

**Aus dem CharitéCentrum CC12 für Innere Medizin und Dermatologie  
Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie  
Direktor: Prof. Dr. med. Wolfram Sterry**

## **Habilitationsschrift**

### **Prognostische Faktoren und therapeutische Optionen beim malignen Melanom**

**zur Erlangung der Lehrbefähigung für das Fach**

**Dermatologie und Venerologie**

**vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät Charité –**

**Universitätsmedizin Berlin**

**von Frau Dr. med. Maja Ann Kristine Hofmann**

**geboren am 10.3.1975 in Limburg an der Lahn**

**Eingereicht: August 2011**

**Dekanin: Prof. Dr. Annette Grüters-Kieslich**

**1. Gutachter: Prof. Dr. Axel Hauschild, Kiel**

**2. Gutachter: Prof. Dr. Claus Garbe, Tübingen**

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1. Einleitung</b>	<b>4-13</b>
<b>2. Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>14</b>
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>15-19</b>
3.1. Diagnostische Wertigkeit des Tumormarkers MIA im Follow-up von Stadium I und II Melanompatienten	<b>15</b>
3.2. Einfluß des Lymphknotenbefalls auf den Tumormarker MIA im Melanom Stadium III	<b>16</b>
3.3. Prognostische Wertigkeit von TNF- $\alpha$ , B2M and sIL-2R unter adjuvanter IFN- $\alpha$ 2b Therapie beim malignem Melanom	<b>17</b>
3.4. Prognostische Faktoren und Einfluß der therapeutischen Optionen bei Melanompatienten mit Hirnmetastasen	<b>18</b>
3.5. Temozolomid als Monotherapie oder in Kombination mit Radiatio in Melanompatienten mit nicht resektablen Hirnmetastasen	<b>19</b>
<b>4. Diskussion</b>	
4.1. Prognostische Faktoren und Serummarker	<b>20-25</b>
4.2. Prognostische Faktoren und therapeutische Konzepte bei Hirnfiliae	<b>26-30</b>
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>31</b>
<b>6. Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>32</b>
<b>7. Literaturangaben</b>	<b>33-53</b>
<b>8. Danksagung</b>	<b>54</b>
<b>9. Erklärung</b>	<b>55</b>

## 1. Einleitung

Das maligne Melanom stellt einen der 10 häufigsten soliden Tumorarten dar. 90% der Todesfälle kutaner Tumore werden durch das maligne Melanom hervorgerufen (1). In Deutschland machte im Jahr 2006 das maligne Melanom bei Frauen 4,3%, bei Männern 3,2% aller bösartigen Neubildungen aus. 63000 Personen, davon 37000 Frauen, lebten 2006 mit einem 5 Jahre zuvor diagnostizierten malignen Melanom (5-Jahres-Prävalenz). Relevante Erkrankungsdaten sind bereits ab dem 20. Lebensjahr zu beobachten, wobei das mittlere Erkrankungsalter bei 64 Jahren bei Männern und 58 Jahren bei Frauen liegt (2).

Während die Inzidenz des malignen Melanoms zunimmt, zeigt sich im letzten Jahrzehnt eine Stabilisierung der Mortalitätszahlen (1). Dies ist auf die verbesserte Früherkennungsrate mit einer höheren Diagnostik der prognostisch besseren dünneren Melanome zurückzuführen. Die Inzidenzzahlen berechnet das Robert-Koch-Institut auf der Grundlage der Krebsregister in den verschiedenen Bundesländern. Für den Zeitraum 1990 bis 2000 war ein Anstieg der Inzidenzrate von 8 auf 12 Fälle bei Männern pro 100.000 Einwohner und Jahr und von 9 auf 12 Fälle bei Frauen pro 100.000 Einwohner und Jahr dokumentiert worden. Dies entspricht einem prozentualen Anstieg von 5% bei den Männern und 3,3% bei den Frauen. Das Zentralregister des Malignen Melanoms, das im Gegensatz zu den bevölkerungsbezogenen Krebsregistern aufgrund der Datenlage Aussagen über klinisch-epidemiologische Trends machen kann, schätzt, dass auch in den nächsten 2-3 Jahrzehnten mit einer stetigen Inzidenzzunahme zu rechnen ist (1). Als Hauptrisikofaktor für die Entstehung eines malignen Melanoms wird weiterhin vor allem die intermittierende UV-Strahlung angenommen (3). Mittlerweile häufen sich Publikationen, in denen Mutationen für das Melanom relevanter Tumorgene wie BRAF, cKit, ERBB4 und kürzlich GRIN2A beschrieben werden (4-7). Auch gelang es, bei einem malignen Melanom das gesamte Genom zu sequenzieren (8), aber der genaue molekulare Mechanismus, der zu der Melanomentstehung führt, konnte bislang nicht aufgeklärt werden.

Für einen kleinen Teil der Melanompatienten sind erbliche Mutationen der CDKN2A und CDK4- Gene mit einem resultierenden 10-fach erhöhtem Melanomrisiko beschrieben worden (9;10). Neben der UV-Genese spielt die Anzahl

der melanozytären Nävi einen wichtigen Marker für die Melanomentstehung (11-13).

Die Prognose eines malignen Melanoms hängt vor allem von der frühzeitigen Diagnose und der damit verbundenen dünneren Tumordicke ab. Wie bei anderen Tumorarten stellt die Tumorausbreitung zum Diagnosezeitpunkt auch beim Melanom den wichtigsten Prognosefaktor dar. Die Entstehung eines Melanoms verläuft in verschiedenen Wachstumsphasen. Zunächst wächst das Melanom innerhalb der Epidermis (in situ Melanom). Primär tritt meistens eine horizontale Wachstumsphase auf. Nach einem variablen Zeitraum beginnt das vertikale Wachstum. Wird die Basalmembran durchbrochen, ist die Möglichkeit einer lymphogenen oder hämatogenen Metastasierung gegeben. Die aktuelle AJCC- (American Joint Committee on Cancer) Stadieneinteilung, die auch im deutschsprachigen Raum verwendet wird, orientiert sich nach der 2009 erschienenen Publikation (14).

Insgesamt wird das Melanom in 4 Stadien eingeteilt, wobei im Stadium I und II keine Metastasierung, im Stadium III eine Metastasierung der regionären Lymphknoten und/oder Satelliten-/Intransit-Metastasen und im Stadium IV eine Fernmetastasierung vorliegt. In den westlichen Industriestaaten werden die Primärmelanome in ca. 90% der Fälle im Stadium des Primärtumors erstdiagnostiziert (15). Aus diesem Grund sind gerade in diesen Stadien geeignete prognostische Faktoren wichtig. Als wichtigster prognostischer Einflussfaktor hat sich der vertikale Tumordurchmesser (Tumordicke nach Breslow) etabliert. Bereits 1970 wurde von Breslow und Clark der vertikale Tumordurchmesser (16) und der Invasionslevel (17) beschrieben. Während der Invasionslevel nach Clark nur noch eine untergeordnete Rolle spielt, richtet sich die Stadieneinteilung im Stadium I und II maßgeblich nach dem Tumordurchmesser nach Breslow. Ein weiterer wichtiger Prognosefaktor, der 2001 in die neue Klassifikation aufgenommen wurde, ist die Ulzeration des Primärtumors. Eine histologisch nachgewiesene Ulzeration führt automatisch zu einer Eingruppierung in die nächst höheren Risikoklasse.

Neben den prognostischen Parametern, die sich in der AJCC-Stadieneinteilung widerspiegeln, werden weitere Prognosefaktoren diskutiert. Weiterführende Prognosefaktoren werden beim malignen Melanom dringend zur genaueren Unterteilung der traditionellen Tumorstadien benötigt, um Patienten zu identifi-

zieren, die ein erhöhtes Rezidivrisiko haben oder von einer Therapie profitieren können. Dass immer wieder neue prognostische Faktoren in die Stadieneinteilung aufgenommen werden, zeigt sich bei dem erst kürzlich inkorporierten Mitoseindex (Zellteilungen pro mm<sup>2</sup>). Die histologisch nachweisbare Mitoserate wurde in mehreren kleinen Studien zunächst als potentieller prognostischer Faktor beschrieben (18). Im Verlauf zeigte sich auch in großen Studien der prognostische Einfluß (19;20). In der aktuellen AJCC Klassifikation wurde der mitotische Index in die Tumorstadieneinteilung mitaufgenommen (14).

Ein in der Literatur immer wieder kontrovers diskutierter prognostischer Faktor ist die anatomische Lokalisation des Primärtumors. Hier scheint die Lokalisation am oberen Stamm, Oberarmen, Hals und behaartem Kopf mit einer schlechteren Prognose einherzugehen, die sog. TANS-(thorax, upper arm, neck and scalp)-Region (21;22). Als Ursache werden die kürzeren Lymphbahnen mit weniger dazwischen geschalteten Lymphknotenstationen in diesen Regionen diskutiert. In anderen Publikationen konnte dieser Einflussfaktor jedoch nicht bestätigt werden (23;24). Auch für die histologischen Subtypen wurden Unterschiede in der Prognose beschrieben. Primär noduläre und akrolentiginöse Melanome gehen mit einer schlechteren Prognose einher verglichen mit dem superficiell spreitenden und Lentigo maligna Melanom (22;25).

Die Tumorregression ist ein häufiges Phänomen bei malignen Melanomen und reicht von partiellen Regressionen bis hin zu kompletten Regressionen des Primärtumors (26). Inwieweit Regressionsphänomene das Überleben beeinflussen, konnte bislang noch nicht endgültig geklärt werden (27). In der Literatur findet man kontroverse Studienergebnisse. Einige Studien konnten keinen Überlebensvorteil bezüglich der Regression feststellen (28-32). In anderen Studien zeigte sich die Regression als negativer prognostischer Faktor (33;34).

Der metastatische Befall der regionären Lymphknotenstationen ist ein entscheidender prognostischer Faktor, und minimiert die 10-Jahresüberlebensrate auf 49%, mit einer Überlebensrate von nur 13% in der Gruppe mit den ungünstigsten prognostischen Parametern bis 69% bei Vorliegen der Kombination von günstigen prognostischen Parametern. Beim Vorliegen von Organmetastasen sinkt die 10-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit auf nur 6%, wobei hier die metastatisch befallenen Organe unterschieden werden. Liegen Metastasen der

Haut, Subkutis oder Lymphknoten vor, beträgt die mediane Überlebenszeit 12 Monate, bei viszeralen Metastasen 5 Monate (35). Für Patienten mit Hirnmetastasen findet man infauste Prognosen mit einer medianen Überlebenszeit von nur 3-5 Monaten (36).

Erstmalig wurde 2001 ein Serummarker in die AJCC Stadieneinteilung als prognostischer Parameter aufgenommen. Im fernmetastasierten Stadium IV führt ein erhöhtes Serum-LDH (Laktatdehydrogenase) zu einer Höherstufung in der M-Klassifikation. Serum LDH steigt mit ansteigender Tumormasse und kann dahingehend als Surrogatmarker für die Tumormasse verwendet werden (37). Die Aufnahme des unspezifischen LDHs in die Stadieneinteilung führte zu Diskussionen (38). Hier bleibt weiterhin der Wunsch nach einem sensitiveren und spezifischeren Serummarker, der sowohl in der Primärdiagnostik, Nachsorge und für das Therapiemonitoring eingesetzt werden kann. Bislang wird in Deutschland am meisten verbreitet S100b als Serummarker für das Melanom eingesetzt. Auch für das Protein MIA („melanoma inhibitory activity“) konnte gezeigt werden, dass es im Serum von metastasierten Melanompatienten nachweisbar ist. MIA konnte 1989 erstmalig im Zellkulturüberstand von einer Melanomzelllinie detektiert werden (39) und stellt ein kleines Protein (11kD) dar, welches von Melanomzellen in den Extrazellularraum sezerniert wird. MIA führt durch die Bindung an Laminin und Fibronectin zu einer Reduktion der Zell-Matrix-Interaktion und fördert so die Tumorzellausbreitung (40). Im Gegensatz zu S100b wird MIA vorwiegend von Melanomzellen, aber nicht von Melanozyten exprimiert (41). Im Normalgewebe wird MIA nur von Chondrozyten exprimiert, dies erklärt positive Serumwerte in der Schwangerschaft und Kindheit (42). Bei nichtmelanozytären Tumoren wurde eine Expression von MIA bislang beim Chondrosarkom (43), beim Gliom (44) und Adenokarzinomen (45) beschrieben. MIA kann mittels ELISA-Technik (enzyme linked immunosorbent assay) im Serum routinemäßig analysiert werden. In kleineren Studien zeigte sich, dass MIA verglichen mit S100b bei Melanompatienten im Stadium III und IV eine ähnliche Spezifität (81,7% versus 80,3%) aufweist, bezüglich der Sensitivität war MIA (77,7%) S100b (55,5%) überlegen (46). Problematisch sind die verschiedenen cut-off-Werte, die in den bisherigen Publikationen verwendet werden. Hier variieren die Werte zwischen 6,5ng/ml (47) bis über 20ng/ml (48).

In mehreren experimentellen Studien wurden verschiedene neuere Markermoleküle wie angiogene Faktoren, Matrixmetalloproteinasen, Zytokine und ihre Rezeptoren, lösliche Formen der HLA-Moleküle sowie Proteine der Zelladhäsion im Serum von Melanompatienten beschrieben (49). Erfolgversprechend könnte die Serumproteinanalyse mittels massenspektrometrischer Verfahren sein, erste Publikationen zeigen vielversprechende Ergebnisse (50;51). Insgesamt konnte aber keine Überlegenheit gegenüber S100b, LDH oder MIA aufgezeigt werden, so dass diese neuen Markermoleküle in die Routinediagnostik bislang nicht eingeführt wurden.

Therapeutisch steht bei den Melanomprimärtumoren die operative Versorgung im Vordergrund. In-situ-Melanome werden mit einem Sicherheitsabstand von 0,5 cm exzidiert, Melanome < 2 mm Tumordicke mit einem Sicherheitsabstand von 1 cm und Melanome  $\geq$  2 mm Tumordicke mit einem Sicherheitsabstand von 2 cm. Eine Wächterlymphknotenbiopsie erfolgt ab einer Tumordicke von 1 mm. Wenn weitere ungünstige Prognoseparameter (Clark-Level IV/V; Ulzeration des Primärtumors; Regressionszeichen) vorliegen, kann auch bei geringeren Tumordicken eine Wächterlymphknotenbiopsie erwogen werden. Liegt ein metastatischer Befall des Wächterlymphknotens vor, wird aktuell eine Lymphknotendissektion der regionären, befallenen Lymphknotenstation empfohlen (52).

Die medikamentöse Therapie des malignen Melanoms richtet sich nach dem jeweiligen Tumorstadium. Eine adjuvante Therapie wird durchgeführt, wenn bei einem hohen Rezidivrisiko eine Tumorfreiheit vorliegt, d.h. keine Metastasierung nachgewiesen werden kann. Interferon-alpha (IFN- $\alpha$ ) ist bislang die einzige Substanz, die in der adjuvanten Therapiesituation in prospektiven randomisierten Studien zu einem Behandlungsvorteil für die Patienten geführt hat. Bisherige Studien zeigten, dass der Einsatz von IFN- $\alpha$  das progressionsfreie Überleben signifikant beeinflusst (53-58). Eine signifikante Verlängerung des Gesamtüberlebens konnte bislang in 2 Studien gezeigt werden (53;55). In einer kürzlich publizierten Metaanalyse mit 14 randomisiert-kontrollierten Studien, in denen IFN- $\alpha$  adjuvant appliziert wurde, zeigte sich bei Patienten mit Hochrisikomelanomen ein signifikanter Einfluß auf das Gesamtüberleben und das progressionsfreie Überleben (59). Nach den aktuellen Leitlinien wird eine adjuvante Therapie mit niedrig dosiertem IFN- $\alpha$  (3x3 Mio IE IFN- $\alpha$  s.c./Woche über 18-24

Monate) ab Stadium II empfohlen. Die beiden verfügbaren Interferone, IFN- $\alpha$ 2a und IFN- $\alpha$ 2b, unterscheiden sich in ihrer molekularen Struktur nur aufgrund von 2 Aminosäuren und können klinisch als equivalent bezüglich ihrer Wirksamkeit und des Toxizitätsspektrums betrachtet werden. Im Stadium III kann eine Hochdosistherapie mit IFN- $\alpha$  (20 Mio IE/m<sup>2</sup>KOF i.v. 4 Wochen gefolgt von 10 Mio/m<sup>2</sup>KOF s.c. über 12 Monate) erwogen werden (60). Die mittelhochdosierte IFN- $\alpha$  Therapie (IFN- $\alpha$  5x10 Mio IE/Woche s.c. 4 Wochen gefolgt von 3x10 Mio oder 3x5 Mio IE/Woche s.c.), die in der EORTC 18952 Studie überprüft wurde, zeigte keinen Einfluß auf das rezidivfreie Überleben und Gesamtüberleben (61) und bietet somit keinen Vorteil gegenüber der niedrig dosierten und hoch dosierten IFN- $\alpha$  Therapie. Die neueren pegylierten Interferone zeichnen sich durch eine längere Halbwertszeit und damit verbunden nur einmal wöchentlichen Applikation aus. Erste Studienergebnisse zeigten für Melanompatienten im Stadium III eine signifikante Verbesserung des rezidivfreien Überlebens verglichen mit einer Beobachtungsgruppe (62). Inwieweit die pegylierten Interferone die bislang klinisch erprobten Interferone ablösen werden, werden weitere Studienergebnisse in naher Zukunft zeigen können.

IFN- $\alpha$  stellt ein pleiotropes Zytokin dar, welches antivirale, antiproliferative, antiangiogenetische, Apoptose-induzierende und immunmodulatorische Effekte aufweist (63). Die durch IFN- $\alpha$  induzierte Zytokinkaskade konnte bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt werden. Hintergrund des adjuvanten Einsatzes beim Melanom ist, dass IFN- $\alpha$  einen Effekt auf die Mikrometastasierung haben soll. Ein Problem von IFN- $\alpha$  stellt die Nebenwirkungsrate dar. Das Fatigue-Syndrom, das unter Therapie auftritt, führt häufig zu einer deutlich eingeschränkten Lebensqualität (64), sowie zu einem vorzeitigen Therapieabbruch; aber auch schwerwiegende neuropsychiatrische, kardiale, nephrologische und thyreotoxische Ereignisse können unter der Therapie auftreten. Hier wäre es wünschenswert, schon vor Therapiebeginn einen Serummarker zu haben, um Patienten selektieren zu können, die unter schwerwiegenden Toxizitäten leiden werden. Aktuell wird davon ausgegangen, dass nur ein gewisser Anteil von Patienten von der IFN- $\alpha$  Therapie profitiert. Gerade im Hinblick auf das Toxizitätsspektrum, wäre es von klinischer Relevanz vor dem Therapiestart diejenigen Patienten zu selektieren, die von der adjuvanten Therapie profitieren werden.

Die Therapiesituation im Stadium IV ist weiterhin unbefriedigend und seit ca. 20 Jahren wurde kein neues Medikament zur Behandlung zugelassen. Aktuell zeigen zwei Substanzgruppen (CTLA-4 Antikörper, BRAF-Kinase-Inhibitoren) gute Studienergebnisse und könnten somit eine Zulassung im Stadium IV des malignen Melanoms erreichen. Die zur Verfügung stehenden Chemotherapeutika haben alle palliativen Charakter und zeichnen sich durch Ansprechraten von bis zu 20% und keinem eindeutigen Überlebensvorteil aus (65). Eine Zulassung für die Behandlung für diese Indikation haben in Deutschland Dacarbazin (DTIC), Vindesin und Cisplatin. Die in der Monotherapie bislang am besten untersuchte und am häufigsten aufgrund ihres günstigen Nebenwirkungsprofils eingesetzte Substanz ist DTIC. Mediane Überlebenszeiten liegen bei ca. 6-9 Monaten. Aufgrund der begrenzten Wirkung von DTIC wurden verschiedenen Polychemotherapie- und Polychemoimmunschemata angewendet. Hier zeigte sich häufig eine verbesserte objektive Ansprechraten, ohne signifikanten Einfluß auf die mediane Überlebenszeit (66).

Da die objektiven Ansprechraten bei der Erstlinientherapie gering sind, erhalten die meisten Patienten eine Zweitlinientherapie. Bislang gibt es nur wenige Studien, die Therapieregimen in der Zweitlinientherapie untersuchten. Objektive Ansprechraten werden hier zwischen 0-14% beschrieben (67-74), wobei bislang ungeklärt ist, inwieweit ein Überlebensvorteil erreicht werden kann. Kürzlich wurde in der Zweitlinientherapie mit einer Kombination von Paclitaxel und Carboplatin eine mediane Überlebenszeit von 10,5 Monaten erreicht (74).

Mehrere neue Substanzen wurden und werden aktuell in Multizenterstudien auf ihre Wirksamkeit beim malignen Melanom hin überprüft. Ansatzpunkte sind zum einen die unspezifische Immuntherapie wie z.B. mit CpG (75), Kinase-Inhibitoren wie Sorafenib (76), antiangiogenetische Substanzen wie Bevacizumab (77), immunstimulierende Substanzen, speziell CTLA4- (Cytotoxic- T-Lymphocyte-Antigen) Antikörper (78;79), Multikinaseinhibitoren wie BRAF-Kinase-Inhibitoren (80) und auch Histondeacetylaseinhibitoren, die zur Depression von Tumorsuppressorgenen führen (73). Aufgrund der neuen Studienergebnisse könnten gleich drei Medikamente in naher Zukunft für die Behandlung des metastasierten malignen Melanoms zugelassen werden. Zum einen das bcl-2 Antisense Oblimersen, das in Kombination mit DTIC appliziert wird. Hier konnte

in einer multizentrischen Studie ein signifikanter Überlebensvorteil für Patienten mit einem normalem Serum-LDH, die DTIC in Kombination mit Oblimersen erhalten hatten, im Vergleich zur Patientengruppe mit DTIC-Monotherapie erreicht werden (11,4 versus 9,7 Monate) (81). Dieser Überlebensvorteil wird in einer neuen Multizenterstudie nochmals überprüft. Die aktuell vielversprechendsten Substanzen sind die CTLA-4 Antikörper und BRAF-Kinase-Inhibitoren. CTLA-4 ist ein Oberflächenprotein auf aktivierten T-Lymphozyten mit inhibitorischem Effekt, durch Blockade kommt es zu einer verstärkten T-Zell gesteuerten Immunantwort, die beim malignen Melanom erwünscht ist. Für Ipilimumab (CTLA-4-Antikörper) wurde in einer multizentrischen Phase III Studie gezeigt, dass ein signifikantes verbessertes Gesamtüberleben von 10 bzw. 10,1 Monaten bei der Gabe von Ipilimumab alleine oder in Kombination mit dem Impfstoff gp100 (ein tumorspezifisches Melanosom-Glykoprotein) verglichen mit 6,4 Monaten in dem Vakzinearm erreicht werden konnte (82). Neben den CTLA4-Antikörpern werden aktuell die BRAF-Kinase-Inhibitoren in multizentrischen Studien auf ihre Wirksamkeit hin überprüft. Eine Mutation des BRAF-Gens (V600E- Mutation) führt zu einer Verhinderung des Absterbens von Tumorzellen und fördert somit die Proliferation. Durch spezielle Blockade kann dieser Mechanismus eingedämmt werden. Erste Studienergebnisse zeigen vielversprechende Ergebnisse (80).

Die Behandlung von Hirnmetastasen stellt eine besondere therapeutische Herausforderung dar. Hirnmetastasen treten klinisch bei ca. 8-48% der Patienten auf und können nach Autopsiefunden bei Melanompatienten in bis zu 75% der Fälle nachgewiesen werden (83;84). Das maligne Melanom stellt eine der häufigsten Krebsarten dar, bei denen Hirnmetastasen im Verlauf auftreten können und die häufig den lebenslimitierenden Faktor darstellen (85). Das Ausmaß der angewendeten Therapie hängt zum einen von der Anzahl der Hirnfiliae ab, zum anderen auch von dem Befall weiterer Organsysteme. Als palliative Therapieoptionen der Hirnfiliae stehen die operative Therapie, die stereotaktische Radiatio oder Ganzhirnradiatio sowie chemotherapeutische Ansätze zur Verfügung. Insgesamt liegen nur wenige Studien zu Patienten mit Hirnmetastasen bei malignem Melanom vor, da die Gesamtüberlebenszeit limitiert ist. In den meisten Analysen wird die Gesamtüberlebenszeit mit 3-5 Monaten angegeben (86;87). Bislang gibt es in dieser Patientengruppe kein anerkanntes standardisiertes

therapeutisches Vorgehen, speziell auch in Bezug der Kombinationen der verschiedenen Therapiestrategien. Bei einzelnen Hirnfiliae stellt die chirurgische Entfernung oder stereotaktische Radiatio die Therapie der Wahl dar (88;89). Die Entscheidung hängt meist von der Lage und damit der Operabilität der Hirnfiliae ab, die stereotaktische Radiatio wird mittlerweile als gleichwertig zur operativen Entfernung im Bezug auf die Rezidiv- und Überlebensrate angesehen. Eine Ganzhirnradiatio kann nach einer stereotaktischen Radiatio oder Operation der Hirnfiliae angeschlossen werden, wobei hier die Rate der Toxizitäten deutlich zunimmt (90). Bei multiplen Läsionen bleibt als strahlentherapeutische Therapiealternative die Ganzhirnradiatio. Die klinische Effektivität der Ganzhirnradiatio bei Melanommetastasen ist bis heute nicht geklärt, meist wird sie palliativ appliziert, um neurologische Symptome zu kontrollieren. Bei neurologischer Symptomatik sollten zusätzlich Steroide zur Symptomverbesserung eingesetzt werden.

Da zumeist bei bestehenden Hirnfiliae Organmetastasen vorliegen, sollten chemotherapeutische Ansätze erwogen werden. Welche Patienten von einer Chemotherapie profitieren, ist bislang nicht eindeutig geklärt. Zur chemotherapeutischen Behandlung haben sich Temozolomid und Fotemustin etabliert, da diese Substanzen die Blut-Hirn-Schranke überwinden können (91;92). Temozolomid ist ein orales Chemotherapeutikum und wird zu Mitozolomid (MTIC) metabolisiert, dem gleichen aktiven Metaboliten wie des DTICs. Entscheidend ist, dass auch eine Umwandlung im ZNS zu MTIC stattfindet, so dass eine ZNS-Wirksamkeit entsteht (93). Fotemustin ist ein Phosphoalanin-modifiziertes Nitrose-Harnstoff-Präparat, welches intravenös verabreicht wird. Schon frühe Studien zeigten, dass Fotemustin im Vergleich zu DTIC die Zeit bis zum Auftreten von Hirnfiliae von 7,2 Monaten auf 22,7 Monate signifikant verlängern kann (94). Neben diesen chemotherapeutischen Therapien scheinen auch die neueren Therapieformen wie die CTLA-4 Antikörper Aktivität bei Hirnmetastasen zu entfalten, zumindest wurde von anhaltenden kompletten Remissionen berichtet (95). Ob die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke zur Behandlung von Hirnfiliae essentiell ist, ist noch unklar. In experimentellen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Chemotherapeutika eine höhere Konzentration in den Metastasen als im Liquorraum erreichen können (96). Diskutiert wird auch, dass bei vorliegender Hirnmetastasierung eine Störung der Blut-Hirn-Schranke vorliegt,

so dass auch nicht liquorgängige Chemotherapeutika diese passieren können (97).

## 2. Zielsetzung der Arbeit

In den letzten Jahren wurden viele Daten und Studien im Bereich der prognostischen Faktoren und Therapien des malignen Melanoms publiziert. Insgesamt stellt sich weiterhin eine verbesserungswürdige Situation in der Nachsorge, Verlaufsdagnostik und Therapie des malignen Melanoms dar. Zwar gelingt es, durch die primäre Stadieneinteilung eine prognostische Bewertung abzugeben, jedoch ist das genaue biologische Verhalten von Melanomen in vielen Teilbereichen noch nicht vollständig aufgeklärt. Ziel der Arbeit ist es, zum einen im Rahmen der Primär- und Verlaufsdagnostik in Bezug der prognostischen Serummarker neue Erkenntnisse zu gewinnen, zum anderen neue Strategien in der Therapie speziell von Hirnmetastasen zu erarbeiten. Das Protein MIA wird häufig als Serummarker bei Melanompatienten sowohl in der Primärdiagnostik als auch in der Routinenachsorge eingesetzt. Inwieweit MIA in der Primärdiagnostik von Stadium I-III Melanompatienten hilfreich ist, ob Patienten mit häufig falsch-positiven Serumwerten im Rahmen der Nachsorge identifiziert werden können, ist ein wichtiger Analyseschritt in dieser Arbeit. Zusätzlich wurde untersucht, inwieweit im Stadium III MIA als prognostischer Marker eingesetzt werden kann. In der adjuvanten Therapiesituation stellt IFN- $\alpha$  als einziges zugelassenes Präparat den Therapiestandard dar. Kein Biomarker ist derzeit verfügbar, der prätherapeutisch aufzeigen kann, welche Patienten von einer adjuvanten Therapie profitieren und bei welchen Patienten starke Toxizitäten auftreten werden. Im Rahmen einer prospektiven Untersuchung wurden Serumwerte verschiedener Zytokine analysiert, um Hinweise zu finden, welche Serummarker hilfreich sein könnten. Bis zu 75% der Melanompatienten im Stadium IV können Hirnfiliae als lebenslimitierende Metastasen aufweisen. Sowohl das Risikoprofil als auch die Therapieoptionen bei Melanompatienten mit Hirnfiliae sind bislang in nur wenigen Publikationen Gegenstand der Untersuchung. Welche Patienten von einer Therapie profitieren können und welches Therapiekonzept sinnvoll ist, wurde in weiteren Arbeiten analysiert.

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1. Diagnostische Wertigkeit des Tumormarkers MIA im Follow-up von Stadium I und II Melanompatienten**

Neben histologischen Prognoseparametern, die nur bei der Erstdiagnose erhoben werden können, stellen Tumormarker ein wichtiges diagnostisches und prognostisches Kriterium in der Nachsorge der Melanompatienten dar. An 5343 Serumwerten wurde der prognostische Wert des Tumormarkers MIA bei 1079 Patienten im Stadium I und II bewertet. Anhand von 313 gesunden Probanden ohne Melanomanamnese wurden Referenzwerte bestimmt. Die 95%-Perzentile konnte bei 11,93ng/ml festgelegt werden. Aufgrund dieses Analyseschrittes wurden in dieser Publikation die Auswertungen bei einem von dem Hersteller empfohlenen Cut-off von 8,8ng/ml, 12ng/ml (95% Perzentile) und einem höheren Cut-off von 15ng/ml durchgeführt. Insgesamt zeigte sich, dass der Tumormarker MIA die zuverlässigsten Ergebnisse bei einem Cut-off von 12ng/ml zeigte, verglichen mit 8,8ng/ml und 15ng/ml. Bei 12ng/ml konnte eine Sensitivität von 67,6% im Stadium I und 65,6% im Stadium II, bei einer Spezifität von 76,9% und 66,7% analysiert werden. Eine weitere klinisch wertvolle Information war, dass zum einen ältere Frauen, zum anderen Männer mit einer anamnestisch höheren Tumordicke signifikant gehäuft falsch positive MIA-Werte in der Nachsorge aufwiesen. Bei der Primärdiagnose von Stadium I und II Melanompatienten zeigten sich bei 18,4% der Patienten vor OP, bei 20% innerhalb von 5 Tagen nach OP und bei 21,5% der Patienten innerhalb von 30 Tagen nach OP ein MIA-Wert oberhalb des Cut-offs von 12ng/ml, keine Korrelation zur Tumordicke konnte festgestellt werden. Insgesamt kann das Protein MIA in der Nachsorge von Melanompatienten als Serummarker eingesetzt werden. Im Bereich der Primärdiagnostik von dünneren Melanomen stellt MIA keine diagnostische Hilfe dar.

### **3.2. Einfluß des Lymphknotenbefalls auf den Tumormarker MIA im Melanom Stadium III**

Bei Patienten mit malignem Melanom im Stadium III wird ebenso wie im Stadium I und II ein zuverlässiger Tumormarker sowohl bei Diagnosestellung als auch in der Nachsorge benötigt. Da es im Stadium III häufig zu Metastasenbildungen im Lymphknoten kommt, war dies ein Hauptansatzpunkt unserer Analysen. Es wurden 667 Patienten mit Primärmelanomen, bei denen eine Wächterlymphknotenbiopsie und/oder Lymphknotendissektion erfolgte, anhand der Serummarker MIA und LDH analysiert. Hier zeigte sich, dass bei metastatisch befallenen Wächterlymphknoten der Tumormarker MIA mit 9,02ng/ml signifikant erhöht war ( $p=0,024$ ), aber damit im Rahmen des in der vorherigen Arbeit erarbeiteten Cut-offs von 12ng/ml lag. Der Tumormarker MIA zeigte sich signifikant erhöht (Cut-off 12ng/ml), wenn 3 oder mehr Lymphknoten metastatisch befallen waren. In der Nachsorge von 206 Stadium III Melanompatienten hatten Patienten mit einem MIA-Wert  $> 12\text{ng/ml}$  ein dreifach erhöhtes Risiko, Metastasen zu entwickeln. Somit stellt der Serummarker MIA eine diagnostische Hilfe sowohl zur Diagnosestellung, als auch im Rahmen der Nachsorge von Hochrisikopatienten dar.

### **3.3. Prognostische Wertigkeit von TNF- $\alpha$ , B2M and sIL-2R unter adjuvanter IFN- $\alpha$ 2b Therapie beim malignem Melanom**

Neben etablierten Serummarkern existiert der Wunsch nach sensitiveren und spezifischeren Biomarkern speziell unter adjuvanten Therapieformen. Gerade bei Hochrisikomelanompatienten, die eine adjuvante Therapie mit IFN- $\alpha$  erhalten, gibt es bislang keine Serummarker, die vor oder unter der Therapie mit IFN- $\alpha$  Hinweise auf das Ansprechen oder Toxizitäten geben könnten. In einer prospektiven Studie wurde der prognostische Einfluß verschiedener Zytokine - IL-1 $\beta$ , IL-2, sIL-2R, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  and  $\beta$ -2 microglobulin (B2M)- im Serum von Melanompatienten sowohl vor Behandlungsbeginn als auch unter adjuvanter IFN- $\alpha$  Therapie untersucht. Insgesamt wurden 66 Melanompatienten im Stadium II und III mit einer IFN- $\alpha$ 2b-Therapie in einer Dosis von 10 Mio IE 5x/Woche über 4 Wochen gefolgt von 5 Mio IE (Arm A) oder 10 Mio IE (Arm B) IFN- $\alpha$ 2b /3x/ Woche über insgesamt 2 Jahre therapiert. Hier waren die wichtigsten Ergebnisse für TNF- $\alpha$  zu finden. Zum einen zeigten sich signifikant niedrigere Serumwerte vor ( $p=0,013$ ) und unter Therapie ( $p=0,017$ ) bei Patienten, die unter Therapie ein Rezidiv zeigten. Bei Patienten, bei denen starke Toxizitäten unter Therapie auftraten, waren signifikant höhere TNF- $\alpha$  Werte zu finden ( $p=0,037$ ). IL-1 $\beta$  konnte über den gesamten Zeitraum im Serum nicht detektiert werden. Serum IL-2 zeigte einen Anstieg unter Therapie für Patienten ohne Rezidiv, einen Abfall für Patienten mit Rezidiv, jedoch ohne statistische Signifikanz. Für IL-6 zeigte sich in beiden Patientengruppen ein Anstieg während der IFN- $\alpha$  Therapie, wobei der Anstieg bei Patienten ohne Rezidiv signifikant höher war ( $p=0,02$ ). Für IL-10 waren bei Patienten ohne Rezidiv signifikante Veränderungen über den Therapiezeitraum verglichen mit Patienten mit Rezidiv ( $p=0,0001$ ) oder mit Toxizitäten ( $p=0,003$ ) nachweisbar. Bezüglich der verschiedenen IFN- $\alpha$  Dosierungen zeigten sich keine signifikanten Veränderungen. Die Kombination der Ausgangswerte von TNF- $\alpha$ , B2M und IL2R zeigte einen positiven Vorhersagewert für Rezidive von 82,9%. Insgesamt ist das Zytokinprofil vor und auch unter IFN- $\alpha$  Therapie mit einer prognostischen Relevanz verbunden.

### **3.4. Prognostische Faktoren und Einfluß der therapeutischen Optionen bei Melanompatienten mit Hirnmetastasen**

Neben prognostischen Faktoren in niedrigen Tumorstadien, werden auch prognostischen Einflußfaktoren im Stadium IV benötigt. Bei Patienten mit Hirnmetastasen gibt es nur wenige Therapieoptionen und eine schlechte Studienlage. Gerade bei diesen Patienten stehen nur noch palliative Chemotherapien und Radiotherapien teilweise mit einem hohen Toxizitätsprofil zur Verfügung. Insofern ist es klinisch wichtig, Patienten zu identifizieren, die von einer Chemotherapie und/oder Radiotherapie profitieren könnten und Therapieoptionen zu finden, die eine gute Ansprechrates bei einem geringen Toxizitätsprofil bieten.

Bei 133 Melanompatienten mit Hirnmetastasen betrug die Überlebenszeit des gesamten Kollektivs 24 Wochen (range 1-196). Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung wiesen 46% eine symptomatische und 48% eine asymptomatische Hirnmetastasierung auf. Die häufigsten Primärsymptommatiken waren Kopfschmerzen (23%), gefolgt von Krampfanfällen (22%) und Lähmungserscheinungen (20%). Die häufigste Lokalisation der Hirnmetastasen war das Cerebrum (65%), während das Cerebellum oder der Hirnstamm in nur 5% der Fälle bei Initialdiagnose involviert waren. Bei Analyse der prognostischen Faktoren wiesen Frauen ein signifikant verlängertes Überleben mit 36 Wochen verglichen mit 17 Wochen bei den Männern auf ( $p=0,0163$ ). Als weitere prognostische Faktoren konnten die Anzahl der Hirnmetastasen, die Durchführung eines operativen Eingriffs, Einsatz einer Chemotherapie, Radiotherapie und die Applikation von Kortikosteroiden analysiert werden.

### **3.5. Temozolomid als Monotherapie oder in Kombination mit Radiatio in Melanompatienten mit nicht resektablen Hirnmetastasen**

In einer weiteren Publikation zu Melanompatienten mit Hirnmetastasen wurde das orale Chemotherapeutikum Temozolomid in einer Dosierung von 200mg/m<sup>2</sup> über 5 Tage alle 28 Tage in Kombination mit oder ohne Radiatio 35 Melanompatienten mit obligaten Hirnfiliae verabreicht. Insgesamt zeigte sich ein gutes Tolerabilitätsprofil. 8/35 Patienten wiesen eine Grad III oder IV Toxizität auf (Leukopenie, Granulozytopenie, Thrombozytopenie, Anaemie, Übelkeit und Obstipation), wobei Patienten die zusätzlich eine Radiotherapie erhalten hatten eine erhöhte Anzahl an hämatologischen Nebenwirkungen aufwiesen. Insgesamt konnten 1 komplette Remission (3%) und 2 partielle Remissionen (6%) dokumentiert werden. In 9/34 Patienten (26,4%) war eine stabile Erkrankung, in 5/34 Patienten (14,7%) ein gemischtes Ansprechen mit partieller oder kompletter Remission der Hirnfiliae bei Progression der anderen internen Filiae zu verzeichnen.

Die mediane progressionsfreie Zeit betrug 5 Monate (range 0-16), mit einer längsten Ansprechrage von 16 Monaten. Die mediane Überlebenszeit lag für das Gesamtkollektiv bei 8 Monaten (range 0-28), wobei die gleichzeitige Radiatio zu einer signifikanten Verlängerung der medianen Überlebenszeit von 3 Monaten führte ( $p=0,0440$ , Temozolomidmonotherapie 5 Monate, Temozolomid plus Radiatio 8 Monate). Temozolomid wies in Kombination mit einer stereotaktischen Radiatio eine mediane Überlebenszeit von 9 Monaten (range 2-28) und in Kombination mit einer Ganzhirnbestrahlung von 7 Monaten (range 3-17) auf.

## 4. Diskussion

### 4.1. Prognostische Faktoren und Serummarker

Die Prognose des malignen Melanoms ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Trotz vorliegender prognostischer Einschätzungen gibt es weiterhin keinen Marker, der ein Rezidiv frühzeitig und sicher voraussagen kann.

Für das maligne Melanom existieren bislang neben Serum LDH routinemäßig zwei eingesetzte Tumormarker: S100b und MIA. Im Gegensatz zu S100b liegen für den Serummarker MIA Publikationen mit nur geringen Patientenzahlen vor. Gerade für Patienten in niedrigeren Stadien ist in der Nachsorge ein sensitiver und spezifischer Serummarker sehr hilfreich. Die meisten Daten für MIA sind bislang im Stadium III und IV zu finden. Hier wurden bessere Sensitivitäten in höheren Stadien mit einer größeren Tumorlast beschrieben. Im Stadium III wurden bei 50 Patienten Sensitivitäten für MIA von 77,7%, für S100b von 55,5% gefunden, im Stadium IV lag die Sensitivität für MIA bei 84,1%, für S100b bei 73,9% (46). In kleineren Studien mit geringeren Patientenzahlen (7 Patienten Stadium III, 16 Patienten Stadium IV) wurden Sensitivitäten für MIA von 31,8% und 76,2% für S100b berichtet (98). In einer prospektiven Studie mit 296 tumorfreien Stadium II und III Patienten wurden deutlich geringere Sensitivitäten von 22% für MIA versus 29% für S100b berichtet (99). In unseren Analysen mit über 5300 Serumproben von 1079 Patienten im Stadium I und II konnten wir Sensitivitäten von 67,6% im Stadium I und 65,6% im Stadium II berechnen. Damit lagen unsere Sensitivitäten verglichen mit den anderen Studien mit deutlich geringeren Patientenzahlen im oberen Bereich. Die teilweise höher berichteten Sensitivitäten sind durch die Analyse von Patienten mit sicherem Metastasenachweis erklärbar. In unserer Arbeit der Stadium I und II Patienten wurden Serumwerte von Patienten aus der Routinenachsorge verwendet. Eine interne Metastasierung mit einhergehenden höheren MIA-Serumwerten ist in niedrigeren Tumorstadien unwahrscheinlicher als in tumorfreien Stadien III oder IV. Ein entscheidender Punkt beim Vergleich der Sensitivitäten liegt auch bei dem verwendeten Cut-off. Vor den Ergebnissen unserer Analysen wurde in unserer Klinik routinemäßig ein Cut-off von 8,8ng/ml verwendet. Dieser Cut-off wird von dem Hersteller empfohlen. Schon im klinischen Alltag war auffällig, dass viele

Patienten falsch-positive Werte in der Nachsorge aufwiesen. So zeigte sich in unserer Analyse, dass im Stadium II bei einem Cut-off von 8,8ng/ml zwar eine deutlich höhere Sensitivität mit 85,2% erreicht werden konnte, dafür aber eine schlechte Spezifität mit nur 46,8%. Das beste Sensitivitäts-/Spezifitätsverhältnis fanden wir bei einem Cut-Off von 12ng/ml. Aufgrund unserer gefundenen Daten wird dieser Cut-off in der Nachsorge in unserer Klinik routinemäßig verwendet.

Ein weiterer wichtiger Endpunkt unserer Untersuchungen war die Analyse der falsch-positiven Tumormarkerwerte. In der Nachsorge sind falsch-positive Tumormarkerwerte in vielerlei Hinsicht problematisch. Zum einen sind sie kostenintensiv, da zunächst eine erneute Tumormarkerbestimmung stattfindet und bei konstanter Erhöhung weitere radiologische Untersuchungen bis hin zu CT und MRT Untersuchungen folgen. Zudem stellen permanent erhöhte Tumormarkerwerte eine große psychische Belastungssituation für Patienten dar. In unserem Patientenkollektiv zeigte sich, dass signifikant häufiger falsch-positive Tumormarkerwerte bei älteren Frauen auftreten. Aufgrund der Expression von MIA in Chondrozyten sind erhöhte Serummarkerwerte im Wachstum und in der Schwangerschaft bekannt. Erhöhte MIA-Werte wurden auch bei Patienten mit rheumatoider Arthritis (100) und bei Marathonläufern beschrieben (101). Verschiedene entzündliche Gelenkerkrankungen treten gehäuft bei älteren Frauen auf (102). Dies könnte mit eine Erklärung für die häufigeren erhöhten Serummarkerwerte bei älteren Frauen im Rahmen der Nachsorge sein.

Bei Männern fanden sich signifikant häufiger falsch-positive Tumormarkerwerte bei größerer Breslowdicke des Primärtumors. Bei Melanompatienten im Stadium I und II wird von zirkulierenden Tumorzellen berichtet (103). Eine Möglichkeit bei höheren Tumordicken könnte sein, dass eine gewisse Anzahl an zirkulierenden Tumorzellen im Blut vorhanden ist, die MIA sezernieren. Diese zirkulierenden Tumorzellen könnten noch nicht in der Lage sein, die Blutbahn zu verlassen und somit noch kein Metastasierungspotential aufweisen.

Weitere Analysen wurden bei Patienten vor der Primärtumoroperation durchgeführt. Hier konnten wir zeigen, dass bei einem Cut-off von 12ng/ml bei ungefähr 20% der Patienten ein erhöhter Tumormarkerwert vorlag. Diese erhöhten Tumormarkerwerte könnten auch durch zirkulierende Tumorzellen im Blut zustande kommen. Bei weiteren Analysen fanden wir jedoch, dass keine Korrelation zur Tumordicke festzustellen war. Auch konnten wir auf postoperative Daten

zurückgreifen und analysieren, dass selbst 30 Tage nach der Primärtumorentfernung bei 21,5% der Patienten ein erhöhter Tumormarker vorlag. Insofern sind diese erhöhten Werte als falsch-positive Werte anzusehen. Bosserhoff *et al.* fanden bei 13% der Melanompatienten im Stadium I und 23% im Stadium II erhöhte Tumormarkerwerte ebenfalls ohne eine Korrelation zur Tumordicke, hier lagen keine Analysen postoperativ vor (47). Auch in dieser Arbeit ist nicht davon auszugehen, dass die erhöhten Werte durch den Primärtumor und damit durch sezernierende Melanozyten zustande kommen. Insofern stellt das Protein MIA keinen Tumormarker dar, der bei der Primärdiagnosestellung hilfreich ist. Zur Detektion von Lymphknotenmetastasen bei Primärdiagnosestellung ist neben der Routinesonographie ein zuverlässiger Tumormarker klinisch sinnvoll. Das Standardvorgehen sieht bei Primärmelanomen ab einer Tumordicke von 1 mm routinemäßig die Entnahme des Wächterlymphknotens vor. Bei histologisch nachgewiesenem metastatischem Befall des Wächterlymphknotens erfolgt eine erneute OP mit kompletter Lymphknotendisektion der entsprechenden Lymphknotenstation. Die Routineserummarker S100b und LDH konnten nicht als prädiktive Marker in Bezug auf den Wächterlymphknotenstatus bestätigt werden (104). In einer Studie mit 140 Melanompatienten konnte gezeigt werden, dass der Serummarker MIA der beste prädiktive Test war, um einen positiven Wächterlymphknoten vorherzusagen (105). In unserer Analyse konnten auch wir signifikant erhöhte MIA-Serumwerte bei Patienten mit positivem Wächterlymphknoten feststellen. Legt man hier jedoch einen Cut-off von 12ng/ml zugrunde, liegen diese Werte innerhalb des Cut-offs. Würde bei dieser Patientengruppe der von der Firma empfohlenen Cut-off von 8,8ng/ml angewendet werden, wären die Serumwerte der Patienten mit einem negativen Wächterlymphknoten (8,41ng/ml) gerade unterhalb dieses Cut-offs, während die Serumwerte bei Patienten mit einem positiven Wächterlymphknoten (9,02ng/ml) oberhalb des Cut-offs wären. Insofern ist zu überdenken, ob bei dieser Patientengruppe ein niedrigerer Cut-off angewendet werden sollte. Auch Vucetic *et al.* (105) diskutieren über den optimalen Cut-off bei Patienten mit Wächterlymphknotenbiopsien. Aufgrund ihrer Ergebnisse arbeiten sie in dieser Patientengruppe mit einem Cut-off von 8,6ng/ml anstelle von 9,1ng/ml. Eine weitere wichtige Erkenntnis unserer Arbeit war, dass Patienten mit 3 oder mehr Lymphknotenmetastasen einen signifikant erhöhten Serumwert von MIA

(12,55ng/ml) aufzeigten. Dies könnte gerade bei der Primärdiagnostik von Melanomen hilfreich sein, zumal bei der Wächterlymphknotenbiopsie zumeist nur ein Lymphknoten entfernt wird, so dass das Vorhandensein eines Tumormarkers gerade in Kombination mit einer Ultraschalldiagnostik weitere Informationen eines metastatischen Befalls liefern könnte. Auch muß die Rate der falsch-negativen Wächterlymphknotenbiopsien berücksichtigt werden, die zwischen 5 und 7% angegeben wird (106;107). Zusätzlich gibt es Patienten, bei denen ein Wächterlymphknoten intraoperativ nicht auffindbar ist, auch hier könnte der Einsatz des Serummarkers MIA weitere Hinweise über den metastatischen Befall der Lymphknoten geben. Insofern zeigt sich aufgrund unserer Daten, dass der Tumormarker MIA bei Patienten mit Hochrisikomelanomen in der Primärdiagnostik miteingesetzt werden sollte.

Die adjuvante Therapie mit IFN- $\alpha$  ist eine etablierte Therapieform bei Patienten mit malignem Melanom mit hohem Metastasierungspotential. IFN- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ 2a und IFN- $\alpha$ 2b) stellt die einzige zugelassene Therapie in der adjuvanten Therapiesituation dar. In unserer Studie, die das Zytokinmuster vor und unter adjuvanter Therapie mit mittelhochdosiertem IFN- $\alpha$ 2b untersuchte, konnte TNF- $\alpha$  als prognostisch wichtigster Marker unter den untersuchten Zytokinen identifiziert werden. TNF- $\alpha$  ist ein inflammatorisches Zytokin, dessen anti-Tumorstoffwirkung bekannt ist (108). Aus diesem Grund wird es z.B. zur hyperthermen Extremitätenperfusion eingesetzt (109). Der Nachweis von autoimmunen Phänomenen war in einer Publikation von Gogas *et al.* (110) bei Melanompatienten im Stadium IIB-III mit signifikant weniger Rezidiven unter Therapie mit IFN- $\alpha$ 2b verbunden. Zusätzlich zeigte sich im Rahmen einer Studie, in der IFN- $\alpha$ 2b im Stadium IIIB-C neoadjuvant verabreicht wurde, sowohl ein signifikanter Anstieg von CD11c+ und CD3+Zellen als auch ein signifikanter Abfall von CD83+Zellen innerhalb von Lymphknotenmetastasen bei Patienten, die auf die Therapie ansprachen, verglichen mit Patienten, die nicht auf die Therapie ansprachen (111). In der EORTC18991 Studie wurden aufgrund der Daten von Gogas *et al.* (110) Autoantikörper (Antikardiolipin, Antithyroglobulin und antinukleäre Antikörper) bei Patienten, die pegyliertes Interferon erhalten hatten, retrospektiv analysiert. Jedoch konnte weder ein prognostischer noch ein prädiktiver Wert gefunden werden (112). Diese Daten werden jedoch aufgrund der

retrospektiv gewonnenen Ergebnisse sowie der Analyse in unterschiedlichen Laboren kritisch betrachtet. Insofern wird in weiteren Studien der prognostische Wert der Autoimmunphänomene geklärt werden müssen. In einer aktuellen Studie wurde untersucht, inwieweit Ferritin und CRP (C-reaktives Protein) als akute Phase Proteine im Serum von Melanompatienten einen prognostischen Wert unter einer mittelhochdosierten IFN- $\alpha$ 2b Therapie (EORTC 18952 Studie) haben könnten. Interessanterweise führt die IFN- $\alpha$ 2b Applikation zu einem signifikanten Anstieg der Ferritinwerte, aber nicht der CRP-Werte. Weder Ferritin noch CRP lieferten einen prognostischen oder prädiktiven Wert unter der IFN- $\alpha$ 2b Therapie (113).

Die Th1-Immunantwort mit TNF- $\alpha$  spielt bei Autoimmunkrankheiten eine wichtige Rolle. In der letzten Zeit wurden eine Reihe von TNF- $\alpha$  Antagonisten zur Behandlung der Psoriasis vulgaris und auch der rheumatoiden Arthritis, die einen autoimmunen Hintergrund aufweist, zugelassen. Dass eine Langzeitblockade von TNF- $\alpha$  zu vermehrten Hauttumoren führen kann, wurde in einer Metaanalyse aufgeführt (114). Auch das Auftreten von Melanomen und Melanommetastasen unter anti-TNF- $\alpha$  Therapie wurde beschrieben (115;116). Durch welchen genauen pathophysiologischen Mechanismus die melanozytäre Proliferation durch die Blockade von TNF- $\alpha$  induziert wird, ist bislang immunologisch nicht aufgeklärt. Während der positive Effekt der TNF- $\alpha$  Blockade bei entzündlichen Erkrankungen durch die Wiederherstellung der immunogenen Homeostase durch Expression der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatory (Treg) Funktion bewirkt wird (117), ist dieser Effekt bei Tumorerkrankungen nicht wünschenswert, da Treg Zellen die immunologische Toleranz von Selbstantigenen kontrollieren und eine wichtige Rolle bei der Supprimierung von anti-Tumor Immunantworten spielen (118). Hohe Serumwerte von TNF- $\alpha$  könnten daher bei Melanompatienten eine anti-Tumor Immunität durch Unterdrückung von Tregs hervorrufen. In ersten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Melanompatienten verglichen mit gesunden Probanden erhöhte Mengen von Tregs im Blut aufweisen, diese aber unter Therapie mit IFN- $\alpha$  abnehmen (119). Diese Daten unterstützen unsere Analysen und bieten viel versprechende Aussichten, um die immunmodulatorischen Vorgänge unter IFN- $\alpha$  Therapie besser verstehen zu können.

Die Kombination von TNF- $\alpha$ , B2M und IL2-R hatte in unserem Patientenkollektiv einen positiven Vorhersagewert für Rezidive von 82,9%. Dies stellt vor Beginn

einer adjuvanten Therapie einen wichtigen Ansatzpunkt dar und sollte mit einer höheren Patientenzahl verifiziert werden. Um die immunologischen Veränderungen über die Zeit der langfristigen IFN- $\alpha$  Therapie aufzuklären, haben wir über den gesamten Therapiezeitraum von 2 Jahren das Zytokinmuster untersucht. Gerade in den ersten vier Wochen der Immuntherapie sahen wir die auffälligsten Veränderungen, im weiteren Verlauf veränderte sich das Zytokinmuster vor allem bei Rezidivbildung. Speziell für TNF- $\alpha$  konnten wir feststellen, dass bei 46,6% unserer Patienten kein TNF- $\alpha$  direkt vor dem Rezidiv im Serum mehr nachweisbar war. Mittels einer multiplexen Zytokinanalyse fanden Yurkovetsky *et al.* (120) vor der Therapie erhöhte TNF- $\alpha$  Werte bei Patienten mit einem längeren rezidivfreien Überleben unter einer IFN- $\alpha$  Hochdosistherapie. Hier wurden die Zytokinmuster vor und nach 3 Monaten Therapie untersucht. Neben TNF- $\alpha$  fanden sich IL1 $\beta$ , IL1 $\alpha$ , IL-6, die Chemokine MIP-1a und MIP-1b vor Therapie signifikant erhöht. Speziell für IL1 $\beta$  und IL-6 konnten wir vor Therapie keinen prädiktiven Wert erarbeiten, für IL-6 zeigten sich in unserem Patientenkollektiv unter Therapie signifikant höhere Werte bei Patienten ohne Rezidiv. Insgesamt ist ungeklärt, ob die applizierte IFN- $\alpha$  Dosis mit resultierendem veränderten Zytokinprofil eine Rolle spielt. In unserer Arbeit war kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Dosierungsschemata (10 Mio IE IFN- $\alpha$ 2b versus 5 Mio IE IFN- $\alpha$  2b 3x/Woche) auffällig. Während einer IFN- $\alpha$  Hochdosistherapie, die in den USA routinemäßig eingesetzt wird, werden jedoch mit 10 Mio IE/m<sup>2</sup> Körperoberfläche 3x/Woche deutlich höhere Dosen an IFN- $\alpha$  verabreicht.

Letztendlich stellen Zytokinmuster als potentielle prädiktive und prognostische Serummarker einen interessanten Ansatzpunkt unter adjuvanter Immuntherapie dar, wobei z.B. gerade der Einfluss unterschiedlicher IFN- $\alpha$ -Dosierungen noch weiter untersucht werden sollte. Auch die Art der Rezidive wie Lokalrezidive oder das Auftreten von internen Metastasen spielt mit Sicherheit eine Rolle. Hier könnte die Erstellung von Genanalysen zu Zytokinpolymorphismen in der Zukunft weitere Erkenntnisse liefern. Neben dem individuellen Zytokinmuster ist auch der Hintergrund der jeweiligen Erkrankung entscheidend, so dass Werte von Patienten mit entzündlichen Erkrankungen, wie Hepatitis C, die häufig eine IFN- $\alpha$  Therapie erhalten, nicht mit dem Zytokinprofil von Melanompatienten verglichen werden sollten.

## 4.2. Prognostische Faktoren und therapeutische Konzepte bei Hirnfiliae

Die therapeutischen Optionen bei Patienten mit Hirnmetastasen sind sehr limitiert. Aus diesem Grund ist es wichtig, Patienten mit einer besseren Prognose selektieren zu können, die von einer Therapie in diesem Stadium profitieren könnten. Ähnlich wie andere Publikationen, die sich mit Prognosefaktoren bei Patienten mit Hirnfiliae des malignen Melanoms beschäftigen (86;87), wurden auch unsere Daten an einem retrospektiven Kollektiv erhoben. Anhand eines Patientenkollektivs von 133 Melanompatienten mit Hirnmetastasen konnten wir feststellen, dass eine geringere Anzahl von Hirnmetastasen, die Durchführung einer OP, eine Applikation von Chemotherapie sowie die Durchführung einer Radiotherapie prognostische Parameter mit einem positiven Einfluß auf das Gesamtüberleben darstellen. Auch das weibliche Geschlecht zeichnete sich durch einen signifikanten Gesamtüberlebensvorteil von 36 Wochen verglichen zu 17 Wochen für Männer aus. Wodurch dieser Überlebensvorteil entstehen könnte, ist unklar. Bezüglich der ZNS Immunologie gibt es geschlechtsspezifische Unterschiede, die wahrscheinlich durch die Wirkung des Östrogens hervorgerufen werden. Östrogene zeigten in früheren Publikationen einen neuroprotektiven Effekt (121). Auch eine schützende Wirkung der Östrogene konnte bei chemisch induzierter Hypoxie nachgewiesen werden, ein Vorteil, der bei hypoxischen Hirnmetastasen eine Rolle spielen könnte (122).

Ein weiterer wichtiger Punkt bei der Analyse von prognostischen Faktoren zeigte sich bei der Anwendung von Kortikosteroiden. Prinzipiell weisen Kortikosteroide einen immunsuppressiven Effekt auf, vor allem wenn die Therapie über einen längeren Zeitraum stattfindet. Bei Patienten mit Hirnfiliae werden sie häufig bei symptomatischen Hirnfiliae, bestehendem Hirnödem oder auch zur Prophylaxe von Hirnödemen speziell unter durchgeführter Radiatio appliziert. In unseren Analysen konnten wir zeigen, dass durch die Steroidapplikation kein negativer Effekt auf das Gesamtüberleben entsteht. Sogar zeigte sich, dass Patienten, die im Verlauf Kortikosteroide erhalten hatten, ein verbessertes Gesamtüberleben hatten. Aus diesem Grund gibt es bei diesen Patienten keine Bedenken, zumindest kurzfristig, Steroide zu applizieren. Aber auch eine langfristige Steroidapplikation unter Ipilimumabtherapie zeigte keine negative Aus-

wirkungen der erlangten kompletten Regression über eine Zeitdauer von 2 Jahren (123).

In einer aktuellen Studie wurde untersucht, welche Melanompatienten am ehesten Hirnmetastasen entwickeln und welche Faktoren beim Vorhandensein von Hirnmetastasen zu einem verlängerten Überleben führen können. So konnte gezeigt werden, dass zum einen die Primärtumorulzeration sowie die Lokalisation im Kopf-Halsbereich zu einem gehäuftem Auftreten von Hirnmetastasen führen (124). Auch Fife *et al.* (87) konnten in einem großen Patientenkollektiv mit 686 Patienten diese Primärtumoreigenschaften mit einem erhöhten Risiko des Auftretens von Hirnfiliae korrelieren, zusätzlich war das männliche Geschlecht mit einem gehäuftem Auftreten von Hirnfiliae assoziiert. Insofern scheint das männliche Geschlecht gegenüber dem weiblichen Geschlecht einen unterlegenen Schutzmechanismus in der Metastasenentstehung im Gehirn zu besitzen, zumal auch wir in unserer Analyse ein verbessertes Gesamtüberleben für das weibliche Geschlecht ab dem Zeitpunkt der Hirnfiliarisierung fanden. Gerade die Identifikation von Patienten, die Hirnmetastasen entwickeln können, ist klinisch besonders wichtig. Somit könnte schon im Rahmen der Nachsorge bei diesen Patienten routinemäßige eine engmaschigere Kontrolle auf Beteiligung des Gehirns erfolgen. Bei insgesamt 692 Melanompatienten mit Hirnmetastasen aus 9 verschiedenen deutschen Kliniken konnte als unabhängiger prognostische Parameter das Serum-LDH sowie die Anzahl der Hirnmetastasen identifiziert werden. Auch in anderen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass LDH einen prognostischen Stellenwert bei Patienten mit Hirnfiliae aufweist und dass Patienten mit einem niedrigen Serumwert von einer Therapie profitieren (87;125). Anhand dieser Analysen wird nochmals deutlich, dass zuverlässige Serummarker beim malignen Melanom auch im metastasierten Stadium benötigt werden. Hier fehlen bislang prospektive Analysen zu den etablierten Serummarkern MIA und S100b bei Patienten mit Hirnmetastasen. In der retrospektiven Studie von Eigentler *et al.* (86) zeigte sich das Serum LDH bezüglich des prognostischen Werts dem S100b überlegen. Für S100b konnte gezeigt werden, dass bei allen Organmetastasen die höchsten Serumwerte bei Hirnmetastasen gefunden werden können. Auch der Serummarker MIA zeigte deutlich erhöhte Werte, wobei Patienten mit multiplen Leberfiliae höhere Werte aufwiesen (126).

Da gerade Patienten mit nur wenigen Hirnmetastasen teilweise noch eine respektable Überlebenswahrscheinlichkeit mit noch gut erhaltener Lebensqualität haben, sollte den Patienten eine palliative Therapie angeboten werden. Samlowski *et al.* (127) zeigten, dass Patienten mit bis zu 5 Hirnfiliae von einer aggressiveren Therapieform, die eine stereotaktische Radiatio beinhalten sollte, profitieren. Bei Patienten mit nur einer Hirnfilia zeigte sich die Behandlungsoption als wichtiges prognostisches Kriterium (86). Dies unterstützt auch unsere Daten, in denen wir die Behandlungsoption mit als entscheidenden prognostischen Faktor sehen konnten. Gerade in dieser Patientensubgruppe mit einer limitierten Überlebenswahrscheinlichkeit steht die Erhaltung der Lebensqualität im Vordergrund. Temozolomid ist als orales Chemotherapeutikum verfügbar und kann von den Patienten zu Hause eingenommen werden. Somit kann ein stationärer Aufenthalt vermieden werden. In ersten Studien zum Wirksamkeitsnachweis beim malignen Melanom wurden Patienten im Stadium IV ohne Hirnfiliae behandelt (128). Im Vergleich mit einer Kontrollgruppe, die DTIC (200 mg/m<sup>2</sup> für 5 Tage alle 21 Tage) erhalten hatte, zeichnete sich in einer Phase III Studie mit 305 Melanompatienten für Patienten mit Temozolomid (200mg/m<sup>2</sup> für 5 Tage alle 28 Tage) ein Trend zu einem verlängertem Gesamtüberleben bei vergleichbarer Ansprechrates und Toxizität ab (129). Die Monotherapie mit Temozolomid bei Patienten mit obligaten Hirnmetastasen zeichnete sich durch eine gute Verträglichkeit aus, wobei das Gesamtüberleben mit 3,5 Monaten nicht deutlich verlängert wurde (130). Da Hirnmetastasen des malignen Melanoms als strahlensensibel gelten, ist die Kombination einer Radiatio mit einer Chemotherapie klinisch sinnvoll. Aus diesem Grund analysierten wir diese Kombination. In unserer Studie mit Melanompatienten mit obligaten Hirnfiliae fand sich eine gute Verträglichkeit des oralen Chemotherapeutikums Temozolomid in Kombination mit Radiatio. Die mediane Überlebenszeit bei Patienten mit Hirnfiliae eines Melanoms wird mit 3-5 Monaten beschrieben (36). In unserer Patientengruppe zeigte sich bei Patienten, die nur Temozolomid erhalten hatten eine mediane Überlebenszeit von 5 Monaten. In anderen Studien mit Melanompatienten mit Hirnfiliae zeigten sich Überlebenszeiten von 3,5 Monaten (130) und 4,7 Monaten, wobei in dieser Studie Temozolomid teilweise mit anderen Chemotherapeutika kombiniert worden war (131). Da die Monotherapie mit Temozolomid keinen signifikanten Überlebensvorteil zeigen konnte, häufen sich

mittlerweile Publikationen, in denen Temozolomid in Kombination mit anderen Therapeutika appliziert wird. Dass bei jeder Kombinationstherapie die Evaluation der Toxizitäten entscheidend ist, zeigt die Kombination von Temozolomid und Thalidomid. Hier wurden bei Applikation von Temozolomid (75mg/m<sup>2</sup>KOF/Tag für 6 Wochen, 2 Wochen Pause) und Thalidomid (bis 400mg/Tag) eine hohe Rate lebensbedrohlicher Toxizitäten durch thrombotische Ereignisse beobachtet. Da es zusätzlich zu keinem objektiven Ansprechen auf die Therapie kam, stellt dieses Therapieregimen aufgrund der schlechten Verträglichkeit keine Option bei diesen Patienten dar (132).

Einen deutlichen Überlebensvorteil mit 8 Monaten medianer Überlebenszeit zeigte die Kombination von Temozolomid (150 mg/m<sup>2</sup> über 5 Tage alle 28 Tage) mit dem Multikinaseinhibitor Sorafenib (400 mg per os, 2x/Tag dauerhaft) in einer Subgruppenanalyse für Patienten mit Hirnfiliae im Rahmen einer Phase-II-Studie (76). Unklar ist, ob die Kombination mit stereotaktischer Radiatio oder Ganzhirnradiatio einen weiteren Einfluß auf das Überleben hätte haben können. In unserer Patientengruppe zeigten sich verlängerte mediane Überlebenszeiten für Patienten, die Temozolomid in Kombination mit einer Radiatio, Ganzhirnradiatio (7 Monate) oder stereotaktische Radiatio (9 Monate), erhalten hatten. In einer Studie mit 39 Patienten, die kürzlich veröffentlicht wurde, zeigte sich bei der Kombination von Temozolomid mit Thalidomid und einer Ganzhirnbestrahlung eine mediane Überlebenszeit von nur 4 Monaten, ebenfalls bei einer hohen Rate von thrombembolischen Ereignissen. Hier wurde Temozolomid in einer Dosierung von 75 mg/m<sup>2</sup> KOF über 6 Wochen appliziert (133). In einer Multizenterstudie der ADO (Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Onkologie) wurde eine zweiwöchentliche Dosierung über jeweils 5 Tage von Temozolomid mit 125mg/m<sup>2</sup> einhergehend mit mehr Toxizitäten mit vergleichbarer Gesamtüberlebenszeit zu 150mg/m<sup>2</sup> über 5 Tage alle 28 Tage berichtet (134), wobei hier nicht eine simultane Radiatio durchgeführt wurde. Ob die unterschiedlichen und damit potentiell radiosensitivierenden Dosierungen von Temozolomid einen Einfluß auf das Überleben haben könnten, ist noch nicht geklärt, stellt aber einen interessanten und wichtigen Ansatz für weitere Studien bei Melanompatienten mit Hirnfiliae dar. Inwiefern die neuen vielversprechenden Therapieansätze der CTLA4-Antikörper und BRAF-Kinaseinhibitoren Auswirkungen auf die Überlebenszeiten bei Hirnfiliae haben könnten, wird sicher in naher Zukunft Gegen-

tand von Studien in diesem Patientenkollektiv sein. Die neueren Entwicklungen werden auch bei Melanompatienten mit Hirnfiliae zu individualisierten Therapieansätzen führen.

Insgesamt stellen Melanompatienten mit Hirnfiliae eine klinisch heterogene Gruppe dar. Entscheidend ist die prognostische Einstufung der Patienten, um ein Therapiekonzept zu erstellen. Die orale Applikation von Temozolomid kann mit einer Radiatio mit akzeptablen Toxizitäten speziell bei Patienten mit guten prognostischen Parametern empfohlen werden.

## 5. Zusammenfassung

Zusammenfassend gelang es in unseren Arbeiten, zum einen weiterführende Daten bezüglich verschiedener Serummarker in tumorfreien Stadien zu gewinnen, zum anderen den Einfluß von prognostischen Faktoren und Therapieoptionen von Melanompatienten mit Hirnfiliae zu erarbeiten. Der Tumormarker MIA stellt in der Nachsorge von Melanompatienten einen wichtigen prognostischen Serummarker dar. Patientengruppen mit häufig falsch-positiven Tumormarkern konnten durch unsere Analysen identifiziert werden. Bei der Primärdiagnosestellung des malignen Melanoms konnten wir analysieren, dass das Protein MIA keinen hilfreichen Tumormarker darstellt. In der Nachsorge von Patienten mit Hochrisikomelanomen und potentiellen Lymphknotenmetastasen sollte MIA als Tumormarker eingesetzt werden, da ab 3 Lymphknotenfiliae signifikant erhöhte Serumwerte auftreten. Bei Hochrisikomelanompatienten, die unter adjuvanter Therapie mit IFN- $\alpha$  stehen, könnte TNF- $\alpha$  mit signifikant niedrigen Werten vor Beginn der adjuvanten Therapie als Serummarker für bevorstehende Rezidive sinnvoll eingesetzt werden. Zusätzlich zeigte sich durch die Kombination mit TNF- $\alpha$ , B2M und IL2R ein guter prädiktiver Wert unter IFN- $\alpha$ 2b Therapie. Weitere klinische Studien sind hierzu notwendig. Wenn eine Metastasierung ins Gehirn stattgefunden hat, stellen die Anzahl der Metastasen, die durchgeführten Therapieformen, aber auch das Geschlecht wichtige prognostische Kriterien dar. Das orale Chemotherapeutikum Temozolomid als Monotherapie aber auch in Kombination mit einer Ganzhirnradiatio oder stereotaktischen Radiatio ist bei dieser Patientengruppe ein tolerables Therapieregimen.

## 6. Abkürzungsverzeichnis

**AJCC** American Joint Committee on Cancer

**B2M**  $\beta$ -2 microglobulin

**CT** Computertomographie

**CTLA4** Cytotoxic- T-Lymphocyte-Antigen

**DTIC** Dacarbazin

**EORTC** European Organisation for Research and Treatment of Cancer

**HLA** Human leucocyte antigen

**IFN- $\alpha$**  Interferon- $\alpha$

**IL-1 $\beta$**  Interleukin-1 $\beta$

**IL-2** Interleukin-2

**IL-6** Interleukin-6

**IL-10** Interleukin-10

**KOF** Körperoberfläche

**LDH** Laktatdehydrogenase

**MIA** melanoma inhibitory activity

**Mio** Millionen

**MIP** Macrophage Inflammatory Proteins

**MRT** Magnetresonanztomographie

**sIL-2R** soluble Interleukin-2 Receptor

**TNF- $\alpha$**  Tumor necrosis factor- $\alpha$

**Treg** T regulatory

**ZNS** Zentrales Nervensystem

## 7. Literaturverzeichnis

1. Garbe C. Management des malignen Melanoms. Springer Medizin Verlag Heidelberg. ISBN-10:3-540-28087-9
2. RKI. Krebs in Deutschland 2005/2006. 23.02.2010. Das maligne Melanom der Haut Kapitel 3.9: 22-25, [www.rki.de](http://www.rki.de)
3. Tucker MA, Goldstein AM. Melanoma etiology: where are we? *Oncogene* 2003;22:3042-52.
4. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002;417:949-54.
5. Curtin JA, Busam K, Pinkel D, Bastian BC. Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma. *J.Clin Oncol.* 2006;24:4340-6.
6. Prickett TD, Agrawal NS, Wei X, Yates KE, Lin JC, Wunderlich JR et al. Analysis of the tyrosine kinome in melanoma reveals recurrent mutations in ERBB4. *Nat.Genet.* 2009;41:1127-32.
7. Wei X, Walia V, Lin JC, Teer JK, Prickett TD, Gartner J et al. Exome sequencing identifies GRIN2A as frequently mutated in melanoma. *Nat.Genet.* 2011;43:442-6.
8. Pleasance ED, Cheetham RK, Stephens PJ, McBride DJ, Humphray SJ, Greenman CD et al. A comprehensive catalogue of somatic mutations from a human cancer genome. *Nature* 2010;463:191-6.

9. Thompson JF, Scolyer RA, Kefford RF. Cutaneous melanoma. *Lancet* 2005;365:687-701.
10. Bishop JN, Harland M, Randerson-Moor J, Bishop DT. Management of familial melanoma. *Lancet Oncol.* 2007;8:46-54.
11. Carli P, Naldi L, Lovati S, La Vecchia C. The density of melanocytic nevi correlates with constitutional variables and history of sunburns: a prevalence study among Italian schoolchildren. *Int.J.Cancer* 2002;101:375-9.
12. Garbe C, Buttner P, Weiss J, Soyer HP, Stocker U, Kruger S et al. Risk factors for developing cutaneous melanoma and criteria for identifying persons at risk: multicenter case-control study of the Central Malignant Melanoma Registry of the German Dermatological Society. *J.Invest Dermatol* 1994;102:695-9.
13. Kraemer KH, Tucker M, Tarone R, Elder DE, Clark WH, Jr. Risk of cutaneous melanoma in dysplastic nevus syndrome types A and B. *N.Engl.J.Med.* 1986;315:1615-6.
14. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR et al. Final Version of 2009 AJCC Melanoma Staging and Classification. *J.Clin.Oncol.* 2009;27:6199-206.
15. Garbe C, Blum A. Epidemiology of cutaneous melanoma in Germany and worldwide. *Skin Pharmacol.Appl.Skin Physiol* 2001;14:280-90.
16. Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann.Surg.* 1970;172:902-8.

17. Clark WH, Jr., From L, Bernardino EA, Mihm MC. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res.* 1969;29:705-27.
18. Massi D, Franchi A, Borgognoni L, Reali UM, Santucci M. Thin cutaneous malignant melanomas (< or =1.5 mm): identification of risk factors indicative of progression. *Cancer* 1999;85:1067-76.
19. Azzola MF, Shaw HM, Thompson JF, Soong SJ, Scolyer RA, Watson GF et al. Tumor mitotic rate is a more powerful prognostic indicator than ulceration in patients with primary cutaneous melanoma: an analysis of 3661 patients from a single center. *Cancer* 2003;97:1488-98.
20. Paek SC, Griffith KA, Johnson TM, Sondak VK, Wong SL, Chang AE et al. The impact of factors beyond Breslow depth on predicting sentinel lymph node positivity in melanoma. *Cancer* 2007;109:100-8.
21. Day CL, Jr., Mihm MC, Jr., Sober AJ, Harris MN, Kopf AW, Fitzpatrick TB et al. Prognostic factors for melanoma patients with lesions 0.76 - 1.69 mm in thickness. An appraisal of "thin" level IV lesions. *Ann.Surg.* 1982;195:30-4.
22. Garbe C, Buttner P, Bertz J, Burg G, d'Hoedt B, Drepper H et al. Primary cutaneous melanoma. Prognostic classification of anatomic location. *Cancer* 1995;75:2492-8.
23. Woods JE, Taylor WF, Pritchard DJ, Sim FH, Ivins JC, Bergstralh EJ. Is the BANS concept for malignant melanoma valid? *Am.J.Surg.* 1985;150:452-5.

24. Cascinelli N, Vaglini M, Bufalino R, Morabito A. BANS. A cutaneous region with no prognostic significance in patients with melanoma. *Cancer* 1986;57:441-4.
25. Kuchelmeister C, Schaumburg-Lever G, Garbe C. Acral cutaneous melanoma in caucasians: clinical features, histopathology and prognosis in 112 patients. *Br.J.Dermatol.* 2000;143:275-80.
26. Shaw HM, Rivers JK, McCarthy SW, McCarthy WH. Cutaneous melanomas exhibiting unusual biologic behavior. *World J.Surg.* 1992;16:196-202.
27. Evans GRD, Manson PN. Review and Current Perspectives of Cutaneous Malignant-Melanoma. *Journal of the American College of Surgeons* 1994;178:523-40.
28. Clemente CG, Mihm MC, Jr., Bufalino R, Zurrada S, Collini P, Cascinelli N. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer* 1996;77:1303-10.
29. Kelly JW, Sagebiel RW, Blois MS. Regression in malignant melanoma. A histologic feature without independent prognostic significance. *Cancer* 1985;56:2287-91.
30. Wanebo HJ, Cooper PH, Hagar RW. Thin (less than or equal to 1 mm) melanomas of the extremities are biologically favorable lesions not influenced by regression. *Ann.Surg.* 1985;201:499-504.

31. Bedrosian I, Faries MB, Guerry D, Elenitsas R, Schuchter L, Mick R et al. Incidence of sentinel node metastasis in patients with thin primary melanoma ( $\leq 1$  mm) with vertical growth phase. *Ann.Surg.Oncol.* 2000;7:262-7.
32. Barnhill RL, Levy MA. Regressing Thin Cutaneous Malignant Melanomas (Less-Than-Or-Equal-To-1.0 Mm) Are Associated with Angiogenesis. *Am.J.Pathol.* 1993;143:99-104.
33. Clark WH, Jr., Elder DE, Guerry D, Braitman LE, Trock BJ, Schultz D et al. Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. *J Natl.Cancer Inst.* 1989;81:1893-904.
34. Paladugu RR, Yonemoto RH. Biologic behavior of thin malignant melanomas with regressive changes. *Arch.Surg.* 1983;118:41-4.
35. Balch CM, Soong SJ, Gershenwald JE, Thompson JF, Reintgen DS, Cascinelli N et al. Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. *J Clin Oncol.* 2001;19:3622-34.
36. Sampson JH, Carter JH, Jr., Friedman AH, Seigler HF. Demographics, prognosis, and therapy in 702 patients with brain metastases from malignant melanoma. *J.Neurosurg.* 1998;88:11-20.
37. Agarwala SS, Keilholz U, Gilles E, Bedikian AY, Wu J, Kay R et al. LDH correlation with survival in advanced melanoma from two large, randomised trials (Oblimersen GM301 and EORTC 18951). *Eur.J.Cancer* 2009;45:1807-14.

38. Garbe C, Ellwanger U, Tronnier M, Brocker EB, Orfanos CE. The New American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma: a critical analysis based on data of the German Central Malignant Melanoma Registry. *Cancer* 2002;94:2305-7.
39. Bogdahn U, Apfel R, Hahn M, Gerlach M, Behl C, Hoppe J et al. Autocrine Tumor-Cell Growth-Inhibiting Activities from Human-Malignant Melanoma. *Cancer Res.* 1989;49:5358-63.
40. Blesch A, Bosserhoff AK, Apfel R, Behl C, Hessdoerfer B, Schmitt A et al. Cloning of A Novel Malignant Melanoma-Derived Growth-Regulatory Protein, Mia. *Cancer Res.*1994;54:5695-701.
41. Bosserhoff AK, Golob M, Buettner R, Landthaler M, Hein R. MIA (Melanoma Inhibitory Activity) Biological functions and clinical relevance. *Hautarzt* 1998;49:762-9.
42. Bosserhoff AK, Kuster H, Hein R. Elevated MIA levels in the serum of pregnant women and of children. *Clinical and Experimental Dermatology* 2004;29:628-9.
43. Bosserhoff AK, Buettner R. Expression, function and clinical relevance of MIA (melanoma inhibitory activity). *Histol.Histopathol.* 2002;17:289-300.
44. Hau P, Ruemmele P, Kunz-Schughart LA, Doerfelt A, Hirschmann B, Lohmeier A et al. Expression levels of melanoma inhibitory activity correlate with time to progression in patients with high-grade glioma. *Oncol.Rep.* 2004;12:1355-64.

45. Perez RP, Zhang P, Bosserhoff AK, Buettner R, Abu-Hadid M. Expression of melanoma inhibitory activity in melanoma and nonmelanoma tissue specimens. *Hum.Pathol.* 2000;31:1381-8.
46. Juergensen A, Holzapfel U, Hein R, Stolz W, Buettner R, Bosserhoff AK. Comparison of two prognostic markers for malignant melanoma: MIA and S100 beta. *Tumor Biology* 2001;22:54-8.
47. Bosserhoff AK, Kaufmann M, Kaluza B, Bartke I, Zirngibl H, Hein R et al. Melanoma-inhibiting activity, a novel serum marker for progression of malignant melanoma. *Cancer Res.* 1997;57:3149-53.
48. Garnier JP, Letellier S, Cassinat B, Lebbe C, Kerob D, Baccard M et al. Clinical value of combined determination of plasma L-DOPA/tyrosine ratio, S100B, MIA and LDH in melanoma. *European Journal of Cancer* 2007;43:816-21.
49. Mouawad R, Spano JP, Khayat D. Old and new serological biomarkers in melanoma: where we are in 2009. *Melanoma Res.* 2010;20:67-76.
50. Mian S, Ugurel S, Parkinson E, Schlenzka I, Dryden I, Lancashire L et al. Serum proteomic fingerprinting discriminates between clinical stages and predicts disease progression in melanoma patients. *J.Clin.Oncol.* 2005;23:5088-93.
51. Findeisen P, Zapatka M, Peccerella T, Matzk H, Neumaier M, Schadendorf D et al. Serum amyloid A as a prognostic marker in melanoma identified by proteomic profiling. *J.Clin.Oncol.* 2009;27:2199-208.

52. Garbe C, Hauschild A, Volkenandt M, Schadendorf D, Stolz W, Reinhold U et al. Evidence and interdisciplinary consensus-based German guidelines: surgical treatment and radiotherapy of melanoma. *Melanoma Res.* 2008;18:61-7.
  
53. Kirkwood JM, Strawderman MH, Ernstoff MS, Smith TJ, Borden EC, Blum RH. Interferon alfa-2b adjuvant therapy of high-risk resected cutaneous melanoma: the Eastern Cooperative Oncology Group Trial EST 1684. *J Clin Oncol.* 1996;14:7-17.
  
54. Kirkwood JM, Ibrahim JG, Sondak VK, Richards J, Flaherty LE, Ernstoff MS et al. High- and low-dose interferon alfa-2b in high-risk melanoma: first analysis of intergroup trial E1690/S9111/C9190. *J Clin Oncol.* 2000;18:2444-58.
  
55. Kirkwood JM, Ibrahim JG, Sosman JA, Sondak VK, Agarwala SS, Ernstoff MS et al. High-dose interferon alfa-2b significantly prolongs relapse-free and overall survival compared with the GM2-KLH/QS-21 vaccine in patients with resected stage IIB-III melanoma: results of intergroup trial E1694/S9512/C509801. *J Clin Oncol.* 2001;19:2370-80.
  
56. Grob JJ, Dreno B, de la SP, Delaunay M, Cupissol D, Guillot B et al. Randomised trial of interferon alpha-2a as adjuvant therapy in resected primary melanoma thicker than 1.5 mm without clinically detectable node metastases. French Cooperative Group on Melanoma. *Lancet* 1998;351:1905-10.
  
57. Pehamberger H, Soyer HP, Steiner A, Kofler R, Binder M, Mischer P et al. Adjuvant interferon alfa-2a treatment in resected primary stage II

- cutaneous melanoma. Austrian Malignant Melanoma Cooperative Group. *J Clin Oncol.* 1998;16:1425-9.
58. Cameron DA, Cornbleet MC, Mackie RM, Hunter JA, Gore M, Hancock B et al. Adjuvant interferon alpha 2b in high risk melanoma - the Scottish study. *Br.J Cancer* 2001;84:1146-9.
59. Mocellin S, Pasquali S, Rossi CR, Nitti D. Interferon alpha adjuvant therapy in patients with high-risk melanoma: a systematic review and meta-analysis. *J.Natl.Cancer Inst.* 2010;102:493-501.
60. Garbe C, Hauschild A, Volkenandt M, Schadendorf D, Stolz W, Reinhold U et al. Evidence-based and interdisciplinary consensus-based German guidelines: systemic medical treatment of melanoma in the adjuvant and palliative setting. *Melanoma Res.* 2008;18:152-60.
61. Eggermont AMM, Suci S, Mackie R, Ruka W, Testori A, Kruit W et al. Post-surgery adjuvant therapy with intermediate doses of interferon alfa 2b versus observation in patients with stage IIb/III melanoma (EORTC 18952): randomised controlled trial. *Lancet* 2005;366:1189-96.
62. Eggermont AM, Suci S, Santinami M, Testori A, Kruit WH, Marsden J et al. Adjuvant therapy with pegylated interferon alfa-2b versus observation alone in resected stage III melanoma: final results of EORTC 18991, a randomised phase III trial. *Lancet* 2008;372:117-26.
63. Pestka S, Krause CD, Walter MR. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev.* 2004;202:8-32.

64. Mohr P, Hauschild A, Trefzer U, Weichenthal M. Quality of life in patients receiving high-dose interferon alfa-2b after resected high-risk melanoma. *J.Clin Oncol.* 2009;27:e70.
65. Tsao H, Atkins MB, Sober AJ. Management of cutaneous melanoma. *N.Engl.J.Med.* 2004;351:998-1012.
66. Eigentler TK, Caroli UM, Radny P, Garbe C. Palliative therapy of disseminated malignant melanoma: a systematic review of 41 randomised clinical trials. *Lancet Oncol.* 2003;4:748-59.
67. Zimpfer-Rechner C, Hofmann U, Figl R, Becker JC, Trefzer U, Keller I et al. Randomized phase II study of weekly paclitaxel versus paclitaxel and carboplatin as second-line therapy in disseminated melanoma: a multicentre trial of the Dermatologic Co-operative Oncology Group (DeCOG). *Melanoma Res.* 2003;13:531-6.
68. Fink W, Zimpfer-Rechner C, Thielke A, Figl R, Kaatz M, Ugurel S et al. Clinical phase II study of pegylated liposomal doxorubicin as second-line treatment in disseminated melanoma. *Onkologie.* 2004;27:540-4.
69. Neuber K, Reinhold U, Deutschmann A, Pfohler C, Mohr P, Pichlmeier U et al. Second-line chemotherapy of metastatic malignant melanoma with intravenous treosulfan: a phase II multicentre trial. *Melanoma Res.* 2003;13:81-5.
70. Gogas H, Bafaloukos D, Aravantinos G, Fountzilas G, Tsoutsos D, Panagiotou P et al. Vinorelbine in combination with interleukin-2 as second-line treatment in patients with metastatic melanoma. A phase II

- study of the Hellenic Cooperative Oncology Group. *Cancer Invest* 2004;22:832-9.
71. Atzpodien J, Terfloth K, Fluck M, Reitz M. Cisplatin, gemcitabine, and treosulfan in relapsed stage IV cutaneous malignant melanoma patients. *Br.J.Cancer* 2007;97:1329-32.
72. Hofmann MA, Gabriel V, Milling A, Kiecker F, Sterry W, Trefzer U. High-dose platinum combination therapy in pretreated patients with disseminated melanoma. *Chemotherapy* 2007;53:422-8.
73. Hauschild A, Trefzer U, Garbe C, Kaehler KC, Ugurel S, Kiecker F et al. Multicenter phase II trial of the historic deacetylase inhibitor pyridylmethyl-N-{4-[(2-aminophenyl)-carbamoyl]-benzyl}-carbamate in pretreated metastatic melanoma. *Melanoma Res.* 2008;18:274-8.
74. Hauschild A, Agarwala SS, Trefzer U, Hogg D, Robert C, Hersey P et al. Results of a Phase III, Randomized, Placebo-Controlled Study of Sorafenib in Combination With Carboplatin and Paclitaxel As Second-Line Treatment in Patients With Unresectable Stage III or Stage IV Melanoma. *J Clin Oncol.* 2009;27:3496-502.
75. Weber JS, Zarour H, Redman B, Trefzer U, O'Day S, van den Eertwegh AJ et al. Randomized phase 2/3 trial of CpG oligodeoxynucleotide PF-3512676 alone or with dacarbazine for patients with unresectable stage III and IV melanoma. *Cancer* 2009;115:3944-54.
76. Amaravadi RK, Schuchter LM, McDermott DF, Kramer A, Giles L, Gramlich K et al. Phase II Trial of Temozolomide and Sorafenib in

- Advanced Melanoma Patients with or without Brain Metastases. *Clin.Cancer Res.* 2009;15:7711-8.
77. Perez DG, Suman VJ, Fitch TR, Amatruda T, Morton RF, Jilani SZ et al. Phase 2 Trial of Carboplatin, Weekly Paclitaxel, and Biweekly Bevacizumab in Patients With Unresectable Stage IV Melanoma A North Central Cancer Treatment Group Study, N047A. *Cancer* 2009;115:119-27.
78. Hersh EM, O'Day SJ, Powderly J, Khan KD, Pavlick AC, Cranmer LD et al. A phase II multicenter study of ipilimumab with or without dacarbazine in chemotherapy-naive patients with advanced melanoma. *Invest New Drugs* 2011;29:489-98.
79. Wolchok JD, Neyns B, Linette G, Negrier S, Lutzky J, Thomas L et al. Ipilimumab monotherapy in patients with pretreated advanced melanoma: a randomised, double-blind, multicentre, phase 2, dose-ranging study. *Lancet Oncol.* 2010;11:155-64.
80. Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, Ribas A, McArthur GA, Sosman JA et al. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N.Engl.J.Med.* 2010;363:809-19.
81. Bedikian AY, Millward M, Pehamberger H, Conry R, Gore M, Trefzer U et al. Bcl-2 antisense (oblimersen sodium) plus dacarbazine in patients with advanced melanoma: the Oblimersen Melanoma Study Group. *J.Clin.Oncol.* 2006;24:4738-45.

82. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N.Engl.J.Med.* 2010;363:711-23.
83. Garbe C, Peris K, Hauschild A, Saiag P, Middleton M, Spatz A et al. Diagnosis and treatment of melanoma: European consensus-based interdisciplinary guideline. *Eur.J.Cancer* 2010;46:270-83.
84. Patel JK, Didolkar MS, Pickren JW, Moore RH. Metastatic pattern of malignant melanoma. A study of 216 autopsy cases. *Am.J.Surg.* 1978;135:807-10.
85. Langer CJ, Mehta MP. Current management of brain metastases, with a focus on systemic options. *J.Clin Oncol.* 2005;23:6207-19.
86. Eigentler TK, Figl A, Krex D, Mohr P, Mauch C, Rass K et al. Number of metastases, serum lactate dehydrogenase level, and type of treatment are prognostic factors in patients with brain metastases of malignant melanoma. *Cancer* 2011;117:1697-703.
87. Fife KM, Colman MH, Stevens GN, Firth IC, Moon D, Shannon KF et al. Determinants of outcome in melanoma patients with cerebral metastases. *J. Clin Oncol.* 2004;22:1293-300.
88. Wronski M, Arbit E. Surgical treatment of brain metastases from melanoma: a retrospective study of 91 patients. *J.Neurosurg.* 2000;93:9-18.
89. Douglas JG, Margolin K. The treatment of brain metastases from malignant melanoma. *Semin.Oncol.* 2002;29:518-24.

90. Chang EL, Wefel JS, Hess KR, Allen PK, Lang FF, Kornguth DG et al. Neurocognition in patients with brain metastases treated with radiosurgery or radiosurgery plus whole-brain irradiation: a randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 2009;10:1037-44.
91. Agarwala SS, Kirkwood JM. Temozolomide, a novel alkylating agent with activity in the central nervous system, may improve the treatment of advanced metastatic melanoma. *Oncologist.* 2000;5:144-51.
92. Jacquillat C, Khayat D, Banzet P, Weil M, Fumoleau P, Avril MF et al. Final report of the French multicenter phase II study of the nitrosourea fotemustine in 153 evaluable patients with disseminated malignant melanoma including patients with cerebral metastases. *Cancer* 1990;66:1873-8.
93. Ugurel S, Becker JC. Treatment of advanced metastatic melanoma. *Hautarzt* 2011; 62:423-9.
94. Avril MF, Aamdal S, Grob JJ, Hauschild A, Mohr P, Bonerandi JJ et al. Fotemustine compared with dacarbazine in patients with disseminated malignant melanoma: a phase III study. *J.Clin Oncol.* 2004;22:1118-25.
95. Margolin KA, Di Giacomo AM, Maio M. Brain metastasis in melanoma: clinical activity of CTLA-4 antibody therapy. *Semin.Oncol.* 2010;37:468-72.
96. Lesser GJ. Chemotherapy of cerebral metastases from solid tumors. *Neurosurg.Clin N.Am.* 1996;7:527-36.

97. Gerstner ER, Fine RL. Increased permeability of the blood-brain barrier to chemotherapy in metastatic brain tumors: establishing a treatment paradigm. *J.Clin Oncol.* 2007;25:2306-12.
  
98. Tas F, Yasasever V, Duranyildiz D, Camlica H, Ustuner Z, Aydiner A et al. Clinical value of protein S100 and melanoma-inhibitory activity (MIA) in malignant melanoma. *American Journal of Clinical Oncology-Cancer Clinical Trials* 2004;27:225-8.
  
99. Garbe C, Leiter U, Ellwanger U, Blaheta HJ, Meier F, Rassner G et al. Diagnostic value and prognostic significance of protein S-100 beta, melanoma-inhibitory activity, and tyrosinase/MART-1 reverse transcription-polymerase chain reaction in the follow-up of high-risk melanoma patients. *Cancer* 2003;97:1737-45.
  
100. Muller-Ladner U, Bosserhoff AK, Dreher K, Hein R, Neidhart M, Gay S et al. MIA (melanoma inhibitory activity): a potential serum marker for rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 1999;38:148-54.
  
101. Neidhart M, Muller-Ladner U, Frey W, Bosserhoff AK, Colombani PC, Frey-Rindova P et al. Increased serum levels of non-collagenous matrix proteins (cartilage oligomeric matrix protein and melanoma inhibitory activity) in marathon runners. *Osteoarthritis and Cartilage* 2000;8:222-9.
  
102. Tutuncu Z, Kavanaugh A. Rheumatic disease in the elderly: Rheumatoid arthritis. *Rheum.Dis.Clini.North.Am.* 2007;33:57-70.

103. Mocellin S, Hoon D, Ambrosi A, Nitti D, Rossi CR. The prognostic value of circulating tumor cells in patients with melanoma: A systematic review and meta-analysis. *Clin.Cancer Res.* 2006;12:4605-13.
104. Egberts F, Momkvist A, Egberts JH, Kaehler KC, Hauschild A. Serum S100B and LDH are not useful in predicting the sentinel node status in melanoma patients. *Anticancer Res.* 2010;30:1799-805.
105. Vucetic B, Rogan SA, Hrabac P, Hudorovic N, Cupic H, Lukinac L et al. Biological value of melanoma inhibitory activity serum concentration in patients with primary skin melanoma. *Melanoma Res.* 2008;18:201-7.
106. Veenstra HJ, Wouters MJ, Kroon BB, Olmos RA, Nieweg OE. Less false-negative sentinel node procedures in melanoma patients with experience and proper collaboration. *J.Surg.Oncol.* 2011.
107. Gershenwald JE, Ross MI. Sentinel-lymph-node biopsy for cutaneous melanoma. *N.Engl.J.Med.* 2011;364:1738-45.
108. Seynhaeve ALB, Hoving S, Schipper D, Vermeulen CE, Wiel-Ambagtsheer GA, van Tiel ST et al. Tumor necrosis factor alpha mediates homogeneous distribution of liposomes in murine melanoma that contributes to a better tumor response. *Cancer Res.*2007;67:9455-62.
109. Laurenzi L, Natoli S, Di Filippo F, Calamaro A, Centulio F, Anza M et al. Systemic and haemodynamic toxicity after isolated limb perfusion (ILP) with TNF-alpha. *J Exp.Clin Cancer Res.* 2004;23:225-31.

110. Gogas H, Ioannovich J, Dafni U, Stavropoulou-Giokas C, Frangia K, Tsoutsos D et al. Prognostic significance of autoimmunity during treatment of melanoma with interferon. *N.Engl.J.Med.* 2006;354:709-18.
  
111. Moschos SJ, Edington HD, Land SR, Rao UN, Jukic D, Shipe-Spotloe J et al. Neoadjuvant treatment of regional stage IIIB melanoma with high-dose interferon alfa-2b induces objective tumor regression in association with modulation of tumor infiltrating host cellular immune responses. *J.Clin Oncol.* 2006;24:3164-71.
  
112. Bouwhuis MG, Suci S, Testori A, Kruit WH, Sales F, Patel P et al. Phase III trial comparing adjuvant treatment with pegylated interferon Alfa-2b versus observation: prognostic significance of autoantibodies--EORTC 18991. *J.Clin Oncol.* 2010;28:2460-6.
  
113. Bouwhuis MG, Collette S, Suci S, de Groot ER, Kruit WH, Ten Hagen TL et al. Changes of ferritin and CRP levels in melanoma patients treated with adjuvant interferon-alpha (EORTC 18 952) and prognostic value on treatment outcome. *Melanoma Res.* 2011.
  
114. Bongartz T, Sutton AJ, Sweeting MJ, Buchan I, Matteson EL, Montori V. Anti-TNF antibody therapy in rheumatoid arthritis and the risk of serious infections and malignancies: Systematic review and meta-analysis of rare harmful effects in randomized controlled trials (vol 295, pg 2275, 2006). *Jama-J. Am. Med. Ass.* 2006;295:2482.
  
115. Katoulis AC, Kanelleas A, Zambacos G, Panayiotides I, Stavrianeas NG. Development of Two Primary Malignant Melanomas after Treatment with Adalimumab: A Case Report and Review of the Possible Link between

- Biological Therapy with TNF-alpha Antagonists and Melanocytic Proliferation. *Dermatology* 2010;221:9-12.
116. Fulchiero GJ, Jr., Salvaggio H, Drabick JJ, Staveley-O'Carroll K, Billingsley EM, Marks JG et al. Eruptive latent metastatic melanomas after initiation of antitumor necrosis factor therapies. *J.Am.Acad.Dermatol* 2007;56:S65-S67.
117. Valencia X, Stephens G, Goldbach-Mansky R, Wilson M, Shevach EM, Lipsky PE. TNF downmodulates the function of human CD4(+)CD25(hi) T-regulatory cells. *Blood* 2006;108:253-61.
118. Antony PA, Restifo NP. CD4(+)CD25(+) T regulatory cells, immunotherapy of cancer, and interleukin-2. *J.Immunother.* 2005;28:120-8.
119. Ascierto PA, Napolitano M, Celentano E, Simeone E, Gentilcore G, Daponte A et al. Regulatory T cell frequency in patients with melanoma with different disease stage and course, and modulating effects of high-dose interferon-alpha 2b treatment. *J.Transl.Med.* 2010;8:76.
120. Yurkovetsky ZR, Kirkwood JM, Edington HD, Marrangoni AM, Velikokhatnaya L, Winans MT et al. Multiplex analysis of serum cytokines in melanoma patients treated with interferon-alpha 2b. *Clin.Cancer Res.* 2007;13:2422-8.
121. Czlonkowska A, Ciesielska A, Gromadzka G, Kurkowska-Jastrzebska I. Estrogen and cytokines production - the possible cause of gender differences in neurological diseases. *Curr.Pharm.Des* 2005;11:1017-30.

122. Nishino H, Nakajima K, Kumazaki M, Fukuda A, Muramatsu K, Deshpande SB et al. Estrogen protects against while testosterone exacerbates vulnerability of the lateral striatal artery to chemical hypoxia by 3-nitropropionic acid. *Neurosci.Res.* 1998;30:303-12.
  
123. Harmankaya K, Erasim C, Koelblinger C, Ibrahim R, Hoos A, Pehamberger H et al. Continuous systemic corticosteroids do not affect the ongoing regression of metastatic melanoma for more than two years following ipilimumab therapy. *Med.Oncol.* 2010. DOI 10.1007/s12032-010-9606-0
  
124. Zakrzewski J, Geraghty LN, Rose AE, Christos PJ, Mazumdar M, Polsky D et al. Clinical variables and primary tumor characteristics predictive of the development of melanoma brain metastases and post-brain metastases survival. *Cancer* 2011;117:1711-20.
  
125. Staudt M, Lasithiotakis K, Leiter U, Meier F, Eigentler T, Bamberg M et al. Determinants of survival in patients with brain metastases from cutaneous melanoma. *Br.J.Cancer* 2010;102:1213-8.
  
126. Auge JM, Molina R, Filella X, Bosch E, Cao MG, Puig S et al. S-100 beta and MIA in advanced melanoma in relation to prognostic factors. *Anticancer Res.*2005;25:1779-82.
  
127. Samlowski WE, Watson GA, Wang M, Rao G, Klimo P, Jr., Boucher K et al. Multimodality treatment of melanoma brain metastases incorporating stereotactic radiosurgery (SRS). *Cancer* 2007;109:1855-62.

128. Bleehen NM, Newlands ES, Lee SM, Thatcher N, Selby P, Calvert AH et al. Cancer Research Campaign phase II trial of temozolomide in metastatic melanoma. *J.Clin Oncol.* 1995;13:910-3.
129. Middleton MR, Grob JJ, Aaronson N, Fierlbeck G, Tilgen W, Seiter S et al. Randomized phase III study of temozolomide versus dacarbazine in the treatment of patients with advanced metastatic malignant melanoma. *J.Clin Oncol.* 2000;18:158-66.
130. Agarwala SS, Kirkwood JM, Gore M, Dreno B, Thatcher N, Czarnetski B et al. Temozolomide for the treatment of brain metastases associated with metastatic melanoma: a phase II study. *J.Clin.Oncol.* 2004;22:2101-7.
131. Bafaloukos D, Tsoutsos D, Fountzilas G, Linardou H, Christodoulou C, Kalofonos HP et al. The effect of temozolomide-based chemotherapy in patients with cerebral metastases from melanoma. *Melanoma Res.* 2004;14:289-94.
132. Krown SE, Niedzwiecki D, Hwu WJ, Hodgson L, Houghton AN, Haluska FG. Phase II study of temozolomide and thalidomide in patients with metastatic melanoma in the brain: high rate of thromboembolic events (CALGB 500102). *Cancer* 2006;107:1883-90.
133. Atkins MB, Sosman JA, Agarwala S, Logan T, Clark JI, Ernstoff MS et al. Temozolomide, thalidomide, and whole brain radiation therapy for patients with brain metastasis from metastatic melanoma: a phase II Cytokine Working Group study. *Cancer* 2008;113:2139-45.

134. Schadendorf D, Hauschild A, Ugurel S, Thielke A, Egberts F, Kreissig M et al. Dose-intensified bi-weekly temozolomide in patients with asymptomatic brain metastases from malignant melanoma: a phase II DeCOG/ADO study. *Ann.Oncol.* 2006;17:1592-7.

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Wolfram Sterry, der mir als Direktor der Klinik für Dermatologie der Charité-Universitätsmedizin das klinische und wissenschaftliche Arbeiten ermöglichte. Durch seine positive Förderung, ständige Diskussionsbereitschaft und kompetente Beratung war und ist das Arbeiten in seiner Klinik mit sehr viel Freude verbunden.

Herrn PD Dr. Uwe Trefzer möchte ich für die sehr konstruktive und nette Teamarbeit danken. In seiner Forschungsgruppe fand ich durch stetige Anregungen und freundschaftliches Zusammenarbeiten große Freude am wissenschaftlichen Arbeiten.

Ein weiterer Dank gilt Frau Dr. Ingeborg Kuchler und Herrn Bernd Schicke, die durch ständige Überwachung der statistischen Auswertungen für die biostatistischen korrekten Veröffentlichungen sorgten.

Frau Petra Siegel und Frau Johanna Kunz, die mich als MTAs im Laborbereich unterstützten, möchte ich herzlich danken.

Auch meinen Kollegen Herrn Dr. Felix Kiecker und Frau Dr. Tabea Wilhelm möchte ich für die sehr gute Zusammenarbeit im klinischen Bereich danken. Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. Gerda Sterry, die mir mit ihrer klinischen Erfahrung immer zur Seite stand.

Ebenso großer Dank gilt meinem Ehemann Dr. Michael Schäfer, der mich stets verständnisvoll begleitet hat. Natürlich möchte ich mich auch bei meinen Eltern, Christa und Kurt Hofmann, bedanken, die mich über viele Jahre immer unterstützt haben.

## Erklärung

### § 4 Abs.3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde.
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

.....  
Datum

.....  
Dr. Maja Hofmann