

Aus der
Sektion für Kinderpathologie (Direktor: Prof. Dr. med. I. Leuschner) und der
Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe (Direktor: Prof. Dr. med. Dr. hc. W. Jonat)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

PROLIFERATIONSSPEZIFISCHE ANTIKÖRPER
Ki-S11 UND Ki-S2 SOWIE HMB-45-EXPRESSION
ALS PROGNOSEMARKER FÜR BENIGNE UND MALIGNEN
MELANOZYTISCHE LÄSIONEN DER HAUT

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Nadja Richter
aus Kiel

Kiel, 2009

1. Berichterstatter: Prof. Dr. v. Kaisenberg

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Hauschild

Tag der mündlichen Prüfung: 07. Oktober 2009

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 07. Oktober 2009

gez.: Prof. Dr. Dr. Schünke
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

meinen Kindern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	4
1. Einleitung	5
2. Methoden	10
2.1 Untersuchungsgut.....	10
2.2 Immunhistochemische Färbung	10
2.2.1 Prinzip der Immunhistochemischen Färbung	10
2.2.2 Herstellung der Paraffinschnitte	11
2.2.3 Alkalische-Phosphatase Anti-Alkalische-Phosphatase (APAAP) Methode.....	11
2.2.4 Avidin-Biotin-Komplex (ABC)-Methode.....	13
2.2.5 Ki-S11.....	14
2.2.6 Ki-S2.....	14
2.2.7 HMB-45	15
2.3 Reagenzien, Verdünnungen und Geräte.....	15
2.4 Beurteilung der Immunhistochemischen Färbung.....	16
2.5 Auswertung	17
2.6 Positiv- und Negativkontrollen.....	18
2.7 Statistische Methoden.....	18
3. Ergebnisse	20
3.1 Generelle Aspekte der Immunfärbung	20
3.1.1 Immunhistochemische Färbungen mit Ki-S11	21
3.1.2 Immunhistochemische Färbungen mit Ki-S2	22
3.1.3 Immunhistochemische Färbungen mit HMB-45.....	23
3.2 Proliferationsindices und histologischer Typ	24
3.3 Proliferationsindices und Dignität (benigne versus maligne).....	27
3.4 Proliferationsindices und prognostische Tumorgruppe	28
3.5 ROC-Analyse	31
3.5.1 Ki-S11.....	32
3.5.2 Ki-S2.....	33
3.5.3 Vergleich und Bewertung von Ki-S11 und Ki-S2	34
3.6 Positive/negative prädiktive Werte und Likelihood-Quotienten	35
3.7 HMB-45.....	36
4. Diskussion.....	37
4.1 Korrelation der Proliferationsaktivität mit dem histologischen Typ	37
4.2 Unterscheidung benigner und maligner Tumoren (Dignität).....	38
4.3 Korrelation der Proliferationsaktivität mit der prognostischen Tumorgruppe ...	39
4.4 ROC-Analyse	40
4.5 Positive/negative prädiktive Werte und Likelihood-Quotienten	40
4.6 Tumorprogression	41
4.7 Studien.....	42
5. Zusammenfassung	45
6. Literaturverzeichnis	46
7. Danksagung	51
8. Lebenslauf.....	52

1. Einleitung

Das in den letzten vier Jahrzehnten stark veränderte Freizeitverhalten hat zu einer Verdreifachung des kutanen malignen Melanoms in der kaukasischen Bevölkerung weltweit geführt. Die Krebsstatistiken der U.S.A. zu Beginn der 1970er Jahre wiesen eine Inzidenz von 6 von 100.000 Fällen und 18 von 100.000 Einwohnern zu Beginn des Jahres 2000 aus. Die Inzidenzraten in Zentraleuropa stiegen im Vergleichszeitraum von 3 bis 4 auf 10 bis 15 Fälle pro 100.000 Einwohner an. Eine weitere Verdopplung der Inzidenzraten wird aufgrund verschiedener Kohortenstudien für die kommenden zwei Jahrzehnte erwartet. Die höchsten Inzidenzraten wurden von Australien und Neuseeland mit 40 bis 60 Fällen pro 100.000 Einwohner berichtet. Während die Mortalitätsraten in den 1970ern und 1980ern leicht anstiegen, kam es in vielen Ländern in den 1990ern zu einem Stillstand des Anstiegs. Gleichzeitig wurde über eine klare Abnahme der Breslow'schen Tumordicke zum Zeitpunkt der Diagnose berichtet, was für eine verbesserte Früherkennung spricht, die der wesentlichste Faktor für eine günstige Prognose ist (Garbe und Leiter, 2009).

Melanozytische Proliferationen sind die Ursache der absoluten Mehrheit aller Hauttumoren. Ihre Histogenese und eine mögliche Progression zu einem malignen Hauttumor wurden bisher jedoch wenig verstanden. Eine mögliche Einteilung mit prognostischer Relevanz ist die Unterscheidung zwischen sechs Kategorien melanozytischer Neoplasien: gewöhnliche Nävi, dysplastische Nävi, Spitz/Reed Nävi (jeweils benigne), das Melanoma in situ, das invasive maligne Melanom sowie das metastasierte Melanom (jeweils maligne). Die dysplastischen Nävi und das Melanoma in situ bilden in dieser Einteilung eine Gruppe von Tumoren zwischen eindeutig benignen und eindeutig malignen Tumoren, deren biologisches Verhalten, und damit verbunden deren Prognose, schlecht vorhersehbar ist.

Lange Zeit wurde von einem kontinuierlichen Übergang von Benignität zu Malignität ausgegangen, wobei den dysplastischen Nävi ein hohes Risiko einer malignen Entartung zugeschrieben wurde (Clark et al., 1978). Zunehmend wurden jedoch Zweifel an dieser Theorie geäußert (Maize JC, 1984; Ackerman AB, 1988). Beim

Syndrom der dysplastischen Nävi (Clark et al., 1978; Elder et al., 1980), dem ein autosomal dominanter Erbgang zugrunde liegt (Greene et al., 1983), besteht zwar ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines malignen Melanoms (Greene et al., 1983; Rigel et al., 1989). Das biologische Verhalten und damit die Prognose der sogenannten sporadischen dysplastischen Nävi bleibt allerdings unklar. Man nimmt an, dass etwa 20% der malignen Melanome auf dem Boden dieses Syndroms entstehen. Ob diese als prämaligne Läsionen anzusehen sind (Ackerman AB, 1988; Elder et al., 1980; Reed RJ, 1990) oder doch kein Übergang in Malignität besteht, ist derzeit noch ungewiss. Einheitliche histopathologische Kriterien gibt es bisher nicht (Clemente et al., 1991; de Wit et al., 1993; Duncan et al., 1993).

Ähnlich unklar ist das biologische Verhalten der Melanoma in situ. Auf der einen Seite scheint es sich bei dieser Entität um die letzte Stufe des Übergangs von Benignität zu Malignität zu handeln (Elder et al., 1980; Clark et al., 1984; Crucioli und Stilwell, 1982). Auf der anderen Seite gilt bei kompletter Exzision die Heilung als gesichert, eine Metastasierung ist nahezu ausgeschlossen (Ackerman AB, 1983). Man geht davon aus, dass etwa 80% der malignen Melanome de novo, d.h. unabhängig von vorangehenden Dysplasien, entstehen.

Die klassische Methode der Klassifizierung von malignen Melanomen orientiert sich an mikroskopischen Befunden, insbesondere der Eindringtiefe, entsprechend der fünf Level nach Clark (Clark et al., 1969), sowie an der Tumordicke (Breslow, 1970).

Eine weitere Methode der Klassifizierung unter Verwendung von Proliferationsmarkern des Zellzyklus orientiert sich nicht nur an der Histologie und am Malignitätsgrad, sondern kann auch Auskunft über den möglichen klinischen Verlauf einer Erkrankung geben (Baak JP, 1990; Stavropoulos et al., 2002; Quinn und Wright, 1990; Hall und Levison, 1990; Linden et al., 1992). Außerdem ist eine zusätzliche Einteilung der Tumoren in verschiedene Schweregrade möglich. Diese Einteilung kann außerdem zur klinischen Einteilung wichtige Informationen mit sich bringen und zur Festlegung des nötigen Therapieregimes herangezogen werden.

Die Proliferationsaktivität kann mittels immunhistochemischer Methoden bestimmt werden. Viele wichtige molekularbiologische Grundlagen dieser Technik sind im

Institut für Pathologie der Christian-Albrechts-Universität in Kiel entwickelt worden (Gerdes et al., 1983; Kreipe et al., 1993a,b). Voraussetzung für die Bestimmung der Proliferationsaktivität ist das Vorhandensein proliferationspezifischer Antigene im Kern sich teilender Zellen. Diese werden von spezifischen Antikörpern gebunden und dadurch immunhistochemisch sichtbar gemacht.

Das Ki-67 und repp86 sind solche Antigene, die sich zur Darstellung des Wachstums einer Zellpopulation eignen (Rudolph et al., 1998a; Frahm et al., 1999; Heidebrecht et al., 1997). Das Ki-67 wird ausschließlich während der G1-, S-, G2- und der M-Phase des Zellzyklus exprimiert (Abbildung 1), nicht jedoch in ruhenden oder terminal differenzierten Zellen (Gerdes et al., 1984; Gerdes et al., 1991; Key et al., 1993). Der in Kiel entwickelte Antikörper Ki-S11 erkennt ein formalinresistentes Epitop des Ki-67 Antigens (Rudolph et al., 1997a). Das Antigen repp86 ist von Beginn der S-Phase bis zum Ende der M-Phase nachweisbar, nicht jedoch während der G1-Phase. Es wird von dem ebenfalls in Kiel entwickelten Antikörper Ki-S2 erkannt (Heidebrecht et al., 1997; Rudolph et al., 1998b). Mit Zunahme der Malignität nimmt die Immunreaktivität von Ki-S2 zu, nicht jedoch die von Ki-S11. Daher nimmt man an, dass es in malignen Zellen durch Verlust von Regulationsmechanismen zu einer Verkürzung der G1-Phase kommt. Somit wäre die Darstellung der Wachstumsfraktion und damit die Abschätzung des malignen Potentials mit Ki-S2 präziser als mit Ki-S11 (Heidebrecht et al., 1997; Rudolph et al., 1998b). Durch die Anwendung der Antikörper Ki-S2 und Ki-S11 ist es mittels Darstellung der Antigene repp86 und Ki-67 möglich, zuverlässige Aussagen über die Proliferationsaktivität von Tumoren zu treffen.

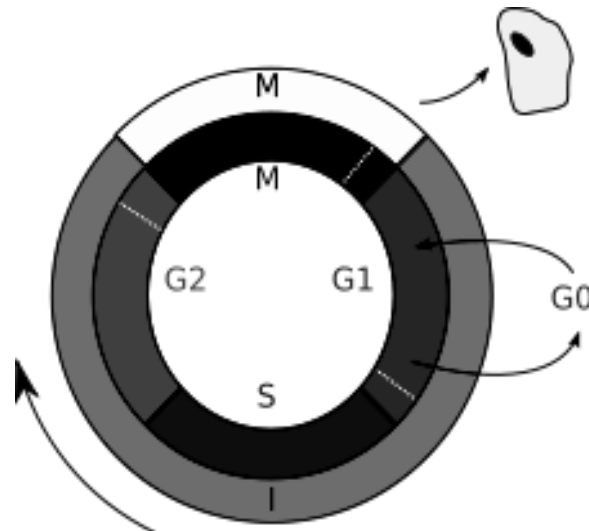


Abbildung 1. Schematische Darstellung des Zellzyklus, M=Mitose, G1=postmitotische Ruhephase, S=Reduplikation, G2=prämitotische Ruhephase, G0=Ruhephase, I=Interphase

Zur vergleichenden Darstellung der melanozytären Differenzierung einer Zelle kann der Antikörper HMB-45 herangezogen werden. Durch ihn wird das Antigen gp100 dargestellt. Dieses befindet sich in der Vorstufe der Melanosomen. Somit ist mittels HMB-45 eine frühe Melaninsynthese bzw. eine Aktivierung melanozytärer Zellen darstellbar (Smoller et al., 1989).

Eine frühere Studie an einer Subpopulation des hier untersuchten Kollektivs verwendete monoclonale Antikörper (AK) Ki-S1 und Ki-S5, welche mit zwei unterschiedlichen proliferationspezifischen nukleären Antigenen (AG) reagieren (Topoisomerase II α bzw. Ki-67), sowie HMB-45, einem AK, der mit gp100 reagiert (Tabelle 1). Dabei zeigten sich statistisch hoch signifikante Unterschiede ($P < 0.01$) der Ki-S1- und Ki-S5-Positivität zwischen den gewöhnlichen Nävi, den Spitz/Reed Nävi, den malignen Melanomen und den metastasierten Melanomen. Die dysplastischen Nävi unterschieden sich kaum von anderen Nävi des zusammengesetzten Typs. Die Ki-S1- und Ki-S5-Positivität des malignen Melanoms war hochgradig assoziiert mit dem Tumorstadium, nicht jedoch mit der Mitoserate oder HMB-45. Mit zunehmender Tumorprogression zeigte sich außerdem eine ansteigende Heterogenität der beobachteten Proliferationsindices. Die Autoren

zogen den Schluss, dass die vorliegende Studie nicht das Konzept einer Progression dysplastischer Naevi in ein malignes Melanom stützt. Die Bestimmung der Proliferationsaktivität könnte sich jedoch bei Fällen einer unsicheren Histologie als wertvolles diagnostisches Instrument erweisen. Außerdem könnte sie geeignet sein, ein alternatives Konzept der Klassifikation melanozytischer Tumoren zu entwickeln (Rudolph et al., 1995).

Tabelle 1. Vergleich der dargestellten Antigene sowie der hierfür verwendeten AK in der Studie von Rudolph et al. (1995) und der vorliegenden Arbeit.

Antigen (AG)	Antikörper (AK)	
Topoisomerase II α	Ki-S1	Rudolph et al., 1995
Ki-67	Ki-S11, Ki-S5	vorliegende Studie, Rudolph et al., 1995
repp86	Ki-S2	vorliegende Studie
gp100	HMB45	vorliegende Studie, Rudolph et al., 1995

In der nun vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, inwieweit die monoklonalen Antikörper Ki-S11 und Ki-S2 die Proliferationsaktivität der untersuchten melanozytären Tumoren widerspiegeln, insbesondere:

- ob die Proliferationsaktivität mit dem histologischen Typ korreliert
- ob sich benigne und maligne Tumoren signifikant unterscheiden
- ob die Proliferationsaktivität mit der prognostischen Tumorgruppe korreliert
- wie hoch die Sensitivitäten und Spezifitäten für unterschiedliche Cut-off-Werte in der ROC-Analyse sind (Prognoseparameter)
- wie hoch die positiven und negativen prädiktiven Werte sowie die Likelihood-Quotienten sind
- ob die vorliegenden Daten das Konzept der Tumorprogression von Vorstufen mit unsicherem biologischen Verhalten stützen
- ob die gefundenen Ergebnisse in Einklang mit früheren Studien stehen.

2. Methoden

2.1 Untersuchungsgut

In die hier vorliegende Arbeit fließen 327 histologische humane Hautgewebeprobe ein. Im Einzelnen werden nun die histologische Diagnose, das Geschlecht und die Altersverteilung dargestellt (Tabelle 2).

Tabelle 2. Histologische Diagnose, Geschlecht und Altersverteilung von 327 humanen Hautgewebeprobe melanozytischer Läsionen der Haut.

Diagnose	männlich N (%)	weiblich N (%)	gesamt N (%)	Alter Mittelwert ± SD
gewöhnliche Nävi	31 (52,5)	28 (47,5)	59 (100,0)	33,9 ± 22,8
dysplastische Nävi	60 (64,5)	33 (35,5)	93 (100,0)	27,4 ± 12,6
Spitz/Reed Nävi	10 (41,7)	14 (58,3)	24 (100,0)	14,1 ± 7,7
Melanoma in situ	48 (69,6)	21 (30,4)	69 (100,0)	58,9 ± 12,8
invasives Melanom	38 (47,5)	42 (52,5)	80 (100,0)	54,2 ± 14,0
metastasiertes Melanom	1 (50,0)	1 (50,0)	2 (100,0)	55,3 ± 18,8
gesamt	173 (52,9)	154 (47,1)	327 (100,0)	41,0 ± 14,7

Das hier untersuchte Kollektiv setzt sich aus Patienten des Institutes für Pathologie und aus der Klinik für Dermatologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel zusammen.

2.2 Immunhistochemische Färbung

2.2.1 Prinzip der Immunhistochemischen Färbung

Die Immunfärbung beruht auf dem Prinzip der Bindung zwischen dem Paratop eines Antikörpers und dem Epitop eines dazugehörigen Antigens. Diese Bindung kann mittels Zugabe eines Enzyms sowie eines Chromogens sichtbar gemacht werden. Als Enzyme werden häufig die Alkalische Phosphatase sowie die Peroxidase benutzt, da beide mit einer Vielzahl von Chromogenen ein Farbprodukt bilden. Neben der Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase (APAAP)-Methode und der Avidin-Biotin-Komplex (ABC)-Methode kommen sowohl direkte als auch indirekte Methoden zur Anwendung. Während bei der direkten Methode der

Primärantikörper mit einem Enzym konjugiert ist, wird bei der indirekten Methode ein enzymmarkierter Sekundärantikörper benötigt, der sowohl an den unkonjugierten Primärantikörper als auch an das Chromogen bindet und somit eine Brücke zwischen beiden herstellt.

2.2.2 Herstellung der Paraffinschnitte

Die Hautgewebeproben wurden in 4% Formalin (Merck, Darmstadt) fixiert und anschließend in Paraffin (Merck, Darmstadt) eingebettet. Von den so gewonnenen Gewebelöcken wurden mit einem Schlittenmikrotom (Leica, Wetzlar) 2-4µm dicke Schnitte gefertigt. Diese wurden dann auf zuvor mit APES (Amino-propyl-ethoxy-silane) beschichtete Objektträger aufgezogen. Durch dieses Verfahren kommt es zu einer Ausbildung kovalenter Bindungen und dadurch zu einer besseren Haftung der Schnitte auf der Oberfläche der Objektträger (Rentrop et al., 1986). Im Folgenden wurden die Schnitte im Brutschrank bei 37°C für 24h getrocknet.

2.2.3 Alkalische-Phosphatase Anti-Alkalische-Phosphatase (APAAP) Methode

Für die APAAP-Methode (Cordell et al., 1984; Stein et al., 1985) benötigt man 4 Reagenzien: den Primärantikörper, den Sekundärantikörper, den APAAP-Komplex (bestehend aus dem Enzym Alkalische Phosphatase und einem Antikörper gegen die Alkalische Phosphatase) sowie einer Entwicklungslösung. Der monoklonale Primärantikörper, in der Regel in Mäusen hergestellt, bindet spezifisch an das nachzuweisende Antigen. Gegen diesen ist der Sekundärantikörper, in einer anderen Tierspezies hergestellt, gerichtet, der zusätzlich an Anti-Alkalische-Phosphatase-Antikörper bindet. Somit bildet der Sekundärantikörper eine Brücke zwischen Primärantikörper und APAAP-Komplex. Die Alkalische Phosphatase katalysiert dann unter Zugabe der Entwicklungslösung mit dem Substrat-Chromogen-Komplex eine chemische Reaktion, deren Endprodukt ein roter Farbstoff ist und indirekt das gesuchte Antigen sichtbar macht.

Zunächst wurden die vorbereiteten Schnitte in Xylol für 10 Minuten entparaffiniert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe (100%-100%-100%-95%-95%-70%) rehydriert. Nach einer gründlichen Spülung in Leitungswasser sowie TBS-Puffer wurden die Schnitte 2,5 Minuten in Citratpuffer gekocht. Die folgende Abkühlung erfolgte langsam durch äußerliches Kühlen des Topfes, gefolgt von Spülen in Leitungswasser. Diese Methode führt zu einer Auflösung von vernetzten Methylengruppen, die sich durch die Anwendung formalinhaltiger Fixativa ausgebildet haben. Diese verdecken das Antigen und machen es für den Antikörper unzugänglich (Shi et al., 1991). Danach wurden die Schnitte in TBS-Puffer gestellt. Nun folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper, jeweils unverdünnt für 1h (Tabelle 3): Die Präparate wurden mit jeweils 100µl der Primärantikörperlösung benetzt und bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach wurden die Präparate dreimal in TBS-Puffer gespült und 30 Minuten mit dem Sekundärantikörper in einer Wanne auf einem Rüttler inkubiert. Der Sekundärantikörper, ein monoklonaler Antikörper des Kaninchens (Kaninchen-Anti-Maus AK, Dako Z 259, Dako, Hamburg), ist sowohl gegen IgG der Maus als auch gegen den APAAP-Komplex gerichtet. Nach erneutem Spülen in TBS-Puffer wurde der APAAP-Komplex hinzugefügt und die Präparate wiederum auf dem Rüttler inkubiert. Diese Applikation des Sekundärantikörpers, gefolgt von der Applikation des APAAP-Komplexes, wurde zweimal für je 10 Minuten wiederholt, wobei zwischenzeitlich mit TBS-Puffer gespült wurde. Dieses sogenannte Sandwich-Verfahren bewirkt eine intensivere Farbreaktion dadurch, dass zusätzliche Enzymmoleküle an die Antigenbindungsstelle gebracht werden. Sowohl der Sekundärantikörper als auch der APAAP-Komplex wurde mit einer 10%-igen Humanserumpufferlösung in einem Verhältnis von 1:20 verdünnt, um mögliche anti-humane Kreuzreaktivitäten auszuschalten. Nach wiederholtem Spülen in TBS-Puffer erfolgte nun die Entwicklung der Farbreaktion. Hierzu wurde eine Entwicklungslösung hergestellt (s.a. 2.3 Reagenzien, Verdünnungen und Geräte), die aus einem Substrat-Chromogen-Komplex besteht. Die Alkalische Phosphatase des APAAP-Komplexes hydrolysiert das Substrat Naphthol-AS-BI-Phosphat zu Phenolkomponenten, die mit dem Chromogen Neufuchsin zu einem roten Azofarbstoff reagieren. Zur Blockierung der endogenen Phosphatase wurde Levamisol (L9756, Sigma, St. Louis, USA) zugefügt. Die Schnitte wurden 20 min inkubiert. Anschließend wurden die Präparate mit aqua dest. gespült und für 1

Minute mit Hämalaun gegengefärbt. Nach gründlichem Spülen in Leitungswasser folgte eine Dehydrierung der Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%-95%-95%-100%-100%-100% Ethanol) und Xylol. Zum Abschluss wurden die Präparate mit Pertex (Medite, Burgdorf) eingedeckt.

2.2.4 Avidin-Biotin-Komplex (ABC)-Methode

Die Avidin-Biotin-Komplex-Methode (Hsu et al., 1981) basiert auf der Fähigkeit des Eiweißglycoproteins Avidin (Streptavidin), 4 Moleküle des Vitamins Biotin physikalisch zu binden. Der Sekundärantikörper (z.B. Kaninchen-Antikörper), der an den Primärantikörper (z.B. Maus-Antikörper) bindet, ist mit Biotin konjugiert. Als drittes Reagenz wird ein Peroxidase-konjugierter Avidin-Biotin-Komplex hinzugefügt. Die freien Stellen dieses Komplexes ermöglichen die Bindung an das Biotin des Sekundärantikörpers. Mit einem geeigneten Chromogen werden mittels einer enzymatischen Reaktion, katalysiert durch die Peroxidase, die Antigen-Antikörper-Bindungsstellen sichtbar gemacht.

Die Präparate wurden analog der APAAP-Methode entparaffiniert und rehydriert. Darauf folgte für 20 Minuten ein Bad in einem Gemisch aus Methanol und Wasserstoffperoxid. In gleicher Weise wie bei der APAAP-Methode wurden die Präparate in TBS-Puffer gespült, in Citratpuffer gekocht und nach Abkühlung durch Leitungswasser mit dem Primärantikörper inkubiert. Während der Inkubation des Primärantikörpers in einer feuchten Kammer wurde der biotinylierte Sekundärantikörper (Kaninchen-Anti-Maus-Antikörper E 354, Dako, Hamburg) in einem Verhältnis von 1:100 mit zuvor 1:10 verdünntem, inaktiviertem Humanserum verdünnt. Das Humanserum dient der Abdeckung unspezifischer Bindungsstellen im Präparat. Auch der mit Peroxidase konjugierte Avidin-Biotin-Komplex (Strept. AB Komplex K 377, Dako, Hamburg) wurde in einer Verdünnung von 1:100 in TBS-Puffer zu diesem Zeitpunkt hergestellt. Nach Abschluß der Inkubation mit dem Primärantikörper folgte nach dreimaligem Spülen mit TBS-Puffer die Inkubation mit dem biotinylierten Sekundärantikörper, indem jeweils 100µl der vorbereiteten Lösung auf ein Präparat pipettiert wurden, um 30 Minuten einzuwirken. Danach mussten die Schnitte erneut gründlich gespült und mit dem Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex für weitere 30 Minuten inkubiert werden. Die freien Stellen des Avidinmoleküls

ermöglichten jetzt die Bindung an das Biotin des Sekundärantikörpers. Im Anschluss erfolgte eine Spülung der Präparate mit TBS-Puffer und die Entwicklung mit dem Chromogen Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid (DAB, Sigma, St. Louis, USA). Dieses fungiert als Elektronendonator und wird durch die Peroxidase oxidiert. Dabei bildet sich ein braunes Reaktionsprodukt, das in Alkohol unlöslich ist und die Antigen-Antikörper-Bindungsstelle markiert. Für diesen Schritt wurden die Präparate mit einer in Puffer aufgelösten DAB-Tablette unter Zugabe von Wasserstoffperoxid 10 Minuten inkubiert. Diese Maßnahme musste unter Lichteinstrahlung erfolgen, da UV-Licht die enzymatische Reaktion beschleunigt. Das anschließende Spülen mit Wasser, die Kerngegenfärbung und die Dehydrierung der Präparate erfolgte gemäß der oben beschriebenen APAAP-Methode. Zum Eindecken der Präparate wurde Pertex (Medite, Burgdorf) verwendet.

2.2.5 Ki-S11

Dieser monoklonale Antikörper der Maus, der in dem Institut für Hämatopathologie der Christian-Albrechts-Universität Kiel hergestellt wird, erkennt ein formalinresistentes Epitop des Ki-67 Antigens (Rudolph et al., 1997a). Es handelt sich hierbei um ein im Zellkern befindliches Antigen, welches ausschließlich während der G1-, S-, G2- und M-Phase des Zellzyklus, nicht jedoch in ruhenden oder terminal differenzierten Zellen exprimiert wird. Somit eignet sich der Nachweis dieses proliferationsassoziierten Antigens zur Darstellung der Wachstumsfraktion einer Zellpopulation (Gerdes et al., 1984; Gerdes et al., 1991; Key et al., 1993).

2.2.6 Ki-S2

Dieser Antikörper der Maus, der ebenfalls in dem Institut für Hämatopathologie der Universität Kiel hergestellt wird, erkennt ein proliferationsassoziiertes Antigen repp86 mit einem Molekulargewicht von 86 kD (Heidebrecht et al., 1997; Rudolph et al., 1998b). Das Antigen repp86 ist vom Beginn der S-Phase bis zum Ende der M-Phase nachweisbar, nicht jedoch während der G1-Phase. Das Protein zeigt eine diffuse Lokalisation im Zellkern in den Phasen G2 und S sowie einen strikten räumlichen Bezug zum Spindelapparat während der Mitose (Heidebrecht et al., 2001;

Heidebrecht et al., 2003). Da die Immunreaktivität von Ki-S2, im Gegensatz zu der von Ki-S11, mit der Zunahme der Malignität steigt, nimmt man an, dass der Verlust von Regulationsmechanismen in malignen Zellen zu einer Verkürzung der G-1-Phase führt. Somit wäre mit Ki-S2 eine genauere Beurteilung der Wachstumsfraktion und damit verbunden eine bessere Abschätzung des malignen Potentials einer Zellpopulation möglich, verglichen mit Ki-S11 (Heidebrecht et al., 1997; Rudolph et al., 1998b).

2.2.7 HMB-45

Der Antikörper HMB-45 (Enzo Life Sciences, Farmingdale, U.S.A.) ist ein Marker mit einer hohen Spezifität für eine melanozytäre Differenzierung einer Zelle (Wick et al, 1988; Ordóñez et al., 1988). Das durch ihn dargestellte Antigen gp100 befindet sich in der Vorstufe der Melanosomen und stellt dadurch eine frühe Melaninsynthese bzw. eine Aktivierung melanozytärer Zellen dar (Smoller et al., 1989). Häufig findet sich eine starke Anfärbung der epidermalen Komponente bei Abschwächung der Reaktion nach vertikal. Die Expression kann in Metastasen verringert sein (Bishop et al., 1993).

2.3 Reagenzien, Verdünnungen und Geräte

ABC-Komplex:

Streptavidin 1:100 in TBS (Lösung A) und biotinylierte Peroxidase 1:100 in TBS (Lösung B), Nr. K 377 (Dako, Hamburg)

Entwicklungslösung: 3,3'-Diaminobenzidin (DAB)-Tetrahydrochlorid (Sigma, St. Louis, USA)

(ABC) 1 Tablette DAB (Sigma, St. Louis, USA) in 18ml TBS-Puffer

Entwicklungslösung: Propandiol, Trispuffer, Natriumchlorid, Levamisol

APAAP:

Naphthol AS-BI-phosphat, N,N-Dimethylformamid

Neufuchsin, Natriumnitrit, mit HCl auf pH 8,7 einstellen

saures Hämalaun nach Maier

BSA:

Bovines Serumalbumin (Sigma, St. Louis, USA)

Citratpuffer:

21g Citronensäure-1-anhydrat in 10l aqua dest., mit 2N NaOH auf pH 6 eingestellt

Dampfdrucktopf: handelsüblich

Methanol: (Merck, Darmstadt)

Mikrowelle: handelsüblich

Pertex: (Medite, Burgdorf)

Schlittenmikrotom: (Leica, Wetzlar)

Sekundärantikörper:

Kaninchen-Anti-Maus Nr. Z 259 (Dako, Hamburg), 1:20 in Humanserum, Humanserum zuvor 1:10 mit TBS verdünnt

Kaninchen-Anti-Maus, biotinyliert, Nr. E 354 (Dako, Hamburg), 1:100 in Humanserum, Humanserum zuvor 1:10 mit TBS verdünnt

TBS-Puffer:

87,7g Natriumchlorid, 68,5g Trishydrochlorid, 9g Trisbase in 10l aqua dest., pH 7,4

Tabelle 3. Angaben über verwendete AK, Verdünnungen und Inkubationszeiten.

Primärantikörper	Verdünnung	Inkubationszeit
Ki-S11	unverdünnt	1h
Ki-S2	unverdünnt	1h
HMB 45	unverdünnt	1h

2.4 Beurteilung der Immunhistochemischen Färbung

Die mikroskopische Beurteilung und die quantitative Auswertung erfolgten nach der unter 2.5 dargestellten Methode. Während von den mit Ki-S11 gefärbten Schnitten alle Fälle in die Untersuchung mit eingingen, konnten bei der Ki-S2-Färbung drei Fälle aufgrund mangelnder Anfärbung interner Positivkontrollen nicht berücksichtigt werden. Für die Auswertung wurden somit von den insgesamt 327 Fällen alle mit Ki-S11 gefärbten Fälle herangezogen, während sich die Stichprobengröße der Ki-S2-Färbung auf 324 Fälle reduzierte.

In der Ki-S11-Färbung zeigten sich sowohl Anfärbungen von Mitosen als auch Anfärbungen von Zellkernen proliferierender Zellen in unterschiedlichen Zellzyklusphasen. Dabei schwankte die Intensität der Kernmarkierung zwischen hellen Färbungen mit granulären Chromatinstrukturen und dunklen, homogenen Anfärbungen des Interphasechromatins. Die Auswertung wurde durch eine leichte

unspezifische zytoplasmatische Hintergrundfärbung nicht beeinträchtigt. Auch in der Ki-S2-Färbung wurde neben der Anfärbung von Mitosen eine Anfärbung von Zellkernen proliferierender Zellen deutlich, die sich in verschiedenen Zellzyklusphasen befanden. Hierbei zeigte sich eine relativ homogene Anfärbung des Zellkerns. Die auch hier beobachteten unspezifischen Hintergrundfärbungen des Zytoplasmas führten zu keiner Beeinträchtigung der Auswertung. In der HMB-45-Färbung zeigten sich Anfärbungen des Zytoplasmas in Zellen unterschiedlicher Zellzyklusphasen. Dabei schwankte die Anfärbung des Zytoplasmas zwischen kaum wahrnehmbarer Intensität und starker Intensität.

2.5 Auswertung

Die mikroskopische Auswertung der immunhistochemischen Färbungen wurde gemeinsam mit Herrn Prof. Dr. med. P. Rudolph im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, durchgeführt.

Die Zählungen erfolgten mit einem 10x10 Quadratrastermaßstab (Zeiss, Jena), Mikroskop BH-2 (Olympus, Hamburg), der bei 400-facher Vergrößerung einer Fläche von 0,342 mm² entspricht. Zur Ermittlung der Proliferationsraten bei der Ki-S11- und der Ki-S2-Färbung wurde zunächst bei mittlerer Vergrößerung nach Arealen mit der höchsten Färbeintensität gesucht. Daraufhin erfolgte die Berechnung der Proliferationsrate, indem bei 400-facher Vergrößerung (HPF) in randomisiert aufeinander folgenden Gesichtsfeldern der prozentuale Anteil positiver Zellen an mindestens 1000 Zellen bestimmt wurde. Hierbei galt nur eine unzweifelhafte Anfärbung des Kerns als positive Reaktion, eine allgemeine Färbeintensität blieb unbeachtet.

Die Immunreaktion mit HMB-45 wurde in vier Kategorien eingeteilt: Kategorie 1 ist eine starke Anfärbung des Zytoplasmas in >90% der Zellen (+++), Kategorie 2 ist eine starke Anfärbung des Zytoplasmas in 50% bei schwacher Anfärbung in den verbleibenden 50% der Zellen (++), Kategorie 3 ist eine schwache Anfärbung des Zytoplasmas in 50% der Zellen oder eine starke Anfärbung in wenigen Zellen (+), Kategorie 4 ist keine Anfärbung (-).

2.6 Positiv- und Negativkontrollen

Es erfolgten interne Positivkontrollen in Form von jeweils in den Präparaten enthaltenem Normalgewebe. In diesem waren jeweils einzelne proliferierende Zellen nachweisbar. Mittels HMB-45 wurden Melanozyten der normalen Haut angefärbt.

Als Negativkontrollen dienten zusätzliche Färbungen ohne Verwendung des Primärantikörpers.

2.7 Statistische Methoden

Die beobachteten Proliferationsindices wurden in den zu vergleichenden Diagnose- und Tumorgruppen beschreibend dargestellt anhand von Mittelwert und Standardabweichung, Minimum und Maximum sowie dem Median und auf Normalverteilung geprüft mittels Kolmogorov-Smirnov-Test oder Shapiro-Wilk-Test. Da keine signifikanten Abweichungen von einer Normalverteilung nachweisbar waren, konnten parametrische Verfahren zur weiteren statistischen Analyse eingesetzt werden. Mittels einfaktorieller Varianzanalyse wurden die Diagnosegruppen für beide AK, Ki-S11 und Ki-S2, hinsichtlich der Proliferationsrate miteinander verglichen. Post-hoc-Vergleiche erfolgten mittels Bonferroni-adjustierter t-Tests. Weiterhin wurde das Eta-Quadrat als Effektstärkemaß bestimmt, das den Zusammenhang zwischen der Diagnosegruppe und der Proliferationsrate quantifiziert.

Um einen geeigneten Cut-off-Wert zu ermitteln, der es ermöglicht, die benignen von den malignen Gewebeproben bei größtmöglicher Sensitivität und gleichzeitig größtmöglicher Spezifität zu trennen, wurde eine ROC-Analyse (ROC=Receiver Operating Characteristic) für beide AK durchgeführt. Darüber hinaus wurden die beiden Antikörper hinsichtlich ihrer Funktion als diagnostischer Test anhand der Sensitivität und Spezifität, des positiven und negativen prädiktiven Wertes sowie anhand des positiven und negativen Likelihood-Quotienten gegenübergestellt und bewertet. Zu den genannten Wahrscheinlichkeiten bzw. Raten wurden 95%-Vertrauensbereiche ermittelt.

Es wurde stets zweiseitig getestet und ein Signifikanzniveau von 5% zugrunde gelegt. Die statistische Analyse erfolgt mit SPSS für Windows, Version 17 (SPSS Inc., Chicago, USA) und BiAS für Windows, Version 8.4, Epsilonverlag, Frankfurt.

3. Ergebnisse

3.1 Generelle Aspekte der Immunfärbung

Die Mehrheit der benignen melanozytären Läsionen weist mittels Anfärbung durch die Antikörper Ki-S11 und Ki-S2 eine Anzahl proliferierender Zellen auf. Lediglich bei den gewöhnlichen Nävi konnte mittels Ki-S2-Färbung keine Reaktion der Melanozyten dargestellt werden. Falsch negative Resultate konnten durch reguläre Anfärbung der basalen Keratinozyten ausgeschlossen werden. In der Gruppe der gewöhnlichen Nävi war die Zahl der proliferierenden Zellen, dargestellt mittels Ki-S11 und Ki-S2, in der epidermalen/junktionalen Zone deutlich höher als in der dermalen Anhäufung von Nävuszellen.

In der Gruppe der dysplastischen Nävi fiel ebenfalls eine erhöhte Anfärbung der Zellen im Bereich der junktionalen Zone auf (Abb. 2a, 3a), sowohl für die Ki-S11- als auch für die Ki-S2-Färbung.

Die malignen Melanome zeigten sowohl in der Ki-S11- als auch in der Ki-S2-Färbung eine starke Proliferation in den basalen Zellschichten, die mit dem Aufwärtswandern der Zellen in das Stratum granulosum abnahm (Abb. 2b, 3b). Innerhalb eines Melanompräparates fand sich die Proliferation, dargestellt mittels Ki-S11 und Ki-S2, häufig fokal erhöht, neben Arealen mit geringerer Proliferation.

Die HMB-45-Expression war in allen Präparaten mit variabler Intensität vor allem in der epidermalen/junktionalen Überganszone zu erkennen (Abb. 4a, b). Bei den malignen Melanomen zeigte sich eine verstärkte Expression im dermalen Bereich (Abb.4b).

Mitosen waren gelegentlich sowohl in den gewöhnlichen wie auch in den dysplastischen Nävi zu sehen, hauptsächlich im epidermalen/junktionalen Bereich. Die Zahl der Mitosen nahm bei den Spitz/Reed Nävi etwas zu. In den malignen Melanomen zeigte sich eine deutlich erhöhte Anzahl an Mitosen.

3.1.1 Immunhistochemische Färbungen mit Ki-S11

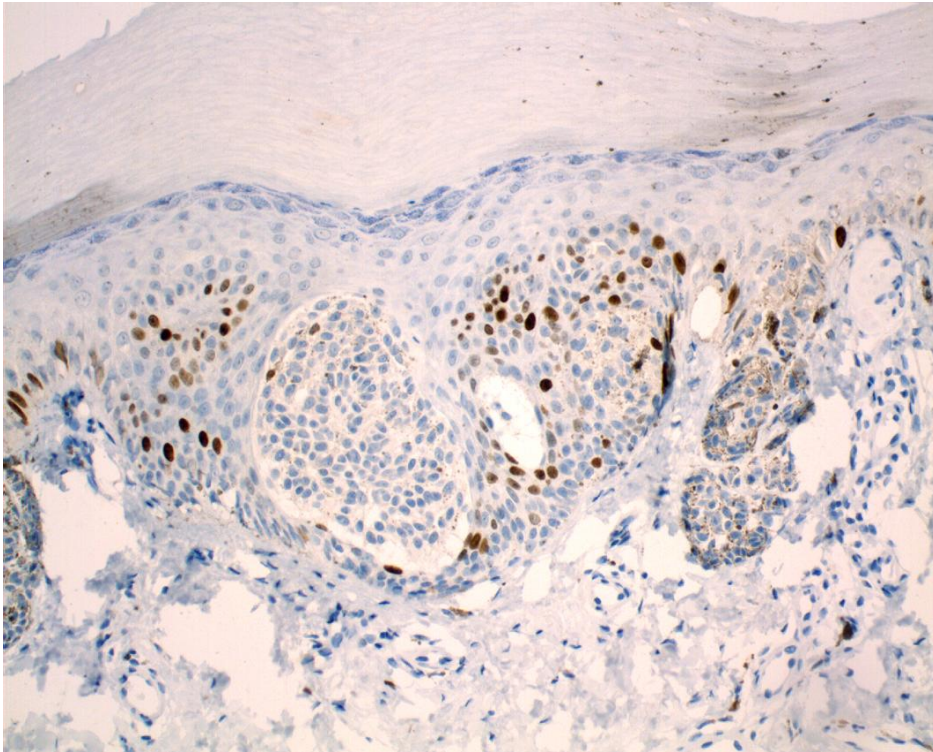


Abb. 2a: Dysplastischer Naevus, Ki-S11-Färbung, 200fache Vergrößerung.

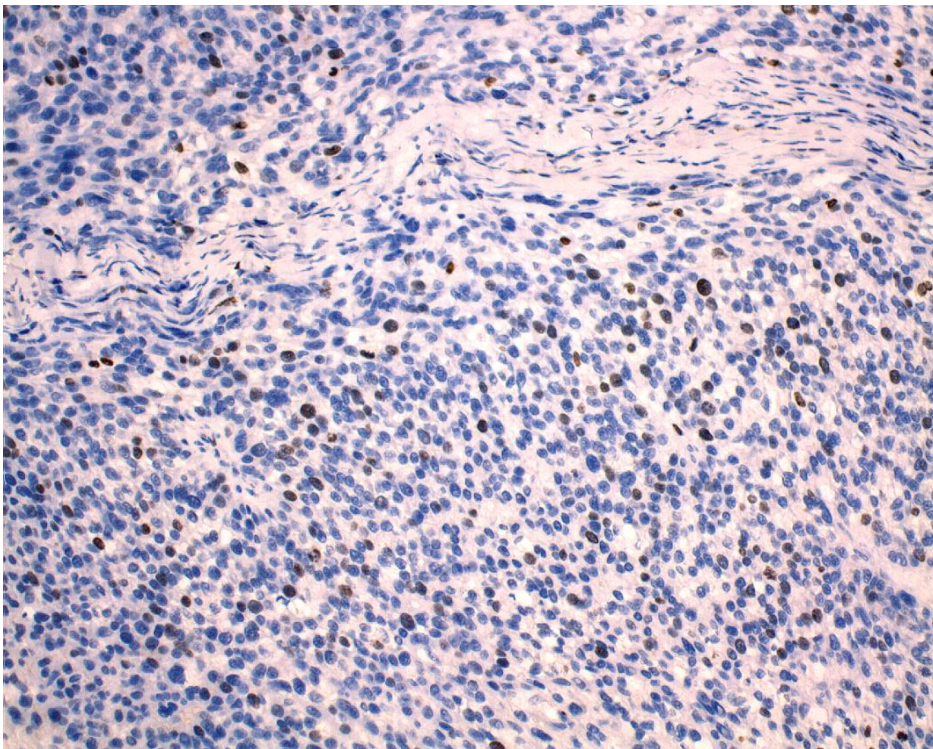


Abb. 2b: Malignes Melanom, Ki-S11-Färbung, 200fache Vergrößerung.

3.1.2 Immunhistochemische Färbungen mit Ki-S2

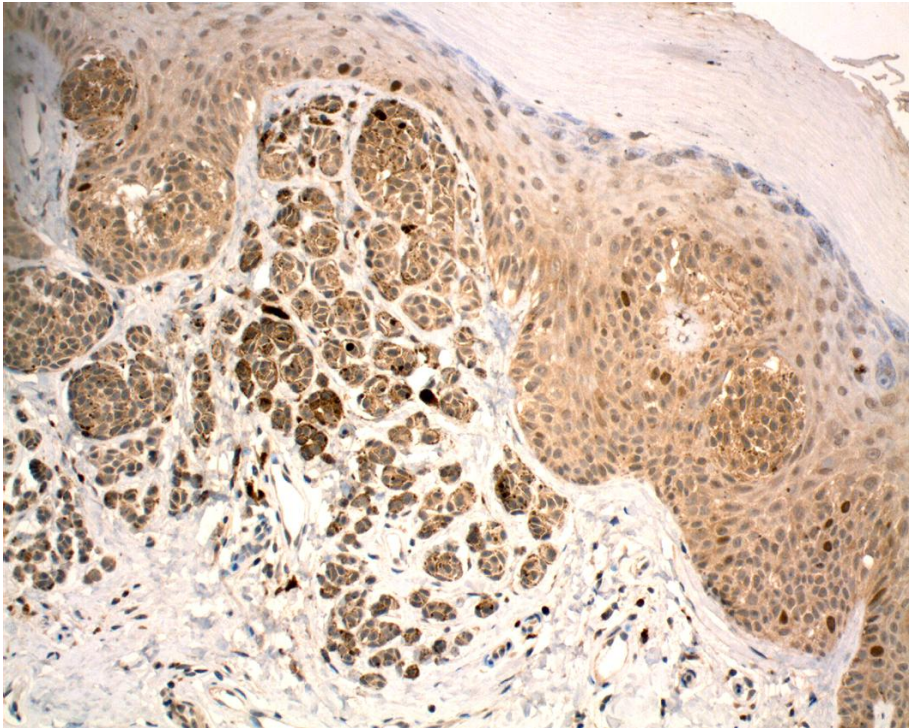


Abb. 3a: Dysplastischer Naevus, Ki-S2-Färbung, 200fache Vergrößerung.

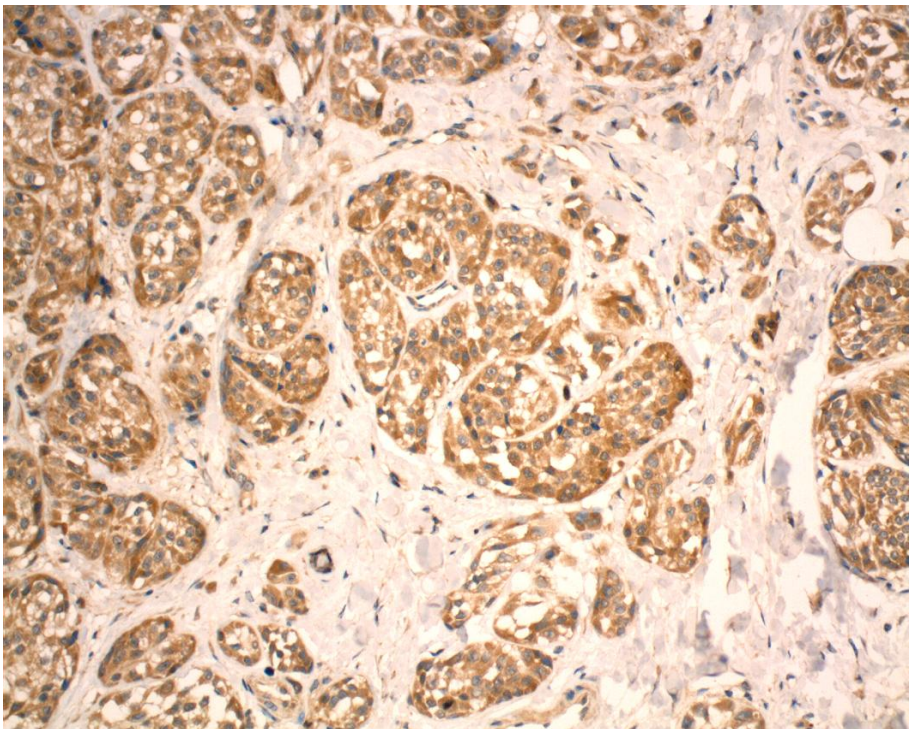


Abb. 3b: Malignes Melanom, Färbung mit Ki-S2, 200fache Vergrößerung

3.1.3 Immunhistochemische Färbungen mit HMB-45

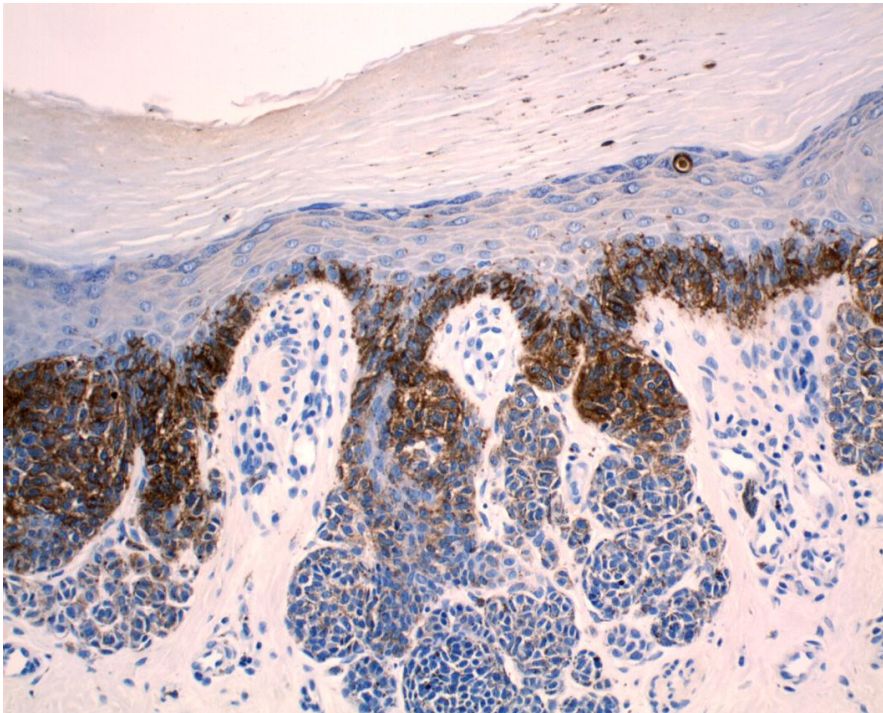


Abb. 4a: Dysplastischer Naevus, HMB-45-Färbung, 200fache Vergrößerung

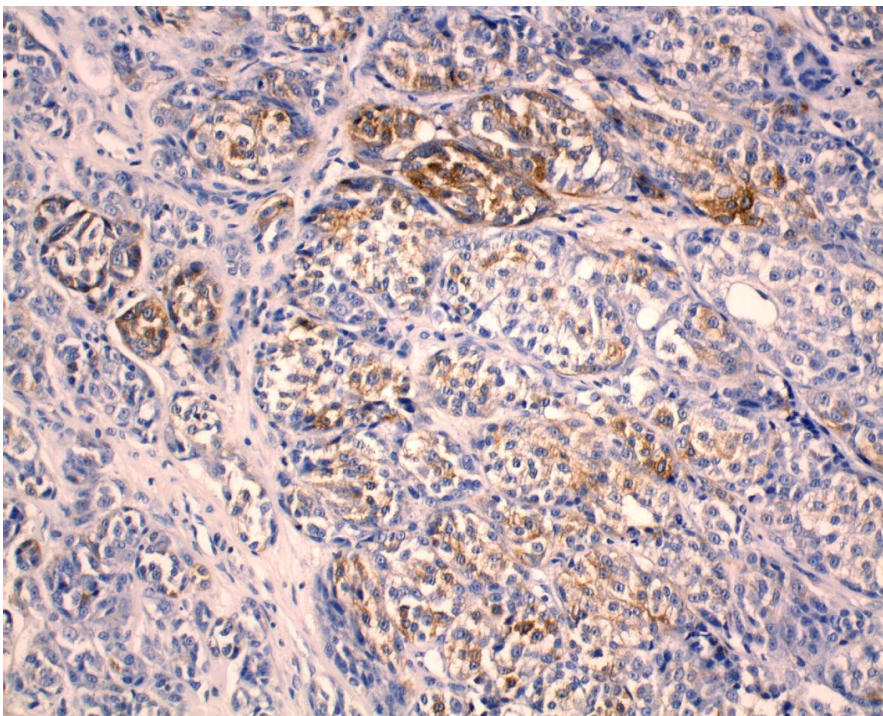


Abb. 4b: Malignes Melanom, HMB-45-Färbung, 200fache Vergrößerung

3.2 Proliferationsindices und histologischer Typ

Die untersuchten Gewebeprobe verteilen sich wie folgt: 59/327 (18%) auf die Kategorie gewöhnliche Nävi, 93/327 (28,4%) auf die Kategorie dysplastische Nävi, 24/327 (7,3%) auf die Kategorie Spitz/Reed Nävi, 69/327 (21,1%) auf die Kategorie Melanoma in situ, 80/327 (24,5%) auf die Kategorie Melanom invasiv und 2/327 (0,6%) auf die Kategorie Melanom metastasiert (Abbildung 5).

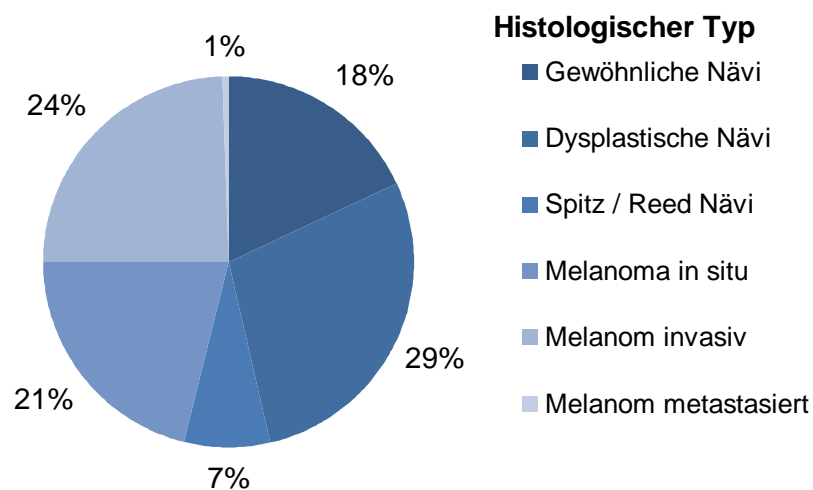


Abbildung 5. Verteilung der histologischen Typen in den 327 humanen Hautgewebeprobe.

Die Verteilung der Proliferationsindices wird in Abhängigkeit von der Färbung und dem histologischen Typ dargestellt (Tabelle 4). Es wird ersichtlich, dass die gesamte Serie durch eine ausgeprägte Proliferationsaktivität gekennzeichnet war. Der mittlere Färbeindex lag für Ki-S11 bei 7,0% ± 8,1% mit einem Minimum von 0,0% und einem Maximum von 41,0%. Der mittlere Proliferationsindex für Ki-S2 lag mit einem Minimum von 0,0%, einem Maximum von 21,0% und einem Mittelwert von 2,6% ± 3,8 % etwas darunter.

Tabelle 4. Maßzahlen zur Verteilung der Proliferationsindices in Abhängigkeit von der Färbung mit Ki-S11 und Ki-S2 und dem histologischen Typ.

Histologischer Typ	Färbung	N	Mittelwert	Standard- Abweichung	Median	Min	Max
Gewöhnliche Nävi	Ki-S11	59	0,38	0,84	0,00	0,00	4,00
	Ki-S2	58	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Dysplastische Nävi	Ki-S11	93	1,23	1,21	1,00	0,00	5,10
	Ki-S2	93	0,01	0,09	0,00	0,00	0,90
Spitz/Reed Nävi	Ki-S11	24	3,32	2,33	2,80	1,00	9,00
	Ki-S2	24	0,53	1,04	0,00	0,00	3,80
Melanoma in situ	Ki-S11	69	11,80	6,24	10,00	2,00	32,00
	Ki-S2	69	4,43	3,17	3,40	0,50	18,00
invasives Melanom	Ki-S11	80	15,66	7,73	14,25	2,45	41,00
	Ki-S2	78	6,61	4,32	5,00	2,00	21,00
metastasiertes Melanom	Ki-S11	2	10,4	3,39	10,40	8,00	12,80
	Ki-S2	2	3,50	0,71	3,50	3,00	4,00
alle Tumoren	Ki-S11	327	7,04	8,08	3,40	0,00	41,00
	Ki-S2	324	2,60	3,84	0,00	0,00	21,00

Die Mittelwerte in den einzelnen Kategorien unterscheiden sich deutlich voneinander, sowohl in der Ki-S11- als auch in der Ki-S2-Färbung. Für beide Färbungen ist mit steigender Kategorie eine ansteigende Tendenz in den mittleren Proliferationsraten erkennbar (Abbildung 6). In der Ki-S11-Färbung steigt die Proliferationsrate bei den gewöhnlichen Nävi von einem Mittel bei 0,3% ± 0,8% mit einer Streubreite von 0,0% - 4,0% zu einem mittleren Färbeindex bei den invasiven Melanomen von 15,6% ± 7,7% mit einer Streubreite von 2,5% – 41,0% an. Bei der Ki-S2-Färbung findet sich ein ähnlicher Anstieg der mittleren Proliferationsraten von den gewöhnlichen Nävi zu den invasiven Melanomen. Während der mittlere Ki-S2-Index für gewöhnliche Nävi konstant bei 0,0% lag, stieg dieser Wert bei den invasiven Melanomen auf 6,6% ± 4,3% mit einer Spannweite von 2,0% – 21,0 % an.

Mittels einfaktorieller Varianzanalyse konnte bei beiden Färbungen eine signifikante Beziehung des histologischen Typs auf den Proliferationsindex nachgewiesen werden ($p < 0,001$). Multiple Post-hoc-Vergleiche ergaben dabei für alle Paarvergleiche signifikante Unterschiede hinsichtlich der Proliferationsindices (t-Test, $p < 0,001$ / Bonferroni-adjustiert). Lediglich zwischen den gewöhnlichen und den dysplastischen Nävi konnte bei Ki-S2-Färbung kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden.

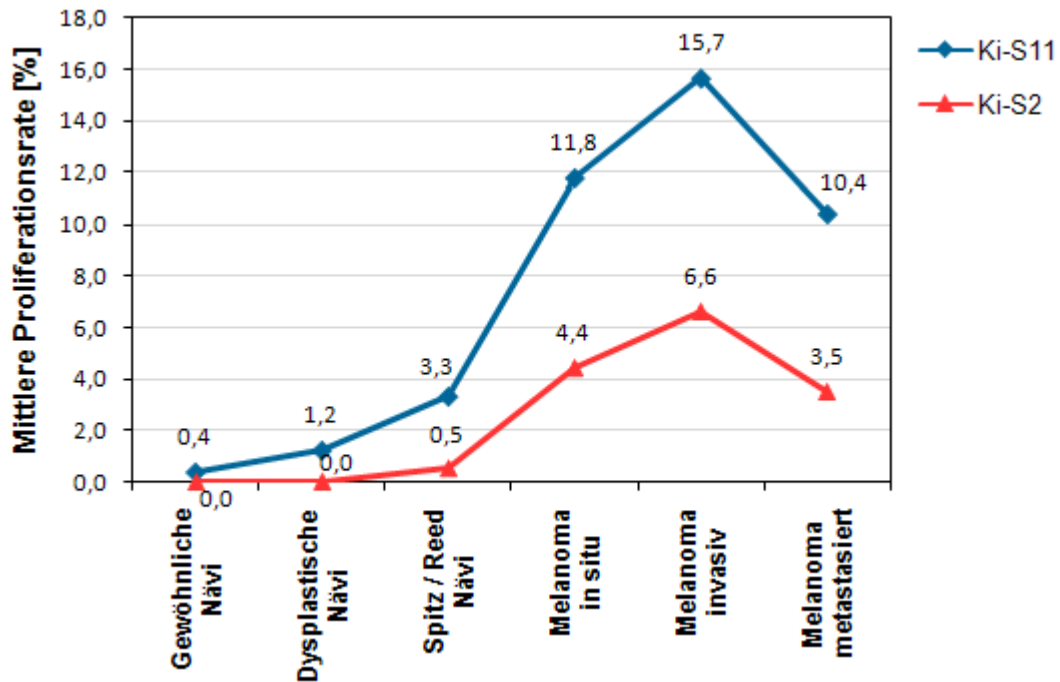


Abbildung 6. Mittlere Proliferationsraten bei Ki-S11- und Ki-S2-Färbung in Abhängigkeit von dem histologischen Typ.

Des Weiteren fällt auf, dass bei den gewöhnlichen Nävi (58/327) in der Ki-S2-Färbung keine Anfärbung gezeigt werden konnte. Eine Proliferation konnte also mit Ki-S2 in dieser Kategorie nicht nachgewiesen werden.

Um die Stärke der Assoziation zwischen der Proliferationsrate und der Diagnose zu quantifizieren, wurden für beide Färbungen das Effektstärkemaß Eta bestimmt. Mit $\text{Eta}=0,799$ für Ki-S11 und $\text{Eta}=0,741$ für Ki-S2 konnte für beide Färbungen ein starker Zusammenhang nachgewiesen werden. Eta^2 entspricht dem Anteil erklärter Varianz, auch dieser war mit 0,638 für Ki-S11- und 0,549 bei Ki-S2-Färbung entsprechend hoch.

3.3 Proliferationsindices und Dignität (benigne versus maligne)

Zusammenfassend waren 176/327 (53,82%) von den untersuchten Gewebeproben als benigne und 151/327 (46,18%) als maligne einzustufen (Abbildung 7).

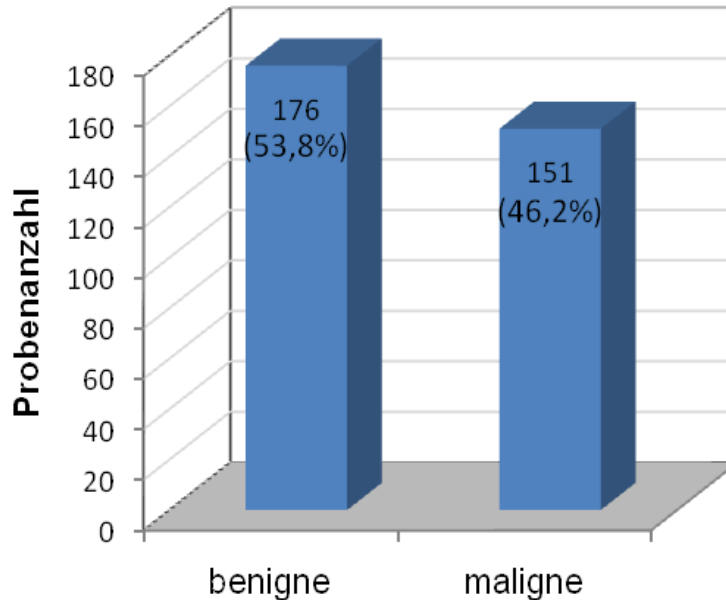


Abbildung 7. Verteilung der Dignität der untersuchten Gewebeproben

Eine Analyse der Proliferationsindices für die benignen und malignen Gewebeproben für die Färbungen Ki-S11 und Ki-S2 zeigt erheblich höhere Werte für maligne Tumoren (Tabelle 5).

Tabelle 5. Maßzahlen zur Verteilung der Proliferationsindices in Abhängigkeit von der Färbung mit Ki-S11 und Ki-S2 und der Dignität.

Dignität	Färbung	N	Mittelwert	Standard-Abweichung	Median	Min	Max
Benigne	Ki-S11	176	1,23	1,60	0,65	0,00	9,00
	Ki-S2	175	0,08	0,42	0,00	0,00	3,80
Maligne	Ki-S11	151	13,92	7,29	12,00	2,00	41,00
	Ki-S2	149	5,56	3,95	4,80	0,50	21,00
alle	Ki-S11	327	7,04	8,08	3,40	0,00	41,00
Tumoren	Ki-S2	324	2,60	3,84	0,00	0,00	21,00

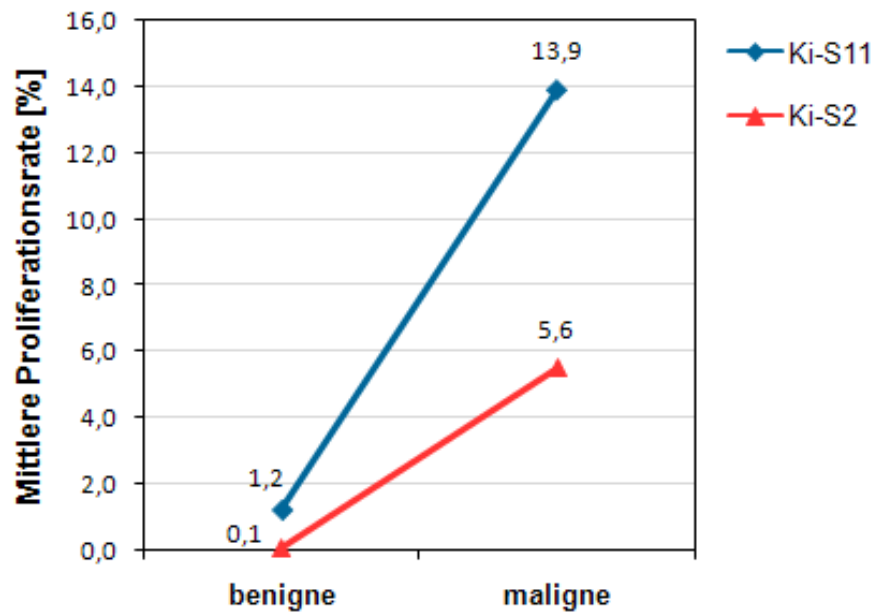


Abbildung 8. Mittlere Proliferationsraten bei Ki-S11- und Ki-S2-Färbung in Abhängigkeit der Dignität.

Dabei fällt wiederum ein sprunghafter Anstieg der mittleren Färbeindices von der Kategorie keine Malignität zu der Kategorie Malignität auf (Abbildung 8). Dies ist sowohl für die Ki-S11- als auch für die Ki-S2-Färbung zu beobachten. Der mittlere Ki-S11-Index steigt von 1,2% \pm 1,6% mit einem Minimum von 0,0% und einem Maximum von 9,0% bei den nicht-malignen Tumoren auf einen Mittelwert von 13,8% \pm 7,3% mit einem Minimum von 2,0% und einem Maximum von 41,0% bei den malignen Tumoren an. Der mittlere Ki-S2-Index steigt in einem ähnlichen Verhältnis von den benignen Tumoren (0,08% \pm 0,4% mit einer Streubreite von 0,0%–3,8%) zu den malignen Tumoren (5,6% \pm 3,9% mit einer Streubreite von 0,5%–21,0%) an.

3.4 Proliferationsindices und prognostische Tumorgruppe

Die Tumoren sind in prognostische Gruppen eingeteilt worden: von den untersuchten Gewebeproben entfielen 175/327 Fälle (53,5%) auf die Kategorie Nävi (einschließlich gewöhnliche Nävi, dysplastische Nävi, Spitz/Reed Nävi), 71/327 (21,7%) auf die Kategorie Melanoma in situ, 30/327 (9,2%) auf die Kategorie Melanom Clark Level 2, 40/327 (12,2%) auf die Kategorie Melanom Clark Level 3, 9/327 (2,8%) auf die

Kategorie Melanom Clark Level 4 und 2/327 (0,6%) entfielen auf die Kategorie Melanom metastasiert (Abbildung 9).

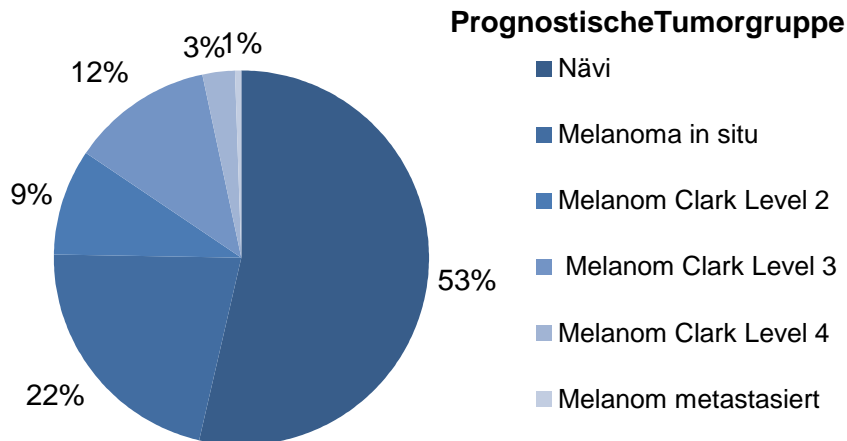


Abbildung 9. Verteilung der prognostischen Tumorgruppen in den 327 untersuchten humanen Hautgewebeproben.

Eine Analyse der Proliferationsindices für die prognostischen Tumorgruppen zeigte deutliche Unterschiede (Tabelle 6). Sowohl für die Ki-S11- als auch für die Ki-S2-Färbung ist ein Anstieg der mittleren Proliferationsraten vom Nävus zum Melanom Clark Level 4 erkennbar. So steht ein mittlerer Ki-S11-Index von $1,2\% \pm 1,5\%$ mit einem Minimum von $0,0\%$ und einem Maximum von $8,0\%$ bei den Nävi einem Ki-S11-Index von $17,9\% \pm 9,6\%$ mit einem Minimum von $2,5\%$ und einem Maximum von $29,0\%$ bei den Melanoma mit einem Clark Level 4 gegenüber. Für die Ki-S2-Färbung beträgt der mittlere Färbeindex bei den Nävi $0,06\% \pm 0,3\%$ mit einem Minimum von $0,0\%$ und einem Maximum von $2,5\%$; bei den Melanoma mit Clark Level 4 beträgt der mittlere Färbeindex $9,1\% \pm 5,3\%$ mit einem Minimum von $4,0\%$ und einem Maximum von $19,0\%$.

Tabelle 6. Maßzahlen zur Verteilung der Proliferationsindices in Abhängigkeit von der Färbung mit Ki-S11 und Ki-S2 und der prognostischen Tumorgruppe.

Tumorgrad	Färbung	N	Mittelwert	Standard- abweichung	Median	Min	Max
Nävi	Ki-S11	175	1,18	1,49	0,60	0,00	0,00
	Ki-S2	174	0,06	0,31	0,00	8,00	2,50
Melanoma in situ	Ki-S11	71	11,73	6,16	10,00	2,00	32,00
	Ki-S2	71	4,40	3,13	3,40	0,50	18,00
Clark Level 2	Ki-S11	30	14,21	5,33	13,50	7,00	28,70
	Ki-S2	29	5,88	3,43	5,00	2,50	15,00
Clark Level 3	Ki-S11	40	16,38	8,76	14,00	6,00	41,00
	Ki-S2	39	6,68	4,58	5,00	2,00	21,00
Clark Level 4	Ki-S11	9	17,94	9,66	15,00	2,45	29,00
	Ki-S2	9	9,12	5,31	7,90	4,00	19,00
Melanom metastasiert	Ki-S11	2	10,40	3,39	10,40	8,00	12,80
	Ki-S2	2	3,50	0,71	3,50	3,00	4,00
alle Tumoren	Ki-S11	327	7,04	8,08	3,40	0,00	41,00
	Ki-S2	324	2,60	3,84	0,00	0,00	21,00

In der Einteilung der Untersuchungsfälle entsprechend der prognostischen Tumorgruppe findet sich erneut ein sprunghafter Anstieg der mittleren Proliferationsraten von gutartigen zu bösartigen Tumoren und er ist für beide Färbungen in ähnlicher Weise zu beobachten (Abbildung 10). Bei der Ki-S11-Färbung steigt der mittlere Färbeindex von 1,2% \pm 1,5% mit einer Streubreite von 0,0%–8,0% bei den Nävi auf einen Mittelwert von 11,7% \pm 6,1% mit einer Streubreite von 2,0%–32,0% bei den Melanoma in situ an. Bei der Ki-S2-Färbung ergibt sich ein ähnliches Verhältnis mit einem mittleren Färbeindex von 0,06% \pm 0,3% und einer Streubreite von 0,0%–2,5% bei den Nävi und einem mittleren Färbeindex von 4,4% \pm 3,1% und einer Streubreite von 0,5% – 18,0% bei den Melanoma in situ.

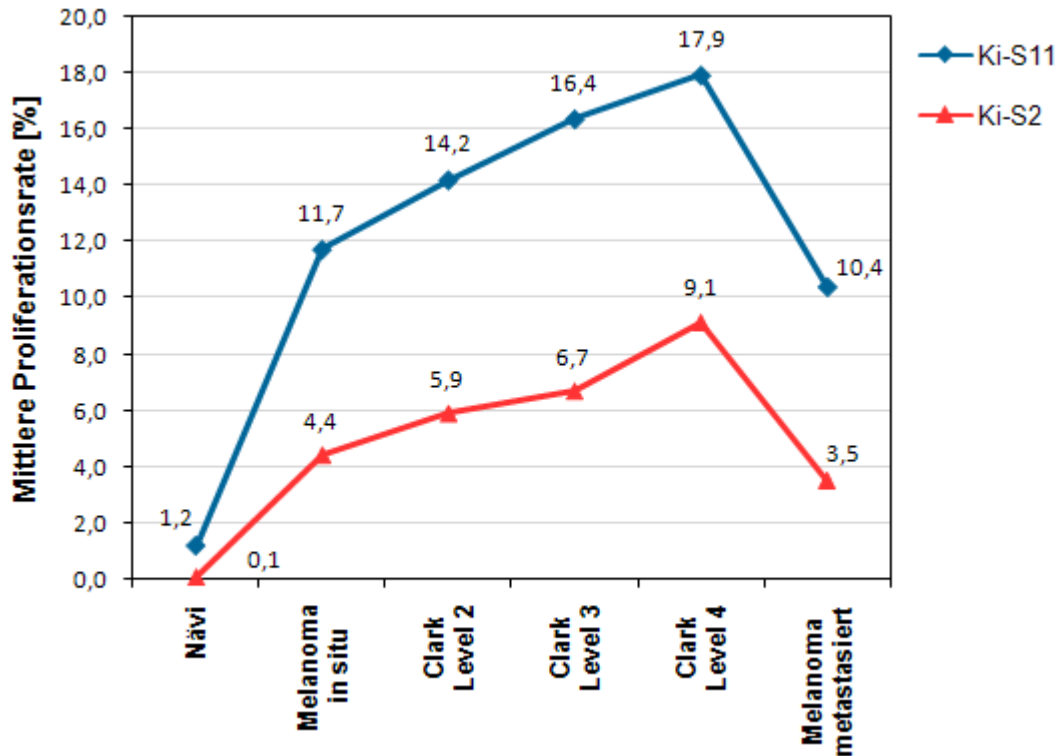


Abbildung 10. Mittlere Proliferationsraten bei Ki-S11- und Ki-S2-Färbung in Abhängigkeit der prognostischen Tumorgruppe.

3.5 ROC-Analyse

Aus den vorangegangenen Berechnungen wurde bereits ersichtlich, dass sich die malignen von den benignen Tumorzellen deutlich hinsichtlich der Proliferationsrate unterscheiden lassen. Dies gilt für beide untersuchten Antikörper Ki-S11 und Ki-S2. Die Stärke dieses Unterschiedes wurde zusätzlich anhand der Fläche unter der ROC-Kurve quantifiziert. Außerdem konnte mittels ROC-Analyse ermittelt werden, bei welcher Proliferationsrate sich ein geeigneter Cut-off befindet, um die malignen Zellproben mit größtmöglicher Sensitivität und gleichzeitig größtmöglicher Spezifität von den benignen zu unterscheiden.

3.5.1 Ki-S11

Bei der Ki-S11-Färbung betrug die Fläche unter der ROC-Kurve $AUC=0,993$ mit einem 95%-Konfidenzintervall von $[0,986; 0,999]$. Dies spricht für einen außergewöhnlich starken Unterscheidungseffekt. Der ermittelte Cut-off-Wert für Ki-S11 lag bei einer Proliferationsrate in Höhe von 4,25%. Hier wurde der maximale Youden-Index (Sensitivität + Spezifität - 1 = 0,934) erreicht. Eine Trennung der malignen von den benignen Zellproben an dieser Grenze führt zu einer Sensitivität von 98,0% und einer Spezifität von 95,4%. Die Abbildung 11 zeigt die ROC-Kurve für die Ki-S11-Färbung.

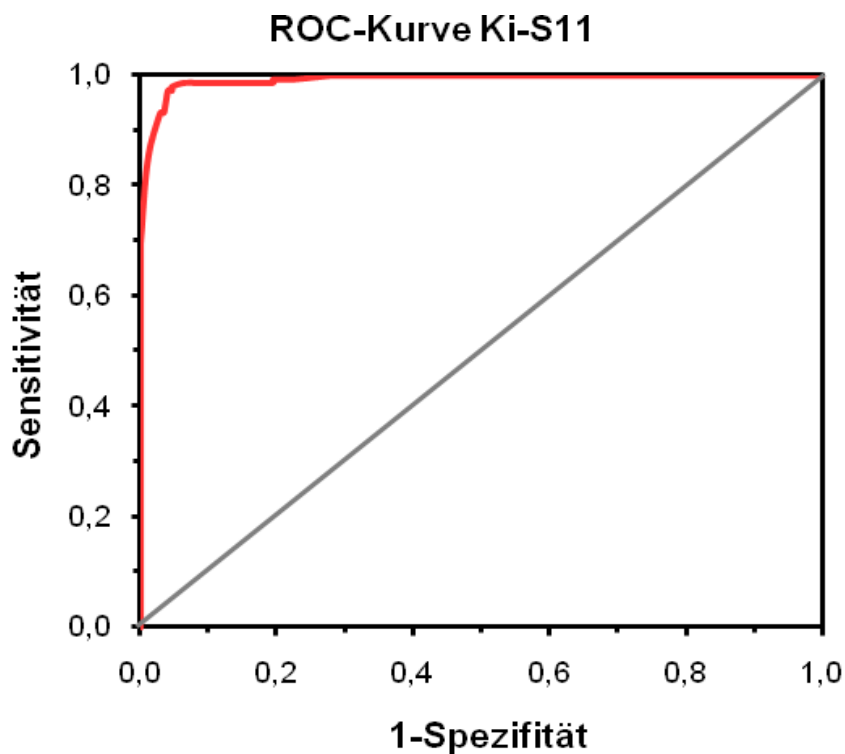


Abbildung 11. ROC-Kurve für die Trennung in maligne und benigne Tumorproben unter Verwendung des AK Ki-S11.

3.5.2 Ki-S2

Bei der Ki-S2-Färbung betrug die Fläche unter der ROC-Kurve $AUC=0,996$ mit einem 95%-Konfidenzintervall von $[0,9991; 1,000]$. Dies spricht für einen sehr starken Unterscheidungseffekt. Der maximale Youden-Index (Sensitivität + Spezifität -1) lag bei 0.934, der daraus ermittelte Cut-off-Wert für Ki-S2 lag bei einer Proliferationsrate in Höhe von 0,25%. Eine Trennung der malignen von den benignen Zellproben an dieser Grenze führt zu einer Sensitivität von 100,0% und einer Spezifität von 96,0%. Die Abbildung 12 zeigt die ROC-Kurve für die Ki-S2-Färbung.

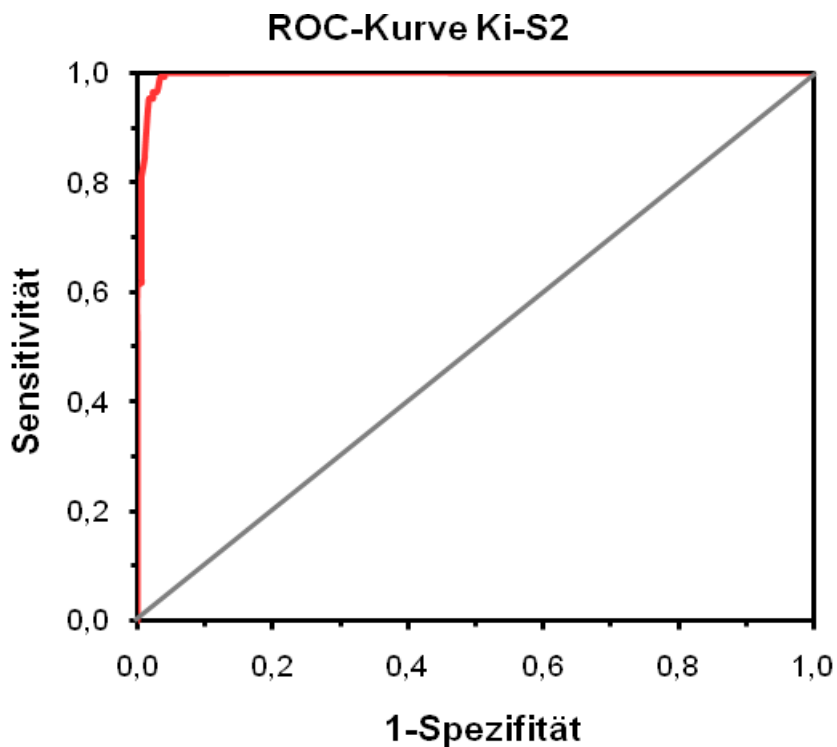


Abbildung 12. ROC-Kurve für die Trennung in maligne und benigne Tumorproben unter Verwendung des AK Ki-S2.

3.5.3 Vergleich und Bewertung von Ki-S11 und Ki-S2

Der Gegenüberstellung der beiden verwendeten AK Ki-S11 und Ki-S2 zeigt (Abbildung 13), dass beide eine sehr hohe AUC aufweisen (0,993 und 0,996).

Die Verwendung der in den ROC ermittelten Cut-off-Werte stellt die Basis für die Erstellung der Vierfeldertafel dar (Tabelle 7).

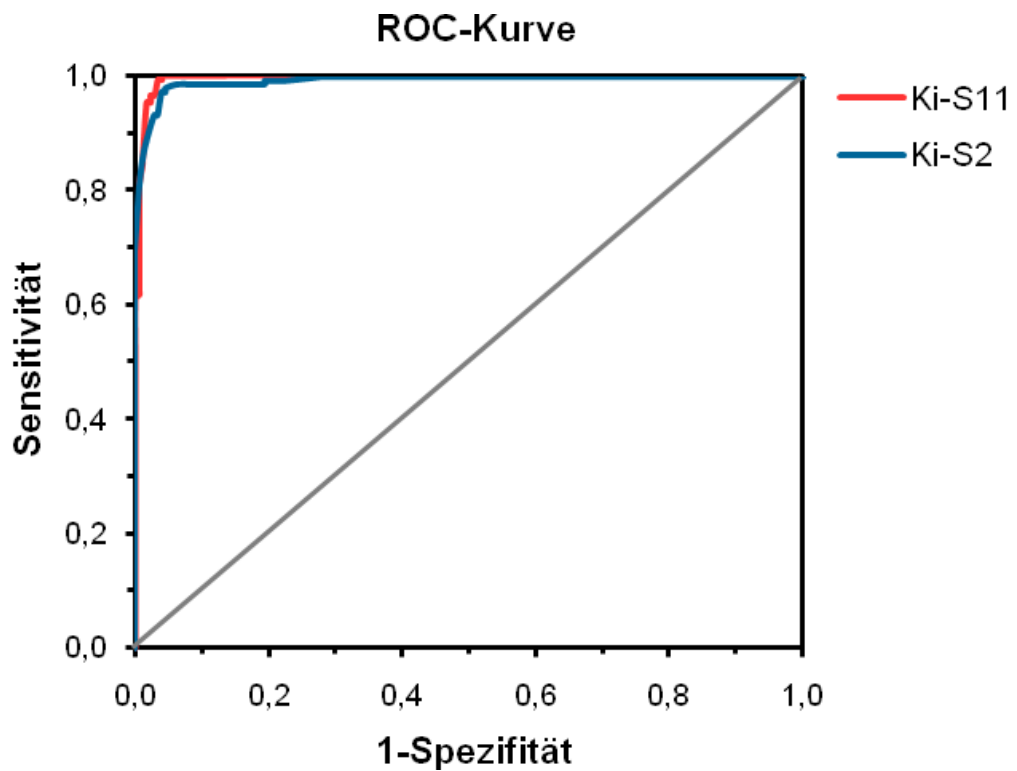


Abbildung 13. Vergleich der ROC-Kurven für die Trennung in maligne und benigne Tumormproben unter Verwendung der AK Ki-S11 und Ki-S2.

3.6 Positive/negative prädiktive Werte und Likelihood-Quotienten

Für die Klinik relevant sind insbesondere die extrem hohen negativen prädiktiven Werte, die Wahrscheinlichkeit, nicht krank zu sein, unter der Voraussetzung, dass das Testergebnis negativ ist (Tabellen 7,8).

In diesem Zusammenhang mag die Verwendung der Proliferationsindices eine wertvolle Bereicherung der konventionellen Klassifikation der malignen Melanome darstellen, insbesondere bei histologisch nicht eindeutigen Befunden.

Tabelle 7. Darstellung der Proliferationsindices für benigne und maligne melanozytische Läsionen der Haut für Ki-S11 und Ki-S2 einschließlich der entsprechenden Cut-offs.

	Maligne	Benigne	gesamt
Ki-S11 ≥ 4,25 (Maligne)	146 (45,06%)	8 (2,47%)	154 (47,53%)
< 4,25 (Benigne)	3 (0,93%)	167 (51,54%)	170 (52,47%)
Ki-S2 ≥ 0,25 (Maligne)	149 (45,99%)	7 (2,16%)	156 (48,15%)
< 0,25 (Benigne)	0 (0,00%)	168 (51,85%)	168 (51,85%)
Gesamt	149 (45,99%)	175 (54,01%)	324 (100,00%)

Tabelle 8. Vierfeldertafel: dargestellt ist die Sensitivität, Spezifität, die positiven und negativen prädiktiven Werte sowie die positive und negative Likelihood-Ratio für Ki-S11 und Ki-S2.

	Ki-S11		Ki-S2	
	Wert	95%-CI	Wert	95%-CI
Sensitivität	97,99%	[94,23%; 99,58%]	100,00%	[97,55%; 100,0%]
Spezifität	95,43%	[91,19%; 98,01%]	96,00%	[91,93%; 98,38%]
Pos. prädiktive Wert	94,81%	[90,02%; 97,73%]	95,51%	[90,97%; 98,18%]
Neg. prädiktive Wert	98,24%	[94,93%; 99,63%]	100,00%	[97,83%; 100,0%]
Pos. Likelihood-Ratio (LR ⁺)	21,44	[10,89; 42,20]	25,00	[12,10; 51,66]
Neg. Likelihood-Ratio (LR ⁻)	0,021	[0,01; 0,065]	0,00	[0,00; 0,00]

LR+		LR-	
> 10	sehr gut	< 0,1	sehr gut
3-10	gut	0,1-0,3	gut
<3	schlecht	>0,3	schlecht

3.7 HMB-45

Der HMB-45 AK zeigte in den melanozytären Läsionen eine variable Anfärbung, häufig mit einer Betonung der epidermalen und epidermal/dermalen Übergangszone. Bei den invasiven malignen Melanomen war die Anfärbung im Bereich der Dermis leicht verstärkt. Insgesamt folgte die Anfärbung keinem charakteristischen Muster und zwischen den histologischen Kategorien zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 9). Es bestand keine Korrelation mit dem Proliferationsindex .

Tabelle 9. Färbung der melanozytären Zellen mit dem HMB-45 AK (%). Dargestellt ist der Anteil gefärbter Zellen in Abhängigkeit von der histologischen Kategorie.

Diagnose	+++	++	+	-
gewöhnliche Nävi	12/59 (20)	7/59 (12)	18/59 (31)	22/59 (37)
dysplastische Nävi	24/93 (26)	22/93 (24)	27/93 (29)	20/93 (21)
Spitz/Reed Nävi	2/24 (8)	6/24 (25)	12/24 (50)	4/24 (17)
Melanoma in situ	36/69 (52)	21/69 (30)	9/69 (13)	3/69 (5)
invasives Melanom	14/80 (17)	36/80 (45)	28/80 (35)	2/80 (3)
metastasiertes Melanom	1/2 (50)	1/2 (50)	0/2 (0)	0/2 (0)

4. Diskussion

Die wichtigsten Befunde der Studie zeigen eine Korrelation zwischen der Proliferationsaktivität und dem histologischen Typ (Tabelle 4, Abbildungen 2-6), einen signifikanten Unterschied zwischen benignen und malignen Läsionen (Tabelle 5, Abbildung 7, 8) und eine Korrelation zwischen der Proliferationsaktivität und prognostischen Tumorgruppen (Tabelle 6, Abbildung 9, 10).

In der ROC-Analyse betrug die Fläche unter der ROC-Kurve für Ki-S11 $AUC=0,993$ (95%-Konfidenzintervall von $[0,986; 0,999]$) (Abbildung 11) und für Ki-S2 $AUC=0,996$ (95%-Konfidenzintervall von $[0,9991; 1,000]$) (Abbildung 12). Ein Cut-off-Wert für Ki-S11 von 4,25% führte zu einer Sensitivität von 98,0% und einer Spezifität von 95,4%, ein Cut-off-Wert für Ki-S2 von 0.25% führte zu einer Sensitivität von 100,0% und einer Spezifität von 96,0% (Tabelle 8), zur Unterscheidung benigne vs. maligne. Daraus ergibt sich ein positiver prädiktiver Wert von 94.8% für Ki-S11 und 95.5% für Ki-S2 sowie ein negativer prädiktiver Wert von 98.2% für Ki-S11 und 100% für Ki-S2 (Tabelle 8). Die LR^+ für Ki-S11 beträgt 21.4 und für Ki-S2 25, die LR^- für Ki-S11 ist 0.02, die für Ki-S2 0.00 (Tabelle 8).

Die vorliegende Arbeit unterstützt nicht das Konzept einer Tumorprogression von benignen melanozytären Tumoren über Läsionen unsicheren biologischen Verhaltens in das maligne Melanom, da die Proliferationsindices von der Gruppe der Nävi zum Melanoma in situ sprunghaft ansteigen (Tabelle 4, Abbildung 6) und nicht, wie bei einer Progression zu erwarten, kontinuierlich ansteigen.

4.1 Korrelation der Proliferationsaktivität mit dem histologischen Typ

In der vorliegenden Arbeit wurde die Proliferationsaktivität durch die untersuchten Antikörper Ki-S11 und Ki-S2 bestimmt (Tabelle 4, Abbildungen 2-4).

Die gesamte Serie der Färbungen war durch eine ausgeprägte Proliferationsaktivität für Ki-S11 und Ki-S2 gekennzeichnet. Der mittlere Färbeindex lag für Ki-S11 (7,0%)

etwas über dem mittleren Färbeindex für Ki-S2 (2,6%). Diese Tatsache lässt sich dadurch erklären, dass das Antigen Ki-67 während des gesamten Zellzyklus exprimiert wird, das Antigen repp86 jedoch nur während der S-, G2- und M-Phasen.

Unsere Ergebnisse haben eine statistisch signifikante Korrelation der Proliferationsaktivität mit der Histologie gezeigt. Die einzelnen Tumorentitäten unterscheiden sich signifikant voneinander (Tabelle 4). Ein anderer gegen Ki-67 gerichteter AK, MIB-1, konnte in mehreren Studien ebenfalls sicher die von uns verwendeten Entitäten unterscheiden (Bergmann et al., 2001; Chorny et al., 2003). Die Mittelwerte der Proliferationsraten beider Färbungen steigen von benignen Läsionen zu malignen Tumoren deutlich an. Mit Ki-S11 konnte zusätzlich zwischen den gewöhnlichen Nävi und den dysplastischen Nävi ein Unterschied nachgewiesen werden, nicht jedoch mit Ki-S2. Die einzige Studie, welche ebenfalls Ki-S11 und Ki-S2 an melanozytären Läsionen verwendete, konnte weder für Ki-S11 noch für Ki-S2 einen Unterschied zwischen gewöhnlichen Nävi und dysplastischen Nävi nachweisen (Rudolph et al., 2000). Das unterschiedliche Ergebnis für die Ki-S11-Färbung kann durch kleinere Fallzahlen in der Arbeit von Rudolph et al. (2000) erklärt werden. Interessanterweise konnte in der Gruppe der gewöhnlichen Nävi mit dem AK Ki-S11 eine geringe Proliferationsrate gezeigt werden, jedoch zeigte sich keine Proliferationsaktivität mit dem AK Ki-S2. Dieser Befund kann dadurch erklärt werden, dass das von Ki-S2 erkannte Antigen repp86 in einem wesentlich kürzeren Abschnitt des Zellzyklus exprimiert wird als Ki-67. Daher werden mit Ki-S11 mehr Zellen markiert, da auch Zellen, die am Anfang bzw. am Ende des Zellzyklus sind, Ki-67 exprimieren.

4.2 Unterscheidung benigner und maligner Tumoren (Dignität)

In unseren Ergebnissen zeigt sich ein deutlicher Unterschied in den Proliferationsraten zwischen benignen und malignen Läsionen (Tabelle 5, Abbildung 7, 8). Dies gilt sowohl für Ki-S11 als auch für Ki-S2. Dabei ergeben sich deutlich höhere Proliferationsraten für maligne Läsionen. Bemerkenswerterweise steigen die Indices von den Spitz/Reed Nävi zu den Melanomata in situ sprunghaft an.

Die Unterscheidung zwischen benignen und malignen melanozytären Läsionen konnte für das Antigen Ki-67, z.B. mittels des Antikörpers MIB-1, durch mehrere

Studien belegt werden (Li et al., 2000; Nasr et al., 2008). Die Darstellung von Ki-67 mittels verschiedener Antikörper ist daher in der Routinediagnostik weit verbreitet (Ohsie et al., 2008). In unserer Studie stellt sich auch das Antigen repp86, dargestellt durch Ki-S2, als Diagnosehilfe zur Unterscheidung zwischen benigne und maligne dar. Eine Unterscheidung zwischen benignen und malignen melanozytäre Läsionen durch Ki-S11 und Ki-S2 konnte bereits an einer kleineren Population (88 Fälle) gezeigt werden (Rudolph et al., 2000).

Die kombinierte Darstellung beider Antigene (Ki-67 und repp86) hat sich zur Unterscheidung benigne/maligne bereits bei anderen Tumoren als sinnvoll erwiesen, z.B. beim Mesotheliom (Taheri et al., 2008). Auch in unserem Untersuchungsgut erscheint der Einsatz beider Antikörper sinnvoll, da gerade bei gering proliferierenden Tumoren eine Überlappung der Maximalwerte der Nävi sowie der Minimalwerte der Melanome bei Ki-67 besteht. Daher ist eine fehlende Ki-S2-Positivität ein weiteres Indiz für einen benignen Tumor.

4.3 Korrelation der Proliferationsaktivität mit der prognostischen Tumorgruppe

Unsere Ergebnisse zeigen eine Korrelation der Proliferationsaktivität mit der prognostischen Tumorgruppe (Tabelle 6, Abbildung 9, 10). Sowohl für die Ki-S11- als auch für die Ki-S2-Färbung ist ein deutlicher Anstieg der Proliferationsraten von Nävi zu Melanomen Clark Level 4 erkennbar. Dies ist im Einklang mit einer Studie an 138 malignen Melanomen, die zeigte, dass Ki-67 unter Verwendung des MIB-1 AK als zusätzlicher Parameter zur Bestimmung der vertikalen Tumorausbreitung des malignen Melanoms sinnvoll ist (Kaleem et al., 2000).

Auffallend in unserer Untersuchung ist ein Abfall der Proliferationsraten von den Melanomen Clark Level 4 zu den metastasierten Melanomen. Der Abfall der Proliferationsaktivität ist dadurch erklärbar, dass in der vorliegenden Studie nur zwei Fälle mit metastasierten Melanomen untersucht wurden und dieser Befund nicht repräsentativ sein muss. Zusätzlich ist bekannt, dass mit zunehmender Tumorprogression die Heterogenität der Proliferationsindizes innerhalb der Tumoren steigt (Rudolph et al., 1995). In einer weiteren Studie an 117 malignen Melanomen

und 18 metastasierten Melanomen wurde aber kein Unterschied in der durch Ki-67 dargestellten Proliferationsaktivität nachgewiesen (Ilmonen et al., 2005).

4.4 ROC-Analyse

Die ROC-Analyse für Ki-S11 und Ki-S2 zeigt einen deutlichen Unterschied in den Proliferationsraten zwischen benignen und malignen melanozytären Läsionen (Tabelle 7, Abbildung 11-13). Beide Antikörper weisen eine sehr große Fläche unter der Kurve auf. Dies spricht für einen starken Unterscheidungseffekt. Diese Tatsache passt zu dem sprunghaften Anstieg in den Proliferationsindices von benignen zu malignen melanozytären Läsionen. Daher eignen sich sowohl Ki-S11 als auch Ki-S2 zur Diagnosesicherung in histologisch nicht eindeutigen Fällen.

Frühere Studien konnten Ki-67, mithilfe des AK MIB-1 an 209 bzw. 55 Fällen angefärbt, als unabhängigen prognostischen Faktor etablieren (Korabiowska et al., 2000; Moretti et al., 2001). Eine jüngere Studie an 396 Fällen, ebenfalls mithilfe von MIB-1, berechnete für Ki-67 eine maximale Sensitivität von 72,0% und eine maximale Spezifität von 88,4%, der Cut-off betrug jedoch 20% (Gimotty et al., 2005). Der in unserer Studie durch die ROC-Analyse ermittelte Cut-off beträgt für Ki-S11 4.25%, die entsprechende Sensitivität und Spezifität ist 98.0% und 95.4%, deutlich höher als in der Arbeit von Gimotty et al. (Tabelle 8). Die Verwendung des AK Ki-S11 zur Darstellung des Ki-67 Antigens, kombiniert mit dem AK Ki-S2 für repp86 ist wegen der höheren Sensitivität und Spezifität sinnvoller als die Verwendung des AK MIB-1.

4.5 Positive/negative prädiktive Werte und Likelihood-Quotienten

Unsere Ergebnisse haben extrem hohe positive und negative prädiktive Werte für Ki-S11 und Ki-S2 gezeigt. Der positive prädiktive Wert für Ki-S11 liegt bei 94,8%, der positive prädiktive Wert für Ki-S2 bei 95,5% (Tabelle 8). Diese Werte bezeichnen das Risiko, bei positivem Testergebnis krank zu sein.

Die größte klinische Relevanz haben jedoch die negativen prädiktiven Werte, die die Wahrscheinlichkeit, bei negativem Testergebnis nicht krank zu sein, wiedergeben. In der vorliegenden Studie konnten hohe negative prädiktive Werte für Ki-S11 und für Ki-S2 erreicht werden. Der negative prädiktive Wert für Ki-S11 lag bei 98,24%, der negative prädiktive Wert für Ki-S2 lag bei 100,00% (Tabelle 8).

Eine jüngere Studie an 396 Fällen, ebenfalls mithilfe von MIB-1, berechnete für Ki-67 einen positiven prädiktiven Wert von 29,5% sowie einen negativen prädiktiven Wert von 97,9% (Gimotty et al., 2005), die entsprechenden positiven und negativen prädiktiven Werte in unserer Arbeit liegen erneut deutlich höher als in der Arbeit von Gimotty et al. (Tabelle 8).

In der vorliegenden Studie wurden für beide Antikörper sehr gute positive und negative Likelihood-Quotienten ermittelt. Diese sagen ebenfalls etwas über die Eignung als Prognoseparameter aus.

Der positive Likelihood-Quotient für Ki-S11 lag bei 21,4; der positive Likelihood-Quotient für Ki-S2 lag bei 25,0; wobei Werte >10 ein sehr gutes Ergebnis bedeuten.

Der negative Likelihood-Quotient für Ki-S11 lag bei 0,02, der negative Likelihood-Quotient für Ki-S2 lag bei 0,00, wobei Werte $<0,1$ ein sehr gutes Ergebnis bedeuten (Tabelle 8).

In der oben genannten Studie (Gimotty et al., 2005) wurden keine Likelihood-Quotienten ermittelt.

Die von uns untersuchten Proliferationsmarker Ki-S11 und Ki-S2 sind somit unabhängige Prognosemarker.

4.6 Tumorprogression

Unsere Ergebnisse haben keinen Hinweis darauf gegeben, dass es zu einer kontinuierlichen Tumorprogression von gewöhnlichen Nävi über Läsionen mit

unsicherem biologischen Verhalten (dysplastischen Nävi, Spitz/Reed Nävi) zu Melanomen kommt. Der sprunghafte Anstieg der Proliferationsaktivität von den Spitz/Reed Nävi zu den Melanomata in situ weist eher darauf hin, dass ein Großteil der malignen Melanome de novo, d.h. unabhängig von den vorhandenen dysplastischen Nävi, entsteht. Das Konzept der Tumorprogression (Clark et al., 1978) wird zunehmend diskutiert (Maize JC, 1984; Ackerman AB, 1988). Für eine mögliche Entstehung maligner Melanome auf dem Boden kongenitaler Nävi finden sich ebenfalls zunehmend weniger Hinweise (Stefanaki et al., 2008), da sich unter Verwendung mehrerer proliferationsassoziierter Antigene kein Unterschied zwischen den Proliferationsaktivitäten kongenitaler Nävi und gewöhnlicher Nävi zeigte.

Eine frühere Studie an 314 Fällen zur Proliferationsaktivität mittels der Antikörper Ki-S1 und Ki-S5 zeigte ebenfalls einen sprunghaften Anstieg der Proliferationsrate von den benignen zu den malignen melanozytären Tumoren (Rudolph et al., 1995). Die Autoren zogen ebenfalls den Schluss, dass der Großteil der malignen Melanome nicht aus dysplastischen Nävi, sondern aus einer völlig anderen Zellpopulation entsteht.

4.7 Studien

In mehr als 200 Studien zum malignen Melanom wurden Antikörper gegen Ki-67 als Proliferationsmarker getestet. Das Antigen Ki-67 hat sich überwiegend als unabhängiger Prognosefaktor erwiesen (Korabiowska et al., 2000; Bergmann et al., 2001; Gimotty et al., 2005). Daher wird Ki-67 gegenwärtig routinemäßig zur Unterscheidung zwischen benignen und malignen melanozytären Läsionen und zur Prognosebeurteilung herangezogen (Ohsie et al., 2008). Auch in der vorliegenden Studie zeigt sich Ki-67 als unabhängiger Prognoseindikator.

Die Mehrheit der Studien verwendet Ranksummentests, Kaplan-Meier-Kurven, Varianzanalysen und Student-t-Tests. Die vorliegenden Daten wurden darüber hinaus durch ROC-Kurven-Analysen, positive und negative prädiktive Werte und positive und negative Likelihood-Quotienten beschrieben. Die vorliegende Studie schließt außerdem die hohe Zahl von 327 Fällen ein. Eine Studie in vergleichbarer

Größe von 396 Fällen (Gimotty et al., 2005), die Ki-67 mithilfe von MiB-1 anfärbte, weist keine ROC-Analyse oder Likelihood-Quotienten auf, die errechneten Sensitivitäten und Spezifitäten liegen deutlich niedriger als in der vorliegenden Studie.

Der in den publizierten Studien vorrangig verwendete Antikörper ist MIB-1. Dieser Antikörper ist gegen ein Formalin-resistentes Epitop des Ki-67-Antigens gerichtet. Er zeigt ein vergleichbares Färbemuster wie der 1983 in Kiel entwickelte Antikörper Ki-67, welcher an das gleichnamige Antigen bindet (Gerdes et al., 1983). Es handelt sich um einen Maus AK, der nach Immunisierung mit der Hodgkin Lymphom Zelllinie L428 produziert wurde (Stein et al., 1985). Der ursprüngliche Antikörper Ki-67 war nur in Kryostat-Schnitten verwendbar, die später entwickelten Antikörper Ki-S5 und MIB-1 jedoch auch in Paraffin-Schnitten. Ki-S5 wurde ebenfalls in Kiel hergestellt (Kreipe et al., 1993b) und wird heute noch in der Routinefärbung verwendet. Dieser Antikörper erkennt ein formalinresistentes Epitop des Ki-67 (Kreipe et al., 1993b). Er gilt als zuverlässiger Prognoseindikator beim malignen Melanom (Rudolph et al., 1995; Rudolph et al., 1997b). In der Studie von Rudolph (Rudolph et al., 1997b) lag der mittlere Proliferationsindex von Ki-S5 allerdings mit 1,4% deutlich niedriger als der mittlere Proliferationsindex von Ki-S11 mit 7,04% in der vorliegenden Studie. Der Ki-S11 AK ist ein später entwickelter Antikörper gegen das Antigen Ki-67 und bindet an ein anderes Epitop als der ursprüngliche Antikörper. In der Western-Blot-Analyse erkennt Ki-S11 das Ki-67, erkennbar an der Anfärbung der 395- und 345kd Banden. Es werden aber zusätzlich noch 130- und 80kd Stränge angefärbt (Rudolph et al., 1997a). Daraus ergibt sich seine hohe Sensitivität. Dies rechtfertigt die Durchführung von weiteren Studien an melanozytären Zellen, zusätzlich zu den bereits intensiv verwendeten MIB-1 AK. An 184 Fällen von Weichteilsarkomen hat sich Ki-S11 als unabhängiger Prognoseindikator für das Gesamtüberleben erwiesen (Rudolph et al., 1997a). Beim Hypopharynxkarzinom konnte Ki-S11 ebenfalls als Prognosefaktor ermittelt werden (Kuropkat et al., 1999). In melanozytären Läsionen ist der Antikörper Ki-S11 bisher nur einmal untersucht worden (Rudolph et al., 2000). Die Proliferationsaktivitäten von Ki-S11 in dieser Studie zeigen ähnliche Werte wie in der vorliegenden Studie, es wurden jedoch nur 88 und nicht 327 Fälle wie in der vorliegenden Studie untersucht.

In der Literatur finden sich 13 Angaben zur Analyse des Antigens repp86. In acht dieser Studien wurde die Kombination der Antigene Ki-67 und repp86 untersucht, die sich für die Unterscheidung benigne vs. maligne beim malignen Mesotheliom als geeignetes Werkzeug herausgestellt hat (TaHERi et al., 2008). Beim Mammakarzinom wird dieser Kombination eine entscheidende Rolle in der Prognosestellung zugeschrieben (Mohsenifar et al., 2007). In beiden Studien wurde der Antikörper Ki-S2 benutzt. Die Kombination der beiden Proliferationsmarker Ki-67 und repp86 mittels der Antikörper Ki-S11 und Ki-S2 wurde an melanozytären Läsionen nur einmal angewandt (Rudolph et al., 2000).

Zusammenfassend stellen die AK Ki-S11 und Ki-S2 für melanozytäre Läsionen ein sehr stark diskriminierendes Werkzeug der Diagnosefindung dar mit hoher Aussagefähigkeit über die Prognose.

5. Zusammenfassung

Diese Arbeit untersucht den Proliferationsindex an einer großen Fallzahl von melanozytären Läsionen mithilfe der Antikörper Ki-S11 und Ki-S2.

Die wichtigsten Befunde der Studie zeigen eine Korrelation zwischen der Proliferationsaktivität und dem histologischen Typ (Tabelle 4, Abbildung 5, 6), einen signifikanten Unterschied zwischen benignen und malignen Läsionen (Tabelle 5, Abbildung 7, 8) und eine Korrelation zwischen der Proliferationsaktivität und der prognostischen Tumorgruppe (Tabelle 6, Abbildung 9, 10).

In der ROC-Analyse betrug die Fläche unter der ROC-Kurve für Ki-S11 $AUC=0,993$ (95%-Konfidenzintervall von $[0,986; 0,999]$) (Abbildung 11) und für Ki-S2 $AUC=0,996$ (95%-Konfidenzintervall von $[0,9991; 1,000]$) (Abbildung 12). Ein Cut-off-Wert für Ki-S11 von 4,25% führte zu einer Sensitivität von 98,0% und einer Spezifität von 95,4%, ein Cut-off-Wert für Ki-S2 von 0.25% führte zu einer Sensitivität von 100,0% und einer Spezifität von 96,0% (Tabelle 8), zur Unterscheidung benigne vs. maligne. Daraus ergibt sich ein positiver prädiktiver Wert von 94.8% für Ki-S11 und 95.5% für Ki-S2 sowie ein negativer prädiktiver Wert von 98.2% für Ki-S11 und 100% für Ki-S2 (Tabelle 8). Die LR^+ für Ki-S11 beträgt 21.4 und für Ki-S2 25, die LR^- für Ki-S11 ist 0.02, die für Ki-S2 0.00 (Tabelle 8).

Die vorliegende Arbeit unterstützt nicht das Konzept einer Tumorprogression von melanozytären Läsionen unsicheren Verhaltens in das maligne Melanom, da die Proliferationsindices von den Spitz/Reed Nävi zum Melanoma in situ sprunghaft ansteigen (Tabelle 4, Abbildung 6).

Zusammenfassend stellen die AK Ki-S11 und Ki-S2 für melanozytäre Läsionen ein sehr stark diskriminierendes Werkzeug der Diagnosefindung dar mit hoher Aussagefähigkeit für die Prognose.

6. Literaturverzeichnis

Ackerman AB, Scheiner AM. How wide and deep is wide and deep enough? A critique of surgical practice in excisions of primary cutaneous malignant melanoma. *Hum Pathol.* 1983;14(9):743-44.

Ackerman AB. What naevus is dysplastic, a syndrome and the commonest precursor of malignant melanoma? A riddle and an answer. *Histopathology.* 1988;13(3):241-56.

Baak JP. Mitosis counting in tumors. *Hum Pathol.* 1990;21(7):683-85.

Bergman R, Malkin L, Sabo E, Kerner H. MIB-1 monoclonal antibody to determine proliferative activity of Ki-67 antigen as an adjunct to the histopathologic differential diagnosis of Spitz nevi. *J Am Acad Dermatol.* 2001;44(3):500-4.

Bishop PW, Menasce LP, Yates AJ, Win NA, Banerjee SS. An immunophenotypic survey of malignant melanomas. *Histopathology.* 1993;23(2):159-66.

Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg.* 1970;172(5):902-8.

Chorny JA, Barr RJ, Kyshtoobayeva A, Jakowatz J, Reed RJ. Ki-67 and p53 expression in minimal deviation melanomas as compared with other nevi-melanocytic lesions. *Mod Pathol.* 2003;16(6):525-29.

Clark WH Jr, From L, Bernardino EA, Mihm MC. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res.* 1969;29(3):705-27.

Clark WH Jr, Reimer RR, Greene M, Ainsworth AM, Mastrangelo MJ. Origin of familial malignant melanomas from heritable melanocytic lesions. 'The B-K mole syndrome'. *Arch Dermatol.* 1978;114(5):732-38.

Clark WH Jr, Elder DE, Guerry D 4th, Epstein MN, Greene MH, Van Horn M. A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Hum Pathol.* 1984;15(12):1147-65.

Clemente C, Cochran AJ, Elder DE, Levene A, MacKie RM, Mihm MC, Rilke F, Cascinelli N, Fitzpatrick TB, Sober AJ. Histopathologic diagnosis of dysplastic nevi: concordance among pathologists convened by the World Health Organization Melanoma Programme. *Hum Pathol.* 1991;22(4):313-19.

Cordell JL, Falini B, Erber WN, Ghosh AK, Abdulaziz Z, MacDonald S, Pulford KA, Stein H, Mason DY. Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *J Histochem Cytochem.* 1984;32(2):219-29.

Crucioli V, Stilwell J. The histogenesis of malignant melanoma in relation to pre-existing pigmented lesions. *J Cutan Pathol.* 1982;9(6):396-404.

de Wit PE, van't Hof-Grootenboer B, Ruiter DJ, Bondi R, Bröcker EB, Cesarini JP, Hastrup N, Hou-Jensen K, MacKie RM, Scheffer E, Suter L, Urso C. Validity of the histopathological criteria used for diagnosing dysplastic naevi. An interobserver study by the pathology subgroup of the EORTC Malignant Melanoma Cooperative Group. *Eur J Cancer.* 1993;29A(6):831-39.

Duncan EL, Whitaker NJ, Moy EL, Reddel RR. Assignment of SV40-immortalized cells to more than one complementation group for immortalization. *Exp Cell Res.* 1993;205(2):337-44.

Elder DE, Goldman LI, Goldman SC, Greene MH, Clark WH Jr. Dysplastic nevus syndrome: a phenotypic association of sporadic cutaneous melanoma. *Cancer.* 1980;46(8):1787-94.

Frahm SO, Rudolph P, Dworeck C, Zott B, Heidebrecht H, Steinmann J, Neppert J, Parwaresch R. Immunoenzymatic detection of the new proliferation associated protein p100 by means of a cellular ELISA: specific detection of cells in cell cycle phases S, G2 and M. *J Immunol Methods.* 1999;223(2):147-53.

Garbe C, Leiter U. Melanoma epidemiology and trends. *Clin Dermatol.* 2009;27(1):3-9.

Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer.* 1983;31(1):13-20.

Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol.* 1984;133(4):1710-15.

Gerdes J, Li L, Schlueter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C, Stahmer I, Kloth S, Brandt E, Flad HD. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol.* 1991;138(4):867-73.

Gimotty PA, Van Belle P, Elder DE, Murry T, Montone KT, Xu X, Hotz S, Raines S, Ming ME, Wahl P, Guerry D. Biologic and prognostic significance of dermal Ki67 expression, mitoses, and tumorigenicity in thin invasive cutaneous melanoma. *J Clin Oncol.* 2005;23(31):8048-56.

Greene MH, Goldin LR, Clark WH Jr, Lovrien E, Kraemer KH, Tucker MA, Elder DE, Fraser MC, Rowe S. Familial cutaneous malignant melanoma: autosomal dominant trait possibly linked to the Rh locus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1983;80(19):6071-75.

Hall PA, Levison DA. Assessment of cell proliferation in histological material. *J Clin Pathol.* 1990;43(3):184-92.

Heidebrecht HJ, Buck F, Steinmann J, Sprenger R, Wacker HH, Parwaresch R. p100: a novel proliferation-associated nuclear protein specifically restricted to cell cycle phases S, G2, and M. *Blood*. 1997;90(1):226-33.

Heidebrecht HJ, Buck F, Endl E, Kruse ML, Adam-Klages S, Andersen K, Frahm SO, Schulte C, Wacker HH, Parwaresch R. Ki-Mcm6, a new monoclonal antibody specific to Mcm6: comparison of the distribution profile of Mcm6 and the Ki-67 antigen. *Lab Invest*. 2001;81(8):1163-65.

Heidebrecht HJ, Adam-Klages S, Szczepanowski M, Pollmann M, Buck F, Endl E, Kruse ML, Rudolph P, Parwaresch R. repp86: A human protein associated in the progression of mitosis. *Mol Cancer Res*. 2003;1(4):271-79.

Hsu SM, Raine L, Fanger H. The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics. *Am J Clin Pathol*. 1981;75(6):816-21.

Ilmonen S, Hernberg M, Pyrhönen S, Tarkkanen J, Asko-Seljavaara S. Ki-67, Bcl-2 and p53 expression in primary and metastatic melanoma. *Melanoma Res*. 2005;15(5):375-81.

Kaleem Z, Lind AC, Humphrey PA, Sueper RH, Swanson PE, Ritter JH, Wick MR. Concurrent Ki-67 and p53 immunolabeling in cutaneous melanocytic neoplasms: an adjunct for recognition of the vertical growth phase in malignant melanomas? *Mod Pathol*. 2000;13(3):217-22.

Key G, Petersen JL, Becker MH, Duchrow M, Schlüter C, Askaa J, Gerdes J. New antiserum against Ki-67 antigen suitable for double immunostaining of paraffin wax sections. *J Clin Pathol*. 1993;46(12):1080-84.

Korabiowska M, Brinck U, Middel P, Brinkmann U, Berger H, Radzun HJ, Ruschenburg I, Droese M. Proliferative activity in the progression of pigmented skin lesions, diagnostic and prognostic significance. *Anticancer Res*. 2000;20(3A):1781-85.

Kreipe H, Alm P, Olsson H, Hauberg M, Fischer L, Parwaresch R. Prognostic significance of a formalin-resistant nuclear proliferation antigen in mammary carcinomas as determined by the monoclonal antibody Ki-S1. *Am J Pathol*. 1993a;142(2):651-57.

Kreipe H, Wacker HH, Heidebrecht HJ, Haas K, Hauberg M, Tiemann M, Parwaresch R. Determination of the growth fraction in non-Hodgkin's lymphomas by monoclonal antibody Ki-S5 directed against a formalin-resistant epitope of the Ki-67 antigen. *Am J Pathol*. 1993b;142(6):1689-94.

Kuropkat C, Rudolph P, Frahm SO, Parwaresch R, Werner JA. Proliferation marker Ki-S11--a prognostic indicator for squamous cell carcinoma of the hypopharynx. *Virchows Arch*. 1999 Dec;435(6):590-5.

Li LX, Crotty KA, McCarthy SW, Palmer AA, Kril JJ. A zonal comparison of MIB1-Ki67 immunoreactivity in benign and malignant melanocytic lesions. *Am J Dermatopathol.* 2000;22(6):489-95.

Linden MD, Torres FX, Kubus J, Zarbo RJ. Clinical application of morphologic and immunocytochemical assessments of cell proliferation. *Am J Clin Pathol.* 1992;97(5 Suppl 1):S4-13.

Maize JC. Dysplastic melanocytic nevi in histologic association with primary cutaneous melanomas. *J Am Acad Dermatol.* 1984;10(5 Pt 1):831-35.

Mohsenifar J, Almassi-Aghdam M, Mohammad-Taheri Z, Zare K, Jafari B, Atri M, Mortazavi SH, Azadeh P, Bagherzadeh M, Azargashb E, Rahimi F. Prognostic values of proliferative markers ki-67 and repp86 in breast cancer. *Arch Iran Med.* 2007;10(1):27-31.

Moretti S, Spallanzani A, Chiarugi A, Fabiani M, Pinzi C. Correlation of Ki-67 expression in cutaneous primary melanoma with prognosis in a prospective study: different correlation according to thickness. *J Am Acad Dermatol.* 2001;44(2):188-92.

Nasr MR, El-Zammar O. Comparison of pHH3, Ki-67, and survivin immunoreactivity in benign and malignant melanocytic lesions. *Am J Dermatopathol.* 2008;30(2):117-22.

Ohsie SJ, Sarantopoulos GP, Cochran AJ, Binder SW. Immunohistochemical characteristics of melanoma. *J Cutan Pathol.* 2008;35(5):433-44.

Ordóñez NG, Ji XL, Hickey RC. Comparison of HMB-45 monoclonal antibody and S-100 protein in the immunohistochemical diagnosis of melanoma. *Am J Clin Pathol.* 1988;90(4):385-90.

Quinn CM, Wright NA. The clinical assessment of proliferation and growth in human tumours: evaluation of methods and applications as prognostic variables. *J Pathol.* 1990;160 (2):93-102.

Reed RJ. Minimal deviation melanoma. *Hum Pathol.* 1990;21(12):1206-11.

Rentrop M, Knapp B, Winter H, Schweizer J. Aminoalkylsilane-treated glass slides as support for in situ hybridization of keratin cDNAs to frozen tissue sections under varying fixation and pretreatment conditions. *Histochem J.* 1986;18(5):271-76.

Rigel DS, Rivers JK, Kopf AW, Friedman RJ, Vinokur AF, Heilman ER, Levenstein M. Dysplastic nevi. Markers for increased risk for melanoma. *Cancer.* 1989;63(2):386-89.

Rudolph P, Lappe T, Schubert C, Schmidt D, Parwaresch RM, Christophers E. Diagnostic assessment of two novel proliferation-specific antigens in benign and malignant melanocytic lesions. *Am J Pathol.* 1995;147(6):1615-25.

Rudolph P, Kellner U, Chassevent A, Collin F, Bonichon F, Parwaresch R, Coindre JM. Prognostic relevance of a novel proliferation marker, Ki-S11, for soft-tissue sarcoma. A multivariate study. *Am J Pathol.* 1997a;150(6):1997-2007.

Rudolph P, Schubert C, Schubert B, Parwaresch R. Proliferation marker Ki-S5 as a diagnostic tool in melanocytic lesions. *J Am Acad Dermatol.* 1997b;37(2 Pt 1):169-78.

Rudolph P, Peters J, Lorenz D, Schmidt D, Parwaresch R. Correlation between mitotic and Ki-67 labeling indices in paraffin-embedded carcinoma specimens. *Hum Pathol.* 1998a Nov;29(11):1216-22.

Rudolph P, Knüchel R, Endl E, Heidebrecht HJ, Hofstädter F, Parwaresch R. The immunohistochemical marker Ki-S2: cell cycle kinetics and tissue distribution of a novel proliferation-specific antigen. *Mod Pathol.* 1998b;11(5):450-56.

Rudolph P, Schubert C, Tamm S, Heidorn K, Hauschild A, Michalska I, Majewski S, Krupp G, Jablonska S, Parwaresch R. Telomerase activity in melanocytic lesions: A potential marker of tumor biology. *Am J Pathol.* 2000;156(4):1425-32.

Shi SR, Key ME, Kalra KL. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem.* 1991;39(6):741-48.

Smoller BR, McNutt NS, Hsu A. HMB-45 staining of dysplastic nevi. Support for a spectrum of progression toward melanoma. *Am J Surg Pathol.* 1989;13(8):680-84.

Stavropoulos NE, Filiadis I, Ioachim E, Hastazeris K, Tsimaris I, Kalogeras D, Stefanaki S, Agnantis NJ. Prognostic significance of p53, bcl-2 and Ki-67 in high risk superficial bladder cancer. *Anticancer Res.* 2002;22(6B):3759-64.

Stefanaki C, Stefanaki K, Antoniou C, Argyrakos T, Stratigos A, Patereli A, Katsambas A. G1 cell cycle regulators in congenital melanocytic nevi. Comparison with acquired nevi and melanomas. *J Cutan Pathol.* 2008;35(9):799-808.

Stein H, Gatter K, Asbahr H, Mason DY. Use of freeze-dried paraffin-embedded sections for immunohistologic staining with monoclonal antibodies. *Lab Invest.* 1985;52(6):676-83.

Taheri ZM, Mehrafza M, Mohammadi F, Khoddami M, Bahadori M, Masjedi MR. The diagnostic value of Ki-67 and repp86 in distinguishing between benign and malignant mesothelial proliferations. *Arch Pathol Lab Med.* 2008;132(4):694-97.

Wick MR, Swanson PE, Rocamora A. Recognition of malignant melanoma by monoclonal antibody HMB-45. An immunohistochemical study of 200 paraffin-embedded cutaneous tumors. *J Cutan Pathol.* 1988;15(4):201-7.

7. Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Pierre Rudolph, vormals an der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, für die Überlassung des Themas und für die Betreuung im Labor.

Mein Dank gilt Frau Monika Hauberg für die Betreuung im Labor des Instituts für Pathologie und für wertvolle Hinweise.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. Walter Jonat, Direktor der Universitäts-Frauenklinik Kiel, da ich an seiner Klinik meine Ausbildung zum Facharzt für Frauenheilkunde und Geburtshilfe absolvieren durfte.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Constantin v. Kaisenberg, Medizinische Hochschule Hannover, vormals Universitäts-Frauenklinik Kiel, für die weitere Betreuung nach dem Ableben von Prof. Dr. Rudolph, die andauernde Ermutigung und die Hilfe bei der Erstellung des Manuskriptes für die Dissertation.

Mein Dank gilt Frau Dipl.-Mathematikerin Ulrike Schulz, die gemeinsam mit mir die bereits von Prof. Dr. Rudolph begonnene statistische Analyse erneut durchgegangen ist, diese überprüft und vervollständigt hat.

Mein Dank gilt außerdem Herrn Prof. Dr. I. Leuschner, welcher mir bei der kritischen Durchsicht der Endversion des Manuskriptes sowie mit der Interpretation von weiteren Abbildungen geholfen hat. Seine Hinweise aus pathologischer Sicht waren außerordentlich wertvoll.

8. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Nadja Richter, geb. Steinhagen (verheiratet)
Geburtsdatum	03.06.1975
Geburtsort	Kiel
Kinder	Leo, geboren 2004 Anton, geboren 2006
Eltern	Prof. Dr. Klaus Steinhagen, Psychologie Ingeborg Steinhagen, geb. Berndt, Sonderschullehrerin

Schulische Ausbildung

1981-1985	Grundschule Schilksee, Kiel
1985-1994	Ricarda-Huch-Schule, Gymnasium, Kiel
1991-1992	Austauschjahr Madera High School, Madera, Kalifornien, USA

Studium

1994-2002	Medizinstudium an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
1997	Physikum
1999	1. Staatsexamen
2001	2. Staatsexamen
2002	3. Staatsexamen

Praktisches Jahr

April bis August 2001	Universitätsklinikum Kiel Chirurgie
August bis Dezember 2001	Universitätsklinikum Kiel Gynäkologie
Dezember 2001-Februar 2002	Taranaki Base Hospital, New Plymouth, Neuseeland
Februar bis März 2002	Innere Medizin Universitätsklinikum Kiel Innere Medizin

Ärztin im Praktikum

2002-2004	Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe des Universitätsklinikums S-H, Campus Kiel
-----------	---

Ärztin in Weiterbildung

seit 10/2004	Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe des Universitätsklinikums S-H, Campus Kiel
--------------	---

Unterschrift