

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. med. Thomas Vogt

**Expression von *Sec62* in melanozytären Tumoren und
Korrelation mit progressfreiem
Überleben und Gesamtüberleben**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2021

Vorgelegt von Maria Elena Wahl
Geboren am 21.08.1993, in Kaiserslautern

Tag der Promotion: 13.01.2023

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Michael D. Menger

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Cornelia Müller

Prof. Dr. med. Henning Madry

Prof. Dr. med. Erich-Franz Solomayer

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	4
1. Zusammenfassung	5
1.1 Deutsche Zusammenfassung	5
1.2. Summary	7
2. Einleitung	9
2.1 Sec62	9
2.2 Malignes Melanom	12
2.2.1 Epidemiologie.....	12
2.2.2 Stadieneinteilung und Prognose.....	13
2.2.3 Risikofaktoren.....	16
2.2.4 Klinik und Diagnostik.....	17
2.2.5 Therapie.....	18
2.3 Blauer Nävus	19
2.4 Spitznävus	19
2.5 Kongenitaler Nävus	20
3. Material/Methoden	22
3.1 Material und Herstellernachweis	22
3.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	22
3.1.2 Benötigte Puffer.....	23
3.1.3 Chemikalien.....	24
3.1.4 Verwendeter Antikörper.....	24
3.2 Fixierung des Gewebes	25
3.3 Versuchsablauf	25
3.3.1 Immunhistologische Färbung von Sec62 an FFPE-Gewebeschnitten.....	25
3.3.2 Tabellarischer Versuchsablauf.....	27
3.4 Dokumentation und Quellen	28
3.5 Analytische Methoden	29
3.6 Statistische Auswertung	30
4 Ergebnisse	31
4.1 Beschreibung des Patientenkollektivs	31
4.2 T-Stadium/ Sec62	35
4.3 Tumordicke nach Breslow/ Sec62	37
4.4 Geschlecht/ Sec62	38
4.5 Ulzerationen/ Sec62	39
4.5.1. Ulzeration/ Sec62/ pT1-, pT2-, pT3-, pT4-Tumore.....	40
4.6 Sentinellymphknoten/ Sec62	42
4.6.1 Sentinellymphknoten/ Sec62/ pT1-, pT2-, pT3-, pT4-Tumore.....	43
4.7 Metastasen/ Sec62	45
4.7.1 Metastasen/ Sec62/ pT1-, pT2-, pT3-, pT4-Tumore.....	46
4.8 Clark-Level/ Sec62	48
4.9 Diagnosen/Sec62	49
4.9.1 Malignes Melanom und Folia/Sec62.....	51
4.9.2 Malignes Melanom und Spitznävus/Sec62.....	52
4.9.2.1 Spitznävus und Alter.....	53
4.9.3 Malignes Melanom und blauer Nävus/Sec62.....	55
4.9.4 Malignes Melanom und kongenitaler Nävus/Sec62.....	56
4.9.8 Spitznävus und blauer Nävus/Sec62.....	57
4.9.9 Spitznävus und kongenitaler Nävus/Sec62.....	58
4.9.10 Blauer Nävus und kongenitaler Nävus/Sec62.....	59
4.10 Alter/Sec62	60
4.11 Melanom-Subtypen/Sec62	61
4.12 Überlebensanalyse	62

4.12.1 Gesamtüberleben (OAS).....	62
4.12.2 Progressfreies Überleben (PFS).....	63
4.13 Zusammenfassung hochsignifikanter Ergebnisse ($p \leq 0,001$).....	65
Zusammenfassung signifikanter Ergebnisse ($p < 0,05$).....	66
4.15 Übersicht Anzahl aller Gewebeproben mit hohem oder niedrigem IRS-Sec62-Score	67
5 Diskussion	69
5.1 Diskussion der Methoden	70
5.2 Diskussion der Ergebnisse.....	71
6 Abbildungsverzeichnis	82
7 Tabellenverzeichnis	84
8 Quellenverzeichnis	85
9 Publikation	91
10 Danksagung.....	91
11 Lebenslauf.....	92

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
AK	Antikörper
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
ca.	circa
ER	Endoplasmatisches Retikulum
g	Gramm
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HNSCC	Head and neck squamous cell carcinoma
HE	Hämatoxylin/Eosin
INF-a	Interferon-a
l	Liter
mg, mm, ml	Milligramm, Millimeter, Mikroliter
mM, M	Milli-, Molarität (molare Masse pro Liter)
min	Minute
µg, µm, µl	Mikrogramm, Mikrometer, Mikroliter
n	Stichprobenumfang
NSCLC	Nicht kleinzelliges Lungenkarzinom
Nr.	Nummer
OAS	Overall Survival
OT	Objektträger
n.s.	nicht signifikant
p	statistischer Signifikanzwert
PBS	phosphatgepufferte Standardisalzlösung
PFS	Progressfree Survival
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
sec	Sekunde
Str.	Stratum

1. Zusammenfassung

1.1 Deutsche Zusammenfassung

Das maligne Melanom ist eine bösartige melanozytäre Neubildung der Haut und macht mit steigender Inzidenz etwa 5% aller Krebserkrankungen in Deutschland aus [29]. Insbesondere in späten Stadien geht diese Diagnose mit einer sehr schlechten Prognose einher [83]. Trotz großer Fortschritte in der Immuntherapie und personalisierten Onkologie, bleibt die Prognose in späten Stadien oft infaust [5, 6, 33, 34].

2006 wurde Sec62 erstmals in Verbindung mit malignen Tumoren, genauer dem Prostatakarzinom beschrieben und eine Überexpression dieses Proteins festgestellt [52]. Im weiteren Verlauf konnte eine erhöhte Sec62-Expression in folgenden weiteren Tumorentitäten nachgewiesen werden:

- Nicht kleinzelliges Lungenkarzinom (NSCLC), Schilddrüsenkarzinom [66],
- Plattenepithelkarzinome von Kopf und Hals (HNSCC) [105],
- Fibrosarkom, Glioblastom [39],
- Zervixkarzinom [65],
- duktales invasives Mammakarzinom [97].

Es zeigte sich, dass eine erhöhte Sec62-Expression mit einer vermehrten Invasion, Migration, höherer ER-Stress-Toleranz und einer schlechteren Prognose einhergeht [39, 40, 66].

Diese Dissertation beschäftigt sich mit der Fragestellung, ob in Melanomen und anderen melanozytären Läsionen eine Sec62-Überexpression nachzuweisen ist und, wie diese sich auf das Gesamtüberleben und progressfreie Überleben auswirkt. Es handelt sich um retrospektive Studie. Insgesamt wurden 209 Gewebeproben immunhistochemisch angefärbt und mit Hilfe des IRS-Scores nach Remmele und Stegner [80] auf die Höhe ihrer Sec62-Expression analysiert. Insgesamt wurden 93 Melanome, 28 Filiae, 29 Spitznävi, 38 kongenitale Nävi und 21 blaue Nävi angefärbt und analysiert. Die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung wurden mit klinischen Daten, wie zum Beispiel Tumorstadium, histologischen Charakteristika und Progress- oder Sterbedatum korreliert und in Beziehung zueinander gesetzt.

Die Ergebnisse dieser Studie lassen sich konkordant in die aktuelle Forschungslage einordnen.

So konnte eine erhöhte Sec62-Expression in Melanomen im Vergleich mit benignen melanozytären Läsionen festgestellt werden.

Aus der Reihe fiel hier der Spitznävus, welcher mit besonders hohen IRS-Sec62-Score-Werten

einherging.

Außerdem zeigte sich, dass invasivere Melanome mit hoher Tumordicke nach Breslow oder Tumorstadium, Melanome mit N1-Status oder mit Ulzerationen eine signifikant höhere Sec62-Expression aufwiesen als wenig invasive Melanome ohne Metastasen und Ulzerationen.

Auch stieg die Sec62-Expression mit steigendem T-Stadium der Melanome und Breslow Level positiv korrelierend an.

Das Gesamtüberleben in Melanomen mit niedriger und hoher Sec62-Expression unterschied sich nicht signifikant voneinander, wohl aber das progressfreie Überleben. Hier konnte ein früherer Progress der Melanomerkrankung bei Patienten mit hoher Sec62-Expression gezeigt werden.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Sec62-Expression in Melanomen Potential für einen neuen Prognoseparameter aufweist und einen weiteren Baustein in der personalisierten Onkologie darstellen könnte.

1.2. Summary

Melanoma is a malignant melanocytic neoplasia of the skin and with a rising incidence accounts for circa 5% of all cancerous diseases in Germany [29]. Especially at an advanced stage, the chance of survival is low despite recent progress made in immunotherapy and personalized medicine [5, 6, 33, 34, 83].

In 2006, the Sec62-protein was first associated with a malignant tumor, namely prostate carcinoma, in which an overexpression of this protein was detected [52]. In following studies an overexpression of the Sec62-protein could be found in various kinds of cancer:

- Non-small-cell lung cancer (NSCLC), thyroid cancer [66]
- Squamous cell carcinoma of the head and neck (HNSCC) [105]
- Fibrosarcoma, Glioblastoma [39]
- Cervical carcinoma [65]
- Ductal invasive breast cancer [97]

Studies showed that an overexpression of Sec62 is often associated with a higher invasion, migration and ER-stress-tolerance of the tumor and furthermore concludes in a worse prognosis [39, 40, 66].

This dissertation deals with the question, if melanoma and other melanocytic lesions also show an Sec62-overexpression and how it influences the overall and progress free survival. In this retrospective study, a total of 209 tissue samples, including 93 melanoma, 28 filiae, 29 spitznevi, 38 congenital nevi and 21 blue nevi were immunohistochemically analyzed using the IRS-Score by Remmele and Stegner [80]. The results of the staining were correlated with clinical data, such as T-stadium, histological characteristics, progress- and survivaldates.

The results of this study are concordant to recent studies, where a Sec62-overexpression could also be found in melanoma, whereas in benign melanocytic lesions no higher Sec62-expression could be detected.

Spitz naevus, a benign melanocytic lesion, falls out of alignment by having one of the highest Sec62-expressions of all stained lesions.

Furthermore, this study showed that more invasive melanoma, with a higher Breslow tumor thickness or overall higher tumor stadium, higher Clark-level as well as melanoma with lymph node metastasis and with ulcerations had significantly higher Sec62-expression than less invasive melanoma.

The overall survival in melanoma with high and low Sec62-expression showed no significant

difference, whereas the progress free survival was significantly shorter in melanoma with high Sec62-expression than in melanoma with a low Sec62-expression.

Concluding, the Sec62-expression in melanomas is a predictive factor and thus carries potential to be used as a biomarker in the future of the expanding field of personalized oncology.

2. Einleitung

2.1 Sec62

Im Jahr 1989 findet das Sec62-Protein erstmals Erwähnung in der medizinischen Fachliteratur. Es wurde ein fehlerhafter Proteintransport in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums in Zellen mit mutiertem Sec62-Gen beobachtet. [27, 90]. Dies führte zu der These, dass Sec62 maßgeblich am Transport von Proteinen in das Lumen des ER beteiligt ist.

In Säugetieren, genauer in den Pankreaszellen eines Hundes, wurde Sec62 erstmals 1997 beschrieben [101]. Hier liegt dieses im Komplex mit Sec61 und Sec63 vor und wirkt am co-translationalen Transport mit [73]. In diesem Komplex fungiert Sec61 als Kanalprotein, durch welches die Vorläuferproteine passieren [47]. Die Länge und Struktur des Polypeptids ist entscheidend für einen Sec62 vermittelten Transport [62].

Beim Ausschalten der Sec62-Sequenz beobachtete man, dass vor allem kleine Vorläuferproteine (kleiner 100 Aminosäuren) nicht mehr in das ER-Lumen transportiert werden konnten. Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass Sec62 verstärkt bei dem Transport von kleinen Proteinen beteiligt ist [62].

Außerdem zeigte sich in mehreren Studien, dass der Sec-Komplex an der Regulation des Calciumhaushaltes in der Zelle beteiligt ist. Hierbei erlaubt Sec61 einen passiven Efflux von Calciumionen aus dem ER in das Zytosol und wirkt somit dem aktiven Import der Calciumionen durch die sarkoplasmatische ER Ca^{2+} -ATPase entgegen [63].

Da das zytosolische Ca^{2+} , Prozesse wie Apoptose [88] oder Zellmigration [49] beeinflusst, kann eine Fehlregulation von Ca^{2+} Efflux schwerwiegende Folgen für die jeweilige Zelle haben.

Die Regulation des passiven Ca^{2+} Efflux durch Sec61-Kanal wird durch verschiedene Mechanismen gewährleistet. Zum einen vermindert Calmodulin von der zytosolischen Seite [32] und zum anderen das Chaperon BiP von der luminalen Seite des ER, den Ca^{2+} Efflux [87].

Beim Ausschalten des Sec62-Gens beobachtete man, dass es zu Erhöhung des zytosolischen Calciums kam, welches die Schlussfolgerung erlaubte, dass auch Sec62 zu einem verminderten Ca^{2+} Effluxes führt. Dies wurde in Modellversuchen bestätigt [67].

Zusätzlich zum Proteintransport und der Regulation des Calciumhaushaltes, ist Sec62 außerdem auch an der Regeneration der Zelle bei ER-Stress beteiligt [35].

Bei Stress kann die Zelle entweder mit einer ungefalteten Protein-Antwort oder mit programmiertem Zelltod reagieren [104]. Bei letzterer Option könnte der Sec61 vermittelte Ca²⁺ Efflux eine Rolle spielen [63].

Im Jahr 2004 wurde erstmals die Verknüpfung zwischen Mutationen in den Sec-Proteinen und pathologischen Prozessen hergestellt. So zeigte sich zum Beispiel, dass eine Loss-of-Function-Mutation im Sec63-Gen zu einer autosomal-dominanten polyzystischen Lebererkrankung führen kann [24]. Auch eine Loss-of-Function-Mutationen im Sec61-Gen ist mit pathologischen Prozessen, wie der autosomal-dominanten tubulo-interstitial Nierenerkrankungen in Menschen oder Diabetes und Hepatosteatose in Mäusen assoziiert [16].

Zwei Jahre später knüpfte man die Verbindung zwischen malignen Neubildungen und einer Überexpression von Sec62. Bei 20 Prostatakarzinomproben fand man bei 50% eine erhöhte Sec62-Expression sowie eine erhöhte Sec62mRNA-Konzentration [52].

Auch andere Tumorentitäten wiesen eine Überexpression von Sec62 im Vergleich zu gesundem Gewebe auf. Die höchste Überexpression fand man bei Lungen- (93 - 97%) und in Schilddrüsenkarzinomen (follikulär 87%; papillär 100%), [66]. Das Hodenkarzinom wies keinerlei erhöhte Sec62-Aktivität auf [39].

In weiteren Studien konnten bei Zervixkarzinomen in 100% der Fälle eine erhöhtes Sec62-Protein Level festgestellt werden. Auch zeigte sich, dass die Schwere der Dysplasie mit der Höhe des Sec62-Protein-Niveaus korreliert [65]. Dieser Trend wurde in vielen weiteren Tumorentitäten bestätigt, sodass anzunehmen ist, dass Sec62 eine Rolle in der Pathogenese, bei diversen malignen Neubildungen hat. Auch der entsprechende DNA-Abschnitt, welcher Sec62 codiert (3q26) ist in den verschiedenen Tumorentitäten erhöht (Cervixkarzinom [2, 46]; NSCLC [25]; Ösophaguskarzinom [20]; Ovarialkarzinom [44] und Kopf-Hals-Karzinome [15, 89]).

Außerdem konnte festgestellt werden, dass Sec62 die Zellmigration und Invasivität der Tumorzellen beeinflusst. Eine geringe Sec62-Aktivität zeigte eine deutlich verringerte Zellmigration und Invasion. Dies wurde unter anderem an Prostatakarzinomen-, Schilddrüsenkarzinomen- und NSLCL-Zellen gezeigt [66]. In Zervixkarzinomen stieg mit Höhe der Sec62-Expression, die Migration und Invasion der Tumorzellen an [65].

Auch zeigte sich, dass Tumorzellen mit einer Überexpression von Sec62, eine erhöhte Widerstandsfähigkeit gegenüber Calcium vermittelten Zellstress haben [40, 66].

Diese Ergebnisse lassen die Frage aufkommen, ob man Sec62 in Zukunft als Biomarker verwenden kann, um eine Aussage über das OAS, das PFS oder über die Malignität eines Tumors zu treffen. In Studien zeigte sich bereits am Beispiel des Prostatakarzinoms, dass die Höhe des Sec62-Proteinlevels mit der histopathologischen Einteilung (Gleason Score) korreliert, sodass ein hohes Sec62-Proteinlevel mit einem höheren Gleason Score und schlussendlich auch mit einer schlechteren Prognose einhergeht [40]. Bei NSCLC zeigte sich eine Korrelation zwischen hohen Sec62-Leveln und dem vermehrten Auftreten von Lymphknotenmetastasen [66].

Diese, auszugsweise präsentierten Ergebnisse, könnten Grundlage für neue Therapieansätze sein. Leider ist es nicht möglich, Sec62 direkt zu inhibieren, lediglich eine indirekte Inhibierung durch Hemmung der sarkoplasmatischen/ER Ca^{2+} ATPase oder die Nutzung von Calmodulin-Antagonisten ist möglich.

In In-vitro-Experimenten konnte durch die Behandlung von Tumorzellen durch den Calmodulin-Antagonisten Trifluoperazin (TFP) eine Hemmung der Tumormigration sowie eine Hemmung der Zellvermehrung gezeigt werden [67]. Besonders gut scheint TFP bei Tumorzellen mit hohen Sec62-Leveln anzusprechen [39, 67].

Chemotherapeutika, wie zum Beispiel Thapsigargin, erhöhen den zytosolischen Calciumhaushalt, um die Tumorzelle in den programmierten Zelltod zu leiten [50]. Tumorzellen mit erhöhtem Sec62-Gehalt sind weniger sensitiv gegenüber Thapsigargin, da sie durch die erhöhte Sec62-Expression eine höhere ER-Stress Toleranz aufweisen und nicht den programmierten Zelltod einleiten [40]. Kombiniert man nun Thapsigargin mit TFP, zeigte sich an Mäusen mit Hypopharynxkarzinomen, dass durch die indirekte Hemmung von Sec62 mit TFP, die Tumorzellen wieder auf die Behandlung mit Thapsigargin ansprechen [56].

Es bleibt abzuwarten, ob dies dazu führt, dass Karzinome, die mit einer Sec62-Überexpression assoziiert sind (wie zum Beispiel Prostata- [39] oder Lungenkarzinome [66], in Zukunft vor Behandlungsbeginn auf ihren Sec62-Gehalt zu untersuchen sind, um die Effektivität der Therapie zu erhöhen.

2.2 Malignes Melanom

2.2.1 Epidemiologie

Das maligne Melanom ist ein hochmaligner Tumor, der sich aus den Melanozyten der Basalschicht der Epidermis entwickelt [79]. Es hat die höchste Metastasierungsrate aller Hauttumoren und führt zu 90 % der Todesfälle durch Hauttumore [3]. In den letzten 4 Dekaden (1970 - 2012) nahm die Inzidenzrate des Melanoms rasant zu; von 3 Fällen pro 100.000 Einwohner auf 19 Fälle pro 100.000 Einwohner. Das ist ein Anstieg der Inzidenz um das Siebenfache. Aktuell gibt es keine Anhaltspunkte, die eine Abflachung der Inzidenzrate erwarten lassen. Im Jahr 2012 war das maligne Melanom sowohl bei Frauen, als auch Männern der fünfthäufigste vorkommende solide Tumor [29, 83].

Betrachtet man Europa, so ist ein Nord-Süd-Gradient zu erkennen, welcher sich mit den höchsten Inzidenzraten in Skandinavien und den niedrigsten Inzidenzraten in mediterranen Ländern bemerkbar macht. Dieses Phänomen lässt sich unter anderem auf die Pathogenese des malignen Melanoms durch erhöhte UV-Exposition zurückzuführen und der erhöhten Vulnerabilität gegenüber dieser, von weniger pigmentierten Hauttypen im Norden und stärker pigmentierten Hauttypen im Süden, erklären [29].

Einige der Gründe für den rasanten Anstieg der Inzidenzraten in Europa sind neue Lebens-, und Freizeitgewohnheiten, bei denen der Körper vermehrt Sonnenausstrahlung ausgesetzt ist. Auch ist das Bild einer sonnengebräunten Person im Kopf der Menschen mit Gesundheit, Attraktivität und Sportlichkeit assoziiert, was die vermehrte UV-Exposition für diese zu einem erstrebenswerten Ziel macht. Ein weiterer Grund für den Anstieg der Inzidenz der Melanome, liegt an der besseren Früherkennung des Hauttumors, welche 2008 im Rahmen eines Hautscreenings eine Leistung der gesetzlichen Krankenkasse wurde [29, 83].

Die Mortalitätsraten stiegen in den Jahren 1999 - 2012 von 2,3 auf 3,0 Fälle bei Frauen und von 2,6 auf 4,1 Fälle pro 100.000 Einwohner bei Männern. Der Grund für den im Vergleich mit der Inzidenzrate relativ geringen Anstieg der Mortalitätsrate, ist in der verbesserten Frühdiagnose von prognostisch günstigeren Tumoren zu finden [29, 83].

2.2.2 Stadieneinteilung und Prognose

Das AJCC teilt das maligne Melanom mit Hilfe der TNM-Klassifikation in vier verschiedenen Stadien ein. Mit der Tumordicke nach Breslow, wird der wichtigste prognostische Faktor des Melanoms bei Erstdiagnose bestimmt. Des Weiteren betrachtet man mikro- und makroskopische Lymphknotenmetastasen sowie Fernmetastasierung über die Lymphknoten hinaus. Seit 2009 fließt auch das Auftreten von Ulzerationen und die Mitoserate bei Melanomen $\leq 1\text{mm}$ in die Stadieneinteilung mit ein. Seit Januar 2017 gibt es eine 8. Fassung der AJCC-Klassifikation (AJCC 2016), welche ab dem 01.01.2018 verbindlich umgesetzt wird. Da die Auswertung dieser Arbeit nach der AJCC-Klassifikation von 2009 erfolgte, wird diese im Folgenden aufgeführt [29].

T-Klassifikation	Tumordicke	Weitere prognostische Parameter
Tis		Melanoma In-situ, keine Tumordinvasion
Tx	Keine Angabe	Stadium nicht bestimmbar
T1	$\leq 1,0\text{ mm}$	a: ohne Ulzeration, Mitosen $< 1/\text{mm}^2$ b: mit Ulzeration, oder Mitoseraten $/\text{mm}^2 \geq 1$
T2	1,01 – 2,00 mm	a: ohne Ulzeration b: mit Ulzeration
T3	2,01 – 4,0 mm	a: ohne Ulzeration b: mit Ulzeration
T4	$> 4,0\text{ mm}$	a: ohne Ulzeration b: mit Ulzeration

Tab. 1 T-Klassifikation des Primärtumors beim malignen Melanom (AJCC 2009). *Fehlen einer Bestimmung der Tumordicke und/oder Ulzeration oder unbekannter Primärtumor. Die Bestimmung der Mitoserate erfolgt am HE-Schnitt.

N-Klassifikation	Zahl metastatisch befallener Lymphknoten (LK)	Ausmaß der Lymphknotenmetastasierung
N1	1 LK	a: nur mikroskopische Metastase(n) (klinische okkult) ⁺ b: nur makroskopische Metastase(n) (klinische nachweisbar)
N2	2-3 LK	a: nur mikroskopisch nodale Metastase(n) b: nur makroskopisch nodale Metastase(n) c: Satellit(en) oder In-transit-Metastase(n) ohne regionäre Lymphknotenmetastasen
N3	≥ 4 LK, oder verbacken Lymphknoten oder Satelliten oder In-transit-Metastasen mit regionärer Lymphknotenbeteiligung	

Tab. 2 N-Klassifikation der regionären Lymphknoten beim malignen Melanom (AJCC 2009). Der Nachweis einer Mikrometastasierung ist in der neuen AJCC-Klassifikation jetzt auch das Auffinden einer einzelnen Zelle, die immunhistochemisch positiv reagiert. Diese Fälle sollen extra gekennzeichnet werden.

M-Klassifikation	Art der Fernmetastasierung	LDH
M1a	Metastasen in Haut, Subkutis oder Lymphknoten, jenseits der regionären Lymphknoten	Normal
M1b	Lungenmetastase(n)	Normal
M1c	Fernmetastase(n) anderer Lokalisation oder Fernmetastase(n) jeder Lokalisation mit erhöhten Serumwerten der Laktatdehydrogenase (LDH)	Normal Erhöht

Tab. 3 M-Klassifikation der Fernmetastasierung beim malignen Melanom (AJCC 2009)

Stadium		T-Klassifikation	N-Klassifikation	M-Klassifikation
0		Tis	N0	M0
I	IA	T1a		
	IB	T1b / T2a		
II	IIA	T2b / T3a		
	IIB	T3b / T4a		
	IIC	T4b		
III	III	Jedes T / Tis	≥N1	
	IIIB	T0	T1b/c	
IV		Jedes T	Jedes N	M1

Tab. 4 Klinische Stadieneinteilung des malignen Melanoms (AJCC 2016)

Clark Level	Eindringtiefe
I	Melanoma in situ
II	Invasion des Stratum papillare der Dermis
III	Invasion bis an die Grenze des Str. reticulare der Dermis
IV	Invasion des Str. reticulare der Dermis
V	Invasion der Subkutis

Tab. 5 Eindringtiefe nach Clark [22]

2.2.3 Risikofaktoren

Der wichtigste Risikofaktor für die Entstehung eines Melanoms, ist die erhöhte UV-Exposition der Haut. Hierbei fand man heraus, dass besonders die intermittierende UV-Exposition im Vergleich zu kontinuierlicher UV-Exposition das Hautkrebsrisiko deutlich steigert. Auch wirkt sich die Anzahl der erworbenen Sonnenbrände prognostisch negativ auf die Entstehung eines malignen Melanoms aus [37]; hierbei steigern besonders die in der Kindheit erlittenen Sonnenbrände das Lebenszeitrisiko erheblich [31].

Der Hauttyp wirkt sich stark auf die Vulnerabilität der Haut gegenüber UV-Strahlung aus und ist somit ein weiterer entscheidender Faktor, der die Entstehung von Melanomen beeinflusst. So haben Menschen, die nach der Hauttypeneinteilung nach Fitzpatrick dem Hauttyp 1 zugeordnet werden können, ein um bis zu 50% erhöhtes Risiko an einem malignen Melanom zu erkranken. Phänotypisch zeichnen sich diese Menschen durch rotes Haar, helle Haut und Augen, eine Vielzahl von Sommersprossen und durch schnelles Entwickeln von Sonnenbrand aus [99].

Etwa 25 Prozent aller Melanome entstehen auf dem Boden von präexistenten melanozytären Nävi. In diesen Fällen handelt es sich meist um superfiziell spreizende Melanome bei vor allem jungen Patienten [12]. Auch scheint es eine positive Korrelation im Hinblick auf die Gesamtanzahl, Größe und Form der vorhandenen melanozytären Nävi und der Entstehung von malignen Melanomen zu geben [42, 48]. So zeigte sich in Meta-Analysen, dass bei einer Anzahl von über 100 melanozytären Nävi, das Risiko für die Bildung eines malignen Melanoms um das Siebenfache anstieg [36].

Des Weiteren erhöht eine positive Familienanamnese das Lebenszeitrisiko an einem malignen Melanom zu erkranken, wobei die zugehörigen Genmutationen in unterschiedlicher Penetranz weitervererbt werden [8]. Zu einer Genmutation, welche mit hoher Penetranz vererbt wird, gehört die Mutation im CDKN2A-Gen. Oft erkranken mehrere Familienmitglieder, nicht nur in der ersten Generation, an einem malignen Melanom [100].

2.2.4 Klinik und Diagnostik

Da die Früherkennung des malignen Melanoms entscheidend die Schwere des weiteren Verlaufs beeinflusst, ist es wichtig, die Bevölkerung zu informieren und zu Selbstinspektion anzuleiten.

Dies kann nach dem ABCDE-Schema ablaufen:

A → Asymmetrie

B → Begrenzung

C → Color

D → Durchmesser

E → Erhabenheit

[28]

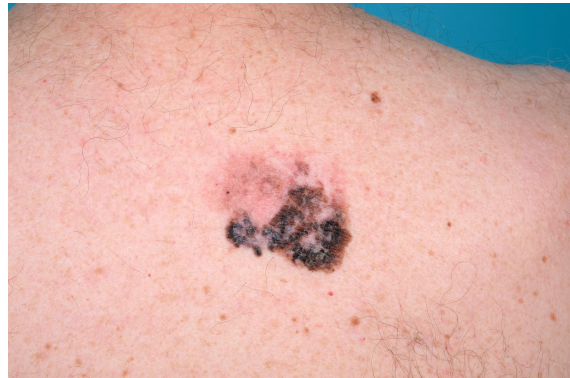


Abb. 1 Malignes Melanom, aus der Befunddatenbank der Universitätsklinik

Die klinische Untersuchung beginnt mit einer kompletten Ganzkörperuntersuchung, inklusive einsehbarer Schleimhäute und Palpation von Lymphknotenstation, bzw. ihrer Abflussgebiete. Diese Untersuchung findet in der Regel ohne Hilfsmittel statt und ist ausreichend, um eine Verdachtsdiagnose zu stellen [29].

Suspekte Läsionen können mit Hilfe der Dermatoskopie noch einmal genauer betrachtet werden. Hierbei wird mithilfe einer Lupe und etwas Flüssigkeit auf der Haut, die zu betrachtende Läsion so vergrößert, dass eine weitere und genauere Evaluation der Verdachtsdiagnose „malignes Melanom“ möglich ist [17, 29]. Eine Erweiterung dieser Diagnostik besteht in der sequenziellen digitalen Dermatoskopie. Hierbei werden die Aufnahmen der Dermatoskopie digital gespeichert und ermöglichen so, Veränderungen von Läsionen im zeitlichen Verlauf zu erkennen [29]. In Studien zeigte sich, dass so Melanome, die bei einer einfachen Dermatoskopie keine Malignitätskriterien aufwiesen, diese aber im Vergleich mit Voraufnahmen betrachtete, doch diagnostiziert werden konnten [55].

Um maligne Melanome, dysplastische Nävi und andere Läsionen ohne chirurgische Intervention besser differenzieren zu können, kann auf die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) zurückgegriffen werden. Hierbei wird mithilfe eines Laserstrahls, der suspekten Gewebsabschnitt punktgenau abgesucht und verhindert gegebenenfalls eine nicht notwendige Exzision der Läsion [29]. Um die definitive Diagnose „malignes Melanom“ zu stellen, muss eine histologische Aufbereitung erfolgen. Hier wird leitliniengerecht eine komplette Exzision mit kleinem Sicherheitsabstand der suspekten Läsion empfohlen. Wird die Diagnose histologisch bestätigt, ist gegebenenfalls eine Erweiterung des Sicherheitsabstandes indiziert (pT1 und pT2 → 1cm; pT3 und pT4 → 2 cm).

2.2.5 Therapie

Der einzig kurative Ansatz zur Behandlung des malignen Melanoms ist die R0-Exzision. Das sich anschließende Staging, orientiert sich an der klinischen Stadieneinteilung nach AJCC 2016. So wird bis Stadium IIB eine Lymphknoten-Sonographie und Bestimmung des Tumormarkers S100B empfohlen. Maximal eskaliert wird das Staging bei Stadium IV, hier wird eine Lymphknoten- sowie Abdomen-Sonographie, Bestimmung von LDH und S100B, Ganzkörper-CT/MRT, Kopf-MRT, Skelettszintigraphie und eine molekularpathologische Untersuchung, auf zum Beispiel eine BRAF-Mutation, empfohlen.

Ab einer Tumordicke von über einem Millimeter ist außerdem eine Sentinel-Lymphonodektomie indiziert.

Die Therapie richtet sich nach der klinischen Stadieneinteilung nach AJCC 2016. Da es bei jedem Patienten individuelle Risikofaktoren und auch persönliche Präferenzen gibt, sind hier exemplarisch einige Therapiemöglichkeiten genannt. Diese schließen sich an die chirurgische Intervention an. So kann zum Beispiel ab Stadium IB, dem Patienten eine adjuvante Therapie mit Interferon- α angeboten werden. Studien ab Stadium II mit INF- α zeigen eine Verlängerung des PFS [41] und einen geringeren signifikanten Vorteil des OAS [38].

Durch die Entdeckung und Erforschung von verschiedenen Treibermutationen, wie BRAF, MEK oder des malignen Melanoms, eröffneten sich neue Therapiemöglichkeiten, die insbesondere das mediane Überleben bei Patienten in fortgeschrittenen Stadien, deutlich verbesserten. Bei der Monotherapie mit dem BRAF-Inhibitor Vemurafenib, ließ sich zum Beispiel eine Steigerung des mittleren Überlebens auf bis zu 20 Monate erzielen. Jedoch zeigte sich auch, dass die Melanomzellen, Resistenzen gegenüber dieser und anderen Monotherapien entwickelten, sodass man nun die Kombination verschiedener Signalweg-Inhibitoren anstrebt [6]. Da die Prognose des metastasierten malignen Melanoms trotz allen Fortschritts, immer noch sehr schlecht ist, sind neue Ansätze in der Therapie zu finden. In In-vitro-Studien konnte zum Beispiel eine selektive Zytotoxizität von diätischen Chalkonen, wie Cardamonin, gegenüber Melanomzellen gezeigt werden, die zu einer Erniedrigung der Proliferationsrate und geringer Invasivität führten. Dieser Effekt zeigte sich ausschließlich bei den Melanomzellen, wohingegen gesunde Melanozyten und Fibroblasten keine Funktionseinschränkungen davontrugen. In-vivo-Studien sind abzuwarten, um zu evaluieren, ob die Kombination von diätischen Chalkonen mit gängigen Chemotherapeutika eine Möglichkeit darstellt, die Prognose des Überlebens des malignen Melanoms zu verbessern [11].

2.3 Blauer Nävus

Die blauen Nävi, auch Nävus coeruleus genannt, gehören der Gruppe der dermalen melanozytären Nävi [79]. Histologisch sieht man im dermalen Bindegewebe dendritische Melanozyten, die dort Melanin produzieren [74]. Da diese Melanozyten in der Epidermis und nicht in der Dermis liegen, erscheinen sie bläulich (sog. Tyndall-Effekt/Milchglaseffekt) [103]. Diese blauschwarzen, makulopapulösen, meist etwas knotigen Herde, bestehen meist ab frühesten Kindheit an [79]. Da sie klinisch häufig nicht leicht von einem malignen Melanom zu differenzieren sind, werden sie häufig exzidiert, sodass eine histologische Aufarbeitung Aufschluss über die Dignität dieser Läsion bringen kann [77]. Es besteht jedoch in der Regel kein Therapiebedarf, da es nur in den seltensten Fällen zu einer malignen Entartung auf dem Boden eines blauen Nävus kommt [79].

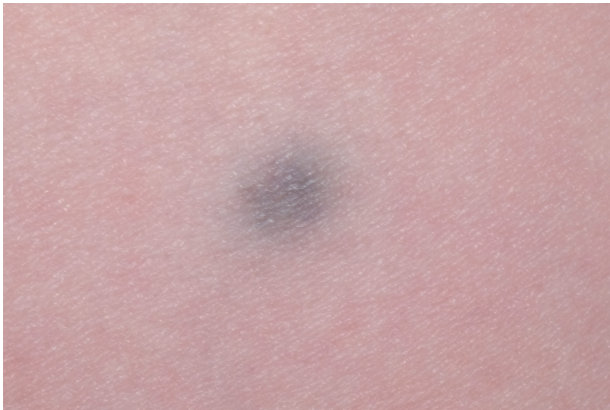


Abb. 2 Blauer Nävus, aus der Befunddatenbank der Universitätsklinik

2.4 Spitznävus

Der Spitznävus, nach seiner Erstbeschreiberin Sophie Spitz benannt, ist eine gutartige Hautveränderung die sich meist bei Kindern und Jugendlichen zeigt [74]. Spitz charakterisierte erstmals histopathologische Eigenschaften wie beispielsweise Hyperkeratose und fleckförmige Parakeratose, der bis dahin nur als juveniles Melanom bekannten Hautläsionen und differenzierte diese von malignen Melanomen. Dies zeigte sie ebenfalls in einer klinischen Studie, in welcher sie den benignen klinischen Verlauf der Hautläsionen beschrieb [93].

Es handelt sich um einen papulös-pigmentierten Nävus [79]. Unter dem Mikroskop prägen meist senkrecht zur Oberfläche stehende Nester aus epitheloiden oder spindeligen Melanozyten das Bild [103]. Eine Metaanalyse bestehend aus insgesamt 15 Studien zu dermatoskopischen Eigenschaften eines Spitznävus, zeigte das sog. Starburst-Muster als dominierendes Merkmal, bei ansonsten sehr vielfältigen Beschreibungen des Phänotyps [60]. Da die sich die Spitznävi durch initial schnelles Wachstum auszeichnen, wird auch hier oft zunächst ein Melanom diagnostiziert. Im Gegensatz zu diesem stagniert das Wachstum des Spitznävus und es kommt in einigen Fällen sogar zu einer

Involution des Nävus [60].

Da histologisch, dermatoskopisch und klinisch eine Differenzierung zu einem spitzoiden malignen Melanom oftmals schwierig ist, hat die International Dermoscopy Society 2016 neue Empfehlungen formuliert und einen Behandlungsleitfaden entwickelt, der nicht nur die Eigenschaften der Läsion, sondern auch das Alter des Patienten mit einschließt. So werden bei symmetrischen spitzoiden Läsionen bei Patienten unter 12 Jahren regelmäßige Kontrollen empfohlen, wohingegen man bei Patienten über 12 Jahren die Exzision des Befundes klar favorisiert, da die Wahrscheinlichkeit eines malignen Befundes steigt [60, 61].

Neuere Studien befassen sich mit Möglichkeiten, wie eine sicherere Differenzierung möglich gemacht werden kann. Hierbei zeigten sich in einer Studie aus mehreren deutschen Kliniken, dass die p16-Expression oder BRAF-Analyse, sich in den Läsionen deutlich voneinander unterscheidet, sodass dies ein Ansatz sein könnte, eine sichere Diagnosestellung zu ermöglichen [81].

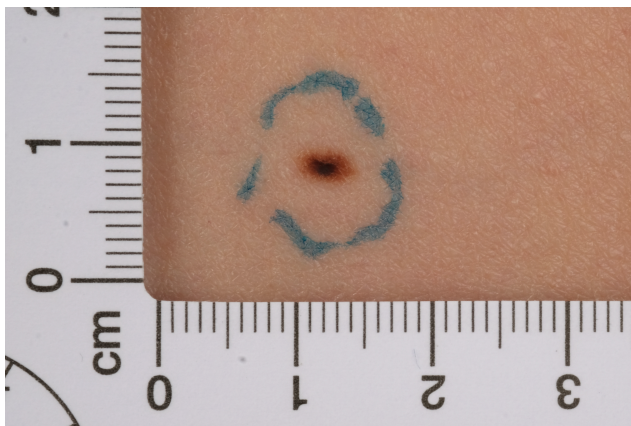


Abb. 3 Spitznävus, aus der Befunddatenbank der Universitätsklinik

2.5 Kongenitaler Nävus

Der kongenitale Nävus gehört der Familie der Nävuszellnävi an und ist wie der Name schon verrät angeboren. Sie bilden sich aus Nävuszellen, die in enger Verwandtschaft zu Melanozyten stehen und meist in Nestern vorkommen. Nach dem Ort der Nester in der Haut, werden die Nävuszellnävi eingeteilt in Junctionsnävi, Compound-Nävi und dermale Nävi. Während bei Junctionsnävi die Nester noch zwischen Epidermis und Dermis liegen, verschieben sich die Nester bei Compound-Nävi schon in Richtung Epidermis und die Nester der dermalen Nävi findet man tief in der Dermis. Die Nävuszellnävi entwickeln sich meist während der Pubertät und sind bei Geburt noch nicht sichtbar. Sie können sich während eines Lebens umwandeln und vollständig zurückbilden.

Da sich diese Nävi auch in dysplastische Nävi umwandeln können, welche eine Melanomvorstufe darstellen, bedarf es regelmäßiger Kontrollen (alle 6 - 12 Monate) und gegebenenfalls eine Exzision des Befundes [74].

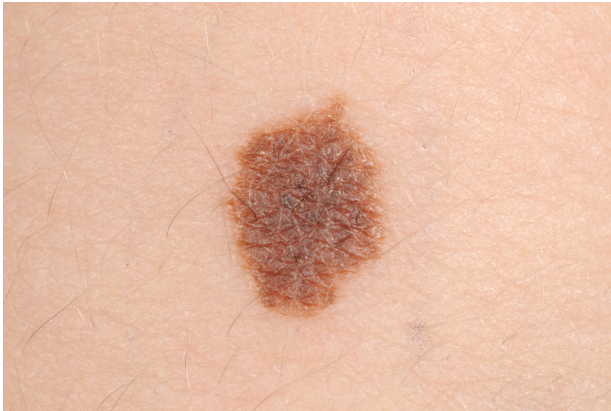


Abb. 4 Kongenitaler Nävus, aus der Befunddatenbank der Universitätsklinik

3. Material/Methoden

3.1 Material und Herstellernachweis

3.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Abimed, Düsseldorf	Gilson-Pipetten
B. Braun, Melsungen	Aqua dest.
Carl Zeiss AG, Oberkochen	Durchlichtmikroskop
Carl Schleicher & Schüll Dassel/KR Einbeck	Faltenfilter Selecta
Ceesem	Objekträgertafeln
Dako Denmark A/S, Produktionsvej 42 DK-2600 Glostrup, Dänemark	Dako REAL™ Detectionssystem (K5005) Alkaline Phosphatase/RED Rabbit/Mouse
Ebro TTX100 type T	Thermometer
IBS, Integra Biosciences, Biebertal	Pipetboy acu
IKA, Staufen	Magnetrührer Combimag RCT
Kartell (made in Italy)	Küvetten (Plastik)
MMM, Medcenter Einrichtungen GmbH, Planegg	Wärmeschrank
Merck, Darmstadt	Entellan, Art. 1.07961.0500
Mettler Toledo, Deutschland	Feinwaage 0 - 100 g
Panasonic, Hamburg	Mikrowelle, Dimension 4
R. Langenbrick, Emmendingen	Deckgläser Objekträger (76 x 26 mm)
Sarstedt, Nürnberg	Reaktionsgefäße (1,5 ml) Serological Pipette Glaspipettenspitzen für Pipetboy acu (5 ml, 10 ml, 2 5ml) Pipettenspitzen (10 - 100µg, 100 – 1000 µl) Ampulle 50 ml
Schleicher und Schüll, Dassel	Filterpapier, DE81
Scientific Industries, Bohemie N.Y., USA	Vortex-Mixer (Genie2™)
SHIELD Scientific Europazentrale, Bennekom, Niederlande	SHIELDskin CHEM™, Neo Nitrile™ 300 Handschuhe, AQL 0,65 G1, Virus Resistant, Micro-Organism Resistant

Sorenson Bioscience	Pipettenspitzen (0,1 - 2µg)
Tefal S.A.S., Rumilly, Frankreich	RK1101 Reiskocher
Thermo Electron Corporation, Waltham, Massachusetts	Heraeus Wärmeschrank
VWR International GmbH, Darmstadt	Ergonomic High-Performance Pipetten (0,1 - 2µg, 10 – 100 µg, 100 – 1000 µg)
Wertheim → Google	Küvetten (Glas)
WTW, Weilheim	pH-Meter, pH 197

3.1.2 Benötigte Puffer

Lösungen und Puffer	Zusammensetzung
Stock A	0,1M Citronensäure = 21,01 g/mol in aqua dest 10,5 g pro 500 ml
Stock B	0,1M Tri-Natriumcitrat-Dihydrat = 29,41 g/mol in aqua dest 14,7 g pro 500 ml
Citratpuffer pH 6,0 (10mM)	4,5 ml Stock A + 20,5 ml Stock B + 225 ml aqua dest pH 6,0 einstellen
Blockierlösung (3% BSA in PBS (w/v); pH 7,2)	50 ml PBS + 1,5 g BSA pH 7,2 einstellen
Antikörperlösung (1% BSA in PBS; pH 7,2)	15 ml 3 % PBS + 30 ml PBS pH 7,2 einstellen
Primär-AK in Antikörperlösung (1:800)	Pro OT jeweils 300 µl (12OT) 3600 µl BSA 1 % + 4,5 µl Primär-AK
AP-Puffer	10 ml AP-Substrat Puffer + 1 Tropfen Levamisol
Substrat-Chromogen-Lösung	750 µl AP-Puffer + 30 µl Chromogen1 + 30 µl Chromogen2 + 30 µl Chromogen3

3.1.3 Chemikalien

Ampuwa R Spüllösung 1000 ml Plastipur R	Fresenius Kabo Deutschland, Bad Homburg
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma Aldrich, Art.A9418
Citronensäure	Merck244
Detektionssystem, Dako REAL (K5005)	
Biotinylierter Sekundäantikörper (Flasche A)	
Streptavidin-Alkalische Phosphatase	
Chromogen 1, 2, 3	
Levamisol	
AP-Substrat-Puffer	
Ethanol, 100 %	Merck, Art. 8187601000
Hämatoxylin ohne Alkohol	Sigma Aldrich, Art MHS32-1L
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat, Merck 6448	Merck 6448
PBS, pH 7,2- 7,4 10 l	Thermo Fisher Scientific
Xylol	Otto Fischar GmbH & Co. KG, PZN 09208831

3.1.4 Verwendeter Antikörper

Antikörper	Beschreibung	Herkunft	Verdünnung
Anti Sec62 (Primäantikörper)	Polyklonaler Peptidantikörper	Kaninchenserum, Universität des Saarlandes	1:1000

3.2 Fixierung des Gewebes

Die von mir, dem dermatologischen Archiv der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie entnommenen Paraffinblöcke, wurden mit freundlicher Unterstützung von denen im Labor der Hautklinik tätigen Mitarbeitern auf den Objektträgern fixiert. Hierbei wurden jeweils zwei Schnitte desselben Präparats auf einem Objektträger fixiert, um bei der immunhistologischen Färbung eine Negativprobe zu haben.

3.3 Versuchsablauf

3.3.1 Immunhistologische Färbung von Sec62 an FFPE-Gewebeschnitten

Es wurde ein Protokoll von Dr. rer. nat. Florian Bochen (Forschungslabor der HNO-Klinik, Universität des Saarlandes) benutzt. Dieses war bereits vor dem Beginn meiner Versuchsreihe an meine Präparate angepasst, weshalb keine Etablierung des Versuchsprotokolls meinerseits stattgefunden hat.

Die Färbung wurde an 4 µm dicken Gewebsschnitten, fixiert auf einem Superfrost Ultra Plus Objektträger, durchgeführt. Die in Paraffin eingebetteten Präparate, stammen aus dem Archiv der Dermatologie, Universitätsklinik des Saarlandes, aus dem Zeitraum 06.01.2006 bis 21.03.2016.

Auf jedem Objektträger befanden sich zwei Schnitte desselben Präparates. Jeweils einer dieser Gewebsschnitte wurde mit dem Sec62-Antikörper und der andere ohne Sec62-Antikörper gefärbt, um jeweils eine Negativ- und Positivprobe für jeden Färbedurchgang zu erhalten.

Pro Färbedurchgang wurde zusätzlich ein Gewebsschnitt der Tonsille einer Ratte, als Positivprobe, angefärbt.

Um die bestmögliche Fixation der Gewebsschnitte auf dem Objektträger zu erreichen, lagerten diese vor jedem Färbedurchgang für 24 Stunden in einem 37° Celsius warmen Wärmeschrank.

Zu Beginn jedes Färbedurchgangs wurde das Dako REAL Detektionssystem (K5005) dem Kühltank entnommen, sodass sich dieses, bis zum Gebrauch, auf Raumtemperatur erwärmte. Dieser Vorgang dauerte ca. eine Stunde.

Zum Entparaffinieren der Gewebsschnitte, wurden diese für 10 Minuten in einer mit Xylol gefüllten Glasküvette gewaschen. Zur Vorbereitung auf wässriges Milieu, wurden die Schnitte weitere dreimal in Xylol, dann in 100 %- und anschließend in 70 %-Alkohol geschwenkt.

Anschließend wurden die Schnitte zweimal für jeweils 30 Sekunden in Aqua dest. gewaschen. Zur Herstellung des Retrievalpuffers wurde der frisch angesetzte Citrat-Puffer mit einem pH-Wert von 6, in einer Kunststoffküvette in der Mikrowelle auf $\geq 95^{\circ}\text{C}$ erhitzt. Zur Demaskierung der Gewebsschnitte wurden diese 30 Minuten lang, in der mit Retrievalpuffer gefüllten Küvette, in einem Wasserbad im Reiskocher inkubiert. Hierbei war die Küvette mit einem Deckel zu verschließen, um eine Vermischung mit dem im Reiskocher befindlichen Wassers zu verhindern. Nach 30 Minuten wurde die Kunststoffküvette aus dem Wasserbad entnommen und bei Raumtemperatur auf $\leq 50^{\circ}\text{C}$ abgekühlt. Dies dauerte ca. 30 Minuten.

Nach dreimaligem Waschen der Gewebsschnitten in PBS-Puffer, à 5 Minuten, wurden die Gewebsschnitte in der feuchten Kammer mit 3 % BSA (200 μl pro OT) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren und so die bestmögliche Färbung mit dem Sec62-Antikörper zu erhalten. Nach Abtropfen des PBS-Puffers, folgte nun die 60minütige Inkubation des Primärantikörpers in Antikörperlösung bei Raumtemperatur. Dem Dako REAL Kit entnommene biotinylierte Sekundärantikörper (3 - 4 Tropfen pro OT) wurden, nach erneutem, 15minütigen Waschens in PBS, für 30 Minuten inkubiert. Es folgte ein weiterer Waschvorgang in PBS für 15 Minuten; anschließend wurden jeweils 3 - 4 Tropfen pro OT der Streptavidin-Alkalischen Phosphatase aufgetragen und 30 Minuten in der feuchten Kammer inkubiert.

Ein letzter 15minütiger Waschvorgang in PBS, bereitete die Gewebsschnitte für die Farbreaktion mit der frisch angesetzten Substrat-Chromogen Lösung vor und die Schnitte wurden weitere 10 - 15 Minuten inkubiert. Nach 5minütigem Spülen mit Aqua dest., folgte das Gegenfärben mit Hämatoxylin ohne Alkohol für 7 Minuten. Das Hämatoxylin wurde vor jeder Anwendung filtriert. Anschließend wurden die Gewebsschnitte für 10 Minuten unter fließendem Wasser gewässert. Die Gewebsschnitte wurden erneut in der aufsteigenden Alkoholreihe sowie dreimal in Xylol geschwenkt und abschließend mit Entellan eingedeckt.

3.3.2 Tabellarischer Versuchsablauf

Zeitangabe	Arbeitsschritt
24 h	Wärmeschrank 37°C
10 min	Entparaffinieren in Xylol
3 x 30 sec.	Schwenken in Xylol
3 x 30 sec.	Schwenken in 100 % Alkohol
3 x 30 sec.	Schwenken in 70 % Alkohol
2 x 30 sec.	Schwenken in Aqua dest.
30 min	Demaskierung durch Kochen im Reiskocher
Ca. 30 min	Abkühlen $\leq 50^{\circ}\text{C}$
3 x 5 min	Waschen in PBS
30 min	Blockierung mit 3 % BSA in PBS
1 h	Inkubation des Primärantikörpers
3 x 5 min	Waschen in PBS
30 min	Inkubation Sekundärantikörpers
3 x 5 min	Waschen in PBS
30 min	Inkubation in Streptavidin-Alkalische Phosphatase
3 x 5 min	Waschen in PBS
15 min	Inkubation in Substrat-Chromogen-Lösung
5 min	Spülen in Aqua dest.
7 min	Gegenfärben mit Hämatoxylin
10 min	Fließend wässern
3 x 30 sec	Schwenken in 100 % Alkohol
3 x 30 sec	Schwenken in 70 % Alkohol
3 x 30 sec	Schwenken in Xylol
Eindecken in Entellan	

3.4 Dokumentation und Quellen

Die zur Datenerfassung verwendeten Patientenakten wurden der SAP-Datenbank der Universitätsklinik des Saarlandes entnommen. Das für die Färbung benutzte Patientenmaterial stammt aus dem Archiv der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie des Universitätsklinikum des Saarlandes.

Es handelt sich um eine retrospektive Studie, die Patienten mit Diagnosedaten vom 06.01.2006 bis zum 21.03.2016 umfasst.

Die Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes prüfte und genehmigte diese Studie (Kenn-Nr.152/17)

Die im Folgenden aufgezählten klinischen Parameter wurden der SAP-Datenbank der Universitäts-Hautklinik entnommen und anonymisiert in einer Tabelle zusammengefasst:

- Geschlecht
- Geburtsdatum
- Erstdiagnose
- Lokalisation

Bei der Diagnose „malignes Melanom“ sind folgende weitere Parameter festgelegt worden:

- TNM-Stadium
- Tumordicke nach Breslow
- Clark Level
- Zeitpunkt Progress
- Ulzeration

Für die Überlebensdaten der Patienten mit der Diagnose Melanom, ist zu Teilen das Archiv der Onkologie-Ambulanz der Universitätshautklinik zurückgegriffen worden. Zu anderen Teilen wurden Daten von Traueranzeigen der „Saarbrücker-Zeitung“ (<https://saarbruecker-zeitung.trauer.de>) sowie der Tageszeitung „Die Rheinpfalz“ (<https://trauer.rheinpfalz.de>) ausgewertet.

Konnte kein Überlebensdatum festgestellt werden, ist der letzte Vorstellungstermin des Patienten in der onkologischen Ambulanz des Universitätsklinikum des Saarlandes, als Austrittsdatum in der Studie- und der Patient als „noch lebend“ festgelegt worden.

Haben sich die Patienten im Jahr 2017 nochmals zur Nachsorge vorgestellt, wurde hier der Stichtag 01.01.2017 festgesetzt.

3.5 Analytische Methoden

Die immunhistochemische Färbung wurde mit Hilfe des immunreaktiven Scores nach Remmele und Stegner ausgewertet [80]. Dieser Score wurde ursprünglich zur Quantifizierung von Östrogen- und Progesteronrezeptoren in Mammakarzinomzellen gebildet, ist aber auch auf andere immunhistochemische Färbungen übertragbar. Der Score bildet sich zum einen aus der Färbeintensität und zum anderen aus dem Anteil der positiv angefärbten Tumorzellen. Die Färbeintensität lässt sich von 0 = keine Färbereaktion bis 3 = starke Färbereaktion. Der zweite Faktor bildet sich aus dem relativen Anteil von positiv angefärbten Tumorzellen im Verhältnis zu allen vorhandenen Tumorzellen. Hierbei kann ein Wert von 0 = keine positiven Zellen bis zu 4 = > 80 % positive Zellen erreicht werden.

Diese beiden Werte aus Färbeintensität und Anteil positiver Tumorzellen wird multipliziert. Der maximal zu erreichende Wert ist somit 12.

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen erfolgte unabhängig voneinander, im Hinblick auf den IRS-Score, durch Frau Prof. Dr. med. C. Müller (Fachärztin für Dermatologie, Zusatzbezeichnung Dermathohistologie und Allergologie), Herrn Priv.-Doz. Dr. med. M. Linxweiler, MHBA (Facharzt für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde) und mich. Hieraus wurde der Mittelwert ermittelt und für die nachfolgende statistische Analyse verwendet.

Färbeintensität		Positive Zellen	
0	keine Färbereaktion	0	keine positiven Zellen
1	schwache Reaktion	1	weniger al 10%
2	mäßige Reaktion	2	zwischen 10- und 50%
3	starke Reaktion	3	zwischen 51- und 80%
		4	mehr als 80%

Tab. 6 Tabellarische Darstellung der Auswertung des Immunreaktiven-Scores

Zur besseren Datenanalyse wurden die Werte des IRS-Scores in hoch und niedrig eingeteilt. Hierfür wurde der Mittelwert aller analysierten IRS-Scores errechnet, welcher 7,646 betrug. Anschließend wurden alle Fälle mit einem IRS-Score ≤ 7 , der Gruppe mit „niedrigem“ IRS-Score und alle Fälle mit einem IRS Score von ≥ 8 , der Gruppe mit einem „hohen“ IRS-Score zugeteilt.

3.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung und Datenanalyse wurde mit Hilfe einer Software, Version 24 des Statistik-Programms „SPSS Statistics“ von IBM verwendet. Die Analyse der Überlebensdaten fand unter der Verwendung der Software, Statistik-Programm „GraphPad Prism 7.0“ von GraphPad Software Inc., statt.

Das Institut für medizinische Biometrie, Epidemiologie und medizinische Informatik der Universität des Saarlandes führte die statistische Beratung (Dipl.-Stat. Gudrun Wagenpfeil) durch.

Zur statistischen Auswertung der Datensätze wurde der Kruskal-Wallis- und Mann-Whitney-U-Test verwandt. Ob eine Normalverteilung der Daten vorliegt wurde mit dem Shapiro-Wilk-Test getestet und anschließend bei nicht normalverteilten Daten die Korrelation mit dem Spearman-Test berechnet wurde. Die Analyse der Überlebensdaten fand unter der Verwendung des Mantel-Cox-Tests (log-rank Test) statt. Zu Beginn wurde ein P-Wert von $< 0,05$ als statistisch signifikant festgelegt.

4 Ergebnisse

4.1 Beschreibung des Patientenkollektivs

Insgesamt wurden die Daten von 209 Patienten ausgewertet; davon waren 100 weiblich und 109 Personen männlich. Folgende Diagnosen wurden in die Statistik aufgenommen:

- Malignes Melanom (93)
- Melanomfilia (28)
- Spitznävus (29)
- blauer Nävus (21)
- kongenitaler Nävus (38)

Das Durchschnittsalter aller Patienten, bei Diagnose der unterschiedlichen Läsionen, betrug bei Frauen 47,7 Jahre und bei Männern 56 Jahre.

Die männlichen Melanompatienten waren bei Erstdiagnose im Schnitt 64,1 Jahre alt; die weiblichen Patienten durchschnittlich 64,5 Jahre alt.

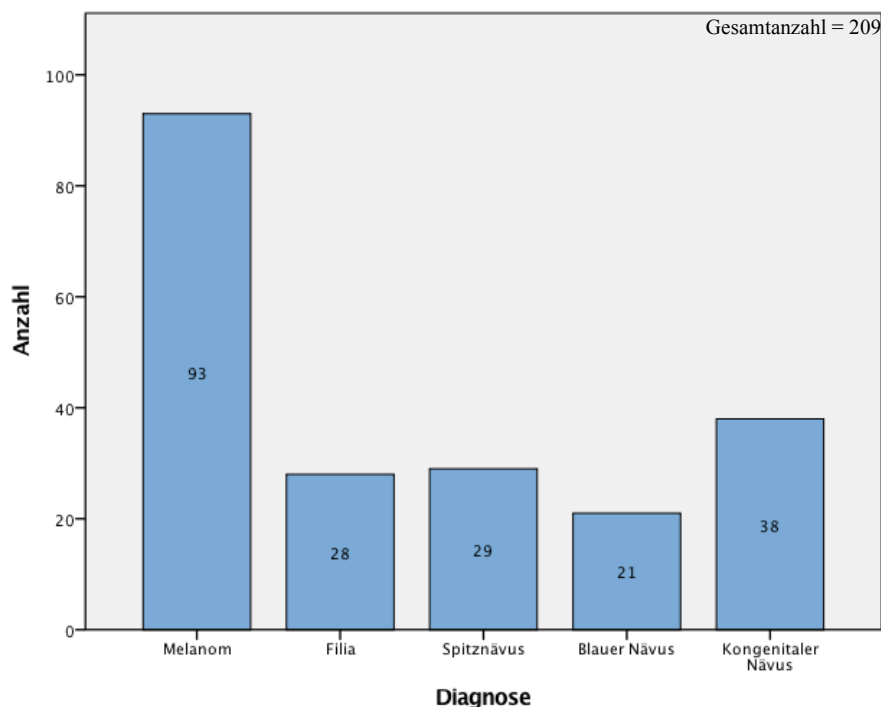


Abb. 5 Graphische Darstellung der Häufigkeit aller untersuchten Diagnosen, mit Hilfe eines Säulendiagramms. Es wurden Präparate von 93 Melanom-, 28 Filia-, 29 Spitz-, 21 blaue - und 38 kongenitaler Nävi untersucht.

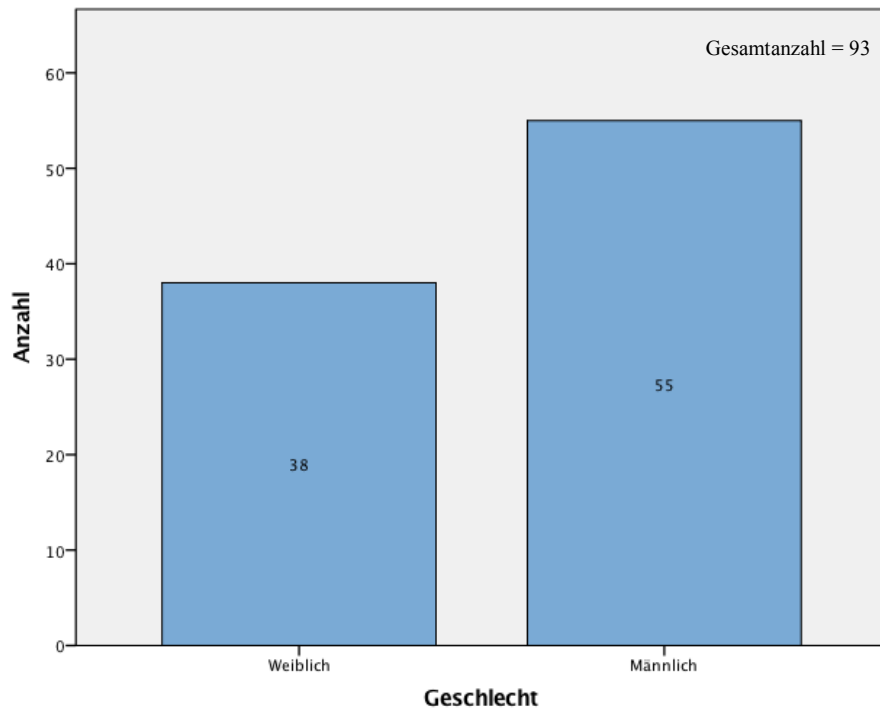


Abb. 6 Graphische Darstellung der Melanome hinsichtlich ihrer Verteilung bei Männern und Frauen, dargestellt anhand eines Säulendiagramms. Die analysierte Gruppe setzt sich aus diagnostizierten Melanomen (93) zusammen. Von diesen sind 38 Patienten weiblich und 55 Patienten männlich

Die Tumorstadien der Melanome reichen von pT1a bis pT4b. Von den 93 Melanom-Patienten erhielten, 19 Patienten die Diagnose eines Melanoms im Stadium T1, 23 Patienten die eines T2-, 28 Patienten die eines T3- und 23 Patienten die eines T4-Tumors.

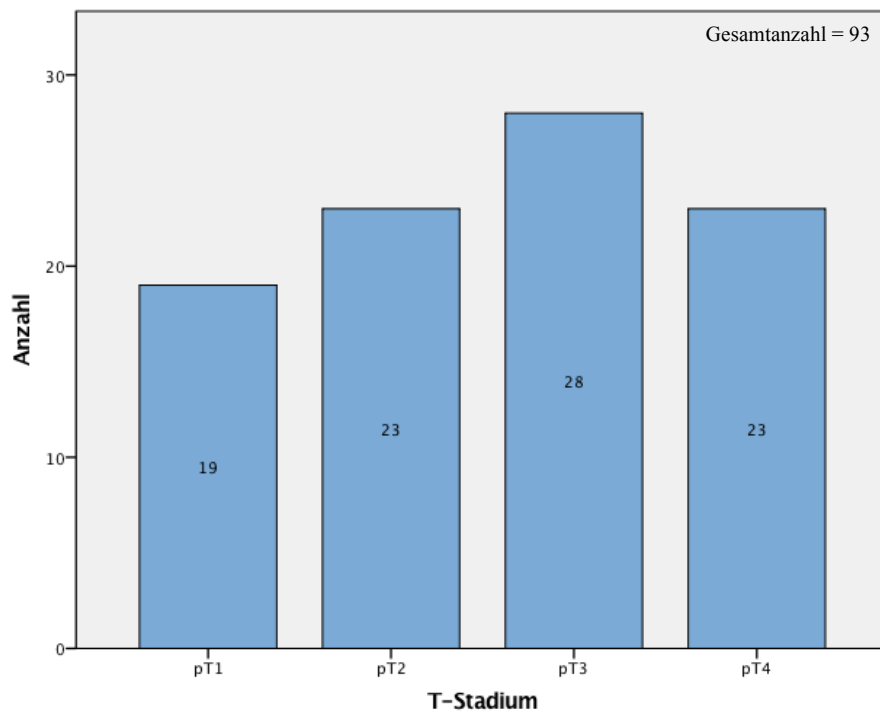


Abb. 7 Graphische Darstellung der Häufigkeiten der verschiedenen Tumorstadien, der untersuchten Melanome, dargestellt anhand eines Säulendiagramms. Es wurden sich 19 pT1-, 23 pT2-, 28 pT3- und 23 pT4-Tumore diagnostiziert.

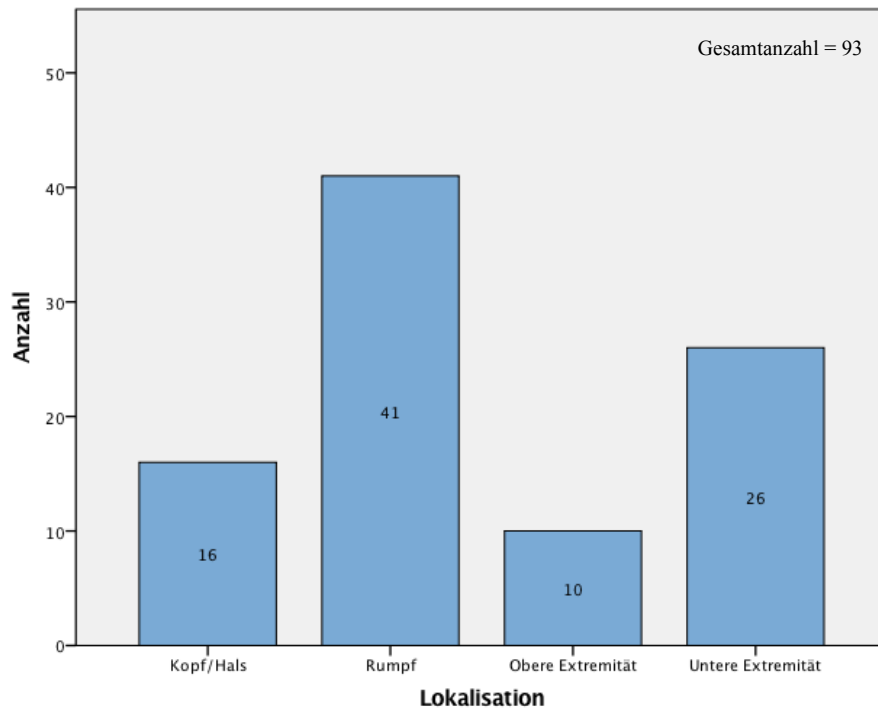


Abb. 8 Graphische Darstellung der Häufigkeiten von Melanomen hinsichtlich ihrer Lokalisation am Körper, dargestellt im Säulendiagramm. Von 93 Melanomen befanden sich in absteigender Reihenfolge 41 im Rumpfbereich, 26 an der unteren Extremität, 16 am Kopf-Hals-Bereich und 10 an der oberen Extremität.

Die Melanome die für diese Arbeit untersucht wurden, befanden sich bei 41 Patienten im Bereich des Rumpfs, bei 26 Patienten an der unteren Extremität, bei 16 Patienten am Kopf-Hals-Bereich und bei 10 Patienten an der oberen Extremität.

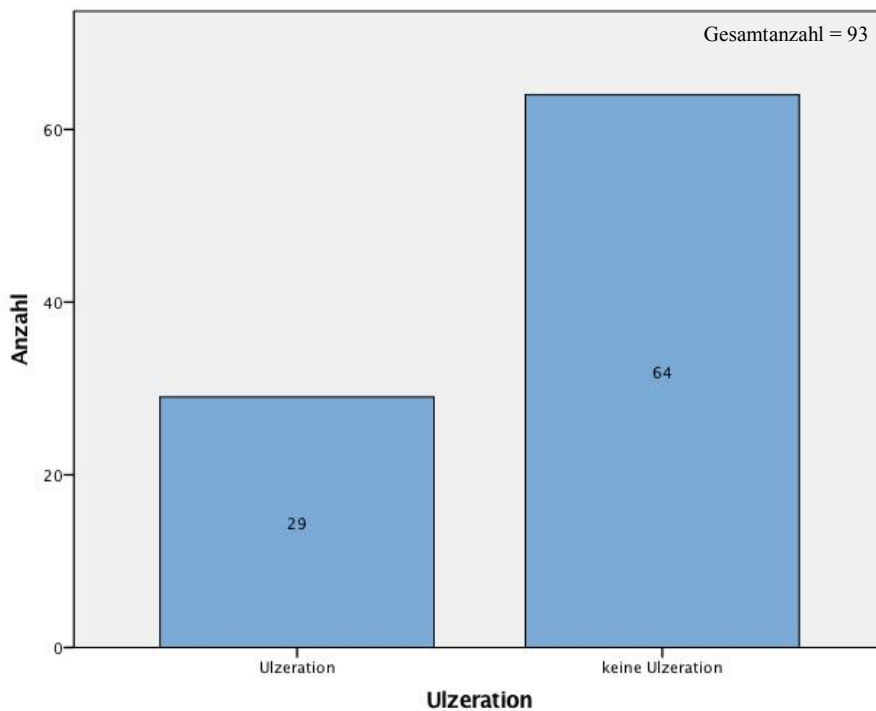


Abb. 9 Graphische Darstellung der Häufigkeiten von Melanomen mit und ohne Ulzerationen, dargestellt an einem Säulendiagramm. Von 121 Melanomen wiesen 37 eine Ulzeration und 82 keine Ulzeration bei Diagnose auf.

Bei 29 der insgesamt 93 Melanompatienten konnte eine Ulzeration nachgewiesen werden; die

restlichen 64 Melanome wiesen keine Ulzeration auf. Bei zwei weiteren Melanomen wurde keine Angabe zu diesem Status gemacht.

Die durchschnittliche Tumordicke nach Breslow (in mm) ist zur Veranschaulichung in der nachfolgenden Tabelle (Tab. 1) zu sehen.

Tumordicke nach Breslow in mm

T-Stadium	Mittelwert (mm)	n
pT1	0,68	19
pT2	1,85	23
pT3	2,80	26
pT4	7,11	22
Insgesamt	3,16	90

Tab. 7 Tabellarische Darstellung durchschnittlichen Tumordicke der Melanome in ihren jeweiligen Stadien. Die Mittelwerte wurden auf 2 Nachkommastellen gerundet. Die pT1-Tumore wiesen eine mittlere Tumordicke von 0,68 mm, pT2-Tumore von 1,85 mm, pT3 von 2,8 mm -und pT4 Tumore von durchschnittlich 7,11 mm auf. In drei Histologiebefunden wurden keine Angaben zu der Tumordicke nach Breslow gemacht.

4.2 T-Stadium/ Sec62

In der nachfolgenden Abbildung wird sich mit der Frage beschäftigt, ob es einen Zusammenhang zwischen dem T-Stadium des Tumors und der Höhe der Sec62-Expression besteht. Die Höhe der Sec62-Expression wird anhand des IRS-Sec62-Scores quantifiziert.

Die pT1-Tumore haben einen Median von 5, ein Minimum von 1,5 und ein Maximum von 10,5. Betrachtet man die pT2-Melanome, sieht man Median von 7,2, ein Minimum von 1,5 und ein Maximum von 12,0. Bei pT3-Tumoren kann man einen Median von 8,8, ein Minimum von 2,0 und ein Maximum 12,0 ablesen. Bei den T4-Melanomen findet man einen Median von 11, ein Minimum von 6,0 und ein Maximum von 12,0.

Die metrischen Daten wurden mit Hilfe des Shapiro-Wilk-Tests auf Normalverteilung geprüft. Diese liegt nicht vor, weshalb die folgenden Daten mit dem Kruskal-Wallis-Test für quantitative Merkmale beliebiger Verteilung ausgewertet wurden. Hier lässt sich ein hochsignifikanter Unterschied ($p = 0,000$) zwischen den einzelnen Tumorstadien und der Höhe des IRS-Sec62-Scores nachweisen. Somit wird die Nullhypothese, dass bei allen T-Stadien identische IRS-Sec62-Scores vorliegen, abgelehnt.

Die paarweisen Vergleiche wurden mit der Bonferroni-Korrektur für mehrere Tests angepasst. Betrachtet man die einzelnen T-Stadien untereinander, so findet man einen hochsignifikanten Unterschied zwischen pT1 und pT4-Tumoren ($p = 0,000$) und in absteigender Reihenfolge signifikanten Unterschied zwischen pT2 und pT4- ($p = 0,002$) und pT1 und pT3-Tumore ($p = 0,049$). Zwischen den T-Stadien pT1 und pT2 ($p = 1,000$), pT2-pT3 ($p = 0,993$) und pT3 und pT4 ($p = 0,098$) besteht kein signifikanter Unterschied.

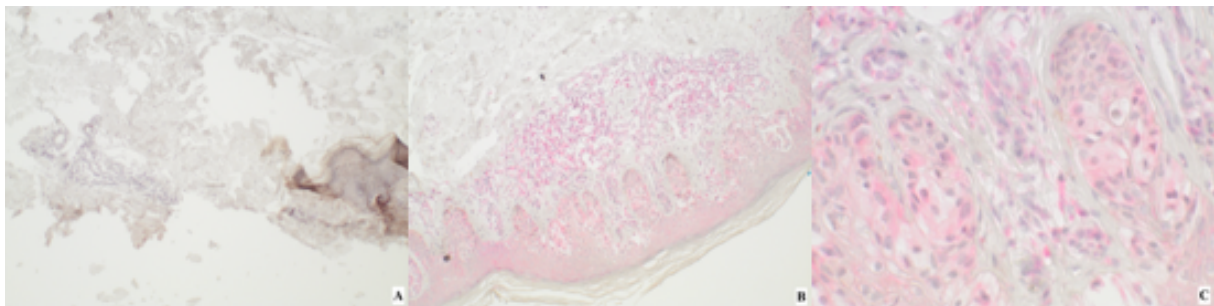


Abb. 10 Malignes Melanom pT1-Stadium; A: ohne AK, 10-fache Vergrößerung; B: mit Sec62-AK, 10-fache Vergrößerung; C: mit Sec62-AK, 40-fache Vergrößerung

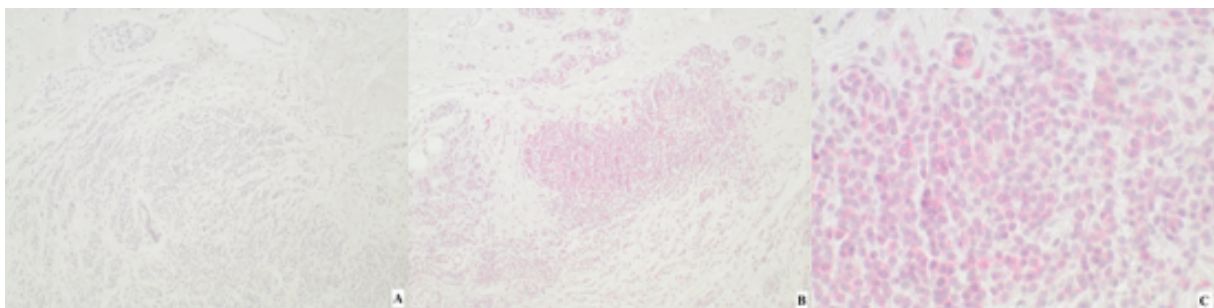


Abb. 11 Malignes Melanom pT2-Stadium; A: ohne AK, 10-fache Vergrößerung; B: mit Sec62-AK, 10-fache Vergrößerung; C: mit Sec62-AK, 40-fache Vergrößerung

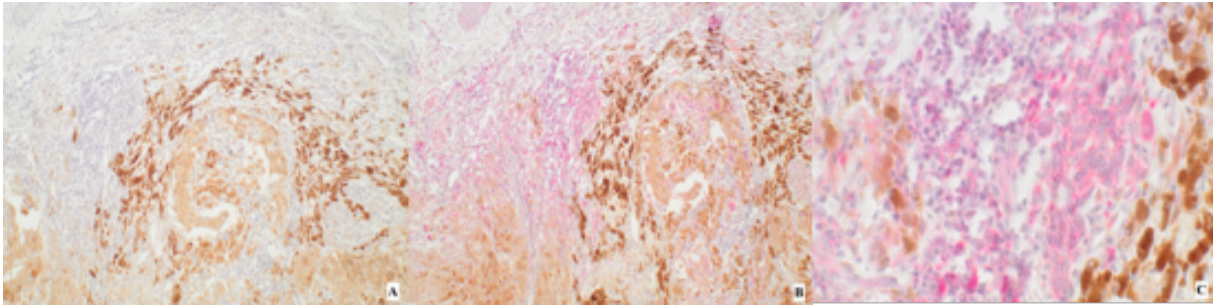


Abb. 12 Malignes Melanom pT3-Stadium; A: ohne AK, 10-fache Vergrößerung; B: mit Sec62-AK, 10-fache Vergrößerung; C: mit Sec62-AK, 40-fache Vergrößerung

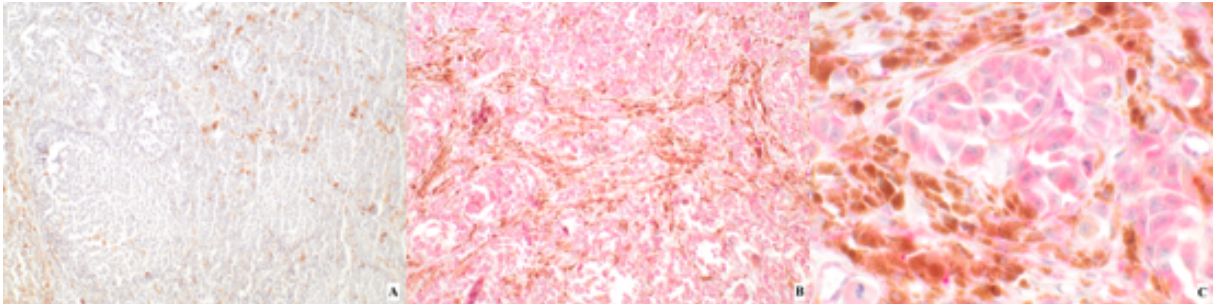


Abb. 13 Malignes Melanom pT4-Stadium; A: ohne AK, 10-fache Vergrößerung; B: mit Sec62-AK, 10-fache Vergrößerung; C: mit Sec62-AK, 40-fache Vergrößerung

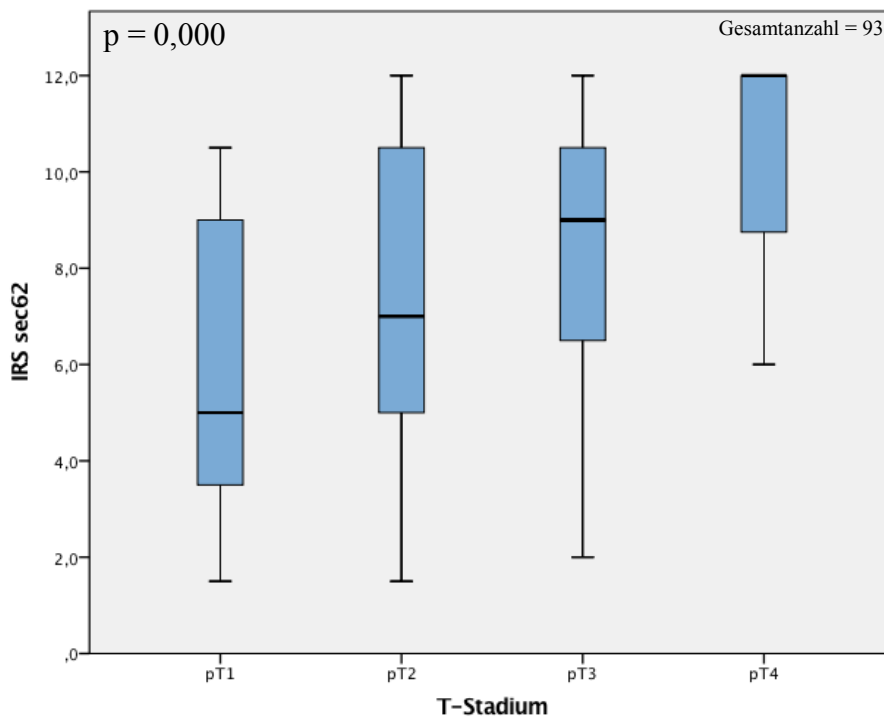


Abb. 14 Statistische Auswertung der Sec62-Expression in Melanomen in ihren verschiedenen Tumorstadien, dargestellt an einem Boxplot. Die Sec62-Expression wird mit Hilfe des IRS-Sec62-Scores quantifiziert. Jede Box stellt den Interquartilsabstand dar. Der Median ist durch eine Linie illustriert. Das 25. bis 75. Quartil der pT1-Tumore umfasst einen Bereich von 3,5 bis 9,0. Bei den pT2-Tumoren werden im entsprechenden Bereich Werte von 5,0 bis 10,5 abgedeckt. Das 25. Quartil bei pT3 Tumoren beginnt bei einem Wert von 6,25 und endet bei am 75. Quartil mit 11,25. Tumore im pT4-Stadium beginnen am 25. Quartil mit 8,625 und enden am 75. Quartil mit einem Wert von 12,0.

4.3 Tumordicke nach Breslow/ Sec62

Im Folgenden wurde geprüft, ob es eine Korrelation zwischen der Tumordicke nach Breslow (mm) und der Höhe des IRS-Sec62-Scores gibt. Bei 90 Melanompräparaten wurden Angaben zur Tumordicke gemacht. Mithilfe des Shapiro-Wilk-Tests wurden die Daten auf Normalverteilung geprüft. Die Daten sind nicht normalverteilt, sodass für die Analyse der Korrelation der Spearman-Test genutzt wurde.

Die Effektstärke wird laut Cohen folgendermaßen interpretiert: 0,1-0,3 (schwach), 0,3-0,5 (mittel) und größer 0,5 (stark). [23]

Bei einem Korrelationskoeffizienten von 0,548 kann man nun von einer stark positiven Effektstärke sprechen, sodass man sagen kann, dass bei steigender Tumordicke auch die Sec62-Expression steigt.

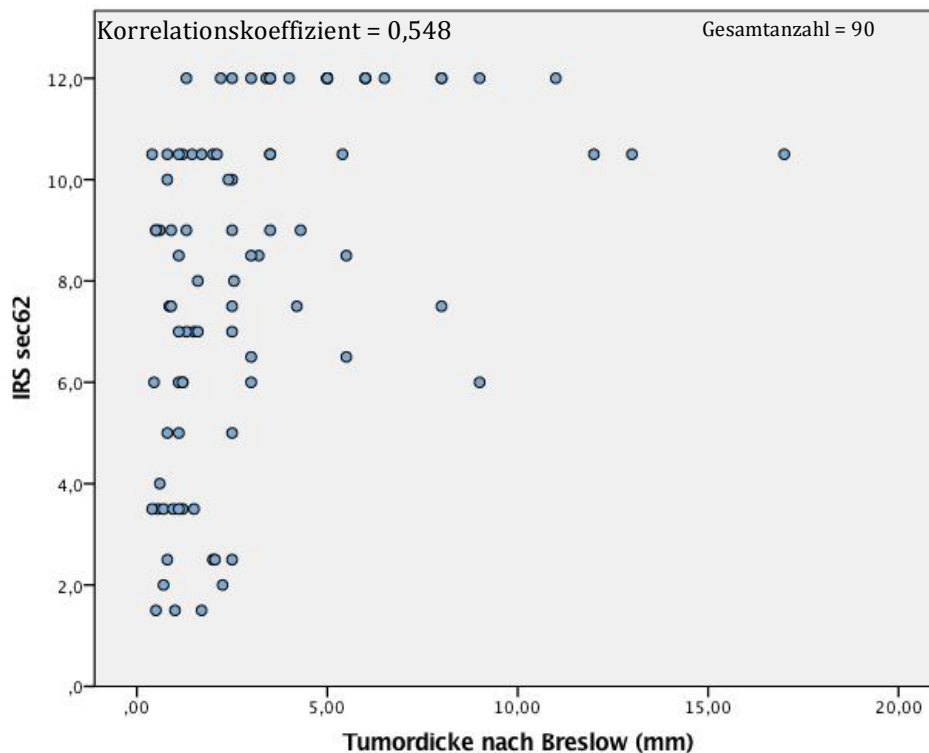


Abb. 15 Statistische Auswertung der Sec62-Expression in Melanomen anhand ihrer Tumordicke nach Breslow, dargestellt an einem Streudiagramm. Die Sec62-Expression wird mit Hilfe des IRS-Sec62-Scores quantifiziert.

4.4 Geschlecht/ Sec62

Im Nachfolgenden wird geprüft, ob es einen Unterschied bezüglich des Geschlechts und der Höhe der Sec62-Expression in Melanomen gibt. Weibliche Patienten weisen einen Median von 8,8, ein Minimum von 1,5 und ein Maximum von 12,0 auf. Bei männlichen Patienten findet sich ebenfalls ein Median von 8,5, ein Minimum von 1,0 und ein Maximum von 12,0.

Der Mann-Whitney-U-Test ($p = 0,709$) besagt, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen Höhe der Sec62-Expression und des Geschlechts der Patienten gibt.

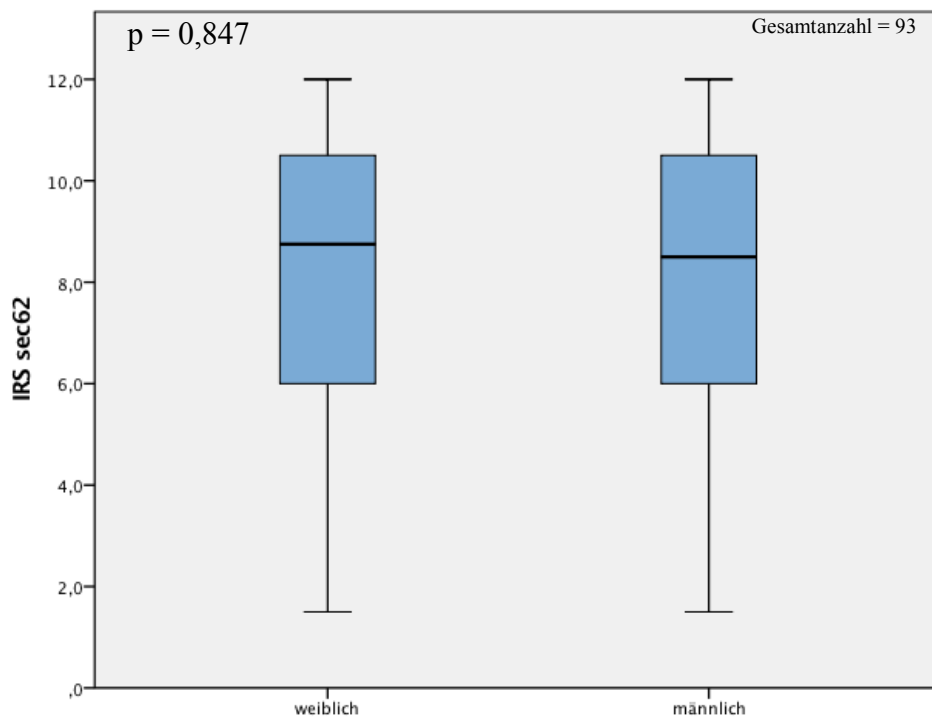


Abb. 16 Statistische Auswertung der Sec62-Expression in Melanomen in Männern und Frauen, dargestellt an einem Boxplot. Die Sec62-Expression wird mit Hilfe des IRS-Sec62-Scores quantifiziert. Jede Box stellt den Interquartilsabstand dar. Der Median ist durch eine Linie illustriert. Die 25. bis 75. Perzentile der weiblichen Patienten umfasst einen Bereich von 5,8 bis 10,5. Der dementsprechende Bereich bei den männlichen Patienten beträgt 6 bis 10,5.

4.5 Ulzerationen/ Sec62

Die nachfolgende Grafik stellt die Antwort auf die Hypothese dar, ob das Vorhandensein von Ulzerationen und die Höhe der Sec62-Expression korrelieren. Von 93 Melanompräparaten wiesen 64 keine- und 24 Ulzerationen auf. Die Präparate von ulzerierten Melanomen zeigten einen Median von 10,5, ein Minimum bei 5 und ein Maximum bei einem Wert von 12. Die Präparate von nicht ulzerierten Melanomen hingegen, hatten einen Median von 7,5, ein Minimum von 1,5 und Maximum von 12.

Der Mann-Whitney-U-Test ($p = 0,001$) zeigt, dass die Höhe des IRS-Sec62-Scores in Melanomen mit Ulzerationen hochsignifikant höher ist, als in Melanomen ohne Ulzeration.

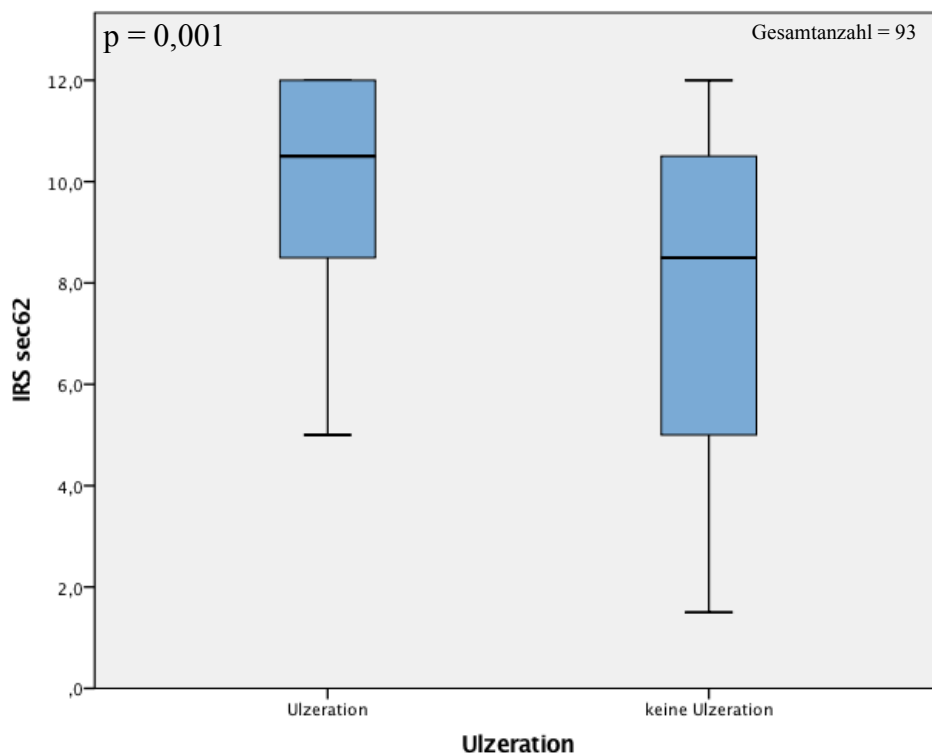


Abb. 17 Statistische Auswertung der Sec62-Expression in Melanomen mit- und ohne Ulzerationen, dargestellt an einem Boxplot. Die Sec62-Expression wird mit Hilfe des IRS-Sec62-Scores quantifiziert. Jede Box stellt den Interquartilsabstand dar. Der Median ist durch eine Linie illustriert. Der Abstand zwischen der 25. Perzentile und der 75. Perzentile bei ulzerierten Melanomen umfasst einen Wertebereich von 8,05 bis 11,76. Der dementsprechende Bereich bei nicht ulzerierten Melanomen reicht von 3,83 bis 10,35.

4.5.1. Ulzeration/ Sec62/ pT1-, pT2-, pT3-, pT4-Tumore

Betrachtet man ausschließlich die pT1-Tumore im Hinblick auf die Höhe der Sec62-Expression und das Vorhandensein von Ulzerationen, gibt es von 19 pT1-Tumoren, zwei Tumore mit Ulzerationen und 17 ohne Ulzeration. Prüft man diese Auswahl auf einen signifikanten Unterschied, so ist laut des Mann-Whitney-U-Tests ($p = 0,421$) die Nullhypothese anzunehmen - es zeigt sich kein signifikanter Unterschied. Die pT1-Tumore mit Ulzerationen haben einen Median von 7,5, ein Minimum von 6,0 und ein Maximum von 9,0. Dahingegen haben pT1-Tumore ohne Ulzerationen einen Median von 4,0, Minimum von 1,5 und ein Maximum von 10,5.

Untersucht man nur pT2-Tumore auf einen Zusammenhang zwischen Sec62-Expression und Ulzerationen, so gibt es drei Melanome mit Ulzerationen und 20 Tumore, die keine Ulzeration aufweisen. Auch hier zeigt sich kein signifikanter Unterschied ($p = 0,635$, Mann-Whitney-U-Test)

Betrachtet man ausschließlich die pT3-Melanom im Hinblick auf ihre Sec62-Expression und Ulzerationen, so gibt es auch hier keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,62$, Mann-Whitney-U-Test). Es wurden 7 pT3-Tumore mit Ulzerationen und 21 ohne Ulzerationen untersucht. Die Melanome mit Ulzerationen wiesen einen Median von 8,5 ein Minimum von 5,0 und ein Maximum von 12,0 auf. Dahingegen hatten die Melanome ohne Ulzerationen einen Median von 9,0 ein Minimum von 2,0 und ein Maximum von 12.

Im Vergleich der pT4-Tumore hinsichtlich ihrer Sec62-Expression und Ulzerationen zeigt sich kein signifikanter Unterschied ($p = 0,708$, Mann-Whitney-U-Test).

Von den untersuchten pT4-Melanomen wiesen 17 Ulzerationen und 6 keine Ulzerationen auf. Die Tumore mit Ulzerationen hatten einen Median von 12,0 ein Minimum von 6,0 und ein Maximum von 12,0. Nicht ulzerierte Melanome zeigten einen Median von 11,25, ein Minimum von 6,5 und ein Maximum von 12.

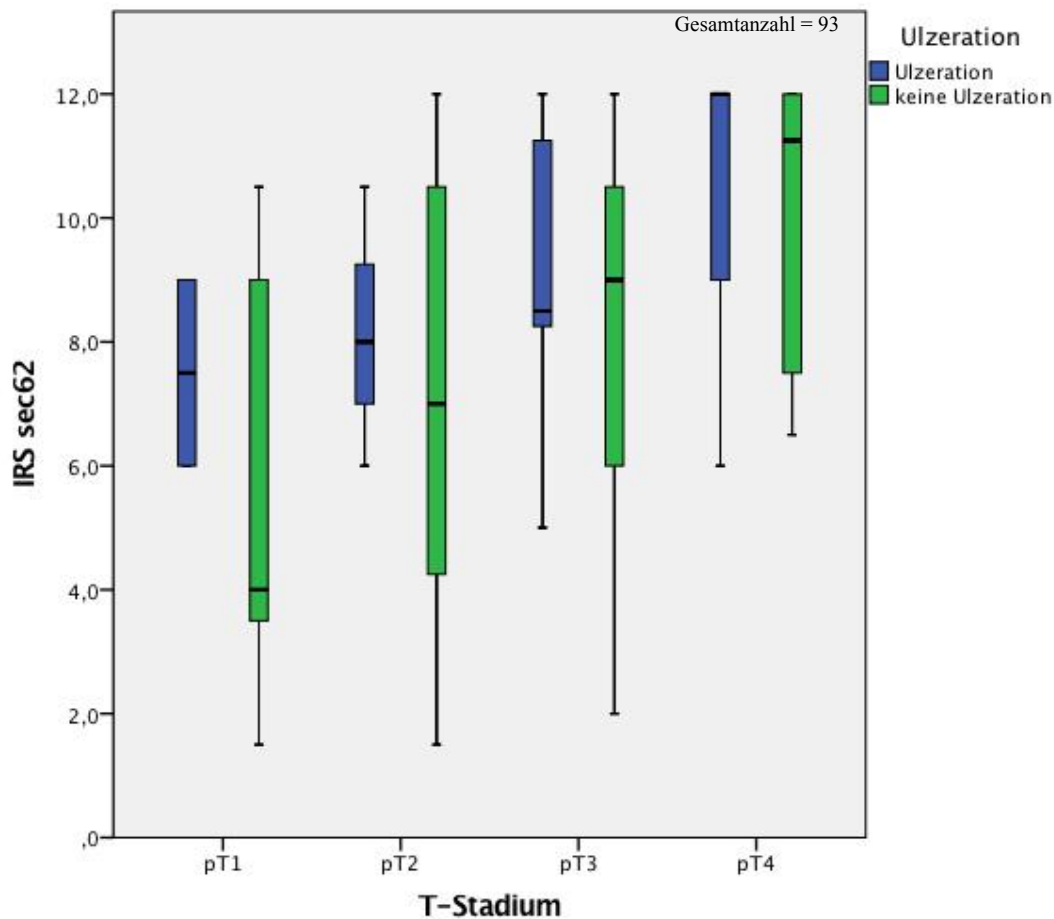


Abb. 18 Statistische Auswertung der Sec62-Expression in Melanomen im pT1-, pT2-, pT3, pT4-Stadium mit- und ohne Ulzerationen, dargestellt an einem Boxplot. Die Sec62-Expression wird mit Hilfe des IRS-Sec62-Scores quantifiziert. Jede Box stellt den Interquartilsabstand dar. Der Median ist durch eine Linie illustriert

pT1: Der Abstand zwischen der 25. Perzentile und der 75. Perzentile bei ulzerierten Melanomen umfasst einen Wertebereich von 8,05 bis 11,76. Der dementsprechende Bereich bei nicht ulzerierten Melanomen reicht von 3,83 bis 10,35.

pT2: Da es sich bei den ulzerierten Melanomen nur um drei Werte handelt, ist eine Beschreibung des 25. und 75. Quartils nicht sinnvoll. Die nicht ulzerierten Tumore decken zwischen dem 25. und 75. Quartil einen Wertebereich von 3,875 bis 10,5 ab.

pT3: Die ulzerierten Melanome decken vom 25. bis zum 75. Quartil den Wertebereich von 8,0 bis 12,0 ab. Bei den nicht ulzerierten Tumoren startet dieser Bereich bei 5,5 und endet bei einem Wert von 11,25.

pT4: Das 25. Quartil beginnt bei ulzerierten Melanomen bei einem Wert von 8,75 und endet am 75. Quartil bei 12. Die nicht ulzerierten Tumore beginnen am 25. Quartil bei einem Wert von 7,25 und enden am 75. Quartil ebenfalls bei einem Wert von 12.

4.6 Sentinellymphknoten/ Sec62

Vergleicht man die Melanome mit positiven (N1) und negativen (N0) Sentinellymphknoten hinsichtlich der Höhe der Sec62-Expression, so gibt es einen signifikanten Unterschied ($p = 0,012$, Mann-Whitney-U-Test). Es zeigt sich, dass man bei Melanomen, mit bereits mit Tumorzellen befallenen Lymphknoten, einen höheren IRS-Sec62-Score zeigen kann, als bei jenen, mit tumorfreien Lymphknoten.

Zur Gruppe der Melanome mit N0-Status gehören 66 Patienten. Das Minimum dieser Melanome liegt bei 1,5, das Maximum bei 12, und der Median hat einen Wert von 7,75.

Der Gruppe mit N1-Status sind insgesamt 27 Patienten zugehörig. Hier liegt das Minimum des IRS-Sec62-Scores bei 5, das Maximum bei 12 und der Median beträgt 9.

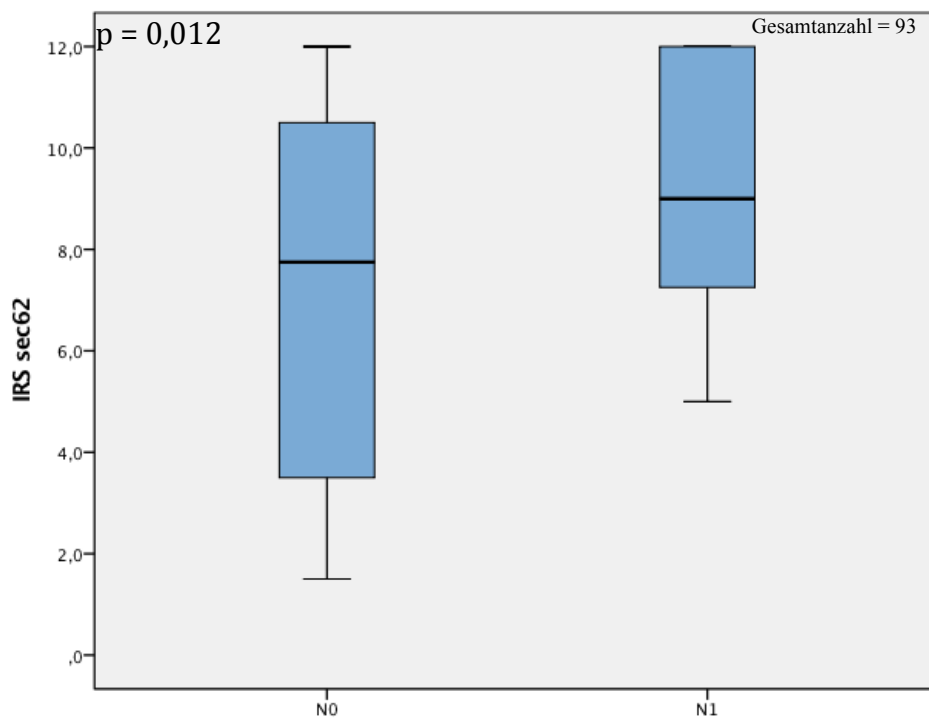


Abb. 19 Statistische Auswertung der Sec62-Expression in Melanomen mit N0- und N1 Status, dargestellt an einem Boxplot. Die Sec62-Expression wird mit Hilfe des IRS-Sec62-Scores quantifiziert. Jede Box stellt den Interquartilsabstand dar. Der Median ist durch eine Linie illustriert. Der Abstand zwischen der 25. Perzentile und der 75. Perzentile bei Melanomen N0-Status umfasst einen Wertebereich von 3,5 bis 10,5. Bei Melanomen mit N1-Status reicht die 25. bis 75. Perzentile von 7 bis 12.

4.6.1 Sentinellymphknoten/ Sec62/ pT1-, pT2-, pT3-, pT4-Tumore

Von den insgesamt 19 pT1-Melanomen hatte lediglich ein Melanom einen positiven Lymphknoten. Bei diesem Melanom wurde ein IRS-Sec62-Score von 9 gemessen. Vergleicht man die beiden Gruppen hinsichtlich ihrer Sec62-Expression, so findet sich kein signifikanter Unterschied ($p = 0,421$, Mann-Whitney-U-Test). Die Melanome mit N0-Status zeigten ein Minimum bei einem Wert von 1,5 das Maximum bei 10,5 und der Median misst 4,5.

Vergleicht man die pT2-Tumore hinsichtlich ihrer Sec62-Expression bei N0- und N1-Status, so zeigt sich auch hier kein signifikanter Unterschied ($p = 0,966$, Mann-Whitney-U-Test). Von insgesamt 23 pT2-Tumoren hatten 20 N0- und 3 N1-Status. Das Minimum der N0-Melanome liegt bei 1,5, das Maximum bei 12, und der Median beträgt 7. Die Melanome mit positiven Lymphknoten zeigen ihr Minimum bei 6, ihr Maximum bei 9, und der Median hat ebenfalls einen Wert von 7.

Auch im Vergleich der pT3-Tumore hinsichtlich ihrer Sec62-Expression und ihres Lymphknotenstatus gibt es keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,962$, Mann-Whitney-U-Test). Von 28 pT3-Tumoren haben 19 N0- und 9 N1-Status. Bei den 19 Melanomen mit tumorfreien Lymphknoten liegt das Minimum des IRS-Sec62-Scores bei 2, das Maximum bei 12 und der Median beträgt 10. Von 9 Melanomen mit positiven Lymphknoten liegt das Minimum bei 5, das Maximum ebenfalls bei 12 und der Median beträgt hier 8,5.

Vergleicht man die pT4-Tumore hinsichtlich ihrer der Sec62-Expression und ihres Lymphknotenbefalls so zeigt sich hier kein signifikanter Unterschied in der Höhe des IRS-Sec62-Scores ($p = 0,926$, Mann-Whitney-U-Test). Von den 23 mit pT4-Tumoren diagnostizierten Patienten, haben 9 Patienten tumorfreie und 14 Patienten tumorpositive Lymphknoten. Die 9 Melanome mit N0-Status zeigen einen minimalen IRS-Sec62-Score von 6,5, einen maximalen Wert von 12, und der Median beträgt hier ebenfalls 12. Die 14 Melanome mit tumorbefallenen Lymphknoten haben ein Minimum von 6, ein Maximum von 12, und auch hier beträgt der Median 12.

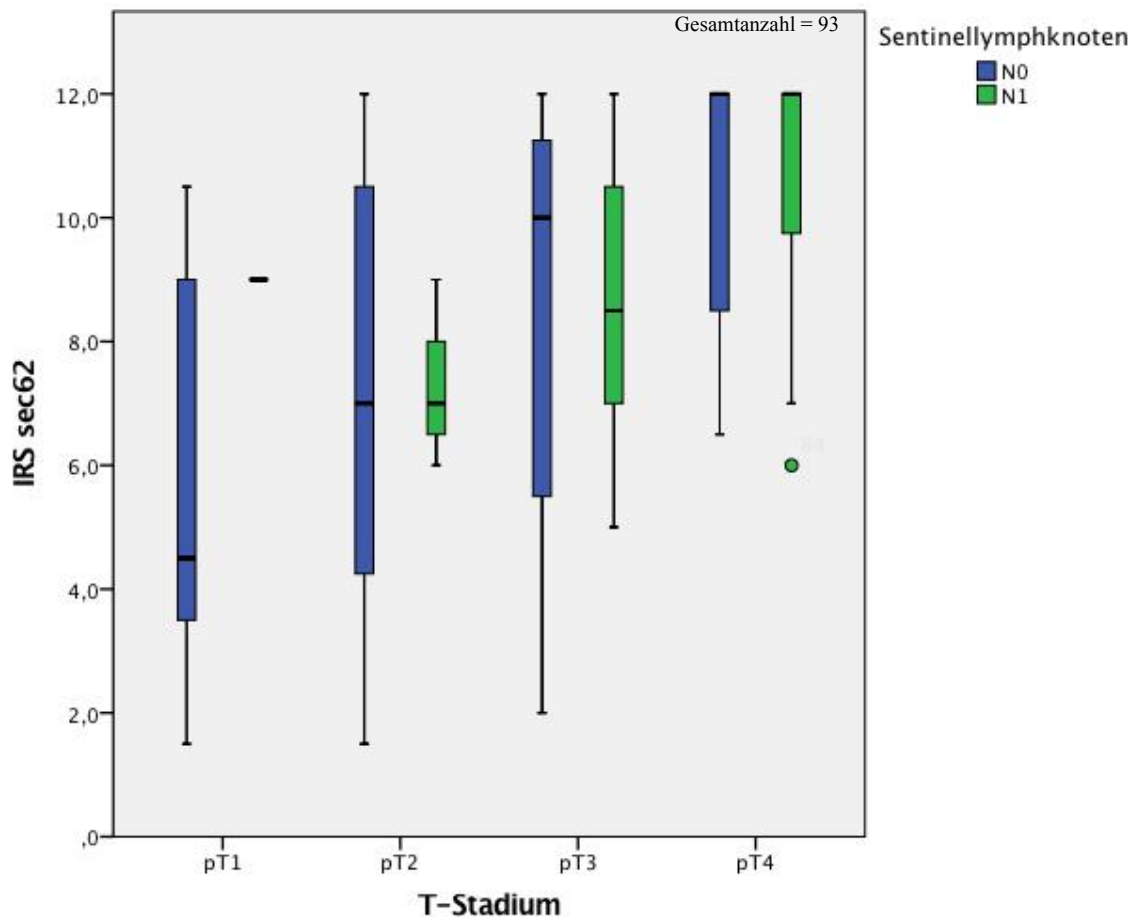


Abb. 20 Statistische Auswertung der Sec62-Expression in pT1-Melanomen mit N0- und N1 Status, an einem Boxplot dargestellt. Die Sec62-Expression wird mit Hilfe des IRS-Sec62-Scores quantifiziert. Jede Box stellt den Interquartilsabstand dar. Der Median ist durch eine Linie illustriert.

pT1: Das 25. Quartil der Tumore ohne positiven Lymphknoten, hat einen Wert von 3,25 und das 75. Quartil von 9.

pT2: Das 25. Quartil der Tumore ohne positive Lymphknoten, hat einen Wert von 3,875 und das 75. Quartil von 10,5. Aufgrund von nur 3 Werten von Tumoren mit N1-Status, ist hier eine Beschreibung des 25. und 75. Quartils nicht sinnvoll.

pT3: Das 25. Quartil der Tumore mit tumorfreien Lymphknoten beginnt bei einem Wert von 5, und das 75. Quartil endet bei einem Wert von 12. Bei den Melanomen mit tumorbefallenen Lymphknoten beginnt der Wertebereich zwischen dem 25. und dem 75. Quartil bei 6,75 und endet bei 11,25.

pT4: Das 25. Quartil der Tumore mit tumorfreien Lymphknoten, beginnt bei einem Wert von 8, und das 75. Quartil endet bei einem Wert von 12. Bei den Melanomen mit tumorpositiven Lymphknoten beginnt der Wertebereich zwischen dem 25. und dem 75. Quartil bei 8,625 und endet ebenso bei 12.

4.7 Metastasen/ Sec62

Von 93 Melanompatienten wiesen 16 Menschen bei Diagnose bereits Metastasen und 77 Patienten keine Metastasen auf. Von den 16 M1-Patienten, hatten 12 Präparaten einen hohen und 4 einen niedrigen IRS-Sec62-Score. Bei den 77 Patienten mit M0-Status wurde bei 40 Patienten ein hoher und bei 37 Präparaten ein niedriger IRS-Sec62-Score gemessen.

Zur Veranschaulichung sind die Zahlen in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt:

		M0	M1	Gesamt
IRS- Sec62	Niedrig	37	4	41
	Hoch	40	12	52
Gesamt		77	16	93

Tab. 8 Tabellarische Darstellung der Sec62-Expression von Melanomen mit M0- und M1-Status, dargestellt anhand einer Kreuztabelle. Die Sec62-Expression wird mit Hilfe des IRS-Sec62-Scores quantifiziert. Anhand des Mittelwertes des IRS-Sec62-Scores aller untersuchten Melanome, wurde die Einteilung in hoch und niedrig erstellt. Hierbei haben die Melanome, die der Hoch-Kategorie zugeordnet sind, einen Wert von > 8 und die Melanome die der Niedrig-Kategorie zugeordnet sind, einen Wert < 7 .

Vergleicht man die Melanome hinsichtlich ihrer Sec62-Expression und das Vorhandensein von Metastasen, so besteht kein signifikanter Unterschied ($p = 0,092$, Mann-Whitney-U-Test). Die Melanome, die bei Diagnose bereits Filia ausgebildet haben, haben einen Median von 9,8, ein Minimum von 2,5 und ein Maximum von 12,0. Dahingegen wiesen die Melanome ohne Metastasen einen Median von 8,0, ein Minimum von 1,5 und ein Maximum von 12,0 auf.

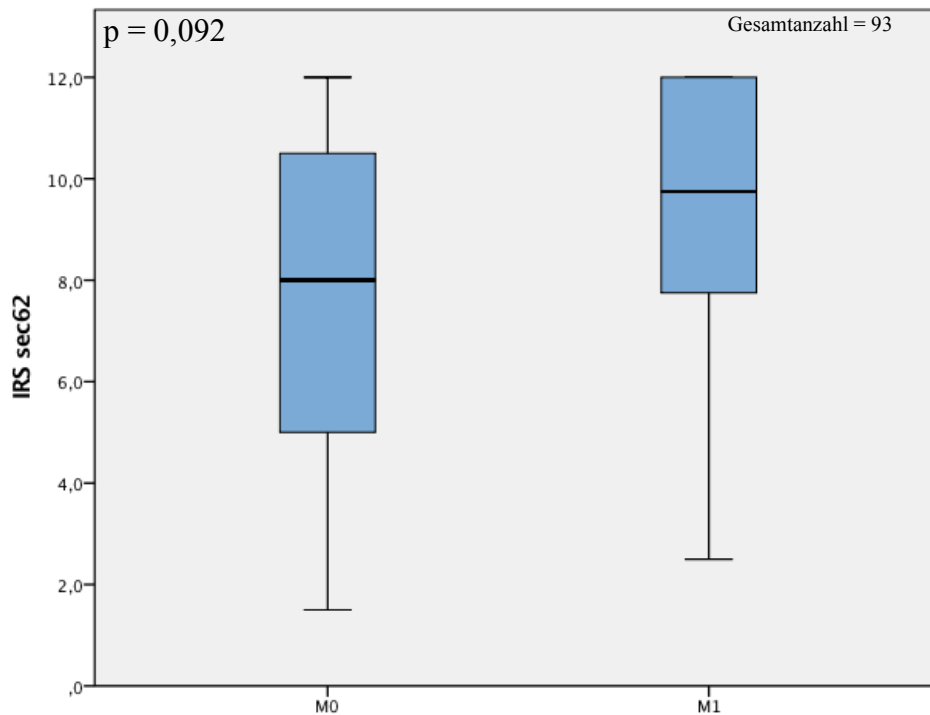


Abb. 21 Statistische Auswertung der Sec62-Expression in Melanomen mit M1- und M0 Status, dargestellt an einem Boxplot. Die Sec62-Expression wird mit Hilfe des IRS-Sec62-Scores quantifiziert. Jede Box stellt den Interquartilsabstand dar. Der Median ist durch eine Linie illustriert. Der Abstand zwischen der 25. Perzentile und der 75. Perzentile bei M0-Status umfasst einen Wertebereich von 5 bis 10,5. Bei M1-Status reicht die 25. bis 75. Perzentile von 7,4 bis 12.

4.7.1 Metastasen/ Sec62/ pT1-, pT2-, pT3-, pT4-Tumore

Von insgesamt 19 Patienten mit pT1-Melanomen, hatten alle den Status M0, so dass es keinen Unterschied in der Höhe der Sec62-Expression gibt. Diese haben ihr Minimum bei einem Wert von 1,5 und ihr Maximum bei 10,5. Der Median der pT1-Tumore beträgt 5.

Von 23 Patienten mit pT2-Tumoren, wiesen zwei bei Diagnose bereits Metastasen auf (M1), wohingegen die restlichen 21 Melanome noch keine Metastasen entwickelt hatten. Vergleicht man diese hinsichtlich eines Unterschieds in der Höhe der Sec62-Expression, so findet sich kein signifikanter Unterschied

($p = 0,569$, Mann-Whitney-U-Test). Die zwei Melanome mit M1-Status haben einen Wert von 2,5 und 9. Die Tumore ohne Metastasen haben ihr Minimum bei 1,5 und ihr Maximum bei 12. Der Median beträgt 7.

Betrachtet man die 29 Patienten mit pT3-Melanome, so haben fünf von diesen bereits Metastasen (M1) bei Diagnosestellung entwickelt, wohingegen die anderen 24 Melanome keine Filiae aufweisen. Auch hier gibt es keinen signifikanten Unterschied in der Höhe der Sec62-Expression ($p = 0,801$, Mann-Whitney-U-Test). Die M1 Tumore haben ihr Minimum bei 5 und ihr Maximum bei 12. Der

zugehörige Median beträgt 8,5. Die Melanome ohne Filiae zeigen ein Minimum von 2, ein Maximum von 12 und einen Median von 9,5.

Von 24 Patienten mit pT4-Tumoren weisen 14 Melanome keine und 10 bereits Filiae bei Diagnosestellung auf. Es gibt keinen signifikanten Unterschied in der Höhe der IRS-Sec62-Scores ($p = 0,796$, Mann-Whitney-U-Test). Der IRS-Sec62-Score hat bei den M0-Melanomen sein Minimum bei 6,5, sein Maximum bei 12 und der Median beträgt ebenfalls 12. Die M1-Melanome zeigen ihr Minimum bei 6 und das Maximum bei 12. Der zugehörige Median ist 11,25.

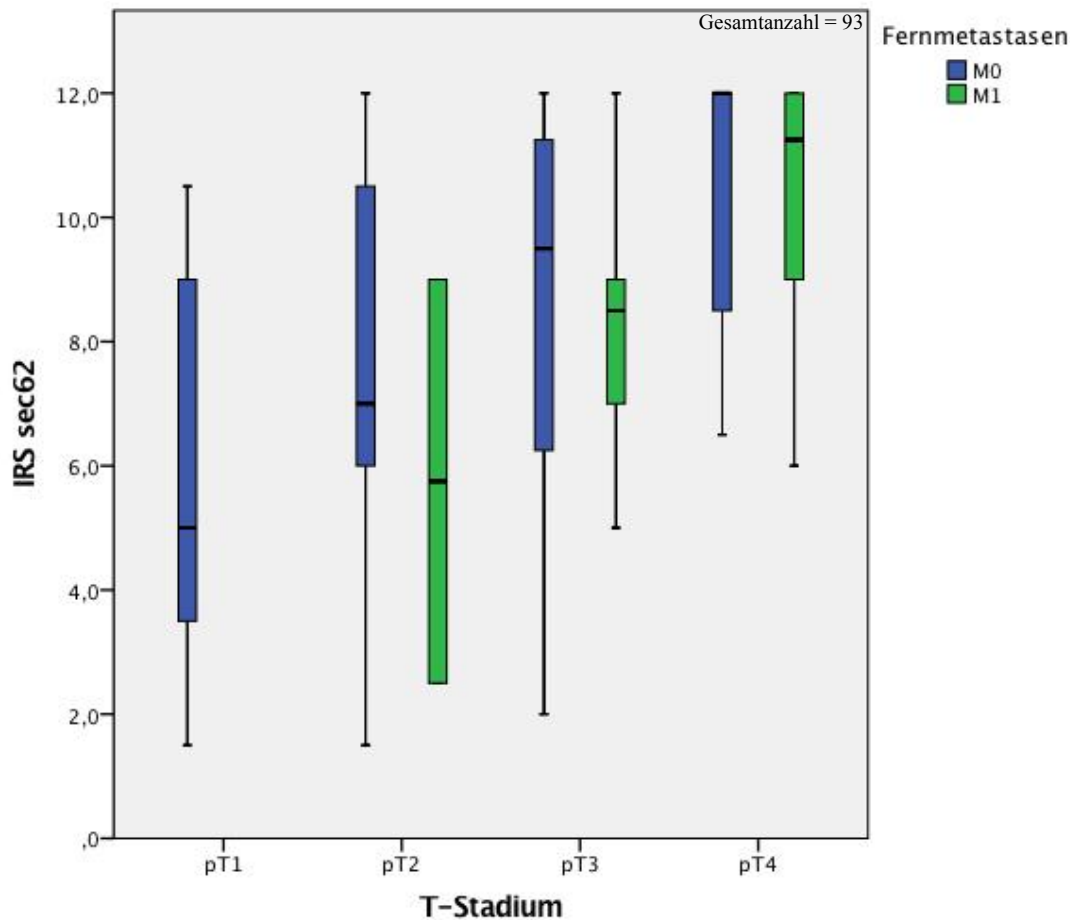


Abb. 22 Statistische Auswertung der Sec62-Expression in pT1-Melanomen, dargestellt an einem Boxplot. Alle 19 pT1-Tumore sind mit M0-Status diagnostiziert worden. Die Sec62-Expression wird mit Hilfe des IRS-Sec62-Scores quantifiziert. Jede Box stellt den Interquartilsabstand dar.

pT1: Der Median ist durch eine Linie illustriert. Das 25. Quartil beginnt bei 3,5 und das 75. Quartil endet bei einem Wert von 9.

pT2: Das 25. Quartil der M0-Tumore beginnt bei 5,5 und endet am 75. Quartil bei einem Wert von 10,5.

pT3: Das 25. Quartil der Tumore ohne Metastasen, hat einen Wert von 6,125 und das 75. Quartil von 11,625. Bei den Melanomen mit Metastasen beginnt der Wertebereich zwischen dem 25. und dem 75. Quartil bei 6 und endet bei 10,5.

pT4: Das 25. Quartil der Melanome ohne Filiae, hat einen Wert von 8,25, und das 75. Quartil zeigt einen Wert von 12. Bei den Tumoren mit Filiae beginnt das 25. Quartil bei 8,5 und endet am 75. Quartil bei einem Wert von 12.

4.8 Clark-Level/ Sec62

Vergleicht man die Melanome im Hinblick auf ihre Sec62-Expression und ihre Einteilung in die Clark Level, so zeigt sich ein signifikanter Unterschied ($p = 0,002$ Kruskal-Wallis-Test). Von 93 untersuchten Melanomen, finden sich bei 2 Präparaten keine Angaben bezüglich des zugehörigen Clark-Levels. Clark-Level 2 konnten 18 Melanome zugeordnet werden, welche ihren minimalsten IRS-Sec62-Score bei 1,5, ihren maximalsten Score bei 12 und der Median hat einen Wert von 5,5. Insgesamt 50 Melanome wiesen ein Clark-Level 3 auf. In dieser Gruppe liegt das Minimum bei 1,5, das Maximum bei 12 und der Median beträgt 7,75. Clark-Level 4 wurde bei 16 Melanomen festgestellt. Hier liegt der minimalste IRS-Sec62-Score bei 2,5, der maximalste Wert bei 12 und der Median misst sich bei einem Wert von 10,5. Nur 7 Melanome konnten dem Clark-Level 5 zugeordnet werden. Das Minimum dieser Melanome beträgt 6, das Maximum 12 und der Median findet sich hier bei einem Wert von 12.

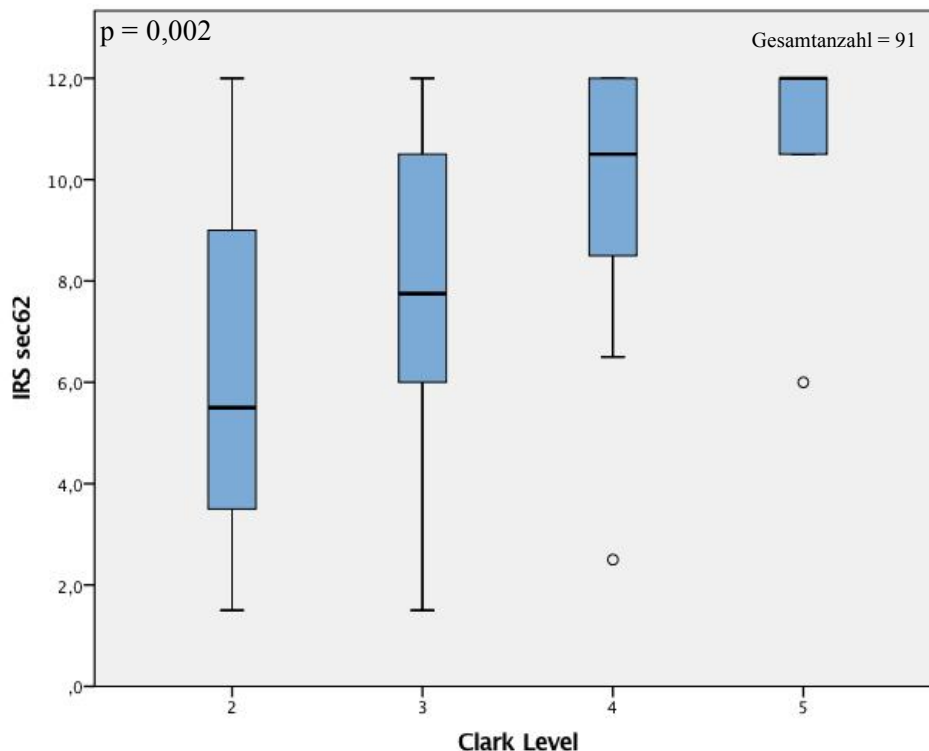


Abb. 23 Statistische Auswertung der Sec62-Expression in Melanomen im Hinblick auf ihre Clark Level Einteilung, dargestellt an einem Boxplot. Die Sec62-Expression wird mithilfe des IRS-Sec62-Scores quantifiziert. Jede Box stellt den Interquartilsabstand dar. Der Median ist durch eine Linie illustriert. Der Abstand zwischen der 25. Perzentile und der 75. Perzentile bei Melanomen mit Clark Level 2 umfasst einen Wertebereich von 3,5 bis 9. Bei Melanomen, die dem Clark Level 3 zugeordnet sind, reicht die 25. bis 75. Perzentile von 6 bis 10,5. Das 25. Quartil der Melanome mit Clark Level 4 beginnt bei einem Wert von 8,5 und endet am 75. Quartil bei 12. Dem Clark Level 5 zugehörigen Melanome decken eine Wertebereich zwischen dem 25. und 75. Quartil von 10,5 bis 12 ab.

4.9 Diagnosen/Sec62

Im Folgenden wird geprüft, ob ein signifikanter Unterschied zwischen der Höhe des IRS-Sec62-Scores und der Art der melanozytären Läsion besteht. In diese Auswertung wurden insgesamt 93 Melanome, 28 Filiae, 29 Spitznävi, 21 blaue Nävi und 38 kongenitale Nävi aufgenommen. Der Kruskal-Wallis-Test bestätigt einen hochsignifikanten Unterschied ($p = 0,000$) zwischen Art der Läsion und Höhe des IRS-Sec62-Scores.

Bei den Melanomen, erstrecken sich die Werte des IRS-Sec62-Scores von einem Minimum von 1,5 bis zum Maximum von 12, der Median beträgt 8,5. Bei den Präparaten mit der Diagnose Filia, wird insgesamt ein Bereich von 4 bis 12 abgedeckt. Hier hat der Median einen Wert von 10,5. Die Werte der Spitznävi beginnen bei einem Minimum von 6, enden bei einem Maximum von 12 und der Median hat einen Wert von 12.

Betrachtet man die Blauen Nävi, so zeigt sich das Minimum bei 1, das Maximum bei 9 und der Median liegt bei 2,0.

Die kongenitalen Nävi decken einen Wertebereich von 1 bis 10,5 ab und der Median beträgt hier 5.

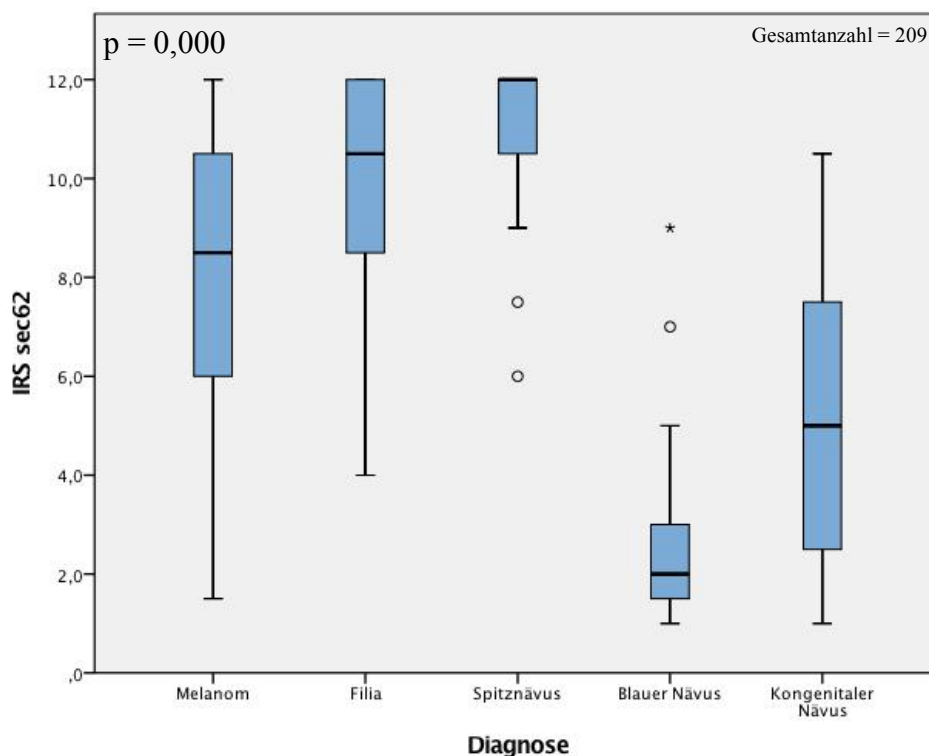


Abb. 24 Statistische Auswertung der Sec62-Expression in Melanomen, Filiae, Spitznävi, blauen Nävi und kongenitalen Nävi, an einem Boxplot dargestellt. Die Sec62-Expression wird mit Hilfe des IRS-Sec62-Scores quantifiziert. Jede Box stellt den Interquartilsabstand dar. Der Median ist durch eine Linie illustriert. Das 25. bis 75. Quartil der Melanompatienten erstrecken sich von 6,0 bis 10,5. Bei der Diagnose Filia ist der Bereich des 25. bis 75. Quartil von 8,5 bis zu einem Wert von 12 groß. Das 25. Quartil der Spitznävi beginnt bei 9,75 und das 75. Quartil endet bei einem Wert von 12. Der Bereich zwischen dem 25. und 75. Quartil bei blauen Nävi erstreckt sich von einem Wert von 1,25 bis 3. Das 25. Quartil der kongenitalen Nävi beginnt bei einem Wert von 2,5 und endet mit dem 75. Quartil bei einem Wert von 7,625.

Diagnosen	IRS-sec62		Gesamt
	Niedrig	Hoch	
Malignes Melanom	41	52	93
Filia	5	23	28
Spitznävus	2	27	29
Blauer Nävus	20	1	21
Kongenitaler Nävus	29	9	38
Gesamt	97	112	209

Tab. 9 Tabellarische Darstellung der Sec62-Expression bei allen untersuchten Diagnosen, dargestellt anhand einer Kreuztabelle. Die Sec62-Expression wird mit Hilfe des IRS-Sec62-Scores quantifiziert.

Vergleicht man die Läsionen paarweise, so gibt es hochsignifikante Unterschiede in der Höhe des IRS-Sec62-Scores zwischen Blauen Nävi mit Melanomen und mit Spitznävi (jeweils $p = 0,000$). Ebenso zeigen sich hochsignifikante Unterschiede zwischen den Diagnosen kongenitaler Nävus mit Melanomen ($p = 0,000$) und mit Spitznävi ($p = 0,000$).

Zwischen Melanomen und Filiae gibt es keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,22$). Wohingegen bei Melanomen und Spitznävi ein hochsignifikanter Unterschied ($p = 0,000$) in der Höhe des IRS-Sec62-Scores besteht.

Zwischen Blauen Nävi und kongenitalen Nävi besteht kein signifikanter Unterschied ($p = 0,31$).

Im Folgenden sind die Läsionen paarweise vergleichend aufgeführt und auf ihre Signifikanz geprüft.

4.9.1 Malignes Melanom und Filia/Sec62

Zwischen der Höhe des IRS-Sec62-Scores von 93 Melanomen und 28 Filiae besteht ein signifikanter Unterschied ($p = 0,012$, Mann-Whitney-U-Test). Das Minimum der Melanome beträgt 1,5, das Maximum 12, und der Median hat einen Wert von 8,5. Die Filiae decken einen Wertebereich von 4 bis 12 ab und haben einen Median von 10,5.

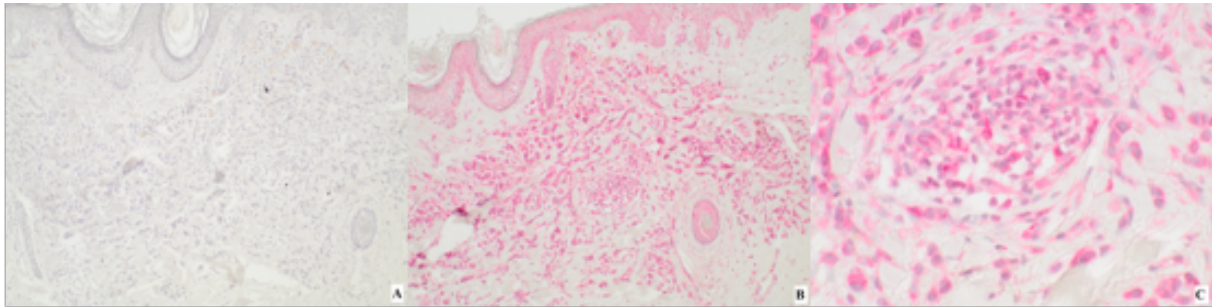


Abb. 25 Filia eines malignen Melanoms; A: ohne AK, 10-fache Vergrößerung; B: mit Sec62-AK, 10-fache Vergrößerung; C: mit Sec62-AK, 40-fache Vergrößerung

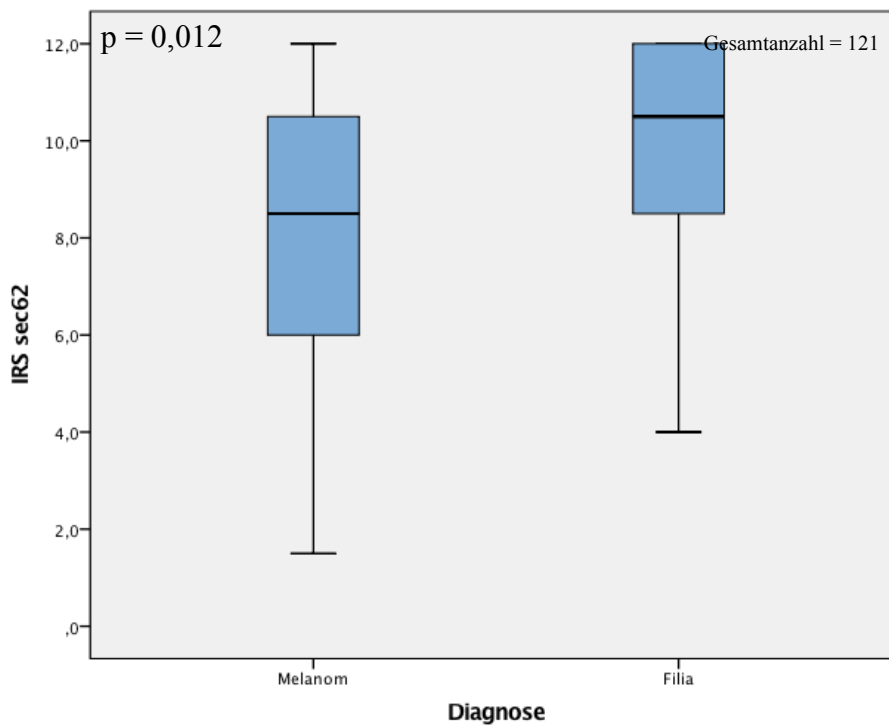


Abb. 26 Statistische Auswertung der Sec62-Expression in Melanomen und Filiae, an einem Boxplot dargestellt. Die Sec62-Expression wird mit Hilfe des IRS-Sec62-Scores quantifiziert. Jede Box stellt den Interquartilsabstand dar. Der Median ist durch eine Linie illustriert. Bei den Melanomen beginnt das 25. Quartil bei einem Wert von 6 und das 75. Quartil endet bei einem Wert von 10,5. Dagegen startet das 25. Quartil der Filiae bei 8,5 und endet am 75. Quartil mit 12,0.

4.9.2 Malignes Melanom und Spitznävus/Sec62

Vergleicht man die Höhe des IRS-Sec62-Scores zwischen Melanomen und Spitznävus, so darf man auch die Nullhypothese verwerfen, denn es besteht ein signifikanter Unterschied ($p = 0,000$, Mann-Whitney-U-Test). Da die Werte der Melanome, zuvor bereits beschrieben sind, werden nur noch die Werte der zu vergleichenden neuen Läsion aufgezählt.

Das Minimum der 29 untersuchten Spitznävus beträgt 6, das Maximum hat einen Wert von 12, und der Median misst ebenfalls 12.

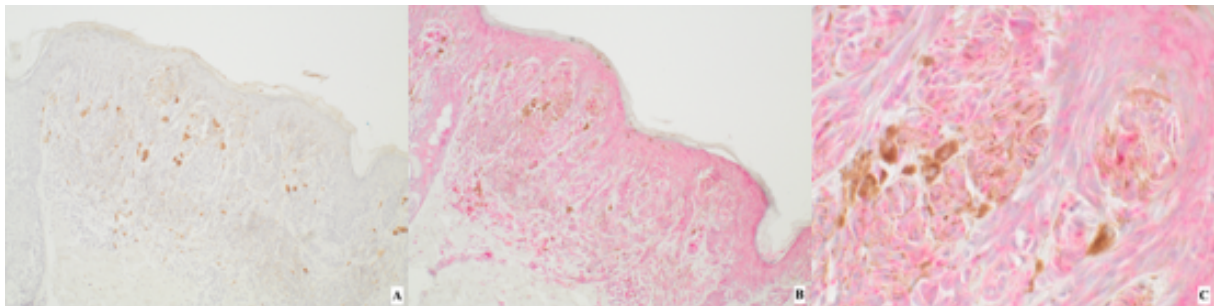


Abb. 27 Spitznävus; A: ohne AK, 10-fache Vergrößerung; B: mit Sec62-AK, 10-fache Vergrößerung; C: mit Sec62-AK, 40-fache Vergrößerung

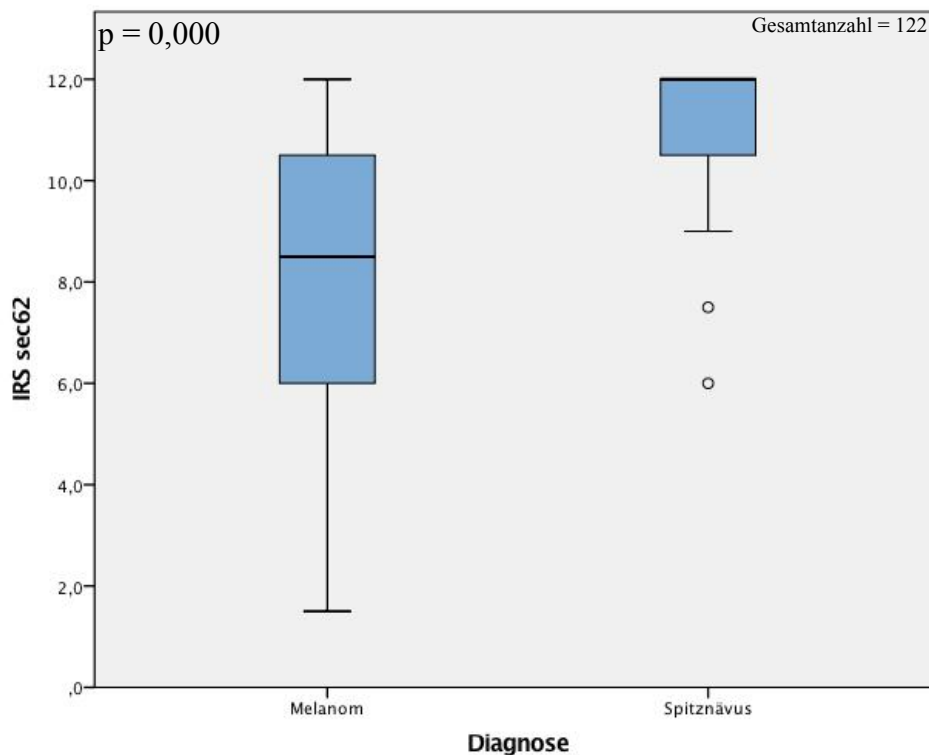


Abb. 28 Statistische Auswertung der Sec62-Expression in Melanomen und Spitznävus, an einem Boxplot dargestellt. Die Sec62-Expression wird mit Hilfe des IRS-Sec62-Scores quantifiziert. Jede Box stellt den Interquartilsabstand dar. Der Median ist durch eine Linie illustriert. Das 25. Quartil der Spitznävus beginnt bei 9,75 und das 75. Quartil hat einen Wert von 12. Die Werte der Melanome sind Abb. 19 zu entnehmen.

4.9.2.1 Spitznävus und Alter

Von 29 Patienten mit Spitznävi waren neun Patienten unter 18 Jahre alt und 20 Patienten Erwachsene und somit über 18 Jahre alt. Von den Patienten haben 2 Patienten einen niedrigen- und 27 Patienten einen hohen IRS-Sec62-Score. Eine Einzelauswertung und Unterteilung in Kinder und Erwachsene erscheint nicht sinnvoll, da die Gruppe der Kinder sehr klein ist (n = 9) und ausschließlich hohe IRS-Sec62-Scores aufweist.

Alter		1	2	3	4	8	16	20	23	25	28	29	31	32	38	40	46	Gesamt
IRS	6,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
sec62	7,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
	9,0	0	0	0	0	1	0	1	2	0	0	0	1	0	0	0	0	5
	10,5	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	5
	12,0	1	2	1	1	0	2	1	1	0	1	1	1	1	1	1	2	17
Gesamt		2	2	1	1	1	2	3	4	1	2	2	2	2	1	1	2	29

Tab. 10 Tabellarische Darstellung des Alters der Patienten mit Spitznävi und dem zugehörigen IRS-Sec62-Score.

Betrachtet man die Gesamtheit der Patienten und der Höhe des IRS-Sec62-Scores im Bezug auf das Alter der Patienten, so zeigt sich kein signifikanter Zusammenhang ($p = 0,241$, Mann-Whitney-Test).

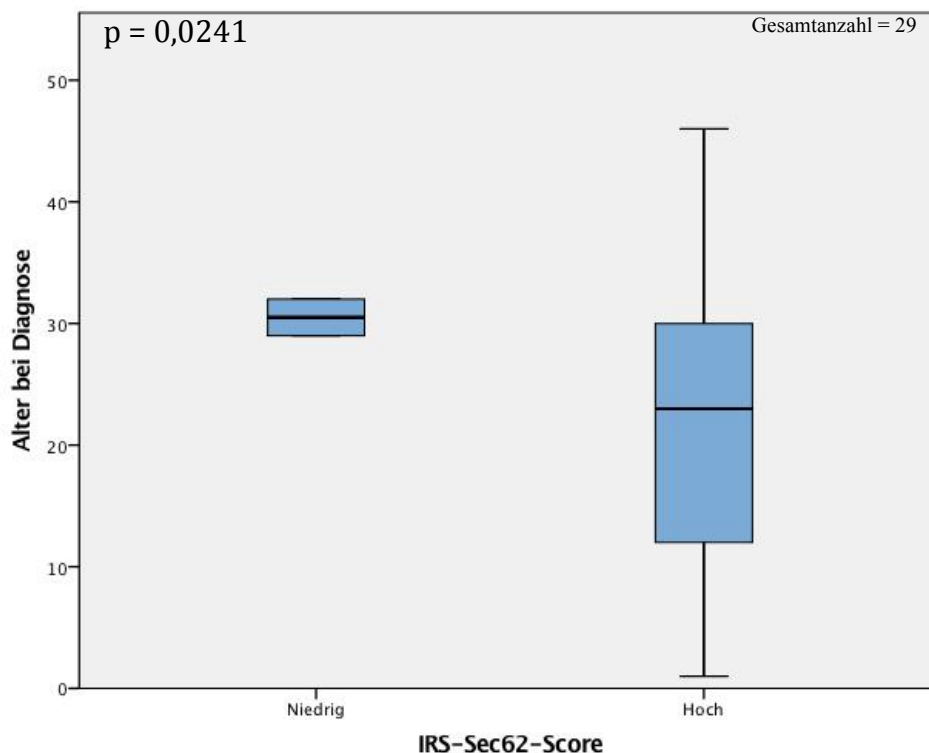


Abb. 29 Statistische Auswertung der Sec62-Expression in Spitznävi im Hinblick auf die Altersverteilung, an einem Boxplot dargestellt. Die Sec62-Expression wird mit Hilfe des IRS-Sec62-Scores quantifiziert. Jede Box stellt den Interquartilsabstand dar. Der Median ist durch eine Linie illustriert.

Das Alter der Patienten mit Spitznävi wurde mit Hilfe des Shapiro-Wilk auf Normalverteilung geprüft. Diese liegt nicht vor, weshalb eine Korrelation mit dem Spearman-Test untersucht wurde. Bei einem Wert von $-0,38$ besteht eine schwach negative Korrelation zwischen dem Alter der Patienten und der

Höhe der Sec62-Expression.

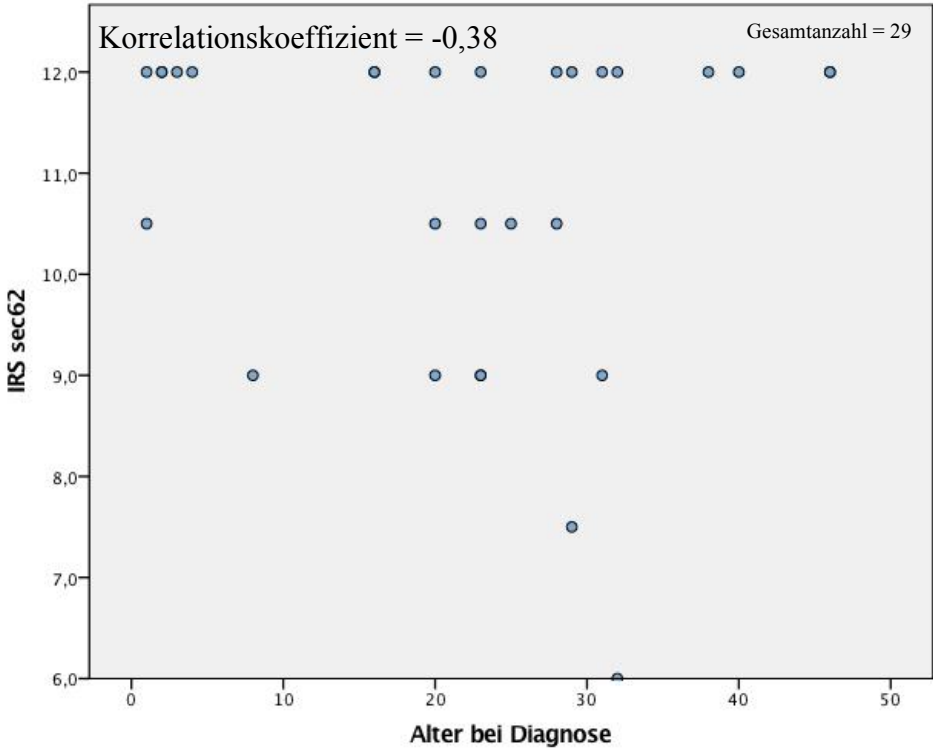


Abb. 30 Statistische Auswertung der Sec62-Expression in Spitznävi anhand des Alters, dargestellt an einem Streudiagramm. Die Sec62-Expression wird mit Hilfe des IRS-Sec62-Scores quantifiziert.

4.9.3 Malignes Melanom und blauer Nävus/Sec62

Des Weiteren gibt es auch zwischen Melanomen und blauen Nävi hinsichtlich ihrer Sec62-Expression einen signifikanten Unterschied ($p = 0,000$, Mann-Whitney-U-Test). Der IRS-Sec62-Score der blauen Nävi beginnt bei einem Minimum von 1 und endet bei einem Maximum von 9. Der Median beträgt 2.

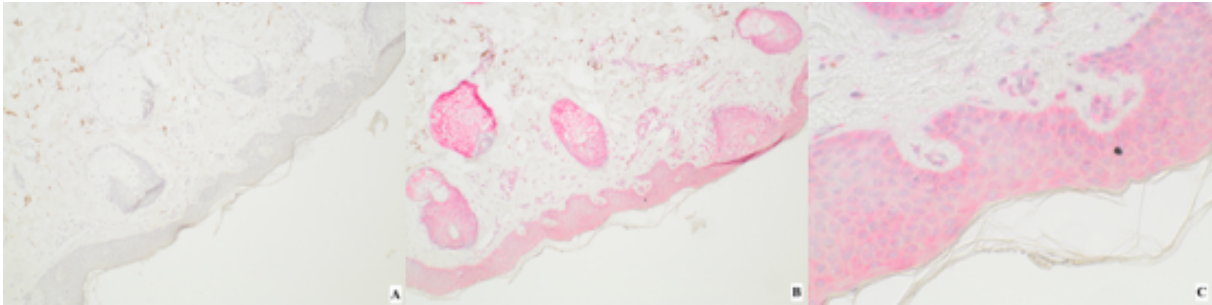


Abb. 31 Blauer Nävus; A: ohne AK, 10-fache Vergrößerung; B: mit Sec62-AK, 10-fache Vergrößerung; C: mit Sec62-AK, 40-fache Vergrößerung

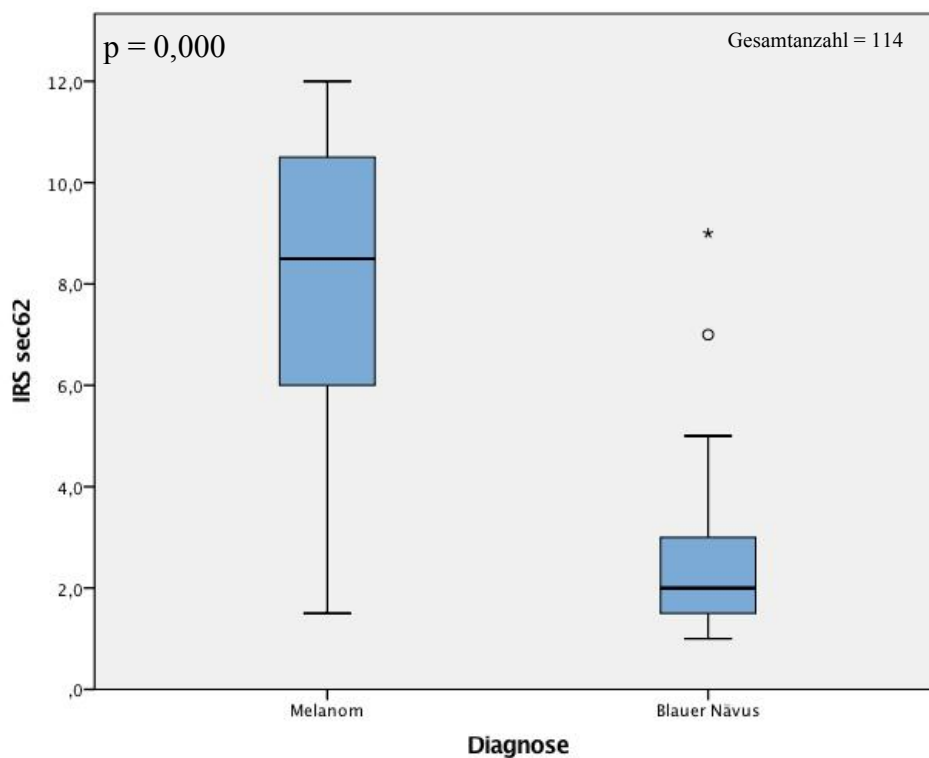


Abb. 32 Statistische Auswertung der Sec62-Expression in Melanomen und blauen Nävi, an einem Boxplot dargestellt. Die Sec62-Expression wird mit Hilfe des IRS-Sec62-Scores quantifiziert. Jede Box stellt den Interquartilsabstand dar. Der Median ist durch eine Linie angezeigt. Das 25. Quartil der blauen Nävi beginnt bei 1,25 und endet am 75. Quartil bei einem Wert von 3. Die Werte der Melanome sind Abb. 19 zu entnehmen.

4.9.4 Malignes Melanom und kongenitaler Nävus/Sec62

Betrachtet man die Sec62-Expression bei Melanomen und kongenitalen Nävi, so errechnet sich auch hier ein hochsignifikanter Unterschied ($p = 0,000$, Mann-Whitney-U-Tests). Das gemessene Minimum des IRS-Sec62-Scores bei kongenitalen Nävi beträgt 1, das Maximum 10,5, und der Median hat einen Wert von 5.

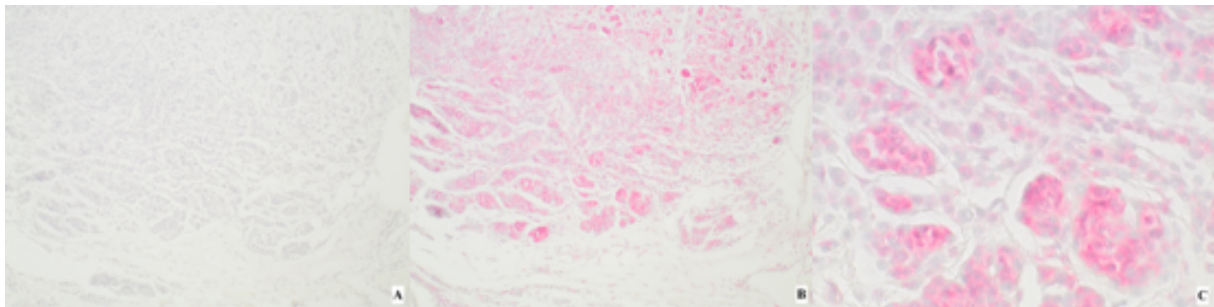


Abb. 33 Kongenitaler Nävus; A: ohne AK, 10-fache Vergrößerung; B: mit Sec62-AK, 10-fache Vergrößerung; C: mit Sec62-AK, 40-fache Vergrößerung

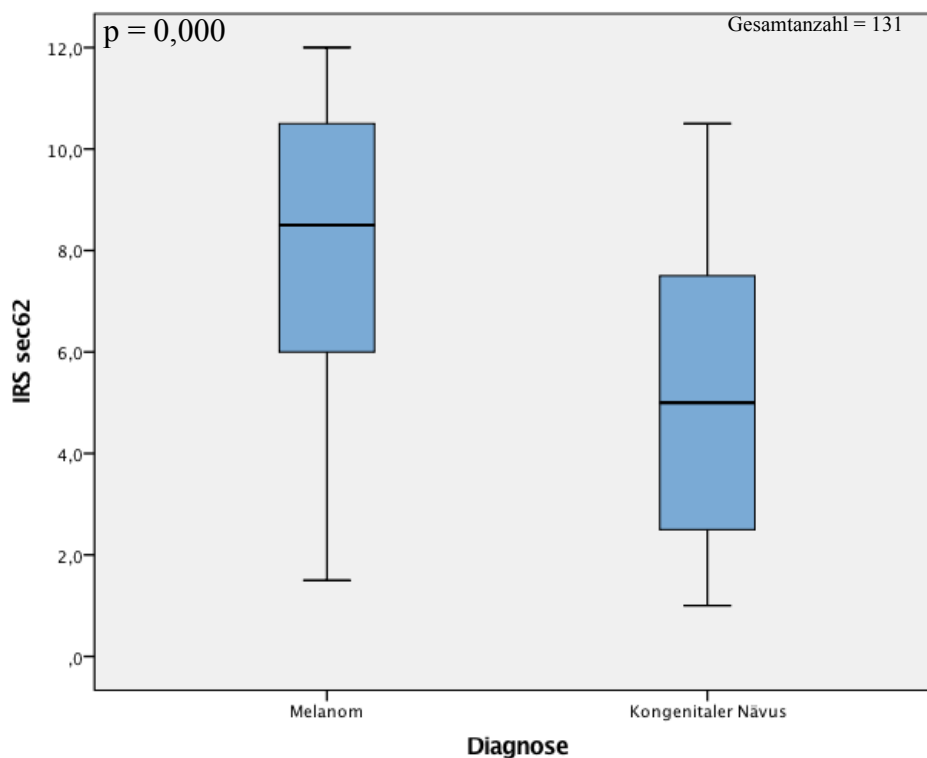


Abb. 34 Statistische Auswertung der Sec62-Expression in Melanomen und kongenitalen Nävi, an einem Boxplot dargestellt. Die Sec62-Expression wird mit Hilfe des IRS-Sec62-Scores quantifiziert. Jede Box stellt den Interquartilsabstand dar. Der Median ist durch eine Linie illustriert. Das 25. Quartil der kongenitalen Nävi beginnt bei einem Wert von 2,5 und endet am 75. Quartil bei 7,625. Die Werte der Melanome sind Abb. 19 zu entnehmen.

4.9.8 Spitznävus und blauer Nävus/Sec62

Im Vergleich der Expression von Sec62 in Spitznävi und blauen Nävi fällt auf, dass die Spitznävi einen wesentlich höheren IRS-Sec62-Score haben, als die blauen Nävi. Auch hier besteht ein hochsignifikanter Unterschied ($p = 0,000$, Mann-Whitney-U-Test). Der kleinste gemessene Wert der Spitznävi ist 6, der größte ist 12. Die Spitznävi haben einen Median von 12. Das Minimum der blauen Nävi liegt bei 1, das Maximum bei 9. Der Median der blauen Nävi beträgt 2.

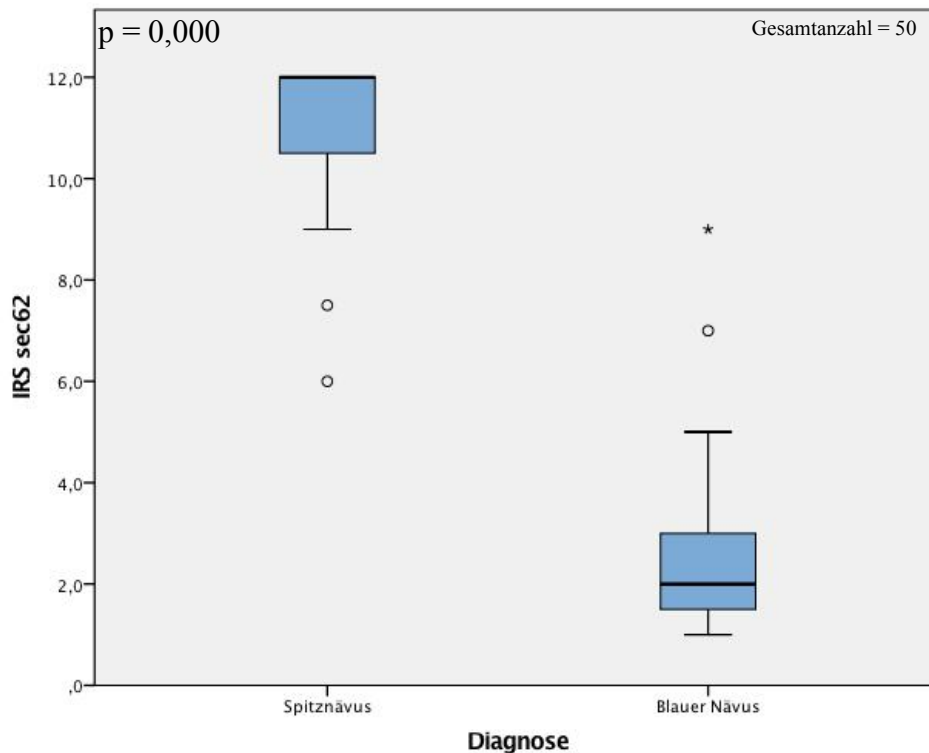


Abb. 35 Statistische Auswertung der Sec62-Expression in Spitznävi und blauen Nävi, an einem Boxplot dargestellt. Die Sec62-Expression wird mit Hilfe des IRS-Sec62-Scores quantifiziert. Jede Box stellt den Interquartilsabstand dar. Der Median ist durch eine Linie illustriert. Das 25. Quartil der Spitznävi beginnt bei einem Wert von 9,75 und endet am 75. Quartil bei 12. Das 25. Quartil der blauen Nävi hingegen beginnt bereits bei 1,25 und endet am 75. Quartil bei einem Wert von 3.

4.9.9 Spitznävus und kongenitaler Nävus/Sec62

Auch im Vergleich zwischen Spitznävi und kongenitalen Nävi fällt ein hochsignifikanter Unterschied in der Höhe der Sec62 Expression auf ($p = 0,000$, Mann-Whitney-U-Test). Die Werte des IRS-Sec62-Scores der Spitznävi sind höher als die der kongenitalen Nävi. Die Werte der Spitznävi sind der Beschreibung zu Abbildung 26 zu entnehmen. Der kleinste gemessene Wert der kongenitalen Nävi beträgt 1 und der höchste 10,5. Der Median liegt bei 5.

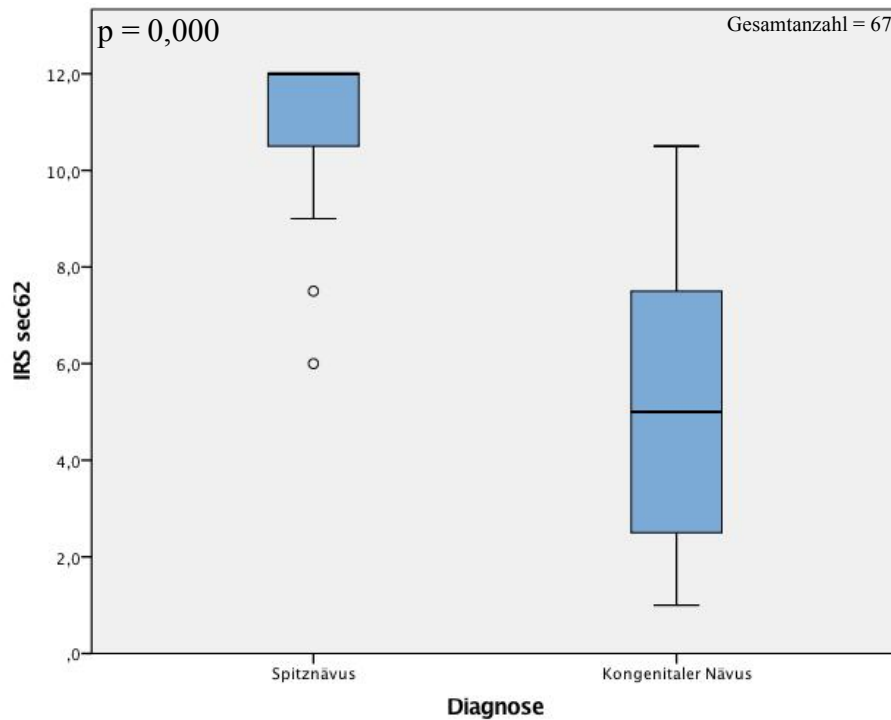


Abb. 36 Statistische Auswertung der Sec62-Expression in Spitznävi und kongenitalen Nävi, an einem Boxplot dargestellt. Die Sec62-Expression wird mit Hilfe des IRS-Sec62-Scores quantifiziert. Jede Box stellt den Interquartilsabstand dar. Der Median ist durch eine Linie illustriert. Das 25. Quartil der kongenitalen Nävi beginnt bei dem Wert 2,5 und das 75. Quartil endet bei einem Wert von 7,625. Die Werte der Spitznävi sind Abbildung 26 zu entnehmen.

4.9.10 Blauer Nävus und kongenitaler Nävus/Sec62

Zu guter Letzt findet man auch im Vergleich der Läsionen blauer- und kongenitaler Nävus einen hochsignifikanten Unterschied in der Sec62-Expression ($p = 0,000$, Mann-Whitney-U-Test). Der IRS-Sec62-Score der blauen Nävi misst ein Minimum von 1, ein Maximum von 9 und einen Median von 2. Das Minimum der kongenitalen Nävi liegt ebenfalls bei einem Wert von 1, das Maximum bei 10,5 und der Median findet sich bei 5.

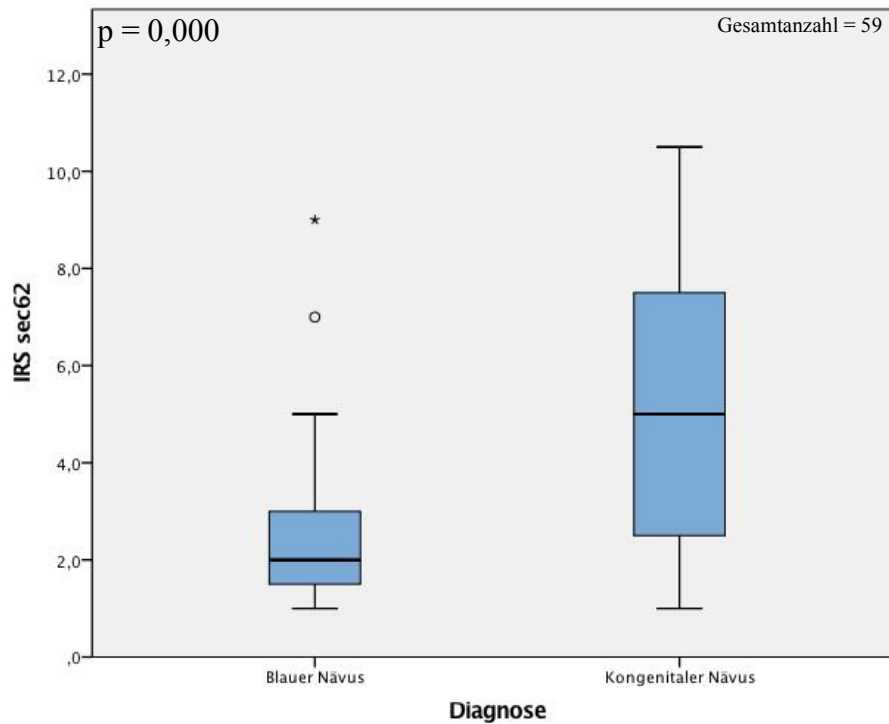


Abb. 37 Statistische Auswertung der Sec62-Expression in blauen und kongenitalen Nävi, an einem Boxplot dargestellt. Die Sec62-Expression wird mit Hilfe des IRS-Sec62-Scores quantifiziert. Jede Box stellt den Interquartilsabstand dar. Der Median ist durch eine Linie illustriert. Das 25. Quartil der blauen Nävi beginnt bei einem Wert von 1,25 und endet mit dem 75. Quartil bei 3. Dahingegen beginnt das 25. Quartil der kongenitalen Nävi beginnt bei dem Wert 2,5 und das 75. Quartil endet bei einem Wert von 7,625.

4.10 Alter/Sec62

Im Vergleich zwischen dem Alter der Patienten und der Höhe der Sec62 Expression gibt es keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,604$, Kruskal-Wallis-Test). Für diesen Test wurden lediglich der Patienten mit Melanomen und Filiae ausgewählt. Die Gruppen der 20- bis 29jährigen (4), der 30- bis 39jährigen (3) und der 40- bis 49-jährigen (5), sind die Gruppen mit den wenigsten Patienten. Die Gruppe der 60- bis 69jährigen ist mit 37 Patienten, die Gruppe mit dem größten Patientenkollektiv. Exemplarisch werden die Gruppen mit den meisten und wenigsten Patienten beschrieben. Die Gruppe der 30- bis 39jährigen hat ihren minimalsten IRS-Sec62-Score bei einem Wert von 3,5, ihr Maximum bei 10,5 und der Median beträgt 8,5. Bei dem Patientenkollektiv der 60- bis 69jährigen, beträgt das Minimum 1,5, das Maximum 12 und der Median hat einen Wert von 10,5.

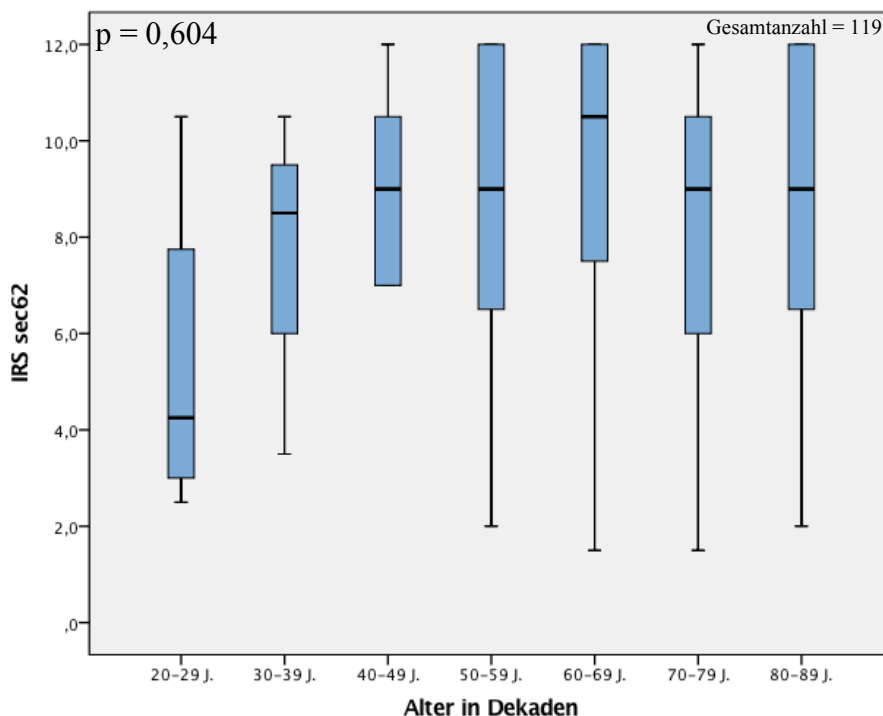


Abb. 38 Statistische Auswertung der Sec62-Expression in den verschiedenen Altersstufen in Dekaden, an einem Boxplot dargestellt. Die Sec62-Expression wird mit Hilfe des IRS-Sec62-Scores quantifiziert. Jede Box stellt den Interquartilsabstand dar. Der Median ist durch eine Linie illustriert. Da das Patientenkollektiv der 30- bis 39-jährigen hat nur drei Werte, weshalb eine Bezifferung des 25. und 75. Quartil nicht sinnvoll ist. Bei der Gruppe der Patienten der 60- bis 69jährigen beginnt das 25. Quartil bei 7 und das 75. Quartil endet bei 12.

4.11 Melanom-Subtypen/Sec62

Von insgesamt 93 Patienten mit der Diagnose malignes Melanom, gab es bei lediglich 50 Melanomen Angaben bezüglich ihres Subtyps. Im Vergleich zwischen den Melanomen hinsichtlich ihrer Subtypen superfiziell spreitendes Melanom (SSM), Lentigo-Maligna Melanom (LMM), akrolentiginöses Melanom (ALM) und noduläres malignes Melanom (NMM) in Verbindung mit ihrer Sec62-Expression, zeigt sich kein signifikanter Unterschied ($p = 0,673$, Kruskal-Wallis-Test). Der Gruppe der SMM sind 25 Patienten, der LMM-Gruppe 5-, ALM-Gruppe 6- und der NMM, 14 Patienten zugehörig.

Die superfiziell spreitenden Melanome haben ihr Minimum bezüglich des IRS-Sec62-Scores bei 1,5, ihr Maximum bei 12 und der Median beträgt hier 7,5. Das Minimum der Lentigo-Maligna Melanome liegt bei einem Wert von 1,5, das Maximum bei 10,5 und der Median liegt bei 5. Die akrolentiginösen Melanome zeigen ihr Minimum bei 2, ihr Maximum bei 10,5 und der Median liegt bei einem Wert von 7,25. Der IRS-Sec62-Score der noduläre maligne Melanom misst ein Minimum bei 2, ein Maximum bei 12 und der Median liegt hier bei 7,75.

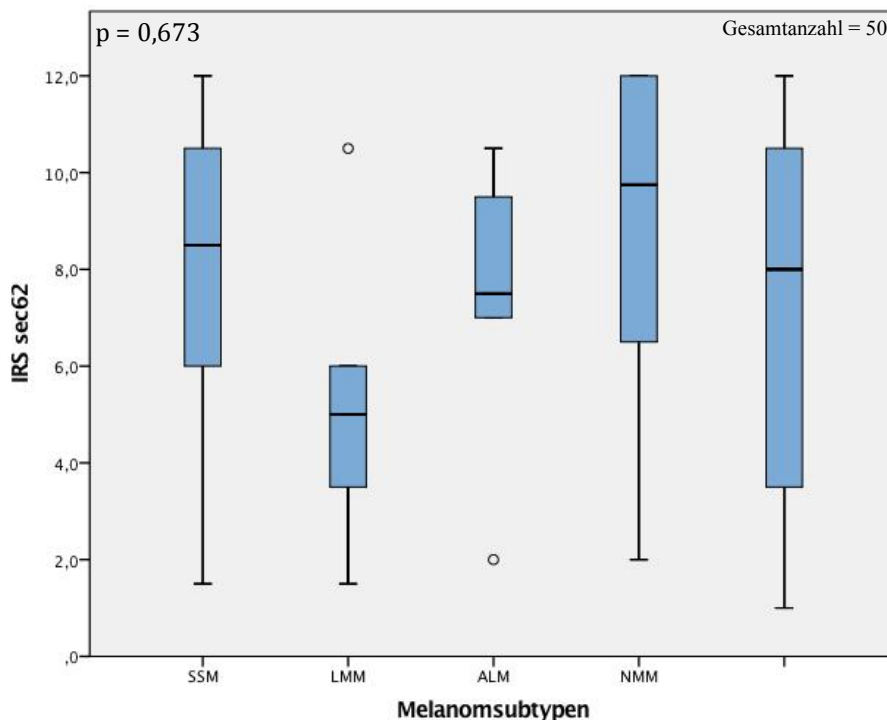


Abb. 39 Statistische Auswertung der Sec62-Expression in Melanomen hinsichtlich ihres Subtyps, an einem Boxplot dargestellt. Die Sec62-Expression wird mit Hilfe des IRS-Sec62-Scores quantifiziert. Jede Box stellt den Interquartilsabstand dar, der Median ist durch eine Linie illustriert. Das 25. Quartil der superfiziell spreitenden Melanome beginnt bei 4,5 und das 75. Quartil endet bei einem Wert von 10,5. Bei den Lentigo-Maligna Melanomen beginnt das 25. Quartil bei 2,5 und endet mit dem 75. Quartil bei einem Wert von 8,25. Dahingegen beginnt das 25. Quartil der akrolentiginösen Melanomen bei 5,75 und endet am 75. Quartil bei 9,375. Der Wertebereich der nodulären Melanome zwischen dem 25. und 75. Quartil, beginnt bei 3,25 und endet bei 10,5.

4.12 Überlebensanalyse

4.12.1 Gesamtüberleben (OAS)

Befasst man sich mit den Überlebensraten der Patienten mit der Diagnose malignem Melanom, so unterscheiden sich die Überlebenskurven in den einzelnen Tumorstadien signifikant voneinander. Die Höhe des IRS-Sec62-Scores in Bezug auf das OAS der Patienten mit Melanomen, zeigt keinen signifikanten Unterschied. Von 119 untersuchten Patienten wurde bei 56 das Austrittsdatum mit dem 01.01.2017 festgelegt, da keine weiteren Informationen bezüglich des aktuellen Status der Patienten vorlagen. Das mediane Überleben von Patienten mit Melanomen in T1- sowie T2-Stadium ist mit den vorliegenden Daten nicht darstellbar. Das mediane Überleben von Patienten mit Melanomen im Stadium 3 beträgt 83 Monate und im Stadium 4 beträgt es nur noch 28 Monate

Das mediane Überleben bei Patienten mit einem hohen IRS-Sec62-Score beträgt 123 Monate. Das mediane Überleben der Patienten mit Melanomen mit einem niedrigen IRS-Sec62 ist mit diesen Daten nicht darstellbar, da mit dem Enddatum der Studie über 50% der Patienten mit einem niedrigen IRS-Sec62-Score noch leben, sodass kein medianes Überleben errechnet werden kann.

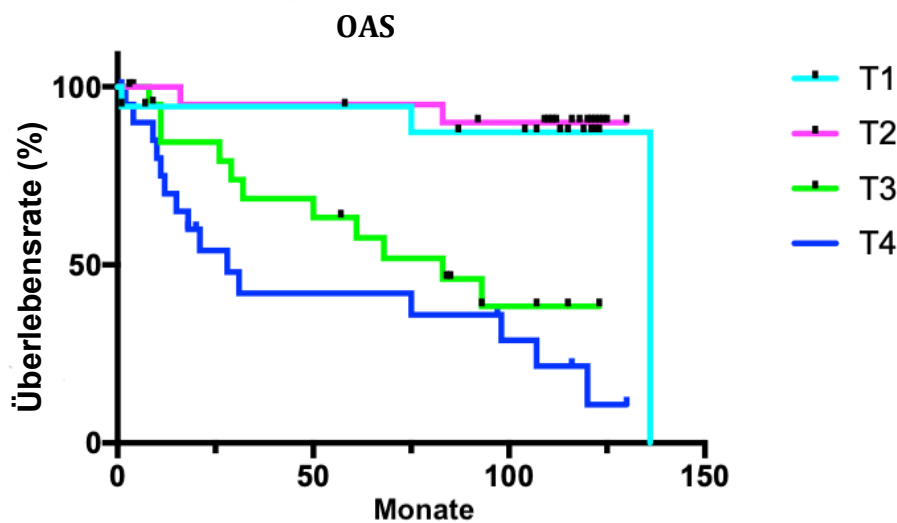


Abb. 40 Überlebensanalyse nach Kaplan Meier für die verschiedenen Tumorstadien des malignen Melanoms unserer Kohorte. Es werden die OAS-Daten von Patienten mit pT1-Tumoren (hellblaue Kurve), mit pT2-Tumoren (pinke Kurve), mit pT3-Tumoren (grüne Kurve) und pT4-Tumoren (dunkelblau) miteinander verglichen. Die Überlebenskurven unterscheiden sich signifikant voneinander. ($p < 0,0001$, Log-Rank-Test). Die schwarzen Punkte stellen zensierte Daten dar.

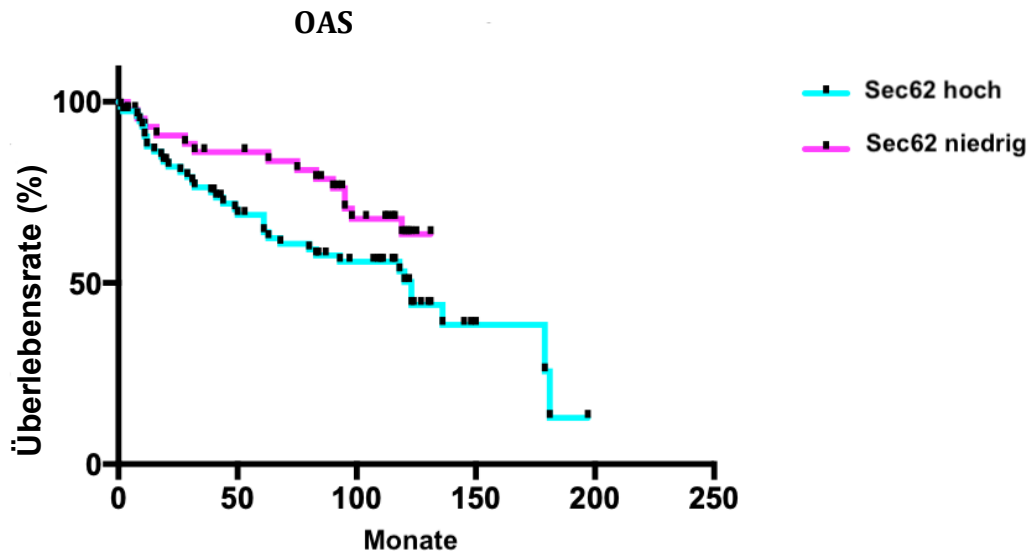


Abb. 41 Überlebensanalyse nach Kaplan Meier für maligne Melanome mit hohem (hellblaue Kurve) und niedrigem (pinke Kurve) IRS-Sec62-Score. Die Kurven unterscheiden sich nicht signifikant voneinander ($p = 0,0794$, Log-Rank-Test). Die schwarzen Punkte stellen zensierte Daten dar. Hierbei haben die Melanome, die der Hoch-Kategorie zugeordnet sind, einen Wert von > 8 und die Melanome die der Niedrig-Kategorie zugeordnet sind, einen Wert < 7 .

4.12.2 Progressfreies Überleben (PFS)

Betrachtet man das progressfreie Überleben der Patienten mit der Diagnose Melanom in Bezug auf ihr Tumorstadium, so besteht ein signifikanter Unterschied in der Länge des PFS je nach Tumorstadium. Nach 35 Monaten ist bei 50 % der Patienten mit der Diagnose eines malignen Melanoms im T4-Stadium ein Progress der Erkrankung festgestellt worden.

Betrachtet man das progressfreie Überleben der Patienten mit der Diagnose Melanom in Bezug auf die Höhe ihres IRS-Sec62-Scores, so gibt es einen signifikanten Unterschied in der Länge des progressfreien Überlebens bei Patienten mit Melanomen mit hohem- oder niedrigem IRS-Sec62-Score.

So beträgt der mediane Progress der Patienten mit Melanomen mit hohem Sec62-Anteil 56 Monate. Für Patienten mit Melanomen, welche einen niedrigen IRS-Sec62-Score aufweisen, ist mit diesen Daten kein medianer Progress darstellbar, da bis zum Endpunkt der Studie bei weniger als 50 % der Patienten mit Melanomen einen Progress der Erkrankung vermeldet wurde.

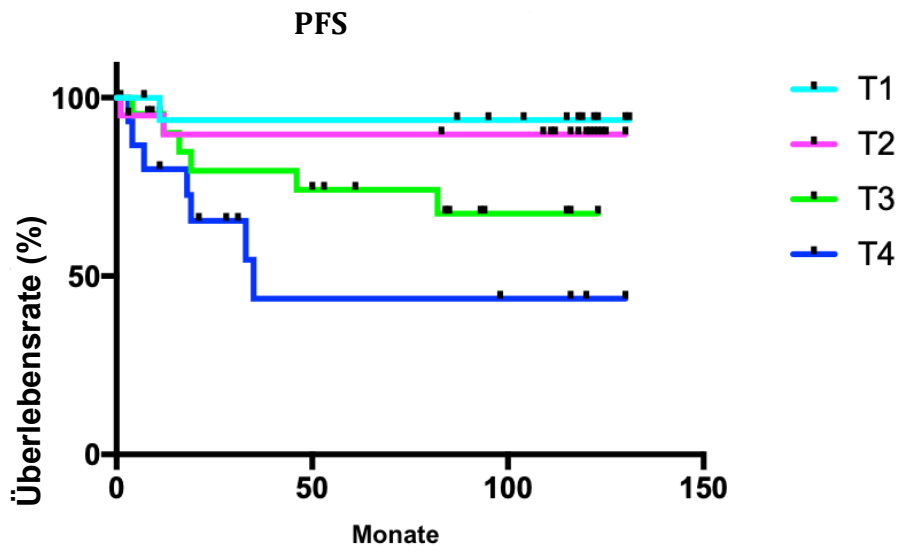


Abb. 42 Überlebensanalyse des progressfreien Überlebens der jeweiligen Tumorstadien der malignen Melanome. Es werden die PFS-Daten von Patienten mit pT1-Tumoren (hellblaue Kurve), mit pT2-Tumoren (pinke Kurve), mit pT3-Tumoren (grüne Kurve) und pT4-Tumoren (dunkelblau) miteinander verglichen. Die Kurven unterscheiden sich signifikant voneinander ($p = 0,0079$, Log-Rank-Test). Die schwarzen Punkte stellen zensierte Daten dar.

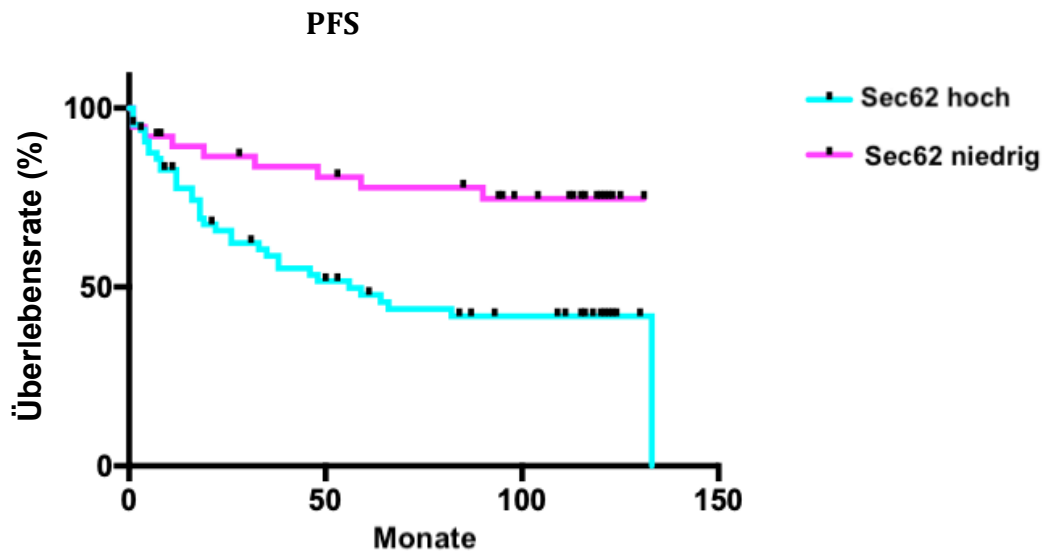


Abb. 43 Überlebensanalyse des progressfreien Überlebens von Melanomen mit hohem (hellblaue Kurve) und niedrigem (pinke Kurve) IRS-Sec62 Score. Die Kurven unterscheiden sich signifikant voneinander ($p = 0,0027$, Log-Rank-Test). Die schwarzen Punkte stellen zensierte Daten dar. Hierbei haben die Melanome, die der Hoch-Kategorie zugeordnet sind, einen Wert von > 8 und die Melanome die der Niedrig-Kategorie zugeordnet sind, einen Wert < 7 .

4.13 Zusammenfassung hochsignifikanter Ergebnisse ($p \leq 0,001$)

Parameter	Signifikanz	Bedeutung
T-Stadium – IRS-Sec62-Score	$p = 0,000$	Die T-Stadien unterscheiden sich signifikant in der Höhe ihres IRS-Sec62-Scores. Hohe Tumorstadien haben einen höheren Median als niedrigere Stadien.
→ zwischen pT1 und pT4	$p = 0,000$	
Ulzerationen – IRS-Sec62-Score	$p = 0,001$	Der IRS-Sec62-Score unterscheidet sich in der Höhe signifikant voneinander in Melanomen mit und ohne Ulzerationen. Die Melanome mit Ulzerationen haben einen höheren Median (10,5) als Melanome ohne (7,5).
Art der Läsion – IRS-Sec62-Score	$p = 0,000$	Die verschiedenen Hautläsionen unterscheiden sich in der Höhe ihres IRS-Sec62-Scores. Maligne Läsionen, wie Melanome (8,5) und Filiae (10,5) haben einen höheren Median als die benignen Läsionen, wie blaue Nävi (2) und kongenitale Nävi (5). Der Spitznävus hat mit einem Median von 12 den höchsten Median aller melanozytären Läsionen.
→ zw. MM und Spitznävus	$p = 0,000$	
→ zw. MM und blauem Nävus	$p = 0,000$	
→ zw. MM und kongenitalem Nävus	$p = 0,000$	
→ zw. Filia und blauem Nävus	$p = 0,000$	
→ zw. Filia und kongenitalem Nävus	$p = 0,000$	
→ zw. Spitznävus und blauem Nävus	$p = 0,000$	
→ zw. Spitznävus und kongenitalem Nävus	$p = 0,000$	
→ zw. kongenitalem und blauem Nävus	$p = 0,000$	
OAS – T-Stadium	$p < 0,0001$	Das Overall Survival in Melanomen unterschiedlichen T-Stadiums unterscheidet sich signifikant voneinander. Bei Melanomen in T1-Stadium ist das OAS deutlich länger als in Melanomen im T4-Stadium.

Stark positive Korrelation ($>0,5$)

Tumordicke nach Breslow – IRS-Sec62-Score	0,548	Mit steigender Tumordicke steigt die Höhe des IRS-Sec62-Scores
--	-------	--

Tab. 11 Zusammenfassung hochsignifikanter Ergebnisse

Zusammenfassung signifikanter Ergebnisse ($p < 0,05$)

Parameter	Signifikanz	Bedeutung
T-Stadium – IRS-Sec62-Score		Die T-Stadien unterscheiden sich signifikant in der Höhe ihres IRS-Sec62-Scores. Hohe Tumorstadien haben einen höheren Median als niedrigere Stadien.
→ zwischen pT2 und pT4	$p = 0,002$	
→ zwischen pT1 und pT3	$p = 0,049$	
Lymphknotenbefall – IRS-Sec62-Score	$p = 0,012$	Der IRS-Sec62-Score unterscheidet sich in der Höhe signifikant voneinander, bei Melanomen mit oder ohne tumorbefallene Lymphknoten. Die Melanome mit N0-Status haben einen niedrigeren Median (7,5) als jene mit N1-Status (9).
Clark-Level – IRS-Sec62-Score	$p = 0,002$	Die Clark-Level unterscheiden sich signifikant in ihrem IRS-Sec62-Score. Höhere Clark-Level haben einen höheren IRS-Sec62-Score als niedrige.
Art der Läsion – IRS-Sec62-Score		Die verschiedenen Hautläsionen unterscheiden sich in der Höhe ihres IRS-Sec62-Scores. Melanome (8,5) haben einen höheren Median als Filiae (10,5).
→ zw. MM und Filia	$p = 0,012$	
PFS – T-stadium	$p = 0,0079$	Die progressfreie Zeit unterscheidet sich signifikant in Melanomen unterschiedlichen T-Stadiums. Die progressfreie Zeit ist in Melanomen im T4-Stadium deutlich kürzer als in jenen im T1-Stadium.
PFS – IRS-Sec62-Score	$p = 0,0027$	Die progressfreie Zeit unterscheidet sich signifikant bei Melanomen mit hohem oder niedrigem IRS-Sec62-Score. Die Patienten bei denen ein Melanom mit hohem IRS-Sec62-Score diagnostiziert worden ist, haben eine kürzere progressfreie Zeit als Melanome mit niedrigem IRS-Sec62-Score.

Tab. 12 Zusammenfassung signifikanter Ergebnisse

4.15 Übersicht Anzahl aller Gewebeproben mit hohem oder niedrigem IRS-Sec62-Score

		IRS-Sec62-Score		Gesamt
		Niedrig (IRS ≤ 7)	Hoch (IRS ≥ 8)	
Diagnosen	Malignes Melanom	41	52	93
	Filia	5	23	28
	Spitznävus	2	27	29
	Blauer Nävus	20	1	21
	Kongenitaler Nävus	29	9	38
Geschlecht	Weiblich	45	55	100
	Männlich	55	57	109
Lokalisation aller Diagnosen	Kopf/Hals	25	24	49
	Rumpf	33	41	74
	Obere Extremität	15	12	27
	Untere Extremität	23	35	58
T-Stadium	T1-Stadium	13	6	19
	T2-Stadium	13	10	23
	T3-Stadium	11	18	28
	T4-Stadium	5	19	23
Tumordicke nach Breslow	Level I	13	6	19
	Level II	12	9	21
	Level III	7	16	23
	Level IV	4	18	22
N-Status bei Erstdiagnose	N0	33	35	68
	N1	13	39	52
M-Status bei Erstdiagnose	M0	38	46	84
	M1	8	27	35
Ulzerationen	Keine	35	29	64
	Vorhanden	6	23	29
Clark Level	Level 2	11	8	19
	Level 3	25	33	58
	Level 4	8	22	30
	Level 5	1	9	10

Melanomsubtypen	SSM	13	12	25
	LMM	4	1	5
	ALM	4	2	6
	NMM	7	7	14

Tab. 13 Anzahl aller Gewebeproben mit hohem und niedrigem IRS-Sec62-Score

5 Diskussion

Das maligne Melanom ist eine bösartige Neubildung der Melanozyten der Haut und ist für 90 % aller Todesfälle durch Hauttumore verantwortlich. Die Inzidenz an Neuerkrankungen ist seit 1970 um das Siebenfache angestiegen [29] und macht circa 5 % aller Krebserkrankungen in Deutschland aus. Etwa zwei Drittel aller Fälle werden in einem frühen Stadium diagnostiziert und gehen mit einem 5-Jahres-Überleben von circa 90 % einher. Bei UICC Stadium 4 liegt das 5-Jahres-Überleben hingegen nur noch bei circa 19 % [82].

Die seit 2011 zugelassene Immuntherapie, das Entdecken von Treibermutationen, wie zum Beispiel der BRAF-Mutation und deren gezielte Therapie mit BRAF-Kinasehemmern, beispielsweise Vemurafenib, verbesserten insbesondere das mediane Überleben von Patienten mit metastasiertem Melanom deutlich. Trotz des neuen Therapieerfolges bilden sich meist nach einigen Monaten Therapieresistenzen aus [34]. Diese zu umgehen und die Mechanismen zu verstehen, ist Inhalt aktueller Forschung. Ein Weg der Resistenzvermeidung, ist zum Beispiel die Kombination verschiedener Wirkstoffe [5, 6, 33, 92]. Es sprechen jedoch nicht alle Melanome gleich gut an und kommt es zu Ausbildung immer neue Resistenzen, welche den Therapieerfolg zeitlich begrenzen [69].

In diversen Tumorentitäten des Menschen, wie zum Beispiel Prostatakarzinomen [52], NSCLC und Schilddrüsenkarzinomen [66], Cervixkarzinomen [65] Kopf-Hals-Tumoren [14] und Magenkarzinomen [45] konnten erhöhte Sec62-Werte nachgewiesen werden. 2017 wurde erstmals auch in einem malignen Hauttumor, dem atypischen Fibroxanthom, eine erhöhte Sec62-Expression nachgewiesen [75]. Sec62 ist Teil eines Komplexes mit dem Kalziumkanal Sec61 und Sec63 und befindet sich in der Membran des ER, mit luminalen sowie zytosolischen Anteilen [26, 84]. Neben dem Transport von Vorläuferproteinen [59], der Erholung von ER-Stress [35], kommt Sec62 eine zentrale Rolle im Kalziumhaushalt der Zelle zu, denn es erlaubt passiven Efflux von Kalzium aus dem Lumen des ERs in das Zytosol [67]. Die Kalziumkonzentration im Zytosol der Zelle wirkt sich auf Prozesse wie Zellmigration und Apoptose aus. Dies deutet daraufhin, dass auch Sec62 Einfluss auf diese Prozesse hat [49, 88]. Welche genauen Mechanismen dem zugrunde liegen, ist noch nicht endgültig geklärt. In weiteren Studien zeigte sich, dass Überexpression von Sec62 mit einer vermehrten Zellmigration- und Invasion des Tumors einhergeht, die Widerstandsfähigkeit des Tumors gegenüber ER-Stress erhöht ist und den Calciumhaushalt der Zelle beeinflusst, welches die Wirkung einiger Chemotherapeutika entscheidend einschränkt [39, 40, 67]

Zum aktuellen Zeitpunkt gibt es keine Studien über die klinische Relevanz oder prognostische Auswirkungen der Höhe der Sec62-Expression bei Melanomen. Diese Studie beschäftigt sich mit der Frage, ob auch bei Melanomen eine Sec62-Überexpression vorliegt und welche prognostische

Relevanz diese auf das OAS oder PFS hat. Außerdem korrelierten wir die Höhe der Sec62-Expression mit klinischen Daten wie zum Beispiel das TNM-Stadium.

5.1 Diskussion der Methoden

Die immunhistochemische Färbung ist eine 1942 von Albert Coons entwickelte Methode, um das Vorhandensein bestimmter Proteinen, mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers nachzuweisen [1]. Sie ist ein standardisierter, etablierter und reproduzierbarer Prozess der Analyse von in Paraffin eingebetteten Gewebeproben [64]. Immer mehr rückt der Nachweis von prognostischen Biomarkern verschiedener Krebserkrankungen durch immunhistochemische Färbung in den letzten Jahren in den Vordergrund [58, 108]. Dies macht es zu einer idealen Methode, Sec62, welches sich in anderen Tumorentitäten bereits als prognostischer Biomarker zeigte [14, 65, 67, 94, 96, 97, 105, 106], auch in Melanomen nachzuweisen.

Da es zum aktuellen Zeitpunkt keine Studien über die Sec62-Expression in Melanomen gibt, ist die immunhistochemische Färbung eine schnelle, effiziente und auch kostengünstige Methode, um die Basis für weitere Forschungsansätze zu bilden [78]. Bei fehlendem Nachweis können weitere Experimente ausbleiben und so Ressourcen gespart werden.

Des Weiteren nutzten eine Vielzahl vorangegangener Studien, welche sich mit dem Thema der Sec62-Überexpression in Tumorzellen beschäftigten, die Methodik der immunhistochemischen Färbung [14, 30, 39, 75, 97]. Diese Gemeinsamkeit macht Vergleiche zwischen den Ergebnissen dieser Studien und Interpretationen möglich.

Ein weiterer Vorteil, der immunhistochemischen Färbung ist, dass sie sowohl in der Forschung, als auch in der Diagnostik des klinischen Alltags eingesetzt werden kann [71]. Insbesondere die Krebsdiagnostik- und Therapie zeigen eine Tendenz zu individualisierter Medizin. Dies geschieht unter anderem durch die Darstellung von sogenannten Biomarkern in Gewebeproben, welche durch immunhistochemische Färbungen gut darstellbar sind [54].

Ein Nachteil der immunhistochemischen Färbung zeigt sich in der Auswertung der Ergebnisse. Diese ist nicht einheitlich genormt. So bediente sich ein chinesisches Forschungsteam bei der Auswertung ihrer Färbungen des IODs (Integral optical density) [30], weitere Forschungsgruppen nutzen den IRS-Score nach Remmele und Stegner [14, 75, 97] und eine wiederum andere Studie, teilte die Ergebnisse ihrer Färbung in weak-medium-strong ein [39].

Diese vielfältigen Auswertungsmethoden erschweren einen einheitlichen Vergleich und Beurteilung der Ergebnisse dieser Methodik. Die Mehrheit der Studien bediente sich jedoch des IRS-Sec62-

Scores, welcher auch in dieser Studie Verwendung fand, sodass sich hier eine gute Vergleichbarkeit ergibt.

Klar ist, dass die immunhistochemische Färbung der Melanome nur Basis für weitere Forschung sein kann, denn sie erlaubt keinerlei Aussage über das Verhalten von Sec62 in lebenden Melanomenzellen.

Ein weiterer Vorteil der immunhistochemischen Färbung ist, dass bereits in der Vergangenheit entnommenes in Paraffin eingebettetes Patientengewebe (FFPE) untersucht werden kann [58] und es so möglich ist, Patientenproben aus zurückliegenden Jahrzehnten zu verwenden und im Zusammenhang mit klinischen Daten über einen längeren Zeitraum zu interpretieren. So ist es möglich, nachträglich Aussagen zu dem OAS oder PFS zu machen.

Andererseits ist die Verwendung der in Paraffin eingebetteten Patientenproben in ihrer weiteren Verwendung sehr begrenzt. So sind Verfahren, die es ermöglichen FFPE-Proben für genomische Analysen nutzbar zu machen sehr aufwändig und von vielen Faktoren, beispielsweise Art und Menge des Gewebes oder Art und Dauer der Lagerung, abhängig [7, 19, 86]. Dies hat zur Folge, dass die Daten desselben Tumors nicht immer durch unterschiedliche Methoden untersucht und analysiert werden können.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

Sec62-Expression in malignen und benignen Tumoren

Um festzustellen ob in Melanomen (n=119) eine signifikant erhöhte Sec62-Expression vorliegt, färbten wir zum Vergleich benigne Hautläsionen (blauer Nävus n=21, kongenitaler Nävus n=38, Spitznävus n=29) immunhistochemisch an. Die Gewebeproben stammten nicht von denselben Patienten, von denen auch die Melanome exzidiert wurden, welches einen direkten Vergleich dieser nicht möglich macht.

Jedoch können benigne Läsionen, wenn diese ohne eine Exzision als solche erkannt werden können, aus ethischen Gründen nicht gezielt exzidiert werden. Dies würde eine unnötige chirurgische Intervention für den Patienten bedeuten, welche mit entsprechenden Risiken einhergeht. Dies macht einen gezielten Vergleich benigner und maligner Hautläsionen derselben Person auf ihren Sec62-Gehalt nahezu unmöglich.

Trotzdem ist das Ergebnis des Vergleiches maligner und benigner Läsionen recht eindrücklich und es zeigt sich eine signifikant höhere Sec62-Expression in Melanomen im Vergleich mit benignen Hautläsionen: kongenitaler- ($p=0,000$) und blauer Nävus ($p=0,000$).

Sec62/Spitznävus

Auffallend ist, dass der Spitznävus eine signifikant höhere ($p = 0,000$) Sec62-Expression aufweist, als die angefärbten Melanome. Von 29 angefärbten Spitznävi wiesen 93 % einen erhöhten IRS-Sec62-Score auf.

Mit dem Thema, ob und wie Spitznävi und Melanome sicher zu unterscheiden sind sowie Spitznävi als eindeutig benigne Struktur zu identifizieren sind, beschäftigen sich zahlreiche Studien. Beide Läsionen können morphologisch ähnliche Merkmale aufweisen (z. B. Asymmetrie, noduläre Strukturen, ...) [60, 85]. Außerdem zeichnet sich der Spitznävus durch initial schnelles Wachstum aus, welches die Abgrenzung zum Melanom weiter erschwert [4]. Um die Identifikation zu vereinfachen, hat die International Dermoscopy Society eine Meta-Analyse von 15 Studien, die sich mit der dermatoskopischen Identifikation von Spitznävi befassen, durchgeführt. Trotz vereinfachter Leitlinien gibt es immer noch Läsionen, wie den atypischen Spitznävus, der auch histopathologisch nicht sicher von einem Melanom zu unterscheiden ist [60]. Dass die Sec62-Expression in beiden Läsionen, im Vergleich mit benignen Nävi erhöht ist, fügt sich in das Gesamtbild der Gemeinsamkeiten beider Hautläsionen und die Schwierigkeit der Differenzierung dieser ein.

Obwohl sich die Höhe des IRS-Sec62-Scores in Spitznävi signifikant ($p=0,000$) von der in Melanomen unterscheidet, ist eine eindeutige Differenzierung von Melanomen und Spitznävi anhand der Höhe ihrer Sec62-Expression nicht möglich, da sich sowohl Melanome als auch Spitznävi mit sowohl hohen als auch niedrigen IRS-Sec62-Scores zeigen.

Das maligne Potential des Spitznävus ist viel diskutiert und scheint von Spitznävus zu Spitznävus stark zu variieren [43, 72]. Da bisherige Studien zeigten, dass ein hoher Sec62-Gehalt in einer Tumorzelle, stimulierend auf Migration und Invasion des Tumors wirkte [14, 65, 67], ist der Einfluss der erhöhte Sec62-Expression in Spitznävi zu evaluieren. Diese wäre ein Möglichkeit zu erklären, dass im Jahr 1989 von Spitznävi befallene Lymphknoten gefunden wurden [91] und somit die Fähigkeit der Migration im Körper besitzen.

Da insbesondere atypische Spitznävi mit einem erhöhten Entartungspotential einhergehen [43], stellt sich die Frage, ob die Sec62-Expression in diesen Läsionen einen Einfluss auf den Übergang in eine maligne Läsion hat.

Für diese These sprechen würde, dass in dysplastischen Zervixzellen (HeLa) gezeigt wurde, dass eine Überexpression von Sec62 den Übergang einer zervikalen intraepithelialen Läsion (CIN) in eine invasive Neoplasie triggerte [65]. Jedoch ist ein Einfluss, von bis jetzt unbekannten Faktoren auf diese Transformation von nicht-maligne in maligne Läsion nicht auszuschließen.

Sec62/Kongenitaler Nävus

Die Höhe der Sec62-Expression ist in kongenitalen Nävi signifikant höher als in blauen Nävi, jedoch niedriger als in Melanomen und Spitznävi. Im Vergleich mit dem IRS-Score der Spitznävi wiesen von 38 untersuchten Proben lediglich 23 % (n = 9) einen hohen IRS-Sec62-Score auf.

Von Kongenitalen Nävi, vor allem sogenannte Riesennävi mit einem Durchmesser von über 20cm, geht ein erhöhtes Risiko Entartungsrisiko in ein Melanom aus [13], beziehungsweise das Risiko der Entartung nimmt mit steigender Größe zu [57]. Die erhöhte Sec62 Expression der kongenitalen Nävi, könnte ein Hinweis auf eben dieses maligne Potential sein. Auch hier wäre die zuvor genannte Studie über den Übergang von zervikalen intraepithelialen Neoplasien (CIN) in Zervixkarzinome [65] ein Hinweis, dass Sec62 einen Einfluss auf die Entartung einer benignen Läsion haben könnte. Allerdings ist dieser Aspekt lediglich in einer Studie untersucht und wie bereits zuvor erwähnt, kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein bis jetzt unbekannter Faktor die eigentliche Transformation der CIN in ein Karzinom verursachte. Dies bleibt in zukünftigen Studien zu evaluieren.

Interessant wäre, ob es sich bei den 9 Läsionen mit hoher Sec62-Expression um kongenitale Nävi mit besonders großem Durchmesser handelte oder ob diese in der Vergangenheit entarteten. Leider sind diese Daten durch das lang zurückliegen der Exzision und oft nicht kontinuierliche Betreuung durch die Hautklinik des Uniklinikums des Saarlandes nicht vollständig ermittelbar.

Würde sich bestätigen, dass eine erhöhte Sec62-Expression in kongenitalen Nävi ein erhöhtes Risiko für eine maligne Entartung darstellt, könnten kongenitale Nävi mit erhöhter Sec62 Expression engmaschiger beobachtet oder gezielt exzidiert werden.

Sec62 als Prognosefaktor / Gesamtüberleben

Greiner *et al.* zeigten 2011 erstmals eine Korrelation zwischen der histopathologischen Einteilung von Prostatakarzinomen, dem Gleason-Score und der Höhe der Sec62-Überexpression. Mit steigendem

Gleason-Score nahm auch die Höhe der Sec62-Expression zu und ging mit einem schlechteren klinischen Verlauf einher [39, 40, 52].

Bei dysplastischen Läsionen der Zervix und Cervixkarzinomen wurde eine vergleichbare Beobachtung gemacht. Hier wurden 107 Zellabstriche der Zervix mithilfe einer FISH Analyse untersucht und es zeigte sich, dass mit Schwere der Dysplasie bzw. der Invasivität des Karzinoms, die Sec62-Expression stieg [65].

Dieser Trend spiegelt sich auch in den Ergebnissen der immunhistochemischen Färbung der in dieser Studie untersuchten Melanome wider. So zeigte sich eine signifikante Zunahme der Sec62-Expression mit steigendem Tumorstadium.

Dieses Ergebnis ließ sich ebenso bei der Tumordicke nach Breslow, welche mit steigendem Dicke mit einer schlechteren Prognose einhergeht [29], darstellen. Hier zeigt sich ebenfalls eine stark positive Korrelation des Breslow-Levels mit der Höhe der Sec62-Expression.

Der mittlerweile nicht mehr verwendete Prognosefaktor Clark Level, fügt sich in die zuvor beschriebenen Ergebnisse ein; hier sieht man mit steigendem Clark Level eine signifikante Zunahme der Sec62-Expression.

Da sich sowohl das Tumorstadium, Tumordicke nach Breslow sowie die Clark-Level das Melanom nach seiner Ausbreitung im Gewebe oder Invasivität klassifizieren [29], ist zu überlegen, inwieweit die Sec62-Expression das invasive Wachstum des Melanoms beeinflusst. Greiner et al. testete 2011 wie Sec62 die Invasivität von Tumorzellen beeinflusst. Hierfür wurde ein Sec62-Gen-Silencing an Tumorzellreihen, die mit einer Sec62-Überexpression einhergehen (Prostatakarzinom(PC3), Fibrosarkom (HT1080), Glioblastom(TX3868), Lungenkarzinom(A549) und NSCLC(H1299)) durchgeführt[39]. In allen Tumorentitäten konnte eine signifikante Reduktion des invasiven Wachstums festgestellt werden [39]. Dieses Verhalten konnte in einer Studie mit Zellen von Zervixkarzinomen ebenfalls beobachtet werden [65]. Die Ergebnisse unsere Studie kombiniert mit denen der zuvor genannten Studien legt nahe, dass auch bei Melanomen die Fähigkeit der Invasion mit steigender Sec62-Expression zunimmt. Dies sicher zu bestätigen, wird Inhalt zukünftiger Studien sein.

Wir untersuchten einen weiteren wichtigen Prognosefaktor des Malignen Melanoms, das Vorhandensein von Ulzerationen, im Hinblick auf die Höhe der Sec62-Expression. Das Vorhandensein von Ulzerationen wirkt sich negativ auf die Prognose des erkrankten Patienten aus [18]. Es zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Sec6-Expression bei Melanomen mit Ulzerationen im Vergleich mit Melanomen ohne Ulzerationen.

Da die Tumordicke nach Breslow, das Tumorstadium des Melanoms und das Vorhandensein von Ulzerationen von hoher prognostischer Relevanz für den weiteren klinischen Verlauf einer Melanom Erkrankung sind [29] und diese positiv mit der Sec62-Expression korrelieren, könnte dies ein Hinweis für einen negativen Einfluss einer erhöhten Sec62-Expression auf die Prognose des Melanoms sein.

In Studien konnte bei NSCLC [66], Zervixkarzinomen und Kopf-Halstumoren gezeigt werden, dass sich die Höhe der Sec62 Expression negativ auf das Gesamtüberleben des Patienten auswirkte.

Dieses Ergebnis konnten wir in unserer Studie nicht bestätigen, wobei, wenn auch nicht signifikant, wir feststellen konnten, dass Patienten mit hoher Sec62 Expression ein kürzeres Gesamtüberleben hatten als Patienten mit niedriger Sec62-Expression. Dass das Ergebnis nicht signifikant ist, könnte an der vergleichsweise kleinen Kohorte liegen und dass bei 44 Patienten das Austrittsdatum mit dem 01.01.2017 festgelegt werden musste, da keine Informationen über mögliche Sterbedaten ermittelbar waren. Es ist zu überlegen, ob sich das Ergebnis der vorherigen Studien anderer Tumorentitäten, dass Sec62 einen Einfluss auf das Gesamtüberleben hat, bei einem größeren Patientenkollektiv auch bei Melanomen finden lässt.

Sec62/Progressfreies Überleben

Im Gegensatz hierzu zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Dauer des progressfreien Überlebens und der Höhe der Sec62-Expression. Patienten mit Melanomen mit hohem IRS-Sec62-Score, zeigten einen deutlich früheren Progress der Melanom Erkrankung, als Patienten mit Melanomen mit niedrigem IRS-Sec62-Score. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen einer chinesischen Studie, in welcher der Progress von hepatuzellulären Karzinomen (HCC) in Bezug auf die Höhe ihrer Sec62-Expression nach Resektion untersucht wurde. Hier zeigte sich ein schnellerer Progress bei Patienten mit hoher Sec62-Expression [106]. Dieses Ergebnis konnte 2019 in einer weiteren Studie aus China bestätigt werden. Bei dieser wurden, unter anderem 60 Gewebeproben von Patienten mit HCCs immunhistochemisch für Sec62 angefärbt und es zeigte sich ein deutlich früherer Progress des Karzinoms bei hoher Sec62-Expression, als bei niedriger. Auch am Mausmodell ließ sich dieser Effekt durch Hochregulation der Sec62-Expression an HCCs replizieren [30]. Dies lässt vermuten, dass auch in Melanomen Sec62 eine Rolle beim Progress der Erkrankung spielen könnte. Sollte sich diese These in zukünftigen Studien bestätigen, so könnte dies auch klinische Auswirkungen haben. Beispielsweise wäre es möglich Patienten, welche Melanome mit hoher Sec62-Expression aufweisen, nach Resektion enghmaschiger zu kontrollieren, um einen Progress der Erkrankung frühzeitig zu entdecken.

Sec62/ Lymphknotenmetastasen und Fernmetastasen

Neben einer verminderten Invasivität von Karzinomen durch Sec62-Gensilencing, zeigte sich auch eine signifikante Reduktion der Migration der Krebszellen [39]. Diesen durch Greiner et. al. beschriebenen Vorgang konnte von weiteren Forschungsgruppen repliziert und bestätigt werden [39, 40, 66, 67, 105]. So verloren Zervixkarzinome [65], HNSCCs [14], Lungen- [39] und Schilddrüsenkarzinome [66], Prostatakarzinome, Fibrosarkome und Glioblastome [39] durch Sec62-Gensilencing ihr Migrationspotential.

Da die Migrationsfähigkeit der Tumorzellen die Bildung von Metastasen beeinflusst, betrachteten wir die Höhe der Sec62-Expression bei Melanomen mit- und ohne Lymphknoten- oder Fernmetastasen bei Erstdiagnose. Hier zeigte sich zum einen ein signifikanter Unterschied bei Lymphknotenmetastasen. Melanome die bereits Lymphknotenmetastasen entwickelten, wiesen eine signifikant höhere Sec62-Expression auf, als Melanome, welche bei Erstdiagnose ein N0-Stadium aufwiesen. Bei Melanomen ohne und mit bereits ausgebildeten Fernmetastasen zeigte sich widererwarten kein signifikanten Unterschied in der Höhe der Sec62-Expression. Wohl aber zeigte sich bei 75% der 16 M1-Melanompatienten ein hoher- und bei nur 52% der insgesamt 77 M0-Melanompatienten ein hoher IRS-Sec62-Score. Ob die ungleiche Verteilung in den zwei Gruppen Grund für die fehlende Signifikanz ist, wird in zukünftigen Studien zu evaluieren sein.

Denn dieses Phänomen konnte bereits bei anderen Tumorentitäten beobachtet werden. Bei Gewebeproben von Patienten mit invasiv duktalem Brustkrebs, wurde eine deutlich erhöhte Sec62-Expression bei Tumoren mit bereits ausgebildeten Metastasen beschrieben [97].

Jedoch wiesen von 87 angefärbten Melanomen mit M1- oder N1-Status, nur bei circa 72 % (n=43) einen hohen IRS-Sec62-Score auf. In den verbleibenden 28 % (n=12) zeigte sich ein niedriger IRS-Sec62-Score. Auch in Brustkrebszellen mit bereits ausgebildeten Metastasen, lies sich nicht in allen Gewebeproben ein hoher IRS-Sec62-Score nachweisen, wohl aber vereinzelte Zellen, die eine starke Färbung zeigten. Lediglich in einem einzigen Tumor mit bereits ausgebildeten Metastasen, konnten keine Zellen mit starker Färbung nachgewiesen werden[97].

Eine von Takacs et. al. entwickelte These besagte, dass bereits eine einzige Tumorzelle mit erhöhter Sec62-Expression in Mammakarzinomen für ein erhöhtes Metastasenrisiko genüge [97]. Da sich die Melanomzellen ähnlich präsentieren, wäre auch hier ein solcher Zusammenhang denkbar.

Abschließend ist davon auszugehen, dass konkordant zu vorherigen Studien an anderen Tumorentitäten, die Höhe der Sec62-Expression die Zellmigration und somit die Bildung von

Metastasen bei Melanomen steigert [39, 65, 105]. Unklar bleibt nach wie vor, welche genaue Funktion Sec62 genau in diesem Vorgang einnimmt.

Übertragen auf den klinischen Alltag, könnte eine Konsequenz sein, dass Patienten mit Melanomen mit erhöhter Sec62-Expression, in früheren Stadien schneller und intensiver auf eine Lymphknoten- als auch Fernmetastasierung gescreent werden könnten. Dieses Ergebnis an lebenden Zellen zu replizieren und diese These zu validieren, wird Inhalt zukünftiger Studien sein.

Sec62 und Melanomsubtypen

Die verschiedenen Subtypen der Melanome gehen mit unterschiedlich schnellem Wachstumsverhalten und Invasivität einher. So gibt es zum Beispiel mit dem nodulären Melanom, einen sehr schnell vertikal, invasiv wachsenden Tumor, wohingegen das superfiziell spreitende Melanom, sich durch langsames, zunächst horizontales Wachstum auszeichnet [3]. Auch zeigte sich, dass in den verschiedenen Subtypen verschiedene Treibermutationen, wie zum Beispiel BRAF, unterschiedlich häufig vorkommen [70, 107]. Ebenso wurde ein unterschiedliches gutes Ansprechen der Melanomsubtypen auf unterschiedliche Therapieoptionen beobachtet [76]. Insgesamt ist die aktuelle Studienlage zu diesem Thema noch sehr heterogen, wodurch eine eindeutige Zuordnung bestimmter Mutationen zu bestimmten Subtypen nicht möglich ist.

Da sich die unterschiedlichen Subtypen unter anderem durch ihre Invasivität unterscheiden [3] und diversen Studien ein Zusammenhang zwischen dem Grad der Invasivität eines Tumors und der Höhe der Sec62-Expression belegt worden ist [30, 39, 65], wäre anzunehmen, dass sich invasivere Subtypen, wie dem nodulären Melanom, sich in der Höhe ihrer Sec62-Expression von weniger invasiven Melanomen, wie dem superfiziell spreitenden Melanom, unterscheiden. Diese These konnten wir in unserer Studie nicht bestätigen. Grund hierfür könnte eine sehr kleine Fallzahl (n=50) und ungleiche Verteilung über die einzelnen Gruppen sein, was wiederum an den lückenhaften Angaben der histologischen Gutachten zu diesem Thema lag.

Zu einem ähnlichen Ergebnis ist auch eine Studie zum Thema des Sec62-Gehalts in invasiv duktalem Brustkrebs gekommen. Auch hier fand sich kein Unterschied in der Höhe der Sec62-Expression zwischen den Subtypen, obwohl diese sich in Wachstums- und Metastasierungsverhalten unterscheiden. Jedoch handelte es sich auch hier um ein kleines Patientenkollektiv (n = 53) [97].

Ob das kleine Patientenkollektiv Grund für den nicht signifikanten Unterschied der Höhe der Sec62-Expression ist oder ob sich die Melanomsotypen nicht in der Höhe ihrer Sec62-Expression unterscheiden, wird in zukünftigen Studien zu klären sein.

Sec62 in Filia stärker erhöht als in Primarius

Nicht nur weisen Melanome mit bereits vorhandenen Lymphknoten-oder Fernmetastasen eine erhöhte Sec62-Expression auf, sondern auch die ausgebildeten Filiae. Diese haben eine signifikant höhere Sec-Expression als die Primärtumore. Ein direkter Vergleich zwischen Primarius und Filia ist nicht möglich, da die untersuchten Filia nicht durch die untersuchten Melanome ausgebildet wurden.

Jedoch zeigte auch Linxweiler et. al, welcher die Lymphknotenmetastasen von Kopfhalstumoren und sogenannten CUPs (Cancer of unknown primary) untersuchte, eine deutlich höhere Sec62-Expression in Metastasen als in den zugehörigen Primärtumoren [14].

Auswirkungen auf die Therapie durch erhöhte Sec62-Werte in Melanomen

In zurückliegenden Studien zeigte sich bereits, dass die Höhe der Sec62-Expression einen Einfluss auf die Wirksamkeit bestimmter Chemotherapeutika hat. Diese wirkt sich insbesondere negativ auf die Wirksamkeit von SERCA-Inhibitoren wie Thapsigargin aus [56, 67], welche im Idealfall durch die Hemmung der Kalziumpumpe des ERs eine Aufhebung des Kalziumkonzentrationsgefälles zwischen Lumen des ERs und Zytosols bewirken, was wiederum die Zelle in ER-Stress versetzt und schlussendlich den programmierten Zelltod dieser Zelle induziert [102, 109].

Bei Prostata-Karzinomen entdeckte man eine Resistenz jener Tumorzellen mit einer erhöhten Sec62-Expression gegen diese Therapie [67]. Eine Sec62-Überexpression wurde in ca. 50 % aller Prostatakarzinomproben gefunden [40]. Grund für die Resistenz dieser Tumore ist, dass Sec62 in Zusammenspiel mit Calmodulin, den Kalziumausstrom aus dem ER ins Zytosol verhindert und somit die Zelle geringerem ER-Stress ausgesetzt ist und es so nicht zur Apoptose kommt [67].

Hieraus resultierten Überlegungen eine Therapieanpassung durch Kombination von SERCA-Inhibitoren mit Calmodulin-Antagonisten (Trifluoperazin) vorzunehmen. Dieser hemmt Sec62 indirekt und wodurch der SERCA-Inhibitor seine volle Wirkung entfalten kann [56].

Eine 2007 von der American Association for Cancer Research veröffentlichte Studie beschreibt, dass auch Melanome Mechanismen besitzen sich vor ER-Stress zu schützen und so resistent gegenüber Chemotherapeutika sind, die diesen induzieren [21]. In dieser und in vorherigen Studien zeigt sich, dass sich diese Resistenz teilweise durch eine vermehrte Aktivität der mitogen-activated protein-kinase (MEK) erklären lässt [51].

Mit dieser Studie könnte ein ergänzender neuer Ansatz entstanden sein, diesen Mechanismus weiter zu entschlüsseln. Denn die erhöhte Sec62-Expression in Melanomen könnte ein weiterer Faktor sein, welcher die Melanomzellen vor ER-Stress schützt.

Es ist also auch bei der Therapie von Melanomen zu überlegen, ob eine Kombination verschiedener Stoffe, wie zum Beispiel dem Calmodulin-Antagonist TFP, einem MEK-Inhibitor Trametinib zusammen mit Thapsigargin eine Möglichkeit wären, die verschiedenen Schutzmechanismen vor ER-Stress der Melanomzelle zu umgehen.

Ein weiterer ER-Stress-Induktor in der Therapie des malignen Melanoms ist Vemurafenib, welches, ähnlich Thapsigargin, mit einer Erhöhung des zytosolischen Kalziums eine Apoptose Induktion bewirkt [9]. Diese Therapie ist bei Melanomen mit BRAF-Mutation seit 2011 zugelassen und zeigt ein gutes Therapieansprechen [34]. Doch auch hier sind nicht alle Melanome sensibel für diese Therapie. Ebenso kommt es immer wieder zur Entwicklung von Therapieresistenzen [69]. Nun wäre es in zukünftigen Studien interessant herauszufinden, ob die erhöhte Sec62-Expression, ähnlich wie bei Prostatakarzinomen, Grund für diese Therapieresistenz sein könnte.

Ebenso wie bei Prostatakarzinomen, zeigte sich in unserer Studie nicht in allen Melanomen eine hohe Sec62-Expression [40]. Von 93 untersuchten Melanomen zeigte sich in 56 % aller Gewebeproben ein hoher IRS-Sec62-Score. Es ist zu evaluieren, ob diese 56 % für ein schlechteres Therapieansprechen gegenüber ER-Stress-Induktoren verantwortlich sein könnten.

Würde sich diese These bestätigen, so könnten auch hier neue Therapieoptionen entstehen, beispielsweise die Kombination mit einem Calmodulin-Antagonisten, um so einen Resistenzmechanismus des Melanoms zu eliminieren. Außerdem ist zu überlegen, ob man die Höhe der Sec62-Expression als routinemäßigen Screeningparameter nutzen sollte, um frühzeitige Therapieoptimierungen vornehmen zu können.

Ebenso ist zu evaluieren, ob die erhöhte Sec62-Expression in Melanomen konstant ist oder ob diese im Krankheitsverlauf variiert und so bei der Entwicklung von Therapieresistenzen eine Rolle spielt. Dafür sprechen würde eine Studie, welche zeigte, dass der kodierende Genabschnitt nicht mit der

tatsächlichen Sec62-Expression korrelieren muss [39]. Dies wiederum lässt vermuten, dass die Zelle Mechanismen besitzt, die Sec62-Expression hoch oder runter zu regulieren. Wäre Sec62 ein Auslöser für die Entwicklung einer Resistenz in Melanomen, so wäre eine generelle Kombination mit einem Calmodulin-Antagonisten zu empfehlen, um die Bildung dieser Resistenz von vornerein zu verhindern. Ein Screening wäre in diesem Fall weniger sinnvoll, da sich eine Hochregulation der Sec62-Expression erst nach Analyse der Gewebeprobe entwickeln könnte.

Zusammenfassung- Kernaussagen-Ausblick

Abschließend ist festzustellen, dass die Ergebnisse dieser Studie konkordant mit vorherigen Studien zum Thema der Sec62-Expression in bösartigen Tumoren zu sein scheinen [14, 27, 39, 40, 53, 65-67, 94, 95, 98, 105, 106].

Die Sec62-Expression ist in malignen Melanomen im Vergleich zu benignen Läsionen deutlich erhöht. Auch konnte in dieser Studie ein signifikanter Zusammenhang zwischen erhöhter Sec62-Expression und der vermehrten Invasion und Migration von Melanomzellen festgestellt werden.

Des Weiteren zeigte sich, dass mit fortgeschrittenem Tumorstadium die Höhe der Sec62-Expression positiv korrelierend zunahm.

Ebenso wiesen Tumore mit bereits ausgebildeten Lymphknotenmetastasen eine deutlich erhöhte Sec62-Expression auf.

Außerdem zeigte sich, dass Melanome mit erhöhter Sec62-Expression mit einem schnelleren Progress der Erkrankung einhergingen.

An anderen Tumorentitäten wurde bereits nachgewiesen, dass eine erhöhte Sec62-Expression nicht nur die Invasion und Migration von Tumorzellen positiv beeinflusst [39], sondern scheint sie die Zelle auch widerstandsfähiger gegenüber ER-Stress zu machen [10, 35, 40, 66, 67]. Es zeigte sich eine Therapieresistenz gegenüber Substanzen, die in den Tumorzellen ER-Stress induzieren. Diese konnte durch Zugabe eines Calmodulin-Antagonisten, welcher Sec62 indirekt hemmt, umgangen werden [56, 67].

Auch in der Melanomtherapie kommen Substanzen zum Einsatz, welche ER-Stress in den Melanomzellen induzieren [9, 51]. Vorbestehende Resistenzen und sich entwickelnde Resistenzen beschränken den Therapieerfolg stark ein [69].

Thema für zukünftige Studien könnte sein, ob die erhöhte Sec62-Expression Grund für Resistenzen gegenüber diesen Therapien ist und ob auch hier eine Zugabe eines Calmodulin-Antagonisten sinnvoll wäre.

Ein gezieltes Screening der Melanome auf ihren Sec62-Gehalt vor Therapiebeginn, könnte eine Konsequenz sein.

Neben der Therapieanpassung geben die Ergebnisse dieser Studie auch Anlass zur Diskussion von Sec62 als prognostischem Marker. Ein schnellerer Progress von Melanomen mit hoher Sec62-Expression und der erhöhte Gehalt in Melanomen mit bereits ausgebildeten Metastasen, begründen diese Überlegung.

Eine Konsequenz könnten frühere Kontrollen und intensivere diagnostische Staging-Maßnahmen bei Melanomen mit hoher Sec62-Expression sein, um einen Progress früher zu erkennen.

In dieser Studie konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Höhe der Sec62-Expression und dem Gesamtüberleben der Patienten gezeigt werden. Im Kontrast hierzu stehen Studien anderer Tumorentitäten, welche ein deutlich schlechteres Gesamtüberleben von Menschen mit Tumoren mit hohem Sec62-Gehalt zeigten.

Es ist zu überlegen, ob ein größeres Patientenkollektiv doch einen signifikanten Zusammenhang zwischen Gesamtüberleben und hoher Sec62-Expression zeigen könnte

Aus der Reihe fällt der Spitznävus, der als benigne melanozytäre Läsion definiert ist und die höchsten IRS-Sec62-Score-Werte aller Läsionen aufwies. Dieses Ergebnis reiht sich in eine lange Liste an Gemeinsamkeiten zwischen Melanomen und Spitznävi ein, was die eindeutige Differenzierung dieser so erschwert und besonders bei atypischen Spitznävi oft eine eindeutige Diagnose nicht möglich macht [4, 43, 61, 68, 81, 91].

Es bleibt in zukünftigen Studien zu evaluieren, welchen Einfluss die hohe Sec62-Expression auf den Spitznävus hat und ob diese beispielsweise Trigger für eine maligne Entartung eines Spitznävus sein könnte.

6 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Foto Malignes Melanom	17
Abb. 2 Foto blauer Nävus	19
Abb. 3 Foto Spitznävus	20
Abb. 4 Foto kongenitaler Nävus	21
Abb. 5 Säulendiagramm alle Diagnosen	31
Abb. 6 Säulendiagramm Geschlecht und MM	32
Abb. 7 Säulendiagramm T-Stadium	32
Abb. 8 Säulendiagramm Lokalisation der MM	33
Abb. 9 Säulendiagramm Ulzerationen MM	33
Abb. 10 Foto MM pT1-Stadium mit- und ohne AK 10-/40-fache Vergrößerung	35
Abb. 11 Foto MM pT2-Stadium mit- und ohne AK 10-/40-fache Vergrößerung	35
Abb. 12 Foto MM pT3-Stadium mit- und ohne AK 10-/40-fache Vergrößerung	36
Abb. 13 Foto MM pT5-Stadium mit- und ohne AK 10-/40-fache Vergrößerung	36
Abb. 14 Boxplot Sec62/ T-Stadium MM	36
Abb. 15 Streudiagramm Sec62/ Tumordicke nach Breslow	37
Abb. 16 Boxplot Sec62/ Geschlecht MM	38
Abb. 17 Boxplot Sec62/ Ulzerationen der MM	39
Abb. 18 Boxplot Sec62/ Ulzerationen nach T-Stadium der MM	41
Abb. 19 Boxplot Sec62/ Sentinellymphknoten der MM	42
Abb. 20 Boxplot Sec62/ Sentinellymphknoten nach T-Stadium der MM	44
Abb. 21 Boxplot Sec62/ Fernmetastasierung der MM	46
Abb. 22 Boxplot Sec62/ Fernmetastasierung nach T-Stadium der MM	47
Abb. 23 Boxplot Sec62/ Clark-Level	48
Abb. 24 Boxplot Sec62/ untersuchte Diagnosen	49
Abb. 25 Foto Filia mit- und ohne AK 10-/40-fache Vergrößerung	51
Abb. 26 Boxplot Sec62/ MM/ Filiae	51
Abb. 27 Foto Spitznävus mit- und ohne AK 10-/40-fache Vergrößerung	52
Abb. 28 Boxplot Sec62/ MM/ Spitznävi	52
Abb. 29 Boxplot Sec62/ Alter Spitznävi	53
Abb. 30 Streudiagramm Sec62/ Alter Spitznävi	54
Abb. 31 Foto blauer Nävus mit- und ohne AK in 10-/40-facher Vergrößerung	55
Abb. 32 Boxplot Sec62/ MM/ blaue Nävi	55
Abb. 33 Foto kongenitaler Nävus mit- und ohne AK in 10-/40-facher Vergrößerung	56

Abb. 34 Boxplot Sec62/ MM/ kongenitale Nävi.....	56
Abb. 35 Boxplot Sec62/ Spitznävi/ blaue Nävi.....	57
Abb. 36 Boxplot Sec62/ Spitznävi/ kongenitale Nävi.....	58
Abb. 37 Boxplot Sec62/ blaue Nävi/ kongenitale Nävi	59
Abb. 38 Boxplot Sec62/ MM und Filia/ Alter in Dekaden	60
Abb. 39 Boxplot Sec62/ MM-Subtypen.....	61
Abb. 40 Überlebenskurve MM nach Tumorstadien.....	62
Abb. 41 Sec62-Expression in MM hoch/niedrig.....	63
Abb. 42 Progressfreies Überleben/Tumorstadien des MM.....	64
Abb. 43 Progressfreies Überleben/Sec62-Expression in MM hoch/niedrig	64

7 Tabellenverzeichnis

Tab. 1 T-Klassifikation des Primärtumors beim malignen Melanom (AJCC 2009)	13
Tab. 2 N-Klassifikation der regionären Lymphknoten beim MM (AJCC 2009).....	14
Tab. 3 M-Klassifikation der Fernmetastasierung beim MM (AJCC 2009)	14
Tab. 4 Klinische Stadieneinteilung des MMs (AJCC2016).....	15
Tab. 5 Clark Level.....	15
Tab. 6 Auswertung des Immunreaktiven Scores.....	29
Tab. 7 Tumordicke nach Breslow der untersuchten MM.....	34
Tab. 8 Kreuztabelle M0/M1 und Sec62 hoch/niedrig	45
Tab. 9 Kreuztabelle alle Diagnosen und Sec62 hoch/niedrig	50
Tab. 10 Alter der Patienten mit Spitznävi und Höhe des IRS-Sec62-Scores.....	53
Tab. 11 Zusammenfassung hochsignifikanter Ergebnisse	65
Tab. 12 Zusammenfassung signifikanter Ergebnisse.....	66
Tab. 13 Anzahl aller Gewebeproben mit Sec62 hoch/niedrig	68

8 Quellenverzeichnis

1. A.H. Coons, H.J.C., N.R. Jones, E. Berliner, , *The Demonstration of Pneumococcal Antigen in Tissues by the Use of Fluorescent Antibody*. The Journal of Immunology, 1942. **45**(3): p. 159-170.
2. Allen, D.G., et al., *Progressive genetic aberrations detected by comparative genomic hybridization in squamous cell cervical cancer*. Br J Cancer, 2000. **83**(12): p. 1659-63.
3. Altmeyers Enzyklopädie. *Melanom c43.-*. 25.10.2020; Available from: <https://www.enzyklopaedie-dermatologie.de/dermatologie/melanom-2410>.
4. Argenziano, G., et al., *Dermoscopic pitfalls in differentiating pigmented Spitz naevi from cutaneous melanomas*. Br J Dermatol, 1999. **141**(5): p. 788-93.
5. *Ärzteblatt. Immuntherapie des metastasierten melanoms: Hohe antitumorwirkung belegt*. 2014; Available from: <https://www.aerzteblatt.de/archiv/161328/Immuntherapie-des-Metastasierten-Melanoms-Hohe-Antitumorwirkung-belegt>.
6. *Ärzteblatt, D. Malignes melanom: Durchbruch in der therapie*. 2014; Available from: <https://www.aerzteblatt.de/archiv/163355/Malignes-Melanom-Durchbruch-in-der-Therapie>.
7. Au - Pikor, L.A., et al., *DNA Extraction from Paraffin Embedded Material for Genetic and Epigenetic Analyses*. JoVE, 2011(49): p. e2763.
8. Barrett, J.H., et al., *Fine mapping of genetic susceptibility loci for melanoma reveals a mixture of single variant and multiple variant regions*. Int J Cancer, 2015. **136**(6): p. 1351-60.
9. Beck, D., et al., *Vemurafenib potently induces endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in BRAFV600E melanoma cells*. Sci Signal, 2013. **6**(260): p. ra7.
10. Bergmann, T.J., et al., *Role of SEC62 in ER maintenance: A link with ER stress tolerance in SEC62-overexpressing tumors?* Mol Cell Oncol, 2017. **4**(2): p. e1264351.
11. Berning, L., et al., *In vitro selective cytotoxicity of the dietary chalcone cardamomin (CD) on melanoma compared to healthy cells is mediated by apoptosis*. PLoS One, 2019. **14**(9): p. e0222267.
12. Bevona, C., et al., *Cutaneous melanomas associated with nevi*. Arch Dermatol, 2003. **139**(12): p. 1620-4; discussion 1624.
13. Bittencourt, F.V., et al., *Large congenital melanocytic nevi and the risk for development of malignant melanoma and neurocutaneous melanocytosis*. Pediatrics, 2000. **106**(4): p. 736-41.
14. Bochen, F., et al., *Effect of 3q oncogenes SEC62 and SOX2 on lymphatic metastasis and clinical outcome of head and neck squamous cell carcinomas*. Oncotarget, 2017. **8**(3): p. 4922-4934.
15. Bockmuhl, U., et al., *Distinct patterns of chromosomal alterations in high- and low-grade head and neck squamous cell carcinomas*. Cancer Res, 1996. **56**(23): p. 5325-9.
16. Bolar, N.A., et al., *Heterozygous Loss-of-Function SEC61A1 Mutations Cause Autosomal-Dominant Tubulo-Interstitial and Glomerulocystic Kidney Disease with Anemia*. Am J Hum Genet, 2016. **99**(1): p. 174-87.
17. Bowling, J., et al., *Dermoscopy key points: recommendations from the international dermoscopy society*. Dermatology, 2007. **214**(1): p. 3-5.
18. Callender, G.G. and K.M. McMasters, *What does ulceration of a melanoma mean for prognosis?* Adv Surg, 2011. **45**: p. 225-36.
19. Campos, P.F. and T.M. Gilbert, *DNA extraction from formalin-fixed material*. Methods Mol Biol, 2012. **840**: p. 81-5.

20. Chang, Y.C., et al., *Molecular cytogenetic characterization of esophageal cancer detected by comparative genomic hybridization*. J Clin Lab Anal, 2010. **24**(3): p. 167-74.
21. Chen, L.H., et al., *Inhibition of Endoplasmic Reticulum Stress–Induced Apoptosis of Melanoma Cells by the ARC Protein*. Cancer Research, 2008. **68**(3): p. 834-842.
22. Clark, W.H., et al., *The Histogenesis and Biologic Behavior of Primary Human Malignant Melanomas of the Skin*. Cancer Research, 1969. **29**(3): p. 705-727.
23. Cohen, J., *Statistical power analysis for the behavioral sciences*. 1988, Hillsdale, N.J.: L. Erlbaum Associates.
24. Davila, S., et al., *Mutations in SEC63 cause autosomal dominant polycystic liver disease*. Nat Genet, 2004. **36**(6): p. 575-7.
25. Dehan, E., et al., *Chromosomal aberrations and gene expression profiles in non-small cell lung cancer*. Lung Cancer, 2007. **56**(2): p. 175-84.
26. Deshaies, R.J., et al., *Assembly of yeast Sec proteins involved in translocation into the endoplasmic reticulum into a membrane-bound multisubunit complex*. Nature, 1991. **349**(6312): p. 806-8.
27. Deshaies, R.J. and R. Schekman, *SEC62 encodes a putative membrane protein required for protein translocation into the yeast endoplasmic reticulum*. J Cell Biol, 1989. **109**(6 Pt 1): p. 2653-64.
28. Deutsche Krebsgesellschaft. *Vorbeugung und frühererkennung von hautkrebs*. 03.07.2020; Available from: <https://www.krebsgesellschaft.de/onko-internetportal/basis-informationen-krebs/krebsarten/hautkrebs/frueherkennung.html>.
29. DKG, D.K., AWMF. *Leitlinien Programm Onkologie: Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms, Langversion 3.1, 2018*. 2018; Version 3.1 - Juli 2018; [Available from: https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/032-024OL_1_S3_Melanom-Diagnostik-Therapie-Nachsorge_2018-07_01.pdf].
30. Du, J., et al., *Sec62 promotes early recurrence of hepatocellular carcinoma through activating integrin/CAV1 signalling*. Oncogenesis, 2019. **8**(12): p. 74.
31. Elwood, J.M. and J. Jopson, *Melanoma and sun exposure: an overview of published studies*. Int J Cancer, 1997. **73**(2): p. 198-203.
32. Erdmann, F., et al., *Interaction of calmodulin with Sec61alpha limits Ca²⁺ leakage from the endoplasmic reticulum*. Embo j, 2011. **30**(1): p. 17-31.
33. Flaherty, K.T., et al., *Combined BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAF V600 mutations*. N Engl J Med, 2012. **367**(18): p. 1694-703.
34. Flaherty, K.T., et al., *Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma*. N Engl J Med, 2010. **363**(9): p. 809-19.
35. Fumagalli, F., et al., *Translocon component Sec62 acts in endoplasmic reticulum turnover during stress recovery*. Nat Cell Biol, 2016. **18**(11): p. 1173-1184.
36. Gandini, S., et al., *Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi*. Eur J Cancer, 2005. **41**(1): p. 28-44.
37. Gandini, S., et al., *Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure*. European journal of cancer, 2005. **41**(1): p. 45-60.
38. Garbe, C., et al., *Adjuvant low-dose interferon {alpha}2a with or without dacarbazine compared with surgery alone: a prospective-randomized phase III DeCOG trial in melanoma patients with regional lymph node metastasis*. Ann Oncol, 2008. **19**(6): p. 1195-201.
39. Greiner, M., et al., *Silencing of the SEC62 gene inhibits migratory and invasive potential of various tumor cells*. Int J Cancer, 2011. **128**(10): p. 2284-95.
40. Greiner, M., et al., *Sec62 protein level is crucial for the ER stress tolerance of prostate cancer*. Prostate, 2011. **71**(10): p. 1074-83.

41. Grob, J.J., et al., *Randomised trial of interferon alpha-2a as adjuvant therapy in resected primary melanoma thicker than 1.5 mm without clinically detectable node metastases. French Cooperative Group on Melanoma.* Lancet, 1998. **351**(9120): p. 1905-10.
42. Grob, J.J., et al., *Count of benign melanocytic nevi as a major indicator of risk for nonfamilial nodular and superficial spreading melanoma.* Cancer, 1990. **66**(2): p. 387-95.
43. Harms, K.L., et al., *Atypical Spitz Tumors: A Diagnostic Challenge.* Arch Pathol Lab Med, 2015. **139**(10): p. 1263-70.
44. Haverty, P.M., et al., *High-resolution analysis of copy number alterations and associated expression changes in ovarian tumors.* BMC Med Genomics, 2009. **2**: p. 21.
45. He, H., et al., *MiR-4429 prevented gastric cancer progression through targeting METTL3 to inhibit m(6)A-caused stabilization of SEC62.* Biochem Biophys Res Commun, 2019. **517**(4): p. 581-587.
46. Heselmeyer, K., et al., *Advanced-stage cervical carcinomas are defined by a recurrent pattern of chromosomal aberrations revealing high genetic instability and a consistent gain of chromosome arm 3q.* Genes Chromosomes Cancer, 1997. **19**(4): p. 233-40.
47. High, S., et al., *Sec61p is adjacent to nascent type I and type II signal-anchor proteins during their membrane insertion.* J Cell Biol, 1993. **121**(4): p. 743-50.
48. Holly, E.A., et al., *Number of melanocytic nevi as a major risk factor for malignant melanoma.* J Am Acad Dermatol, 1987. **17**(3): p. 459-68.
49. Huang, J.B., et al., *Identification of channels promoting calcium spikes and waves in HT1080 tumor cells: their apparent roles in cell motility and invasion.* Cancer Res, 2004. **64**(7): p. 2482-9.
50. Jakobsen, C.M., et al., *Design, synthesis, and pharmacological evaluation of thapsigargin analogues for targeting apoptosis to prostatic cancer cells.* J Med Chem, 2001. **44**(26): p. 4696-703.
51. Jiang, C.C., et al., *Inhibition of MEK Sensitizes Human Melanoma Cells to Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Apoptosis.* Cancer Research, 2007. **67**(20): p. 9750-9761.
52. Jung, V., et al., *Genomic and expression analysis of the 3q25-q26 amplification unit reveals TLOC1/SEC62 as a probable target gene in prostate cancer.* Mol Cancer Res, 2006. **4**(3): p. 169-76.
53. Jung, V., et al., *Genomic and expression analysis of the 3q25-q26 amplification unit reveals TLOC1/SEC62 as a probable target gene in prostate cancer.* Mol Cancer Res, 2006. **4**(3): p. 169-76.
54. Kalia, M., *Personalized oncology: recent advances and future challenges.* Metabolism, 2013. **62 Suppl 1**: p. S11-4.
55. Kittler, H., et al., *Identification of clinically featureless incipient melanoma using sequential dermoscopy imaging.* Arch Dermatol, 2006. **142**(9): p. 1113-9.
56. Korbel, C., et al., *Treatment of SEC62 over-expressing tumors by Thapsigargin and Trifluoperazine.* Biomol Concepts, 2018. **9**(1): p. 53-63.
57. Krenzel, S., A. Hauschild, and T. Schäfer, *Melanoma risk in congenital melanocytic naevi: a systematic review.* Br J Dermatol, 2006. **155**(1): p. 1-8.
58. L Fan, P.J., *Handbook of practical immunohistochemistry*, ed. Fan Lin and J. Prichard. 2015: Springer-Verlag New York.
59. Lakkaraju, A.K., et al., *Efficient secretion of small proteins in mammalian cells relies on Sec62-dependent posttranslational translocation.* Mol Biol Cell, 2012. **23**(14): p. 2712-22.

60. Lallas, A., et al., *Update on dermoscopy of Spitz/Reed naevi and management guidelines by the International Dermoscopy Society*. British Journal of Dermatology, 2017. **177**(3): p. 645-655.
61. Lallas, A., et al., *Likelihood of finding melanoma when removing a Spitzoid-looking lesion in patients aged 12 years or older*. J Am Acad Dermatol, 2015. **72**(1): p. 47-53.
62. Lang, S., et al., *Different effects of Sec61alpha, Sec62 and Sec63 depletion on transport of polypeptides into the endoplasmic reticulum of mammalian cells*. J Cell Sci, 2012. **125**(Pt 8): p. 1958-69.
63. Lang, S., et al., *Sec61 complexes form ubiquitous ER Ca²⁺ leak channels*. Channels (Austin), 2011. **5**(3): p. 228-35.
64. Lin, F. and Z. Chen, *Standardization of diagnostic immunohistochemistry: literature review and geisinger experience*. Arch Pathol Lab Med, 2014. **138**(12): p. 1564-77.
65. Linxweiler, M., et al., *Identification of SEC62 as a potential marker for 3q amplification and cellular migration in dysplastic cervical lesions*. BMC Cancer, 2016. **16**(1): p. 676.
66. Linxweiler, M., et al., *Sec62 bridges the gap from 3q amplification to molecular cell biology in non-small cell lung cancer*. Am J Pathol, 2012. **180**(2): p. 473-83.
67. Linxweiler, M., et al., *Targeting cell migration and the endoplasmic reticulum stress response with calmodulin antagonists: a clinically tested small molecule phenocopy of SEC62 gene silencing in human tumor cells*. BMC Cancer, 2013. **13**: p. 574.
68. Manchi, M. and V. Canzonieri, *Atypical melanocytic lesions: a historical overview*. Pol J Pathol, 2019. **70**(1): p. 26-32.
69. Manzano, J.L., et al., *Resistant mechanisms to BRAF inhibitors in melanoma*. Ann Transl Med, 2016. **4**(12): p. 237.
70. Mazurenko, N.N., et al., *[Spectrum of oncogene mutations is different in melanoma subtypes]*. Mol Biol (Mosk), 2015. **49**(6): p. 1022-9.
71. McCourt, C.M., et al., *Immunohistochemistry in the era of personalised medicine*. J Clin Pathol, 2013. **66**(1): p. 58-61.
72. Menezes, F.D. and W.J. Mooi, *Spitz Tumors of the Skin*. Surg Pathol Clin, 2017. **10**(2): p. 281-298.
73. Meyer, H.A., et al., *Mammalian Sec61 is associated with Sec62 and Sec63*. J Biol Chem, 2000. **275**(19): p. 14550-7.
74. Moll, I., *Duale Reihe Dermatologie*. 8. vollständig überarbeitete Auflage ed. 2016, Georg Thieme Verlag KG: Ingrid Moll. 536.
75. Muller, C.S.L., et al., *Expression of 3q oncogene SEC62 in atypical fibroxanthoma-immunohistochemical analysis of 41 cases and correlation with clinical, viral and histopathologic features*. Oncol Lett, 2019. **17**(2): p. 1768-1776.
76. Namikawa, K. and N. Yamazaki, *Targeted Therapy and Immunotherapy for Melanoma in Japan*. Curr Treat Options Oncol, 2019. **20**(1): p. 7.
77. Otto Braun-Falco; Gerd Plewig; Helmut H. Wolff; Walter H.C. Burgdorf; Michael Landthaler, *Dermatologie und Venerologie*. 5.Auflage ed. 2005: Springer Medizin Verlag Heidelberg.
78. Raab, S.S., *The cost-effectiveness of immunohistochemistry*. Arch Pathol Lab Med, 2000. **124**(8): p. 1185-91.
79. Rassner, G., *Dermatologie Lehrbuch und Atlas*. 8. Auflage ed. 2006 Elsevier GmbH: Gernot Rassner.
80. Remmele, W. and H.E. Stegner, *[Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]*. Pathologe, 1987. **8**(3): p. 138-40.
81. Ritter, A., et al., *Reevaluation of established and new criteria in differential diagnosis of Spitz nevus and melanoma*. Arch Dermatol Res, 2018. **310**(4): p. 329-342.

82. Robert Koch Institut. *Krebs in deutschland / malignes melanom der haut*. 17.12.2019; Available from: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2019/kid_2019_c43_melanom.pdf?blob=publicationFile.
83. Robert Koch Institut. *Krebs in deutschland / malignes melanom der haut*. 17.12.2019 26.12.2020]; Available from: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Melanom/melanom_inhalt.html.
84. Rothblatt, J.A., et al., *Multiple genes are required for proper insertion of secretory proteins into the endoplasmic reticulum in yeast*. J Cell Biol, 1989. **109**(6 Pt 1): p. 2641-52.
85. Sainz-Gaspar, L., et al., *Spitz Nevus and Other Spitzoid Tumors in Children -Part 1: Clinical, Histopathologic, and Immunohistochemical Features*. Actas Dermosifiliogr, 2020. **111**(1): p. 7-19.
86. Santos, M.C., C.P. Saito, and S.R. Line, *Extraction of genomic DNA from paraffin-embedded tissue sections of human fetuses fixed and stored in formalin for long periods*. Pathol Res Pract, 2008. **204**(9): p. 633-6.
87. Schauble, N., et al., *BiP-mediated closing of the Sec61 channel limits Ca²⁺ leakage from the ER*. EMBO J, 2012. **31**(15): p. 3282-96.
88. Scorrano, L., et al., *BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis*. Science, 2003. **300**(5616): p. 135-9.
89. Sheu, J.J., et al., *Chromosome 3p12.3-p14.2 and 3q26.2-q26.32 are genomic markers for prognosis of advanced nasopharyngeal carcinoma*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2009. **18**(10): p. 2709-16.
90. Shibusani, S.T. and T. Yoshimori, *A current perspective of autophagosome biogenesis*. Cell Res, 2014. **24**(1): p. 58-68.
91. Smith, K.J., et al., *Spindle cell and epithelioid cell nevi with atypia and metastasis (malignant Spitz nevus)*. Am J Surg Pathol, 1989. **13**(11): p. 931-9.
92. Sosman, J.A., et al., *Survival in BRAF V600-mutant advanced melanoma treated with vemurafenib*. N Engl J Med, 2012. **366**(8): p. 707-14.
93. Spitz, S., *Melanomas of childhood*. Am J Pathol, 1948. **24**(3): p. 591-609.
94. Takacs, F.Z., et al., *Sec62/Ki67 and p16/Ki67 dual-staining immunocytochemistry in vulvar cytology for the identification of vulvar intraepithelial neoplasia and vulvar cancer: a pilot study*. Arch Gynecol Obstet, 2019. **299**(3): p. 825-833.
95. Takacs, F.Z., et al., *Sec62/Ki67 dual staining in cervical cytology specimens: a new marker for high-grade dysplasia*. Arch Gynecol Obstet, 2019. **299**(2): p. 481-488.
96. Takacs, F.Z., et al., *Sec62/Ki67 dual staining in cervical cytology specimens: a new marker for high-grade dysplasia*. Arch Gynecol Obstet, 2019. **299**(2): p. 481-488.
97. Takacs, F.Z., et al., *Identification of 3q oncogene SEC62 as a marker for distant metastasis and poor clinical outcome in invasive ductal breast cancer*. Arch Gynecol Obstet, 2019. **299**(5): p. 1405-1413.
98. Takacs, F.Z., et al., *Identification of 3q oncogene SEC62 as a marker for distant metastasis and poor clinical outcome in invasive ductal breast cancer*. Arch Gynecol Obstet, 2019. **299**(5): p. 1405-1413.
99. Titus-Ernstoff, L., et al., *Pigmentary characteristics and moles in relation to melanoma risk*. Int J Cancer, 2005. **116**(1): p. 144-9.
100. Tsao, H. and K. Niendorf, *Genetic testing in hereditary melanoma*. J Am Acad Dermatol, 2004. **51**(5): p. 803-8.
101. Tyedmers, J., et al., *Homologs of the yeast Sec complex subunits Sec62p and Sec63p are abundant proteins in dog pancreas microsomes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(13): p. 7214-9.

102. Viskupicova, J., M. Majekova, and L. Horakova, *Inhibition of the sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA1) by rutin derivatives*. J Muscle Res Cell Motil, 2015. **36**(2): p. 183-94.
103. W. Kempf, M.H., H. Kutzner, W. Burgdorf, *Dermatopathologie*. 2007: Steinkopff Darmstadt.
104. Walter, P. and D. Ron, *The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation*. Science, 2011. **334**(6059): p. 1081-6.
105. Wemmert, S., et al., *Initial evidence for Sec62 as a prognostic marker in advanced head and neck squamous cell carcinoma*. Oncol Lett, 2016. **11**(3): p. 1661-1670.
106. Weng, L., et al., *Identification of cyclin B1 and Sec62 as biomarkers for recurrence in patients with HBV-related hepatocellular carcinoma after surgical resection*. Mol Cancer, 2012. **11**: p. 39.
107. Yamazaki, N., et al., *BRAF V600 mutations and pathological features in Japanese melanoma patients*. Melanoma Res, 2015. **25**(1): p. 9-14.
108. Yong, W.H., S.M. Dry, and M. Shabihkhani, *A practical approach to clinical and research biobanking*. Methods Mol Biol, 2014. **1180**: p. 137-62.
109. Zeitung, P. *Die Karotte des Todes*. 25.03.2014 25.10.2020]; Available from: <https://www.pharmazeutische-zeitung.de/ausgabe-132014/die-karotte-des-todes/>.

9 Publikation

Müller CSL, Pföhler C, Wahl M, Bochen F, Körner S, Kühn JP, Bozzato A, Schick B, Linxweiler M. Expression of SEC62Oncogene in Benign, Malignant and Borderline Melanocytic Tumors—Unmasking the Wolf in Sheep’s Clothing? *Cancers*. 2021; 13(7):1645. <https://doi.org/10.3390/cancers13071645>

10 Danksagung

Die vorliegende Arbeit widme ich meinen Eltern, die mich mit ihrer unerschöpflichen Liebe bei all meinen Vorhaben unterstützen und mir immer Kraft und Rückhalt geben.

Mein herzlicher Dank gilt:

Frau Prof. Dr. med. Cornelia Müller für das Überlassung des Themas und ihr mir entgegengebrachtes Vertrauen. Außerdem danke ich ihr für die sehr gute Betreuung, die Unterstützung und konstruktiven Anregungen über den gesamten Zeitraum dieser Arbeit.

Herrn PD Dr. med. Max Linxweiler für die große Hilfe bei der statistischen Auswertung, sowie die Bereitstellung seines Wissens und seiner Publikationen.

Herrn M. Sc. Florian Bochen und dem gesamten Laborteam für die freundliche Einarbeitung im Labor und die Hilfe bei der Erstellung der Färbungen.

Frau Dipl.-Stat. Gudrun Wagenpfeil für die tolle Beratung und konstruktive Hilfe bei der statistischen Auswertung meiner Daten.

Frau Anne Kerber für die Erstellung der Schnitte.

Der Universitätsklinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, sowie der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde für die Nutzung und Bereitstellung der Materialien und Gerätschaften.

Dem Fotolabor der Universitätsklinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie für die Bereitstellung und das Heraussuchen der Bilder aus dem Archiv.

11 Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.