

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

**Prognostische Bedeutung von CD28-Autoantikörpern bei Patienten mit malignem
Melanom unter Therapie mit Ipilimumab**

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2017

Vorgelegt von:
Vera Nicole Steiner
Geboren am 17.01.1988 in Schwäbisch Hall

Inhaltsverzeichnis:

1.1	Zusammenfassung.....	4
1.2	Summary.....	4
1.3	Zusammenfassung.....	6
2	Einleitung	8
2.1	Epidemiologie und Pathogenese des malignen Melanoms.....	8
2.2	Melanomtypen.....	11
2.3	Stadieneinteilung des Melanoms.....	13
2.4	Diagnostik des malignen Melanoms	16
2.5	Therapie des malignen Melanoms.....	17
2.6	Prognose des malignen Melanoms	21
2.7	Funktionen von CTLA-4 und CD28.....	23
2.8	Ipilimumab und seine Wirkungsweise.....	25
2.9	CD28-Autoantikörper bei Melanompatienten	28
2.10	Laborparameter.....	30
3	Fragestellung der Dissertation.....	32
4	Material und Methodik	33
4.1	Patientenkollektiv	33
4.2	Therapie und Laborkontrollen.....	35
4.3	Laborparameter.....	36
4.4	Beobachtungszeitraum, Progressionsfreie Überlebenszeit und Gesamtüberleben .	37
4.5	Statistische Auswertung	37
5	Ergebnisse	38
5.1	Inzidenz und Prävalenz von CD28-Autoantikörpern	38
5.1.1	Nebenwirkungen	39
5.1.2	Melanomtyp des Primärtumors.....	39
5.1.3	Lokalisation des Primärtumors	40
5.2	Progressionsfreie Überlebenszeit.....	41
5.2.1	Gesamte Progressionsfreie Überlebenszeit	41
5.2.2	Mittlere Progressionsfreie Überlebenszeit aller Patienten.....	43
5.2.3	Mittlere Progressionsfreie Überlebenszeit der Patienten im Stadium IV	43

5.2.4	Mediane Progressionsfreie Überlebenszeit aller Patienten.....	44
5.2.5	Medianes progressionsfreie Überleben der Patienten im Stadium IV	44
5.3	Zeit zwischen 1. Ipilimumab-Gabe und Tod.....	47
5.3.1	Gesamte Überlebenszeit.....	47
5.3.2	Mittlere Überlebenszeit aller Patienten	49
5.3.3	Mittlere Überlebenszeit der Patienten im Stadium IV	49
5.3.4	Mediane Überlebenszeit aller Patienten	50
5.3.5	Mediane Überlebenszeit der Patienten im Stadium IV.....	50
5.4	Verlaufsbeurteilung	53
5.4.1	Höhe der CD28-Autoantikörperkonzentration in Abhängigkeit von der Zeit	54
6	Diskussion.....	57
7	Anhang.....	64
7.1	Auswertungstabelle	64
8	Literaturverzeichnis	65
9	Tabellenverzeichnis.....	73
10	Abbildungsverzeichnis	74
11	Dank.....	75
12	Lebenslauf.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.

1.1 Zusammenfassung

1.2 Summary

Prognostic significance of CD28 autoantibodies in patients with malignant melanoma under therapy with ipilimumab

For an effective response, the two opponents CD28 and CTLA-4 on T cells are crucial. While the CD28 receptor as a costimulatory receptor has the role as a catalyst during the immune response, CTLA-4 has blocking effects and downregulates the immune response after activation.

In previous studies, autoantibodies against CD28 were detected in patients with atopic diathesis and in patients with autoimmune diseases. Immunomodulatory therapies with e.g. interferon appear to induce the occurrence of autoantibodies against CD28. Studies including patients with malignant melanoma showed a correlation between the occurrence of CD28 autoantibodies and interferon treatment.

It is thinkable that CD28 autoantibodies may act immunostimulating by activating T cells as superagonists. On the other hand is also thinkable that these antibodies lead to immunosuppression by preferential activation of regulatory T cells or by blocking the CD-28 receptor directly.

The occurrence and the relevance of CD28 autoantibodies in patients with malignant melanoma under therapy with ipilimumab have not yet been examined.

Ipilimumab is approved for the treatment of patients with metastatic melanoma. The substance modulates the immune system by blocking the CTLA-4 receptor and this indirectly leads to a persistent immune stimulation.

The aim of the present study was to investigate the incidence and prevalence of CD28 autoantibodies in melanoma patients treated with ipilimumab and their possible effects on progression-free and overall survival.

Seventeen of 19 patients included in this study died during the observation period. Eighteen patients developed a progressive disease during or after treatment with Ipilimumab. In nine patients (47.4 %) CD28 autoantibodies were detected in serum samples connected under therapy. Eight patients (44.1 %) developed a seroconversion during the therapy with Ipilimumab. In one patient (5.3 %) CD28-autoantibodies were detected prior to therapy with ipilimumab. The titer of CD28 autoantibodies showed a correlation between therapy with

Ipilimumab and the occurrence of CD28 autoantibodies, as therapy with ipilimumab appears to induce the production of CD28 autoantibodies.

The median progression-free survival of stage IV patients was 85 days for patients with CD28 autoantibodies and 69 days for patients with no CD28 autoantibodies. On average, the stage IV patients without CD28 autoantibodies showed no progression for 114 days, while patients with CD28 antibodies had no progression of disease for 67 days. The differences were not statistically significant.

The median overall survival of stage IV patients was 183 days for patients without CD28 antibodies, compared to 216 days for patients with CD28 abs. The median overall survival of patients with stage IV disease was 231 days for patients with CD28-autoantibodies compared to 183 days for patients without CD28-autoantibodies. The differences were not statistically significant.

The present study could show that the presence of CD28 autoantibodies on its own represents no prognostic factor.

In the meantime, other experimental investigations that were not part of this study, identified not yet a characterised serum component, that was able to trump the inhibitory effect of CD28 abs on T cells in vitro.

1.3 Zusammenfassung

Prognostische Bedeutung von CD28-Autoantikörpern bei Patienten mit malignem Melanom unter Therapie mit Ipilimumab

Für eine funktionierende Immunantwort sind die beiden Gegenspieler CD28 und CTLA-4 von entscheidender Bedeutung. Während dem CD28-Rezeptor als costimulatorischem Rezeptor die Rolle eines Katalysators während der Immunantwort zukommt, hat CTLA-4 blockierende Wirkungen und regelt die Immunantwort nach Aktivierung wieder herab.

Autoantikörper gegen CD28 konnten zuvor bei Patienten mit atopischer Diathese und bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen nachgewiesen werden. Immunmodulierende Therapien, z.B. mit Interferonen scheinen das Auftreten von Autoantikörpern, u.a. gegenüber CD28, zu induzieren. Untersuchungen an Patienten mit malignem Melanom konnten einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von CD28-Autoantikörpern und einer Interferonbehandlung nachweisen.

Es ist möglich, dass CD28-Autoantikörper immunstimulierend wirken, indem sie als Superagonisten T-Zellen direkt ohne weitere Signale aktivieren. Andererseits ist ebenfalls denkbar, dass diese Antikörper immunsuppressiv wirken, indem sie z. B. präferentiell die Aktivierung regulatorischer T-Zellen fördern oder aber den CD-28-Rezeptor direkt blockieren.

Das Vorkommen und die Bedeutung von CD28-Autoantikörpern bei Patienten mit malignem Melanom unter einer Therapie mit Ipilimumab sind bislang noch nicht untersucht worden.

Ipilimumab ist zur Behandlung von Patienten mit metastasiertem Melanom zugelassen. Die Substanz greift in das Immungeschehen ein, indem sie den CTLA-4-Rezeptor auf T-Zellen blockiert und damit indirekt eine fortbestehende Immunstimulation erlaubt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Inzidenz und die Prävalenz von CD28-Autoantikörpern bei Melanompatienten unter Therapie mit Ipilimumab und deren mögliche Auswirkungen auf das progressionsfreie und das Gesamtüberleben zu untersuchen.

Von 19 in dieser Studie eingeschlossenen Patienten verstarben 17 während des Beobachtungszeitraumes. Bei 18 Patienten konnte eine Krankheitsprogression während oder nach der Ipilimumabbehandlung nachgewiesen werden. Bei neun Patienten (47,4 %) konnten CD28-Autoantikörper im Serum nachgewiesen werden. Acht Patienten (44,1 %) wiesen im Verlauf der Ipilimumabtherapie eine Serokonversion auf. Ein Patient (5,3 %) war bereits vor Therapiebeginn CD28-positiv. Die Titerverläufe der CD28-Autoantikörper zeigten einen Zusammenhang zwischen der Ipilimumabtherapie und dem Auftreten der CD28-

Autoantikörper. Die Ipilimumabtherapie scheint die Produktion der CD28-Autoantikörper zu induzieren.

Der Median des progressionsfreien Überlebens im Stadium IV der Tumorerkrankung betrug für Patienten mit CD28-Autoantikörpern 69 Tage, für Patienten ohne nachweisbare CD28-Autoantikörper 85 Tage. Im Mittel waren Patienten im Stadium IV ohne CD28-Autoantikörper 114 Tage progressionsfrei, während es bei den Patienten mit positivem Antikörpernachweis 67 Tage waren. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.

Der Median des Gesamtüberlebens der Patienten im Stadium IV betrug 183 Tage für Patienten ohne Antikörpernachweis im Serum, im Vergleich zu 216 Tagen bei Patienten mit Antikörpernachweis. Das mittlere Gesamtüberleben der Patienten im Stadium IV betrug 183 Tage für CD28-negative Patienten verglichen mit 231 Tagen für CD28-positive Patienten. Die Unterschiede waren statistisch ebenfalls nicht signifikant.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass das Vorhandensein von CD28-Autoantikörpern alleine genommen keinen prognostischen Faktor darstellt.

Zwischenzeitlich konnten andere experimentelle Untersuchungen, die nicht Gegenstand dieser Arbeit waren, zeigen, dass im Serum von Melanompatienten mit und ohne CD28-Autoantikörper eine weitere Komponente vorhanden sein kann, die *in vitro* den inhibitorischen Effekt der CD28-Autoantikörper auf T-Zellen antagonisiert.

2 Einleitung

2.1 Epidemiologie und Pathogenese des malignen Melanoms

Das maligne Melanom (schwarzer Hautkrebs) ist eine bösartige Neoplasie mit Ursprung in den Melanozyten, welche in der Basalzellschicht der Haut lokalisiert sind und das dunkle Hautpigment Melanin bilden. Die Melanozyten entstammen der Neuralleiste und wandern während der Embryonalentwicklung in die Haut ein (Shain & Bastian, 2016) (Dupin & Le Douarin, 2003). Auf 1 mm² menschlicher Epidermis befinden sich schätzungsweise 1500 Melanozyten (Shain & Bastian, 2016). Jeder Melanozyt ist mit durchschnittlich 36 Keratozyten verbunden, welche das Melanin in Form von Melanosomen von den Melanozyten erhalten (Shain & Bastian, 2016). Das Melanin dient den Keratinozyten als Schutz vor dem schädigenden Einfluss des UV-Lichts (Hsu, Meier, & Herlyn, 2002). Melanome sind meist kutane Melanome, in seltenen Fällen können diese auch auf Schleimhäuten, der Bindehaut und der Aderhaut des Auges sowie den Hirnhäuten lokalisiert sein und besitzen, abhängig von der Tumordicke, eine sehr hohe Metastasierungstendenz (Shain & Bastian, 2016) (Volkenandt, 2005).

Die Inzidenz des schwarzen Hautkrebses steigt seit Jahrzehnten stetig an (Leiter, Eigentler, & Garbe, 2014) (Kaatch, 2012). Dies wird auf eine erhöhte Sonnenexposition aufgrund veränderter Freizeitaktivitäten und einer Zunahme der UV-Konzentration in der Atmosphäre zurückgeführt (Kaatch, 2012). Im Saarland stieg die Anzahl der neudiagnostizierten Melanome zwischen 1970 und 2009 von drei auf 22 Fälle bei den Männern und bei den Frauen von drei auf 20 Fälle pro 100 000 Einwohner und Jahr (Krebsregister, Saarland, 2016) (Pflugfelder, Koch, & Blum, 2013). Die höchsten Inzidenzraten in Europa werden in den skandinavischen Ländern beobachtet, wohingegen die niedrigsten Raten in den Mittelmeerländern zu beobachten sind. Weltweit ist die Melanominzidenz in Australien und Neuseeland am höchsten. In Queensland, Australien wurden 50-60 Fälle pro 100 000 Einwohner und Jahr beobachtet (Kaatch, 2012) (Garbe & Leiter, Melanoma epidemiology and trends., 2009) (Pflugfelder, Koch, & Blum, 2013).

Melanome werden häufiger bei hellhäutigen Patienten mit Hauttyp I und II nach Fitzpatrick gefunden (Pflugfelder, Koch, & Blum, 2013) (Garbe & Leiter, Melanoma epidemiology and trends., 2009).

Außerdem steigt die Melanomhäufigkeit bei Kaukasiern mit der abnehmenden Nähe ihres Wohnsitzes zum Äquator an (Pflugfelder, Koch, & Blum, 2013) (Garbe & Leiter, Melanoma epidemiology and trends., 2009).

Ein weiterer wichtiger Risikofaktor ist zudem die Anzahl der Nävi am gesamten Integument, wobei für folgende Gruppen ein erhöhtes Risiko gilt: Personen mit multiplen melanozytären Nävi, mit Atypischem Nävusyndrom, mit mehr als fünf atypischen melanozytären Nävi und einem Melanom in der Familiengeschichte bzw. einem Melanom in der eigenen Vorgeschichte (Pflugfelder, Koch, & Blum, 2013) (Garbe & Leiter, Melanoma epidemiology and trends., 2009).

Die erhöhte UV-Exposition gilt als wichtigster Risikofaktor und hierbei insbesondere Sonnenbrände in der Kindheit (Lens & Dawes, 2003). Die kumulative UV-Dosis scheint weniger schädlich, als die intermittierend hohe UV-Dosis, die auf anfangs ungebräunter Haut rasch zu einem Sonnenbrand führen kann. Körperregionen mit hoher kumulativer UV-Exposition (Gesicht, Handrücken) weisen sehr viel seltener Melanome auf, im Vergleich zum Stamm, der durch die Kleidung vor hoher kumulativer UV-Exposition geschützt ist, gleichzeitig aber durch ein gelegentliches Sonnenbad und dem nachfolgend entstehenden Sonnenbrand einer hohen intermittierenden UV-Belastung ausgesetzt ist (Volkenandt, 2005) (Garbe & Leiter, Melanoma epidemiology and trends., 2009) (Shain & Bastian, 2016).

Shain und Bastian unterscheiden zwei Subtypen von Melanomen (Shain & Bastian, 2016). Zum einen gibt es die Melanome, die auf chronisch sonnengeschädigter Haut entstehen. Diese Melanome besitzen eine hohe Anzahl an Mutationsraten, treten im höheren Lebensalter auf (nach dem 55. Lebensjahr) und bestehen typischerweise an Körperlokalisationen, die einer erhöhten Sonnenexposition ausgesetzt sind. Sie sind mit Mutationen im NRAS-, NF-1 und BRAF Non V600E-Gen assoziiert. Zum Anderen gibt es die Melanome, die auf nicht-sonnengeschädigter Haut entstehen. Diese entstehen typischerweise im jüngeren Lebensalter, haben eine vergleichsweise geringere Mutationsrate und bestehen an Körperregionen, die einer geringeren Sonnenexposition ausgesetzt sind (Shain & Bastian, 2016). Sie weisen gehäuft eine Mutation im BRAF V600E-Gen auf.

Die Melanompathogenese aus Nävi gliedert sich nach Clark in fünf Entwicklungsschritte (Clark W. H., 1991). Am Anfang der Melanompathogenese steht nach Shain und Bastian der dysplastische Nävus, dieser kann sich spontan, *de novo*, entwickeln oder aus vorbestehenden gutartigen Melanomzytenproliferationen entstehen. Ein dysplastischer Nävus ist histologisch durch eine Lymphozyteninfiltration in die Dermis gekennzeichnet (Shain & Bastian, 2016).

Ein Melanoma *in situ* bezeichnet eine Proliferation von Melanozyten, die sich durch ein unregelmäßiges Wachstum auszeichnen, welches auf die Epidermis begrenzt ist. Melanoma *in situ* gelten als Vorläufer für Melanome auf nicht-sonnengeschädigter Haut und Melanome

auf sonnengeschädigter Haut. Die Lentigo maligna ist ein Melanoma *in situ*, ein Vorläufer des Lentigo maligna Melanoms, welches typischerweise *de novo* entsteht und dessen Ursprungszellen bisher nicht bekannt waren. Proliferiert das Melanoma *in situ* weiterhin und verlassen die Melanomzellen die Epidermis und infiltrieren Dermis, Submukosa oder andere Schichten, spricht man von einem invasiven Melanom. Ein Melanoma *in situ* kann Jahre bestehen ohne in ein invasives Melanom überzugehen. Dies impliziert, dass andere genetische Faktoren vorhanden sein müssen, die dessen Wachstum und weitere Ausbreitung fördern (Shain & Bastian, 2016).

Die meisten invasiven Melanome gehen aus einem Melanoma *in situ* hervor. Eine Ausnahme bildet das noduläre Melanom. Dieses entsteht sporadisch ohne ersichtlichen Vorläufer und kann sich sowohl auf chronisch sonnengeschädigter Haut als auch auf nicht-chronisch-sonnengeschädigter Haut entwickeln. Das Risiko zur Metastasierung korreliert mit der Tumordicke (Balch, et al., 2009). Bei etwa 70 % der Patienten kommt es im Falle einer Metastasierung zum Befall der regionären Lymphknoten (Volkenandt, 2005). Erste Anzeichen der Metastasierung sind ein schmerzloser und harter Lymphknoten bzw. im weiteren Verlauf mehrere schmerzlose und harte Lymphknoten, die konfluieren können. In diesem Verbund kommt es zu ersten Hautauffälligkeiten. Die Haut kann durch nekrotischen Zerfall ulzerieren. Die Hautmetastasierung erfolgt lymphogen zunächst in die umgebende Haut des Primärtumors: Satellitenmetastasen sind bis zu 2 cm vom Primärtumor entfernt. In-Transit-Metastasen sind dadurch charakterisiert, dass sie zwischen Primärtumor und regionären Lymphknoten lokalisiert sind. Im Rahmen der hämatogenen Fernmetastasierung kann eine disseminierte Hautmetastasierung auftreten. Die hämatogene Fernmetastasierung betrifft neben der Haut vor allem die Organe: Leber, Lunge, Gehirn und Knochen, kann aber auch jedes andere Organ betreffen (Shain & Bastian, 2016) (Volkenandt, 2005).

Schätzungsweise vier Prozent aller Melanome treten als Metastasen ohne erkennbaren Primarius in Erscheinung. Diese melanoma of unknown primary (MUP) besitzen eine hohe Mutationsrate, was darauf schließen lässt, dass der Primarius seinen Ursprung in einer Körperregion mit hoher UV-Exposition hat. Einige der Primarien haben sich spontan zurückgebildet oder konnten nicht nachgewiesen werden (Shain & Bastian, 2016).

Nach Shain und Bastian gehen die Melanome auf nicht-sonnengeschädigter Haut aus gewöhnlichen Naevi hervor, die für gewöhnlich langsam proliferieren und sich in seltenen Fällen durch sekundäre oder tertiäre Mutationen nach o. g. Entwicklung zu einem Melanom entwickeln (Shain & Bastian, 2016). Im Gegensatz hierzu stehen die Melanome auf sonnengeschädigter Haut, die mit Mutationen im NRAS- NF-1 oder BRAF-Non-V600E - Gen assoziiert sind und die aus einem Melanoma *in situ* hervorgehen (Shain & Bastian, 2016).

2.2 Melanomtypen

Klinisch und histologisch werden verschiedene Typen des malignen Melanoms unterschieden. Die Häufigkeitsverteilung der Melanome ist in Abbildung 1 dargestellt. Mehr als die Hälfte aller Melanome treten als superfiziell spreitendes Melanom (SSM) auf, welches durch unregelmäßige Begrenzung, ein asymmetrisches Erscheinungsbild und Farbschattierungen gekennzeichnet ist. Das anfangs horizontale Wachstumsverhalten ändert sich zunehmend in ein vertikales Wachstumsverhalten, wodurch ein sekundär knotiges superfiziell spreitendes Melanom entstehen kann (Volkenandt, 2005).

Abbildung 1:

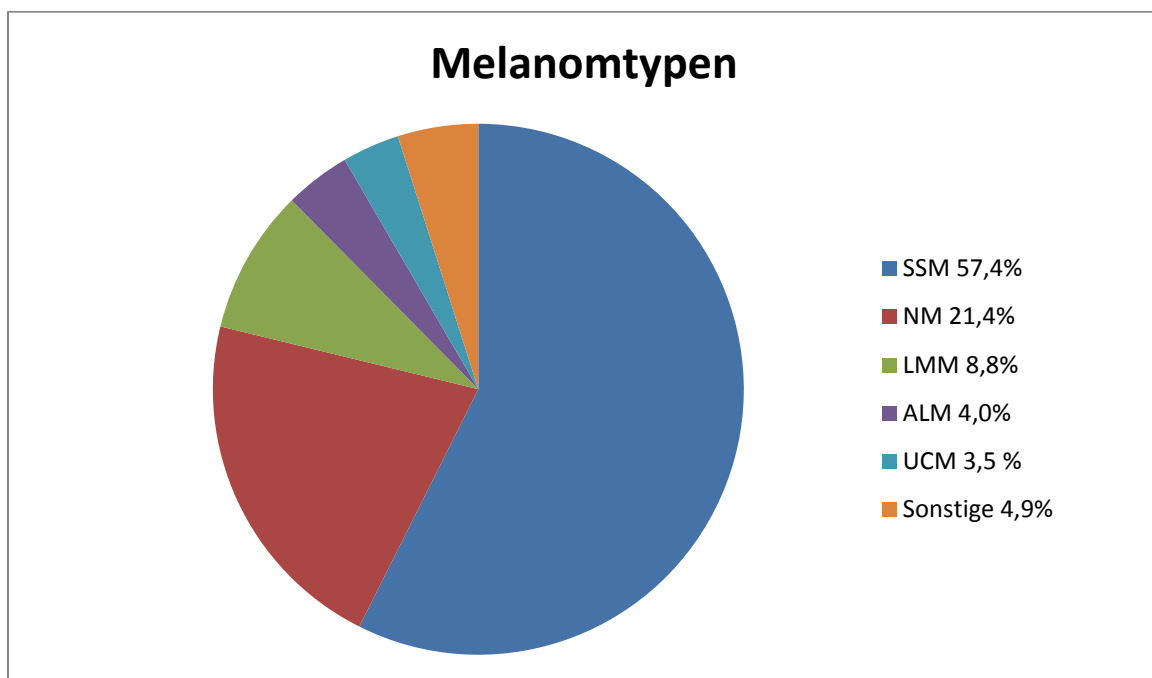


Abbildung 1: Häufigkeitsverteilung der Melanome in Anlehnung an (Garbe C. , Epidemiologie des Hautkrebses, 1998)

Der zweithäufigste Melanomtyp, das noduläre Melanom (NMM), ist durch anfänglich sehr kurzes horizontales Wachstum charakterisiert, welches in ein vertikales Wachstumsmuster übergeht und einen farblich recht homogenen Knoten hervorbringt (Volkenandt, 2005).

Das Lentigo-maligna-Melanom (LMM) entwickelt sich aus der Lentigo maligna, einem Carcinoma *in situ*, welches bei Überschreiten der Basalmembran in das invasive Lentigo-maligna-Melanom übergeht. Dieser Subtyp des Melanoms entwickelt sich auf chronisch

sonnengeschädigter Haut und ist meist bereits seit Jahren überwiegend als Lentigo maligna im Gesichtsbereich vorbestehend (Shain & Bastian, 2016). Das Lentigo-maligna-Melanom macht etwa 8,8 % aller malignen Melanome aus (Volkenandt, 2005).

An den Händen und Füßen manifestiert sich das akrolentiginöse Melanom (ALM), welches sich aus einer akralen, lentigo-artigen Läsion entwickelt und nach einem vertikalen Wachstumsmuster in einen Tumor übergeht, der meist die typischen bräunlich bis schwarzen Farbschattierungen aufweist und eine hohe Ulzerations- bzw. Blutungsneigung besitzt (Volkenandt, 2005).

Des Weiteren gibt es noch einige seltene Varianten des Melanoms, die weniger als 5 % aller Melanome ausmachen: das desmoplastische Melanom, das Schleimhautmelanom, das an der Mundschleimhaut, im Nasopharynx, Gastrointestinaltrakt oder im Genitalbereich lokalisiert sein kann, das Bindehautmelanom, das Aderhautmelanom, der häufigste intraokuläre Tumor beim Erwachsenen und das Melanom mit unbekanntem Primärtumor (Heinzerling, Hartmann, Hund, & Schuler, 2014) (Garbe, et al., 2012) (Volkenandt, 2005).

2.3 Stadieneinteilung des Melanoms

Die aktuell gültige Klassifizierung und Stadieneinteilung des malignen Melanoms basiert auf der Empfehlung des American Joint Committee on Cancer (AJCC) aus dem Jahre 2009 (Balch, et al., 2009). Das maligne Melanom wird anhand der Tumordicke nach Breslow (T), Vorhandensein und Anzahl der befallenen regionären Lymphknoten (N) und dem Vorhandensein einer Fernmetastasierung (M) in verschiedene Stadien eingeteilt. Eine Übersicht über die TNM-Klassifikation zeigen Tabelle 1, Tabelle 2 und Tabelle 3. Für den Primärtumor fließen auch Angaben über Ulzeration, das Vorhandensein von Mitosen oder Regressionszeichen ein.

Im Falle von Lymphnotenmetastasen wird zwischen Makrometastasen und Mikrometastasen unterschieden. Makrometastasen sind klinisch detektierbar. Mikrometastasen sind klinisch nicht-nachweisbare Lymphknotenmetastasen, die z.B. durch die Sentinel-Node-Biopsie histologisch nachgewiesen werden können (Heinzerling, Hartmann, Hund, & Schuler, 2014).

Bei vorhandenen Fernmetastasen wird in drei Untergruppen, in Abhängigkeit von der Lokalisation der Metastasen und der Höhe des Lactatdehydrogenase(LDH)-Spiegels im Serum unterteilt (Balch, et al., 2009).

Die Stadieneinteilung ist in Tabelle 4 dargestellt und ist Grundlage für das weitere Therapievorgehen, die Strukturierung der Nachsorge und die Prognose des Patienten, die durch eine 5-Jahresüberlebensrate oder 10-Jahresüberlebensrate angegeben werden kann. Die Einteilung erfolgte aufgrund von Daten aus einer prospektiven Studie mit etwa 38 000 Melanompatienten in den Stadien I-IV und wird auch vom International Union against Cancer Committee (UICC) anerkannt (Balch, et al., 2009). Verglichen mit den früheren Klassifikationen wird seit 2009 bei Primärtumoren von unter 1mm Dicke auch die Mitoserate pro mm² berücksichtigt (Balch, et al., 2009).

Tabelle 1:

T-Klassifikation	Tumordicke in mm	Ulzerationen/ Mitoserate
T is		Melanoma <i>in situ</i>
T 1	< 1	A: Mit Ulzeration oder Mitosen < 1/ mm ² B: Keine Ulzeration oder Mitosen > 1/ mm ²
T 2	1,01-2,00	A: Mit Ulzeration B: Keine Ulzeration
T 3	2, 01-4,00	A: Mit Ulzeration B: Keine Ulzeration
T 4	> 4	A: Mit Ulzeration B: Keine Ulzeration

Tabelle 1:T-Klassifikation maligner Melanome (in Anlehnung an Balch et al., 2009)

Tabelle 2:

N-Klassifikation	Anzahl der befallenen Lymphknoten	Ausmaß der Lymphknotenmetastasierung
N 0	0	Keine Lymphknotenmetastasierung
N 1	1	A: Mikrometastasen B: Makrometastasen
N 2	2-3	A: Mikrometastasen B: Makrometastasen C: Satellitenmetastasen/ In-Transit-Metastasen ohne Lymphknotenmetasen
N 3	> 4 oder verbackene Lymphknoten oder Satelliten oder In-Transit-Metastasen mit regionärer Lymphknotenbeteiligung	

Tabelle 2: N-Klassifikation aus (Balch et al., 2009) und (Pflugfelder, Koch & Blum, 2013)

Tabelle 3:

M- Klassifikation	Art der Fernmetastasierung	LDH im Serum
M 0	Keine Fernmetastasen	normal
M 1 a	Metastasen in angrenzender Haut, Subkutis oder außerhalb der regionären Lymphknoten	normal
M 1 b	Lungenmetastasen	normal
M 1 c	Fernmetastasen anderer Lokalisation/ Fernmetastasen jeder Lokalisation mit erhöhten LDH- Werten	normal erhöht

Tabelle 3: M-Klassifikation maligner Melanome (in Anlehnung an Balch et al., 2009)

Tabelle 4:

Stadium	Primärtumor pT	Regionale Lymphknotenmetastasen N	Fernmetastasen M
0	Tis	N0	M0
IA	T1a	N0	M0
	T1b	N0	M0
IB	T1b	N0	M0
	T2a	N0	M0
IIA	T2b	N0	M0
	T3a	N0	M0
IIB	T3b	N0	M0
	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
IIIA	T1a-T4b	N1a, N2a	M0
IIIB	T1a-T4a	N1b, N2b	M0
	T4a/ T4b	N2c	M0
IIIC	T1a-T4b	N1b	M0
	Jedes T	N2b	M0
IV	Jedes T	Jedes N	M1

Tabelle 4: Stadieneinteilung des malignen Melanom (in Anlehnung an Balch et al., 2009)

2.4 Diagnostik des malignen Melanoms

Melanome fallen durch Wachstum, veränderte Form oder Farbe oder durch Juckreiz und Blutungen auf. Als Differentialdiagnosen kommen vorwiegend andere pigmentierte Tumoren in Frage. Vom Melanom abzugrenzen sind andere benigne und maligne Tumoren: Pigmentiertes Basalzellkarzinom, pigmentierte Verruca seborrhoica, pigmentiertes Hydrozystem und pigmentierte aktinische Keratosen, vaskuläre Tumoren wie Granuloma pyogenicum und Kaposi-Sarkom oder ein pigmentiertes Dermatofibrom (Volkenandt, 2005).

Verdächtige Hautläsionen können klinisch und auch mithilfe des Dermatoskops beurteilt werden. Die Dermatoskopie ist ein sensitives, aber nicht-spezifisches, nicht-invasives Diagnoseverfahren um Hautläsionen durch Vergrößerung besser beurteilen zu können. Durch das Auftragen einer Flüssigkeit zwischen dem Dermatoskop und der Haut wird die Reflexion vermindert, die auftritt, wenn das Licht auf die Epidermis fällt. Dadurch werden tiefere Schichten der Haut sichtbar, die mit dem bloßen Auge, wie bei einer klinischen Inspektion, nicht erkennbar wären (Blum, 2016) (Bowling, et al., 2007) (Pflugfelder, Koch, & Blum, 2013).

Das Exzizat bzw. Biopsat eines malignen Melanoms wird histopathologisch anhand der Tumordicke nach Breslow, dem Vorhandensein von Ulzeration und bei dünnen Primärtumoren von unter 1 mm Dicke anhand der Mitoserate beurteilt (Balch, et al., 2009). Die Mitoserate korreliert bei geringen Tumordicken mit der Überlebenszeit und besitzt bei dünnen Primärtumoren die stärkste prognostischste Aussagekraft (Azzola MF, 2002) (Balch, et al., 2009). Die Tumordicke nach Breslow ist der wichtigste prognostische Faktor, hierbei werden vier Kategorien unterschieden: Tumordicken von < 1 mm; zwischen 1,01- 2mm; 2,01- 4mm und > 4mm (Balch, Wilkerson, J. A., Soong, Ingalls, & Maddox, 1980) (Balch, et al., 2009).

Im Rahmen des Stagings eines Primärtumors wird eine Lymphknotenultraschalluntersuchung ab Tumorstadium IB empfohlen (Bafounta, Beauchet, Aegerter, & Saiag, 2004) und eine Sentinellymphknotenbiopsie ab einer Tumordicke von 1 mm durchgeführt (Kunte, et al., 2010) (Mays, et al., 2010).

Zur genauen Diagnostik bei lokoregionaler Metastasierung werden ein Schädel-MRT zum Ausschluss von Hirnmetastasen (Fogarty & Tartaglia, 2006) und schnittbildgebende Diagnostik, oder ggf. ein PET-CT zum Nachweis möglicher nichtzerebraler Metastasen (Xing, et al., 2011) eingesetzt. Zusätzlich zur Bestimmung des S100B-Wertes im Serum kann der LDH-Wert im Serum bestimmt werden (Nowecki, Rutkowski, Kulik, Siedlecki, & Ruka, 2008).

Im bereits metastasierten Stadium des Melanoms wird oft zusätzlich eine Skelettszintigraphie zur Detektion möglicher Knochenmetastasen veranlasst (Pflugfelder, Koch, & Blum, 2013).

2.5 Therapie des malignen Melanoms

Die nachfolgend benannten Therapieempfehlungen beziehen sich auf die zum Zeitpunkt der Erstellung der Doktorarbeit gültige S3-Leitlinie „Diagnosis, Therapy and Follow-up of Melanoma“ (Pflugfelder, Koch, & Blum, 2013).

Melanomverdächtige Hautläsionen werden in der Regel vollständig entfernt und in Abhängigkeit von der Tumordicke nach Breslow mit einem Sicherheitsabstand zum Tumorrand exzidiert, der bei *in situ* Melanomen 0,5 cm, Melanomen von < 2mm Tumordicke 1 cm bzw. bei einer Melanomdicke von > 2 mm 2 cm beträgt und örtliche Rezidive des Tumors verhindern soll (Garbe, Eigentler, Keilholz, Hauschild, & Kirkwood, 2011).

Bei vorhandenem Resttumor (R1/ R2-Situation) nach einer Exzision sollte nach Möglichkeit eine Nachresektion stattfinden, um eine R0-Resektion zu ermöglichen. Die postoperative adjuvante Radiotherapie kann bei häufig lokal rezidivierenden Melanomen, wie dem desmoplastischen Melanom oder bei Melanomen mit knappen Schnitträndern das lokale Tumorstadium verhindern (Foote, Burmeister, Burmeister, Bayley, & Smithers, 2008). Eine adjuvante Radiotherapie sollte postoperativ bei Nachweis von mehr als drei befallenen Lymphknoten, Kapseldurchbruch der Metastase oder einer Lymphknotenmetastase < 3 cm erfolgen (Burmeister, et al., 2012). Von einer prophylaktischen Entfernung im Sinne einer elektiven Dissektion der regionären Lymphknoten wird abgeraten. Diese zeigt für den Patienten keinen Prognosevorteil und birgt potentielle Nebenwirkungen (Volkenandt, 2005).

Eine adjuvante Therapie mit Interferon α kann bei tumorfreien Melanompatienten ohne Lymphknoten- oder Fernmetastasen indiziert sein (Eggermont, et al., 2009) (Mocellin, Pasquali, Rossi, & Nitti, 2010). So zeigte eine Studie von Grob *et al.*, dass Patienten, bei denen noch keine Lymphknotenmetastasen nachweisbar waren, von einer Low-dose-Interferon-Behandlung über 18 Monate profitieren (Grob, et al., 1998). Die Studien von Mocellin *et al.* konnten eine Verbesserung des rezidivfreien Überlebens als auch des Gesamtüberlebens bei Melanompatienten mit Interferonbehandlung nachweisen (Mocellin, Lens, Pasquali, & Chiarion Sileni, 2013).

Bei lokalisierten solitären Fernmetastasen ist deren komplette operative Exzision, sofern eine R0-Resektion möglich ist, die Therapie der Wahl. Die komplette Resektion von isolierten Metastasen kann ein Langzeitüberleben ermöglichen (Hanaizi, et al., 2011).

Bei multilokulären und nicht resezierbaren Metastasen kann unter palliativen Gesichtspunkten eine Monochemotherapie mit Dacarbazin, alternativ auch mit Temozolamid verabreicht werden. Temozolid wird wegen der guten Liquorgängigkeit vorzugsweise bei Hirnmetastasen verabreicht (Heinzerling, Hartmann, Hund, & Schuler, 2014). Zu den Polychemotherapieschemata gehören folgende Kombinationen aus folgenden Substanzen: DVP (Dacarbazin, Vindesin, Cisplatin), BOLD (Bleomycin, Vincristin/Oncovin, Lomustin, Dacarbazin) und BHD (BCNU, Hydroxyurea, Dacarbazin). Bei Patienten mit rascher Tumorprogression sprechen diese besser als Monotherapien an, gleichzeitig weisen sie aber eine höhere Toxizität auf und verbessern die Überlebenszeit in der Regel nicht, so dass sie mittlerweile auch im Hinblick auf andere Therapieoptionen im nicht-operablen Stadium deutlich seltener zum Einsatz kommen (Heinzerling, Hartmann, Hund, & Schuler, 2014).

Ossäre Metastasen werden mit Bisphosphonaten oder dem RANK-Ligand-Inhibitor Denosumab und bei klinischer Symptomatik wie beispielsweise Instabilität mit möglicher Frakturgefahr und starken Schmerzen mit Strahlentherapie behandelt (Pflugfelder, Koch, & Blum, 2013) (Heinzerling, Hartmann, Hund, & Schuler, 2014).

Im Stadium der Fernmetastasierung kommt die Strahlentherapie bei Weichteil-, Lymphknoten- und Knochenmetastasen zum Einsatz. In Studien konnte bislang keine Auswirkung auf das Gesamtüberleben der Melanompatienten nachgewiesen werden (Pflugfelder, Koch, & Blum, 2013). Hirnmetastasen gelten als die häufigste Todesursache bei Patienten im fernmetastasiertem Stadium. Diese können sich durch Hirndruckzeichen oder Krampfanfälle äußern und haben dadurch deutlichen Einfluss auf die Lebensqualität des Patienten. Bei einer begrenzten Anzahl von Hirnmetastasen ist die Therapie der Wahl deren operative Entfernung bzw. deren stereotaktische Einzelbestrahlung, die mit einer geringeren Toxizität verbunden ist als die Ganzhirnradioatio. Bei multiplen Hirnmetastasen oder Meningeosis melanomatosa ist eine Ganzhirnbestrahlung indiziert. Bei Anzeichen auf eine Verlegung im Ventrikelabflusssystem durch Metastasen, ist eine operative Entfernung indiziert, um einen Liquoraufstau und damit verbundene raumfordernde Auswirkungen und die resultierende Erhöhung des Hirndrucks zu verhindern (Heinzerling, Hartmann, Hund, & Schuler, 2014) (Pflugfelder, Koch, & Blum, 2013).

Zielgerichtete Therapien mit Substanzen, die mutierte Gene des RAS-RAF-MEK-ERK-Signaltransduktionsweges adressieren, sind mittlerweile alleine oder in Kombination zur Behandlung metastasierter Melanome zugelassen (Chapman, Hauschild, & Robert, 2011) (Hauschild, et al., 2012) (Long, et al., 2015) (Robert, et al., 2015) (Larkin, et al., 2014).

Bei etwa 50 % aller Melanome kann eine Mutation im BRAF-Gen nachgewiesen werden, wobei in den meisten Fällen die Aminosäure Valin durch Glutamat ersetzt wurde (sog. V600E-Mutation) (Davies, et al., 2002). BRAF-Mutationen kommen hauptsächlich bei Melanomen an nicht chronisch sonnenexponierter Haut vor. Das veränderte BRAF-Molekül aktiviert den RAS/RAF/MEK/ERK-Pathway und fördert damit eine Proliferation der Tumorzellen (Davies, et al., 2002). Die BRAF V600E sensitiven Mutationen sprechen sehr gut auf die BRAF V600E-Kinase-Inhibitoren Vemurafenib oder Dabrafenib an (Chapman, Hauschild, & Robert, 2011) (Hauschild, et al., 2012). Eine Kontraindikation für diese Therapie besteht bei Patienten mit BRAF-Wildtyp oder NRAS-Mutation (Goel, Lazar, Warneke, Redston, & Haluska, 2006) (Heinzerling, Hartmann, Hund, & Schuler, 2014) (Chapman, Hauschild, & Robert, 2011). Da im Therapieverlauf trotz guter Ansprechrate Resistenzen auftreten, werden diese Substanzen meist zusammen mit MEK-Inhibitoren, wie zum Beispiel Trametinib oder Cobimetinib, gegeben (Larkin, et al., 2014) (Robert, et al., 2015). Hierdurch reduziert sich auch die Toxizität, die in der Kombination in der Regel geringer ist als unter Monotherapie. MEK1 und MEK 2 sind Tyrosin-/Threoninkinasen, und wie das BRAF-Molekül Teil des RAS/RAF/MEK/ERK-Pathways, deren Aktivierung zu einer Tumorzellproliferation führen kann (Heinzerling, Hartmann, Hund, & Schuler, 2014). Long *et al.* verglich in einer großen doppelblinden Studie die Wirksamkeit von Dabrafenib und Trametinib mit der von Dabrafenib und einem Placebo. Hier zeigte sich sowohl eine verbesserte progressionsfreie Überlebenszeit als auch eine verbesserte Gesamtüberlebenszeit für die Patientengruppe, die mit Dabrafenib und Tramefinib behandelt wurde, im Gegensatz zur Patientengruppe, die nur Dabrafenib verabreicht bekam (Long, et al., 2015).

Die seltene c-KIT-Mutation findet sich vorwiegend bei Patienten mit akrolentiginösen Melanomen oder Schleimhautmelanomen. Der c-KIT-Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib erzielte bisher bei c-KIT mutierten metastasierten Melanomen eine Ansprechrate von bis zu 23 %, weshalb ein Therapieversuch mit Imatinib bei inoperablen oder Fernmetastasen eines c-KIT-mutierten Melanoms empfohlen werden kann (Pflugfelder, Koch, & Blum, 2013) (Heinzerling, Hartmann, Hund, & Schuler, 2014) (Guo, et al., 2011).

Im Stadium der Fernmetastasierung kommen als zugelassene Immuntherapeutika der CTLA-4-Antikörper Ipilimumab, sowie die Programmed-cell-death-1 (PD-1)-Blocker Nivolumab und Pembrolizumab in Betracht, die sog. Checkpoint-Inhibitoren darstellen (Robert, et al., 2015) (Heinzerling, Hartmann, Hund, & Schuler, 2014). Programmed-cell-death-1-Ligand (PDL-1) befindet sich auf Tumorzellen, während sich das Programmed-cell-death-protein-1 (PD1) auf B-und T-Zellen befindet. Die Bindung von PD1 mit PD-1-Ligand bewirkt eine Herabregulierung oder Deaktivierung der T-Zellen. Die PD-1-Blocker inhibieren die Interaktion von PD-1 und PD-1-Ligand und führen somit indirekt zur Aktivierung von T-

Lymphozyten. Die Studie von Larkin *et al.* konnte die Wirksamkeit von Nivolumab, einem Anti-PD-1 monoklonalem Antikörper bei Melanompatienten mit BRAF-Wildtyp nachweisen (Larkin, et al., 2015) und zeigte außerdem ein verlängertes progressionsfreies Überleben bei einer alleinigen Behandlung mit Nivolumab bzw. einer Kombinationsbehandlung von Ipilimumab und Nivolumab im Vergleich mit einer Monotherapie mit Ipilimumab (Larkin J. , et al., 2015). Eine Studie von Robert *et al.* untersuchte die Wirkung der beiden Checkpointinhibitoren Pembrolizumab und Ipilimumab in Bezug auf die progressionsfreie Überlebenszeit und das Gesamtüberleben bei Melanompatienten im Stadium III und IV. Pembrolizumab war Ipilimumab in beiden Endpunkten überlegen und hatte eine niedrigere Nebenwirkungsrate als Ipilimumab. So traten bei 12 % der mit Pembrolizumab behandelten Patienten Nebenwirkungen auf, wohingegen 20 % der mit Ipilimumab behandelten Patienten Nebenwirkungen aufwiesen (Robert, et al., 2015).

2.6 Prognose des malignen Melanoms

Die Prognose des malignen Melanoms kann anhand der 5- oder 10- Jahres- Überlebensrate angegeben werden und ist abhängig von folgenden prognostischen Faktoren:

Vertikale Tumordicke nach Breslow

Der wichtigste prognostische Faktor ist die vertikale Tumordicke nach Breslow, die 1970 eingeführt wurde (Breslow, 1969) und die Invasion des Tumors gemessen zwischen dem Stratum granulosum der Epidermis bis zu dem tiefsten noch nachweisbaren Tumorgewebe (Balch, et al., 2009). Die 10-Jahres-Überlebensrate korreliert mit der Tumordicke und nimmt mit größer werdender Tumordicke ab. Tabelle 5 stellt die 10-Jahresüberlebensrate in Abhängigkeit von der Tumordicke dar. So leben 10 Jahre nach Erstdiagnose noch etwa 50 % der Patienten, bei denen ein Primärtumor mit einer Tumordicke von über 4 mm diagnostiziert worden war.

Tabelle 5:

Stadium	Tumordicke in mm	10-Jahresüberlebensrate in %
T1	< 1	92
T2	1,01- 2	80
T3	2,01- 4	63
T4	>4	50

Tabelle 5: 10-Jahres-Überlebensrate in Abhängigkeit von der Tumordicke in Anlehnung an (Balch, et al., 2009)

Mitoserate pro mm²

Die Proliferationsrate des Tumors wird als Mitoserate pro mm² angegeben. Die Mitoserate ist seit 2009 Bestandteil zur Klassifizierung von malignen Melanomen und ersetzt seit 2009 das Invasionslevel nach Clark als ein Primärkriterium bei der Einteilung von malignen Melanome im Stadium T1 (Balch, et al., 2009). Die Mitoserate gilt als aussagekräftiger und unabhängiger Prognosefaktor. In einer Studie des AJCC mit 10233 Patienten konnte gezeigt werden, dass die Mitoserate nach der Tumordicke der zweitaussagekräftigste Prognosefaktor ist (Balch, et al., 2009).

Vorhandensein von Ulzerationen

Das Vorhandensein einer Ulzeration des Primärtumors wirkt sich ebenfalls negativ auf die Überlebenszeit der Patienten aus. Die Überlebensprognose eines Patienten mit ulzeriertem

Melanom ist nahezu äquivalent mit der Prognose eines Patienten mit einem nicht-ulzerierten Melanom mit der nächst höheren Tumordicken-Kategorie. So beträgt die Fünf-Jahres-Überlebensrate von nicht-ulzerierten T3a Melanomen 79 % und die Fünf-Jahres-Überlebensrate von ulzerierten T2b Melanomen 82 %. Beide gehören dem Stadium IIB an (Balch, Wilkerson, J. A., Soong, Ingalls, & Maddox, 1980).

Alter bei Primärdiagnose

In einer Studie aus Florida konnte gezeigt werden, dass das Alter bei Erstdiagnose ebenfalls mit den prognostischen Faktoren Tumordicke und Ulzeration korreliert. Hierbei wurden die Patienten in zwei Gruppen unterteilt; die Gruppe der über 65-Jährigen Patienten waren weniger häufig rezidivfrei, als die Gruppe der unter 65-Jährigen Patienten (55 % vs. 65 %) (Austin, Cruse, Lyman, Schroer, Glass, & Reintgen, 1994).

Lokalisation des Primärtumors

Tumore, die am Thorax (an Rücken oder Brust), am Oberarm, der Kopfhaut und dem Hals lokalisiert sind, haben eine schlechtere Prognose als Tumore mit Lokalisation an den Extremitäten oder im Gesicht (Garbe C, 1995).

Clark-Level

Das Invasionslevel nach Clark wurde 1969 von Clark eingeführt (Clark, From, & Bernadino, 1969). Es werden fünf verschiedene Level unterschieden. Diese Klassifizierung hat eine weitaus geringere prognostische Bedeutung als die Tumordicke nach Breslow. Der Einfluss auf die Prognose konnte nur bei Tumoren von einer Tumordicke unter 1 mm belegt werden (Balch, et al., 2009). In der letzten überarbeiteten Ausgabe der Melanoma Staging Klassifikation der AJCC von 2009 wurde das Invasionslevel nach Clark daher durch die Mitoserate pro mm² ersetzt (Balch, et al., 2009).

2.7 Funktionen von CTLA-4 und CD28

Eine optimale Immunantwort erfordert ein direktes antigenspezifisches, von den T-Zellen generiertes Signal und ein zweites costimulatorisches Signal, welches von den auf den T-Zellen befindlichen Korezeptoren ausgeht. Diese Korezeptoren optimieren die T-Zell-vermittelten Immunantworten, da sie maßgeblich für die Balance von stimulierenden und inhibitorischen Signalen im Immungeschehen verantwortlich sind und den Organismus vor einer erhöhten Autoimmunität bewahren (Valk, Rudd, & Schneider, 2008).

Das Zytotoxische Lymphozyten Antigen 4 (CTLA-4), auch CD152 genannt, befindet sich auf der Oberfläche von T-Zellen und ist ein wichtiger inhibitorischer Korezeptor. Es bindet mit einer 100-fach höheren Affinität an Proteine der B7-1- und B7-2-Klasse als der strukturähnliche Korezeptor und Gegenspieler CD28 (Chattopadhyay, et al., 2009). Er befindet sich hauptsächlich in intrazellulären Kompartimenten. Die B7-1- und B7-2-Moleküle sind auf Antigen-Präsentierenden Zellen (APC) vorhanden. Phänotypisch CTLA-4-defiziente Mäuse zeigten die starke inhibitorische Rolle des CTLA-4 im Immungeschehen (Valk, Rudd, & Schneider, 2008). Die Mäuse wurden gesund geboren, zeigten aber nach wenigen Tagen durch das fehlende Gegengewicht zu CD28, eine massive Lymphozytenexpansion in das umliegende Gewebe und eine frühe Sterblichkeit (Valk, Rudd, & Schneider, 2008). Dies unterstreicht die Hypothese, dass CTLA-4 essentiell für die Minderung der Autoreaktivität der T-Lymphozyten ist (Wolchok & Saenger, 2008).

Der CD28-Rezeptor, der sich wie CTLA-4 auf der T-Zell-Oberfläche befindet, bindet dieselben Liganden der B7-Familie, mit einer weitaus schwächeren Affinität. Seine Hauptaufgabe ist es, die T-Zell-Aktivierung zu steigern und zu erhalten. CD28 ist somit Gegenspieler von CTLA-4 (Chattopadhyay, et al., 2009). Fällt CTLA-4 durch genetische Defizienz oder Manipulation (CTLA-4 Antikörper-Therapie) aus, kann CD28 ungehindert und ungehemmt agieren, wodurch das Gleichgewicht der Immunantwort stark zugunsten der Immunstimulation verändert wird und woraus gleichzeitig eine ungehinderte Autoimmunität resultieren kann (Bakacs, Merishi, & Moss, 2011). Individuen mit chronischen Infektionen oder Menschen im höheren Lebensalter haben signifikant mehr CD28 negative T-Zellen, was darauf schließen lässt, dass ein Verlust der CD28 positiven T-Zellen mit immunologischem Altern einhergeht (Riley & June, 2004).

Die Aktivierung der T-Zellen erfolgt durch Antigen-präsentierenden Zellen (APC: Makrophagen, B-Zellen und Dendritische Zellen). Das wichtigste Signal ist das Erkennen des Antigens mithilfe der MHC-II-Moleküle. Körperfremde Antigene werden von den APC aufgenommen, im Zellinneren abgebaut und an MHC-II-Komplexe gebunden. Diese an

MHC-II-gebundenen Antigene werden wiederum auf der Zelloberfläche den CD-4-positiven T-Helferzellen präsentiert. Ein kostimulatorisches Signal erfolgt über CD28, das an die B7-Moleküle der APC bindet. Die CD-4-positive T-Helferzelle erkennt den Komplex aus Antigen und MHC-II-Molekül; es kommt zur Aktivierung und damit zu einer von Interleukin-2 abhängigen T-Zell-Proliferation. Die T-Zellen aktivieren zuletzt B-Zellen, welche sich zu Plasmazellen differenzieren und große Mengen an Antikörpern gegen das Antigen bilden (Heinzerling, Hartmann, Hund, & Schuler, 2014).

Die Herabregulierung von T-Zellen durch CTLA-4 wird hauptsächlich durch zwei Mechanismen bestimmt: dem kompetitiven Antagonisieren von CD28-Signalen und dem direkt negativen Signalweg (Teft, 2005). CTLA-4 ist im Gegensatz zu CD28 nicht konstitutiv auf der T-Zell-Oberfläche vorhanden und wird erst nach der Aktivierung der T-Zellen kompensatorisch auf der T-Zell-Oberfläche vermehrt exprimiert. Es gruppiert sich mit seinen Lipidrafts an der immunologischen Synapse (gebildet aus der aktivierten T-Zelle und der Antigen-präsentierenden Zelle) und konkurriert dort mit CD28 um die Bindung von B7-Molekülen. Die Affinität von CTLA-4 zu den B7-Molekülen ist 10-100-fach größer als die zwischen CD28 und den B7-Molekülen, sodass CTLA-4 dem CD28-Rezeptor den Bindungspartner entzieht (Teft, 2005).

2.8 Ipilimumab und seine Wirkungsweise

Ipilimumab (Yervoy®), ist ein rekombinanter vollständig humaner monoklonaler IgG1-Antikörper gegen CTLA-4. Durch die Blockade von CTLA-4 wirkt Ipilimumab dessen negativer Regulierung auf die T-Zellen entgegen. CTLA-4 bremst T-Zell-Reaktionen und verhindert durch seine inhibitorische Wirkungsweise eine überschießende Autoimmunreaktion. Ipilimumab verstärkt durch die Blockade von CTLA-4 wiederum die Aktivierung und Proliferation der T-Zellen und damit deren Infiltration in Tumore und wirkt sich auf den nachfolgenden Tumorzelltod aus, indem es die Immunantwort fördert und damit die Tumorerkennung durch das Immunsystem verbessert. Gleichzeitig fördert es indirekt die Funktion von CD28 und dessen aktivierende Funktion. Die T-Zellen verlieren hierbei zunehmend die Fähigkeit zwischen körperfremd und körpereigen zu unterscheiden, sodass die Eigentoleranz des Organismus abnimmt, woraus eine Zunahme von Autoimmunphänomenen resultiert (Bakacs, Merishi, & Moss, 2011) (Pflugfelder, Koch, & Blum, 2013) (Hodi, et al., 2003).

Ipilimumab wurde an der Universität Berkeley in Kalifornien (USA) entwickelt und ist im März 2011 von der US Food and Drug Administration (FDA) für nicht-resezierbare oder metastasierende Melanome zugelassen worden. Im Juli 2011 genehmigte die Europäische Kommission (European Medicines Agency) den Einsatz von Ipilimumab für die Behandlung von vorbehandelten Patienten mit fortgeschrittenen (unresezierbaren oder metastasierten) Melanomen (Comittee for Medicinal Products for Human Use, 2011) (Finn, Markovic, & Joseph, 2012). Seit dem 31.10.2013 ist Ipilimumab auch als first-line-Therapie zur Behandlung von Patienten mit metastasiertem Melanom zugelassen (Buzaid, Argawala, & Hauschild, 2014).

Im Rahmen einer dreiarmligen Phase III Studie von Hodi *et al.* wurden Patienten mit bereits vorbehandeltem, fernmetastasiertem und nicht-resezierbarem Melanom mit Ipilimumab (3 mg/kg/Körpergewicht), einer Vakzine (gp 100) und einer Kombination aus Ipilimumab und Vakzine behandelt. Die Ipilimumab-Gruppe und die Kombinationsgruppe (Ipilimumab+Vakzine) hatten mit 10,0 bzw. 10,1 Monaten Gesamtüberleben einen signifikanten Überlebensvorteil gegenüber der Vakzinegruppe mit 6,4 Monaten. In einer Phase III Studie von Robert *et al.* wurden 502 Patienten mit nicht vorbehandeltem, inoperablem metastasiertem Melanom (Stadium III, IV) mit Ipilimumab (10 mg/kg/Körpergewicht) und Dacarbazin bzw. Dacarbazin+Placebo alle drei Wochen behandelt. In dieser Studie konnte ebenfalls eine Verlängerung des Gesamtüberlebens der Ipilimumab+Dacarbazin-Gruppe mit 11,2 Monaten verglichen mit der Therapie mit Dacarbazin plus Placebo mit 9,1 Monaten gezeigt werden. Schwere immunvermittelte

Nebenwirkungen wurden in beiden Studien in den Ipilimumab-Armen in größerem Ausmaß beobachtet (Hodi, O' Day, & McDermatt, 2010) (Robert, et al., 2011).

Schadendorf und Mitarbeiter führten eine Langzeitüberlebensstudie mit Ipilimumab mit 4846 Patienten durch, bei der das mediane Überleben 9,5 Monate betrug. Auffällig im Gesamtüberleben ist ein Plateau, beginnend im dritten Jahr, das bis zum zehnten Jahr reicht und unabhängig von der Ipilimumabdosis bzw. der jeweiligen Vorbehandlung ist (Schadendorf, et al., 2015).

In Deutschland ist Ipilimumab zugelassen zur Behandlung metastasierter Melanome in einer Dosis von 3 mg/kg/Körpergewicht p. i. im Abstand von jeweils 3 Wochen. Verabreicht werden hierbei vier Zyklen (Committee for Medicinal Products for Human Use, 2011).

Durch das mögliche Auftreten von Autoimmunphänomenen ist die Compliance des Patienten und dessen aktive Mitarbeit zwingend erforderlich, um frühestmöglich unerwünschte Nebenwirkungen erkennen und behandeln zu können. Die Nebenwirkungen von Ipilimumab, die in klinischen Studien beobachtet wurden, sind vor allem auf die verstärkte Immunantwort und die daraus resultierende Autoimmunität zurückzuführen (Granziani, Tentori, Pierluigi, & Navarra, 2011) und werden, je nach Schweregrad, gemäß CTC (Common Toxicity Criteria) in fünf Gruppen unterteilt. Die häufigsten Nebenwirkungen (von denen mehr als 10 % der Patienten betroffen sind) umfassen Diarrhoe, Exanthem, Pruritus, Fatigue, Übelkeit und Erbrechen und verminderten Appetit (Hanaizi, et al., 2011).

In der Studie von Robert *et al.* wurden schwere Nebenwirkungen (Grad III-IV) bei 56,3 % der Patienten festgestellt, die mit Ipilimumab und Dacarbazin behandelt wurden, wohingegen nur 27,5 % der Patienten, die mit Dacarbazin plus Placebo behandelt wurden schwere Nebenwirkungen aufwiesen (Robert, et al., 2011). Schwere medikamenten-spezifisch-vermittelte Nebenwirkungen betrafen vor allem vier Organsysteme: den Gastrointestinaltrakt, die Leber, die Haut und das endokrine System. Autoimmun vermittelte Nebenwirkungen treten typischerweise in einer charakteristischen zeitlichen Abfolge auf. Drei bis vier Wochen nach Beginn einer Therapie mit Ipilimumab sind erste Auswirkungen an der Haut bemerkbar. Hautveränderungen, wie Exanthem und Pruritus, treten häufig auf, sprechen in der Regel aber gut auf topische Steroide, wie z. B. Betamethason, an. In lediglich 4 % der Fälle sind die cutanen Nebenwirkungen so schwer, dass die Therapie pausiert oder abgesetzt werden muss (Kähler & Hauschild, 2011). Nach 6-7 Wochen können erste Symptome im Gastrointestinaltrakt bzw. in der Leber auftreten. Bei Hepatotoxizität und schwerwiegenden Erhöhungen der Transaminasenwerte und des Gesamtbilirubins ist ein Therapieabbruch indiziert und eine hochdosierte Cortisontherapie nötig (Kähler & Hauschild, 2011). Bei unverändertem Zustand wird eine immunsuppressive Therapie mit Mycophenolatmofetil

empfohlen. Die gastrointestinalen Auswirkungen Colitis und Diarrhoe sind häufig, so tritt Diarrhoe bei 44 % der Patienten begleitend auf und ist i. d. R. verbunden mit allgemeiner Schwäche und einem Elektrolytungleichgewicht (Kähler & Hauschild, 2011). Die Behandlung der milden Diarrhoe erfolgt symptomatisch mit Loperamid und Volumen-/Elektrolytsubstitution. Eine schwere Diarrhoe (ab einer Stuhlfrequenz von 7/d) bedarf einem Therapieabbruch und einer hochdosierten Kortisonbehandlung und ggf. der Gabe von TNF- α -Blockern wie Infliximab (Kähler & Hauschild, 2011). Im Fall der Kolitis besteht die Gefahr der Darmperforation. Durchschnittlich neun Wochen nach Therapiebeginn können endokrine Nebenwirkungen auftreten, wie beispielsweise eine Hypophysitis, deren Symptome denen von Hirnmetastasen gleichen kann. Therapie der Wahl ist ebenfalls die Gabe von hochdosiertem Kortison, wobei eine Befundbesserung nach frühestens 20 Wochen zu erwarten ist (Weber, 2009) (Kähler & Hauschild, 2011) .

2.9 CD28-Autoantikörper bei Melanompatienten

CD28-Autoantikörper konnten in der Vergangenheit bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen und bei Atopikern nachgewiesen werden (Neuber, Mähns, Hübner, Gergely, & Weichenthal, 2006). Außerdem wurden erhöhte CD28-Autoantikörpertiter bei Melanompatienten gefunden (Körner, et al., 2013). In einer Studie von Körner *et al.* wurde das Vorhandensein von CD28-Autoantikörpern bei 230 Melanompatienten in Bezug auf die Gesamtüberlebenszeit und progressionsfreie Überlebenszeit untersucht (Körner, et al., 2013). In der Vergleichsgruppe befanden sich 624 Personen, die an Hepatitis B- und Hepatitis C, Psoriasis, Allergien oder Plasmozytom erkrankt waren sowie gesunde Blutspender. CD28-Autoantikörper konnten in signifikant höherem Ausmaß bei an Melanom oder an Hepatitis B oder C erkrankten Personen nachgewiesen werden als bei den anderen untersuchten Gruppen. Das Vorhandensein der CD28-Autoantikörper war hier bei den zuvor mit Interferon behandelten Patienten signifikant höher, als bei den Vergleichsgruppen ohne vorausgehende Interferonbehandlung, wobei die Dosis der Interferontherapie (low-dose versus high-dose) keinen Einfluss auf das Vorhandensein von CD28-Autoantikörpern hatte. Die Patientengruppe mit nachgewiesenen CD28-Autoantikörpern zeigte nach einer vorausgehenden Interferontherapie mit 61 % deutlich häufiger eine Krankheitsprogression als Melanompatienten ohne nachweisbare CD28-Autoantikörper, bei der nur 40 % der Patienten einen nachweisbaren Krankheitsprogress nach Interferontherapie hatten. Außerdem war die Präsenz von CD28-Autoantikörpern bei Melanompatienten mit einem höheren Risiko assoziiert an der Krankheit zu versterben. Zwischen der Gesamtüberlebenszeit bzw. der progressionsfreien Überlebenszeit und dem Vorhandensein von CD28-Autoantikörpern bestand jedoch keine signifikante Korrelation (Körner, et al., 2013).

Eine adjuvante Interferontherapie scheint die Produktion von CD28-Autoantikörpern zu induzieren. Lühder *et al.* beschreiben in ihrer Arbeit zwei Gruppen von CD28-Autoantikörpern, deren Aktivierungsweg und ihre jeweilige Rolle im Immungeschehen. Zum einen gibt es die konventionellen CD28-Autoantikörper, die zur T-Zellaktivierung ein Signal über den T-Zell-Rezeptor benötigen, und zum anderen gibt es superagonistische CD28-Autoantikörper, die die T-Zellen direkt und unabhängig von weiteren Signalen *in vivo* und *in vitro* stimulieren können (Lühder, et al., 2003). Neuber *et al.* zeigte, dass CD28-Autoantikörper in Seren von Patienten mit atopischer Dermatitis *in vitro* die T-Zell-Proliferation steigerten (Neuber, Mähns, Hübner, Gergely, & Weichenthal, 2006).

Critchley-Thorne *et al.* untersuchten den Effekt einer Interferontherapie auf die Lymphozytenstimulation im peripheren Blut bei drei Tumorentitäten (Brustkrebs, malignes

Melanom und gastrointestinales Karzinom) und zeigten, dass sich eine Interferonbehandlung bei den untersuchten Patienten negativ auf deren Lymphozytenfunktion und damit auf die Immunfunktion auswirkte. Außerdem untersuchten sie die Auswirkungen der Interferonbehandlung auf die Immunabwehr bei Melanompatienten und einer Vergleichsgruppe von gesunden Blutspendern. Es zeigte sich, dass die Melanompatienten grundsätzlich schlechter auf die Interferonbehandlung ansprachen als die Vergleichsgruppe. Unter den Melanompatienten sprachen zwei Drittel auf die Interferontherapie an und ein Drittel nur gering (Low-Responder). Hieraus schlussfolgerten die Autoren, dass Defekte in den Interferonsignalwegen oder ein geringes Ansprechen auf die Interferontherapie mit einer herabgesetzten Immunabwehr bei Melanompatienten einhergehen (Critchley-Thorne, Yan, Nacu, Weber, Holmes, & Lee, 2007).

2.10 Laborparameter

Folgende Laborparameter haben bei Patienten mit Melanom prognostische Bedeutung und eignen sich als Tumormarker im weiteren Sinn:

CRP

Das C-reaktive Protein (CRP) ist ein Entzündungsparameter. Nach Studien von Deichmann *et al.* von 2001 und 2004 ist das CRP der Laktatdehydrogenase (LDH) als prognostischer Marker im Stadium der Fernmetastasierung überlegen und ist ein prognostisch aussagekräftiger Überlebenszeitparameter (Deichmann, Kahle, Moser, Wacker, & Wüst, 2004) (Deichmann, Bremer, Kuner, Wacker, Waldmann, & Näher, 2001).

Laktatdehydrogenase (LDH)

Die LDH ist ein unspezifischer Parameter, der erst im Spätstadium der Erkrankung auffallend erhöhte Konzentrationen aufweist (Hein, Bosserhoff, & Ring, 2006). So weist die LDH bei vielen krankhaften Prozessen mit einem erhöhten Zellzerfall einen erhöhten Wert auf, wie beispielsweise beim Myokardinfarkt oder anderen Malignomen (Hein, Bosserhoff, & Ring, 2006). Entzündliche Prozesse wie Myokarditis oder Hepatitis gehen ebenfalls mit erhöhten LDH-Werten einher (Hein, Bosserhoff, & Ring, 2006). In Studien korrelierten erhöhte LDH-Werte im Serum von Melanompatienten mit einer geringeren Überlebenszeit im Stadium der Fernmetastasierung (Balch C. M., 2003), weswegen die LDH-Serum-Konzentration im Stadium der Fernmetastasierung (Stadium IV) als Parameter zur Klassifikation der Melanome durch das American Joint Committee on Cancer (AJCC) aufgenommen wurde. (Balch, *et al.*, 2009) Nach Garbe *et al.* (2003) ist die LDH der Marker mit der höchsten Spezifität aber der geringsten Sensitivität (Garbe, Leiter, Blaheta, & Meier, 2003).

S 100-Proteine

Die S100-Proteine sind calciumbindende Proteine, die im intrazellulären Calciumstoffwechsel eine Rolle spielen. Als Serummarker und Verlaufsparemeter in der Melanomnachsorge ist vor allem das S100 β -Protein von Bedeutung. Das S100 β -Protein wird in Schwannzellen, Astrozyten und Gliazellen, aber auch in Melanozyten, Adipozyten und Chondrozyten gebildet. S100-Serumwerte können bei Leber- und Nierenerkrankungen, aber auch bei Erkrankungen des Zentralen Nervensystems erhöht sein, woraus falschpositive Ergebnisse resultieren können (Hein, Bosserhoff, & Ring, 2006). In einer Studie von Hauschild *et al.* wurden Blutproben von 419 Melanompatienten in den Stadien I-IV der Erkrankung im Hinblick auf den Serummarker S100 β untersucht. Die Überlebenszeiten von Patienten mit einem Serumlevel < 0,2 mg/dl waren deutlich besser als die Überlebenszeiten der Patienten

mit einem Serumlevel > 0,2 mg/dl unabhängig vom Tumorstadium (Hauschild, et al., 1999). So konnte gezeigt werden, dass S100 β ein wichtiger prognostischer Faktor für die Überlebenszeit und für Nachsorgeuntersuchungen ist. S100 β gilt als sensitiverer und spezifischerer Marker als beispielsweise die LDH oder die Alkalische Phosphatase (AP) (Garbe, Leiter, Blaheta, & Meier, 2003).

3 Fragestellung der Dissertation

In der Studie von Körner *et. al* war das Vorhandensein von CD28-Autoantikörpern bei Melanompatienten mit einer Tendenz zu einer kürzeren Überlebenszeit, aber nicht mit einer signifikant kürzeren progressionsfreien Überlebenszeit verbunden.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, welche prognostische Aussagekraft das Vorhandensein und die Höhe von CD28-Autoantikörpern auf den Verlauf der Erkrankung von Melanompatienten unter der Therapie mit Ipilimumab hat und inwieweit CD28-Autoantikörper möglicherweise das progressionsfreie und das Gesamtüberleben beeinflussen.

Zielsetzung der Arbeit ist es somit, mögliche Unterschiede bezüglich des progressionsfreien Überlebens und des Gesamtüberlebens in Abhängigkeit vom Vorhandensein von CD28-Autoantikörpern im Serum herauszufinden.

Dabei sollen folgende Fragen beantwortet werden:

1. Wie häufig kommen CD28-Autoantikörper bei Melanompatienten unter Ipilimumabtherapie vor?
2. Induziert eine Therapie mit Ipilimumab die Bildung von CD28-Autoantikörpern?
3. Besteht ein Unterschied in Bezug auf das progressionsfreie Überleben zwischen Melanompatienten mit CD28-Autoantikörpern und Melanompatienten ohne CD28-Autoantikörper?
4. Besteht ein Unterschied in Bezug auf das Gesamtüberleben zwischen Melanompatienten mit CD28-Autoantikörpern und Melanompatienten ohne CD28-Autoantikörper?
5. Inwiefern eignen sich vorhandene CD28-Autoantikörper als prognostischer oder prädiktiver Marker?
6. Welche weiteren Faktoren haben Einfluss auf die Wirksamkeit einer Therapie mit Ipilimumab?

4 Material und Methodik

4.1 Patientenkollektiv

Die vorliegende Arbeit und statistische Auswertung basiert auf den Daten von Patienten mit inoperabel metastasiertem Melanom, die sich zwischen dem 18.04.2012 und dem 03.09.2014 einer Behandlung mit Ipilimumab an der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie des Universtätsklinikums des Saarlandes unterzogen.

Das Patientenkollektiv bestand aus Erwachsenen mit fortgeschrittenem Melanom im fernmetastasierten Stadium (Stadium IV) oder im lokoregionär metastasiertem Stadium (Stadium III), die bereits vortherapiert worden waren und nicht *in sano* operabel waren und nach einem Progress unter Vortherapie Ipilimumab verabreicht bekamen.

Das Patientenkollektiv umfasste 19 Patienten, darunter sechs Frauen und 13 Männer. Das mediane Alter zum Zeitpunkt der ersten Ipilimumabgabe betrug 72 Jahre (range 46-82). Bei drei Patienten lagen zu Therapiebeginn keine Fernmetastasen (Stadium III) vor, die übrigen 16 Patienten hatten Fernmetastasen, wobei sich zwei Patienten im Stadium M1b und 14 im Stadium M1c befanden.

Die folgende Tabelle 6 zeigt die Patientencharakteristika im untersuchten Patientenkollektiv.

Tabelle 6:

Anzahl	19
Geschlechtsverteilung	Weiblich: 6 (31,6 %) Männlich: 13 (68,4 %)
Medianes Alter	72 Jahre (range 46-82 Jahre)
Anzahl der durchgeführten Zyklen der Therapie mit Ipilimumab	2 Zyklen: n= 4 (21,1 %) 3 Zyklen: n= 3 (15,8 %) 4 Zyklen: n= 12 (63,2 %)
M-Stadium zu Beginn der Therapie	IIIC: n= 3 (15,8 %) M1a: n= 0 (0 %) M1b: n= 2 (10,5 %) M1c: n= 14 (73,7 %)
Metastasenlokalisierung (jeweils prognostisch ungünstige Lokalisation)	Lokoregionäre Lymphknoten +/- Satelliten- und in-transit-Filiae: n= 3 (15,8 %) Lunge: n= 1 (5,3 %) Andere Organe: n= 13 (63,1 %) Hirn: n= 3 (15,8 %)
Melanomtyp des Primärtumors	Noduläres Melanom: n= 6 (31,6 %) Superfiziell Spreitendes Melanom: n= 6 (31,6 %) Unklassifizierbares Melanom: n= 4 (21,1 %) Akrolentiginöses Melanom: n= 2 (10,5 %) Desmoplastisches Melanom: n= 1 (5,3 %)
Lokalisation des Primärtumors	Rücken: n= 6 (31,1 %) Fuß: n= 5 (26,3 %) Bein: n= 5 (26,3 %) Oberarm: n= 3 (15,8 %)
Vorausgegangene adjuvante Interferonbehandlung	Interferonbehandlung: n= 8 (42,1 %) Keine Interferonbehandlung: n= 11 (57,9 %)

Tabelle 6: Patientencharakteristika im untersuchten Patientenkollektiv

4.2 Therapie und Laborkontrollen

Ipilimumab wurde intravenös in der zugelassenen Dosierung von 3 mg/kg Körpergewicht über einen 90-minütigen Zeitraum alle drei Wochen verabreicht. Geplant waren in allen Fällen vier Gaben. Direkt vor der ersten ambulanten Infusionstherapie wurde eine Blutentnahme (Baseline) vorgenommen. Danach wurden Blutentnahmen bei weiteren Ipilimumabgaben oder i. R. des Stagings (6 Wochen nach der letzten Ipilimumab-Gabe) und danach alle drei Monate zur Kontrolle vorgenommen.

4.3 Laborparameter

Es wurden folgende Laborparameter erfasst: S100-Werte, CRP, LDH und CD28-Autoantikörper im Serum. Diese Parameter dienen zur Verlaufs-/Progressionsbeurteilung der Tumorerkrankung. Die Bestimmung der Werte S100, CRP und LDH erfolgte im Zentrallabor des Universitätsklinikums des Saarlandes. Die Bestimmung der CD28-Autoantikörper erfolgte mittels eines durch das Forschungslabor der Klinik für Innere Medizin I und dem José Carreras Zentrum für Immun- und Gentherapie etablierten ELISA-Essays. Dieser Essay fand erstmals in der Studie von Körner *et. al.* Anwendung. Dessen Etablierung ist dort genau beschrieben (Körner, et al., 2013).

Für die statistische Auswertung wurden in einer Excel-Tabelle folgende Patientendaten erfasst:

- Patientennummer
- Geschlecht
- Geburtsdatum
- Alter zum Zeitpunkt der ersten Ipilimumabgabe
- Datum der ersten Ipilimumabgabe
- Zeitspanne zwischen erster Ipilimumabgabe bis zum Tumorprogress in Tagen, sofern Progress im Beobachtungszeitraum eintrat
- Zeitspanne zwischen erster Ipilimumabgabe bis zum Tod in Tagen, sofern der Patient im Beobachtungszeitraum verstorben ist
- Anzahl der verabreichten Ipilimumab-Zyklen
- Lokalisation der Metastasen zu Beginn der Ipilimumabtherapie (Lymphknoten, Lunge, andere Lokalisation, Hirn)
- Art und Anzahl der Vortherapien vor Ipilimumabbehandlung
- Art und Anzahl der Folgetherapien nach Progress unter Ipilimumabbehandlung
- Nebenwirkungen unter der Ipilimumabtherapie entsprechend der CTCAE-Einteilung
- die einzelnen Parameter: S100, CRP; LDH und CD28-Autoantikörper zum Zeitpunkt der Entnahme der jeweiligen Blutproben

4.4 Beobachtungszeitraum, Progressionsfreie Überlebenszeit und Gesamtüberleben

Beginn des Beobachtungszeitraumes war für alle Patienten die erste Serumentnahme im Rahmen der ersten Ipilimumabgabe. Die Serumentnahmen fanden zwischen dem 18.04.2012 dem 15.10.2013 statt.

Als Enddatum der Beobachtung wurde das Sterbedatum gewählt bzw. die letzte Serumentnahme für diejenigen Patienten, die zum Zeitpunkt der Datenauswertung, dem 03.09.2014, noch am Leben waren.

Als Progress der Tumorerkrankung wurden neuauftretene Metastasen oder deren Größenzunahme um $> 25\%$ bzw. deren erster Nachweis in einer Bildgebung gewertet.

4.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Excel 2010 und SPSS Version 19 unter Unterstützung von Herrn PD Dr. Stefan Gräber (Instituts für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes).

Die Tabellen, Graphiken und Kaplan-Meier-Kurven wurden mithilfe von Excel 2010 und SPSS Version 19 erstellt.

Zum Vergleich des progressionsfreien Überlebens bzw. des Überlebens wurde der Log-Rank-Test verwendet. $P < 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet.

5 Ergebnisse

5.1 Inzidenz und Prävalenz von CD28-Autoantikörpern

Neun von 19 Patienten (47,4 %) der Patienten zeigten CD28-Autoantikörper im Serum. Einer dieser Patienten wies CD28-Autoantikörper bereits vor der ersten Ipilimumab-Gabe auf. Somit kam es bei acht von 19 (44,1 %) Patienten zu einer Serokonversion. Von den Patienten im Stadium IV zeigten sieben der insgesamt 16 (43,8 %) Patienten eine Serokonversion. Abbildung 2 veranschaulicht den Patientenanteil mit bzw. ohne CD28-Autoantikörper.

Die Serokonversion fand bei vier Patienten nach der zweiten Ipilimumab-Gabe, bei drei Patienten nach der dritten Ipilimumab-Gabe und bei einem Patienten nach der vierten Gabe von Ipilimumab statt.

Abbildung 2:

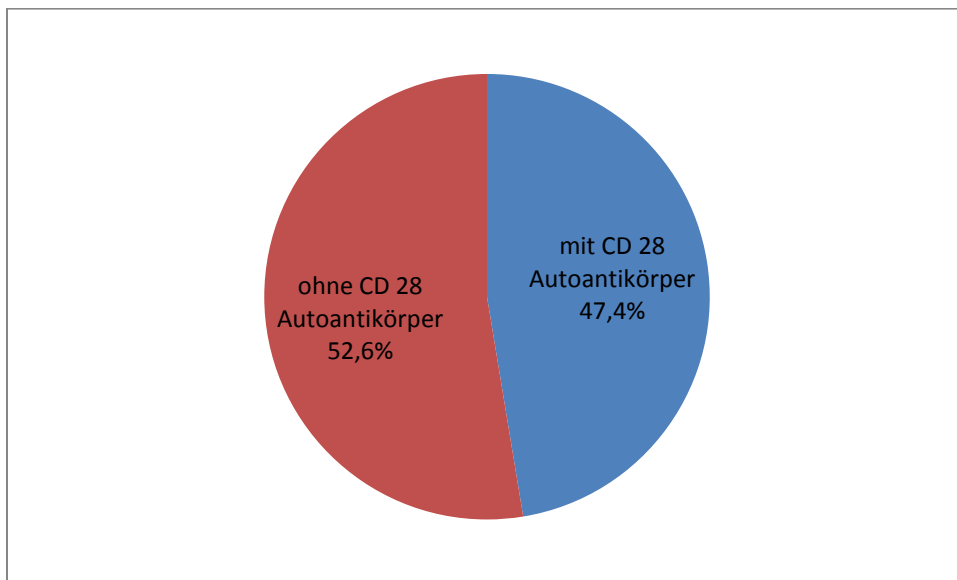


Abbildung 2: Patientenanteil mit bzw. ohne CD28-Autoantikörper

5.1.1 Nebenwirkungen

Traten behandlungsbedürftige Nebenwirkungen auf, wurde die Therapie unterbrochen und ein Zyklus der Behandlung mit Ipilimumab ausgelassen. 12/19 Patienten (63,2 %) erhielten alle geplanten vier Zyklen, drei Patienten (15,8 %) erhielten drei Zyklen und bei zwei Patienten (10,5 %) konnten nur zwei Ipilimumab-Gaben durchgeführt werden. Drei Patienten (15,8 %) litten unter Diarrhoe, Kolitiden betrafen zwei Patienten (10,5 %) und ein Exanthem (5,3 %) trat bei einem Patienten auf. Die übrigen Patienten hatten keine Nebenwirkungen durch die Ipilimumabbehandlung. Bei anschließender ambulanter Weiterbehandlung der Patienten wurden weitere Laboruntersuchungen vorgenommen.

5.1.2 Melanomtyp des Primärtumors

Die Verteilung der zugrunde liegenden Melanomtypen des Primärtumors im Patientenkollektiv zeigt Abbildung 3. Unter den Primärtumoren traten die Typen noduläres Melanom (NM) und das superfiziell spreitende Melanom (SSM) mit jeweils 31,6 % gleich häufig auf. Zwei (10,5 %) der Primärtumoren wurden als akrolentiginöses Melanom beschrieben. Ein desmoplastisches Melanom (5,3 %) trat einmal auf. Vier Melanome (21,1 %) konnten nicht klassifiziert werden (UCM).

Abbildung 3:

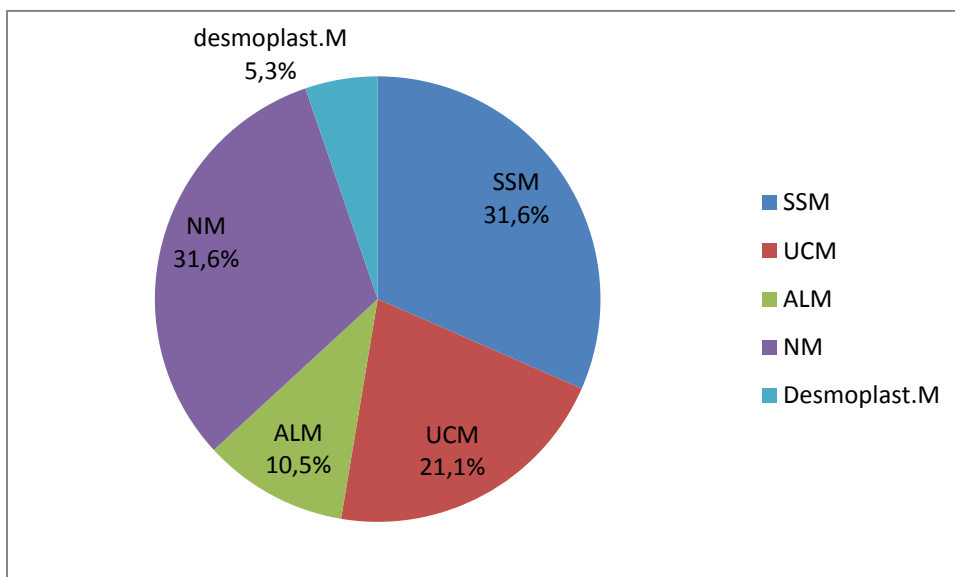


Abbildung 3: Melanomtyp des Primärtumors (SSM: superfiziell spreitendes Melanom; UCM: unklassifizierbares Melanom; ALM: akrolentiginöses Melanom; NM: noduläres Melanom, desmoplast. M: desmoplastisches Melanom)

5.1.3 Lokalisation des Primärtumors

Die Lokalisation der Primärtumoren ist in Abbildung 4 dargestellt. Der Rücken kam als Lokalisationsort mit 31,6 % am häufigsten vor, gefolgt von Unterschenkel, Zehe und Oberarm mit jeweils 15,8 %. Bei zwei Patienten (10,2 %) trat das Melanom am Fuß auf. Oberschenkel bzw. Knie war der Lokalisationsort von jeweils einem Melanom (5,3 %). Zusammenfassend war von den Melanomen im untersuchten Patientenkollektiv kein Primärtumor im Kopf-Hals-Bereich lokalisiert. Sechs Melanome (31,6 %) waren an Stamm und 13 (58,4 %) an den Extremitäten lokalisiert.

Abbildung 4:

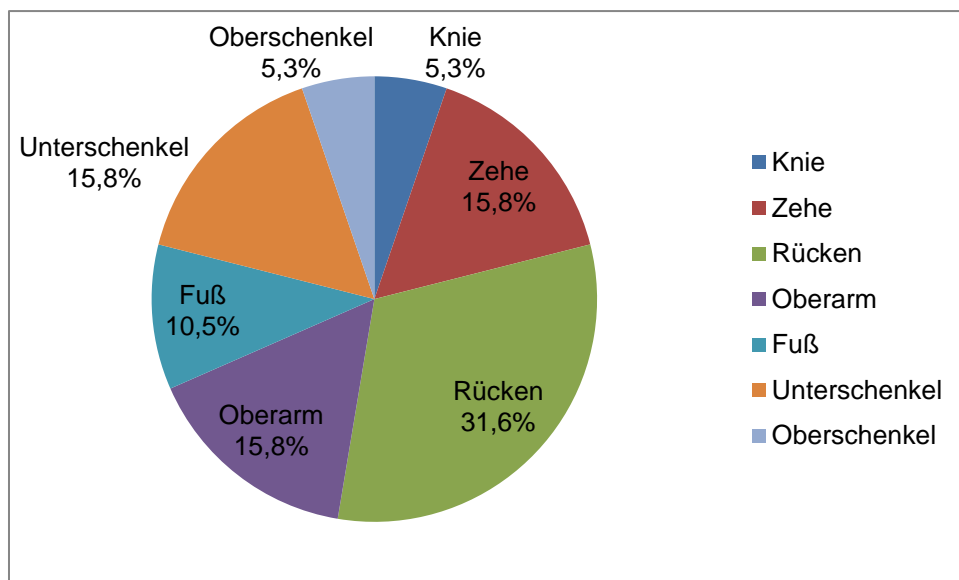


Abbildung 4: Lokalisation des Primärtumors

5.2 Progressionsfreie Überlebenszeit

5.2.1 Gesamte Progressionsfreie Überlebenszeit

Innerhalb des Beobachtungszeitraumes zeigte sich bei 18/19 (94,6 %) der Patienten ein Progress der Tumorerkrankung. Ein Patient (5,3 %) blieb während des Beobachtungszeitraumes progressionsfrei.

Tabelle 7 zeigt die Anzahl der progredienten und progressionsfreien Patienten unterteilt nach Männern und Frauen.

Tabelle 7:

	Geschlecht		Gesamt
	männlich	weiblich	
Progressionsfrei	1	0	1
Progredient	12	6	18
Gesamt	13	6	19

Tabelle 7: Anzahl der progredienten bzw. progressionsfreien Patienten unterteilt nach Männern und Frauen

Tabelle 8 zeigt die Anzahl der Tage, die zwischen der ersten Ipilimumab-Gabe und einem möglichen Progress lagen und damit die progressionsfreie Überlebenszeit. Der Mittelwert der progressionsfreien Überlebenszeit beträgt ca. 74 Tage und der Median, der Zeitpunkt, an dem bei 50 % der Patienten bereits ein Krankheitsprogress nachweisbar war, beträgt 83 Tage. Aus der Tabelle wird ersichtlich, dass in diesem Patientenkollektiv im Minimum 21 Tage zwischen der ersten Verabreichung von Ipilimumab und dem nachweisbaren Progress lagen. Die längste Spanne zwischen erster Ipilimumab-Gabe und Progress betrug 120 Tage.

Tabelle 8:

Tage zw. 1. Ipilimumab-Gabe u Progress	Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozent	Kumulierte Prozent	
21	1	5,3 %	5,6 %	5,6 %	
33	2	10,5 %	11,1 %	16,7 %	
44	1	5,3 %	5,6 %	22,2 %	
47	1	5,3 %	5,6 %	27,8 %	
65	1	5,3 %	5,6 %	33,3 %	
69	1	5,3 %	5,6 %	38,9 %	
76	1	5,3 %	5,6 %	44,4 %	
83	1	5,3 %	5,6 %	50,0 %	
84	1	5,3 %	5,6 %	56,6 %	
85	3	15,8 %	16,7 %	72,2 %	
86	1	5,3 %	5,6 %	77,8 %	
91	1	5,3 %	5,6 %	83,3 %	
105	1	5,3 %	5,6 %	88,9 %	
113	1	5,3 %	5,6 %	94,4 %	
120	1	5,3 %	5,6 %	100,0 %	
Gesamt	18	94,7 %	100,0 %		
	1	5,3 %			
	19	100,0 %			

Tabelle 8: Tage zwischen 1. Ipilimumab-Gabe und Progress

5.2.2 Mittlere Progressionsfreie Überlebenszeit aller Patienten

Tabelle 9 zeigt den Mittelwert der progressionsfreien Überlebenszeit für die Patientengruppe mit CD28-Autoantikörpern und wiederum für die Patientengruppe ohne CD28-Autoantikörper. Der Mittelwert ist hier bei den Patienten ohne Antikörper mit ca. 70 Tagen etwas kleiner als bei den Patienten mit Antikörpern (77 Tage).

Tabelle 9:

CD 28	Mittelwert			
	Schätzer	Standardfehler	95 %-Konfidenzintervall	
			Untere Grenze	Obere Grenze
nein	70,444	8,607	53,574	87,315
ja	76,778	10,520	56,160	97,396
gesamt	73,611	6,638	60,601	86,621

Tabelle 9: Mittlere Progressionsfreie Überlebenszeit aller Patienten(n=19)

5.2.3 Mittlere Progressionsfreie Überlebenszeit der Patienten im Stadium IV

Tabelle 10 zeigt den Mittelwert der progressionsfreien Überlebenszeit für Patienten im Stadium IV. Die drei Patienten im Stadium III wurden ausgenommen. Die mittlere progressionsfreie Überlebenszeit der Patienten mit CD28-Autoantikörper beträgt hier ca. 67 Tage, wobei die mittlere progressionsfreie Überlebenszeit bei Patienten ohne CD28-Autoantikörper bei 114 Tagen liegt.

Tabelle 10:

CD 28	Mittelwert			
	Schätzer	Standardfehler	95 %-Konfidenzintervall	
			Untere Grenze	Obere Grenze
nein	114,125	46,113	23,744	204,506
ja	66,571	10,435	46,118	87,025
gesamt	91,933	25,080	42,776	141,091

Tabelle 10: Mittlere Progressionsfreie Überlebenszeit der Patienten im Stadium IV (n=16)

5.2.4 Mediane Progressionsfreie Überlebenszeit aller Patienten

In Tabelle 11 wird der Median der progressionsfreien Überlebenszeit (Stadium III und IV) für beide Patientengruppen dargestellt.

Tabelle 11:

CD 28	Median			
	Schätzer	Standardfehler	95 %-Konfidenzintervall	
			Untere Grenze	Obere Grenze
nein	85,000	0,831	83,370	86,630
ja	76,000	10,435	55,547	96,453
gesamt	83,000	8,485	66,369	99,631

Tabelle 11: Mediane progressionsfreie Überlebenszeit aller Patienten (n=19)

Der Median für das progressionsfreie Überleben liegt bei den Patienten ohne Antikörper bei 85 Tagen und bei der Gruppe mit Antikörpern bei 76 Tagen, somit sind unter den Patienten ohne Antikörper nach 85 Tagen 50 % progressiert, wohingegen bei der Vergleichsgruppe mit Antikörpern bereits nach 76 Tagen die Hälfte einen Progress aufwies.

5.2.5 Medianes progressionsfreie Überleben der Patienten im Stadium IV

Tabelle 12 zeigt die mediane progressionsfreie Überlebenszeit der Patienten im Stadium IV. Der Median der Patienten mit CD28-Autoantikörper liegt hier bei 69 Tagen im Unterschied zu den Patienten ohne CD28-Autoantikörper, deren Median bei 85 Tagen liegt.

Tabelle 12:

CD 28	Median			
	Schätzer	Standardfehler	95 %-Konfidenzintervall	
			Untere Grenze	Obere Grenze
nein	85,000	0,816	83,400	86,600
ja	69,000	28,805	12,543	125,457
gesamt	83,000	9,661	64,065	101,935

Tabelle 12: Mediane progressionsfreie Überlebenszeit der Patienten im Stadium IV (n=16)

Abbildung 5:

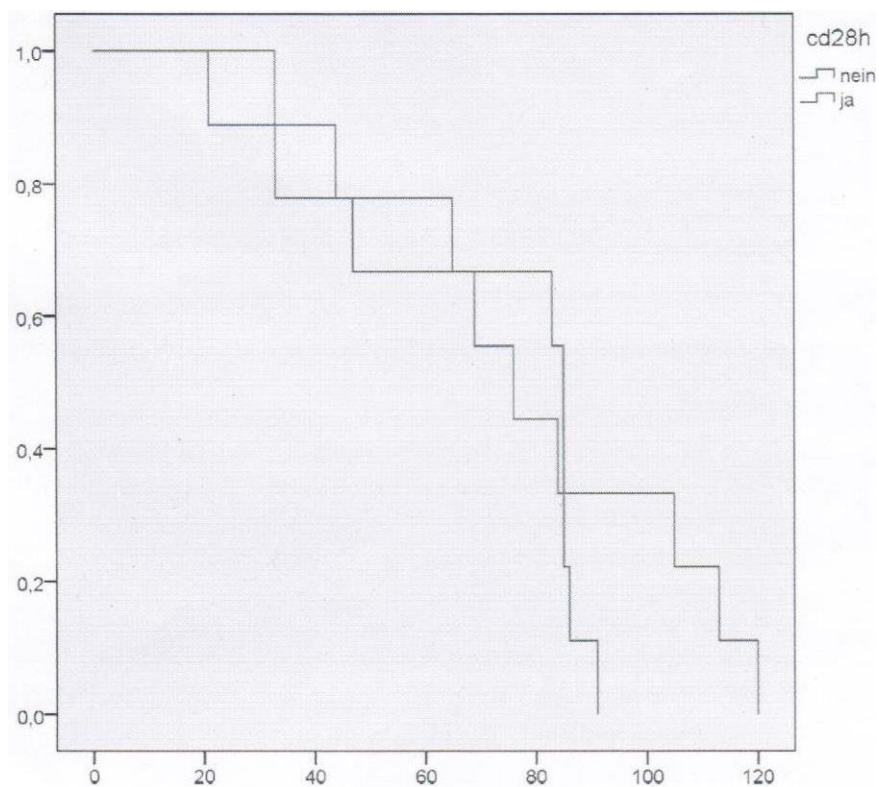


Abbildung 5: Kaplan-Meier-Kurve zur Darstellung der Progressionsfreien Überlebenszeit für alle Patienten mit bzw. ohne CD28-Autoantikörper im Stadium III und IV (n=19) y-Achse= Anteil der Patienten ohne Progress, x-Achse= Progressionsfreie Zeit

Die Analyse nach Kaplan-Meyer, dargestellt in Abbildung 5, zeigte keinen signifikanten Unterschied für das progressionsfreie Überleben der Patienten mit und ohne CD28-Autoantikörper ($p=0,470$, log-Rank-Test).

Abbildung 6:

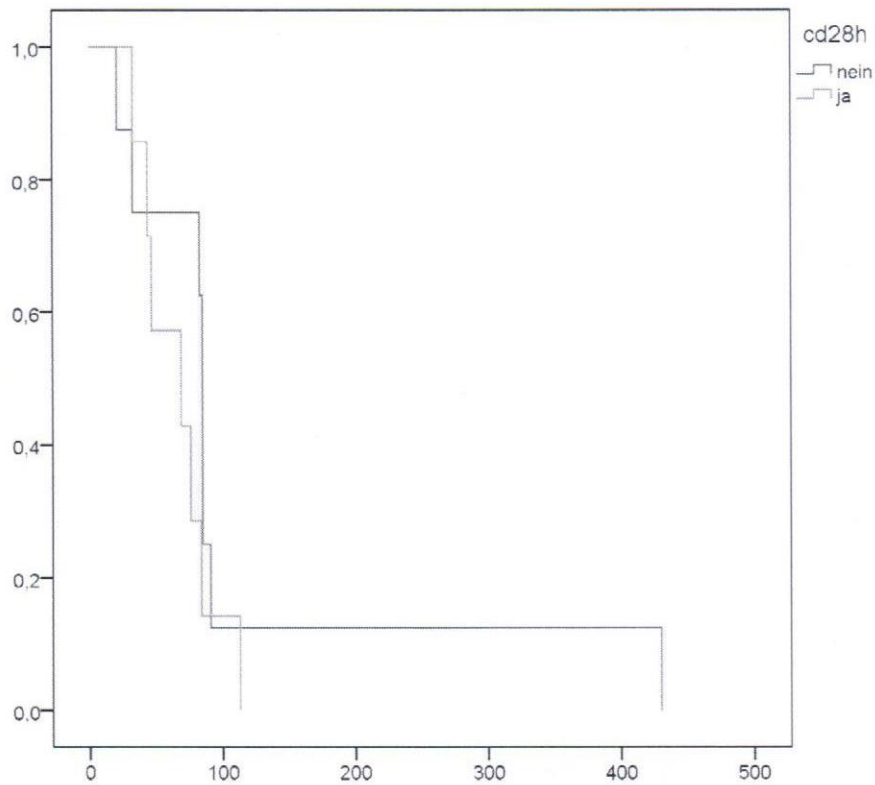


Abbildung 6: Kaplan-Meier-Kurve zur Darstellung der Progressionsfreien Überlebenszeit der Patienten mit bzw. ohne CD28-Autoantikörper im Stadium IV (n=16), y-Achse= Anteil der Patienten ohne Progress, x-Achse= progressionsfreie Zeit

Die Kaplan-Meier-Kurven für die Patienten im Stadium IV sind in Abbildung 6 dargestellt.

Für die Patienten im Tumorstadium IV ergibt die Analyse nach Kaplan-Meier keinen signifikanten Unterschied zwischen den Patienten mit und Patienten ohne CD28-Autoantikörpern ($p=0,780$, log-Rank-Test).

5.3 Zeit zwischen 1. Ipilimumab-Gabe und Tod

5.3.1 Gesamte Überlebenszeit

Zum Zeitpunkt der Datenauswertung waren 17 der insgesamt 19 Patienten (89,5 %) verstorben.

Tabelle 13 beschreibt die Anzahl der überlebenden und verstorbenen Patienten unterteilt nach Männern und Frauen.

Tabelle 13:

	Geschlecht		Gesamt
	männlich	weiblich	
Überlebt	2	0	2
Verstorben	11	6	17
Gesamt	13	6	19

Tabelle 13: Anzahl der überlebenden und verstorbenen Patienten unterteilt nach Männern und Frauen

Tabelle 14 zeigt die Anzahl der Tage, die zwischen der ersten Ipilimumab-Verabreichung und dem jeweiligem Todeszeitpunkt lagen und beschreibt somit die Überlebenszeit.

Nach 216 Tagen waren noch ca. 30 % der Patienten am Leben. Die kürzeste Überlebenszeit beträgt 48 Tage, wohingegen die bis zum Stichpunkt längste Überlebenszeit 648 Tage beträgt. Aus diesen Werten ergibt sich für die Gesamtüberlebenszeit ein Median von 184,5 Tagen und ein Mittelwert von ca. 260 Tagen.

Tabelle 14:

	Tage zwischen. 1. Ipilimumab-Gabe u Tod	Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozent	Kumulierte Prozent
Gültig	48	1	5,3 %	5,9 %	5,9 %
	56	1	5,3 %	5,9 %	11,8 %
	78	1	5,3 %	5,9 %	17,6 %
	88	1	5,3 %	5,9 %	23,5 %
	98	1	5,3 %	5,9 %	29,4 %
	109	1	5,3 %	5,9 %	35,3 %
	146	1	5,3 %	5,9 %	41,2 %
	183	1	5,3 %	5,9 %	47,1 %
	186	1	5,3 %	5,9 %	52,9 %
	188	1	5,3 %	5,9 %	58,8 %
	196	1	5,3 %	5,9 %	64,7 %
	216	1	5,3 %	5,9 %	70,6 %
	327	1	5,3 %	5,9 %	76,5 %
	331	1	5,3 %	5,9 %	82,4 %
	364	1	5,3 %	5,9 %	88,2 %
	387	1	5,3 %	5,9 %	94,1 %
	648	1	5,3 %	5,9 %	100 %
	Gesamt	17	89,5 %	100 %	
Lebend		2	10,5 %		
Gesamt		19	100 %		

Tabelle 14: Tage zwischen 1. Ipilimumab-Gabe und Tod

5.3.2 Mittlere Überlebenszeit aller Patienten

Tabelle 15 beschreibt die durchschnittliche Überlebenszeit der Patienten mit nachgewiesenen CD28-Autoantikörpern und der Patienten ohne CD28-Autoantikörper. Der Mittelwert der Überlebenszeit der CD28-positiven Patienten beträgt ca. 356 Tage, die mittlere Überlebenszeit der CD28-negativen Patienten liegt bei ca. 175 Tagen und ist damit durchschnittlich um 181 Tage kürzer.

Tabelle 15:

CD 28	Mittelwert			
	Schätzer	Standardfehler	95 %-Konfidenzintervall	
			Untere Grenze	Obere Grenze
nein	174,600	32,031	111,819	237,381
ja	355,667	82,662	193,649	517,684
gesamt	260,368	46,099	170,014	350,723

Tabelle 15: Mittlere Überlebenszeit aller Patienten (n=19)

5.3.3 Mittlere Überlebenszeit der Patienten im Stadium IV

In Tabelle 16 ist die mittlere Überlebenszeit der Patienten im Stadium IV dargestellt, ausgenommen der drei Patienten im Stadium III. Die mittlere Überlebenszeit der Patienten mit CD28-Autoantikörpern entspricht 231 Tagen, wohingegen die mittlere Überlebenszeit der Patienten ohne CD28-Autoantikörper ca. 183 Tage beträgt.

Tabelle 16:

CD 28	Mittelwert			
	Schätzer	Standardfehler	95 %-Konfidenzintervall	
			Untere Grenze	Obere Grenze
nein	183,111	34,524	115,443	250,779
ja	230,857	52,128	128,686	333,029
gesamt	203,594	29,160	146,441	260,746

Tabelle 16: Mittlere Überlebenszeit der Patienten im Stadium IV (n=16)

5.3.4 Mediane Überlebenszeit aller Patienten

Die mediane Überlebenszeit aller Patienten ist in nachfolgender Tabelle 17 dargestellt. Die mediane Überlebenszeit der Patienten ohne CD28-Autoantikörper beträgt 146 Tage, diese ist verglichen mit den Patienten mit CD28-Autoantikörpern, die eine mediane Überlebenszeit von 331 Tagen aufweisen, deutlich kürzer.

Tabelle 17:

CD 28	Median			
	Schätzer	Standardfehler	95 %-Konfidenzintervall	
			Untere Grenze	Obere Grenze
nein	146,000	58,502	31,336	260,664
ja	331,000	171,432	0,000	667,006
gesamt	188,000	10,157	168,093	207,907

Tabelle 17: Mediane Überlebenszeit aller Patienten (n=19)

5.3.5 Mediane Überlebenszeit der Patienten im Stadium IV

In unten stehender Tabelle 18 wird der Median für die Überlebenszeit der Patienten im Stadium IV, ausgenommen der Patienten im Stadium III, dargestellt. Der Median für die Patienten, die CD28-Autoantikörper im Serum aufweisen, beträgt 216 Tage, im Gegensatz zu denjenigen Patienten ohne nachweisbare CD28-Autoantikörper im Serum, der 183 Tage beträgt.

Tabelle 18:

CD 28	Median			
	Schätzer	Standardfehler	95 %-Konfidenzintervall	
			Untere Grenze	Obere Grenze
nein	183,000	55,156	74,894	291,106
ja	216,000	24,877	167,241	264,759
gesamt	186,000	5,000	176,200	195,800

Tabelle 18: Mediane Überlebenszeit der Patienten im Stadium IV (n=16)

Abbildung 7:

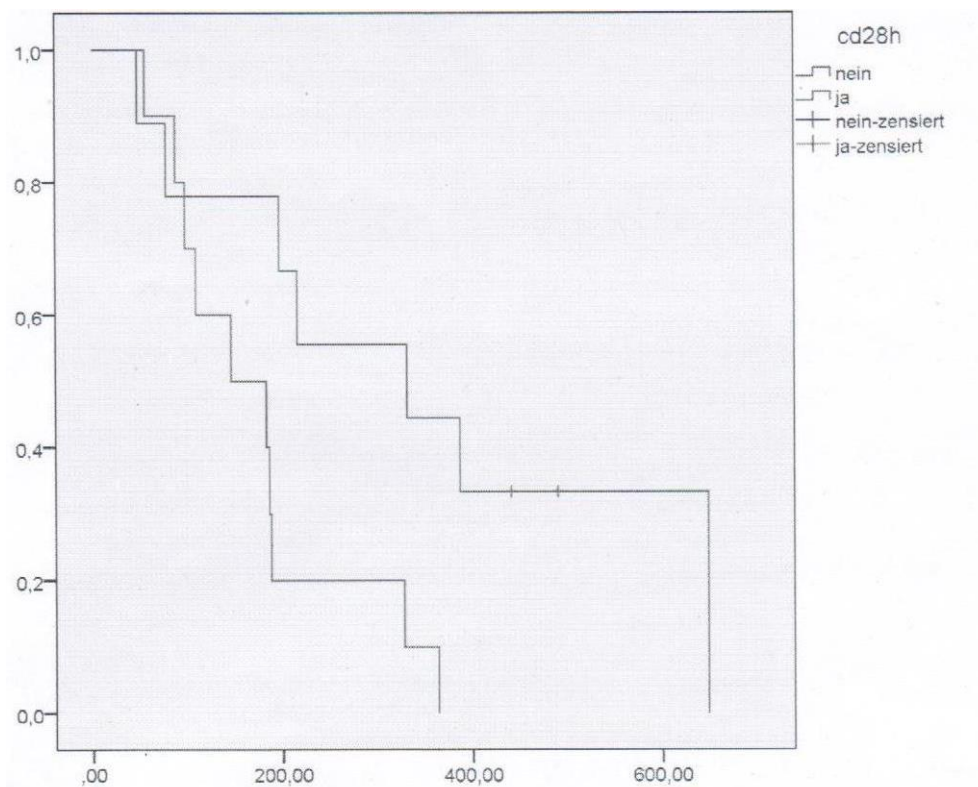


Abbildung 7: Kaplan-Meier-Kurve zur Darstellung der Überlebenszeit für die Patienten mit bzw. ohne CD28-Autoantikörper im Stadium III und IV; (n=19), y-Achse= Anteil der lebenden Patienten, x-Achse= Überlebenszeit in Tagen

Die Analyse nach Kaplan-Meyer ergibt eine signifikant verlängerte Überlebenszeit für Patienten mit CD28-Autoantikörpern im Vergleich zu Patienten ohne CD28-Autoantikörper ($p=0,023$, log-Rank-Test). Die Überlebenszeit nach Kaplan-Meier ist in Abbildung 7 dargestellt.

Abbildung 8:

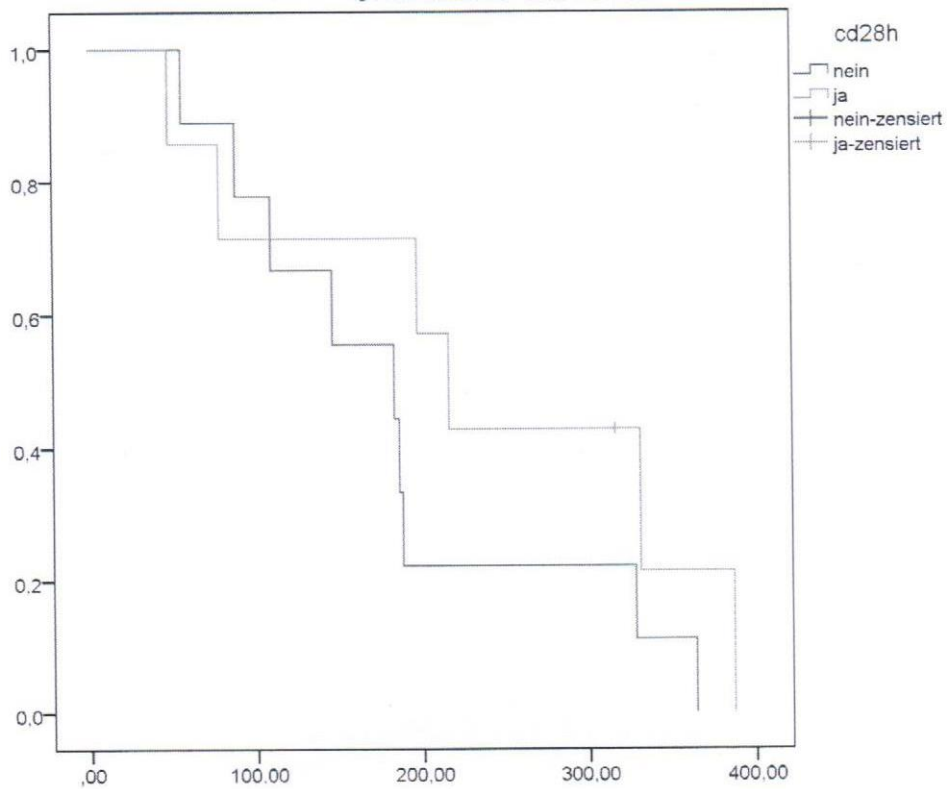


Abbildung 8: Kaplan-Meier-Kurve zur Darstellung der Überlebenszeit der Patienten mit bzw. ohne CD28-Autoantikörper im Stadium IV; (n=16), y-Achse= Anteil der lebenden Patienten, x-Achse= Überlebenszeit in Tagen

Die Analyse nach Kaplan-Meier ergibt keine Unterschiede in der Überlebenszeit für die Patienten mit und ohne nachweisbare CD28-Autoantikörper im Stadium IV der Tumorerkrankung und ist in Abbildung 8 dargestellt ($p=0,306$, log-Rank-Test).

5.4 Verlaufsbeurteilung

In Tabelle 19 werden die Tage zwischen der letzten Ipilimumab-Gabe und der letzten Blutentnahme dargestellt. Bei 9 der insgesamt 19 Patienten gab es Blutwerte, die nach Beendigung der Ipilimumabtherapie bestimmt wurden; für diese Patienten konnte der weitere Verlauf beurteilt werden. Die längste Zeitspanne zwischen Ende der Ipilimumabtherapie und der letzten Blutentnahme betrug 349 Tage. Bei 10 Patienten und damit mehr als der Hälfte der Patienten fand die letzte Blutentnahme zum Zeitpunkt der letzten Ipilimumab-Gabe statt.

	Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
0	10	52,6 %	52,6 %	52,6 %
21	1	5,3 %	5,3 %	57,9 %
42	1	5,3 %	5,3 %	63,2 %
63	1	5,3 %	5,3 %	68,4 %
126	1	5,3 %	5,3 %	73,7 %
152	1	5,3 %	5,3 %	78,9 %
204	1	5,3 %	5,3 %	84,2 %
251	1	5,3 %	5,3 %	89,5 %
301	1	5,3 %	5,3 %	94,7 %
349	1	5,3 %	5,3 %	100,0 %
Gesamt	19	100,0 %	100,0 %	

Tabelle 19: Tage zwischen Ende der Ipilimumabtherapie und letzter Blutentnahme

5.4.1 Höhe der CD28-Autoantikörperkonzentration in Abhängigkeit von der Zeit

In Abbildung 9 werden die Titerverläufe der Patienten mit vorhandenen CD28-Autoantikörpern während der Behandlung von Ipilimumab und während der darauffolgenden Weiterbehandlung bzw. Weiterbetreuung dargestellt und beschrieben.

Abbildung 9:

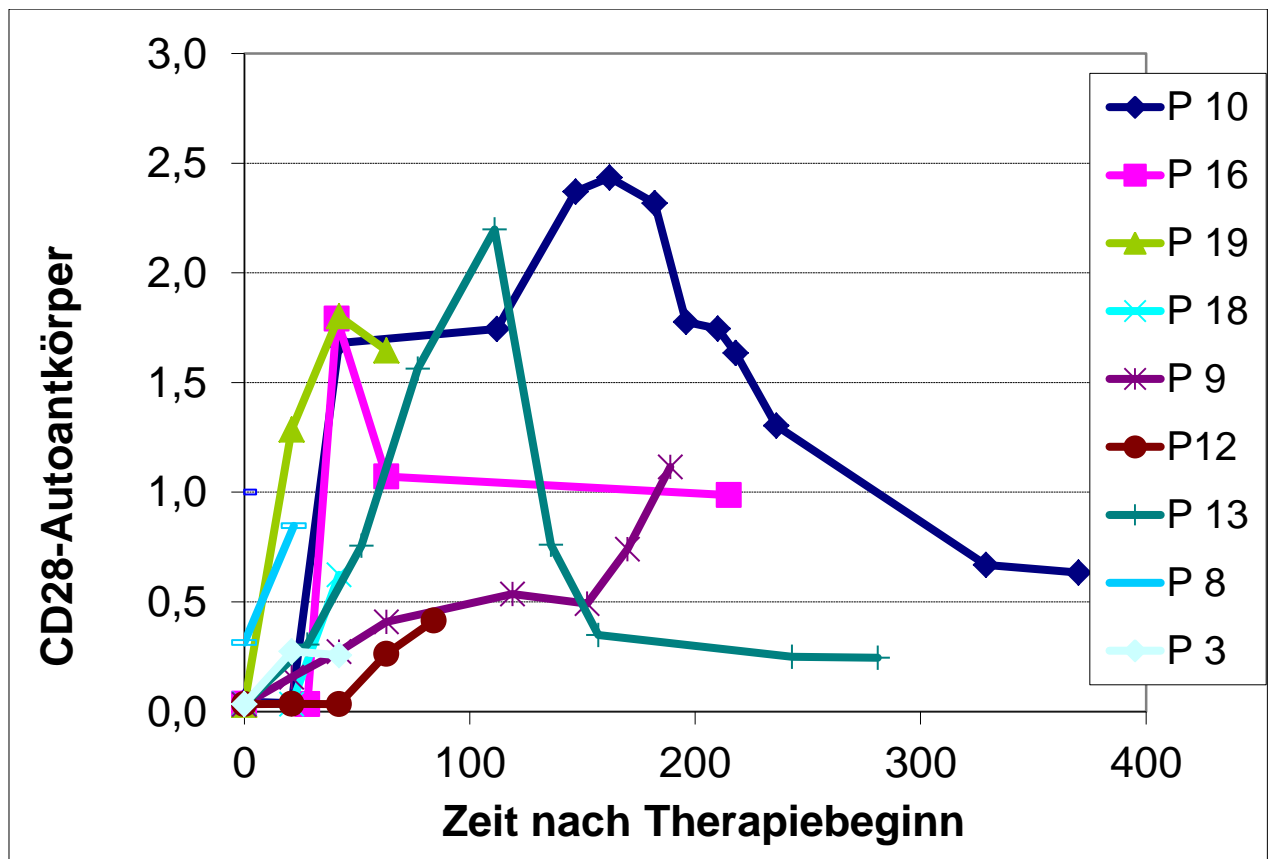


Abbildung 9: CD28-Titer im Verlauf, die y-Achse beschreibt die Serokonzentration der CD28-Autoantikörper in Abhängigkeit von der Zeit (x-Achse), P=Patient

Patient 10

Bei Patient 10 wurde die Serokonzentration der CD28-Autoantikörper über einen Zeitraum von 370 Tagen und damit über etwa ein gesamtes Jahr verfolgt. Für diesen Patienten konnte der längste Kurvenverlauf dokumentiert werden. Anfangs fanden die Blutentnahmen während der Ipilimumab-Gabe und damit im Abstand von drei Wochen statt. Danach fanden noch weitere acht Kontrollen statt, die den Kurvenverlauf darstellen. Die Serokonversion erfolgte nach 42 Tagen (nach der dritten Ipilimumab-Gabe). Die maximale Serokonzentration der Antikörper wurde im Rahmen der 6. Blutentnahme an Tag 162 gemessen und betrug 2,435. Nach diesem Peak fiel die Kurve stetig wieder ab; bei der letzten Blutentnahme am

Tag 370 konnte noch eine CD28-Autoantikörper-Konzentration von 0,0633 verzeichnet werden.

Patient 16

Die Serokonversion fand bei diesem Patienten an Tag 42, nach der 3. Ipilimumab- Gabe statt, die Titerhöhe der CD28-Autoantikörper im Serum konnte über einen Zeitraum von 215 Tagen beobachtet werden, wobei die ersten Serumproben direkt vor der jeweiligen Ipilimumab-Gabe entnommen wurden und die letzte Serumkontrolle an Tag 215 erfolgte.

Patient 19

Bei Patient 19 sind die Serumspiegel der CD28-Autoantikörper jeweils vor den vier Ipilimumab-Gaben gemessen worden. Der Titer der CD28-Autoantikörper zeigte hier einen vergleichsweise starken Anstieg. Der anfangs seronegative Patient wies an Tag 21 eine Serokonversion auf und zeigte an Tag 42 (dritte Ipilimumab-Gabe) ein Maximum des CD28-Autoantikörpertiters mit einer Serumkonzentration von 1,803.

Patient 18

Die Höhe der CD28-Autoantikörper konnten jeweils während der ersten drei Ipilimumabbehandlungen gemessen werden und zeigten an Tag 42 einen leichten Anstieg der Serokonzentration.

Patient 9

Die Titer der CD28-Autoantikörper von Patient 9 wurden an acht Zeitpunkten gemessen. Die Serokonversion fand nach der zweiten Ipilimumab-Gabe statt. Die Höhe der CD28-Autoantikörperkonzentration nahm im Verlauf stetig zu und zeigte am letzten Messtag (Tag 189) mit 1,115 ein Maximum.

Patient 12

Die Serokonversion fand bei diesem Patienten nach der vierten Ipilimumab-Gabe statt. Nach der Ipilimumab-Behandlung wurde an Tag 84 ein weiteres Mal die Höhe der CD28-Autoantikörper im Serum mit 0.415 bestimmt, somit konnte ein Anstieg nach dem vierten Messzeitpunkt an Tag 63 festgestellt werden.

Patient 13

Die Höhe der CD28-Serumautoantikörper konnte hier an jeweils 10 Messzeitpunkten bestimmt werden. Die Serokonversion fand nach der zweiten Ipilimumab-Gabe statt. Der Titer der CD28-Autoantikörper zeigte sein Maximum am 6. Messzeitpunkt an Tag 111 mit

2,198, im weiteren Kurvenverlauf nahm die Höhe der CD28-Autoantikörper zunächst steil ab, nach der achten Messung an Tag 161 mit 0,349 nahm die Kurve nur noch leicht ab. Die letzte Messung fand an Tag 281 statt und wies eine Konzentration von 0,245 auf.

Patient 8

Patient 8 wies als einziger des untersuchten Kollektivs bereits zu Beginn der Therapie mit Ipilimumab CD28-Autoantikörper im Serum auf. Der CD28-Autoantikörper-Titer konnte nur an zwei Messzeitpunkten bestimmt werden. Die Konzentration stieg zwischen der 1. und 2. Gabe steil an und lag bei 0,314 an Tag 1 und bei 0,847 an Tag 22.

Patient 3

Zu Patient 3 liegen Werte von drei Messzeitpunkten vor. Hier fand die Serokonversion nach der zweiten Ipilimumab-Gabe statt. Die Titerhöhe der CD28-Autoantikörper stieg bei der zweiten Ipilimumab-Gabe auf 0,275 an Tag 22 an und fiel daraufhin zum Tag 43 mit 0,256 wieder leicht ab.

6 Diskussion

Der CD28-Rezeptor und der CTLA-4-Rezeptor, sowie gegen diese gerichtete Antikörper (sowohl therapeutische als auch Autoantikörper) sind seit längerem Gegenstand der medizinischen Forschung.

CD28 und CTLA-4 sind Gegenspieler in Bezug auf die Aktivierung bzw. die Inhibition von T-Zellen und spielen eine wichtige Rolle im Immungeschehen. Während die Bindung von B7-Molekülen an CD28 als costimulatorisches Signal die Aktivierung von T-Zellen steigert, führt die Bindung von B7-Molekülen an CTLA-4 zu einer Inhibition der T-Zell-Aktivität und bremst damit die T-Zell-Proliferation (Wolchok & Saenger, 2008).

2006 wurden in Seren von Atopikern erstmals CD28-Autoantikörper nachgewiesen. *In vitro* führten diese CD28-Autoantikörper-positiven Patientenserum zu einer starken Proliferation von T-Zellen (Neuber, Mähns, Hübner, Gergely, & Weichenthal, 2006). Aus dieser Beobachtung folgerten die Autoren, dass die enthaltenen CD28-Autoantikörper die Entzündung im Rahmen atopischer Erkrankungen, wie des endogenen Ekzems, aufrecht erhalten und somit proinflammatorische Eigenschaften besitzen.

2013 wurde das Vorkommen von CD28-Autoantikörpern bei verschiedenen Patientengruppen untersucht (Körner, et al., 2013). Die Studie von Körner *et al.* untersuchte Melanompatienten in den verschiedenen Stadien der Erkrankung und verschiedene Vergleichsgruppen, darunter Patienten mit nachgewiesener Hepatitis B- oder Hepatitis C-Infektion, Patienten mit IgE-vermittelten Allergien vom Soforttyp, Patienten mit Plasmozytom/multiplem Myelom, Patienten mit Psoriasis, sowie 140 gesunde Blutspender. In dieser Untersuchung war das Vorkommen von CD28-Autoantikörpern signifikant mit der zugrunde liegenden Erkrankung assoziiert. Die Gruppe der gesunden Blutspender hatte mit 1,4 % den geringsten Anteil an CD28-positiven Probanden verglichen mit den Patienten mit Psoriasis (3,85 %), mit Allergien (7,4 %), multiplem Myelom (8,7 %), Virushepatitis (21,2 %) und malignem Melanom (18,3 %) (Körner, et al., 2013). Hier war vor allem auffällig, dass die gesunde Vergleichsgruppe (Gruppe der gesunden Blutspender), die nicht (immunstimulierend) therapiert worden war, einen signifikant geringeren Anteil an CD28-positiven Seren aufwies als die übrigen Probanden. Des Weiteren haben Patienten mit Virushepatitis mit 21,2 % und malignem Melanom mit 18,3 % einen vergleichsweise hohen Anteil an CD28-positiven Seren (Körner, et al., 2013). Der Unterschied dieser beiden Gruppen gegenüber den restlichen Probanden war statistisch signifikant. Der hohe CD28-Autoantikörperanteil betraf somit vor allem diejenigen Patientengruppen, die zuvor auch zu einem großen Anteil mit Interferonen behandelt worden waren. Eine Interferonbehandlung hatten alle Patienten mit Hepatitis und ein Teil der Melanompatienten erhalten. Hieraus

konnte geschlussfolgert werden, dass eine immunstimulierende Therapie mit z.B. Interferon-alpha oder pegylierten Interferonen die Bildung von CD28-Autoantikörpern induzieren kann (Körner, et al., 2013). Außerdem zeigte die Studie, dass vorhandene CD28-Autoantikörper bei Melanompatienten mit einem erhöhten Risiko an der Tumorerkrankung zu versterben, vergesellschaftet waren. Eine prognostische Bedeutung von CD28-Autoantikörpern für den Verlauf der Melanomerkrankung erschien damit wahrscheinlich (Körner, et al., 2013).

Prinzipiell ist das Vorkommen sowohl aktivierender als auch inhibitorischer CD28-Autoantikörper denkbar. Aktivierende CD28-Autoantikörper können einerseits immunstimulatorisch wirken, indem sie als Superagonisten am CD28-Rezeptor agieren und ohne ein zusätzliches über den T-Zell-Rezeptor vermitteltes Signal präferenziell Effektor-T-Zellen stimulieren. Andererseits ist es vorstellbar, dass diese Antikörper immunsuppressiv wirken, indem sie entweder präferentiell regulatorische T-Zellen aktivieren oder aber den T-Zell-Rezeptor direkt blockieren. Nach Marshall ist auch eine dosisabhängige Wirkung derartiger Antikörper möglich. So könnten z.B. superagonistische CD28-Autoantikörper in niedriger Dosierung präferenziell regulatorische T-Zellen aktivieren und damit die Aktivität des Immunsystems drosseln, in höherer Dosierung könnten diese jedoch bevorzugt zur Aktivierung von T-Effektorzellen beitragen und damit die Immunantwort steigern (Marshall, 2006).

Eine experimentelle Analyse der hier untersuchten Seren, die nicht Gegenstand der vorliegenden Doktorarbeit war, zeigte, dass alle CD28-Autoantikörper-positiven Seren und die darin enthaltenen CD28-Autoantikörper nach Aufreinigung direkt blockierend auf den CD28-Rezeptor von Jurkatzellen wirkte (Pföhler C., et al., 2014).

Eine Studie von Bowhuis *et al.* zeigte bei Melanompatienten, die Polymorphismen des CD28-Gens aufwiesen, ein verkürztes progressionsfreies Überleben. Die Polymorphismen schienen sich hier negativ auf die reguläre Funktion des CD28-Rezeptors auszuwirken (Bowhuis, et al., 2010). Ein Funktionsverlust oder die Inaktivierung des CD28-Rezeptors resultiert grundsätzlich in einer verminderten Fähigkeit der T-Lymphozyten zu proliferieren und einer Tendenz zu einer erhöhten Apoptoseeigung der T-Zellen (Effros, 2000). Angesichts dieser Erkenntnisse, liegt die Vermutung nahe, dass CD28-Autoantikörper ebenfalls die reguläre Funktion des CD28-Rezeptors modulieren könnten. *In vitro* konnten inhibitorische Effekte von CD28-Autoantikörpern von Melanompatienten auf Jurkatzellen nachgewiesen werden (Körner, et al., 2013). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass ein Zusammenhang zwischen der Höhe der CD28-Autoantikörper und der Inaktivierung der Zellen besteht. Eine hohe CD28-Autoantikörperkonzentration resultierte in einer stärkeren Inhibition der Jurkatzellen als eine niedrige Konzentration (Körner, et al., 2013).

Eine Untersuchung der progressionsfreien Überlebenszeit und der Überlebenszeit von Melanompatienten unter Ipilimumabtherapie in Abhängigkeit vom Vorhandensein von CD28-Autoantikörpern im Serum wurde bisher noch nicht durchgeführt und war Thema der vorliegenden Untersuchung.

Von den 19 in die Studie eingeschlossenen Patienten konnten bei neun (47,4 %) CD28-Autoantikörper im Serum festgestellt werden. Hiervon wies ein Patient bereits zu Beginn der Studie CD28-Autoantikörper auf. Dieser war im Vorfeld nicht mit Interferon behandelt worden. Bei acht von neun Patienten (88,9 %) waren zu Beginn keine CD28-Autoantikörper nachweisbar: Die Patienten zeigten im Studienverlauf eine Serokonversion, d.h. erst im Verlauf der Erkrankung und nach einer unterschiedlichen Anzahl von Ipilimumab-Gaben konnten CD28-Autoantikörper im Serum festgestellt werden. Die übrigen zehn Patienten (52,6 %) wiesen während des gesamten Beobachtungszeitraumes keine CD28-Autoantikörper auf.

Bei Körner *et al.* wiesen mit 18,3 % der Melanompatienten wesentlich weniger Patienten CD28-Autoantikörper auf als in der vorliegenden Studie, in der rund die Hälfte der Patienten (47,4 %) CD28-Autoantikörper entwickelte. Unterschiede liegen in der Therapie und den Tumorstadien zu Beginn der Studie begründet. Die Melanompatienten von Körner *et al.* befanden sich in verschiedenen Stadien (I-IV) der Erkrankung und sind nicht mit Ipilimumab behandelt worden. Das vorliegende Patientenkollektiv besteht größtenteils aus Melanompatienten im Stadium IV (16/19) und wenigen Patienten im Stadium III (3/19), die allesamt mit Ipilimumab behandelt wurden. Es muss aber, unabhängig von der unterschiedlichen Zusammensetzung der Kollektive, angenommen werden, dass eine Ipilimumabtherapie genau wie eine Therapie mit Interferon-alpha, CD28-Autoantikörper induzieren kann, dies aber bei einem deutlich höheren Prozentsatz der Patienten. Grundsätzlich ist dies nicht verwunderlich, da es unter Therapie mit Checkpointinhibitoren wie Ipilimumab regelhaft zu Autoimmunphänomenen und zur Bildung von Autoantikörpern kommt (Körner, et al., 2013) (Neuber, Mähns, Hübner, Gergely, & Weichenthal, 2006).

Im hier untersuchten Patientenkollektiv ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Patientengruppen in Bezug auf das progressionsfreie Überleben ($p=0,702$), lediglich eine Tendenz für ein verlängertes progressionsfreies Überleben bei Patienten ohne CD28-Autoantikörper. Patienten mit CD28-Autoantikörper hatten eine mediane progressionsfreie Überlebenszeit von 76 Tagen. Die mediane progressionsfreie Überlebenszeit von Patienten ohne CD28-Autoantikörper betrug 85 Tage. Dieser Unterschied war statistisch nicht signifikant.

Das untersuchte Patientenkollektiv bestand aus Patienten in verschiedenen Krankheitsstadien, so waren zu Therapiebeginn von den insgesamt 19 Patienten 16 Patienten im Stadium IV und drei Patienten im Stadium III. Die unterschiedlichen Tumorstadien zu Therapiebeginn sind *per se* mit einer unterschiedlichen Prognose verbunden. Daher mussten die Patienten der einzelnen Tumorstadien getrennt beurteilt werden.

Unter den Patienten im Stadium IV der Tumorerkrankung ergab sich beim progressionsfreien Überleben ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Patientengruppen ($p=0,236$). Die mediane progressionsfreie Überlebenszeit von Patienten mit CD28-Autoantikörpern liegt hier bei 69 Tagen. Patienten ohne CD28-Autoantikörper hatten eine mediane progressionsfreie Überlebenszeit von 85 Tagen.

Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen von Körner *et al.*, die in ihrem Kollektiv in Bezug auf das progressionsfreie Überleben ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen Melanompatienten mit CD28-Autoantikörpern und Melanompatienten ohne CD28-Autoantikörpern fanden (Körner, et al., 2013).

Die mediane Überlebenszeit für alle Patienten betrug in der hier vorliegenden Untersuchung für die Patienten mit CD28-Autoantikörpern 331 Tage und ist damit im Vergleich zu den Patienten ohne nachweisbare CD28-Autoantikörper, die eine mediane Überlebenszeit von 146 Tagen zeigen, signifikant verlängert ($p=0,041$). Dieses Ergebnis darf aber nicht überinterpretiert werden, da nach Herausnehmen der Patienten im Stadium III, die *per se* eine bessere Prognose haben, dieser statistisch signifikante Unterschied verschwindet. Gegen Ende des Beobachtungszeitraumes waren aus der Gruppe der Patienten ohne CD28-Autoantikörper bereits alle Patienten verstorben. Von den neun Patienten, bei denen CD28-Autoantikörper nachgewiesen werden konnten, waren gegen Ende des Beobachtungszeitraumes sieben Patienten verstorben, zwei Patienten (77,8 %) lebten noch zu Ende der Auswertung, beide befanden sich zu Beginn der Ipilimumabtherapie aber im inoperablen lokoregionär metastasierten Stadium III und nicht im Stadium der Fernmetastasierung (Stadium IV), weswegen dieses Ergebnis nur eingeschränkt verwertbar ist.

Betrachtet man nur die Patienten im Stadium IV der Tumorerkrankung, zeigt sich kein signifikanter Unterschied mehr zwischen den Patienten mit bzw. ohne CD28-Autoantikörper ($p=0,218$). Die mediane Überlebenszeit liegt hier bei den Patienten ohne CD28-Autoantikörper bei 183 Tagen. Die Patientengruppe mit CD28-Autoantikörpern besitzt eine mediane Überlebenszeit von 216 Tagen.

Verglichen mit der Auswertung des gesamten Patientenkollektivs ist die mediane Überlebenszeit mit 216 Tagen bei CD28-positiven Patienten im Stadium IV deutlich kürzer als die mediane Überlebenszeit von 331 Tagen der CD28-positiven Patienten im gesamten Patientenkollektiv. Dies ist auf die ausgenommenen Patienten im Stadium III zurückzuführen (Patient 10, Patient 19), von denen zwei Patienten CD28-Autoantikörper aufwiesen und mit 648 Tagen (Patient 10) und 567 Tagen (Patient 19) vergleichsweise lange Überlebenszeiten besitzen, die sich vor allem auf den Wert des Medians auswirken. Die verschiedenen Ergebnisse in Bezug auf die Überlebenszeit zwischen der Auswertung des gesamten Patientenkollektivs (19 Patienten im Stadium III und IV) mit einer signifikant verlängerten Überlebenszeit und der 16 Patienten im Stadium VI, bei der die Überlebenszeit nicht signifikant verlängert ist, sind ebenfalls auf die drei Patienten im Stadium III zurückzuführen.

Die Ergebnisse der Untersuchungen von Körner *et al.* zeigten ebenfalls keine signifikante Korrelation zwischen der Überlebenszeit und der Anwesenheit von CD28-Autoantikörpern, aber eine Tendenz für eine längere Überlebenszeit für Patienten ohne CD28-Autoantikörper (Körner, et al., 2013). Diese Tendenz zu einer längeren Überlebenszeit für Patienten ohne CD28-Autoantikörper steht im Gegensatz zu den hier vorliegenden Daten. Hier zeigen vor allem zwei Patienten eine vergleichsweise lange Überlebenszeit: Patient 10 mit 648 Tagen nach der ersten Ipilimumabgabe; Patient 19 war gegen Ende des Beobachtungszeitraumes (03.09.2014) noch nicht verstorben, sodass seine Überlebenszeit zum Auswertungszeitpunkt 462 Tage beträgt. Betrachtet man die CD28-Autoantikörperkonzentration von Patient 10 im Verlaufe der Zeit, fällt auf, dass erst nach dem Beginn der Ipilimumabtherapie CD28-Autoantikörper gebildet werden und die Serumkonzentration im Verlauf der Therapie weiter zunimmt bis zu einem Maximum an Tag 111 nach Beginn der Ipilimumabtherapie. Zur Abnahme der CD28-Autoantikörperkonzentration kommt es erst nach Beendigung der Ipilimumabtherapie. Die übrigen Patienten zeigen ähnliche Serumverläufe. So kommt es auch bei den meisten anderen unter der Ipilimumabtherapie i.d.R. initial zu einem starken Anstieg der Serumkonzentration der CD28-Autoantikörper und nach Beendigung der Therapie zu einem konsekutiven Abfall des Titers, was darauf schließen lässt, dass Ipilimumab die Bildung der CD28-Autoantikörper fördert, deren Bildung aber nach Beendigung der Therapie meist auch wieder abnimmt. Patient 10 zeigte trotz der höchsten gemessenen Antikörperkonzentration die längste Überlebenszeit. Dies ist insofern erstaunlich, als dass CD28-Autoantikörper nach den Untersuchungen von Körner *et al. in vitro* inhibitorische Effekte zeigten (Körner, et al., 2013).

Damit muss in der Konsequenz die alleinige prognostische Relevanz von CD28-Autoantikörpern bei Melanompatienten in Frage gestellt werden. Es ist aber weiterhin

denkbar, dass CD28-Autoantikörper in Verbindung mit anderen Serummarkern eine relevante prognostische Wertigkeit besitzen.

Grundsätzlich stellt sich nun die Frage, welche Auswirkungen auf eine Therapie der alleinige Nachweis von CD28-Autoantikörpern haben könnte. Würde deren Nachweis die Beendigung einer systemischen Therapie mit Checkpointinhibitoren rechtfertigen? Zum jetzigen Zeitpunkt sicherlich nicht, da relevante prospektive Studien zu dieser Fragestellung nicht existieren.

Seit 2015 sind die Programmed Cell Death 1 Protein (PD-1)-Antagonisten Pembrolizumab und Nivolumab zur Therapie des fortgeschrittenen metastasierten malignen Melanoms zugelassen (European Medicines Agency, 2015). PD-1-Inhibitoren greifen an anderer Stelle als Ipilimumab in das Immungeschehen ein. Indem sie die Interaktion von PD-1-Rezeptor mit dem PD-1-Liganden unterbinden, verhindern sie die aus einer solchen Bindung resultierende Deaktivierung oder Herabregulierung von T-Zellen (Heinzerling, Hartmann, Hund, & Schuler, 2014). Kürzlich durchgeführte Studien konnten die Überlegenheit von Pembrolizumab und Nivolumab gegenüber Ipilimumab in Hinblick auf die Gesamtüberlebenszeit, die progressionsfreie Überlebenszeit und im Hinblick auf therapiebedingte Nebenwirkungen zeigen (Robert, et al., 2015) (Larkin, et al., 2015). Ipilimumab hat seit Zulassung der PD-1-Inhibitoren an Bedeutung verloren und stellt in der Monotherapie nicht mehr den Checkpointinhibitor der ersten Wahl dar. Die Substanz wurde aber 2016 in Kombination mit Nivolumab zur Behandlung inoperabler metastasierter Melanome zugelassen (Larkin J. , et al., 2015). Nach einer jüngst durchgeführten Langzeitstudie von Schadendorf *et al.* zur Monotherapie mit Ipilimumab bei Melanomen überlebte die Hälfte der Patienten das erste Jahr der Behandlung nicht. Jedoch zeigten die Kaplan-Meyer-Kurven eine Plateau-Phase, die vom dritten Jahr nach Behandlungsbeginn bis zum zehnten Jahr anhält, woraus geschlussfolgert werden kann, dass Patienten, die das dritte Behandlungsjahr nach Beginn der Monotherapie mit Ipilimumab überlebt haben, mit großer Wahrscheinlichkeit auch die nächsten sieben Jahre überleben werden (Schadendorf, et al., 2015).

Die Unterschiede in den Ergebnissen bezüglich der Überlebenszeit in der vorliegenden Arbeit und der Studie von Körner *et al.* können unter anderem auch durch die verschiedenen nachfolgenden Therapien begründet sein. Die Patienten beider Studien wurden nachfolgend mit Chemotherapien, Bestrahlung oder anderen zielgerichteten Therapien behandelt, welche ebenfalls den weiteren Krankheitsverlauf und die Prognose der Patienten beeinflussen.

Ein weiterer Aspekt ist das uneinheitliche Patientenkollektiv. Die Patienten dieser Studie befanden sich zu Therapiebeginn ausschließlich im Stadium IV (16/19) bzw. im Stadium III. Es wurden getrennte Auswertungen für die 16 Patienten im Stadium IV vorgenommen, da die Patienten aus verschiedenen Tumorstadien, aufgrund der unterschiedlichen Prognose

nicht verglichen werden können. Die Melanompatienten aus der Studie von Körner *et. al.* befanden sich zu Studienbeginn in den Stadien I-IV nach AJCC. Die Kollektive sind daher nur eingeschränkt bis gar nicht miteinander vergleichbar, da die verschiedenen Krankheitsstadien eine unterschiedliche Prognose haben und hiervon sowohl die progressionsfreie Überlebenszeit als auch die Gesamtüberlebenszeit vom Stadium abhängig sind (Balch, et al., 2009).

Die hier vorliegende Untersuchung stellt zudem eine klinische, retrospektive longitudinale und monozentrische Studie dar, die mit 19 Patienten nur eine sehr kleine Anzahl an Patienten einschließt. Durch den sehr kleinen Stichprobenumfang sind alle Ergebnisse nur ein erstes Resultat, das in seiner Aussagekraft nicht überinterpretiert werden darf. Um die Aussagekraft der Ergebnisse zu erhöhen, müssten prospektive multizentrische Studien mit einer größeren Probandenanzahl durchgeführt werden. Hier sollten dann auch verschiedene Kollektive, möglichst nur im Stadium IV verglichen werden: Patienten mit Ipilimumab-Monotherapie, Patienten unter Monotherapie mit Pembrolizumab oder Nivolumab und Patienten, die eine Kombinationstherapie aus Ipilimumab und Nivolumab erhalten.

7 Anhang

7.1 Auswertungstabelle

Nr	Gen-der	Alter In Jahren	Sta-dium Nach AJCC	AK	Typ	Zyklen	INF	Progressions-freie Überlebens-zeit in Tagen	Über-lebens-zeit in Tagen
1	0	74	IV	0	SSM	4	1	83	186
2	0	60	IV	0	UCM	4	0	65	364
3	1	73	IV	1	ALM	3	1	47	48
4	0	75	IV	0	UCM	4	0	85	188
5	0	75	IV	0	NM	3	0		56
6	1	71	IV	0	SSM	3	0	33	109
7	1	74	III	0	SSM	4	1	86	98
8	0	81	IV	1	DM	2	0	69	216
9	0	82	IV	1	NM	4	1	113	331
10	0	46	III	1	SSM	2	1	105	648
11	0	72	IV	0	UCM	4	0	85	327
12	1	56	IV	1	NM	4	1	84	196
13	0	76	IV	1	SSM	4	0	33	387
14	0	68	IV	0	NM	4	1	85	88
15	0	59	IV	0	SSM	4	0	91	183
16	0	50	III	1	NM	4	0	76	
17	1	56	IV	0	NM	4	1	21	146
18	1	72	IV	1	UCM	2	0	44	78
19	0	62	III	1	ALM	4	0	120	

Tabelle 20: Auswertungstabelle

Gender:0=männlich, 1=weiblich; **AK:CD28-Autoantikörper:**0= keine CD28-Autoantikörper im Serum vorhanden, 1= CD28-Autoantikörper im Serum vorhanden; **Typ=Melanomart**, SSM= superfiziell spreitendes Melanom, NM=noduläres Melanom, UCM=unklassifizierbares Melanom; ALM=akrolentiginöses Melanom; DM=desmoplastisches Melanom; **Zyklen=** Anzahl der durchgeführten Ipilimumabzyklen; **INF:**zuvor durchgeführte Interferontherapie, 1= vorangehende Interferontherapie, 0=keine vorangehende Interferontherapie; **Progressionsfreie Überlebenszeit=Tage** zwischen 1.Ipilimumabgabe und Progress; **Überlebenszeit=Tage** zwischen 1. Ipilimumabgabe und Tod

8 Literaturverzeichnis

- Ascierto, M. L., & Melero, I. A. (2015). Melanoma: from incurable beast to a curable bet. The success of immunotherapy. *Frontiers in Oncology*, S. 1-7.
- Austin, P., Cruse, C., Lyman, G., Schroer, K., Glass, F., & Reintgen, D. (1994). Age as a prognostic factor in the malignant melanoma population. *Annals of Surgical Oncology*, S. 487-494.
- Azzola MF, S. H. (2002). Tumor mitotic rate is a more powerful prognostic indicator than ulceration in patients with primary cutaneous melanoma. *Cancer*, S. 1488-1498.
- Bafounta, M., Beauchet, A., Aegerter, P., & Saiag, P. (2004). Ultrasonography or palpation for detection of melanoma nodal invasion: a meta analysis. *Lancet Oncology* 5, S. 673-680.
- Bakacs, T., Merishi, J., & Moss, R. (2011). Ipilimumab (Yervoy) and the TGN 1412 catastrophe. *Immunobiology*, S. 583-589.
- Balch, C. M. (2003). New TNM Melanoma Staging System: Linking Biology and Natural History to Clinical Outcomes. *Seminars in surgical oncology*, S. 42-53.
- Balch, C. M., Soong, S., Thompson, J. F., Atkins, D. R., Byrd, D. R., Buzaid, A. C., et al. (2009). Final Version of 2009 AJCC Melanoma Staging and Classification. *Journal of Clinical Oncology*, S. 6199-6206.
- Balch, C., Gershenwald, J., Soong, S., Thompson, J., Ding, S., Byrd, D., et al. (Mai 2010). Multivariate Analysis of prognostic factors among 2313 patients with stage III melanoma: comparison of nodal micrometases versus macrometastases. *Journal of Clinical Oncology*, S. 2452-2459.
- Balch, C., Wilkerson, J. A., M. T., Soong, S., Ingalls, A., & Maddox, W. (1980). The Prognostic significance of ulceration of cutaneous melanoma. *Cancer*, S. 3012-3017.
- Blum, A. (2016). Dermatoskopie ohne Dermatoskop. *Hautarzt* 2016, S. 925-926.
- Bowhuis, M. G., Gast, A., Figl, A., Eggermont, A. M., Hemminki, K., Schadendorf, D., et al. (2010). Polymorphisms in the CD28/CTLA-4/ICOS genes: role in malignant melanoma susceptibility and prognosis? *Cancer Immunology Immunotherapy*, S. 303-3012.

- Bowling, J., Argenziano, G., Azenha, A., Bandic, J., Bergman, R., Blum, A., et al. (2007). Dermoscopy Key Points: Recommendations from the International Dermoscopy Society. *Dermatology*, S. 1-5.
- Breslow, A. (1969). Thickness, Cross-Sectional areas and Depth of Invasion in the Prognosis of cutaneous Melanoma. *Annals of Surgery*, S. 902-908.
- Burmeister, B., Henderson, M., Ainslie, J., Fisher, R., Di Iulio, J., Smithers, B., et al. (2012). Adjuvant radiotherapy versus observation alone for patients at risk of lymph node field relapse after therapeutic lymphadenectomy for melanoma:a randomised trial. *Lancet Oncology*, S. 589-597.
- Buzaid, A. C., Argawala, S. S., & Hauschild, A. A. (2014). Algorithm for the Management of Metastatic cutaneous Melanoma. *Chinese Clinical Oncology*, S. 1-10.
- Chapman, P., Hauschild, A., & Robert, C. (2011). Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *New England Journal of Medicine*, S. 1448-1450.
- Chattopadhyay, K., Lazar-Molnar, E., Yan, Q., Rubinstein, R., Zhan, C., Vidorovich, V., et al. (2009). Sequence, structure, function, immunity: structural genomics of costimulation. *National Institute of Health*, S. 356-386.
- Clark, W. H. (1991). Tumor progression and the nature of cancer. *The Gordon Hamilton-Fairley Memorial Lecture*, S. 631-644.
- Clark, W. H., From, L., & Bernadino, E. A. (1969). The Histogenesis and biological Behavior of Primary Human Malignant Melanomas of the Skin. *Cancer Research*, S. 705-726.
- Comittee for Medicinal Products for Human Use. (2011). *Assessment Report for Yervoy (Ipilimumab)*. London: European Medicines Agency.
- Critchley-Thorne, R. J., Yan, N., Nacu, S., Weber, J., Holmes, S. P., & Lee, P. P. (2007). Down-Regulation of the Interferon Signaling Pathway in T Lymphocytes from Patients with Metastatic Melanoma. *PLoS Med*, S. 897-910.
- Davies, H., Bignell, G., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., et al. (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, S. 949-954.
- Deichmann, M., Bremer, A., Kuner, M., Wacker, J., Waldmann, V., & Näher, V. (2001). Are responses to therapy of metastasized malignant melanoma reflected by decreasing serum values of S100beta or melanoma inhibitory activity (MIA)? *Melanoma research*, S. 291-296.

- Deichmann, M., Kahle, B., Moser, K., Wacker, J., & Wüst, K. (2004). Diagnosing melanoma patients with entering American Joint Committee on Cancer Stage IV, C reactive protein in serum is superior to lactate dehydrogenase. *British Journal of Cancer* 2004, S. 699-702.
- Dupin, E., & Le Douarin, N. (2003). Development of melanocyte precursors from the vertebrate neural crest. *Oncogene*, S. 3016-3023.
- Effros, R. (2000). Long-term immunological memory against viruses. *Mech Ageing Dev*, S. 161-170.
- Eggermont, A., Testori, A., Marsden, J., Hersey, P., Quirt, I., Petrella, P., et al. (2009). Utility of adjuvant systemic therapy in melanoma. *Annals of Oncology* 20, S. 30-34.
- European Medicines Agency. (2015). *European public Assessment report for Keytruda*. London.
- Finn, L., Markovic, S. N., & Joseph, R. W. (2012). Therapy for metastatic melanoma: the past, present, and future. *BMC Medicine*, S. 1-10.
- Fogarty, G., & Tartaglia, C. (2006). The utility of magnetic resonance imaging in the detection of brain metastases in the staging of cutaneous melanoma. *Clinical Oncology (Royal College of Radiologists)*, S. 260-262.
- Foot, M., Burmeister, B., Burmeister, E., Bayley, G., & Smithers, B. (2008). Desmoplastic Melanoma: the role of radiotherapy in improving local control. *AZ journal of surgery*, S. 273-276.
- Garbe C, B. P.-H. (1995). Primary cutaneous melanoma. Identification of prognostic groups and estimation of individual prognosis for 5093 patients. *Cancer*, S. 2484-2491.
- Garbe C, B. P.-H. (1995). Primary cutaneous melanoma. Prognostic classification of anatomic location. *Cancer*, S. 2492-2498.
- Garbe, C. (1998). Epidemiologie des Hautkrebses. In S. Seeber, & J. Schütte, *Therapiekonzepte Onkologie* (S. 799-829). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Garbe, C., & Schadendorf, D. (2003). Surveillance and Follow-Up Examination in Cutaneous Melanoma. *Focus: Dermatological Oncology*, S. 241-246.
- Garbe, C., & Leiter, U. (2009). Melanoma epidemiology and trends. *Clinics in dermatology*, S. 3-9.

- Garbe, C., Büttner, P., Ellwanger, U., Bröcker, E., Jung, E., Orfanos, C., et al. (1995). The Malignant Melanoma Central Register of the German Society of Dermatology 1983-1993. Epidemiologic developments and current therapeutic management of malignant melanoma of the skin. *Hautarzt*, S. 683-92.
- Garbe, C., Eigentler, T. K., Keilholz, U., Hauschild, A., & Kirkwood, J. M. (2011). Systemic Review of Medical Treatment in Melanoma: Current Status and Future Prospects. *The Oncologist*, S. 5-24.
- Garbe, C., Leiter, U. E., Blaheta, H.-J., & Meier, F. R. (2003). Diagnostic Value and Prognostic Significance of Protein S100B, Melanoma Inhibitory Activity and tyrosinase/MART1 Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction in the Follow up of high risk Melanoma Patients. *Cancer*, S. 1737-1745.
- Garbe, C., Peris, K. H., Saiag, P., Middleton, M., Spatz, A., Grob, J.-J., et al. (2012). Diagnosis and treatment of melanoma. European consensus-based interdisciplinary guideline-Update 2012. *European Journal of Cancer* 48, S. 2375-2390.
- Goel, V., Lazar, A., Warneke, C., Redston, M., & Haluska, F. (2006). Examination of Mutations in BRAF, NRAS and PTEN in Primary Cutaneous Melanoma. *Journal of Investigative Dermatology* 126, S. 154-160.
- Granziani, G., Tentori, L., Pierluigi, & Navarra. (2011). Review: Ipilimumab: A novel immunostimulatory monoclonal antibody for the treatment of cancer. *Pharmakological Research* 65, S. 9-22.
- Grob, J., Dreno, B., de la Salmonière, P., Delaunay, M., Cupissol, D., Guillot, B., et al. (1998). 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*, S. 1905-1910.
- Guo, J., Si, L., Kong, Y., Flaherty, K. T., Xu, X., Zhu, Y., et al. (2011). Phase II, Open-Label, Single-Arm Trial of Imatinib Mesylate in Patients with Metastatic Melanoma Harboring c-KIT-Mutation or Amplification. *Journal of Clinical Oncology*, S. 2904-2909.
- Hanaizi, Z., van-Zwieten-Boot, B., Calvo, G., Sancho Lopez, A., van Dartel, M., Camarero, J., et al. (2011). The European Medicines Agency review of ipilimumab (Yervoy) for the treatment of advanced (unresectable or metastatic) melanoma in adults who received prior therapy: summary of the scientific assessment of the Committee for Medicinal Products for Human Use. *European Journal of Cancer*, S. 237-242.

- Hauschild, A., Engel, G., Brenner, W., Gläser, R., Mönig, H., Henze, E., et al. (1999). S 100 Protein Protection in Serum is a significant Prognostic Factor in Metastatic Melanoma. *Oncology*, S. 338-344.
- Hauschild, A., Grob, J., Demidov, L., Jouary, T., Gutzmer, R., Millward, M., et al. (Juli 2012). Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet oncology*, S. 358-365.
- Hein, R., Bosserhoff, A., & Ring, J. (2006). Tumormarker beim Malignen Melanom. *Deutsches Ärzteblatt*, S. 943-948.
- Heinzerling, L., Hartmann, A., Hund, M., & Schuler, G. (2014). *Medikamentöse Tumorthherapie in der Dermatookologie*. Berlin, Heidelberg: Springer.
- Hodi, F., Mihm, M., Soiffer, R., Haluska, F., Butler, M., MV, S., et al. (2003). Biologic activity of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 antibody blockade in previously vaccinated metastatic melanoma and ovarian carcinoma patients. *Proc Natl Acad Sci USA*, S. 4712-4717.
- Hodi, S., O' Day, S., & McDermatt, D. (2010). improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *National Institute of Health*, S. 711-723.
- Hsu, M.-Y., Meier, F., & Herlyn, M. (2002). Review:Melanoma development and progression: a conspiracy between tumor and host. S. 522-536.
- Kaatch, P. S. (2012). *Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes-Krebs in Deutschland 2007/2008*. Berlin: Robert-Koch-Insitut.
- Kähler, K. C., & Hauschild, A. (2011). Treatment and side effect management of CTLA-4 antivody therapy in metastatic melanoma. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, S. 277-285.
- Körner, R., Preuss, K.-D., Fadle, N., Madjidi, D., Neumann, F., Bergler, L., et al. (2013). Serum Antibodies against CD 28- A New Potential Marker of Dismal Prognosis in Melanoma Patients. *PLOS one*, S. 1-10.
- Krebsregister, Saarland*. (kein Datum). Von www.krebsregister.saarland.de/index.html abgerufen
- Kunte, C., Geimer, T., Baumert, J., Konz, B., Volkenandt, M., Flaig, M. R., et al. (2010). Prognostic factors associated with sentinel lymph node positivity and effect of sentinel status on survival: an analysis of 1049 patients with cutaneous melanoma. *Melanoma research*, S. 330-337.

- Larkin, J., Ascierto, P., Dreno, B., Atkinson, V., Liskay, G., Maio, M., et al. (2014). Combined vemurafenib and cobimetinib in BRAF-mutated melanoma. *The New England Journal of medicine*, S. 1867-1876.
- Larkin, J., Chiarion-Sileni, V., Gonzalez, R., Grob, J., CL, C., Lao, C., et al. (2015). Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *New England Journal of Medicine*, S. 1270-1271.
- Larkin, J., Chiarion-Sileni, V., Gonzalez, R., Grob, J., Cowey, C., Lao, C., et al. (2015). Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *The New England Journal of Medicine*, S. 23-34.
- Larkin, J., Lao, C., Urba, W., McDermott, D., Horak, C., Jiang, J., et al. (2015). Efficacy and Safety of Nivolumab in Patients with BRAF V600 Mutant and BRAF Wild-Type Advanced Melanoma: A pooled Analysis of 4 Clinical Trials. *JAMA Oncology*, S. 433-440.
- Leiter, U., Eigentler, T., & Garbe, C. (2014). Epidemiology of skin cancer. *Advances in experimental medicine and biology*, S. 120-140.
- Lens, M., & Dawes, M. (2003). Global perspectives of of contemporary epidemiological trends of cutaneous malignant melanoma. *British Journal of Dermatology 2004*, S. 179-185.
- Long, G. V., Stroyakovskiy, D. G., Levchenka, E., de Braud, F., Larkin, J., Garbe, K., et al. (2015). Dabrafenib and trametinib versus dabrafenib and placebo for Val600 BRAF-mutant melanoma: a multicentre, double-blind, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet*, S. 444-451.
- Lühder, F., Huang, Y., Dennehy, K. M., Guntermann, C., Müller, I., Kerkau, T., et al. (2003). Topological Requirements and Signaling Properties of T Cell-activating, Anti-CD28 Antibody Superagonists. *The Journal of Experimental Medicine*, S. 955-966.
- Marshall, E. (2006). Violent Reaction to Monoclonal Antibdy Therapy Remains a Mystery. *Science*, S. 1688-1689.
- Mays, M., Martin, R., Burton, A., Ginter, B., Edwards, M., Reintgen, D., et al. (2010). Should all patients with melanoma between 1 and 2 mm Breslow thickness undergo sentinel lymph node biopsy? *Cancer 116*, S. 1535-1544.
- Menzies, A., & Long, G. (2013). Recent advances in melanoma systemic therapy. BRAF inhibitors, CTLA4 antibodies and beyond. *European Journal of Cancer*, S. 1-13.

- Mocellin, S., Lens, M., Pasquali, S. P., & Chiarion Sileni, V. (2013). Interferon alpha for the adjuvant treatment of cutaneous melanoma. *The Cochrane Database of Systemic Review*.
- Mocellin, S., Pasquali, S., Rossi, C. R., & Nitti, D. (2010). Interferon Alpha Adjuvant Therapy in Patients with High Risk Melanoma: A systemic Review and Meta- analysis. *Journal of the National Cancer Institute*, S. 493-501.
- Mocellin, S., Zavagno, G., & Nitti, D. (2008). The prognostic value of serum S100B in patients with cutaneous melanoma: a meta-analysis. *International Journal of Cancer*, S. 2370-2376.
- Neuber, K., Mähns, B., Hübner, C., Gergely, H., & Weichenthal, M. (2006). Autoantibodies against CD28 are associated with atopic diseases. *Clinical and Experimental Immunology*, S. 262-269.
- Nowecki, Z., Rutkowski, P., Kulik, J., Siedlecki, J., & Ruka, W. (2008). Molecular and biochemical testing in stage III melanoma: multimarker reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay of lymph fluid after lymph node dissection and preoperative serum lactate dehydrogenase level. *The British Journal of Dermatology*, S. 597-605.
- Pflugfelder, A., Koch, C., & Blum, A. (2013). Malignant Melanoma, S3-guideline "Diagnosis, Therapy and Follow-up of melanoma". *guidelines*.
- Pföhler, C., Preuss, K., Janssen, E., Koerner, R., Mueller, C., & Vogt, T. (2014). Ipilimumab therapy seems to induce CD28 antibodies with inhibitory effect on T cells of melanoma patients. *Oncology Research and Treatment*, S. 100.
- Riley, J. L., & June, C. H. (2004). The CD 28 Family: a T-cell rheostat for therapeutic control of T-cell activation. *Blood Journal*, S. 13-21.
- Robert, C., Karaszewska, B., Schachter, J., Rutkowski, P., Mackiewicz, A., Stroiakovski, D., et al. (2015). Improved overall survival in melanoma with combined dabrafenib and trametinib. *The new England Journal of medicine*, S. 30-39.
- Robert, C., Schachter, J., Long, G. V., Arance, A., Grob, J.-J. M., Daud, A., et al. (2015). Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *The New England Journal of Medicine*, S. 2521-2532.

- Robert, C., Thomas, L., Bondarenko, I., O'Day, S., Weber, J., Garbe, C., et al. (2011). Ipilimumab plus Dacarbazine for Previously Untreated Metastatic Melanoma. *The New England Journal of Medicine*, S. 2517-2526.
- Schadendorf, D., Hodi, F., Robert, C., Weber, J. S., Margolin, K., Hamid, O., et al. (2015). Pooled Analysis of Long-Term Survival Data from Phase II and Phase III Trials of Ipilimumab in Unresectable or Metastatic Melanoma. *American Society of Clinical Oncology*, S. 1864-1873.
- Shain, A., & Bastian, B. (2016). From melanocytes to melanoma. *Nature Reviews. Cancer*, S. 345-358.
- Staveley-O-Carroll, K., Sotomayor, E., Montgomery, J., Borrello, I., Hwang, L., Fein, S., et al. (1998). Induction of antigen-specific T cell anergy: An early event in the course of tumor progression. *Immunology*, S. 1178-1183.
- Teft, W. A. (2005). A Molecular Perspective of CTLA-4 Function. *The Annual Review of Immunology*, S. 65-97.
- Valk, E., Rudd, C., & Schneider, H. (2008). CTLA-4 trafficking and surface expression. *Trends in Immunology*, S. 272-279.
- Volkenandt, M. (2005). Maligne Melanome. In O. Braun-Falco, G. Plewig, H. H. Wolff, W. H. Burgdorf, & M. Landthaler, *Dermatologie und Venerologie 5. Auflage* (S. 1582). Heidelberg: Springer Medizin.
- Weber, J. (2009). Ipilimumab: controversies in its development, utility and autoimmune adverse events. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, S. 823- 830.
- Wolchok, J. D., & Saenger, Y. (2008). The Mechanism of Anti CTLA-4 Activity and the Negative Regulation of T-Cell Activation. *The Oncologist*, S. 2-9.
- Xing, Y., Bronstein, Y., Ross, M., Askew, RL, Lee, J., et al. (2011). Contemporary diagnostic imaging modalities for the staging and surveillance of melanoma patients: a meta analysis. *Journal of the National Cancer Institute*, S. 129-142.

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:T-Klassifikation maligner Melanome (in Anlehnung an Balch et al., 2009)	14
Tabelle 2: N-Klassifikation aus (Balch et al., 2009) und (Pflugfelder, Koch & Blum, 2013)....	14
Tabelle 3: M-Klassifikation maligner Melanome (in Anlehnung an Balch et al., 2009).....	15
Tabelle 4: Stadieneinteilung des malignen Melanom (in Anlehnung an Balch et al., 2009)..	15
Tabelle 5: 10-Jahres-Überlebensrate in Abhängigkeit von der Tumordicke in Anlehnung an (Balch, et al., 2009)	21
Tabelle 6: Patientencharakteristika im untersuchten Patientenkollektiv	34
Tabelle 7: Anzahl der progredienten bzw. progressionsfreien Patienten unterteilt nach Männern und Frauen.....	41
Tabelle 8: Tage zwischen 1. Ipilimumab-Gabe und Progress	42
Tabelle 9: Mittlere Progressionsfreie Überlebenszeit aller Patienten(n=19)	43
Tabelle 10: Mittlere Progressionsfreie Überlebenszeit der Patienten im Stadium IV (n=16)..	43
Tabelle 11: Mediane progressionsfreie Überlebenszeit aller Patienten (n=19).....	44
Tabelle 12: Mediane progressionsfreie Überlebenszeit der Patienten im Stadium IV (n=16)	44
Tabelle 13: Anzahl der überlebenden und verstorbenen Patienten unterteilt nach Männern und Frauen.....	47
Tabelle 14: Tage zwischen 1. Ipilimumab-Gabe und Tod	48
Tabelle 15: Mittlere Überlebenszeit aller Patienten (n=19).....	49
Tabelle 16: Mittlere Überlebenszeit der Patienten im Stadium IV (n=16)	49
Tabelle 17: Mediane Überlebenszeit aller Patienten (n=19).....	50
Tabelle 18: Mediane Überlebenszeit der Patienten im Stadium IV (n=16)	50
Tabelle 19: Tage zwischen Ende der Ipilimumabtherapie und letzter Blutentnahme.....	53
Tabelle 20: Auswertungstabelle.....	64

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Häufigkeitsverteilung der Melanome in Anlehnung an (Garbe C. , Epidemiologie des Hautkrebses, 1998)	11
Abbildung 2: Patientenanteil mit bzw. ohne CD28-Autoantikörper	38
Abbildung 3: Melanomtyp des Primärtumors (SSM: superfiziell spreitendes Melanom; UCM: unklassifizierbares Melanom; ALM: akrolentiginöses Melanom; NM: noduläres Melanom, desmoplast. M: desmoplastisches Melanom)	39
Abbildung 4: Lokalisation des Primärtumors.....	40
Abbildung 5: Kaplan-Meier-Kurve zur Darstellung der Progressionsfreien Überlebenszeit für alle Patienten mit bzw. ohne CD28-Autoantikörper im Stadium III und IV (n=19) y-Achse= Anteil der Patienten ohne Progress, x-Achse= Progressionsfreie Zeit	45
Abbildung 6: Kaplan-Meier-Kurve zur Darstellung der Progressionsfreien Überlebenszeit der Patienten mit bzw. ohne CD28-Autoantikörper im Stadium IV (n=16), y-Achse= Anteil der Patienten ohne Progress, x-Achse= progressionsfreie Zeit	46
Abbildung 7: Kaplan-Meier-Kurve zur Darstellung der Überlebenszeit für die Patienten mit bzw. ohne CD28-Autoantikörper im Stadium III und IV; (n=19), y-Achse= Anteil der lebenden Patienten, x-Achse= Überlebenszeit in Tagen	51
Abbildung 8: Kaplan-Meier-Kurve zur Darstellung der Überlebenszeit der Patienten mit bzw. ohne CD28-Autoantikörper im Stadium IV; (n=16), y-Achse= Anteil der lebenden Patienten, x-Achse= Überlebenszeit in Tagen.....	52
Abbildung 9: CD28-Titer im Verlauf, die y-Achse beschreibt die Serokonzentration der CD28-Autoantikörper in Abhängigkeit von der Zeit (x-Achse), P=Patient.....	54

11 Dank

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Claudia Pföhler für die Überlassung des Themas, für ihre Anregungen und Verbesserungsvorschläge und ihre stetige Präsenz in allen Phasen der Arbeit.

Meiner Betreuerin Frau Dr. Eva Janssen danke ich herzlich für ihren Einsatz und die vielen Hilfestellungen.

Herrn PD Dr. Stefan Gräber danke ich für die Einführung in das SPSS-Programm und die Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Zum Schluss gilt ein besonderer Dank meiner Familie, die mich stets unterstützt und immer für mich da ist.

12 Lebenslauf