierung des cut-off-Wertes war auch Thema anderer Studien, z.B. verglich Schlagenhauff et al. (2000) die cut-off-Werte 0,8µg/l, 0,12µg/l und 0,13µg/l und kam zu dem Schluss, dass der cut-off von 0,13µg/l das beste Spezifitäts-/Sensitivitäts-Verhältnis von 54%/96%, besitzt.

Insgesamt liegt die ermittelte Sensitivität/Spezifität-Kombination der vorliegenden Arbeit, unter Beachtung der jeweils verwendeten cut-off-Werte, in den Bereichen der vorgestellten Arbeiten aus der gängigen Literatur.

Unter Verwendung der ROC-Kurven lässt sich durch Berechnung der Fläche unterhalb der Kurve - der AUC – eine Aussage über die Testgüte des Verfahrens machen. Die in Kapitel 3.6.1 dargestellten AUC-Werte bescheinigen bei-

den Testverfahren in den Stadien der regionären Lymphknotenmetastasierung (Sangtec®100=0,56; Elecsys®S100=0,53) eine schlechte Testgüte. In einer Studie von Garbe et al. (2000) betrug die AUC für diese Melanomstadien jedoch 0,66, lag also im Vergleich deutlich höher. Für diese Diskrepanz konnte eine Ursache nicht gefunden werden. In den Metastasengruppen 3 und 4, den Stadien mit vorhandener Fernmetastasierung, erreichten beide Testverfahren bessere AUC-Werte, im einzelnen 0,82 und 0,76 für den Sangtec®100 bzw. 0,78 und 0,68 für den Elecsys®S100. Deichmann et al. (2001) konnte mit dem Sangtec®100 in einer Arbeit, unter Testung zu zwei verschiedenen Messzeitpunkten bei Stadium-IV-Patienten, etwas niedrigere AUC-Werte von 0,75 bzw. 0,71 erzielen. In einer weiteren Studie desselben Autors über die S100-Messung mit dem Sangtec®100 bei Stadium-IV-Patienten wurde jedoch eine sehr hohe AUC von 0,91 errechnet [Deichmann et al. 1999]. Soweit bekannt, wurde bis auf die genannten Beispiele in den bisherigen Studien über das Protein S100 beim malignen Melanom von der AUC selten Gebrauch gemacht, wodurch die Beurteilung der Ergebnisse erschwert wird.

Insgesamt präsentieren sich in vorliegender Untersuchung beide Testverfahren für die Entdeckung regionärer Lymphknotenmetastasen wegen ihrer zu geringen Testgüte in diesem Bereich als ungeeignet.

Für das Stadium der Fernmetastasierung erreichen sowohl der Sangtec®100 mit 0,76 als auch der Elecsys®S100 mit 0,68 gute AUC-Werte, wobei der Sangtec® noch eine geringfügig bessere Testgüte bietet. Warum der AUC in der Metastasengruppe 3, d.h. bei Haut- und Lymphknotenfernmetastasen, in beiden Testverfahren höher ist als in der Gruppe mit viszeralen Fernmetastasen (Metastasengruppe 4), konnte nicht abschließend geklärt werden.

Die vorgestellten Studien verdeutlichen, dass der gewählte cut-off-Wert keine einmalig festgelegte und dann unveränderbare Größe darstellt, sondern dass er dynamisch den jeweils an den Tumormarker gestellten Anforderungen, angepasst werden muss. Der cut-off-Wert, als definierte Grenze zwischen physiologischer und pathologischer Konzentration eines Tumormarkers, stellt immer einen Kompromiss zwischen Sensitivität und Spezifität dar. Das Protein S100

im Speziellen hat sich für die Verwendung als Melanomscreeningparameter als ungeeignet erwiesen. Seine Bedeutung liegt neben dem Therapiemonitoring und der Einschätzung der Überlebenswahrscheinlichkeit, v. a. in der Rolle als Routineparameter in der Melanomnachsorge, um dort frühzeitig eine möglicherweise vorhandene Metastasierung zu erkennen. Für diese Verwendung ist eine hohe Spezifität sinnvoll, da sonst durch falsch positive S100-Bestimmungen dem Patienten unnötige, meistens bildgebende Folgeuntersuchungen zugemutet werden. Neben den nicht unerheblichen Kosten bildgebender Verfahren führen diese Falschmessungen und dadurch verursachte Folgeuntersuchungen zu einer starken psychischen Belastung der Tumorpatienten.

Um für diese Zielsetzung die passende Kombination von Sensitivität und Spezifität zu finden, wurden die in Kapitel 3.6 dargestellten ROC-Kurven verwendet. Hier zeigt sich der cut-off-Wert von 0,1 µg/l für den Elecsys®S100 als praktikabelste und effektivste Lösung um eine hohe Spezifität von 94% mit einer guten Sensitivität von 41% zu kombinieren. So sollen, bei einer guten Sensitivität zur Entdeckung von Metastasen in der Melanomnachsorge, durch die hohe Spezifität falsch positive Protein-S100-Messungen auf ein Minimum reduziert werden. Ob sich dieser empfohlene cut-off-Wert in der klinischen Routine bewähren wird, werden weiterführende Untersuchungen zeigen.

5. Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Das maligne Melanom gilt als der aggressivste Hauttumor, wobei die Prognose der Erkrankung erheblich von einer Fernmetastasierung verschlechtert wird. Ein frühzeitiges Therapieren dieser Metastasierung verbessert die Überlebenswahrscheinlichkeit und Langzeitprognose. Das Ziel für den Einsatz des Protein S100 als Tumormarker ist daher eine Metastasierung möglichst schnell zu erkennen. Für die Protein-S100-Bestimmung aus dem Serum wurde der luminometrische Elecsys®S100-Immunoassay entwickelt. Innerhalb der vorliegenden Arbeit wurde dieses Testverfahren für den Einsatz in der klinischen Routine untersucht. Für dessen Aufgabe in der Melanomnachsorge spielen eine gute Reproduzierbarkeit und eine gute Sensitivität und Spezifität eine wichtige Rolle. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Evaluierung eines geeigneten cut-off-Wertes für das Elecsys®-Testverfahren. Es wurde geprüft welcher cut-off-Wert und welche damit verbundene Kombination aus Sensitivität und Spezifität für die Verwendung des Testes in der Nachsorge von Melanompatienten den bestmöglichen Kompromiss zwischen falsch negativen und falsch positiven Messergebnissen bedeutet. Die Ergebnisse der S100-Messungen mit dem Elecsys®S100 wurden denen des luminometrischen Sangtec®100LIA-mat®-Immunoassays gegenübergestellt, der sich bereits im klinischen Einsatz befindet.

Das in vorliegender Arbeit verwendete Elecsys®S100-System arbeitet nach dem Sandwich-Prinzip bei welchem 2 Antikörper und ein Mikropartikel an das S100-Protein binden und anschließend das Anlegen von Spannung zu einer messbaren chemoluminiszenten Emission führt. Es wurden 944 Proben von 449 Patienten aus der Melanomnachsorge der Universitäts-Hautklinik Tübingen in die Untersuchung eingeschlossen.

Betrachtet man die Ergebnisse beider Testverfahren, liegen die Messungen des Sangtec®100 um 30% höher als die des Elecsys®S100. Auffallend ist, dass 24,2% der Sangtec®100-Messungen das Ergebnis 0,00µg/l S100 erga-

ben, gegenüber nur 0,2% beim Elecsys®S100. Da auch beim Gesunden von niedrigen physiologischen S100-Konzentrationen im Serum ausgegangen wird, besitzt der Elecsys®S100 in diesem niedrigen Wertebereich ein besseres Differenzierungsvermögen, dessen Bedeutung jedoch bisher noch unklar ist.

Der Elecsys®S100-Assay zeigte auch bei einem Chargenwechsel der Testsubstanzen eine gute Reproduzierbarkeit, erkennbar an den Steigungen der Regressionsgeraden und den entsprechenden Korrelationskoeffizienten.

Bei der Festlegung eines cut-off-Wertes wurde auf eine hohe Spezifität geachtet, um falsch positive Protein-S100-Messungen zu minimieren. Dafür bietet sich ein cut-off-Wert von 0,1µg/l an, der eine Spezifität von 94% mit einer Sensitivität von 41% kombiniert.

Der luminometrische Elecsys®S100-Immunoassay zeichnet sich bei einem empfohlenen cut-off-Wert von 0,1µg/l durch gute Reproduzierbarkeit, Spezifität und Sensitivität aus. Beim Elecsys®S100 handelt es sich somit um ein gutes Testverfahren zur Messung des Tumormarkers Protein S100 in der Nachsorge von Patienten mit malignem Melanom.

6. Literaturverzeichnis

1. Acland K, Evans AV, Abraha H, Healy CM, Roblin P, Calonje E, Orchard G, Higgins E, Sherwood R, Russell-Jones R (2002) Serum S100 concentrations are not useful in predicting micrometastatic disease in cutaneous malignant melanoma. Br J Dermatol 146: 832-835

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

3. Aurell A, Rosengren LE, Wikkelso C, Nordberg G, Haglid KG (1989) The S-100 protein in cerebrospinal fluid: a simple ELISA method. J Neurol Sci 89: 157-164

4. Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG, Fleming ID, Gershenwald JE, Houghton A, Jr., Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MF, Morton DL, Reintgen DS, Ross MI, Sober A, Thompson JA, Thompson JF (2003) New TNM melanoma staging system: linking biology and natural history to clinical outcomes. Semin Surg Oncol 21: 43-52

5. Banfalvi T, Boldizsar M, Gergye M, Gilde K, Kremmer T, Otto S (2002) Comparison of prognostic significance of serum 5-S-Cysteinyldopa, LDH and S-100B protein in Stage III-IV malignant melanoma. Pathol Oncol Res 8: 183-187

6. Banfalvi T, Gilde K, Gergye M, Boldizsar M, Kremmer T, Otto S (2003) Use of serum 5-S-CD and S-100B protein levels to monitor the clinical course of malignant melanoma. Eur J Cancer 39: 164-169

7. Baudier J, Delphin C, Grunwald D, Khochbin S, Lawrence JJ (1992) Characterization of the tumor suppressor protein p53 as a protein kinase C substrate and a S100b-binding protein. Proc Natl Acad Sci U S A 89: 11627-11631

8. Berking C, Schlupen EM, Schrader A, Atzpodien J, Volkenandt M (1999) Tumor markers in peripheral blood of patients with malignant melanoma: multimarker RT-PCR versus a luminoimmunometric assay for S-100. Arch Dermatol Res 291: 479-484

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

10. Bonfrer JM, Korse CM, Israels SP (1997) Serum S-100 has prognostic significance in malignant melanoma. Anticancer Res 17: 2975-2977

11. Bonfrer JM, Korse CM, Nieweg OE, Rankin EM (1998) The luminescence immunoassay S-100: a sensitive test to measure circulating S-100B: its prognostic value in malignant melanoma. Br J Cancer 77: 2210-2214

12. Bosserhoff AK, Golob M, Buettner R, Landthaler M, Hein R (1998) [MIA ("melanoma inhibitory activity"). Biological functions and clinical relevance in malignant melanoma]. Hautarzt 49: 762-769

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

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

15. Bottoni U, Izzo P, Richetta A, Mannooranparampil TJ, Devirgiliis V, Del Giudice M, Reale MG, Frati L, Calvieri S (2003) S100 serum level: a tumour marker for metastatic melanoma. Melanoma Res 13: 427-429

16. Boyano MD, Garcia-Vazquez MD, Gardeazabal J, Garcia dG, Smith-Zubiaga I, Canavate ML, Raton JA, Bilbao I, Diaz-Perez JL (1997) Serum-soluble IL-2 receptor and IL-6 levels in patients with melanoma. Oncology 54: 400-406

17. Brochez L, Naeyaert JM (2000) Understanding the trends in melanoma incidence and mortality: where do we stand? Eur J Dermatol 10: 71-75

18. Brownbridge GG, Gold J, Edward M, MacKie RM (2001) Evaluation of the use of tyrosinase-specific and melanA/MART-1-specific reverse transcriptase-coupled--polymerase chain reaction to detect melanoma cells in peripheral blood samples from 299 patients with malignant melanoma. Br J Dermatol 144: 279-287

19. Buettner PG, Leiter U, Eigentler TK, Garbe C (2005) Development of prognostic factors and survival in cutaneous melanoma over 25 years. Cancer 103: 616-624

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

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

22. Clapham DE (1995) Calcium signaling. Cell 80: 259-268

23. Cochran AJ, Lu HF, Li PX, Saxton R, Wen DR (1993) S-100 protein remains a practical marker for melanocytic and other tumours. Melanoma Res 3: 325-330

24. Cochran AJ, Wen DR, Herschman HR, Gaynor RB (1982) Detection of S-100 protein as an aid to the identification of melanocytic tumors. Int J Cancer 30: 295-297

25. Cooper EH (1985) Neuron specific enolase: a marker of (small cell) cancers of neuronal and neuroendocrine origin. Biomed Pharmacother 39: 165-166

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

27. Curry BJ, Farrelly M, Hersey P (1999) Evaluation of S-100beta assays for the prediction of recurrence and prognosis in patients with AJCC stage I-III melanoma. Melanoma Res 9: 557-567

28. Deichmann M, Benner A, Bock M, Jackel A, Uhl K, Waldmann V, Naher H (1999) S100-Beta, melanoma-inhibiting activity, and lactate dehydrogenase discriminate progressive from nonprogressive American Joint Committee on Cancer stage IV melanoma. J Clin Oncol 17: 1891-1896

29. Deichmann M, Benner A, Kuner N, Wacker J, Waldmann V, Naher H (2001) Are responses to therapy of metastasized malignant melanoma reflected by decreasing serum values of S100beta or melanoma inhibitory activity (MIA)? Melanoma Res 11: 291-296

30. Deichmann M, Kahle B, Moser K, Wacker J, Wust K (2004) Diagnosing melanoma patients entering American Joint Committee on Cancer stage IV, C-reactive protein in serum is superior to lactate dehydrogenase. Br J Cancer 91: 699-702

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

32. Djukanovic D, Hofmann U, Sucker A, Rittgen W, Schadendorf D (2000) Comparison of S100 protein and MIA protein as serum marker for malignant melanoma. Anticancer Res 20: 2203-2207

33. Djukanovic D, Hofmann U, Sucker A, Schadendorf D (2001) Melanoma tumour markers S100B and MIA: evaluation of stability in serum and blood upon storage and processing. Br J Dermatol 145: 1030-1031

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

35. Fagnart OC, Sindic CJ, Laterre C (1988) Particle counting immunoassay of S100 protein in serum. Possible relevance in tumors and ischemic disorders of the central nervous system. Clin Chem 34: 1387-1391

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

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

38. Garbe C (2000) Zunehmende Häufigkeit des malignen Melanoms. [Increasing incidence of malignant melanoma]. Hautarzt 51: 518

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

40. Garbe C, Buttner P, Ellwanger U, Brocker EB, Jung EG, Orfanos CE, Rassner G, Wolff HH (1995) [The Malignant Melanoma Central Register of the German Society of Dermatology 1983-1993. Epidemiologic developments and current therapeutic management of malignant melanoma of the skin]. Hautarzt 46: 683-692

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

42. Garbe C, Paul A, Kohler-Spath H, Ellwanger U, Stroebel W, Schwarz M, Schlagenhauff B, Meier F, Schittek B, Blaheta HJ, Blum A, Rassner G (2003b) Prospective evaluation of a follow-up schedule in

cutaneous melanoma patients: recommendations for an effective follow-up strategy. J Clin Oncol 21: 520-529

43. Gaynor R, Herschman HR, Irie R, Jones P, Morton D, Cochran A (1981) S100 protein: a marker for human malignant melanomas? Lancet 1: 869-871

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

45. Gershenwald JE, Buzaid AC, Ross MI (2000) Classification and staging of melanoma. Clin Lab Med 20: 785-815

46. Ghanem G, Loir B, Morandini R, Sales F, Lienard D, Eggermont A, Lejeune F (2001) On the release and half-life of S100B protein in the peripheral blood of melanoma patients. Int J Cancer 94: 586-590

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

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

49. Hamberg AP, Korse CM, Bonfrer JM, de Gast GC (2003) Serum S100B is suitable for prediction and monitoring of response to chemoimmunotherapy in metastatic malignant melanoma. Melanoma Res 13: 45-49

50. Hansson LO, von Schoultz E, Djureen E, Hansson J, Nilsson B, Ringborg U (1997) Prognostic value of serum analyses of S-100 protein beta in malignant melanoma. Anticancer Res 17: 3071-3073

51. Hardemark HG, Ericsson N, Kotwica Z, Rundstrom G, Mendel-Hartvig I, Olsson Y, Pahlman S, Persson L (1989) S-100 protein and neuron-specific enolase in CSF after experimental traumatic or focal ischemic brain damage. J Neurosurg 71: 727-731

52. Harpio R, Einarsson R (2004) S100 proteins as cancer biomarkers with focus on S100B in malignant melanoma. Clin Biochem 37: 512-518

53. Hasegawa M, Takata M, Hatta N, Wakamatsu K, Ito S, Takehara K (1997) Simultaneous measurement of serum 5-S-cysteinyldopa, circulating intercellular adhesion molecule-1 and soluble interleukin-2 receptor levels in Japanese patients with malignant melanoma. Melanoma Res 7: 243-251

54. Hauschild A, Engel G, Brenner W, Glaser R, Monig H, Henze E, Christophers E (1999a) Predictive value of serum S100B for monitoring patients with metastatic melanoma during chemotherapy and/or immunotherapy. Br J Dermatol 140: 1065-1071

55. Hauschild A, Engel G, Brenner W, Glaser R, Monig H, Henze E, Christophers E (1999b) S100B protein detection in serum is a significant prognostic factor in metastatic melanoma. Oncology 56: 338-344

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

57. Henze G, Dummer R, Joller-Jemelka HI, Boni R, Burg G (1997) Serum S100--a marker for disease monitoring in metastatic melanoma. Dermatology 194: 208-212

58. Hidaka H, Endo T, Kawamoto S, Yamada E, Umekawa H, Tanabe K, Hara K (1983) Purification and characterization of adipose tissue S-100b protein. J Biol Chem 258: 2705-2709

59. Hill BR, Levi C (1954) Elevation of a serum component in neoplastic disease. Cancer Res 14: 513-515

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

61. Hoon DS, Bostick P, Kuo C, Okamoto T, Wang HJ, Elashoff R, Morton DL (2000) Molecular markers in blood as surrogate prognostic indicators of melanoma recurrence. Cancer Res 60: 2253-2257

62. Hoon DS, Wang Y, Dale PS, Conrad AJ, Schmid P, Garrison D, Kuo C, Foshag LJ, Nizze AJ, Morton DL (1995) Detection of occult melanoma cells in blood with a multiple-marker polymerase chain reaction assay. J Clin Oncol 13: 2109-2116

63. Horikoshi T, Ito S (1992) Serum 5-S-cysteinyldopa (5-S-CD) as a marker of melanoma progression. J Dermatol 19: 809-813

64. Horikoshi T, Ito S, Wakamatsu K, Onodera H, Eguchi H (1994) Evaluation of melanin-related metabolites as markers of melanoma progression. Cancer 73: 629-636

65. Hornef S, Lux J, Rassner G (1992) [Neuron-specific enolase (NSE)--a suitable tumor marker in malignant melanoma?]. Hautarzt 43: 77-80

66. Isobe T, Ishioka N, Okuyama T (1981) Structural relation of two S-100 proteins in bovine brain; subunit composition of S-100a protein. Eur J Biochem 115: 469-474

67. Isobe T, Okuyama T (1978) The amino-acid sequence of S-100 protein (PAP I-b protein) and its relation to the calcium-binding proteins. Eur J Biochem 89: 379-388

68. Isobe T, Okuyama T (1981a) The amino acid sequence of the tryptophan-containing subunit (alpha-subunit) of bovine brain S-100 protein. J Neurochem 37: 522-524

69. Isobe T, Okuyama T (1981b) The amino-acid sequence of the alpha subunit in bovine brain S-100a protein. Eur J Biochem 116: 79-86

70. Isobe T, Tsugita A, Okuyama T (1978) The amino acid sequence and the subunit structure of bovine brain S-100 protein (PAP I-b). J Neurochem 30: 921-923

71. Juergensen A, Holzapfel U, Hein R, Stolz W, Buettner R, Bosserhoff A (2001) Comparison of two prognostic markers for malignant melanoma: MIA and S100 beta. Tumour Biol 22: 54-58

72. Jury CS, McAllister EJ, MacKie RM (2000) Rising levels of serum S100 protein precede other evidence of disease progression in patients with malignant melanoma. Br J Dermatol 143: 269-274

73. Karnell R, von Schoultz E, Hansson LO, Nilsson B, Arstrand K, Kagedal B (1997) S100B protein, 5-S-cysteinyldopa and 6-hydroxy-5-methoxyindole-2-carboxylic acid as biochemical markers for survival prognosis in patients with malignant melanoma. Melanoma Res 7: 393-399

74. 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: 962-969

75. Kato K, Kimura S (1985) S100ao (alpha alpha) protein is mainly located in the heart and striated muscles. Biochim Biophys Acta 842: 146-150

76. Keilholz U, Willhauck M, Rimoldi D, Brasseur F, Dummer W, Rass K, de Vries T, Blaheta J, Voit C, Lethe B, Burchill S (1998) Reliability of reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)-based assays for the detection of circulating tumour cells: a quality-assurance initiative of the EORTC Melanoma Cooperative Group. Eur J Cancer 34: 750-753

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

78. Krahn G, Kaskel P, Sander S, Waizenhofer PJ, Wortmann S, Leiter U, Peter RU (2001) S100 beta is a more reliable tumor marker in peripheral blood for patients with newly occurred melanoma metastases compared with MIA, albumin and lactate-dehydrogenase. Anticancer Res 21: 1311-1316

79. Ludwin SK, Kosek JC, Eng LF (1976) The topographical distribution of S-100 and GFA proteins in the adult rat brain: an immunohistochemical study using horseradish peroxidase-labelled antibodies. J Comp Neurol 165: 197-207

80. Martenson ED, Hansson LO, Nilsson B, von Schoultz E, Mansson-Brahme E, Ringborg U, Hansson J (2001) Serum S-100b protein as a prognostic marker in malignant cutaneous melanoma. J Clin Oncol 19: 824-831

81. Matsushita Y, Hatta N, Wakamatsu K, Takehara K, Ito S, Takata M (2002) Melanoma inhibitory activity (MIA) as a serum marker for early detection of post-surgical relapse in melanoma patients: comparison with 5-S-cysteinyldopa. Melanoma Res 12: 319-323

82. Matus A, Mughal S (1975) Immunohistochemical localisation of S-100 protein in brain. Nature 258: 746-748

83. Miliotes G, Lyman GH, Cruse CW, Puleo C, Albertini PA, Rapaport D, Glass F, Fenske N, Soriano T, Cuny C, Van Voorhis N, Reintgen D (1996) Evaluation of new putative tumor markers for melanoma. Ann Surg Oncol 3: 558-563

84. Mohammed MQ, Abraha HD, Sherwood RA, MacRae K, Retsas S (2001) Serum S100beta protein as a marker of disease activity in patients with malignant melanoma. Med Oncol 18: 109-120

85. Molina R, Navarro J, Filella X, Castel T, Ballesta AM (2002) S-100 protein serum levels in patients with benign and malignant diseases: false-positive results related to liver and renal function. Tumour Biol 23: 39-44

86. Moore BW (1965) A soluble protein characteristic of the nervous system. Biochem Biophys Res Commun 19: 739-744

87. Mouawad R, Benhammouda A, Rixe O, Antoine EC, Borel C, Weil M, Khayat D, Soubrane C (1996) Endogenous interleukin 6 levels in patients with metastatic malignant melanoma: correlation with tumor burden. Clin Cancer Res 2: 1405-1409

88. Mouawad R, Rixe O, Meric JB, Khayat D, Soubrane C (2002) Serum interleukin-6 concentrations as predictive factor of time to progression in metastatic malignant melanoma patients treated by biochemotherapy: a retrospective study. Cytokines Cell Mol Ther 7: 151-156

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

90. Nakajima T, Watanabe S, Sato Y, Kameya T, Shimosato Y, Ishihara K (1982) Immunohistochemical demonstration of S100 protein in malignant melanoma and pigmented nevus, and its diagnostic application. Cancer 50: 912-918

91. Osella-Abate S, Savoia P, Quaglino P, Fierro MT, Leporati C, Ortoncelli M, Bernengo MG (2003) Tyrosinase expression in the peripheral blood of stage III melanoma patients is associated with a poor prognosis: a clinical follow-up study of 110 patients. Br J Cancer 89: 1457-1462

92. Palmieri G, Ascierto PA, Perrone F, Satriano SM, Ottaiano A, Daponte A, Napolitano M, Caraco C, Mozzillo N, Melucci MT, Cossu A, Tanda F, Gallo C, Satriano RA, Castello G (2003) Prognostic value of circulating melanoma cells detected by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. J Clin Oncol 21: 767-773

93. Palmieri G, Strazzullo M, Ascierto PA, Satriano SM, Daponte A, Castello G (1999) Polymerase chain reaction-based detection of circulating melanoma cells as an effective marker of tumor progression. Melanoma Cooperative Group. J Clin Oncol 17: 304-311

94. Persson L, Hardemark H, Edner G, Ronne E, Mendel-Hartvig I, Pahlman S (1988) S-100 protein in cerebrospinal fluid of patients with subarachnoid haemorrhage: a potential marker of brain damage. Acta Neurochir (Wien) 93: 116-122

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

96. Reynolds SR, Albrecht J, Shapiro RL, Roses DF, Harris MN, Conrad A, Zeleniuch-Jacquotte A, Bystryn JC (2003) Changes in the presence of multiple markers of circulating melanoma cells correlate with clinical outcome in patients with melanoma. Clin Cancer Res 9: 1497-1502

97. Salopek TG, Marghoob AA, Slade JM, Rao B, Rigel DS, Kopf AW, Bart RS (1995) An estimate of the incidence of malignant melanoma in the United States. Based on a survey of members of the American Academy of Dermatology. Dermatol Surg 21: 301-305

98. Sasaki Y, Shimizu H, Naka W, Takeshita E, Nishikawa T (1997) Evaluation of the clinical usefulness of measuring urinary excretion of 5-S-cysteinyldopa in melanoma: ten years' experience of 50 patients. Acta Derm Venereol 77: 379-381

99. Sato T, McCue P, Masuoka K, Salwen S, Lattime EC, Mastrangelo MJ, Berd D (1996) Interleukin 10 production by human melanoma. Clin Cancer Res 2: 1383-1390

100. Schaarschmidt H, Prange HW, Reiber H (1994) Neuron-specific enolase concentrations in blood as a prognostic parameter in cerebrovascular diseases. Stroke 25: 558-565

101. Schafer BW, Heizmann CW (1996) The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology. Trends Biochem Sci 21: 134-140

102. Scheibenbogen C, Mohler T, Haefele J, Hunstein W, Keilholz U (1995) Serum interleukin-8 (IL-8) is elevated in patients with metastatic melanoma and correlates with tumour load. Melanoma Res 5: 179-181

103. Schittek B, Blaheta HJ, Florchinger G, Sauer B, Garbe C (1999a) Increased sensitivity for the detection of malignant melanoma cells in peripheral blood using an improved protocol for reverse transcription-polymerase chain reaction. Br J Dermatol 141: 37-43

104. Schittek B, Bodingbauer Y, Ellwanger U, Blaheta HJ, Garbe C (1999b) Amplification of MelanA messenger RNA in addition to tyrosinase increases sensitivity of melanoma cell detection in peripheral blood and is associated with the clinical stage and prognosis of malignant melanoma. Br J Dermatol 141: 30-36

105. Schlagenhauff B, Schittek B, Ellwanger U, Stroebel W, Blum A, Schwarz M, Rassner G, Garbe C (2000) Significance of serum protein S100 levels in screening for melanoma metastasis: does protein S100 enable early detection of melanoma recurrence? Melanoma Res 10: 451-459

106. Schmitz C, Brenner W, Henze E, Christophers E, Hauschild A (2000) Comparative study on the clinical use of protein S-100B and MIA (melanoma inhibitory activity) in melanoma patients. Anticancer Res 20: 5059-5063

107. Schultz ES, Diepgen TL, Den-Driesch P (1998) Clinical and prognostic relevance of serum S-100 beta protein in malignant melanoma. Br J Dermatol 138: 426-430

108. Schwartze G, Fiedler H (1994) [The diagnostic significance of alpha-MSH in malignant melanoma of man]. Hautarzt 45: 468-470

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

110. Skogseid IM, Nordby HK, Urdal P, Paus E, Lilleaas F (1992) Increased serum creatine kinase BB and neuron specific enolase following head injury indicates brain damage. Acta Neurochir (Wien) 115: 106-111

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

112. Stefansson K, Wollmann R, Jerkovic M (1982a) S-100 protein in soft-tissue tumors derived from Schwann cells and melanocytes. Am J Pathol 106: 261-268

113. Stefansson K, Wollmann RL, Moore BW, Arnason BG (1982b) S-100 protein in human chondrocytes. Nature 295: 63-64

114. Stoitchkov K, Letellier S, Garnier JP, Bousquet B, Tsankov N, Morel P, Ghanem G, Le Bricon T (2002) Melanoma progression and serum L-dopa/L-tyrosine ratio: a comparison with S100B. Melanoma Res 12: 255-262

115. Takahashi K, Isobe T, Ohtsuki Y, Sonobe H, Yamaguchi H, Akagi T (1985) S-100 protein positive human T-lymphocyte. Am J Clin Pathol 83: 69-72

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

117. Thomas L (1995) Tumormarker. In: Thomas L (ed) Labor und Diagnose. 4. Auflage edn. Die medizinische Verlagsgesellschaft mbH, Marburg: 1134-1251

118. Tofani A, Cioffi RP, Sciuto R, Rea S, Festa A, Di Filippo F, Cavaliere R, Maini CL (1997) S-100 and NSE as serum markers in melanoma. Acta Oncol 36: 761-764

119. Van Eldik LJ, Jensen RA, Ehrenfried BA, Whetsell WO, Jr. (1986) Immunohistochemical localization of S100 beta in human nervous system tumors by using monoclonal antibodies with specificity for the S100 beta polypeptide. J Histochem Cytochem 34: 977-982

120. Vuoristo MS, Kellokumpu-Lehtinen P, Laine S, Parvinen LM, Hahka-Kemppinen M, Korpela M, Kumpulainen E (2000) The value of serum S-100beta and interleukins as tumour markers in advanced melanoma. Melanoma Res 10: 237-241

121. Warr RP, Zebedee Z, Kenealy J, Rigby H, Kemshead JT (2003) The detection of tyrosinase mRNA in peripheral blood samples is unlikely to aid in the management of patients with localised malignant melanoma. Br J Plast Surg 56: 540-545

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

123. Wollina U, Karte K, Hipler UC, Knoll B, Kirsch K, Herold C (2000) Serum protein s100beta in patients with malignant melanoma detected by an immunoluminometric assay. J Cancer Res Clin Oncol 126: 107-110

124. Zeltzer PM, Marangos PJ, Parma AM, Sather H, Dalton A, Hammond D, Siegel SE, Seeger RC (1983) Raised neuron-specific enolase in serum of children with metastatic neuroblastoma. A report from the Children's Cancer Study Group. Lancet 2: 361-363

125. Zimmer DB (1991) Examination of the calcium-modulated protein S100 alpha and its target proteins in adult and developing skeletal muscle. Cell Motil Cytoskeleton 20: 325-337

126. Zimmer DB, Cornwall EH, Landar A, Song W (1995) The S100 protein family: history, function, and expression. Brain Res Bull 37: 417-429

7. Anhang

7.1. Erfassungsbogen

Pat.Nr.	Snr.	Lfd.Nr.	Name	Geschlecht	Geb. Datum	Datum BE	Stadium	S100 (µg/l) Sang.	S100 (µg/l) Elec.	Typ	TD (mm)	OP	Lokal.	Met.-Gr.

Danksagung

Hiermit erfülle ich die angenehme Aufgabe Herrn Professor Dr. med. C. Garbe, Leiter der Sektion Dermatologische Onkologie der Universitäts-Hautklinik Tübingen, für die Überlassung des Themas und für die anregenden und konstruktiven Gespräche zu danken.

Herrn Privatdozent Dr. P. Brossart danke ich für die Begutachtung der Arbeit.

Danken möchte ich meinem Betreuer Dr. med. U. Caroli für die zahlreichen Anregungen, die Ermutigungen und die hilfreichen Diskussionen. Weiterhin danke ich Paul Böhm für die Ratschläge bei der statistischen Auswertung. Mein Dank gilt außerdem Evelyn Maczey und allen weiteren Mitarbeitern der Universitäts-Hautklinik, die mir unterstützend und hilfreich zur Seite standen.

Abschließend gilt besonderer Dank meiner Familie und meiner Freundin Julia Brugger die mit viel Geduld, Aufmunterung und tatkräftiger Unterstützung die Entstehung dieser Dissertation möglich gemacht haben.

Lebenslauf

Name	Simon Reichenauer
Geburtsdatum	06.09.1977
Geburtsort	Berlin-Schöneberg
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig
Eltern	Josef Reichenauer Inge Reichenauer
Geschwister	Florian Reichenauer

07/1984 – 07/1988	Stauferschule Schwäbisch Gmünd
08/1988 – 05/1997	Hans-Baldung-Gymnasium Schwäbisch Gmünd
09/1997 – 10/1998	Zivildienst im Rettungsdienst des Deutschen Roten Kreuzes in Schwäbisch Gmünd
11/1998 – 03/1999	Beschäftigung als Rettungssanitäter im Kreisverband Schwäbisch Gmünd des Deutschen Roten Kreuzes
04/1999	Immatrikulation für das Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
26.03.2001	Ärztliche Vorprüfung
21.03.2002	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
11/2002 – 02/2005	Studentische Hilfskraft in der internistischen Notaufnahme der Medizinische Klinik, Universitätsklinikum Tübingen
12/2002	Beginn der Dissertation an der Universitäts-Hautklinik Tübingen
08.09.2004	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
29.11.2005	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung