

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie
der Universität zu Köln
Direktorin: Universitätsprofessorin Dr. med. E. R. von Stebut-Borschitz

Biomarker-basierte Risikostratifizierung beim Melanom der Stadien II und III: serologische und immunhistochemische Analysen

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Leon Kampe
geboren in Göttingen

promoviert am 25.02.2026

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln
2026

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink

1. Gutachterin: Universitätsprofessorin Dr. med. C. Franklin
2. Gutachter: Privatdozent Dr. med. J.-M. Heger

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Frau Univ.-Prof. Dr. med. Cindy Franklin
Frau Dr. rer. nat. Paola Zigrino

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Der dieser Arbeit zugrunde liegende klinische Datensatz und das Patientenmaterial wurde mir von Frau Univ.-Prof. Dr. med. Cindy Franklin zur Verfügung gestellt.

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch Frau Univ.-Prof. Dr. med. Cindy Franklin und Frau Dr. rer. nat. Paola Zigrino sowie dem biologisch-technischen Assistenten Herr Jan Zamek von mir selbst ausgeführt worden.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 13.10.2025

Danksagung

Zu Beginn möchte ich mich herzlich bei meiner Doktormutter Univ.-Prof. Dr. med. Cindy Franklin bedanken, die mir die Durchführung des Forschungsprojektes sowie die Anfertigung dieser Arbeit ermöglicht hat. Weiterhin bedanke ich mich sehr bei meiner Zweitbetreuerin Dr. rer. nat. Paola Zigrino, die mich umfassend bei der Planung der praktischen Durchführung meiner Experimente und der Auswertung beraten und unterstützt hat. Einen besonderen Dank möchte ich Jan Zamek für die stets hilfsbereite technische und persönliche Unterstützung aussprechen. Ebenso danke ich Gabriela Scherr für die technische und persönliche Hilfestellung bei der Ausführung meiner Arbeit.

Weiterhin bedanken möchte ich mich bei Joy Steinkamp für die technische und praktische Ratgebung. Außerdem bedanke ich mich bei den Mitarbeiterinnen der Histologie für die Beratung und Hilfestellung bei der Anfertigung meiner histologischen Schnitte. Darüber hinaus möchte ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des dermatologischen Forschungslabors danken, die mich bei der praktischen Arbeit unterstützt haben und hier nicht namentlich erwähnt wurden.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich unermüdlich während des gesamten Forschungsprojektes unterstützt und motiviert haben. Weiterhin danke ich Rovena Halpape, die bereits früh mein Interesse an wissenschaftlichen Themen geweckt hat. Außerdem bedanke ich mich bei meiner Kollegin Dr. med. Petra Blauert für die Ratgebung. Darüber hinaus möchte ich mich herzlich bei Nicole Spalek, Jan Kittelmann und Luca de Cesare bedanken für die umfassende persönliche Unterstützung bei der Bewältigung meines Promotionsprojektes.

Meiner geliebten Mutter gewidmet.

Widmung

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	7
1. ZUSAMMENFASSUNG	8
2. EINLEITUNG	9
2.1. Das maligne Melanom	9
2.2. Wissenschaftlicher Hintergrund	10
2.3. Schematischer Lymphknotenaufbau und Lokalisation der untersuchte Biomarker	16
2.4. Fragestellungen und Ziel der Arbeit	17
3. MATERIAL UND METHODEN	18
3.1. Patientenkollektiv, Datenerhebung und Einschlusskriterien	18
3.2. Methoden	21
3.2.1. Enzyme linked immunosorbent Essay	21
3.2.2. Immunhistochemie und Histochemie	24
3.2.3. Illustrierte (immun-)histochemische Expressionsscores	26
3.2.4. Statistische Analysen mit SPSS und GraphPad und statistische Auswertung klinischer Daten	30
3.3. Material	32
3.3.1. Verwendete Enzyme linked immunosorbent assays	32
3.3.2. Verwendete Antikörper für die immunhistochemischen Analysen	32
3.3.3. Verwendete Arbeitsprogramme	33
3.3.4. Weitere verwendete Materialien	33
4. ERGEBNISSE	35
4.1. Deskriptive Statistik aller eingeschlossenen Patienten	35
4.2. Deskriptive Statistik der Patientenkohorten der immunhistochemischen Untersuchungen	37
4.3. Fernmetastasenfreies und Gesamtüberleben der Patienten der immunhistochemischen Untersuchungen	38
4.4. Serologische Untersuchungen von Melanompatienten im Stadium II	40
4.4.1. Interleukin-4	40
4.4.2. Interleukin-6	40

4.4.3.	CCL1	42
4.4.4.	CCL21	43
4.4.5.	CXCL10	45
4.4.6.	HAPLN1	47
4.5.	Immunhistochemische Untersuchungen von Melanompatienten in den Stadien II und III	48
4.5.1.	CCL21	48
4.5.2.	CXCL10	50
4.5.3.	HAPLN1	52
4.5.3.1.	HAPLN1 im Stroma	52
4.5.3.2.	HAPLN1 in Melanometastasen	54
4.5.4.	CD20	56
4.5.5.	CD45	57
4.5.6.	CD68	59
4.5.6.1.	CD68 allgemein	59
4.5.6.2.	CD68 im subkapsulären Lymphknotenbereich	60
4.5.7.	Kollagenfärbungen	62
4.6.	Korrelation der (immun-)histochemischen Marker	66
4.7.	Statistische Auswertung der prognostischen Relevanz der klinisch-chemischen Laborparameter	67
4.7.1.	Laktatdehydrogenase, Glukose und C-reaktives Protein	67
4.7.2.	S100B	69
4.8.	Stratifikation des Überlebens nach dem Serumspiegel von Laktatdehydrogenase, Glukose, C-reaktives Protein und S100B	70
5.	DISKUSSION	74
5.1.	Diskussion	74
5.2.	Chancen und Limitationen	79
6.	LITERATURVERZEICHNIS	81
7.	ANHANG	85
7.1.	Abbildungsverzeichnis	85
7.2.	Tabellenverzeichnis	86

Abkürzungsverzeichnis

AJCC	American Joint Committee on Cancer
CD	Cluster of differentiation
CCR(-7/-8)	CC chemokine receptors (-7/-8)
CCL(-1/-21)	CC-ligand (-1/-21)
CRP	C-reaktives Protein
ctDNA	Circulating tumor DNA
CXCL10	C-X-X motif chemokine 10
DI	Deziliter
ED	Erstdiagnose
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
EZM	Extrazellulärmatrix
HAPLN1	Hyaluronan and proteoglycan link protein 1
HRP	Horseradish-Peroxidase
IL(-4/-6)	Interleukin(-4/-6)
KI	Konfidenzintervall
LDH	Laktatdehydrogenase
mg/ml	Milligramm / Milliliter
n	numbers (Anzahl)
ng	Nanogramm
p	p (probability)-Wert
PD(-1)	Programmed cell death protein (-1)
Pg	Pikogramm
qRT-PCR	Quantitative real-time Polymerase chain reaction
RNA	Ribonukleinsäure
St.	Stadium
S100B	S100 calcium-binding protein b
SLN	Sentinel lymph node (Sentinellymphknoten)
SLND	Sentinel lymph node dissection (Sentinellymphknoten-Dissektion)
TBS	Tris-buffered saline
TMB	Tetramethylbenzidin
TRS	Target retrieval solution
TNM	Tumor, Nodus, Metastase
µg/µl	Mikrogramm/Mikroliter

1. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der prognostischen Relevanz von routinemäßig erhobenen Blutparametern, löslichen Serummarkern sowie immunhistochemischen Biomarkern im Sentinellymphknoten von Melanompatienten in den Stadien II und III. Von den Blutparametern war ausschließlich das CRP signifikant mit dem fernmetastasenfreien Überleben assoziiert, insbesondere im Stadium II. LDH, Glukose und S100B zeigten keine signifikante prognostische Relevanz.

Die löslichen Marker IL-4 und HAPLN1 konnten aufgrund technischer Limitationen nicht ausgewertet werden. Für IL-6, CCL1, CCL21 und CXCL10 ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen progressionsfreien und progressiven Verläufen im Stadium II.

Immunhistochemisch zeigten sich insbesondere eine erhöhte CXCL10-Expression sowie eine reduzierte CD45-Expression im Stadium II als potenziell prädiktiv für eine Tumorprogression. Eine niedrige CD45-Expression war dabei signifikant mit einem schlechteren fernmetastasenfreien Überleben assoziiert. Eine hohe CCL21-Expression im Wächterlymphknoten korrelierte zudem mit einem ungünstigeren Gesamtüberleben. Im Stadium III war eine vermehrte subkapsuläre Makrophagenanzahl mit einem signifikant schlechteren Gesamtüberleben verbunden.

Andere immunhistochemische Befunde im Stadium III konnten aufgrund der Metastasengröße nicht unabhängig interpretiert werden und erscheinen daher nur bedingt prognostisch verwertbar.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass – zusätzlich zu etablierten klinischen Risikofaktoren – einzelne immunologische Marker, insbesondere im Stadium II, ein Potenzial zur verbesserten Risikostratifizierung besitzen. Die frühzeitige Identifikation progressionsgefährdeter Patienten könnte so die individuelle Entscheidung über adjuvante Therapien und engmaschige Nachsorge unterstützen.

2. Einleitung

2.1. Das maligne Melanom

Das maligne Melanom ist ein bösartiger Hauttumor, welcher von den Melanozyten innerhalb der Epidermis ausgeht (1). Es gehört bei Männern und Frauen in Deutschland zu den fünf häufigsten soliden Tumoren und weist in den letzten Jahren eine steigende Inzidenz auf. Für eine Tumorprogression prognostisch relevante Faktoren sind die Tumordicke nach Breslow, das Vorliegen einer Ulzeration des Primärtumors, eine erhöhte Mitoserate, und das Vorliegen einer Metastasierung bei Erstdiagnose (2).

Die Stadieneinteilung des Melanoms erfolgt anhand der TNM-Klassifikation, sowie der klinischen Stadieneinteilung nach dem American Joint Committee on Cancer (AJCC). Trotz eines frühen klinischen Stadiums zum Zeitpunkt der Erstdiagnose entwickelt ein Teil der ursprünglich in sano exziierten Patienten ein Rezidiv. Das Risiko eines Rezidivs bei Patienten mit negativer Sentinellymphknotendisektion (SLND) liegt zwischen 6 und 29% (3). Folglich besteht der Bedarf, bei Patienten mit einem hohen Rezidivrisiko im Stadium II dieses durch entsprechende Therapiemaßnahmen zu reduzieren. Den Patienten mit unauffälliger SLND kann im Stadium IIA – bzw. soll – im Stadium IIB/C – laut Leitlinie eine adjuvante Therapie mittels Interferon alpha offeriert werden (4). Dieser Empfehlung wird jedoch aufgrund einer nur geringen Wirksamkeit und einer hohen Nebenwirkungsrate des Interferon- α nicht mehr gefolgt. Seit 2022 sind nun besser wirksame und besser verträgliche programmed cell death protein-1 (PD-1) -Antikörper für die adjuvante Therapie des Melanoms im Stadium II zugelassen. Zuvor waren PD-1-Antikörper lediglich für die adjuvante Behandlung von Melanompatienten ab dem Stadium III zugelassen (4). Die Zulassung für die adjuvante Therapie mittels PD-1-Antikörper im Stadium II beruht auf den Placebo-kontrollierten, doppelverblindeten und randomisierten Phase-III-Studien KEYNOTE-716 (Pembrolizumab) und Checkmate-S76K (Nivolumab) im Stadium II. In beiden Studien konnte eine Verbesserung des fernmetastasenfreien Überlebens bei einem resezierten Melanom im Stadium IIB/C durch eine adjuvante Therapie mit Pembrolizumab beziehungsweise Nivolumab gezeigt werden (5,6,7,8). Die Ergebnisse dieser Studien zeigen, dass auch Patienten ohne eine lokale oder Fernmetastasierung, welche jedoch ein erhöhtes Risiko einer späteren Metastasierung aufweisen, von einer adjuvanten PD-1-Antikörpertherapie mit Pembrolizumab profitieren können (9). Dabei handelt es sich um einen bedeutenden Meilenstein in der Therapie des malignen Melanoms. Auch wenn sich die Lebensqualität der Studienteilnehmer durch die Pembrolizumabgaben im Rahmen der KEYNOTE-716-Studie nicht wesentlich verschlechtert hat (10), müssen hier jedoch auch finanzielle und ökonomische Gesichtspunkte beachtet werden, wenn die Entscheidung getroffen wird, einer so großen Patientengruppe eine adjuvante Antikörpertherapie mit Pembrolizumab zukommen zu lassen (7). Dies ist insbesondere kritisch zu hinterfragen, da ein Großteil der Patienten auch ohne adjuvante Therapie im Verlauf keine Metastasierung entwickeln würde und aufgrund

dessen von dieser teuren und nebenwirkungsbehafteten Antikörpertherapie nicht profitiert (7). Außerdem würde ein weiterer Teil der Melanompatienten trotz einer adjuvanten Therapie aufgrund von primären und sekundären Resistenzen eine Tumorprogression entwickeln. Aktuell ist unklar, welche Melanompatienten in den Stadien IIB-IIC von einer adjuvanten Immuncheckpointinhibitor-Therapie profitieren. Um solche Patienten, die im Verlauf ihrer Tumorerkrankung eine Tumorprogression aufweisen, bereits vor Therapiestart zu identifizieren, werden Biomarker benötigt. Einige Biomarker wurden bereits in der Literatur als potenziell prognostisch relevante Faktoren diskutiert. Darunter fallen die Tumormutationslast, Serumparameter, Faktoren des Tumormikromilieus, zirkulierende Tumor-DNA (ctDNA) und Genexpressionsscores (11).

2.2. Wissenschaftlicher Hintergrund

In der Melanomforschung gewinnt zunehmend die Vorstellung an Bedeutung, dass Veränderungen in Organsystemen diese aufnahmefähig für Metastasen machen. Bei der Metastasierung ist nicht lediglich der passive Lymphabfluss für die lymphatische Tumorausbreitung verantwortlich; vielmehr erfolgt diese höchstwahrscheinlich über eine sukzessive Abfolge verschiedener Schritte unter Einbeziehung spezifischer Chemokine, die die Metastasierung gezielt ermöglichen (12). Chemokine, die beispielsweise für die Melanomzelleinwanderung oder das T-Zell-Homing und damit für die Aktivierung sowie Rekrutierung des Immunsystems von Bedeutung sind, spielen vermutlich eine zentrale Rolle (13). In der aktuellen Forschung wird ihnen zunehmend größere Aufmerksamkeit geschenkt. Grundlegend wird angenommen, dass Melanomzellen bei der Metastasierung über die afferenten Lymphgefäße in den Sentinellymphknoten gelangen und dort über die subkapsulären Sinus in das lymphatische Gewebe eindringen können. Dabei sind nicht nur lösliche Faktoren von Bedeutung, sondern auch strukturelle Gegebenheiten, wie etwa der Aufbau der extrazellulären Matrix (EZM) (13).

Im Rahmen dieser Arbeit wollten wir daher die prognostische Relevanz löslicher Serumparameter und solcher im Gewebe von Wächterlymphknoten von Melanompatienten im Stadium II und III auf ihre prognostische Relevanz untersuchen. Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden, ob diese Faktoren uns voraussagen können, welche Melanompatienten ohne adjuvante PD-1 gerichtete Therapie eine Tumorprogression entwickeln und daher einer adjuvanten Therapie bedürfen.

Wir wählten hierzu verschiedene lösliche Biomarker im Serum sowie Parameter im Sentinellymphknotengewebe aus, um diese auf ihr Potenzial, eine künftige Metastasierung bei Patienten mit Melanom vorauszusagen, zu untersuchen.

Referenzwerte Interleukin 4 und Interleukin 6

Die Literaturrecherche ergab, dass zahlreiche Laborwerte bereits auf ihre Bedeutung bezüglich Prognose und Rezidivrisiko der Melanompatienten untersucht wurden (14). Unter anderem haben F. Mancuso et al. in ihrer Arbeit die Serumspiegel verschiedener Entzündungsmarker wie die Interleukine -4, -6, -10, -17A, Interferon-gamma, Transforming growth factor beta sowie Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor bei Melanompatienten im frühen Stadium II gemessen (14). In ihrer Arbeit wurde beschrieben, dass erhöhte IL-4-Spiegel, -ähnlich wie eine hohe Tumordicke nach Breslow-, mit einer insgesamt schlechteren Prognose hinsichtlich des progressionsfreien Überlebens assoziiert sind (14). Bei IL-4 handelt es sich um ein Zytokin, das als klassisches TH2-Zytokin bekannt ist, und bereits in der Vergangenheit als eher protumoraler Faktor gewertet wurde (14). IL-6 ist hingegen relevant für die T-Zell-vermittelte antitumorale Wirkung, und erhöhte IL-6-Spiegel zeigen eine Aktivierung des Immunsystems an (14). IL-4 steuert insbesondere Überleben und Proliferation von Lymphozyten (14). Eine Erhöhung der Serumwerte dieser beiden Interleukine bei Patienten in frühen Melanomstadien ist mit einem schlechteren progressionsfreien Überleben assoziiert (14). Daher eignet sich eine Messung dieser beiden Parameter als Kontrolle für unsere Untersuchungen.

HAPLN1

HAPLN1 ist die Abkürzung für das „hyaluronan and proteoglycan link protein 1“. Hierbei handelt es sich um ein Protein, welches eine wichtige Rolle in Geweben mit einem hohen Hyalurongehalt wie der Haut spielt (15). Dieses wird vor allem von jungen Fibroblasten sezerniert. HAPLN1 verfügt dabei über eine wichtige Rolle bei der Vernetzung von extrazellulärer Matrix mit Hyaluron und trägt somit zu einer hohen Dichte der EZM bei. Erwähnenswert ist hierbei, dass ein erhöhter HAPLN1-Gehalt zwar mit einer vermehrten Rate von Lymphknotenmetastasen -insbesondere bei jungen Patienten- einhergeht, jedoch mit einem besseren Überleben assoziiert ist (15). Dies wird dadurch erklärt, dass die extrazelluläre Matrix mithilfe der Vernetzung durch HAPLN1 eine Barriere für eine Metastasierung darstellt und somit einerseits die Rate an Lymphknotenmetastasen erhöht, andererseits aber die hämatogene Aussaat und die Bildung von Fernmetastasen verhindert und somit zu einem verbesserten Überleben beiträgt (15). Ein verminderter Hyalurongehalt -und somit eine HAPLN1-Reduktion- haben zudem eine Relevanz für die Tumorausbreitung in der Haut (16). Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass eine vermehrte lymphatische Permeabilität und in Folge dessen eine vermehrte lymphatische Metastasierung dadurch ermöglicht wird, dass mit zunehmendem Alter durch einen Abbau der extrazellulären Matrix um die lymphatischen Gewebe herum eine verstärkte Metastasierung begünstigt wird (13). Eine abnehmende HAPLN1-Positivität korreliert dabei mit dem Abbau der extrazellulären Matrix und konsekutiv mit dem Verlust der Integrität der lymphatischen Gefäße (13). Ein Verlust von HAPLN1 resultierte in vermehrt lockerem kollagenem Bindegewebe

(13). Es konnte gezeigt werden, dass vermehrtes HAPLN1 bei gealterten Fibroblasten eine Zunahme der Komplexität der Extrazellulärmatrix bewirkt (13). Beinhaltete eine solche Matrix HAPLN1, fiel es Tumorzellen deutlich schwerer, endotheliale Zellbarrieren zu durchschreiten. Der altersabhängige HAPLN1-Gehalt scheint somit einen relevanten Einfluss auf den Metastasierungsweg von Melanomzellen zu haben (13). Die Bedeutung von löslichem HAPLN1 für die Tumorprogression ist bisher jedoch noch nicht untersucht worden.

CCL21

Das Chemokin „CC-ligand 21“ (CCL21) spielt eine relevante Rolle bei der Regulierung des T-Zell-Homings sowie der Einwanderung von dendritischen Zellen in lymphatische Gewebe wie Lymphknoten, welche den dafür passenden Rezeptor CC chemokine receptor 7 (CCR-7) exprimieren (12). Dabei wird es insbesondere in hochendothelialen Venolen exprimiert, welche für die T-Zell-Einwanderung unabdingbar sind (12). So konnte in experimentellen Mausstudien gezeigt werden, dass in Abwesenheit von CCL21 T-Zellen und dendritische Zellen nicht in die Lymphknoten einwandern können. Zudem wird CCL21 von fibroblastischen Retikulumzellen exprimiert (17). H. Takeuchi et al. stellten die Hypothese auf, dass CCL21 einen Beitrag dazu leistet, die Einwanderung von CCR7-positiven Melanomzellen in Sentinellymphknoten zu ermöglichen (12). Sie konnten zeigen, dass es einen Zusammenhang zwischen einer CCR7-Expression auf Melanomzellen und einer im Lymphknoten vorhandenen CCL21-assoziierten Melanomausbreitung gibt (12). Es konnte zudem eine verstärkte CCL21-Expression in Lymphknoten in frühen Melanomstadien gezeigt werden. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass Lymphknotenmetastasen des Melanoms die CCL21-Expression direkt unterdrücken und somit eine weitere Metastasierung begünstigen können (12). Zudem wurde in Studien mit Mäusen gezeigt, dass eine Überexpression von CCR7 im Primärmelanom eine lymphogene Metastasierung erleichtert (18). Melanomzellen scheinen lymphatische Organe wie Lymphknoten als eine Art Sprungbrett zu einer Fernmetastasierung zu nutzen, wobei CCL21 und CCR7 eine Rolle zu spielen scheinen (19). Daher könnten CCL21 und der dazugehörige Rezeptor CCR7 als prognostisch relevante Faktoren bei einem malignen Melanom dienen (12). Takeuchi et al. stellten durch immunhistochemische Färbungen und qRT-PCR fest, dass die untersuchten Melanome und Sentinellymphknoten in niedrigeren Stadien eine höhere CCL21-Expression zeigen (12). Der direkte Einfluss von CCL21 auf die Prognose der Melanompatienten wurde dabei jedoch noch nicht untersucht.

CCL1

Bei „CC-ligand 1“ (CCL1) handelt es sich ebenfalls um ein Chemokin. Dieses wird innerhalb der Lymphsinus in Lymphknoten exprimiert, jedoch nicht im peripheren lymphatischen System. Es bindet an den CCR8-Rezeptor, welcher umfassend von menschlichen Melanomzellen ausgebildet wird (20). Im Rahmen eines *in vitro*-Experimentes durch Van Snick et al. wurde gezeigt, dass CCL1 und CCR8 die Apoptose von malignen T-Zellen im Lymphom und im Rahmen von Leukämien verhindern können (21). Eine ähnliche Pathophysiologie könnte bei Melanomzellen denkbar sein. Bei weiteren *in vitro*-Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Blockade von CCL1 bzw. dessen Rezeptor CC chemokine receptor 8 (CCR8) die Tumorzellwanderung durch lymphatisches Endothelgewebe wirksam verhindern kann (20). Umgekehrt bewirkte rekombinantes CCL1 die Einwanderung von CCR8-positiven Tumorzellen (20). Neben einer Expression im Lymphknoten lässt sich CCL1 auch in Blutgefäßen in dermalen Strukturen finden (22). Melanozyten exprimieren ebenfalls CCL1, und die Ausschüttung inflammatorischer Zytokine erhöht die CCL1-Expression stark (23). Es wird angenommen, dass CCL1 die lymphogene Metastasierung insofern steuert, als dass es nach dem Tumorzelleintritt in die Lymphsinus den Übertritt dieser in den Lymphknotenkortex ermöglicht. (20). Die Korrelation der Höhe des Expressionslevels von CCL1 im Wächterlymphknoten mit einer Krankheitsprogression von Melanopatienten ist in diesen Studien jedoch nicht untersucht worden.

CXCL10

C-X-X motif chemokine 10 (CXCL10) ist ein weiteres Chemokin, welches insbesondere von Melanomzellen sowie CD45+ Zellen in Melanometastasen gebildet wird, und mit einem Ansprechen auf eine Immuntherapie korreliert (24). Genauer gesagt, besitzt die CXCL10-Expression eine hohe Relevanz für die Einwanderung von CD8+-T-Zellen sowie weiteren Immunzellen in das Tumorgewebe (24). Dies kann seine Bedeutung für die Wirksamkeit einer Immuntherapie beim Melanom erklären (24). CXCL10 kann auf Lymphknotenendothel exprimiert werden und scheint auch durch dendritische Zellen umfassend gebildet zu werden. CXCL10 bindet an den CXCR3-Rezeptor, welcher von aktivierten CD8-positiven zytotoxischen T-Zellen exprimiert wird. Ein Zusammenhang mit einer (lymphogenen) Metastasierung und deren Ansprechen auf eine Systemtherapie wird hierbei diskutiert (24). Höhere CXCL10-Spiegel im Melanomgewebe scheinen mit einem reduzierten Tumorwachstum, einer vermehrten Einwanderung von CD8+-T-Zellen und einem besseren Immuncheckpoint-Inhibitor-Ansprechen assoziiert zu sein (24). In einem Mausmodell konnte gezeigt werden, dass bei einem Knock-out des zu CXCL10 zugehörigen Rezeptors CXCR3 die Anzahl der CD8+-T-Zellen signifikant geringer war, und dass diese Mäuse nicht auf eine anti-PD-1-Antikörpertherapie angesprochen haben (25). CXCL10 könnte daher ggf. als Prädiktor für das Ansprechen auf eine Checkpoint-

Inhibitor-Therapie nützlich sein (24). Die Rolle von CXCL10 im Serum und im Wächterlymphknoten als prognostische Faktoren für eine Tumorprogression bei Melanompatienten im Stadium II und III wurde bisher jedoch noch nicht untersucht.

Immunzellmarker CD20, CD45 und CD68

CD20 ist ein B-Zell-Marker, welcher an der Oberfläche von B-Lymphozyten lokalisiert ist (26). Mit diesem gelingt insbesondere die Identifizierung von Lymphfollikeln, in denen die B-Zellen besonders dicht vorliegen. Im Rahmen einer Melanomerkrankung können B-Zellen in Lymphknoten sowohl pro-tumorale als auch anti-tumorale Funktionen übernehmen und dadurch entweder eine effektive Immunabwehr fördern oder immunsuppressiv wirken (27). Insbesondere in frühen Stadien wird vermutet, dass B-Lymphozyten das Fortschreiten eines Melanoms beeinflussen können (27). Im Vergleich zu gesunden Personen konnte gezeigt werden, dass Melanompatienten eine erhöhte Anzahl CD20-positiver Zellen im Sentinellymphknoten aufweisen (28). Dies wird als Hinweis auf eine verstärkte Aktivität, Aktivierung und Einwanderung von B-Zellen infolge des Melanoms interpretiert. Darüber hinaus scheinen B-Zellen zur lymphatischen Metastasierung des Melanoms beizutragen. So konnte in einem Mausexperiment gezeigt werden, dass Lymphknotenmetastasen nicht auftreten, wenn Mäuse B-Zell-defizient waren (29). Lymphfollikel in der Nähe von Tumorgewebe bei Patienten mit positivem Lymphknotenmetastasennachweis scheinen zudem größer und weniger gut abgrenzbar zu sein (27). Die Aktivierung von B-Zell-Follikeln scheint daher Tumorwachstum und Metastasierung innerhalb der Lymphknoten zu beeinflussen (27). Bei CD45 handelt es sich um einen Biomarker, welcher als Oberflächenprotein von sämtlichen Leukozyten exprimiert wird. Daher wird dieser Marker in lymphatischen Geweben wie Lymphknoten ubiquitär exprimiert (30). Therien et al. konnten bei Untersuchungen zeigen, dass Patienten mit Tumorinvasion in einem Lymphknoten tendenziell weniger CD45-positive Zellen aufweisen (25). Ein weiterer Grund für eine mögliche Relevanz von CD45 für die Prognose beim malignen Melanom ist die Tatsache, dass CXCL10 nachgewiesenermaßen von CD45-positiven Zellen exprimiert wird, wodurch sich zwischen diesen beiden Biomarkern eine relevante Assoziation ergibt. Reschke et al. berichteten, dass im Durchschnitt 58% aller CD45-positiven Zellen in Melanommetastasen CXCL10-RNA-Transkripte produzierten (24). Auch scheint CD45, ähnlich wie CXCL10, mit dem therapeutischen Ansprechen und somit auch mit dem Outcome in Verbindung zu stehen. So verfügten Patienten, welche auf eine Immuncheckpoint-Inhibitor-Therapie ansprachen, im Durchschnitt über mehr CD45-positive Zellen in Melanommetastasen als die Non-Responder (24).

CD68 stellt ein Oberflächenmolekül dar, welches von Makrophagen exprimiert wird. Insbesondere subkapsuläre Makrophagen scheinen in von Metastasierung betroffenen Sentinellymphknoten von Patienten mit Melanom erhöht zu sein (31). CD68-positive Makrophagen können

eine Tumorzellinvasion durch Melanomzellen begünstigen (31). Zudem ist bekannt, dass Patienten, die auf eine Immuncheckpoint-Inhibitor-Therapie ansprechen, eine höhere CXCL10-Expression der intratumoralen Makrophagen aufweisen (32,33).

Kollagen I

Bei Kollagen I-Fasern handelt es sich um die in der EZM am häufigsten vorkommenden Proteinfasern. Diese sind für Aufbau und Struktur von Bindegewebe und EZM von besonderer Signifikanz (34). In Verbindung mit anderen Molekülen in der EZM wie HAPLN1 und Hyaluron wird eine Strukturbildung gewährleistet (35). Ein Einfluss auf eine potenzielle Metastasierung durch Strukturveränderung und –minderung, ähnlich wie bei HAPLN1 ist hier denkbar. Kollagen I nimmt dabei vor allem eine fibrilläre Struktur ein, welche durch die Pikrosiriusrot-Färbung in Verbindung mit der Polarisationsmikroskopie sichtbar gemacht werden kann (36). Für Kollagen I wird eine antitumorale Rolle durch Bildung einer mechanischen Barriere diskutiert (35).

S100B

Der Tumormarker S100 calcium-binding protein b (S100B) bezeichnet ein Protein, welches sehr stark von einem Großteil der malignen Melanome exprimiert wird (37,38). Analysen haben gezeigt, dass die Serumspiegel von S100B mit der Tumorlast korrelieren und eine Erniedrigung der Spiegel eine Remission der Melanomerkrankung anzeigen kann (37,39). Es wird insbesondere in der Therapiekontrolle und im Follow-up metastasierter Stadium IV-Melanome eingesetzt, jedoch auch als Indikator für eine Fernmetastasierung in frühen Melanomstadien. Ob eine Korrelation von S100B mit Prognose und Überleben in Stadium II und III-Melanompatienten vorliegt, ist jedoch noch unklar (37,40).

Laktatdehydrogenase und CRP

Die Laktatdehydrogenase (LDH) im Serum korreliert ebenfalls mit der Tumorlast und steigt bei einer zunehmenden Tumorlast an. Sie wird als prognostischer und prädiktiver Prognosefaktor bei Melanompatienten im Stadium IV eingesetzt. (37,41,42). Für niedrigere Tumorstadien ist der Nutzen in Hinblick auf eine prognostische Abschätzung ebenfalls noch unklar. Das C-reaktive Protein (CRP) wurde an unserer Klinik bereits auf seine prognostische Bedeutung im Stadium III untersucht, wo eine Erhöhung des CRP-Wertes eine ungünstigere Prognose anzeigt (43). Im Stadium II-Melanom ist seine Bedeutung weniger gut untersucht.

Glukose

Für die Nüchtern-Glukose wurde die Hypothese aufgestellt, dass durch einen zunehmenden Energiebedarf von Malignomzellen diese auf vermehrte Glukose angewiesen sind, weswegen eine tumorassoziierte Erhöhung der Glukosespiegel möglicherweise auf eine erhöhte Tumormast und somit auf eine bevorstehende oder bereits vorliegende Progression und damit auf eine schlechtere Prognose hindeuten könnten (44). Der gesteigerte Verbrauch von Glukose durch Malignomzellen im Vergleich zu gesunden Zellen ist bereits seit längerem als Warburg-Effekt bekannt (45). Die Bedeutung des Nüchtern-Glukosespiegels insbesondere im Stadium II und sein potenzieller Nutzen als prädiktiver Marker für eine Tumorprogression sind noch ungeklärt.

2.3. Schematischer Lymphknotenaufbau und Lokalisation der untersuchten Biomarker

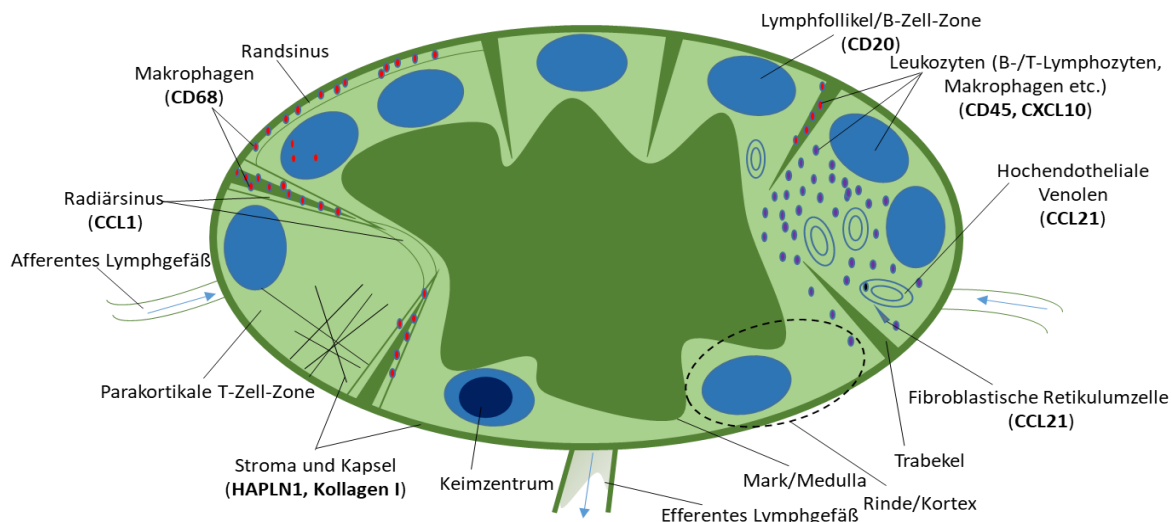


Abb. 1: Darstellung eines schematischen Lymphknotens und der histologischen Lokalisation der untersuchten Biomarker (adaptiert nach Welsch et al. (34)).

Der Lymphknoten ist von einer Kapsel umhüllt, aus welcher bindegewebige Trabekel ins Innere ziehen. Beide bestehen aus straffem Bindegewebe aus Typ-I-Kollagen, in welchem auch HAPLN1 eingelagert wird (13, 34). Im Inneren des Lymphknotens befindet sich ein netzartiges Bindegewebe, in welchem sich Lymphozyten befinden. Im peripheren, kapselnahen Lymphknoten sind die Lymphozyten dichter beieinander gruppiert, weswegen man hier von der Rinde (Kortex) spricht. Diese besteht aus Follikeln mit CD20-positiven B-Zellen sowie der parakortikalen T-Zell-Zone (Parakortex) (34). Weiter zentral befindet sich unscharf abgegrenzt das Mark (Medulla). Durch den gesamten Lymphknoten hindurch ziehen sich Lymphbahnen (Lymphsinus), über welche durch die afferenten Lymphgefäße Lymphe, und potenziell auch Metastasen, in den Lymphknoten gelangen können (34). Dort findet die Expression von CCL1 statt (20). Man unterscheidet Randsinus (entlang der Kapsel) von Radiärsinus (entlang Trab-

ekeln). Die Lymphsinus sind von Endothel ausgekleidet. Neben T- und B-Zellen sind zahlreiche andere Immunzellen im Lymphknoten beschrieben worden. Hierzu gehören vor allem CD68-positive Makrophagen, welche in den Lymphfollikeln und entlang der Trabekel und Lymphsinus anzutreffen sind (34).

Neben Lymphgefäßen finden sich auch Blutgefäße im Lymphknoten. Relevant sind hier insbesondere die hochendothelialen Venolen im Parakortex, durch welche Lymphozyten aus dem Blut in den Lymphknoten einwandern können. In den hochendothelialen Venolen, wie auch fibroblastischen Retikulumzellen im Paracortex wird CCL21 exprimiert (12). Aufgrund der Eigenschaft aller Leukozyten, CD45 zu exprimieren, ist dieses als Pan-Leukozytenmarker ubiquitär im Lymphknoten anzutreffen (34). Das Chemokin CXCL10 wird ebenfalls von CD45-positiven Zellen exprimiert (20).

2.4. Fragestellungen und Ziel der Arbeit

Wir untersuchten im Rahmen dieser Arbeit im ersten Teil Serumproben von Patienten mit malignem Melanom im Stadium II, bei denen eine Wächterlymphknotenbiopsie an der Klinik für Dermatologie und Venerologie der Uniklinik Köln erfolgt ist, die aber zum Zeitpunkt der Biopsie keine lokoregionäre Metastasierung aufwiesen (negative SLND). Folgende Zytokine im Serum wurden mittels ELISA bestimmt: HAPLN1, CCL21, CXCL10 und CCL1. Als Kontrolle wurden IL-6 und IL-4 als bekannte prognostisch relevante Zytokine bestimmt und ihre prognostische Aussagekraft hinsichtlich der Tumorprogression mit der der anderen erhobenen Zytokine verglichen. Ziel war es zu überprüfen, ob die Serum-Parameter bereits vor einer klinisch nachweisbaren Metastasierung angestiegen sind, oder bereits bei Erstdiagnose/SLND des Melanoms erhöht waren und somit als Marker für eine Progression nutzbar sind. Hier sollten solche Faktoren untersucht werden, die bereits in der Literatur als prognostisch relevante gewebeassoziierte Faktoren, jedoch nicht als Serumfaktoren in diesem Kontext beschrieben waren. Neben Unterschieden in der Patientenkohorte mit und ohne spätere Metastasierung wollten wir evaluieren, ob Unterschiede in der Expression dieser Faktoren zwischen Patienten mit einer primär lymphogenen Metastasierung und einer primär viszeralen Metastasierung vorliegen. Die Zeitpunkte der SLND, der Organmetastasierung und des lokoregionären lymphogenen Progresses wurden bei den serologischen Analysen getrennt betrachtet.

Zudem wurden die routinemäßig bestimmten Laborparameter S100B, Glukose, LDH und CRP gesammelt und die Werte der einzelnen Subgruppen miteinander verglichen.

Von allen Patienten wurden klinische Daten, welche zur Prognose der Melanomerkrankung beitragen können, erhoben. Hierzu zählen Alter, Geschlecht, Tumordicke und Ulzerationsstatus des Primärmelanoms, Typ des Primärmelanoms, das AJCC-Stadium, das Auftreten einer Progression im Rahmen einer lokoregionären oder Organmetastasierung, welche Organsys-

teme im Falle einer Progression betroffen waren, die Durchführung einer adjuvanten Systemtherapie, das Todesdatum und das Datum des letzten Patientenkontakts. Neben den aufgelisteten Parametern wurden routinemäßig erhobene Laborparameter wie S100B, CRP, LDH und die Nüchtern-Glucose zum Zeitpunkt der Sentinellymphknoten-Biopsie der einzelnen Gruppen und Stadien herausgesucht und miteinander auf signifikante Unterschiede verglichen. Ebenfalls wurden diese mit dem Überleben der Patienten korreliert. Neben der gezielten Evaluation dieser Zytokine im Serum als prognostische Parameter für eine Tumorprogression wurden im zweiten Teil dieser Arbeit die Biomarker HAPLN1, CCL21, CXCL10 sowie die Moleküle CD20, CD45 und CD68 ergänzend auf FFPE-Material der Sentinellymphknoten mithilfe von immunhistochemischen Färbungen analysiert, um zu überprüfen, ob die Expression der Moleküle im Gewebe bereits eine spätere Tumorprogression voraussagen kann. Darüber hinaus wurde eine Pikrosiriusrot-Färbung zur Darstellung von Kollagen I als wichtigen Marker der EZM durchgeführt. Diese Färbung stellt fibrilläres Kollagen dar, welches vor allem durch Kollagen I repräsentiert wird (32).

Bei den immunhistochemischen Untersuchungen lag das Hauptinteresse insbesondere darauf, Differenzen zum einen zwischen den Patienten mit und ohne Tumorprogression aufzuweisen, und zum anderen Unterschiede in der Expression zwischen den Stadien II und III zu untersuchen. Des Weiteren wurde das fernmetastasenfreie Überleben sowie das Gesamtüberleben der Patienten bestimmt, um dieses mit den immunhistochemisch gemessenen Biomarkern zu korrelieren. Insgesamt sollte damit eine Aussage hinsichtlich des prädiktiven Potenzials der Marker für eine Progression des Melanoms getroffen werden.

3. Material und Methoden

3.1. Patientenkollektiv, Datenerhebung und Einschlusskriterien

Im Vorfeld der Untersuchungen wurden für die Patienten Einschlusskriterien definiert. Eingeschlossene Patienten mussten ein histologisch gesichertes Malignes Melanom im AJCC-Stadium II oder III aufweisen. Weiterhin durfte, bis auf eine Therapie mit Interferon-alpha, keine adjuvante Systemtherapie durchgeführt worden sein, um therapeutische Einflüsse auf den Erkrankungsverlauf auszuschließen. Von den Patienten musste ein dokumentiertes Follow-up vorliegen, um ihren Verlauf einschätzen zu können. Des Weiteren wurde als Einschlusskriterium vorausgesetzt, dass die Patienten eine Sentinel-Lymphknotenbiopsie mit negativem oder positivem Ergebnis erhalten haben und das Lymphknotengewebe an unserer Klinik vorlag.

Diese Patienten wurden dann entsprechend ihrer Stadien-Einteilung in zwei Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe umfasste 96 Patienten im Stadium II, von denen 52 im Verlauf keine Progression zeigten. Unter diesen Patienten hatten 29 ein ulzeriertes Melanom und 23 ein nicht ulzeriertes Melanom bei Diagnosestellung. Des Weiteren wurden 44 Patienten einge-

schlossen, die im Follow-up eine lymphogene oder hämatogene Metastasierung ihres Melanoms entwickelten. Die zweite Gruppe bestand aus 34 Patienten im Stadium III, von denen 13 keine Metastasierung im Follow-up aufwiesen und 21 eine weitere Progression zeigten.

Von den 96 Patienten im Stadium II wurden Seren zum Zeitpunkt der Erstdiagnose und der Metastasierung ausgewählt, aus denen bei 44 Patienten die ausgewählten Biomarker mittels ELISA serologisch quantifiziert wurden. Da bei allen Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose und im Rahmen der weiteren Nachsorge regelmäßig eine Bestimmung von S100B im Serum erfolgt, wurden die restlichen Seren dieser Patienten zu diesen Zeitpunkten in unserer Biobank kryokonserviert. Die Patienten hatten hierzu im Rahmen der BIOMASOTA-Aufklärung ihr Einverständnis gegeben.

Von insgesamt 74 Patienten aus beiden Stadien wurden Lymphknoten (immun-)histochemisch untersucht. Einschlusskriterium hierfür war ein dokumentiertes Follow-up von mindestens ca. 60 Monaten, um möglichst sicher eine Progression bestätigen oder ausschließen zu können. Diese wurden in vier Gruppen unterteilt, die sich jeweils durch ihr Ausgangsstadium und die Metastasierung im Follow-up unterschieden. Für jede der vier Untergruppen wurde eine Patientenzahl von n=20 angestrebt. Allerdings zeigte ein Großteil der Patienten im Stadium III im Verlauf einen Progress, so dass für die Gruppe der Patienten im Stadium III ohne Progress unter Anwendung unserer Einschlusskriterien nur 13 geeignete Patienten identifiziert werden konnten. Darüber hinaus wurden für die 74 Patienten, deren Lymphknoten in die immunhistochemischen Untersuchungen eingeschlossen wurden, das fernmetastasenfreie Überleben und das Gesamtüberleben mit den Ergebnissen der Auswertungen der Untersuchungen korreliert. Von allen 130 Patienten wurden zusätzlich klinische Daten und klinisch-chemische Parameter zusammengetragen und analysiert und das fernmetastasenfreie Überleben sowie das Gesamtüberleben mit den recherchierten klinisch-chemischen Laborwerten korreliert. Einen Überblick über das Studiendesign gibt Abbildung 2.

Ethikvotum und BioMaSOTA-Einwilligung

Sämtliche Patienten, deren Daten in dieser Studie mit einbezogen wurden, haben im Vorfeld in die freiwillige BioMaSOTA-Erklärung (Biologische Material Sammlung zur Optimierung Therapeutischer Ansätze) eingewilligt und diese unterschrieben. Dabei können klinische Daten sowie Biomaterialien, die im Rahmen des Klinikaufenthaltes entnommen wurden, für die medizinische Forschung verwendet werden. Ein Ethikvotum der Ethikkommission Köln für diese Studie liegt vor (EK 23-1421).

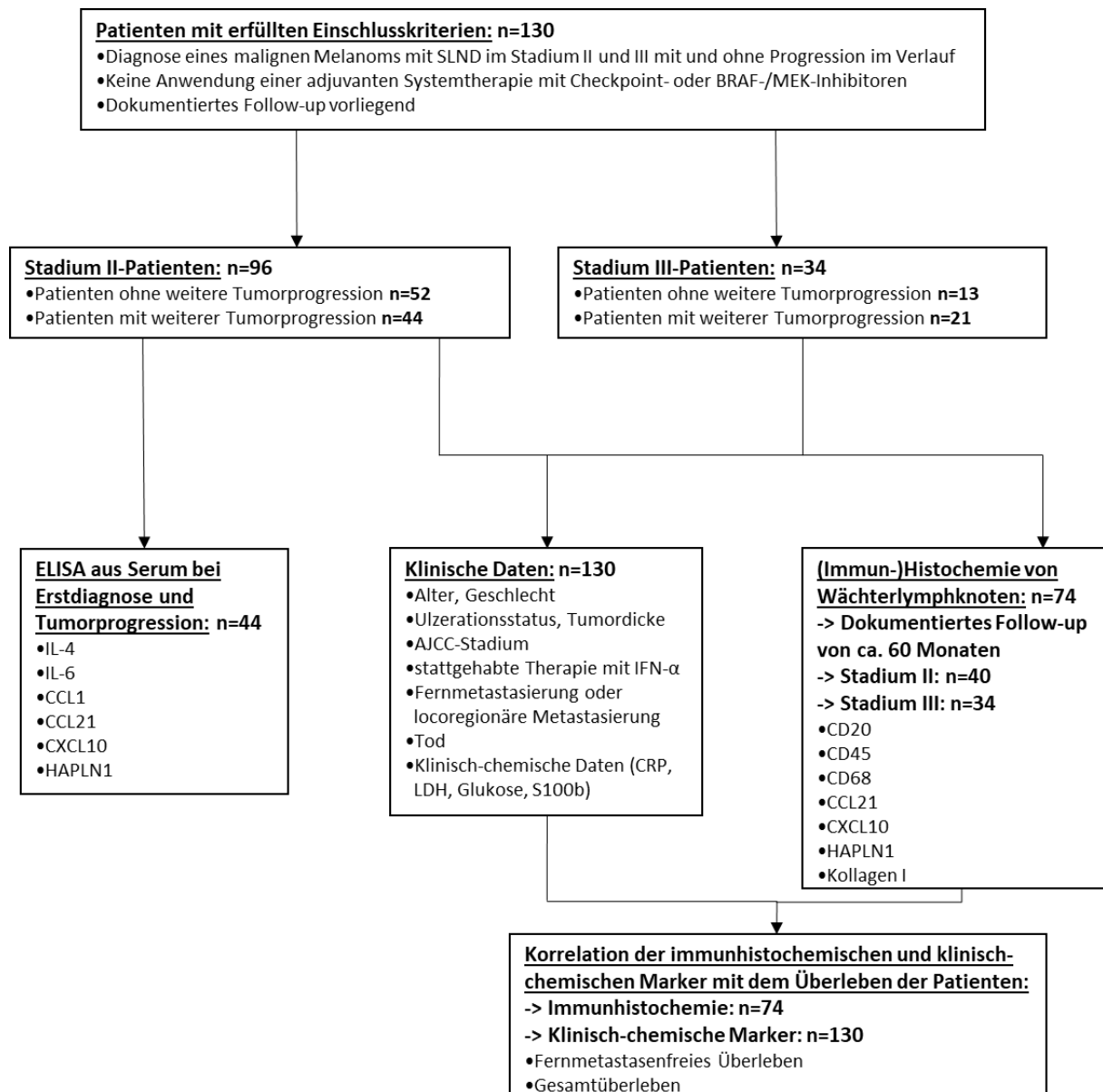


Abb. 2: Flussdiagramm mit dem Studiendesign.

Für den Zugang zu Patientendaten wurde ich als Promotionsstudent in der Klinik für Dermatologie und Venerologie der Uniklinik Köln eingestellt. Damit besteht eine Schweigepflicht über patientenbezogene Daten. Identitäts- und tumorspezifische Charakteristika wurden in einer Exceltabelle dokumentiert, auf die nur Frau Univ.-Prof. Dr. med. Cindy Franklin und ich zurückgreifen können. Bei der Arbeit handelt es sich um eine Kooperationsarbeit zwischen Frau Univ.-Prof. Dr. med. Cindy Franklin aus der Klinik für Dermatologie und Venerologie der Uniklinik Köln sowie Frau Dr. rer. nat. Paola Zigrino aus dem Tumorbiologielabor der Klinik für Dermatologie und Venerologie der Uniklinik Köln.

3.2. Methoden

3.2.1. Enzyme linked immunosorbent Assay (ELISA)

Der Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) stellt ein Messverfahren dar, bei dem eine quantitative Bestimmung der Konzentration eines Antigens innerhalb einer Probe, zum Beispiel einer Serumprobe, durchgeführt werden kann. Dies erfolgt antikörpervermittelt sowie unter der Zugabe eines Enzyms oder Farbstoffes, der die festgestellte Menge farblich kenntlich macht. Dabei wird grundsätzlich zwischen einem direkten, einem indirekten, einem kompetitiven und einem Sandwich-ELISA unterschieden. Die einzelnen Reaktionsschritte sowie die Reihenfolge und genaue Interaktion der genutzten Antikörper, Antigene und weiteren Reagenzien unterscheiden sich bei diesen Verfahren. Nach der jeweiligen Durchführung des experimentellen Protokolls erfolgt eine kolorimetrische Messung mit einer jeweils vorgegebenen Wellenlänge (46).

Im Rahmen unserer Forschungsarbeiten nutzten wir indirekte ELISA, bei welchen zusätzlich ein Sekundärantikörper genutzt wird (46). Die Experimente wurden gemäß einem allgemeinen Arbeitsschema durchgeführt, welches sich am jeweiligen Versuchsprotokoll der einzelnen ELISA-Kits orientierte. Zunächst wurde zur Kalibrierung beziehungsweise zur Schaffung einer Standardkurve ein Standard angesetzt, welcher in einer jeweils vorgegebenen Verdünnungsreihe auf unterschiedliche Konzentrationen verdünnt wurde und in die ersten acht Felder der Mikrotiterplatten eingegeben wurde (s. Anleitungen der jeweiligen ELISA-Kits). Im Anschluss wurden die übrigen Felder mit den zu untersuchenden Seren befüllt. Dies erfolgte, entweder in unverdünnter Form oder gemäß der empfohlenen Verdünnung des jeweiligen Protokolls in zweifacher Ausführung. Die Inkubation der Mikrotiter-Platten erfolgte bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von 2,5 bis 3 Stunden. Im Anschluss wurden die Felder mit einer vorgegebenen Waschlösung, je nach Protokoll, drei- bis viermal gewaschen. Um etwaige nicht gebundene Rückstände zu beseitigen, wurde die Platte in jedem Durchgang gründlich ausgeschüttelt und auf Papiertüchern ausgelegt, um eine komplette Beseitigung der Flüssigkeitsrückstände zu ermöglichen. Im Anschluss wurde auf sämtliche Felder ein Biotinkonjugat aufgetragen und eine erneute jeweils vorgeschriebene Inkubationszeit eingehalten. Nach einer wiederholten Waschung und Entleerung der Platte wurde eine vorbereitete Streptavidin-Horseradish-Peroxidase (HRP)-Lösung in die einzelnen Felder pipettiert und wiederum inkubiert. Im Anschluss wurde eine erneute Waschung und Leerung der Platte durchgeführt und darauf folgend ein Tetramethylbenzidin (TMB)-Substrat in die jeweiligen Felder pipettiert. Die darauffolgende Blaufärbung der jeweiligen Lösungen wurde dann von einer 30-minütigen Inkubationszeit im Dunkeln bei Raumtemperatur und einer leichten konstanten Bewegung der Platten begleitet. Im letzten Schritt wurde eine den ELISA-Kits beigegebene Stopp-Lösung zugegeben und die kolorimetrische Messung bei einer Wellenlänge von 450 nm unmittelbar durchgeführt.

Nach der Absorptionsmessung der einzelnen Felder wurde für die beiden Messwerte, die jeweils einem Patienten zugeordnet waren, der Mittelwert berechnet. Dieser Mittelwert wurde dann in Relation zu der Standardkurve gesetzt und durch eine Umrechnung des photometrischen Wertes in die jeweilige Proteinkonzentration des gemessenen Markers berechnet. In der Konsequenz resultiert für jeden Patienten bzw. jede Probe ein individueller Wert der jeweiligen vorhandenen Konzentration des jeweils gemessenen serologischen Markers.

Für die Auswertung der einzelnen Subgruppen nach Metastasierungsweg und Zeitpunkt (Erstdiagnose bzw. Zeitpunkt Tumorprogression) untereinander wurde auf den Mann-Whitney-Test zurückgegriffen. Hierbei wurde eine nicht-gleichverteilte Gesamtmenge der einzelnen Messwerte angenommen. Der p-Wert wurde berechnet und eine Signifikanzanalyse durchgeführt. Des Weiteren wurden die einzelnen Messwerte ebenfalls nach Alter (<65 Jahre bzw. ≥65 Jahre) und Geschlecht ausgewertet.

Zu Beginn des Projektes wurden, die für die Untersuchungen geplanten Serumproben der eingeschlossenen Patienten in der Serum-Datenbank der Dermatologie der Uniklinik Köln herausgesucht. Sämtliche Serumproben der Patienten zu den jeweils unterschiedlichen Abnahmezeitpunkten verfügen in der Datenbank über eine eigene Serumnummer. Für jeden Patienten im Stadium II wurde eine Serumprobe mitsamt ihrer Nummer zum Zeitpunkt der Erstdiagnose der Melanomerkrankung herausgesucht. Diese sollte, idealerweise, am Tag der Sentinellymphknotenbiopsie oder kurz vorher abgenommen worden sein. Des Weiteren wurden für die Patienten, bei denen im weiteren Verlauf eine Metastasierung des malignen Melanoms auftrat, Serennummern identifiziert, die zum Zeitpunkt der klinischen Progression der Tumor Erkrankung abgenommen wurden. Für die gesammelten Probennummern konnte im Großteil der Fälle eine zugehörige Serumprobe in den Serumlagern gefunden werden, wodurch sich initial eine Gesamtserenanzahl von ca. 120 Seren ergeben hat. Hierfür wurden zwei verschiedene Serumlager der Dermatologie der Uniklinik Köln durchsucht. Zum einen das Serumlager der dermatologischen Klinik im Diagnostik- und Therapiezentrum der Uniklinik Köln, zum anderen das Serumlager des dermatologischen Forschungslabors der Uniklinik Köln. Letzteres beinhaltet neuere Seren, welche in den letzten vergangenen Jahren abgenommen und der Sammlung hinzugefügt wurden.

Nachdem die jeweiligen Serumproben herausgesucht wurden, wurden diese schonend auf Eis gestellt aufgetaut, um daraus Proben für unsere Untersuchungen zu aliquotieren. Hierbei entnahmen wir, soweit es die noch vorhandene Serummenge ermöglichte, in der Regel eine Probenmenge von ca. 800 Mikroliter für unsere Untersuchungen.

Im Rahmen der Gruppenzuordnung wurden die Proben in vier Gruppen eingeteilt. Dabei wurde unterschieden, ob die Patienten im Verlauf eine Tumorprogression entwickelten. Zusätzlich zu

der Einteilung wurde für die späteren Untersuchungen unterschieden, ob die Patienten der Gruppen mit einer Metastasierung im Verlauf zunächst eine lymphogene Metastasierung aufwiesen, oder aber, ob die Erstmanifestation der Progression bereits eine viszerale Fernmetastasierung darstellte.

Aufgrund begrenzter Kapazitäten bei den serologischen Experimenten wurden insbesondere Patienten mit einem ulzerierten, aber nicht metastasierten Melanom mit Patienten mit einer Progression im Verlauf untersucht und verglichen. Aufgrund eines höheren Metastasierungsrisikos bei einem positiven Ulzerationsstatus sind Unterschiede zwischen Patienten mit und ohne Progression interessant (4). Die untersuchten Seren der Patienten, die im späteren Verlauf eine Progression entwickelten, stammten sowohl von Patienten mit, als auch von Patienten ohne eine Ulzeration des Primärmelanoms.

Für die Gruppe der Patienten mit einer späteren Progression wurde zudem die Zeit von der Durchführung der SLND bis zum Auftreten der Progression der Melanomerkrankung in Monaten berechnet (= fernmetastasenfreies Überleben). Zusätzlich dazu wurde für alle Patienten, welche im Verlauf zunächst eine lymphatische Metastasierung gezeigt hatten, die Zeit zwischen der Sentinellymphknotenbiopsie und dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen in Monaten berechnet, beziehungsweise bei einem Patienten bis zum Auftreten von kutanen Melanommetastasen (Zeit bis zum ersten lokoregionären Rezidiv).

Für den ersten ELISA, der sich auf IL-4 bezog, wurden die Patienten in zwei Gruppen unterteilt: eine Gruppe bestehend aus Patienten mit ulzeriertem, jedoch im Verlauf nicht metastasiertem Melanom, und eine Gruppe aus Patienten, bei denen im Verlauf Metastasen aufgetreten waren. In den folgenden serologischen Experimenten änderten wir diese Aufteilung. Dafür wählten wir bestimmte Patienten aus, die sowohl lymphogen als auch hämatogen metastasiert waren, jeweils zum Zeitpunkt der Sentinel-Lymphknotenbiopsie (SLND) und zum Zeitpunkt des Fortschreitens des malignen Melanoms. Zusätzlich verwendeten wir das Serum nicht metastasierter Patienten für vergleichende Untersuchungen. Dabei konzentrierten wir uns insbesondere auf Patienten mit ulzerierten, jedoch nicht metastasierten Melanomen. Diese Untergruppe erschien uns besonders interessant für unsere experimentellen Untersuchungen, da ulzerierte Melanome in der Regel als Hochrisiko-Melanome gelten und ein deutlich erhöhtes Risiko für spätere Metastasen aufweisen (47). Wir hielten daher an diesen Gruppierungen für alle weiteren ELISA-Untersuchungen unserer Arbeit fest (Für Vorgehensweise und nähere Informationen s. Versuchsanleitungen der ELISAs, Kapitel 2.3.1.)

3.2.2. Immunhistochemie und Histochemie

Die Immunhistochemie stellt eine Untersuchungsmethode dar, in deren Rahmen innerhalb eines vorher präparierten Gewebes spezifische biochemische Moleküle und Biomarker qualitativ und quantitativ dargestellt werden können. Dabei können Antigene visualisiert werden, die sich in unterschiedlichen Kompartimenten innerhalb des Gewebes und der Zellen befinden, zum Beispiel in der Zellmembran oder im Zellkern. Dies ermöglicht sowohl die Identifizierung von strukturellen als auch von funktionellen Markern, beispielhaft bei Zellproliferationsmarkern (48). Verwendet werden können kryobehandelte Gewebe sowie formalinfixierte und paraffin-eingebettete Gewebe (48).

Bei den ausgewählten und verwendeten Lymphknoten handelte es sich ausschließlich um paraffineingebettete Lymphknoten, von denen im Vorfeld der Färbungen an einem Mikrotom mehrere Schnitte pro Lymphknoten durchgeführt wurden. Vor dem Beginn der Hauptfärbungen wurden Hämatoxylin-Eosin-Färbungen von allen Lymphknoten angefertigt, um eine Aussage bezüglich der Struktur und des Vorhandenseins intakten lymphogenen Gewebes treffen zu können. Aufgrund teils zu wenig vorhandenen Restgewebes wurden 10 der ursprünglich ausgewählten Lymphknoten und Patienten ausselektiert und mit möglichst vergleichbaren Patienten und deren Lymphknoten ersetzt.

Im Anschluss wurden mit den ausgewählten Antikörpern Probefärbungen nach einem laborinternen Protokoll des dermatologischen Forschungslabors der Uniklinik Köln durchgeführt. In Folge dessen wurde ein für sämtliche Lymphknotenfärbungen einheitliches Vorgehen bestimmt.

Im Vorfeld der Färbungen wurde eine Deparaffinisierung der Lymphknotenschnitte vorgenommen. Dies wurde mit einer absteigenden Alkoholreihe durchgeführt, angefangen mit einer mindestens 20-minütigen Vorbehandlung in Xylol. Darauffolgend wurde ein Bad in einer 100%-Alkohollösung durchgeführt, folgend mit einer 96%- und anschließend einer 75%-Alkohollösung. Zum Schluss erfolgte eine endgültige Rehydrierung in destilliertem Wasser.

Im nächsten Schritt erfolgte eine Demaskierung mit einem Citratpuffer, kurz TRS (Target Retrieval Solution). Dieser wies einen pH von 6 auf und wurde mitsamt der zu färbenden Schnitte in einer Mikrowelle 5x aufgekocht und anschließend ca. 20 Min. bei Raumtemperatur abgekühlt. Danach wurde der Citratpuffer durch einen Tris-Puffer, kurz TBS (Tris-buffered saline) ersetzt, welcher Trisaminomethan und Natriumchlorid enthält.

Folgend wurden die einzelnen Schnitte, welche in der Regel in zweifacher Ausführung auf einem Objektträger liegen, mit einem lipidhaltigen Stift („PEP-Pen“ von Merck) umkreist, um eine Vermischung der jeweils unterschiedlichen Antikörper zu vermeiden sowie eine geringere zu applizierende Menge ebendieser zu ermöglichen. Im Anschluss daran erfolgte eine Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen mit einer 10%-haltigen bovinen Serumalbumin-

Lösung in TBS. Es folgte daraufhin eine 30-minütige Inkubationszeit. Anschließend wurden die Schnitte ohne eine Spülung abgeklopft und die Primärantikörper-Lösungen auf die Schnitte appliziert. Diese wurden über Nacht bei einer Temperatur von 4°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Schnitte dann zweimal für kurze Zeit in einer TBS-Lösung gewaschen. Daran anschließend wurden die Schnitte mittels einer alkalischen Phosphatase-konjugierten sekundären Antikörper bearbeitet. Hierfür wurde zunächst für 15 Minuten ein biotinylierter sekundärer Antikörper aufgetragen, welcher gegen Rabbit- und Mouse-Primärantikörper gerichtet ist. Nach der Inkubationszeit erfolgte eine dreifache Spülung der Schnitte in einer TBS-Lösung. Danach wurde eine alkalische Phosphatase-Lösung appliziert, welche ebenfalls für 15 Minuten aufgetragen wurde. Daran anschließend erfolgte erneut eine dreimalige Spülung in TBS.

Im nächsten Schritt wurde die in dem Projekt verwendete Chromogen-Entwicklungslösung vorbereitet. Dabei handelt es sich um einen Naphthol-Indikator. Dieser wurde nach der Vorbereitung appliziert und je nach der zu beobachtenden Farbenwicklung maximal 20 Minuten inkubiert. Die Färbereaktion wurde durch eine Spülung mit destilliertem Wasser beendet.

Nach Beendigung des Färbeprozesses erfolgte eine Gegenfärbung der immunhistochemisch gefärbten Schnitte mit einer Hämatoxylin-Färbung, um eine Kernfärbung durchzuführen. Nach einer etwa 5-minütigen Färbung wurden die Schnitte unter warmem Leitungswasser abgespült, um ein Nachbläuen der Zellkerne zu ermöglichen. Im letzten Schritt erfolgte eine Eindeckung der Schnitte mit einem wässrigen Eindeckmedium. Bei allen Färbungen wurde zusätzlich eine Negativkontrolle durchgeführt.

Im Rahmen des Projektes wurde ebenfalls als Ziel festgelegt, eine Pikrosiriusrotfärbung durchzuführen, um polarisationsmikroskopisch die Typ I-Kollagenfibrillen sichtbar zu machen und zwischen den unterschiedlichen Subgruppen zu vergleichen. Hierbei wurde, im Gegensatz zu den anderen Färbungen der einzelnen untersuchten Marker, keine immunhistochemische Färbung durchgeführt, sondern eine herkömmliche Färbung mit Pikrosiriusrot.

Für die Durchführung der Kollagenfärbung wurde auf ein laborinternes Färbeprotokoll der dermatologischen Laborabteilung an der Uniklinik Köln zurückgegriffen.

Zu Beginn wurden die Schnitte äquivalent zu dem Vorgehen bei den immunhistochemischen Färbungen der anderen Schnitte mit einer ansteigenden Alkoholreihe, beginnend mit einer Xylolbehandlung rehydriert und anschließend in destilliertes Wasser gelegt. Vor Beginn der Hauptfärbung erfolgte für ca. 5 Minuten eine Gegenfärbung mit einer Hämatoxylin-Lösung zur Kernanfärbung. Im Anschluss wurde eine einstündige Färbung in einer Pikrosiriusrot-Lösung durchgeführt. Nachdem diese abgeschlossen war, erfolgte gemäß Protokoll eine zweimalige

Spülung in 0,5%-haltigem Essigsäurewasser. Danach wurden die Schnitte abgeklopft und einer Redehydrierung zugeführt, um diese haltbar zu machen. Dabei wurden die betreffenden Objektträger 3x jeweils eine Minute in Isopropanol gebadet und anschließend je eine Minute in Xylol eingetaucht. Schlussendlich erfolgte eine lösungsmittelhaltige Eindeckung der Schnitte. Als Resultat der Färbung ergibt sich eine graubraune Kernfärbung, eine Rotfärbung des Kollagens, sowie eine Gelbfärbung des übrigen Gewebes (36).

Um nun die typische Fibrillenstruktur des Typ-I-Kollagens sichtbar zu machen, wurden die Schnitte zusätzlich zur klassischen Lichtmikroskopie mittels Polarisationsmikroskopie betrachtet, welche die Fibrillenstruktur sichtbar macht (36).

Sämtliche immunhistochemisch untersuchte Biomarker wurden in den ihnen zugeschriebenen Lymphknotenregionen untersucht und innerhalb dieser in die Bewertung eingezogen (s. Kapitel 1.2. und 1.3.).

3.2.3. Illustrierte (immun-)histochemische Expressionsscores

Für die vergleichende Auswertung der Lymphknoten wurden diese in vier Gruppen mit jeweils ca. 20 Patienten eingeteilt. Dabei handelt es sich um Patienten der Melanomstadien II und III, jeweils mit und ohne Krankheitsprogression im Verlauf. Die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen erfolgte nach einer visuellen qualitativen Bewertung der Ausprägung der Färbung und damit des Ausmaßes der Expression des jeweiligen Biomarkers. Hierfür wurde nach Durchsicht aller Lymphknotenschnitte eine numerische Skala mit repräsentativen Lymphknoten für die jeweiligen Marker erstellt. Dabei wurde jedem einzelnen Schnitt ein Zahlenwert zwischen 0 und 5 zugewiesen, welcher das Expressionslevel beschreiben soll. Dieser Expressionsscore wurde an die jeweilige Ausprägung der einzelnen Färbungen im Vergleich mit den anderen Lymphknoten der gleichen immunhistochemischen Färbung adaptiert. Hierbei wurde auf bestimmte färbungs- und expressionsspezifische Charakteristika Rücksicht genommen, beispielsweise ob eine Färbung eher dem Muster einer Einzelzell- oder einer Feldfärbung folgt. Der Wert 0 bezeichnet dabei im Allgemeinen eine nicht vorhandene Färbung, während der Wert 5 die maximal beobachtete Ausprägung der Färbung beschreibt. Es wurde festgelegt, dass in die Auswertung lediglich Färbungen im Bereich des Lymphknotenparenchyms einbezogen werden. Eventuell vorhandene Lymphknotenmetastasen wurden separat betrachtet. Stroma sowie Kapsel und anderes Bindegewebe wurden in dem Score lediglich für HAPLN1 und Kollagen mit einbezogen. Für den Makrophagen-Marker CD68 wurde zudem zusätzlich eine Auswertung speziell der subkapsulären Expression im Lymphknoten durchgeführt, da subkapsulären Sinusmakrophagen oft eine besondere Bedeutung bei Tumorerkrankungen zugeschrieben wird.

Die Auswertung der Kollagen-Färbung in den Lymphknoten wurde anhand vier verschiedener Kriterien durchgeführt. Bei diesen Kriterien handelt es sich um die Färbungsintensität im Bereich der Kapsel, dem Vorhandensein einer fibrotischen Reaktion im Lymphknotenparenchym, sowie bei den Lymphknoten im Stadium III der Ausprägung einer metastasären Inkapsulation und dem Vorhandensein von Kollagen innerhalb des metastasären Melanomgewebes.

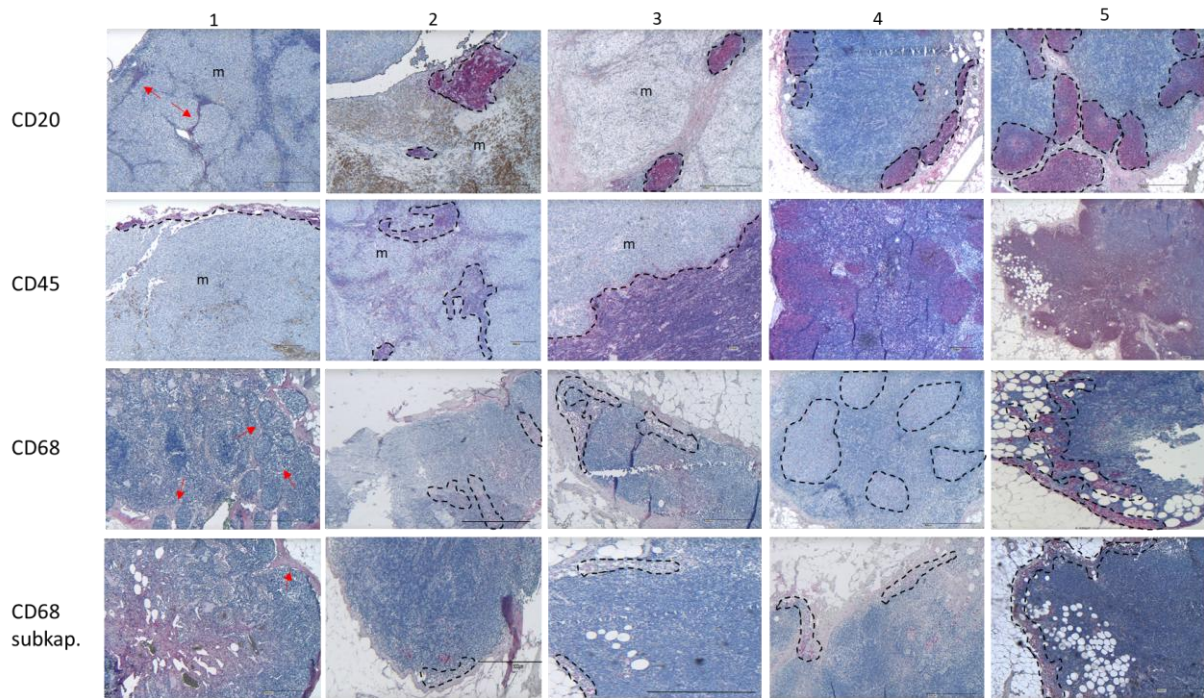


Abb. 3: Darstellung repräsentativer Scorebilder für die Expression der Marker CD20, CD45, CD68 allgemein und speziell im subkapsulären Lymphknotenbereich. Diese wurden anhand ihres Expressionsmusters im Vergleich mit den jeweils anderen Lymphknoten der gleichen Färbung in Relation zueinander gesetzt. Es wurde ein Scorewert von 1 (niedrigste Expression) bis 5 (höchste Expression) festgelegt. In die Wertung einbezogene Bereiche wurden durch Pfeile oder umrundete Flächen dargestellt. CD20 und CD68 in 50-facher Vergrößerung, CD45 in 25-facher Vergrößerung. m=Metastase.

Für den B-Zell-Marker CD20 wurde das gesamte Muster der Anfärbungen der aktivierten B-Zellen innerhalb der Lymphfollikel betrachtet. Bei einem Score von 5 wurde eine hohe Zahl kräftig gefärbter B-Zell-Follikel beobachtet, wohingegen bei einem Score von 1 eine fast vollständige Verdrängung CD20-positiver B-Zellen in Lymphfollikeln gesehen wurde. Ab einem Score von 3 und darunter wurde in der Regel eine deutliche Verdrängung durch Melanometastasen beobachtet, jedoch stellten sich die Follikel noch intakt dar, wohingegen ein Score von 2 eine deutliche Zerstörung der Follikelstruktur zeigte. Bei einem Score von 1 waren nur noch rudimentäre Follikelreste zu erkennen. Für CD45 als Panleukozytenmarker (30) wurde das Ausmaß der CD45-Expression im gesamten Lymphknoten und somit die räumliche Ausbreitung sowie eine ggf. durch Metastasierung oder andere Prozesse veränderte räumliche Ausbreitung betrachtet. Für den Marker CD68 wurde die Anzahl der CD68-positiven Makro-

phagen im Lymphknoten außerhalb von Tumorgewebe betrachtet, ähnlich für die spezifischere Anzahl der Makrophagen im Bereich unterhalb der Lymphknotenkapsel (s. Abbildung 3).

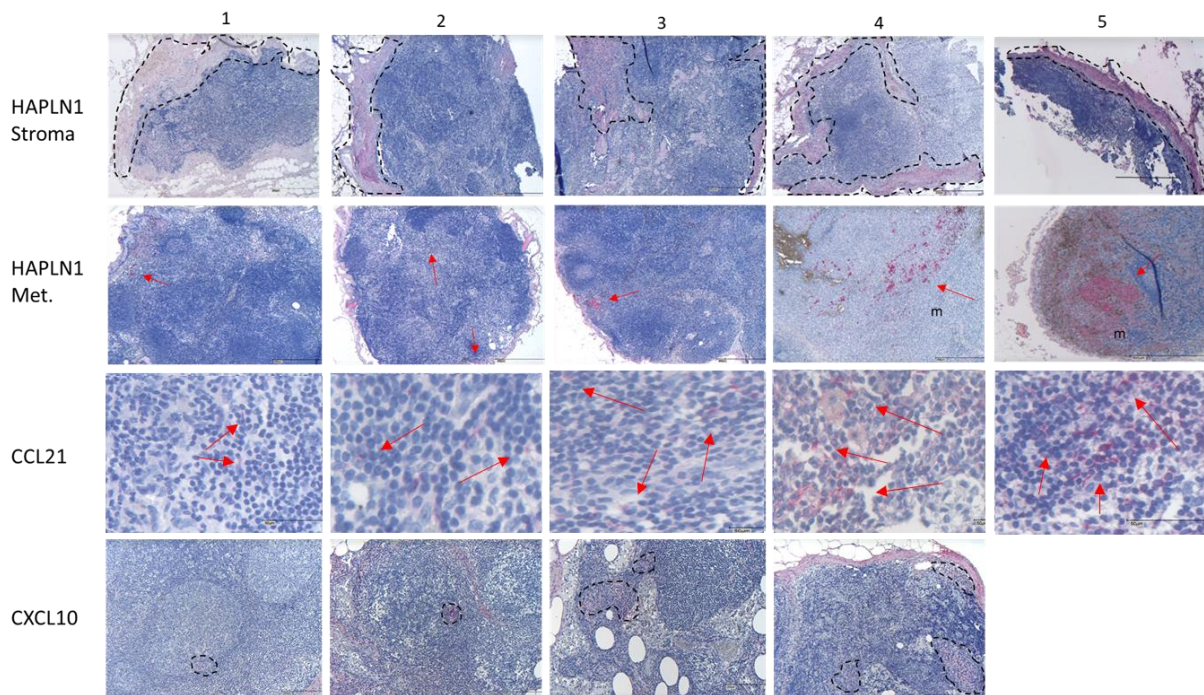


Abb. 4: Darstellung repräsentativer Scorebilder für die Expression von HAPLN1 (Stroma und Metastasen), CCL21 und CXCL10. Diese wurden anhand ihres Expressionsmusters im Vergleich mit den jeweils anderen Lymphknoten der gleichen Färbung in Relation zueinander gesetzt. Es wurde ein Scorewert von 1 (niedrigste Expression) bis 5 (höchste Expression) festgelegt. Beachte: Für CXCL10 wurde aufgrund der insgesamt relativ geringen Anfärbungen kein Scorewert 5 vergeben. In die Wertung einbezogene Bereiche wurden durch Pfeile oder umrandete Flächen dargestellt. HAPLN1 und CXCL10 in 50-facher, CCL21 in 400-facher Vergrößerung. m=Metastase.

Für die HAPLN1-Scores im Stroma wurde das räumliche Ausmaß (gefärbte Fläche) sowie die Stärke der Expression in die Bewertung mit einbezogen. Für die Auswertung in den Metastasen wurde neben dem räumlichen Gesamtmaß die Expressionsstärke mitberücksichtigt.

Bei dem CCL21-Scoring wurde die Anzahl der Single-Cell-Färbungen innerhalb des Lymphgewebes zur Auswertung herangezogen. Bei dem CXCL10-Score wurden das Ausmaß der Feldfärbungen, deren Fläche, Expressionsstärke und numerische Häufigkeit berücksichtigt. Der Score 1 beschrieb hierbei eine leichte einzelne Färbung, der Scorewert 2 eine stärkere einzelne Färbung, der Wert 3 mehrere leichte Färbungen und der Scorewert 4 mehrere großflächige Färbungen. Eine weitere Differenzierung zu einem Scorewert 5 für CXCL10 wurde nicht durchgeführt aufgrund einer insgesamt vergleichsweise schwachen Anfärbung und der fehlenden Möglichkeit einer weiteren Differenzierung der Nuancierung der Färbungen (s. Abbildung 4).

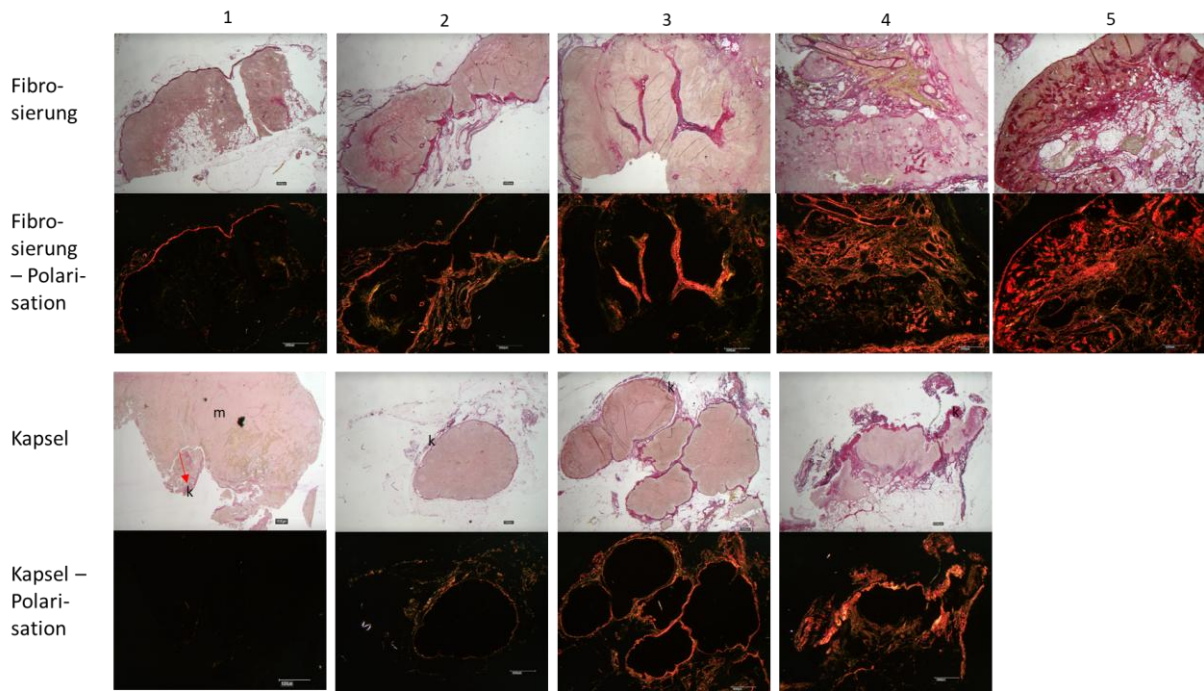


Abb. 5: Darstellung repräsentativer Scorebilder für die Kollagen-I-Expression. Diese wurden anhand ihres Expressionsmusters im Vergleich mit den jeweils anderen Lymphknoten der gleichen Färbung in Relation zueinander gesetzt. Es wurde ein Scorewert von 1 (niedrigste Expression) bis 5 (höchste Expression) festgelegt. Die Darstellung erfolgte jeweils lichtmikroskopisch (oben) und polarisationsmikroskopisch (unten) zur Darstellung der Kollagen-Fibrillen. Beachte: Für die Kategorie Lymphknotenkapsel wurde aufgrund des Abstufungsprofils der ausgewerteten Lymphknoten kein Scorewert 5 vergeben. Kollagenbilder in 12-facher Vergrößerung. m=Metastase, k=Kapsel

Für das Scoring der Kollagenausprägung wurde das Ausmaß der fibrotischen Reaktionen mit Typ I-Kollagen innerhalb des Lymphgewebes ausgewertet. Dabei wurde eine Fibrosierung durch Tumorgewebe ausgeschlossen. Der Wert 1 beinhaltet dabei eine leichte, kleinflächige Fibrose, wohingegen der Scorewert 2 eine etwas stärker ausgeprägte, aber räumlich weiterhin begrenzte Fibrose bezeichnet. Der Score 3 steht für eine deutliche Fibrosierung mit einer deutlich ausgeprägteren räumlichen Ausweitung. Der Punktwert 4 bezeichnet eine sehr starke Fibrose mit sehr flächiger Verteilung. Der Maximalwert 5 beschreibt eine stärkstmögliche Fibrose und eine beinahe komplette Verdrängung des Lymphknotenparenchyms (s. Abb. 5).

In Bezug auf die Erstellung des Scores für die Lymphknotenkapsel wurden die Ausprägung und Dicke beziehungsweise Expressionsstärke des Kollagen Typ I in der Lymphknotenkapsel bewertet. Ein Wert von 1 entspricht einer nur noch marginal erhaltenen Lymphknotenkapsel, zum Beispiel bei starker strukturell-räumlicher Verdrängung durch metastasäres Gewebe in den Lymphknoten. Bei einem Punktwert von 2 ist die Kapsel erhalten und größtenteils durchgängig, in der Polarisationsmikroskopie zeigen sich jedoch teilweise fehlende Signale. Der Score 3 beschreibt eine kräftige und durchgängige Kapsel. Bei dem Höchstscorewert von 4 liegt eine verdickte Kapsel mit Fibrosierungszeichen vor. Ein Score von 5 wurde aufgrund des angetroffenen Abstufungsprofils der untersuchten Lymphknotenkapseln nicht vergeben.

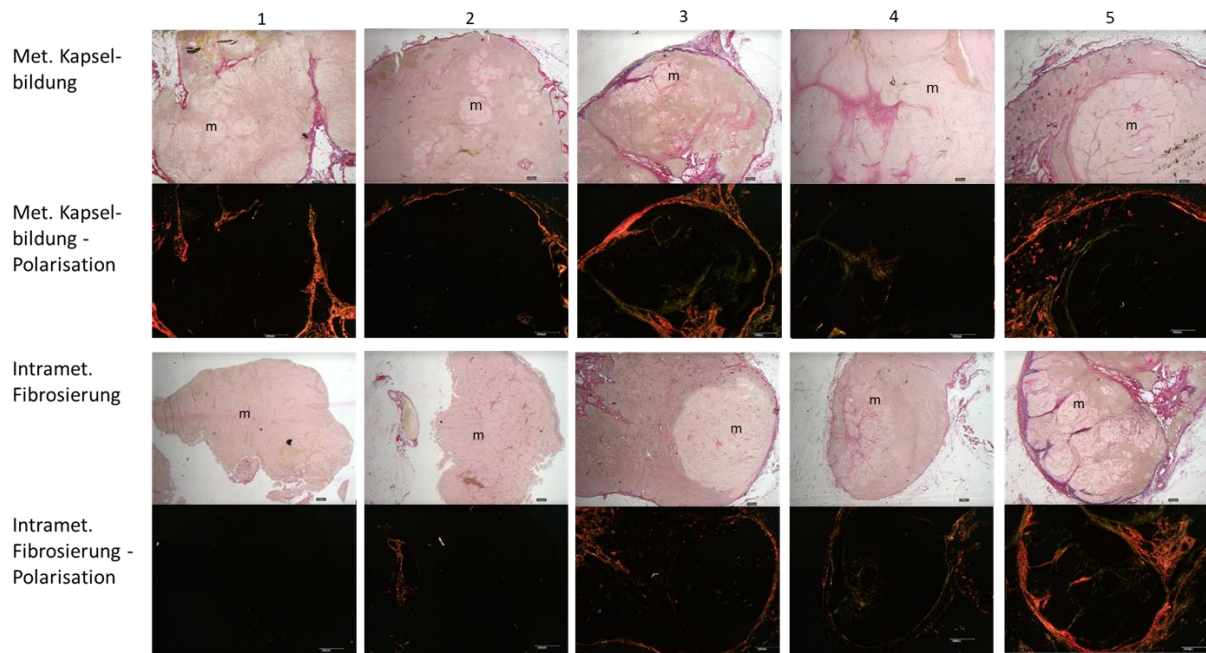


Abb. 6: Darstellung repräsentativer Scorebilder für die metastasäre Kollagen-I-Expression in Bezug auf die perimetastasäre Kapselbildung und intrametastasäre Fibrosierung. Diese wurden anhand ihres Expressionsmusters im Vergleich mit den jeweils anderen Lymphknoten der gleichen Färbung in Relation zueinander gesetzt. Es wurde ein Scorewert von 1 (niedrigste Expression) bis 5 (höchste Expression) festgelegt. Die Darstellung erfolgte jeweils lichtmikroskopisch (oben) und polarisationsmikroskopisch (unten) zur Darstellung der Kollagen-Fibrillen. Kollagenbilder in 12-facher Vergrößerung. m=Metastase, k=Kapsel

Bezüglich des Scores für die perimetastasäre Kapselbildung wurde festgelegt, dass die Kapsel eine Abtrennung zwischen metastasärem und lymphozytärem Gewebe darstellt, sowie, dass der Scorewert 1 eine marginale Metastasenkapsel beschreibt, der Wert 2 eine dünne Kapsel repräsentiert, welche lichtmikroskopisch gut sichtbar ist, in der Polarisationsmikroskopie jedoch ohne erkennbares Signal bleibt. Der Expressionsscore 3 beinhaltet Lymphknoten mit Metastasen mit kräftigerer Kapsel, und der Wert 4 eine noch kräftigere Kapsel. Bei einem Scorewert von 5 liegt eine sehr kräftige, die Metastase deutlich umspannende Kapsel vor.

Der Score der intrametastasären Fibrosierung teilt die Ausprägung der Expression von Typ-I-Kollagen innerhalb der Melanommetastasen der Stadium III-Lymphknoten ein. 1 bezeichnet dabei eine minimale Fibrosierung, 2 eine leichte Fibrosierung ohne Signal in der Polarisation, bei 3 findet sich eine deutliche Fibrosierung mit Signal in der Polarisationsmikroskopie. Der Scorewert 4 wird für eine noch stärkere Fibrosierung zugeteilt, und bei einem Scorewert = 5 liegt eine stärkstmöglich beobachtete Fibrosierung in den Metastasen vor (s. Abb. 6).

3.2.4. Statistische Analysen mittels SPSS und GraphPad und statistische Auswertung klinischer Daten

Für die statistische Analyse zur Identifikation signifikanter Unterschiede zwischen den Gruppen und den einzelnen Krankheitsstadien sowie der Entwicklung eines Krankheitsfortschrittes bei den immunhistochemischen und serologischen Untersuchungen wurde eine nicht-normalverteilte Ausprägung der Werte angenommen und auf den Mann-Whitney-Test zurückgegriffen. Diese Analysen wurden mit Hilfe des Programms GraphPad Prism® durchgeführt. Hierbei wurde bei einem p-Wert $<0,05$ von einem statistisch signifikanten Ergebnis ausgegangen. Weiterhin erfolgte dabei eine Abstufung der Wertigkeit eines statistisch signifikanten Ergebnisses, welche mit einer unterschiedlichen Anzahl von Sternchen (*) angegeben wurde. Ein p-Wert $<0,05$ ergab *, ein Wert $<0,01$ **, ein Wert $<0,001$ *** und ein p-Wert $<0,0001$ ****. Bei den ELISAs wurden statistisch-mathematische Ausreißer aus der Wertung und der grafischen Darstellung entfernt. Zur Identifikation statistischer Ausreißer bei den ELISAs wurde auf die automatische Outlier-Identifikation mittels Rout-Methode in GraphPad Prism® Version 10.0 zurückgegriffen. Die maximale False Discovery Rate (Q) wurde hierbei, durch GraphPad Prism® vorgeschlagen, auf 1% gesetzt.

Um Zusammenhänge zwischen den einzelnen untersuchten Biomarkern festzustellen, wurden die einzelnen ausgewerteten immunhistochemischen Biomarker statistisch mit den jeweils anderen angefärbten Biomarkern korreliert. Hierfür wurden die Marker und ihre jeweiligen Scorewerte mittels des Rang-Korrelations Koeffizienten nach Spearman miteinander korreliert. Dabei wurde eine nicht-normalverteilte Distribution der Scorewerte angenommen. Ebenfalls wurden dabei der P-Wert sowie das 95%-Konfidenzintervall bestimmt. Hierzu wurde ebenfalls das Statistikprogramm GraphPad Prism® genutzt.

Des Weiteren wurden die klinisch-chemischen Laborwerte unter Zunahme von GraphPad Prism® analysiert und bei einer nicht-normalverteilten Gesamtmenge mittels Mann-Whitney-Test auf statistisch signifikante Differenzen zwischen den einzelnen Patientengruppen untersucht. Bei der Darstellung der Laborwerte des C-reaktiven Proteins wurde labortestbedingt die Nachweisgrenze bei 3mg/l festgesetzt. Durch GraphPad Prism® identifizierte statistische Ausreißer wurden, ähnlich den ELISAs, mittels Rout-Methode aus der Wertung entfernt (s. oben). Die deskriptive Statistik wurde mittels numerisch-deskriptiver Analyse mit SPSS durchgeführt. Auch die Korrelation der erhobenen Werte mit dem fernmetastasenfreien und Gesamtüberleben wurde die Analyse in SPSS mit Hilfe von Kaplan-Meier-Kurven durchgeführt. Dargestellt wurde das kumulative Überleben in Relation zur Überlebenszeit in Monaten. Das fernmetastasenfreie und das Gesamtüberleben wurden nach der Höhe der Laborwerte stratifiziert. Hierbei wurden für die Laborwerte Cut-off-Werte festgelegt, die die Grenze zwischen niedrigen und hohen Werten darstellen sollten. Die Cut-off-Werte lagen für CRP bei 5mg/l, für LDH bei 250

U/l, für Serum-Glukose bei 100mg/dl und für S100B bei 0,1µg/l. Diese Cut-off-Werte wurden auf Grundlage mehrerer Quellen ausgewählt (49, 50).

Daneben wurde das Überleben entsprechend der Ergebnisse der immunhistochemischen Analysen stratifiziert. Im Rahmen der Kaplan-Meier-Analysen wurde der Log-Rank-Test zur Signifikanzbestimmung herangezogen. Um eine Korrelation zwischen den immunhistochemisch untersuchten möglichen Biomarkern und dem Überleben der Patienten festzustellen, wurde für jeden dieser Parameter ein individueller Cut-off-Wert festgelegt. Dieser sollte eine klare Unterscheidung zwischen niedriger und hoher Expression des jeweiligen Biomarkers ermöglichen. Für CD20 und CD45 wurden Scorewerte von 0-3 als niedrige Expression betrachtet, da diese Scorewerte in der Regel mit einer deutlich geringeren Markerexpression und einer ausgeprägten Lymphknotenmetastasierung einhergingen. Scorewerte von 4 - 5 wurden als hohe Expression eingestuft. Für CXCL10 wurden aufgrund einer insgesamt geringen Expression in den Färbungen die Werte 0 und 1 als niedrig und die Werte 2, 3 und 4 als hoch bewertet. Bei den anderen biochemischen Markern wurde eine niedrige Expression für die Scorewerte 0, 1 und 2 angenommen, während eine hohe Expression für die Scorewerte 3, 4 und 5 festgestellt wurde. Die Überlebenskorrelationen wurden sowohl für beide Stadien kombiniert als auch für jedes Stadium einzeln durchgeführt. Zur besseren Übersicht und aufgrund der Patientenanzahl wurden in den immunhistochemischen Grafiken kombinierte Überlebensdarstellungen beider Stadien verwendet. Bei signifikanten Ergebnissen innerhalb der einzelnen Stadien wurden diese ebenfalls grafisch dargestellt. Wenn möglich, wurde bei den Überlebensdarstellungen das mittlere und mediane Überleben berechnet und in der Arbeit angegeben. Liegt in einer untersuchten Gruppe im Beobachtungszeitraum der Kaplan-Meier-Schätzer über 50%, ist die mediane Überlebenszeit nicht bestimmbar.

3.3. Material

3.3.1. Verwendete Enzyme linked immunosorbent assays

Untersuchte Proteine	Verwendete ELISAs	Referenznummer
Interleukin-4	Abcam, Human IL-4 SimpleStep ELISA® Kit	ab215089
Interleukin-6	Invitrogen, Human IL-6 ELISA Kit	EH2IL6
CCL1	Sigma-Aldrich, Human I-309/CCL1 ELISA Kit	RAB0040
CCL21	Invitrogen, Human CCL21 (6Ckine) ELISA Kit	EHCCCL21
CXCL10	Invitrogen, Human IP-10 (CXCL10) ELISA Kit	KAC2361
HAPLN1	RayBiotech, Human HAPLN1 ELISA Kit	ELH-HAPLN1

3.3.2. Verwendete Antikörper für die Immunhistochemien

Art des Antikörpers	Verwendete Antikörper	Referenznummer
CD45-Antikörper	Dako, mouse anti human, 4°C, 1:100, pH 6	M0701
HAPLN1-Antikörper	Origene, rabbit anti human, -20°C, 1:100, pH 6	TA325115
CXCL10-Antikörper	Invitrogen, rabbit anti human, -20°C, 1:50, pH 6	10H11L3
CCL21-Antikörper	Sigma, rabbit anti human, -20°C, 1:500, pH 6	HPA051210
CD68-Antikörper	Dako, mouse anti human, 4°C, ready to use, pH 6	N1576
CD20(cy)-Antikörper	Dako, mouse anti human, 4°C, 1:300, pH 6	M0755
CXCL10-Antikörper	R&D Systems, mouse anti human, -20°C, 1:50, pH 6	MAB2662

3.3.3. Verwendete Arbeitsprogramme

Arbeitsprogramme	Arbeitsmethode
Microsoft Word 2016	Textverfassung
Microsoft Excel 2016	Datenauswertung und Datendarstellung
GraphPad Prism 7.0. und 10.0.	Datenauswertung und Grafikdarstellung
SPSS 29.0.	Datenauswertung und Grafikdarstellung
Microsoft PowerPoint 2016	Grafikdarstellung
Discus 5.0.6277	Fotoerstellung der histologischen Schnitte
Victor nivo	Photometrische Serumkonzentrationsbestimmung

3.3.4. Weitere verwendete Materialien

Materialien	Referenznummer
Fast Red Substrate Pack, BioGenex	HK182-5KE
Target Retrieval Solution Citrate pH 6, DakoCytomation	S2369
DCS DetectionLine Polylink Sekundäran-tikörper gebrauchsfertig, DCS Innovative Diagnostik-Systeme	LD340R050
DCS DetectionLine Alkalische Phospha-tase Label (AP) gebrauchsfertig, DCS In-novative Diagnostik-Systeme	AD33IR050
Bovine Serum Albumin cold ethanol fraction, pH 8,2, ≥ 96%, Sigma	A4503-50G
COP30.0.1.0 Cooling Plate, MEDITE	L20035870

Leica RM2255 Mikrotom, SN: 4946/07.2011	14050237960
Epredia Polysine Adhesion Microscope Slides White Tab Objektträger	32800AMNZ
Feather Microtome Blades N35 Type	-
Feather Microtome Blades C35 Type	-
Sartorius Arium pro®	-
Tris Buffered Saline (10x, pH 7,5); 50mmol Tris, 1,5mol NaCl - 60,5g Tris - 87,6g NaCl - 1000ml VE-Wasser	-
Tris (Trizue®base, Sigma)	T1503
NaCl (Roth)	3057.2
PerkinElmer VICTORNivo Multimode Plate Reader	HH35L1019032
Leica Lichtmikroskop DM4000B	263592
Gilson Pipetman 20µl, 100µl, 200µl	-
Eppendorf Research Pipette 0,5-10µl	-
VWR 8-Kanal-Multipette 20-200µl	-
Accu-jet® pro, Brand	03H84605
Pikrosirius red F3B, Firma ABC R Chemie	C.I. 35782
Haemalaun-Lsg., sauer nach Mayer, Wal- deck	2E-038
ImmuMount (Eindeckmedium) epredia	9990402
Xylol technisch CHEMSOLUTE	371.5000
Ethanol 96% vergällt Roth	T171.4
2-Propanol >99,9% Sigma-Aldrich	STBJ9607

4. Ergebnisse

4.1. Deskriptive Statistik aller eingeschlossenen Patienten

	Alle Patienten n=130 (100%)	Stadium II ohne Pro- gression n=52 (40%)	Stadium II mit Pro- gression n=44 (33,8%)	Stadium III ohne Pro- gression n=13 (10%)	Stadium III mit Pro- gression n=21 (16,2%)
Alter					
<65 Jahre	69 (53,1)	25 (48,1)	22 (50,0)	8 (61,5)	14 (66,7)
≥65 Jahre	61 (46,9)	27 (51,9)	22 (50,0)	5 (38,5)	7 (33,3)
Geschlecht					
Männlich	80 (61,5)	34 (65,4)	27 (61,4)	8 (61,5)	11 (52,4)
Weiblich	50 (38,5)	18 (34,6)	17 (38,6)	5 (38,5)	10 (47,6)
Ulzeration					
Nein	54 (41,5)	24 (46,2)	12 (27,3)	9 (69,2)	9 (42,9)
Ja	76 (58,5)	28 (53,8)	32 (72,7)	4 (30,8)	12 (57,1)
Tumordicke					
≤ 1mm	4 (5,4)	0 (0,0)	1 (2,3)		3 (14,3)
>1 - ≤ 2mm	36 (22,3)	18 (34,6)	6 (13,6)	2 (15,4)	10 (47,6)
>2 - ≤ 4mm	44 (33,8)	10 (19,2)	20 (45,5)	8 (61,5)	6 (28,6)
> 4mm	31 (23,8)	9 (17,3)	17 (38,6)	3 (23,1)	2 (9,5)
unbekannt	15 (11,5)	15 (28,8)			
Primärmelanom					
SSM	31 (23,8)	12 (23,1)	10 (22,7)	1 (7,7)	8 (38,1)
NM	44 (33,8)	12 (23,1)	15 (34,1)	8 (61,5)	9 (42,9)
ALM	4 (3,1)	2 (3,8)	2 (4,5)	0 (0,0)	0 (0,0)
LMM	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
unbekannt	42 (32,3)	22 (42,3)	14 (31,8)	3 (23,1)	3 (14,3)
Polypoides Melanom	5 (3,8)	2 (3,8)	2 (4,5)	1 (7,7)	0 (0,0)
andere	4 (3,1)	2(3,8)	1 (2,3)		1 (4,8)
Stadium (AJCC)					
IB	27 (20,8)	24 (46,2)	3 (6,8)		
IIA	4 (3,1)	0 (0,0)	4 (9,1)		
IIB	35 (26,9)	10 (19,2)	25 (56,8)		
IIC	18 (13,8)	6 (11,5)	12 (27,3)		
IIIA	0 (0,0)	0 (0,0)			
IIIB	17 (13,1)	0 (0,0)		7 (53,8)	10 (47,6)
IIIC	16 (12,3)	0 (0,0)		6 (46,2)	10 (47,6)
unbekannt	13 (10,0)	12 (23,1)			1 (4,8)
Metastasierungsweg					
Keine Metastasierung	52 (40,0)	52 (100)	0 (0,0)	(0,0)	0 (0,0)
Primär hämatogen	31 (23,8)	0 (0,0)	31 (70,5)	0 (0,0)	0 (0,0)
Primär lymphogen	47 (36,2)	0 (0,0)	13 (29,5)	13 (100)	21 (100)
Adjuvante Therapie					
Keine	125 (96,2)	52 (100)	44 (100)	9 (69,2)	20 (95,2)
Interferon-alpha	5 (3,8)	0 (0,0)	0 (0,0)	4 (30,8)	1 (4,8)
Fernmetastasierung					
Nein	71 (54,6)	52 (100)	5 (11,4)	13 (100)	1 (4,8)
Ja	59 (45,4)	0 (0,0)	39 (88,6)	0 (0,0)	20 (95,2)
Progression					
Nein	65 (50,0)	54 (100)	0 (0,0)	13 (100)	0 (0,0)
Ja	65 (50,0)	0 (0,0)	44 (100)	0 (0,0)	21 (100)
Tod					
Nein	104 (80,0)	52 (100)	29 (65,9)	13 (100)	11 (52,4)
Ja	26 (20,0)	0 (0,0)	15 (34,1)	0 (0,0)	10 (47,6)

Fernmetastasen- freies Überleben Median in Monaten (95% KI)	48,7 (38,53 - 47,47)	61 (54,52 – 63,48)	33 (27,83 – 42,17)	59 (47,59 – 72,41)	8,8 (6,78 – 21,22)
Gesamtüberleben Median in Monaten (95% KI)	59 (51,66 -60,34)	61 (54,52 – 63,48)	57 (52,54 – 71,46)	59 (47,59 – 72,41)	32,66 (26,25 – 41,75)

Tab. 1: Tumor- und Patientencharakteristika der in dieser Studie eingeschlossenen Patienten.

Im Rahmen der deskriptiven Statistik wurden verschiedene relevante klinische Daten der in dieser Studie eingeschlossenen Patienten zusammengetragen und nach den jeweiligen Gruppen aufgeteilt (s. Tabelle 1). Dabei handelt es sich um das Alter der Patienten mit dem Cut-off-Wert 65 Jahre, das Geschlecht, den Ulzerationsstatus des malignen Melanoms, die Tumordicke nach Breslow, die Subtypen des Primärmelanoms sowie das AJCC-Stadium. Des Weiteren wurden die folgenden Parameter ausgewertet: der Metastasierungsweg, ob eine adjuvante Therapie mit Interferon-alpha durchgeführt wurde, eine mögliche stattgehabte Fernmetastasierung, Progression oder Tod sowie die Dauer des fernmetastasenfreien Überlebens und des Gesamtüberlebens. Die Ergebnisse wurden jeweils als medianer Wert mit dem 95%-Konfidenzintervall präsentiert. Im Rahmen serologischer und klinisch-chemischer Untersuchungen wurden die Patienten in vier Gruppen eingeteilt. Gruppe 1 umfasst Patienten im initialen Stadium II ohne spätere Progression. Gruppe 2 beinhaltet initial im Stadium II befindliche Patienten mit einer Progression im Follow-up. Die Gruppe 3 umfasst Patienten, die zum Zeitpunkt der ersten Untersuchung das Stadium III erreicht hatten, jedoch ohne weitere Progression. Die Gruppe 4 beinhaltet alle Patienten, die im weiteren Verlauf eine Tumorprogression ihres Malignoms zu verzeichnen hatten und zum Zeitpunkt der Erstdiagnose das Stadium III erreicht hatten.

4.2. Deskriptive Statistik der Patientenkohorten der immunhistochemischen Untersuchungen

	Alle Patienten n=74 (100%)	Stadium II ohne Pro- gression n=20 (27%)	Stadium II mit Pro- gression n=20 (27%)	Stadium III ohne Pro- gression n=13 (17,6%)	Stadium III mit Progres- sion n=21 (28,4%)
Alter					
<65 Jahre	42 (56,8)	10 (50,0)	10 (50,0)	8 (61,5)	14 (66,7)
≥65 Jahre	32 (43,2)	10 (50,0)	10 (50,0)	5 (38,5)	7 (33,3)
Geschlecht					
Männlich	43 (58,1)	10 (50,0)	14 (70,0)	8 (61,5)	11 (52,4)
Weiblich	31 (41,9)	10 (50,0)	6 (30,0)	5 (38,5)	10 (47,6)
Ulzeration					
Nein	34 (45,9)	11 (55,0)	5 (25,0)	9 (69,2)	9 (42,9)
Ja	40 (54,1)	9 (45,0)	15 (75,0)	4 (30,8)	12 (57,1)
Tumordicke					
≤ 1mm	4 (5,4)	0 (0,0)	1 (5,0)		3 (14,3)
>1 - ≤ 2mm	25 (33,8)	11 (55,0)	2 (10,0)	2 (15,4)	10 (47,6)
>2 - ≤ 4mm	29 (39,2)	5 (25,0)	10 (50,0)	8 (61,5)	6 (28,6)
> 4mm	14 (18,9)	2 (10,0)	7 (35,0)	3 (23,1)	2 (9,5)
unbekannt	2 (2,7)	2 (10,0)			
Primärmelanom					
SSM	20 (27,0)	6 (30,0)	5 (25,0)	1 (7,7)	8 (38,1)
NM	33 (44,6)	8 (40,0)	8 (40,0)	8 (61,5)	9 (42,9)
ALM	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
LMM	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
unbekannt	19 (25,7)	6 (30,0)	7 (35,0)	3 (23,1)	3 (14,3)
Polypoides Melanom	1 (1,4)			1 (7,7)	0 (0,0)
andere	1 (1,4)				1 (4,8)
Stadium (AJCC)					
IB	13 (17,6)	11 (55,0)	2 (10,0)		
IIA	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)		
IIB	14 (18,9)	4 (20,0)	10 (50,0)		
IIC	8 (10,8)	3 (15,0)	5 (25,0)		
IIIA	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)		
IIIB	17 (23,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	7 (53,8)	10 (47,6)
IIIC	16 (21,6)	0 (0,0)	0 (0,0)	6 (46,2)	10 (47,6)
unbekannt	6 (8,1)	2 (10,0)	3 (15,0)		1 (7,7)
Metastasierungs- weg					
Keine Metastasie- rung	20 (27,0)	20 (100)	0 (0,0)	(0,0)	0 (0,0)
Primär hämatogen	12 (16,2)	0 (0,0)	12 (60,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Primär lymphogen	42 (56,8)	0 (0,0)	8 (40,0)	13 (100)	21 (100)
Adjuvante Therapie					
Keine	69 (93,2)	20 (100)	20 (100)	9 (69,2)	20 (95,2)
Interferon-alpha	5 (6,8)	0 (0,0)	0 (0,0)	4 (30,8)	1 (4,8)
Fernmetastasie- rung					
Nein	37 (50,0)	20 (100)	3 (15,0)	13 (100)	1 (4,8)
Ja	37 (50,0)	0 (0,0)	17 (85,0)	0 (0,0)	20 (95,2)
Progression					
Nein	33 (44,6)	20 (100)	0 (0,0)	13 (100)	0 (0,0)
Ja	41 (55,4)	0 (0,0)	20 (100)	0 (0,0)	21 (100)

Tod					
Nein	58 (78,4)	20 (100)	14 (70,0)	13 (100)	11 (52,4)
Ja	16 (21,6)	0 (0,0)	6 (30,0)	0 (0,0)	10 (47,6)
Fernmetastasen- freies Überleben					
Median in Monaten (95% KI)	51,2 (35,02 - 46,98)	63 (54,90 – 67,10)	39,5 (26,70 – 45,30)	59 (47,59 – 72,41)	8,8 (6,78 – 21,22)
Gesamtüberleben					
Median in Monaten (95% KI)	58 (48,00 – 57,97)	63 (54,90 – 67,10)	60 (49,83 – 70,17)	59 (47,59 – 72,41)	32,66 (26,25 – 41,75)

Tab. 2: Tumor- und Patientencharakteristika der Patienten, deren Lymphknotengewebe immunhistochemisch untersucht wurde.

Für die deskriptive Statistik der Patienten, an deren Wächterlymphknoten wir immunhistochemische Untersuchungen durchführten, wurden relevante klinische Daten der Patienten zusammengetragen (s. Tabelle 2). In diesem Kontext sind ebenfalls das Alter der Patienten mit dem Cut-off-Wert 65 Jahre, das Geschlecht, der Ulzerationsstatus des malignen Melanoms, die Tumordicke nach Breslow, die Subtypen des Primärmelanoms, das AJCC-Stadium, der primäre Metastasierungsweg, die Durchführung einer adjuvanten Therapie mit Interferon-alpha, eine stattgehabte Fernmetastasierung, Progress oder Tod sowie die Dauer des fernmetastasenfreien und des Gesamtüberlebens zu nennen. Diese Daten wurden jeweils als medianer Wert sowie mit dem 95%-Konfidenzintervall dargestellt. Im Rahmen der immunhistochemischen Untersuchungen wurden die Patienten in dieselben vier Gruppen eingeteilt wie bei der Analyse aller in die Studie eingeschlossenen Patienten (s. Tabelle 1).

4.3. Fernmetastasenfreies und Gesamtüberleben der Patienten der immunhistochemischen Untersuchungen

Die im Stadium II befindlichen Patienten wiesen ein mittleres und medianes fernmetastasenfreies Überleben von 59,97 beziehungsweise 67 Monaten auf, wohingegen dieses im Stadium III lediglich 45,31 und 17,08 Monate betrug. Kombiniert für beide Stadien liegt der Mittelwert bei 56,52 und der Median bei 57 Monaten (s. Abbildung 7). Bei Betrachtung des Gesamtüberlebens zeigt sich, dass die Patienten im Stadium II ein mittleres Überleben von 90,41 Monaten aufweisen, während das mittlere Überleben im Stadium III lediglich 68,81 Monate beträgt. Kombiniert für beide Stadien liegt das mittlere Gesamtüberleben bei 83,08 Monaten (s. Abbildung 8).

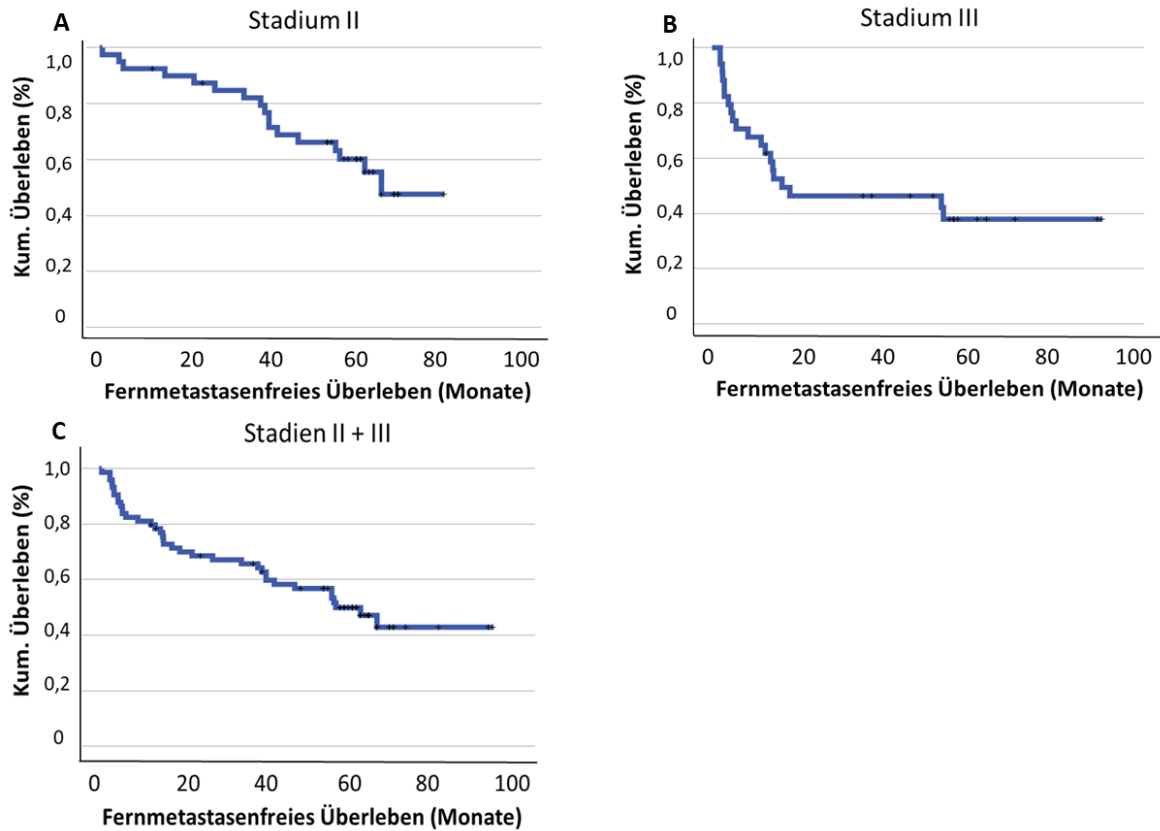


Abb. 7: Darstellung des fernmetastasenfreien Überlebens in Monaten. A: Stadium II. B: Stadium III. C: Stadien II + III.

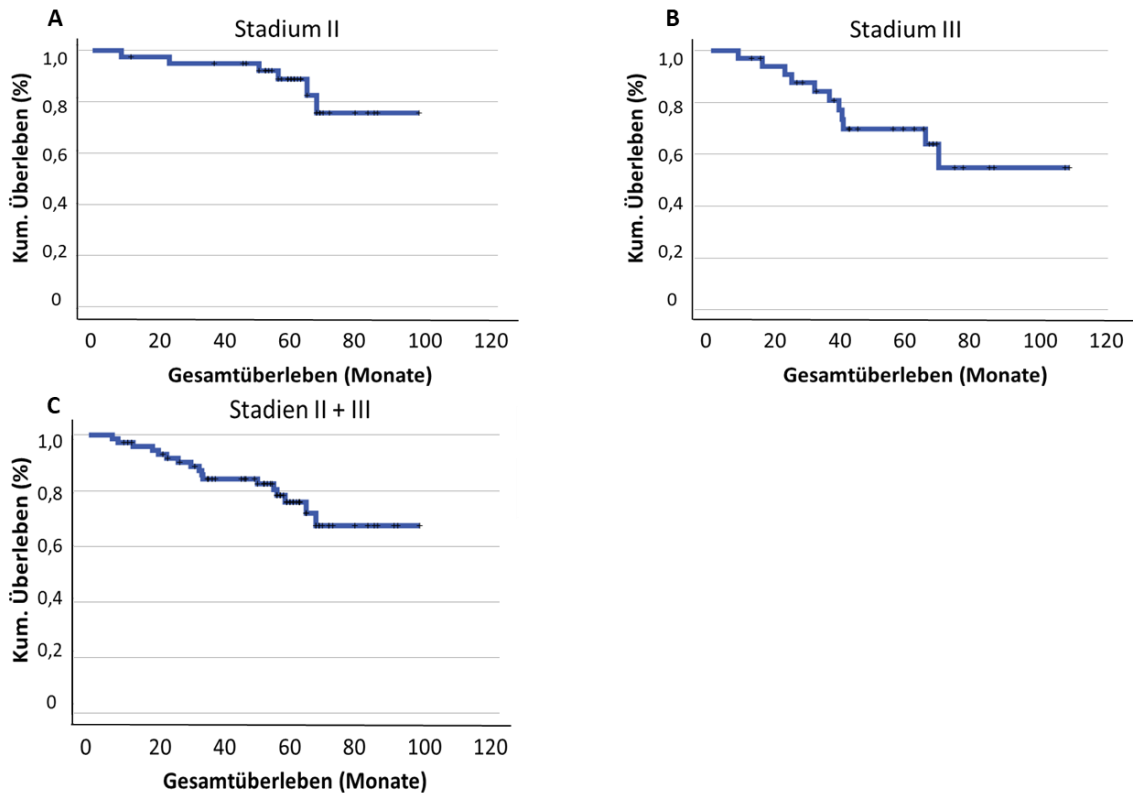


Abb. 8: Darstellung des Gesamtüberlebens in Monaten. A: Stadium II. B: Stadium III. C: Stadien II + III.

4.4. Serologische Untersuchungen von Melanompatienten im Stadium II

4.4.1. Interleukin-4

Die Standardreihe, gemäß den Richtlinien des Versuchsprotokolls der Herstellerfirma durchgeführt, zeigte einen kontinuierlichen und proportionalen Anstieg des Messwerts mit steigender Konzentration. Bei der Kalibrierung der Interleukin-4-Messungen ergaben sich jedoch fast ausschließlich negative Messwerte nach Anpassung der Messkonzentrationen anhand der erstellten Standardreihe. Es wurde lediglich eine Untersuchung und Analyse der Messwerte nach Metastasierungsstatus durchgeführt, wobei mediane Werte von -3,386 pg/ml ($n = 14$) für Patienten mit Metastasen und -2,721 pg/ml ($n = 14$) für Patienten ohne Metastasen festgestellt wurden, was nicht plausibel erscheint. Insgesamt war diese Analyse somit nicht auswertbar. Dennoch wurden bei der Analyse zwei positive Messwerte beobachtet. Ein Wert stach besonders hervor: Ein Patient, der 1946 geboren wurde, zeigte eine berechnete IL-4-Konzentration von etwa 20 pg/ml. Im Gegensatz zu den meisten anderen untersuchten Patienten befand sich dieser Patient zu Beginn bereits im AJCC-Stadium IIC, während die meisten anderen Patienten zu diesem Zeitpunkt im Stadium IIB klassifiziert wurden. Zusätzlich erfolgte die Diagnose der Metastasierung bei diesem Patienten nur wenige Monate nach der Erstdiagnose. Die beiden positiven Messwerte wären mathematisch betrachtet Ausreißer in einer statistischen Signifikanzanalyse gewesen. Da die Messung jedoch insgesamt nicht auswertbar war, wurde keine statistische Signifikanzanalyse durchgeführt. Bei dieser Messung wurde im Gegensatz zu den anderen nur der Zeitpunkt der Erstdiagnose zur Auswahl der Seren berücksichtigt. Insgesamt war diese Analyse somit nicht auswertbar.

4.4.2. Interleukin-6

Die Interleukin-6-Messung im Serum erbrachte für die Melanompatienten ohne weitere Progression einen Medianwert von 3,519pg/ml bei $n = 9$. Für die Melanome mit weiterer Progression wurde eine mediane Serumkonzentration von 3,593pg/ml bei $n = 8$ für die lymphogen bzw. 3,667pg/ml von $n = 9$ für die hämatogen metastasierten Melanome gemessen. Zum Progressionszeitpunkt erbrachte die Messung Medianwerte von 5,342pg/ml ($n = 7$, lymphogener Progress) bzw. 4,750pg/ml ($n = 9$, hämatogener Progress). In Bezug auf das Alter ergaben sich mediane Serumkonzentrationen von 4,307pg/ml ($n = 18$) für die <65-Jährigen und 3,913pg/ml ($n = 23$) für die Patienten ≥ 65 Jahre. Aufgetrennt nach Geschlecht wurde ein medianer Wert von 4,012pg/ml für die Männer sowie 4,533pg/ml für die Frauen festgestellt, inkludiert waren dabei 27 männliche und 15 weibliche Personen (s. Abb. 9). Im statistischen Vergleich zwischen lymphogen und hämatogen metastasierten Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose ($p = 0,8367$) ergab sich kein signifikanter Unterschied. Die lymphogen metastasierten Patienten zeigten auch keinen signifikanten Unterschied in Bezug auf die IL-6-Konzentration zu den Zeitpunkten der Erstdiagnose und der Progression ($p = 0,4145$).

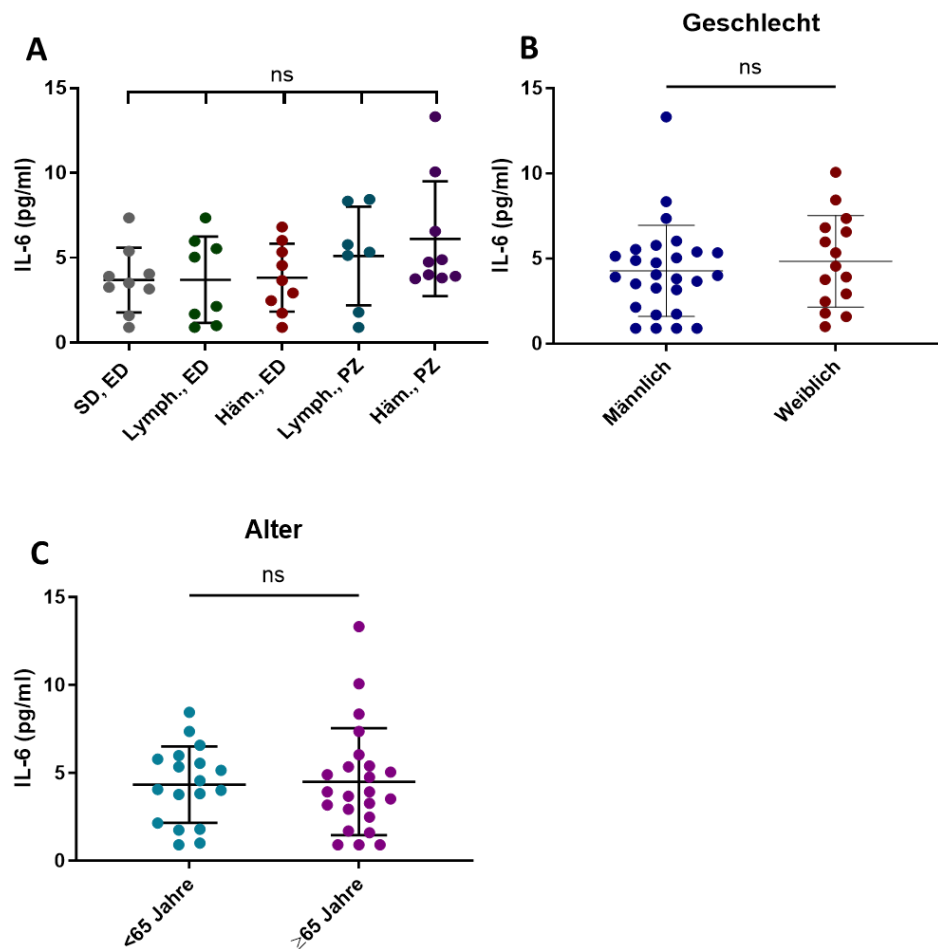


Abb. 9: Konzentrationsverteilung der Messwerte von Interleukin-6. **A:** Darstellung der IL-6-Konzentrationen nach Zeitpunkt und Metastasierungsweg. Einteilung in Stable Disease (SD) bei ED, lymphogen metastasiert bei ED, hämatogen metastasiert bei ED, lymphogen metastasiert beim ersten Progressionszeitpunkt, hämatogen metastasiert beim ersten Progressionszeitpunkt. **B:** Darstellung der IL-6-Konzentration in Abhängigkeit vom Geschlecht. **C:** Darstellung der IL-6-Konzentration nach Alter mit einem Cut-off-Wert von 65 Jahren. Zur Signifikanzanalyse wurde der Mann-Whitney-Test durchgeführt, ein p-Wert $<0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet.

Die hämatogen metastasierten Melanome zu den Zeitpunkten Erstdiagnose vs. Progression wiesen ebenfalls keine signifikanten Differenzen auf ($p = 0,4145$). Zum Zeitpunkt der Progression ergaben sich keine signifikant unterschiedlichen IL-6-Konzentrationen ($p > 0,9999$). In Bezug auf die IL-6-Konzentration zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der ulzerierten, nicht metastasierten Melanome zu den lymphogen metastasierten Patienten bei Erstdiagnose (p -Wert = $0,9463$) oder den hämatogen metastasierten Patienten bei Erstdiagnose ($p = 0,9528$). Darüber hinaus unterschieden sich die Interleukin-6-Konzentrationen statistisch nicht von denen der lymphogen metastasierten Patienten zum Progressionszeitpunkt ($p = 0,2629$). Die hämatogen metastasierten Melanome zum Progressionszeitpunkt zeigten tendenziell höhere IL-6-Konzentrationen als die nicht metastasierten Melanome bei ED. Statistisch war der Unterschied nicht signifikant, aber nah an einem signifikanten Ergebnis ($p = 0,0661$). Die Auftrennung nach Alter ($p = 0,6165$) und Geschlecht ($p = 0,4238$) ergab keine signifikant erhöhten

oder erniedrigten Messwerte für eine einzelne Gruppe. Somit zeigte sich in dieser serologischen Untersuchung kein signifikanter Unterschied in der IL-6-Konzentration im Serum zwischen den einzelnen Subgruppen, die Patienten mit hämatogener Metastasierung zum Progressionszeitpunkt wiesen aber tendenziell höhere Werte auf als zum Zeitpunkt der ED.

4.4.3. CCL1

Bei der Messung der CCL1-Konzentration ergab sich für die ulzerierten Melanome ohne Progression im Verlauf ein Median von 5,463 pg/ml bei $n = 9$. Die CCL1-Konzentration der später lymphogen metastasierten Melanome bei Erstdiagnose ergab einen medianen Wert von 8,231 pg/ml bei $n = 6$, die der später hämatogen metastasierten Melanome 10,92 pg/ml bei $n = 8$. Zum Progressionszeitpunkt ließen sich für die CCL1-Konzentration im Serum Medianwerte von 5,544 pg/ml (lymphogen, $n = 8$) beziehungsweise 7,245 pg/ml (hämatogen, $n = 8$) messen.

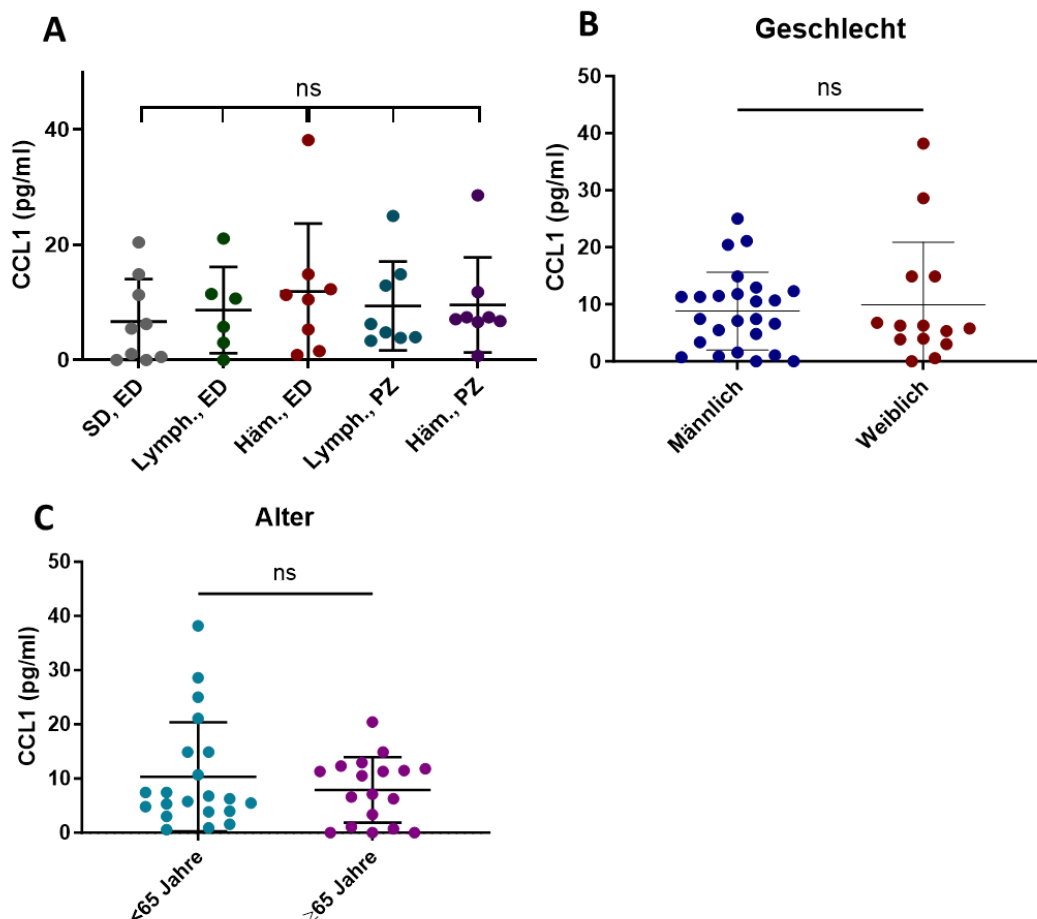


Abb. 10: Konzentrationsverteilung der Messwerte von CCL1. **A:** Darstellung der CCL1-Konzentrationen nach Zeitpunkt und Metastasierungsweg. Einteilung in Stable Disease (SD) bei ED, lymphogen metastasiert bei ED, hämatogen metastasiert bei ED, lymphogen metastasiert beim Progressionszeitpunkt, hämatogen metastasiert beim Progressionszeitpunkt. **B:** Darstellung der CCL1-Konzentrationen in Abhängigkeit von dem Geschlecht. **C:** Darstellung der CCL1-Konzentrationen nach Alter mit Cut-off-Wert 65 Jahren. Zur Signifikanzanalyse wurde der Mann-Whitney-Test durchgeführt, ein p -Wert $<0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet.

Der Vergleich zwischen den primär lymphogen metastasierten Melanomen für CCL1 zu den Zeitpunkten Erstdiagnose und Progression ergab keinen signifikanten Unterschied (p-Wert = 0,7546). Auch zwischen den primär hämatogen metastasierten Melanomen zu den Zeitpunkten Erstdiagnose und Progression konnten keine statistisch signifikanten Differenzen gefunden werden (p-Wert = 0,6250). Der Vergleich der metastasierten Gruppen zu den beiden beobachteten Zeitpunkten ergab weder für den Zeitpunkt der Erstdiagnose ($p = 0,7546$) noch für den Zeitpunkt des Progresses ($p = 0,5546$) einen signifikanten Konzentrationsunterschied. Im Vergleich zu den progressionsfreien Melanomen hatten weder die lymphogen noch die hämatogen metastasierten Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose ($p = 0,6048$ und $p=0,3090$) statistisch höhere Konzentrationen von CCL1 im Serum. Auch zum Zeitpunkt der Progression ($p = 0,4090$ und $0,2258$) wurden keine signifikant höheren Konzentrationen gemessen (s. Abb. 10).

Weiterhin ausgewertet wurden die Messwerte, analog zu den anderen untersuchten Biomarkern, nach Alter und Geschlecht. Die Patienten gleich oder älter 65 Jahre wiesen eine mediane CCL1-Konzentration von 8,801pg/ml bei $n = 18$ auf. Die Patienten jünger als 65 Jahre zeigten eine mediane CCL1-Konzentration von 6,277pg/ml bei 21 untersuchten Patienten. Das Alter zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die CCL1-Konzentration ($p = 0,7539$). Bezüglich des Geschlechts wiesen die männlichen Melanompatienten eine mediane Konzentration von 7,417 ($n = 25$), die weiblichen eine mediane CCL1-Konzentration von 6,033 pg/ml ($n = 14$) auf. Hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied ($p = 0,6908$).

4.4.4. CCL21

Die Gruppe der Patienten mit einem ulzerierten, nicht metastasierten malignen Melanom zeigte eine mediane CCL21-Konzentration im Serum von 154,2 pg/ml bei $n = 9$. Die Patienten mit einem später hämatogen metastasierten Melanom wiesen bei ED ($n = 7$) einen medianen Wert von 132,3 pg/ml auf. Die Seren der Patienten mit einer späteren lymphogenen Metastasierung zeigten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bei der Messung eine mediane CCL21-Konzentration von 179,4 pg/ml, bei einer Stichprobengröße von $n = 8$. Die Serumproben der später lymphogen metastasierten Patienten zum Zeitpunkt der Progression zeigten in der serologischen Messung eine mediane CCL21-Konzentration von 309,0 pg/ml bei $n = 7$, die der später hämatogen metastasierten Patienten bei Progress eine mediane Konzentration von 234,9 pg/ml bei einer Gesamtzahl von $n = 8$.

Der Vergleich der Patientengruppen der im Verlauf hämatogen und lymphogen metastasierten Patienten ergab keinen signifikanten Konzentrationsunterschied zum Zeitpunkt der Erstdiag-

nose zueinander ($p=0,3340$). Die CCL21-Konzentrationen der später lymphogen metastasierenden Patienten zu Erstdiagnose- und Metastasierungszeitpunkt unterschieden sich statistisch nicht signifikant ($p = 0,1981$). Auch die später hämatogen Metastasierten im Vergleich beider Zeitpunkte zeigten keinen signifikanten Unterschied (p -Wert $>0,9999$). Die Konzentrationen beider metastasierter Subgruppen zum Progressionszeitpunkt differierten nicht signifikant ($p = 0,4796$).

Die Patienten mit ulzeriertem, nicht metastasiertem Melanom hatten zum Erstdiagnosezeitpunkt keine signifikant höheren CCL21-Messwerte als die Patienten mit späterem lymphogenem ($p = 0,5846$) oder hämatogenem Progress ($p = 0,7595$). Zum Progressionszeitpunkt waren die Messwerte von CCL21 im Serum der primär lymphogen ($p = 0,2105$) und der primär hämatogen metastasierten Patienten ($p = 0,7595$) nicht signifikant höher als die Messwerte der Patienten mit nicht progredientem Melanom (s. Abb. 11).

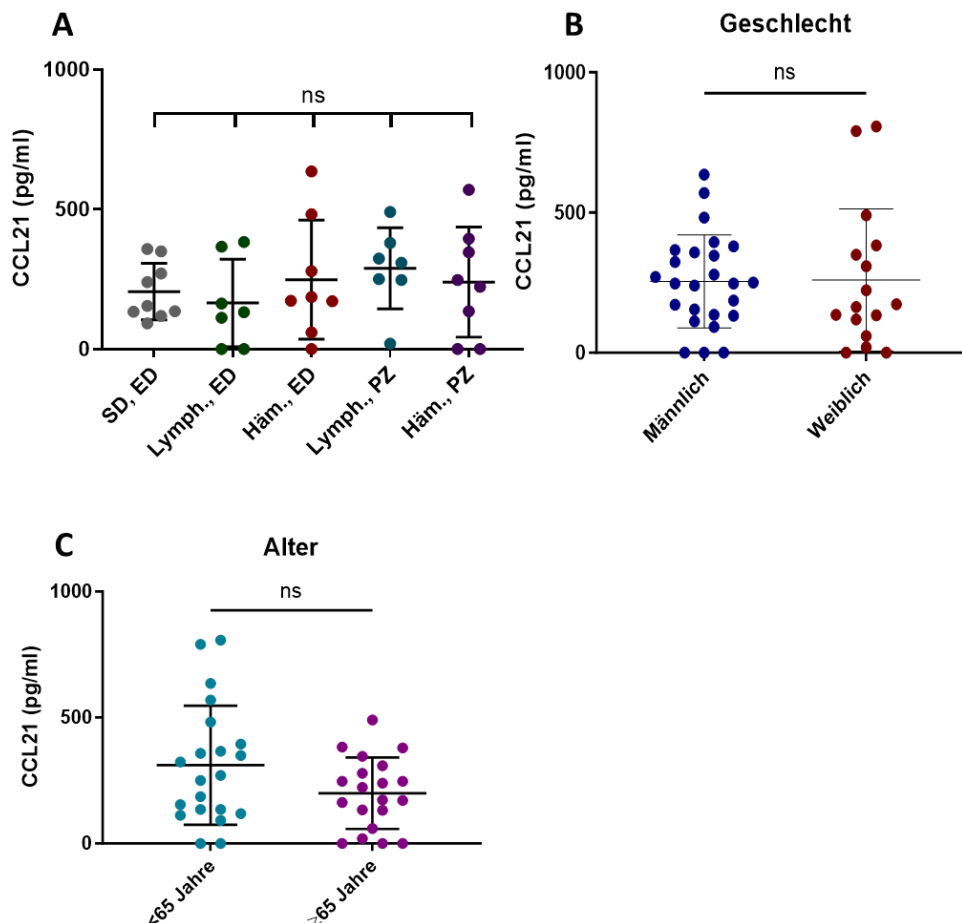


Abb. 11: Konzentrationsverteilung der Messwerte von CCL21. **A:** Darstellung der CCL21-Konzentrationen nach Zeitpunkt und Metastasierungsweg. Einteilung in Stable Disease (SD) bei ED, lymphogen metastasiert bei ED, hämatogen metastasiert bei ED, lymphogen metastasiert beim Progressionszeitpunkt, hämatogen metastasiert beim Progressionszeitpunkt. **B:** Darstellung der CCL21-Konzentrationen in Abhängigkeit von dem Geschlecht. **C:** Darstellung der CCL21-Konzentrationen nach Alter mit Cut-off-Wert 65 Jahre. Zur Signifikanzanalyse wurde der Mann-Whitney-Test durchgeführt, ein p -Wert $<0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet.

In Hinblick auf die Altersverteilung zeigte sich eine CCL21-Mediankonzentration von 270,3 pg/ml bei n = 21 für die Patienten ≥ 65 Jahre, für die Patienten < 65 Jahre ein Median von 197,9 pg/ml bei n = 20. In Unterscheidung des Geschlechts wiesen die männlichen Patienten einen CCL21-Medianwert von 246,7 pg/ml bei n = 25, die weiblichen Patientinnen einen Median der CCL21-Konzentration von 167,6 pg/ml bei n = 16 auf. Die Signifikanzanalysen für den CCL21-ELISA ergaben weder für das Alter ($p = 0,1786$), noch für das Geschlecht ($p = 0,6292$) signifikante Differenzen.

4.4.5. CXCL10

Der mediane Messwert bei den Patienten mit ulzeriertem, später progressionsfreiem Melanom betrug 84,85 bei n = 10. Die Seren der später hämatogen und lymphogen metastasierten Patienten bei Erstdiagnose zeigten in der Messung eine mediane CXCL10-Konzentration von 66,45 (n = 8) beziehungsweise 84,77pg/ml (n = 8) auf. Zum Zeitpunkt des Progresses wiesen diese beiden Patientengruppen einen medianen Messwert von 115,9pg/ml bei n = 8 (primär lymphogen) und 97,47pg/ml bei n = 9 (primär hämatogen) auf (s. Abb. 12).

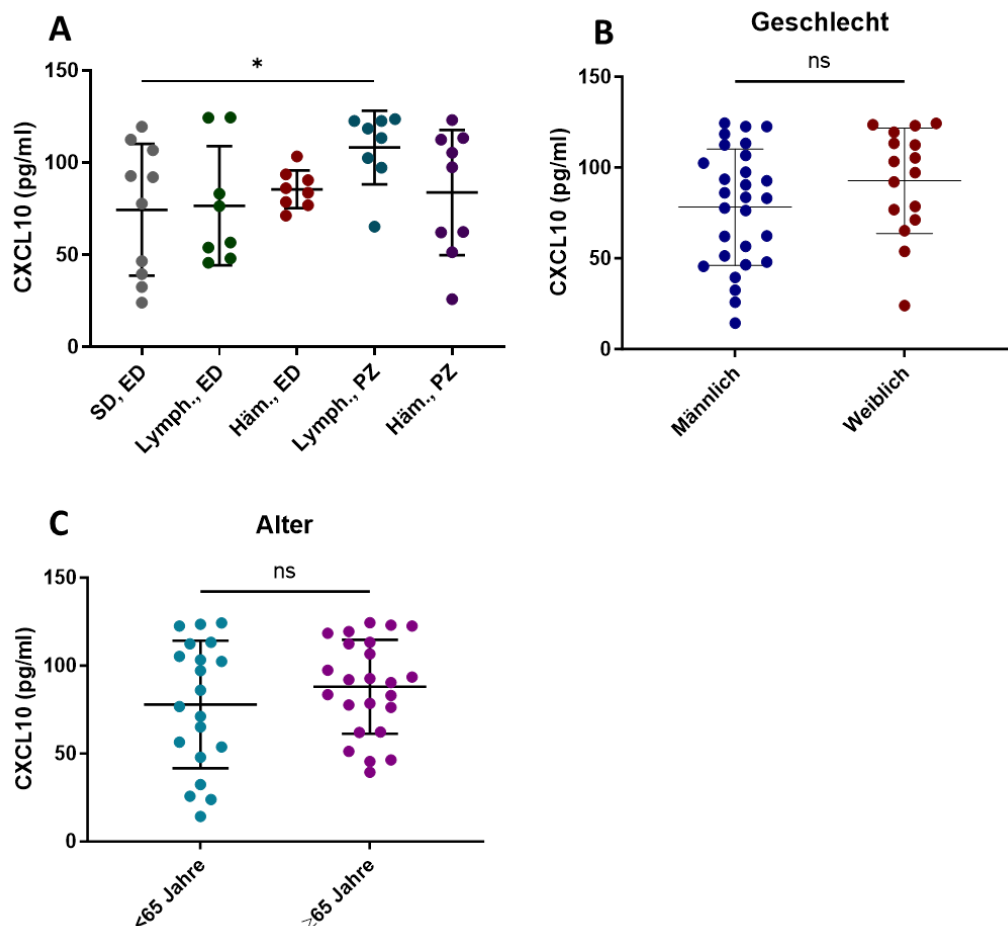


Abb. 12: Konzentrationsverteilung der Messwerte von CXCL10. A: Darstellung der CXCL10-Konzentrationen nach Zeitpunkt und Metastasierungswege. Einteilung in Stable Disease (SD) bei ED, lymphogen metastasiert bei ED, hämatogen metastasiert bei ED, lymphogen metastasiert beim Progressi-

onszeitpunkt, hämatogen metastasiert beim Progressionszeitpunkt. **B:** Darstellung der CXCL10-Konzentrationen in Abhängigkeit von dem Geschlecht. **C:** Darstellung der CXCL10-Konzentrationen nach Alter mit Cut-off-Wert 65 Jahren. Zur Signifikanzanalyse wurde der Mann-Whitney-Test durchgeführt, ein p-Wert $<0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet.

Die statistische Analyse mittels Mann-Whitney-Test ergab für die beiden später metastasierten Gruppen im Vergleich bei Erstdiagnose (p-Wert = 0,2345) und bei Progression (p-Wert = 0,1139) keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Konzentration. Die Betrachtung der primär lymphogen metastasierten Patienten zeigte keine signifikanten Konzentrationsunterschiede bei CXCL10 (p-Wert 0,1605) zum Progressionszeitpunkt im Vergleich zur Erstdiagnose. Bei den primär hämatogen progredienten Melanomen konnten diesbezüglich ebenfalls keine relevanten Unterschiede gefunden werden (p = 0,1605). Der Vergleich der Seren der Patienten mit ulzeriertem Melanom ohne Tumorprogression im Vergleich mit lymphogen (p = 0,7618) und hämatogen (p = 0,8968) progredienten Melanomen zum Erstdiagnosezeitpunkt ergab ebenso keine signifikanten Konzentrationsunterschiede.

Die primär lymphogen metastasierten Patienten zum Zeitpunkt der Progression wiesen eine signifikant höhere CXCL10-Konzentration im Serum auf als die Patienten ohne progredientes Melanom (p = 0,0205), was jedoch kein klinisch nützlicher Vergleich ist. Bei den entsprechenden primär hämatogen metastasierten Patienten konnten keine signifikant höheren Messwerte gefunden werden (p = 0,4600).

Die Auswertung der CXCL10-Messwerte nach Alter ergab einen Medianwert für die Patienten ≥ 65 Jahre von 91,23 pg/ml (n = 24), für die Patienten unter 65 Jahre einen Medianwert von 81,44pg/ml (n = 20). Die Medianwerte für die Aufteilung nach Geschlecht betragen 83,26pg/ml bei n = 28 für die männlichen Probanden, die der weiblichen Probandinnen betragen 100,2pg/ml bei n = 16. Statistisch zeigte die Signifikanzberechnung bei Betrachtung der CXCL10-Konzentrationsunterschiede in Hinblick auf das Alter (p = 0,3143) und das Geschlecht (p = 0,1298) keine signifikanten Unterschiede. Damit wiesen diese Gruppen statistisch keinen signifikanten Unterschied zueinander auf.

4.4.6. HAPLN1

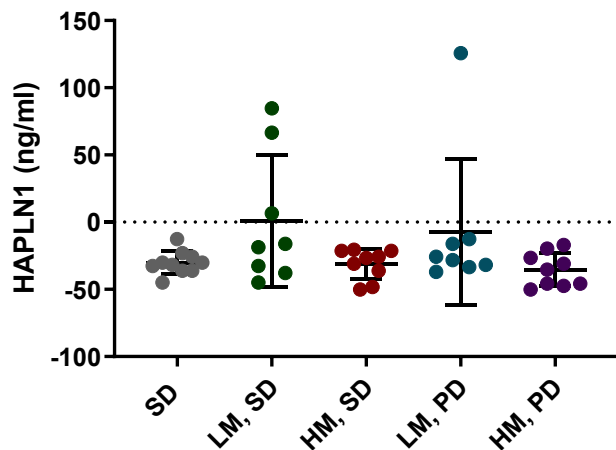


Abb. 13: Konzentrationsverteilung der Messwerte von HAPLN1. Darstellung der HAPLN1-Konzentrationen nach Zeitpunkt und Metastasierungsweg. Beachte: Die meisten Messwerte waren rein rechnerisch niedriger als Null und sind somit negativ dargestellt. Dies ist durch fehlerhafte technische Bedingungen bedingt. Einteilung in Stable Disease (SD) bei ED, lymphogen metastasiert (LM) bei ED, hämatogen metastasiert (HM) bei ED, lymphogen metastasiert beim Progressionszeitpunkt, hämatogen metastasiert beim Progressionszeitpunkt.

Die quantitative Messung der HAPLN1-Konzentrationen in den untersuchten Seren wurde ebenfalls wie die anderen durchgeführten Messungen anhand einer vorher anzusetzenden Standardreihe kalibriert, was gemäß dem Herstellerprotokoll erfolgreich bewerkstelligt werden konnte. Die dabei anfallenden Messwerte bewegten sich nach der Kalibrierung jedoch beinahe in Gänze im negativen Bereich, was in diesem Falle weder statistisch noch physiologisch sinnvoll und auswertbar ist, und damit auch keiner Signifikanzanalyse unterzogen wurde (s. Abb. 13). Hierbei muss beachtet werden, dass gemäß des HAPLN1-ELISA-Protokolls der Herstellerfirma (s. Kapitel 2.3.1.) vor der Durchführung des Experiments eine Serumverdünnung mit dem Faktor 1:5 angefertigt wurde. Es wurde im Protokoll eine mögliche individuelle Anpassung des Verdünnungsfaktors erwähnt, jedoch wurde eine Verdünnung von 1:5 allgemein empfohlen, woran wir uns hielten. Lediglich vier Werte bewegten sich so im positiven und damit nachweisbaren Messbereich, wobei sich diese vier Werte alle bei Patienten mit einer primär lymphogenen Metastasierung ergaben, drei davon zum Zeitpunkt der Erstdiagnose, sowie ein Wert zum Progressionszeitpunkt.

Zwei der erhöhten Messwerte waren auf einen männlichen Patienten zurückzuführen, welcher erst Lymphknotenmetastasen entwickelte, und sekundär im Verlauf Hirnmetastasen ausbildete. Zum Zeitpunkt der Forschungsarbeiten war der 1946 geborene Patient bereits verstorben. Ein weiterer positiv messbarer HAPLN1-Wert entstammte ebenfalls einem männlichen Patienten, welcher zwar auch eine Lymphknotenmetastasierung entwickelte, jedoch bisher

keine hämatogene Fernmetastasierung aufweist. Insgesamt war dieser ELISA somit nicht auswertbar, was wir am Ehesten auf die Verdünnung der Seren zurückführen.

4.5. Immunhistochemische Untersuchungen von Melanompatienten in den Stadien II und III

4.5.1. CCL21

Die Färbung von CCL21 innerhalb der Lymphknoten zeigte ein Muster der Einzelzellfärbung. Um eine genauere Quantifizierung vorzunehmen, wurde eine 400-fache lichtmikroskopische Vergrößerung verwendet. Die Quantifizierung ergab für Patienten im Stadium II ohne spätere Metastasierung einen medianen Wert des Expressionsscores von 1,5 bei $n = 20$. Für Patienten mit einer Progression im Verlauf wurde ein medianer Scorewert von 2,0 bei $n = 20$ beobachtet. Bei den Lymphknoten der Patienten im Stadium III ohne Tumorprogression zeigte sich ein Medianscore von 2,0 bei $n = 13$ und bei den Patienten mit späterer Melanomprogression ein medianer Wert von 2,0 bei einer Anzahl von 21 ausgewerteter Lymphknoten (s. Abb. 14).

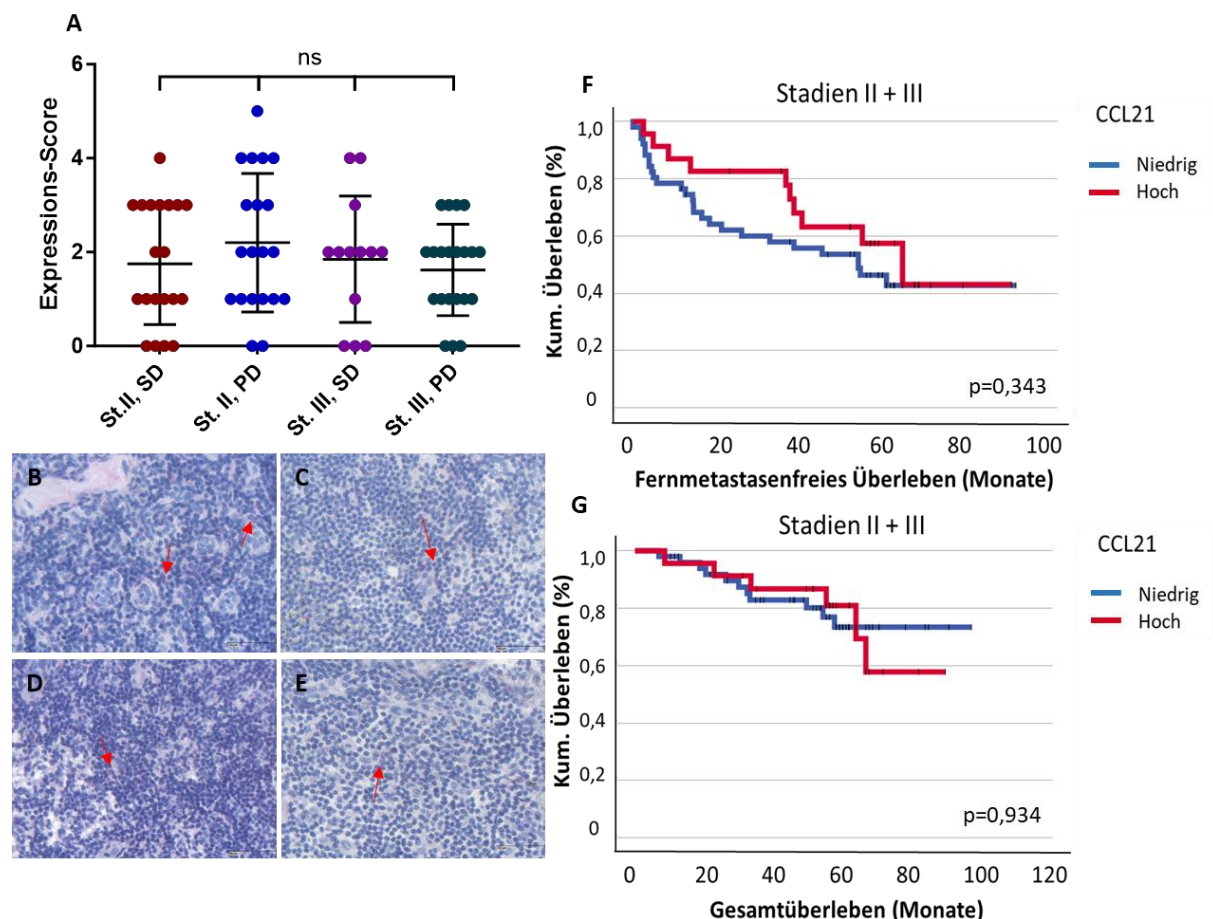


Abb. 14: Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen von CCL21 im Wächterlymphknoten. Bilder in 400-facher Vergrößerung. **A:** Grafische Darstellung der Scorewerte der Lymphknoten der Stadien II + III ohne und mit späterer Tumorprogression. Zur Signifikanzanalyse wurde der Mann-Whitney-Test verwendet, ein p -Wert $<0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet. SD = Stable Disease (ohne Progression im Verlauf), PD = Progressive Disease (mit Progression im Verlauf). Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbungen für **B:** Stadium II ohne Progression. **C:** Stadium II mit Progression, **D:** Stadium III ohne Progression. **E:** Stadium III mit Progression. **F:** Kaplan-Meier-Analyse des

fernmetastasenfreien Überlebens der Patienten mit einer niedrigen sowie einer hohen CCL21-Expression. **G:** Kaplan-Meier-Analyse des Gesamtüberlebens der Patienten mit einer niedrigen sowie einer hohen CCL21-Expression. Ein Score-Wert ≥ 3 wurde als hohe Expression eingestuft. Für die Kaplan-Meier-Analysen wurde der Log-rank-Test verwendet, ein p-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet.

Die Analyse der CCL21-Expression in Lymphknoten zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen Patienten mit und ohne Tumorprogression im Stadium II ($p = 0,3427$) bzw. Stadium III ($p = 0,6411$). Ebenso waren die Unterschiede zwischen progressionsfreien Patienten beider Stadien ($p = 0,9050$) sowie zwischen metastasierten Patienten im Follow-up ($p = 0,2568$) nicht signifikant. Insgesamt zeigten sich keine statistisch relevanten Unterschiede der CCL21-Expression zwischen den untersuchten Subgruppen.

In der Überlebensanalyse (kombiniert für Stadien II und III) betrug das mittlere und mediane fernmetastasenfreie Überleben bei niedriger CCL21-Expression 53,51 bzw. 56 Monate, bei hoher Expression 62,48 bzw. 67 Monate ($p = 0,343$). Beim Gesamtüberleben zeigten Patienten mit niedriger Expression ein mittleres Überleben von 84,39 Monaten, bei hoher Expression lag es bei 76,65 Monaten ($p = 0,934$).

Im Stadium II war eine hohe CCL21-Expression mit einem signifikant schlechteren Gesamtüberleben assoziiert ($p = 0,023$, s. Abbildung 15). Im Stadium III hingegen war tendenziell ein besseres Überleben bei hoher Expression zu beobachten: medianes fernmetastasenfreies Überleben 57,43 vs. 41,86 Monate; medianes Gesamtüberleben 84,27 vs. 63,85 Monate – jedoch ohne statistische Signifikanz ($p = 0,392$ bzw. $p = 0,184$).

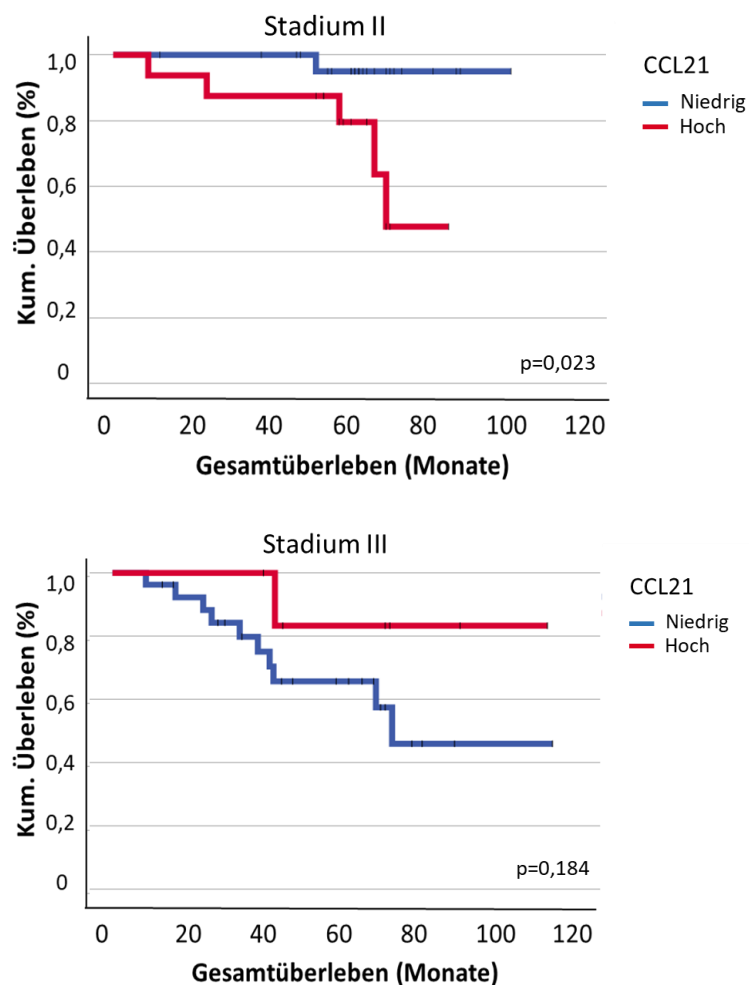


Abb. 15: Signifikanter Unterschied des Gesamtüberlebens bei CCL21 im Stadium II. Kaplan-Meier-Analyse des Gesamtüberlebens der Patienten mit einer niedrigen sowie einer hohen CCL21-Expression im Stadium II und III. Ein Score-Wert ≥ 3 wurde als hohe Expression eingestuft. Für die Kaplan-Meier-Analysen wurde der Log-rank-Test verwendet, ein p-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet.

4.5.2. CXCL10

Die Immunhistochemie für CXCL10 wurde mit zwei unterschiedlichen Antikörpern durchgeführt. Während die erste Antikörperfärbung trotz mehrfacher Versuche keine auswertbaren Ergebnisse lieferte, zeigte der zweite Antikörper (R&D Systems) eine spezifische Anfärbung. Das Färbemuster bestand aus Einzelzellen und kleinen Zellverbänden, vorwiegend im Bereich des Lymphknotenkortexes. Die Auswertung erfolgte bei 50- und 100-facher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop.

Im Stadium II lag der Median der CXCL10-Expression bei progressionsfreien Patienten bei 0 ($n = 20$) und bei Patienten mit späterer Progression bei 0,5 ($n = 20$). Dieser Unterschied war statistisch signifikant ($p = 0,0204$, Mann-Whitney-Test). Somit zeigte sich bei den Patienten mit Progression eine signifikant höhere CXCL10-Expression. Im Stadium III betrug der Median der Expression 2,0 bei progressionsfreien und 1,0 bei metastasierten Patienten ($n = 13$

bzw. n = 20). Dieser Unterschied war nicht signifikant ($p = 0,3015$). Ein Vergleich später progressionsfreier Patienten der Stadien II und III ergab eine signifikant höhere CXCL10-Expression im Stadium III ($p = 0,0002$). Dagegen zeigte der Vergleich zwischen progressiven Verläufen in beiden Stadien keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,1791$).

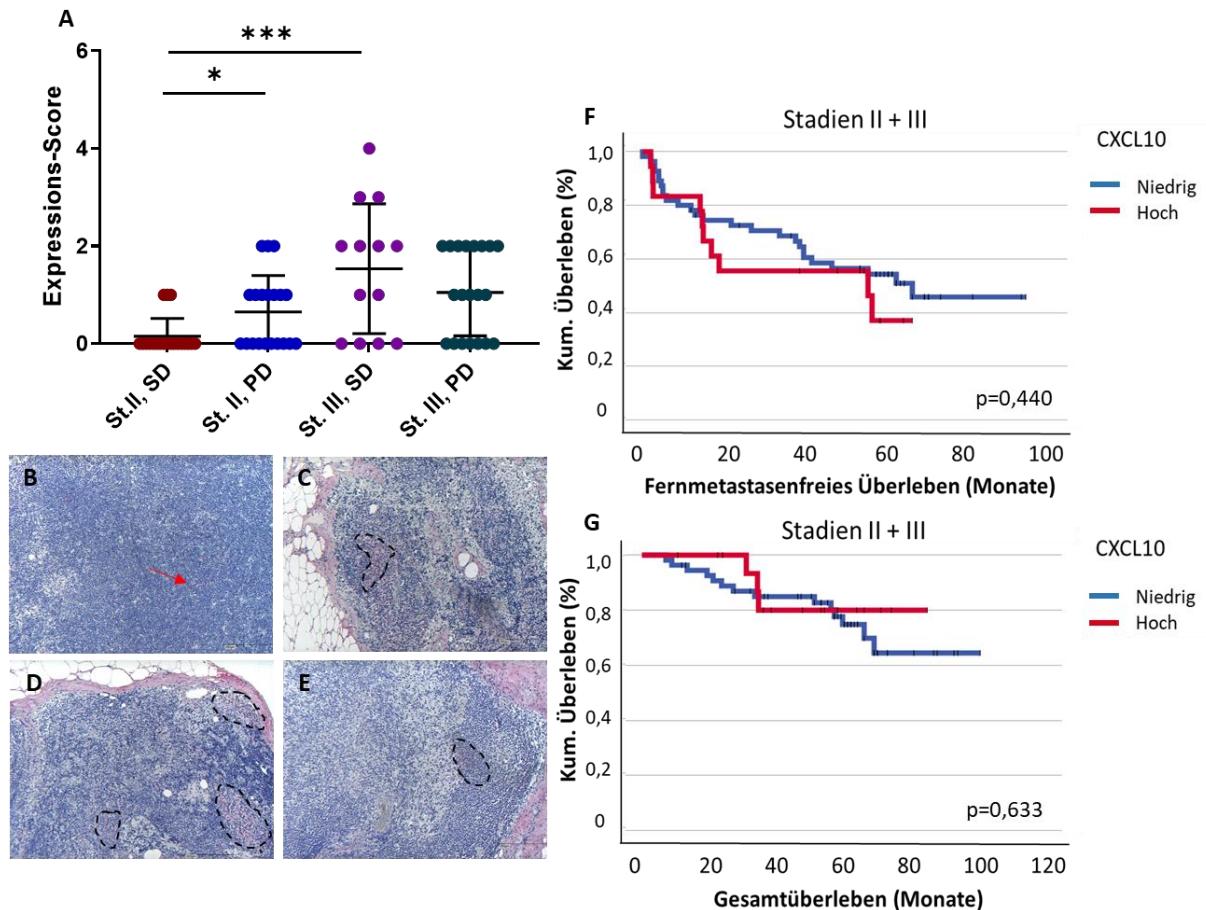


Abb. 16: Signifikanter Unterschied der CXCL10-Expression im Wächterlymphknoten im Vergleich von Stadium II und III-Melanompatienten. Bilder in 50-facher Vergrößerung. **A**: Grafische Darstellung der Scorewerte der Lymphknoten der Stadien II + III ohne und mit späterer Tumorprogression. Zur Signifikanzanalyse wurde der Mann-Whitney-Test verwendet, ein p-Wert $<0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet. SD = Stable Disease (ohne Progression im Verlauf), PD = Progressive Disease (mit Progression im Verlauf). Repräsentative Bilder der immunohistochemischen Färbungen für **B**: Stadium II ohne Progression, **C**: Stadium II mit Progression, **D**: Stadium III ohne Progression, **E**: Stadium III mit Progression. **F**: Kaplan-Meier-Analyse des fernmetastasenfreien Überlebens der Patienten mit einer niedrigen sowie einer hohen CXCL10-Expression. **G**: Kaplan-Meier-Analyse des Gesamtüberlebens der Patienten mit einer niedrigen sowie einer hohen CXCL10-Expression. Ein Score-Wert ≥ 2 wurde als hohe Expression eingestuft. Für die Kaplan-Meier-Analysen wurde der Log-rank-Test verwendet, ein p-Wert $<0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet.

Für alle Patienten (Stadien II und III kombiniert) ergab sich bei niedriger CXCL10-Expression ein mittleres fernmetastasenfreies Überleben von 58,54 Monaten (Median: 67 Monate) und bei hoher Expression ein mittleres fernmetastasenfreies Überleben von 40,13 Monaten (Median: 56 Monate). Dieser Unterschied war nicht signifikant ($p = 0,440$). Das mittlere Gesamtüberleben lag bei 81,61 Monaten (niedrige Expression) vs. 75,56 Monaten (hohe Expression,

ebenfalls ohne signifikanten Unterschied ($p = 0,633$). Auch in den Einzelanalysen der Stadien II und III zeigte die CXCL10-Expression keinen signifikanten Einfluss auf das Überleben.

4.5.3. HAPLN1

4.5.3.1. HAPLN1 im Stroma

Im Stadium II lag der mediane HAPLN1-Expressionsscore bei Patienten ohne spätere Metastasierung bei 2,0; der Mittelwert betrug ebenfalls 2,0 ($n = 18$). Bei Patienten mit späterer Metastasierung im selben Stadium betrug der Median ebenfalls 2,0, während der Mittelwert leicht niedriger bei 1,6 lag ($n = 20$). Der Unterschied war statistisch nicht signifikant ($p = 0,4945$). Im Stadium III zeigten progressionsfreie Patienten eine mediane HAPLN1-Expression von 0,0 und einen mittleren Score von 0,6154 ($n = 13$). Bei Patienten mit späterer Tumorprogression lag der Median ebenfalls bei 0,0, der Mittelwert bei 0,4286 ($n = 21$). Ein Vergleich progressionsfreier Patienten zwischen den Stadien II und III ergab eine signifikant höhere HAPLN1-Expression im Stadium II ($p = 0,0069$). Ebenso zeigte der Vergleich von Patienten mit späterer Progression in beiden Stadien eine signifikant höhere HAPLN1-Expression in Stadium III ($p = 0,0009$). Im Stadium III fiel auf, dass Patienten mit höherer HANPLN1-Expression tendenziell größere Metastasen aufwiesen. Aufgrund der insgesamt geringen Anzahl an Lymphknoten mit hoher HAPLN1-Expression in dieser Gruppe ist diese Beobachtung jedoch mit Zurückhaltung zu interpretieren.

Die HAPLN1-Expression im Stroma wurde altersstratifiziert analysiert, basierend auf dem in der Literatur häufig verwendeten Cut-off von 50 Jahren (vgl. Ecker et al., 2018, s. Abb. 18) sowie dem in dieser Dissertation üblichen Cut-off von 65 Jahren.

Im Stadium II lag der Median der HAPLN1-Expression sowohl bei Patienten unter 50 Jahren (Median 2,0; Mittelwert 1,33, $n = 12$) als auch bei über 50-Jährigen (Median 2,0; Mittelwert 2,0; $n = 26$). Der Unterschied war statistisch nicht signifikant ($p = 0,2188$). Im Stadium III zeigte sich bei beiden Altersgruppen ein Median von 0; die Mittelwerte betrugen 0,62 (<50 Jahre) bzw. 0,42 (>50 Jahre), ebenfalls ohne signifikanten Unterschied ($p = 0,8461$). Auch bei Anwendung des Cut-offs von 65 Jahren ergaben sich in beiden Stadien keine signifikanten Differenzen in der stromalen HAPLN1-Expression.

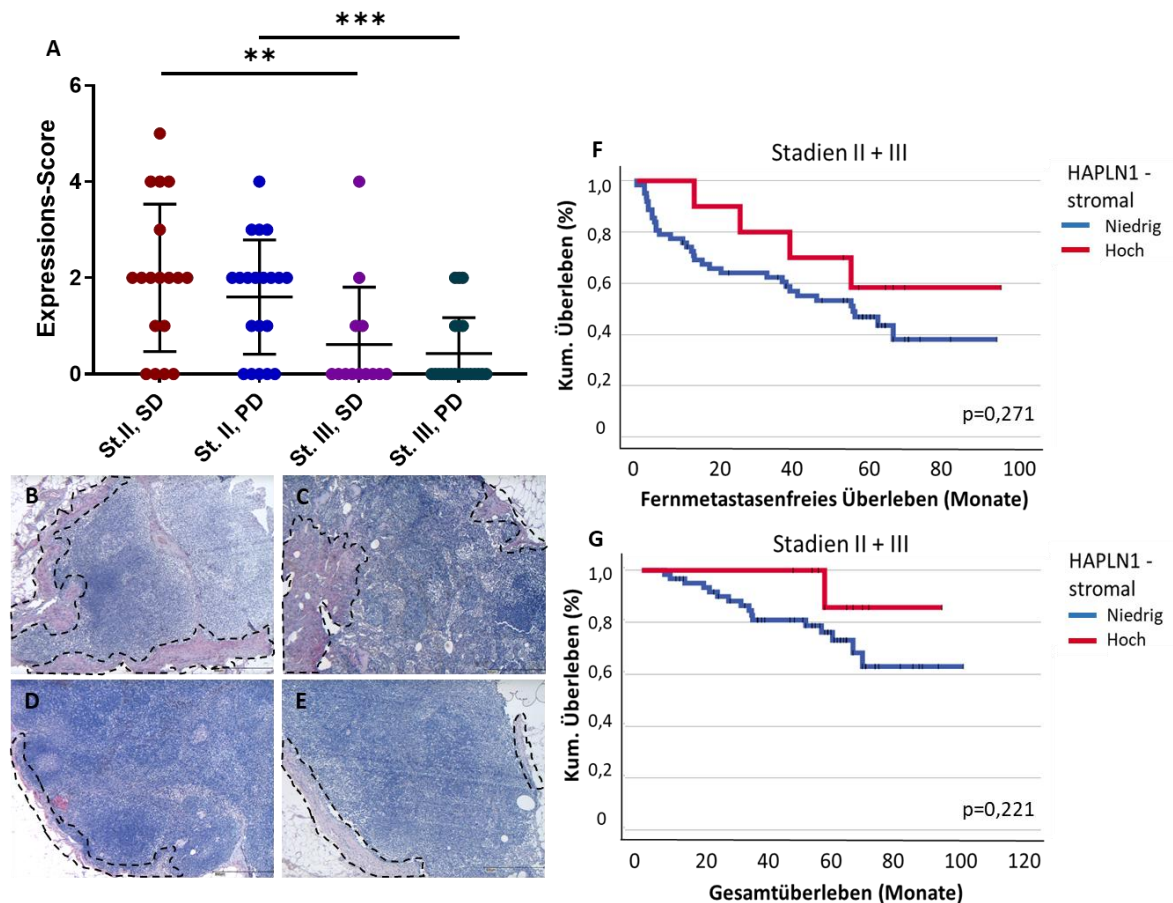


Abb. 17 Signifikanter Unterschied der HAPLN1-Expression im Wächterlymphknoten im Vergleich von Stadium II und III-Melanompatienten. **A:** Grafische Darstellung der Scorewerte der Lymphknoten der Stadien II + III ohne und mit späterer Tumorprogression. Zur Signifikanzanalyse wurde der Mann-Whitney-Test verwendet, ein p-Wert $<0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet. SD = Stable Disease (ohne Progression im Verlauf), PD = Progressive Disease (mit Progression im Verlauf). Repräsentative Bilder der immunohistochemischen Färbungen für **B:** Stadium II ohne Progression. **C:** Stadium II mit Progression, **D:** Stadium III ohne Progression. **E:** Stadium III mit Progression. **F:** Kaplan-Meier-Analyse des fernmetastasenfreien Überlebens der Patienten mit einer niedrigen sowie einer hohen HAPLN1-Expression. **G:** Kaplan-Meier-Analyse des Gesamtüberlebens der Patienten mit einer niedrigen sowie einer hohen HAPLN1-Expression. Ein Score-Wert ≥ 3 wurde als hohe Expression eingestuft. Für die Kaplan-Meier-Analysen wurde der Log-rank-Test verwendet, ein p-Wert $<0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet.

Für das fernmetastasenfreie Überleben lag der Mittelwert bei niedriger HAPLN1-Expression bei 52,49 Monaten (Median: 56,51 Monate), bei hoher Expression bei 70,27 Monaten. Aufgrund der geringen Ereignisrate konnte für die Gruppe mit hoher Expression kein Median berechnet werden. Der Unterschied war statistisch nicht signifikant ($p = 0,271$; Log-rank-Test). Beim Gesamtüberleben betrug die Mittelwerte 80,16 Monate (niedrige Expression) bzw. 89,89 Monate (hohe Expression), ebenfalls ohne signifikanten Unterschied ($p = 0,221$); auch hier konnte kein Median berechnet werden.

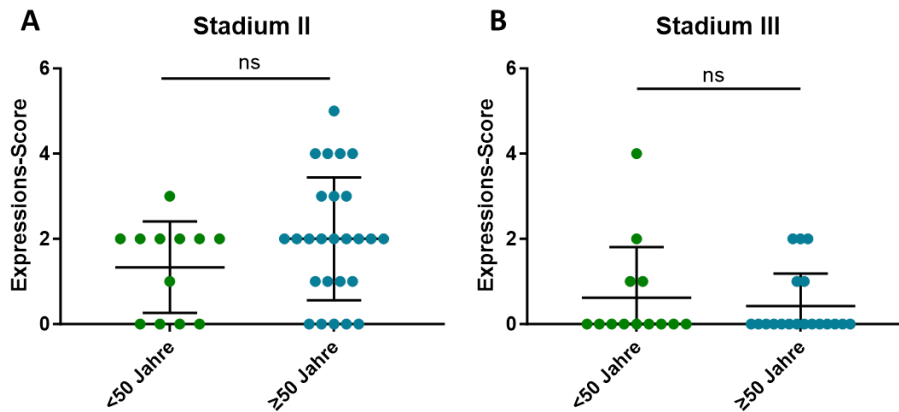


Abb. 18: Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen von HAPLN1 im Stroma nach Alter und Stadien. A: Grafische Darstellung der Scorewerte der Lymphknoten im Stadium II, unterschieden nach dem Alter mit dem Cut-off-Wert 50 Jahre. **B:** Grafische Darstellung der Scorewerte der Lymphknoten im Stadium III, unterschieden nach dem Alter mit dem Cut-off-Wert 50 Jahre. Zur Signifikanzanalyse wurde der Mann-Whitney-Test verwendet, ein p-Wert $<0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet.

Eine tendenziell günstigere Prognose war bei hoher stromaler HAPLN1-Expression erkennbar, sowohl für das fernmetastasenfreie als auch das Gesamtüberleben. Diese Unterschiede erreichten jedoch in keiner Auswertung statistische Signifikanz. Auch die stratifizierte Analyse nach Tumorstadien ergab keine prognostisch relevanten Unterschiede.

4.5.3.2. HAPLN1 in Melanommetastasen

Die Ausprägung der HAPLN1-Expression in Melanommetastasen in den Stadium III-Lymphknoten wurde isoliert von der Expression im Stroma untersucht. Hierbei ergab sich für die Patienten ohne eine spätere Progression ein Scoremittelwert von 0,8462 sowie ein Median von 0,0 in $n=13$ Patienten. Für die Lymphknoten der Patienten mit Tumorprogression im Verlauf zeigte sich ein mittlerer Score von 1,429 und ein Median von 0,0 bei $n=21$. Die Scoredifferenz der beiden Gruppen im Mann-Whitney-Test war statistisch nicht signifikant (p-Wert = 0,8652). Bei den Patienten mit späterer Progression zeigten einige eine höhere intrametastasäre HAPLN1-Expression; in dieser Gruppe wurden höhere Spitzenwerte hinsichtlich der Expression erzielt als es in der progressionsfreien Gruppe der Fall war. Damit ist eine Tendenz zu einer verstärkten intrametastasären HAPLN1-Expression bei Patienten mit späterem Fortschreiten ihres Melanoms erkennbar. In Hinsicht auf das Überleben zeigte sich für das fernmetastasenfreie Überleben bei einer niedrigen intrametastasären HAPLN1-Expression ein mittleres Überleben von 50,96 Monaten und ein medianes Überleben von 56 Monaten. Bei einer hohen Expression wurde ein mittleres Überleben von 27,01 Monaten sowie ein medianes fernmetastasenfreies Überleben von 3 Monaten registriert. Damit zeigten Patienten mit einer niedrigeren intrametastasären HAPLN1-Expression ein signifikant besseres fernmetastasenfreies Überleben ($p=0,0049$, s. Abb. 19).

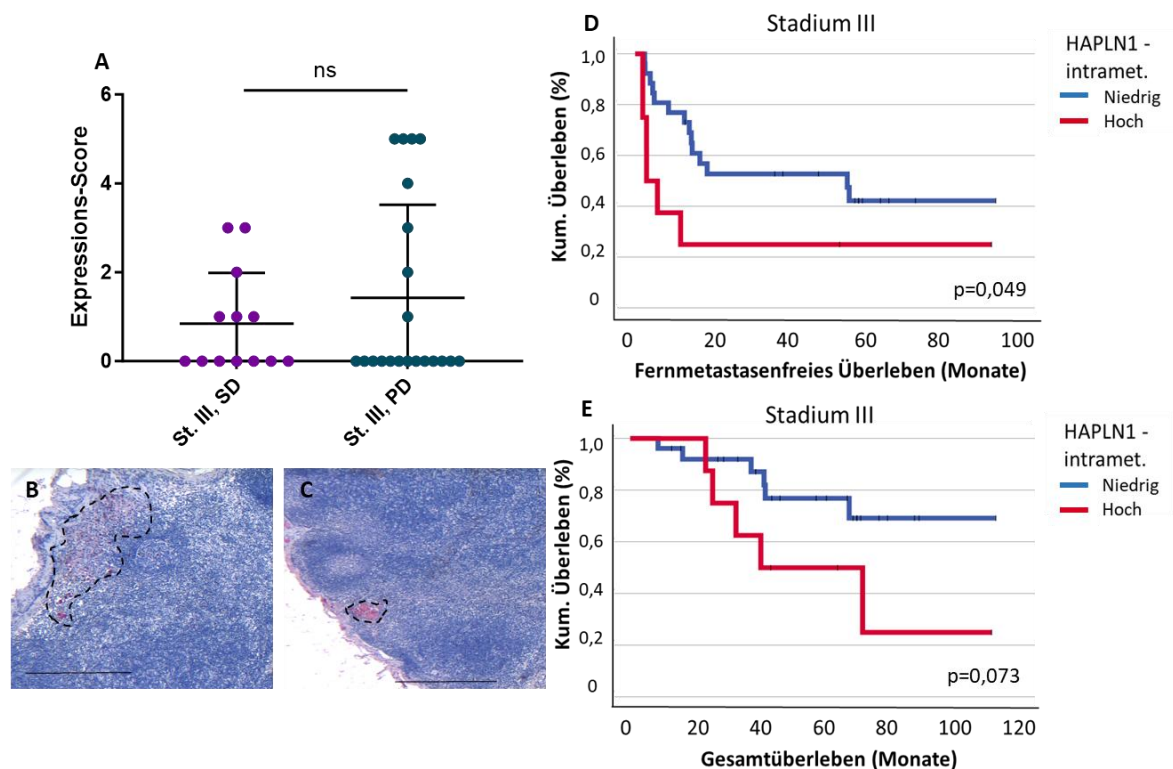


Abb. 19: Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen von HAPLN1 in den Metastasen. Bilder in 50-facher Vergrößerung. **A:** Grafische Darstellung der Scorewerte der Lymphknoten der Stadien II + III ohne und mit späterer Tumorprogression. Zur Signifikanzanalyse wurde der Mann-Whitney-Test verwendet, ein p-Wert $<0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet. SD = Stable Disease (ohne Progression im Verlauf), PD = Progressive Disease (mit Progression im Verlauf). Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbungen für **B:** Stadium III ohne Progression. **C:** Stadium III mit Progression, **D:** Kaplan-Meier-Analyse des fernmetastasenfreien Überlebens der Patienten mit einer niedrigen sowie einer hohen intrametastasären HAPLN1-Expression. **E:** Kaplan-Meier-Analyse des Gesamtüberlebens der Patienten mit einer niedrigen sowie einer hohen intrametastasären HAPLN1-Expression. Ein Score-Wert ≥ 3 wurde als hohe Expression eingestuft. Für die Kaplan-Meier-Analysen wurde der Log-rank-Test verwendet, ein p-Wert $<0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet.

Das Gesamtüberleben zeigte bei einer niedrigen HAPLN1-Expression intrametastasär ein mittleres Überleben von 76,22 Monaten und bei einer hohen Expression ein mittleres Überleben von 51,47 Monaten. Der Vergleich beider Gruppen erbrachte einen p-Wert von 0,073. Tendenziell zeigte ein niedriger Score zwar auch ein besseres Gesamtüberleben, dies war statistisch jedoch (noch) nicht signifikant.

Insgesamt fiel bei der Auswertung auf, dass eine deutliche HAPLN1-Expression eher in größeren und flächigeren Metastasen auffiel, welche prognostisch ungünstiger sind als zahlenmäßig weniger und kleinere Metastasen in den Lymphknoten (29). Jedoch kann keine sichere Aussage getroffen werden, ob es sich dabei um persistierendes Lymphknotenstroma oder aber um Metastasenstroma handelt.

4.5.4.CD20

Die Analyse der qualitativen CD20-Expression im Lymphknoten-Stroma (ohne metastasäres Gewebe) in Sentinel-Lymphknoten ergab deutliche Unterschiede in Abhängigkeit vom Tumorstadium und dem Progressionsverlauf. Im Stadium II zeigten Patienten mit und ohne spätere Metastasierung vergleichbare CD20-Expressionswerte (Median jeweils 5,0; $p = 0,4075$). Im Stadium III hingegen wiesen Patienten mit späterer Progression eine signifikant niedrigere Expression auf als progressionsfreie Patienten (Median 3,0 vs. 5,0; $p = 0,0048$). Zudem zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den Stadien: Bei progressionsfreien Patienten war die CD20-Expression im Stadium III niedriger als im Stadium II ($p = 0,0242$), und auch im direkten Vergleich progressiver Verläufe zwischen beiden Stadien war die Expression im höheren Stadium signifikant reduziert ($p < 0,0001$).

Im Hinblick auf das fernmetastasenfreie Überleben ergab sich bei niedriger CD20-Expression ein deutlich verkürztes Überleben (mittleres Überleben: 14,71 Monate; median: 5,88 Monate) im Vergleich zu Patienten mit hoher Expression (mittleres Überleben: 66,56 Monate; Median nicht erreicht). Der Unterschied war statistisch hochsignifikant ($p < 0,0001$). Im Stadium II war eine Differenzierung aufgrund durchgängig hoher Expression nicht möglich. Im Stadium III war eine niedrige CD20-Expression ebenfalls mit einem signifikant ungünstigeren Verlauf assoziiert ($p < 0,001$).

Auch beim Gesamtüberleben zeigte sich eine prognostisch günstige Assoziation mit hoher CD20-Expression. Patienten mit niedrigen Werten wiesen ein mittleres Überleben von 40,96 Monaten (Median: 34,83 Monate) auf, während bei hoher Expression ein mittleres Überleben von 92,08 Monaten erreicht wurde (Median nicht berechenbar). Der Unterschied war auch hier hochsignifikant ($p < 0,001$). Die Auswertung legt nahe, dass eine niedrige CD20-Expression mit einer stärkeren Verdrängung des lymphatischen Gewebes durch metastasierendes Melanomgewebe korreliert und entsprechend mit einer schlechteren Prognose einhergeht.

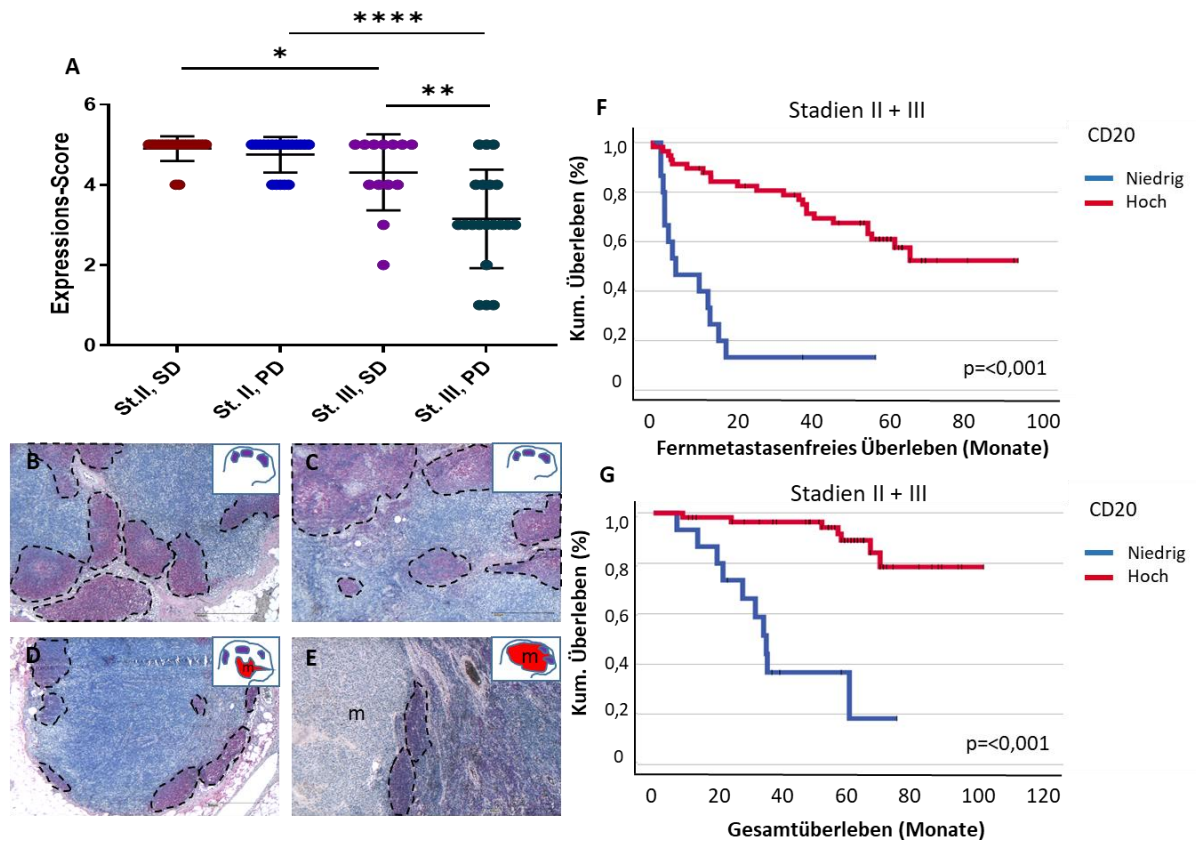


Abb. 20: Signifikanter Unterschied der CD20-Expression im Wächterlymphknoten im Vergleich von Stadium II und III-Melanompatienten. Bilder in 50-facher Vergrößerung. **A:** Grafische Darstellung der Scorewerte der Lymphknoten der Stadien II + III ohne und mit späterer Tumorprogression. Zur Signifikanzanalyse wurde der Mann-Whitney-Test verwendet, ein p-Wert <0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet. SD = Stable Disease (ohne Progression im Verlauf), PD = Progressive Disease (mit Progression im Verlauf). Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbungen für **B:** Stadium II ohne Progression, **C:** Stadium II mit Progression, **D:** Stadium III ohne Progression, **E:** Stadium III mit Progression. **F:** Kaplan-Meier-Analyse des fernmetastasenfreien Überlebens der Patienten mit einer niedrigen sowie einer hohen CD20-Expression. **G:** Kaplan-Meier-Analyse des Gesamtüberlebens der Patienten mit einer niedrigen sowie einer hohen CD20-Expression. Ein Score-Wert ≥ 4 wurde als hohe Expression eingestuft. Für die Kaplan-Meier-Analysen wurde der Log-rank-Test verwendet, ein p-Wert <0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet. m=Metastase.

4.5.5. CD45

In der Auswertung der qualitativen CD45-Expression im Lymphknoten-Stroma (ohne metastasäres Gewebe) ergab sich für die Lymphknoten aus Stadium II ohne Tumorprogression ein medianer Wert von 5,0 im Expressionsscore sowie ein Mittelwert von 4,9 bei n=20. Bei den untersuchten Lymphknoten desselben Stadiums mit einer späteren

Metastasierung zeigte sich im Expressionsscore ein Median von 4,0 und ein mittlerer Wert von 4,05 bei n=20 (s. Abb. 21).

Für das fernmetastasenfreie Überleben zeigte sich bei Patienten mit niedriger CD45-Expression (stadienübergreifend) ein deutlich ungünstigerer Verlauf (mittleres Überleben: 36,14 Monate; median: 15,05 Monate) im Vergleich zu Patienten mit hoher Expression (mittleres Überleben: 68,03 Monate; Median nicht erreicht, p < 0,001). Auch das Gesamtüberleben war bei

hoher CD45-Expression verlängert (89,08 vs. 67,18 Monate), wobei der Unterschied signifikant ausfiel ($p = 0,029$). In Analogie zu CD20 scheint auch die CD45-Expression negativ mit der lymphatischen Verdrängung durch Tumorgewebe zu korrelieren.

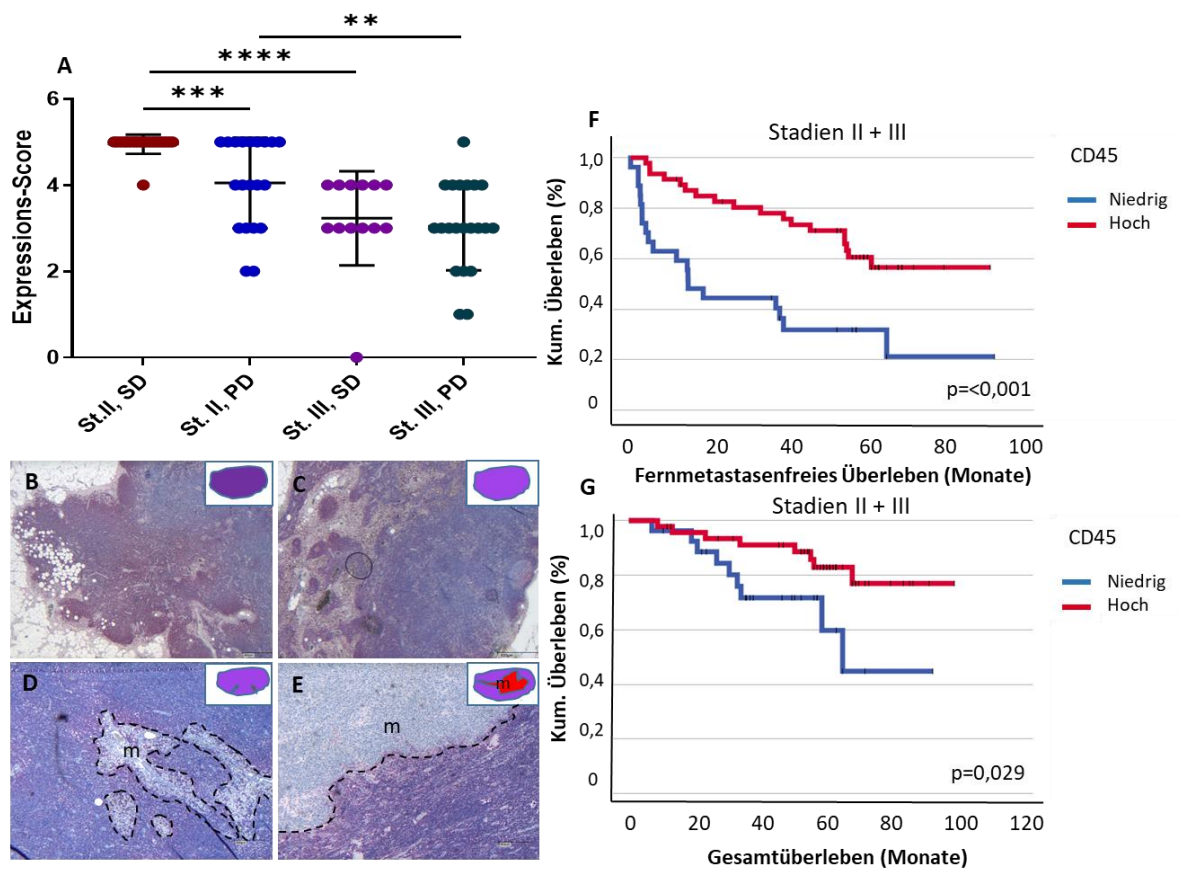


Abb. 21: Signifikanter Unterschied der CD45-Expression im Wächterlymphknoten im Vergleich von Stadium II und III-Melanompatienten. Bilder in 25-facher Vergrößerung. **A:** Grafische Darstellung der Scorewerte der Lymphknoten der Stadien II + III ohne und mit späterer Tumorprogression. Zur Signifikanzanalyse wurde der Mann-Whitney-Test verwendet, ein p-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet. SD = Stable Disease (ohne Progression im Verlauf), PD = Progressive Disease (mit Progression im Verlauf). Repräsentative Bilder der immunohistochemischen Färbungen für **B:** Stadium II ohne Progression, **C:** Stadium II mit Progression, **D:** Stadium III ohne Progression, **E:** Stadium III mit Progression. **F:** Kaplan-Meier-Analyse des fernmetastasenfreien Überlebens der Patienten mit einer niedrigen sowie einer hohen CD45-Expression. **G:** Kaplan-Meier-Analyse des Gesamtüberlebens der Patienten mit einer niedrigen sowie einer hohen CD45-Expression. Ein Score-Wert ≥ 4 wurde als hohe Expression eingestuft. Für die Kaplan-Meier-Analysen wurde der Log-rank-Test verwendet, ein p-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet. m=Metastase.

Bei stadienspezifischer Betrachtung zeigte sich insbesondere im Stadium II ein signifikanter Überlebensvorteil bei hoher CD45-Expression hinsichtlich des fernmetastasenfreien Überlebens (65,8 vs. 33,17 Monate; $p < 0,001$). Für das Gesamtüberleben sowie im Stadium III blieben die Unterschiede hingegen ohne statistische Signifikanz.

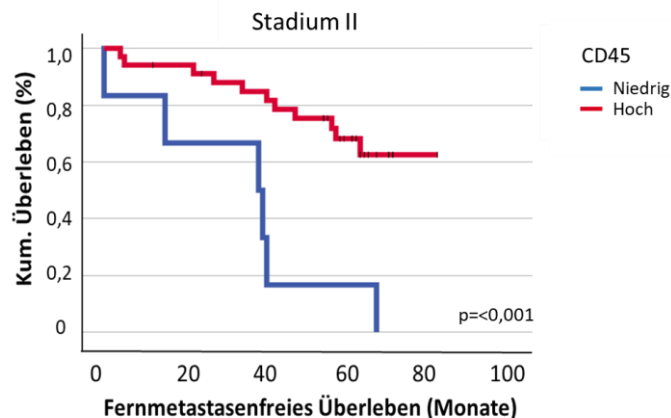


Abb. 22: Signifikanter Unterschied des fernmetastasenfreien Überlebens in Abhängigkeit von der CD45-Expression im Wächterlymphknoten im Stadium II. Kaplan-Meier-Analyse des fernmetastasenfreien Überlebens der Patienten mit einer niedrigen sowie einer hohen CD45-Expression. Ein Score-Wert ≥ 4 wurde als hohe Expression eingestuft. Für die Kaplan-Meier-Analysen wurde der Log-rank-Test verwendet, ein p-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet.

4.5.6. CD68

4.5.6.1. CD68 allgemein

Die Analyse der qualitativen CD68-Expression im Lymphknoten-Stroma (ohne metastasäres Gewebe) in Sentinel-Lymphknoten zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen Patientengruppen mit und ohne Tumorprogression. Im Stadium II wiesen Lymphknoten progressionsfreier Patienten einen medianen Expressionsscore von 2,0 (Mittelwert: 2,4) auf, während bei Patienten mit späterer Metastasierung ebenfalls ein Median von 2,0 und ein Mittelwert von 2,35 festgestellt wurde ($n = je\ 20$). Auch im Stadium III zeigte sich kein signifikanter Unterschied: Die Medianwerte lagen bei 3,0 (progressionsfrei, Mittelwert: 2,92, $n = 13$) bzw. 2,0 (mit Progression, Mittelwert 2,71, $n = 21$). Alle intra- und interstadienspezifischen Vergleiche zeigten keine statistisch signifikanten Differenzen (alle $p > 0,47$).

Auch in Bezug auf das Überleben zeigten sich keine relevanten Effekte. Für das fernmetastasenfreie Überleben lagen die mittleren Überlebenszeiten bei 57,06 Monaten (niedrige Expression) bzw. 55,87 Monaten (hohe Expression); die medianen Zeiten betragen 63 vs. 56 Monate ($p = 0,765$). Das mittlere Gesamtüberleben betrug 87,30 Monate bei niedriger und 73,63 Monate bei hoher CD68-Expression ($p = 0,311$); Medianwerte konnten nicht berechnet werden.

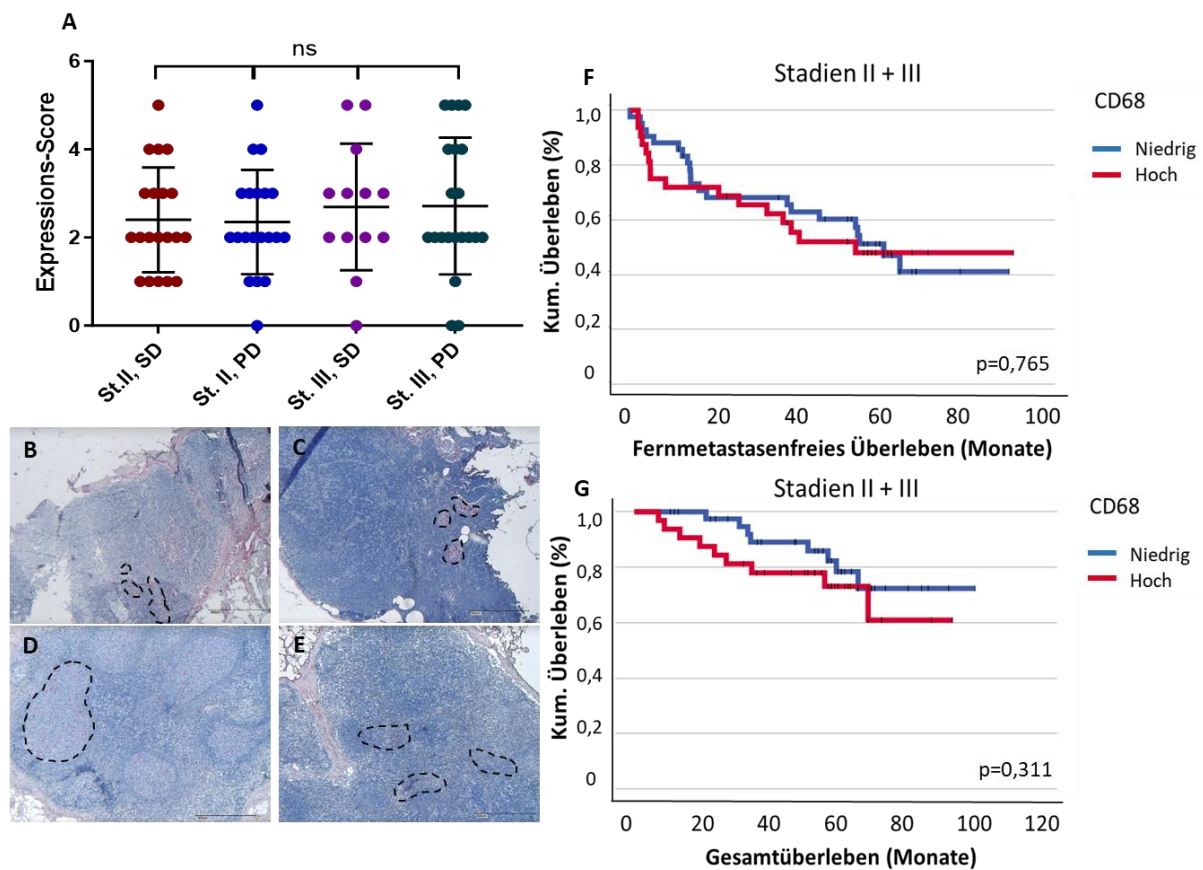


Abb. 23: Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen von CD68 im Wächterlymphknoten. Bilder in 50-facher Vergrößerung. **A:** Grafische Darstellung der Scorewerte der Lymphknoten der Stadien II + III ohne und mit späterer Tumorprogression. Zur Signifikanzanalyse wurde der Mann-Whitney-Test verwendet, ein p-Wert $<0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet. SD = Stable Disease (ohne Progression im Verlauf), PD = Progressive Disease (mit Progression im Verlauf). Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbungen für **B:** Stadium II ohne Progression. **C:** Stadium II mit Progression, **D:** Stadium III ohne Progression. **E:** Stadium III mit Progression. **F:** Kaplan-Meier-Analyse des fernmetastasenfreien Überlebens der Patienten mit einer niedrigen sowie einer hohen CD68-Expression. **G:** Kaplan-Meier-Analyse des Gesamtüberlebens der Patienten mit einer niedrigen sowie einer hohen C68-Expression. Ein Score-Wert ≥ 3 wurde als hohe Expression eingestuft. Für die Kaplan-Meier-Analysen wurde der Log-rank-Test verwendet, ein p-Wert $<0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet.

Separate Analysen für Stadium II und III bestätigten diesen Befund. Weder das fernmetastasenfreie noch das Gesamtüberleben waren in Abhängigkeit von der CD68-Expression signifikant unterschiedlich (alle $p > 0,44$). Insgesamt konnte somit kein prognostischer Einfluss der CD68-Expression auf die klinischen Verläufe der untersuchten Patienten nachgewiesen werden.

4.5.6.2. CD68 im subkapsulären Lymphknotenbereich

Die Analyse der CD68-Expression im subkapsulären Bereich der Sentinel-Lymphknoten ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen Patientengruppen mit und ohne Tumorprogression innerhalb der Stadien II ($p = 0,8964$) und III ($p = 0,1039$). Im Stadium II lag der Median bei 0,5 (Mittelwert: 1,15) in der progressionsfreien Gruppe und 0,0 (Mittelwert: 1,0) in der Gruppe mit Progression (jeweils $n = 20$). Im Stadium II wurde in der progressionsfreien Gruppe ein Median

von 0,0 und ein Mittelwert von 0,25 (n = 12) ermittelt, in der Gruppe mit Progression betrug der Median ebenfalls 0,0 bei einem Mittelwert von 0,9 (n = 20).

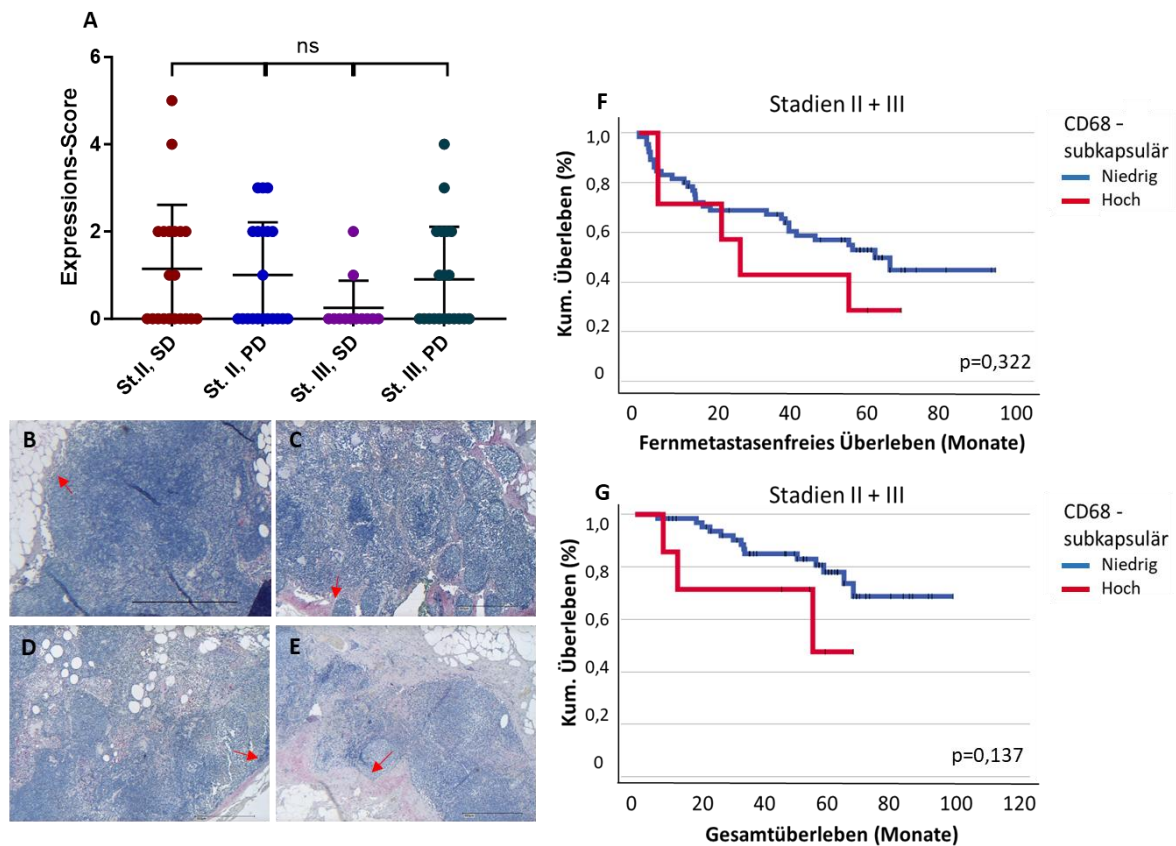


Abb. 24: Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen von CD68 im subkapsulären Bereich des Wächterlymphknotens. Bilder in 50-facher Vergrößerung. **A:** Grafische Darstellung der Scorewerte der Lymphknoten der Stadien II + III ohne und mit späterer Tumorprogression. Zur Signifikanzanalyse wurde der Mann-Whitney-Test verwendet, ein p-Wert $<0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet. SD = Stable Disease (ohne Progression im Verlauf), PD = Progressive Disease (mit Progression im Verlauf). Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbungen für **B:** Stadium II ohne Progression. **C:** Stadium II mit Progression, **D:** Stadium III ohne Progression. **E:** Stadium III mit Progression. **F:** Kaplan-Meier-Analyse des fernmetastasenfreien Überlebens der Patienten mit einer niedrigen sowie einer hohen subkapsulären CD68-Expression. **G:** Kaplan-Meier-Analyse des Gesamtüberlebens der Patienten mit einer niedrigen sowie einer hohen subkapsulären CD68-Expression. Ein Score-Wert ≥ 3 wurde als hohe Expression eingestuft. Für die Kaplan-Meier-Analysen wurde der Log-rank-Test verwendet, ein p-Wert $<0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet.

Ein nahezu signifikanter Unterschied zeigte sich zwischen den progressionsfreien Gruppen der Stadien II und III zugunsten höherer subkapsulärer Makropagenzahlen im Stadium II ($p = 0,0505$). Alle weiteren interstadienspezifischen Vergleiche – sowohl in progressionsfreien als auch in metastasierten Gruppen – blieben ohne statistische Signifikanz.

Auch hinsichtlich des fernmetastasenfreien Überlebens zeigte sich kein signifikanter Einfluss der subkapsulären CD68-Expression. Bei niedriger Expression betrug das mediane und mittlere Überleben 63 bzw. 57,55 Monate, bei hoher Expression 27 bzw. 36,43 Monate ($p = 0,322$). Das Gesamtüberleben zeigte sich ebenfalls nicht signifikant unterschiedlich (84,45 vs. 50,14 Monate, $p = 0,137$).

In der stratifizierten Analyse nach Tumorstadien war nur im Stadium III ein signifikanter Zusammenhang zwischen subkapsulärer CD68-Expression und Gesamtüberleben nachweisbar ($p = 0,041$). Hier zeigten Patienten mit niedriger subkapsulärer Expression ein mittleres Überleben von 70,49 Monaten, im Vergleich zu 35,32 Monaten bei hoher Expression. Das mediane Überleben bei hoher Expression lag bei 13,63 Monaten. Aufgrund der geringen Fallzahl ($n = 2$) ist dieser Befund jedoch mit Vorsicht zu interpretieren.

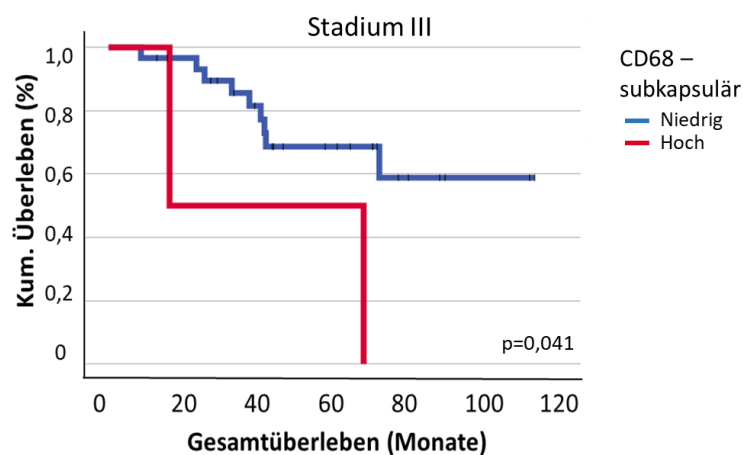


Abb 25: Signifikanter Unterschied des Gesamtüberlebens stratifiziert nach der Expressionsstärke des subkapsulär exprimierten CD68 im Stadium III. Kaplan-Meier-Analyse des Gesamtüberlebens der Patienten mit einer niedrigen sowie einer hohen subkapsulären CD68-Expression. Ein Score-Wert ≥ 3 wurde als hohe Expression eingestuft. Für die Kaplan-Meier-Analysen wurde der Log-rank-Test verwendet, ein p-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet.

4.5.7. Kollagenfärbungen

Im Rahmen der Auswertung kollagener Färbungen wurde das Ausmaß fibrotischer Reaktionen in den Sentinel-Lymphknoten der Stadien II und III systematisch untersucht. Die Analyse umfasste vier Parameter: fibrotische Reaktion, Kapselausbildung, intrametastasäre Kollagenausprägung und perimetastasäre Kapselbildung. Für die generelle fibrotische Reaktion ergaben sich im Stadium II mediane Scorewerte von 1,5 (Mittelwert: 1,65) bei progressionsfreien Patienten und 1,0 (Mittelwert: 1,55) bei Patienten mit späterer Metastasierung. Im Stadium III lagen die Medianwerte bei 1,0 (Mittelwert: 1,5) bzw. 2,0 (Mittelwert: 1,75). Keiner der Gruppenvergleiche erreichte statistische Signifikanz (alle $p > 0,5$).

Auch in der Überlebensanalyse zeigte das Ausmaß der fibrotischen Reaktion keinen signifikanten Einfluss auf das fernmetastasenfreie oder das Gesamtüberleben. Für Patienten mit geringer Kollagenexpression ergab sich ein medianes und mittleres fernmetastasenfreies Überleben von 57 bzw. 56,46 Monaten, bei hoher Expression lagen die Werte bei 67 bzw. 45,77 Monaten ($p = 0,965$). Beim Gesamtüberleben wurden Mittelwerte von 83,95 Monaten

(niedrig) und 65,16 Monaten (hoch) sowie ein Median von 70 Monaten für die Gruppe mit hoher Kollagenexpression berechnet ($p = 0,827$).

Subgruppenanalysen innerhalb der Stadien II und III ergaben ebenfalls keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des fernmetastasenfreien oder Gesamtüberlebens (alle $p > 0,39$). Insgesamt zeigte sich somit keine prognostische Relevanz der kollagenen fibrotischen Reaktion in Sentinel-Lymphknoten hinsichtlich des klinischen Verlaufs.

Die Analyse der Kollagenexpression in der Lymphknotenkapsel ergab im Stadium II mediane und mittlere Scorewerte von 3,0 und 2,55 bei progressionsfreien sowie 3,0 und 3,0 bei progressiven Verläufen. Im Stadium III lagen die Werte bei 3,0/2,9 (ohne Progression) und 3,0/2,5 (mit Progression). In keiner Gruppe zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Kollagenexpression der Kapsel (alle $p > 0,05$).

Bei der intrametastären Fibrosierung war der Median in beiden Gruppen 0,0. Der mittlere Score lag bei progressionsfreien Patienten bei 0,42 und bei Patienten mit späterer Metastasierung bei 1,25. Es zeigte sich ein tendenziell höherer Kollagenanteil bei Progression, jedoch ohne statistische Signifikanz ($p = 0,1158$).

Ähnlich zeigte die Analyse der perimetastären Kapselbildung höhere Scorewerte bei metastasierten Fällen (Median/Mittelwert: 1,5/1,65) im Vergleich zu progressionsfreien Verläufen (0,0/0,58), wobei auch hier kein signifikanter Unterschied festgestellt wurde ($p = 0,0802$, s. Abb. 27). Insgesamt lassen die Daten auf eine nicht signifikante Tendenz zu stärkerer kollagener Reaktion der Metastasen bei späterer Progression schließen, ohne dass eine klare statistische Evidenz für prognostische Relevanz vorliegt. Dies könnte darauf beruhen, dass es sich bei diesen Patienten um solche mit besonders großem Metastasendurchmesser im Wächterlymphknoten handelt.

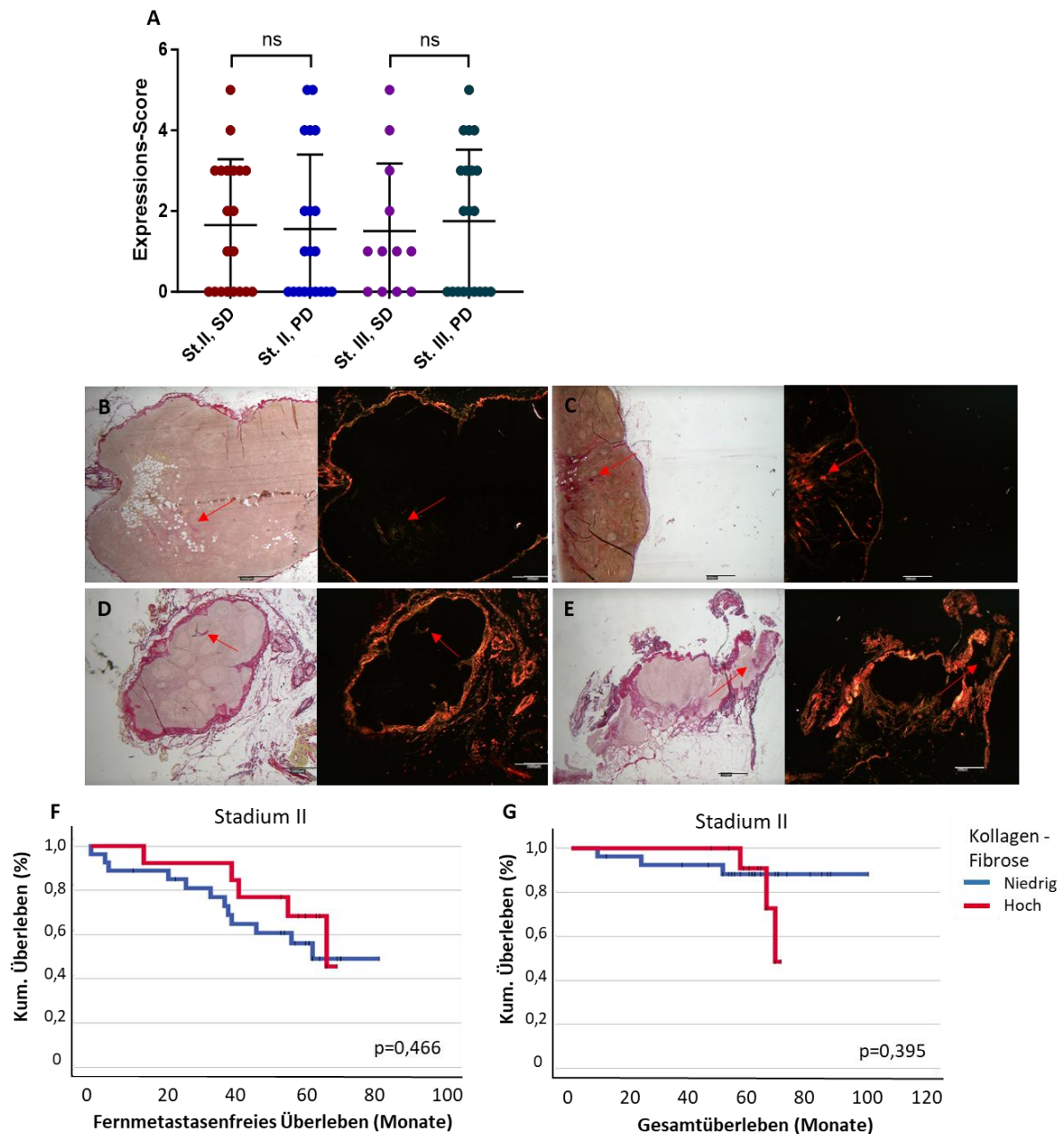


Abb. 26: Ergebnisse der histochemischen Untersuchungen des Kollagens in fibrotischen Reaktionen. Bilder in 12-facher Vergrößerung. Helle Bilder lichtmikroskopische Aufnahmen, dunkle Bilder entsprechende polarisationsmikroskopische Aufnahmen. **A:** Grafische Darstellung der Scorewerte der Lymphknoten der Stadien II + III ohne und mit späterer Tumorprogression. Zur Signifikanzanalyse wurde der Mann-Whitney-Test verwendet, ein p-Wert $<0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet. SD = Stable Disease (ohne Progression im Verlauf), PD = Progressive Disease (mit Progression im Verlauf). Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbungen für **B:** Stadium II ohne Progression. **C:** Stadium II mit Progression, **D:** Stadium III ohne Progression. **E:** Stadium III mit Progression. **F:** Kaplan-Meier-Analyse des fernmetastasenfreien Überlebens der Patienten mit einer niedrigen sowie einer hohen Kollagen-Expression in fibrotischen Reaktionen im Stadium II. **G:** Kaplan-Meier-Analyse des Gesamtüberlebens der Patienten mit einer niedrigen sowie einer hohen Kollagen-Expression in fibrotischen Reaktionen im Stadium II. Ein Score-Wert ≥ 3 wurde als hohe Expression eingestuft. Für die Kaplan-Meier-Analysen wurde der Log-rank-Test verwendet, ein p-Wert $<0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet.

4.6. Korrelation der (immun-)histochemischen Marker

Tab. A (Stadium II)

Korrelationen	Spearman (95%KI)	p-Werte
CD20/CD45	0,1905 (-0,1380;0,4812)	0,2391
CD20/CXCL10	0,1871 (-0,1415;0,4785)	0,2478
CD45/HAPLN1	0,1002 (-0,2360;0,4150)	0,5495
CD45/CXCL10	-0,02963 (-0,3464;0,2932)	0,8560
HAPLN1/Kol. Fibrose	0,3417 (0,01491;0,6025)	0,0358 (*)
HAPLN1/Kapsel	-0,05041 (-0,3727;0,2827)	0,7637

Tab. B (Stadium III)

Korrelationen	Spearman (95%KI)	p-Werte
CD20/CD45	0,5731 (0,2643;0,7753)	0,0008 (*)
CD20/Intramet.	-0,5722 (-0,7775;-0,2566)	0,0010 (*)
CD20/Met. Kapsel	-0,4586 (-0,7084;-0,1068)	0,0108 (*)
CD45/CXCL10	-0,06996 (-0,4231;0,3016)	0,7084
CD45/Intramet.	-0,5836 (-0,7842;-0,2725)	0,0007(*)
CD45/Met. Kapsel	-0,4303 (-0,6903;-0,07173)	0,0176(*)
HAPLN1/Kol. Fibrose	-0,2794 (-0,5885;0,1010)	0,1348
HAPLN1/Kapsel	0,02468 (-0,3484;0,3910)	0,8970
HAPLN1/ Intramet.	-0,1655 (-0,5046;0,2177)	0,4923
HAPLN1/Met. Kapsel	-0,1304 (-0,4773;0,2517)	0,4923

Tab. 3: Ergebnisse der Korrelation der (immun-)histochemischen Marker miteinander mittels Spearman-Test mit 95%-Konfidenzintervall und p-Wert. Tab. A: Korrelation im Stadium II. **Tab. B:** Korrelation im Stadium III. Kol. Fibrose = Kollagene Fibrose. Intramet. = Kollagen intrametastasär, Met. Kapsel = Kollagen in metastasären Kapseln. Statistisch signifikante P-Werte fett unterlegt dargestellt. Zur Signifikanzanalyse wurde der Spearman-Test verwendet, ein p-Wert <0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet.

Die Analyse der immunhistochemischen Marker zeigte im Stadium II lediglich eine signifikante positive Korrelation zwischen der HAPLN1-Expression und dem Ausmaß der Kollagenexpression innerhalb fibrotischer Reaktionen (Spearman $r = 0,3417$, 95%-KI: [0,015; 0,603], $p = 0,0358$, $n = 38$). Für alle weiteren Marker konnten in diesem Stadium keine signifikanten Zusammenhänge festgestellt werden.

Im Stadium III hingegen zeigten sich mehrere signifikante inverse Korrelationen. Zwischen CD20 und CD45 wurde ein negativer Zusammenhang beobachtet ($r = -0,5731$, 95 %-KI: $[-0,775; -0,264]$, $p = 0,0008$, $n = 31$). Ebenso bestand eine signifikante inverse Korrelation zwischen CD20 und intrametastasärem Kollagen ($r = -0,5722$, 95 %-KI: $[-0,778; -0,257]$, $p = 0,0010$, $n = 30$) sowie zwischen CD20 und perimetastasärem Kapselkollagen ($r = -0,4586$, 95 %-KI: $[-0,708; -0,107]$, $p = 0,0108$, $n = 30$).

Auch zwischen CD45 und intrametastasärem Kollagen wurde ein signifikanter inverser Zusammenhang festgestellt ($r = -0,5836$, 95 %-KI: $[-0,784; -0,273]$, $p = 0,0007$, $n = 30$), ebenso wie zwischen CD45 und der perimetastasären Kapselbildung ($r = -0,2794$, 95 %-KI: $[-0,690; -0,072]$, $p = 0,0176$). Zwischen CD45 und CXCL10 konnte hingegen keine signifikante Korrelation nachgewiesen werden ($p = 0,7084$, $n = 30$).

Insgesamt deuten die signifikanten Korrelationen – insbesondere zwischen CD20/CD45 und kollagenen Parametern – auf eine sehr wahrscheinliche Beeinflussung durch die Metastasengröße hin. Größere Metastasen gehen offenbar mit erhöhter Kollagenbildung und gleichzeitiger Verdrängung gesunden Lymphknotengewebes und somit damit verbundener Immunzellen wie CD20-positive Lymphozyten.

4.7. Statistische Auswertung der prognostischen Relevanz der klinisch-chemischen Laborparameter

4.7.1. Laktatdehydrogenase, Glukose und C-reaktives Protein

Für die vergleichende Analyse laborchemischer Parameter wurden die Patientenkohorten anhand von Tumorstadium, Progressionsstatus sowie dem Ulzerationsstatus (bei Stadium II ohne Progression) in fünf Gruppen unterteilt. Die medianen Laborwerte zeigten über alle Gruppen hinweg vergleichbare Ergebnisse: Der LDH-Wert ($n = 59$) bewegte sich zwischen 202 U/l und 232 U/l, die Glukosewerte ($n = 100$) lagen zwischen 95mg/dl und 101mg/dl, und der CRP-Wert ($n = 124$) betrug in allen Gruppen einheitlich 3,0mg/l. In keinem der Gruppenvergleiche zeigten sich signifikante Unterschiede hinsichtlich der analysierten Laborwerte (alle p -Werte $>0,05$), sodass keine laborchemischen Marker identifiziert werden konnten, die mit Progression, Stadium oder Ulzeration in Zusammenhang standen.

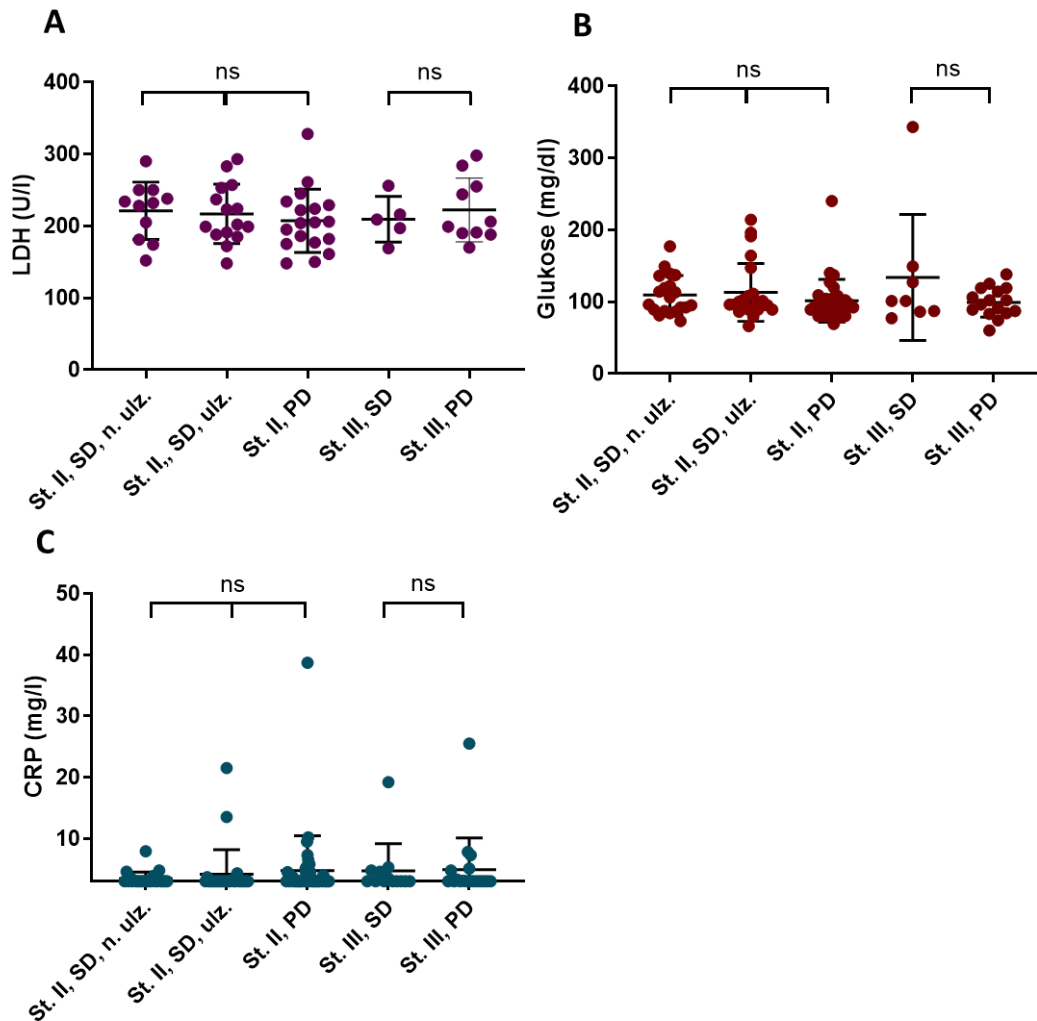


Abb. 28: Grafische Darstellung der klinisch-chemischen Parameter zum Zeitpunkt der SLND. A: Laktatdehydrogenase (n = 59) in U/l für die Subgruppen der Melanompatienten im Stadium II (n = 44); nicht ulzeriert und nicht metastasiert (n = 11), ulzeriert und nicht metastasiert (n = 15), mit Tumorprogression (n = 18). Stadium III (n = 15); ohne Tumorprogression (n = 5) und mit Tumorprogression (n = 10). **B:** Serum-Glukose (n = 100) in mg/dl für die Subgruppen der Melanompatienten im Stadium II (n = 76); nicht ulzeriert und nicht metastasiert (n = 20), ulzeriert und nicht metastasiert (n = 23), mit Tumorprogression (n = 33). Stadium III (n = 24); ohne Tumorprogression (n = 8) und mit Tumorprogression (n = 16). **C:** C-reaktives Protein (n = 124) in mg/l für die Subgruppen der Melanompatienten im Stadium II (n = 92); nicht ulzeriert und nicht metastasiert (n = 24), ulzeriert und nicht metastasiert (n = 27), mit Tumorprogression (n = 41), Stadium III (n = 32); ohne Tumorprogression (n = 13) und mit Tumorprogression (n = 19). Zur Signifikanzanalyse wurde der Mann-Whitney-Test verwendet, ein p-Wert <0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet.

4.7.2. S100B

Die Analyse der S100B-Konzentrationen erfolgte gruppenbasiert unter Einteilung in fünf Subgruppen: Stadium II-Patienten ohne Tumorprogression sowie hämatogen und lymphogen metastasierte Patienten, jeweils zum Zeitpunkt der Erstdiagnose und zum Zeitpunkt der Progression. Die mediane S100B-Konzentration lag bei nicht metastasierten Patienten (n = 10) bei 0,09 µg/l. Hämatogen metastasierte Patienten (n=16) wiesen mediane Werte von 0,07 µg/l (Erstdiagnose (n=8), bzw. 0,075 µg/l (Progression, n = 8) auf. Bei lymphogen metastasierten Patienten (n=15) wurden 0,09 µg/l (Erstdiagnose, n = 8) bzw. 0,11 µg/l (Progression, n = 7) gemessen. Sämtliche Gruppenvergleiche ergaben keine statistisch signifikanten Unterschiede (alle p-Werte > 0,05). Auch der direkte Vergleich zwischen Patienten mit (0,085 µg/l, n = 40) und ohne (0,09 µg/l, n = 51) Tumorprogression zum Zeitpunkt der Erstdiagnose zeigte keinen signifikanten Unterschied (p = 0,834). Eine prognostische Relevanz der S100B-Konzentration konnte somit in dieser Kohorte nicht nachgewiesen werden.

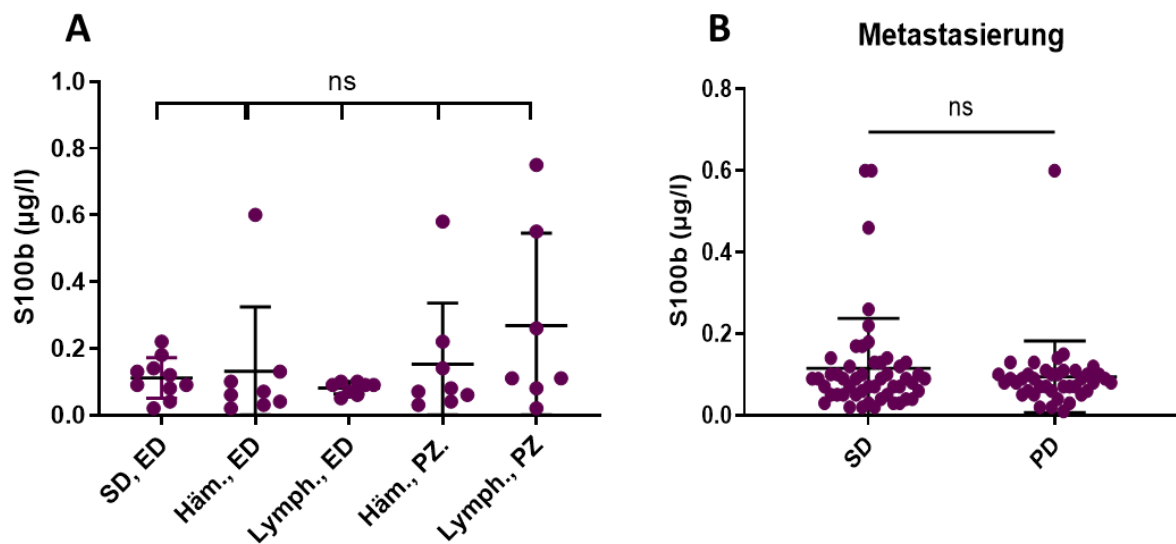


Abb. 29: Grafische Darstellung von S100B im Blut von Stadium II-Patienten. A: Messwerte von S100B (n = 41) in µg/l für die Subgruppen der Melanompatienten mit Stable Disease (SD, ohne Progression im Verlauf) zum Zeitpunkt der Erstdiagnose (n = 10), hämatogen metastasiert zum Zeitpunkt Erstdiagnose (n = 8), lymphogen metastasiert zum Zeitpunkt Erstdiagnose (n = 8), hämatogen metastasiert zum Zeitpunkt der Progression (n = 8) und lymphogen metastasiert zum Zeitpunkt der Progression (n = 7). **B:** S100B in µg/l in den Subgruppen der Melanompatienten ohne Tumorprogression (SD, n = 51) bei Erstdiagnose und mit Tumorprogression (PD, n = 40) zum Zeitpunkt der Erstdiagnose. Zur Signifikanzanalyse wurde der Mann-Whitney-Test verwendet, ein p-Wert <0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet. Beachte: Auf Grund der automatisierten Ausreißer-Identifikation variiert die Anzahl der untersuchten Patienten in beiden Grafiken (s. Material und Methoden.)

4.8. Stratifikation des Überlebens nach dem Serumspiegel von Laktatdehydrogenase, Glukose, C-reaktives Protein und S100B

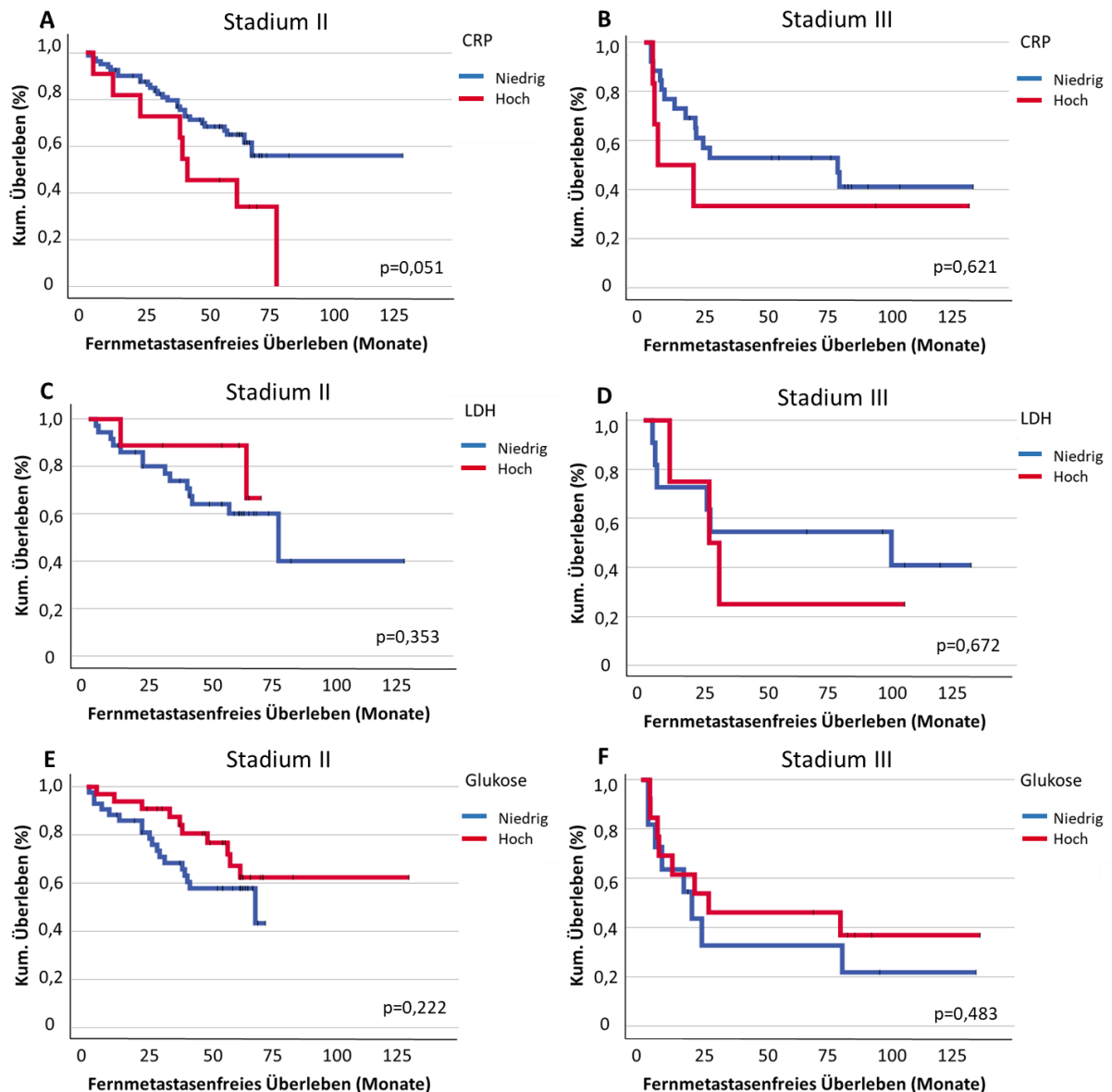


Abb. 30: Fernmetastasenfreies Überleben stratifiziert nach den Serumspiegeln von CRP, LDH und Glukose. A: CRP, Stadium II. **B:** CRP, Stadium III. **C:** LDH, Stadium II. **D:** LDH, Stadium III. **E:** Glukose, Stadium II. **F:** Glukose, Stadium III. Der Cut-off-Wert für einen hohen Serumspiegel lag bei 5mg/l (CRP), 250U/l (LDH) und 100mg/dl (Glukose). Zur Signifikanzanalyse wurde der Log-rank-Test verwendet, ein p-Wert <0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet.

Die Analyse des C-reaktiven Proteins (CRP) ergab für Patienten mit niedrigen CRP-Werten (<5,0 mg/l) ein signifikant längeres fernmetastasenfreies Überleben in den Stadien II und III kombiniert (median: 39 Monate; Mittelwert: 81,86 Monate vs. 43,97 Monate; $p = 0,034$). Im Stadium II zeigte sich ein ähnlicher Trend mit einem mittleren Überleben von 87,66 Monaten (niedrig) vs. 47,18 Monaten (hoch), wobei der Unterschied knapp unterhalb der Signifikanzgrenze lag ($p = 0,051$). Im Stadium III war der Unterschied zwischen niedrigen und hohen CRP-Werten nicht signifikant (74,42 vs. 65,75 Monate; $p = 0,621$). Für das Gesamtüberleben war bei niedrigen CRP-Werten in beiden Stadien kombiniert ein numerischer Vorteil erkennbar

(104,59 vs. 89,64 Monate), jedoch ohne statistische Signifikanz ($p = 0,107$). Auch in den Einzelstadien blieb der Unterschied statistisch nicht signifikant. Eine alternative Analyse mit einem Cut-off von 3,0 mg/l gemäß Schildbach et al. zeigte keine signifikanten Ergebnisse.

Die Analyse der Laktatdehydrogenase (LDH) ergab ebenfalls keinen signifikanten Unterschied im fernmetastasenfreien Überleben (niedrig: 72,54 Monate; hoch: 51,32 Monate; $p = 0,806$) oder im Gesamtüberleben (110,32 vs. 70,5 Monate; $p = 0,417$) für beide Stadien kombiniert. Auch in den Einzelanalysen für Stadium II (fernmetastasenfrei: 77,41 vs. 62,33 Monate; Gesamtüberleben: 116,9 vs. 79,0 Monate) und Stadium III (fernmetastasenfrei: 77,41 vs. 62,33 Monate; Gesamtüberleben: 58,71 vs. 40,55 Monate) zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede. Insgesamt war jedoch eine konsistente Tendenz zu einem ungünstigeren Verlauf bei erhöhtem LDH erkennbar.

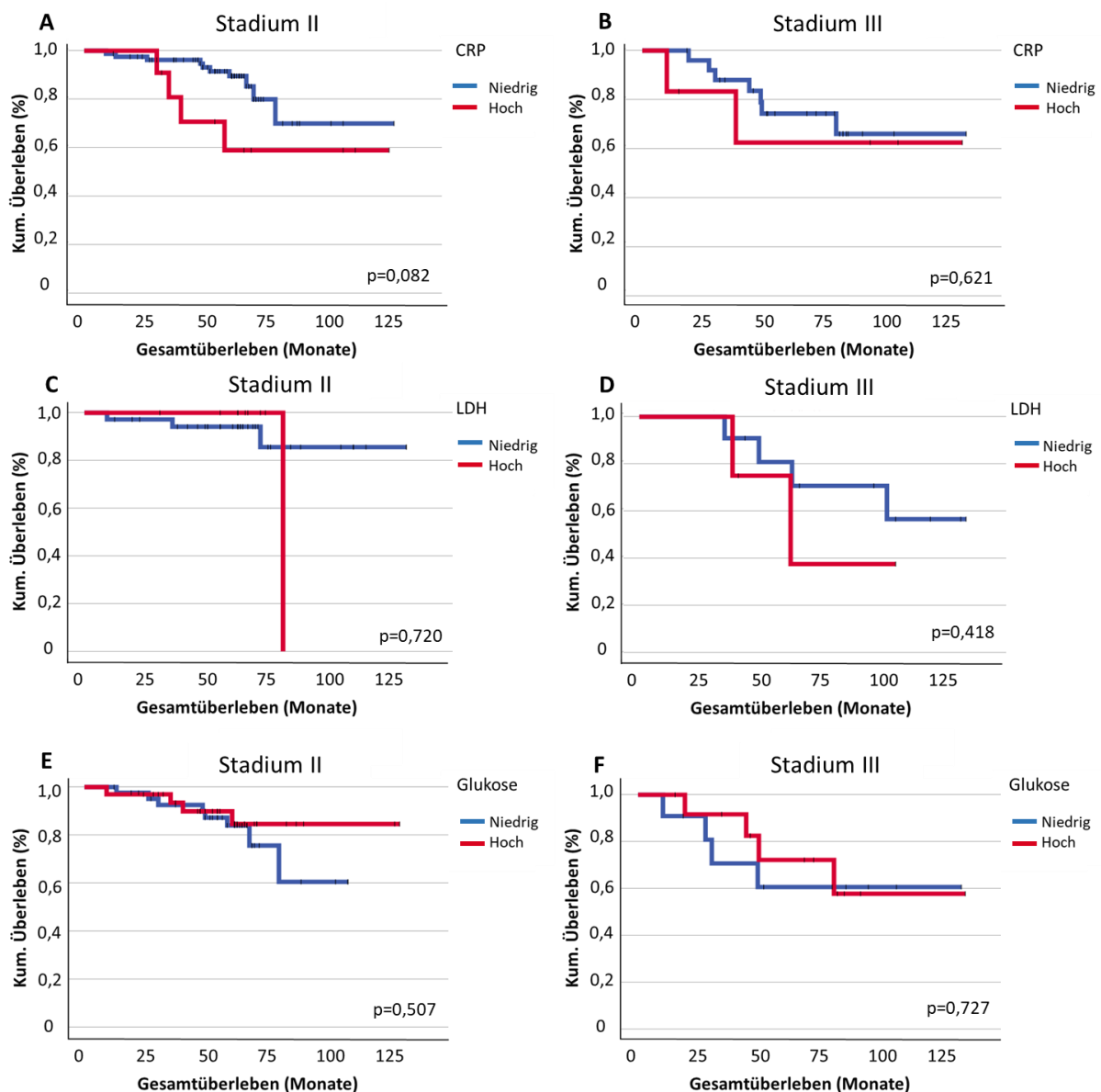


Abb. 31: Gesamtüberleben der Patienten stratifiziert nach den Serumspiegeln von CRP, LDH und Glukose. A: CRP, Stadium II. **B:** CRP, Stadium III. **C:** LDH, Stadium II. **D:** LDH, Stadium III. **E:** Glukose, Stadium II. **F:** Glukose, Stadium III. Der Cut-off-Wert für einen hohen Serumspiegel lag bei 5mg/l (CRP), 250U/l (LDH) und 100mg/dl (Glukose). Zur Signifikanzanalyse wurde der Log-rank-Test verwendet, ein p-Wert <0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet.

Die Analyse des Nüchtern-Glukosespiegels zeigte insgesamt keinen signifikant prognostischen Einfluss auf das fernmetastasenfreie oder Gesamtüberleben. Bei niedrigen Glukosewerten lag das mittlere fernmetastasenfreie Überleben bei 55,49 Monaten, während es bei hohen Werten 84,05 Monate betrug ($p = 0,303$). Das mittlere Gesamtüberleben betrug 85,62 Monate (niedrig) gegenüber 107,83 Monaten (hoch; $p = 0,649$).

In der Subgruppenanalyse für Stadium II war das fernmetastasenfreie Überleben bei niedrigen Glukosewerten mit 50,1 Monaten kürzer als bei hohen Werten (94,91 Monate), ohne statistische Signifikanz ($p = 0,222$). Das mittlere Gesamtüberleben betrug in dieser Gruppe 88,48 Monate (niedrig) vs. 114,41 Monate (hoch; $p = 0,507$). Im Stadium III zeigte sich kein signifikanter Unterschied für das fernmetastasenfreie Überleben (32,47 vs. 44,75 Monate; $p = 0,483$) oder das Gesamtüberleben (65,35 vs. 70,86 Monate; $p = 0,727$). Insgesamt deutete sich im Stadium II ein tendenziell günstigerer Verlauf bei höheren Glukosewerten an, während im Stadium III kein klarer Zusammenhang erkennbar war.

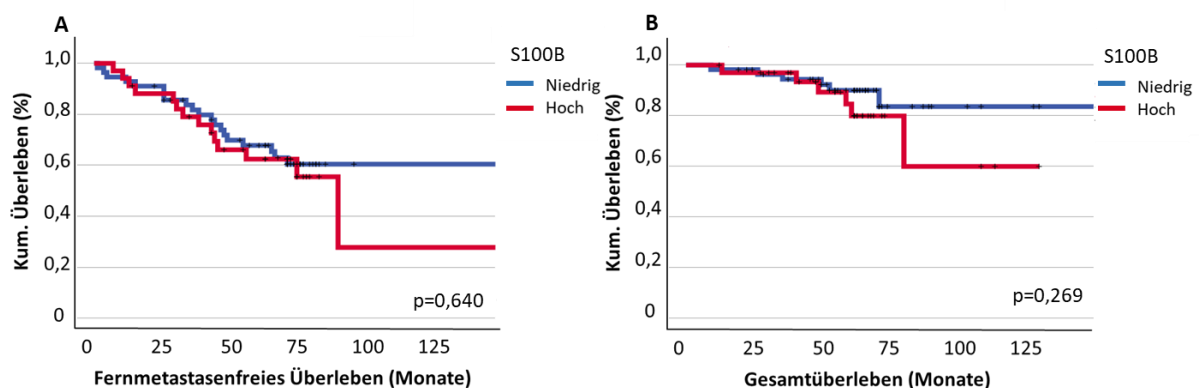


Abb. 32: Fernmetastasenfreies und Gesamtüberleben stratifiziert nach der Höhe des Tumormarkers S100B im Stadium II. A: Fernmetastasenfreies Überleben im Stadium II. **B:** Gesamtüberleben im Stadium II. Der Cut-off-Wert für einen hohen S100B-Serumspiegel lag bei 0,1µg/l. Zur Signifikanzanalyse wurde der Log-rank-Test verwendet, ein p-Wert <0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet.

Für den Tumormarker S100B zeigte sich bei Stadium-II-Patienten ein tendenziell günstigeres Outcome bei niedrigen Serumwerten (< 0,1 µg/l). Das mittlere fernmetastasenfreie Überleben lag bei 91,29 Monaten (niedriger Spiegel) gegenüber 71,39 Monaten (hoher Spiegel), ohne statistische Signifikanz ($p = 0,640$). Auch das mediane fernmetastasenfreie Überleben war bei niedrigen Werten länger (130 vs. 77 Monate). Beim Gesamtüberleben ergab sich ein vergleichbarer Trend: 137,64 Monate (niedrig) gegenüber 101,83 Monaten (hoch; $p = 0,269$). Das mediane Gesamtüberleben konnte für die Gruppe mit erhöhtem S100B-Spiegel nicht berechnet

werden. Die Analyse basierte ausschließlich auf Stadium-II-Patienten, da S100B-Werte für Stadium III nicht verfügbar waren (die Datenbank in der sie sich befanden, war für mich nicht zugänglich). Insgesamt zeigte sich keine statistisch signifikante, aber eine klinisch tendenzielle Assoziation zwischen erhöhtem S100B und ungünstigerem Verlauf.

5. Diskussion

5.1. Diskussion

In dieser Studie wurden serologische Marker (IL-4, IL-6, HAPLN1, CCL1, CCL21 und CXCL10) sowie Überlebensdaten bei Stadium-II-Melanompatienten mit und ohne Progression untersucht. Nur für CXCL10 zeigte sich ein signifikanter Unterschied: Patienten mit primär lymphogener Metastasierung wiesen zum Zeitpunkt der Metastasendiagnose signifikant höhere Serumspiegel auf als progressionsfreie Patienten. Für alle weiteren Marker konnten nach Ausschluss statistischer Ausreißer keine signifikanten Unterschiede identifiziert werden. Dennoch zeigten sich tendenzielle Erhöhungen von IL-6 bei hämatogen metastasierten Patienten, ein Befund, der mit früheren Berichten zu High-Risk-Melanomen übereinstimmt (14). Ebenso wiesen lymphogen metastasierte Patienten zum Progresszeitpunkt höhere CCL21-Werte auf als zum Zeitpunkt der Erstdiagnose.

Die Auswertung von IL-4 war durch technische Probleme limitiert – vermutlich bedingt durch gealterte Seren oder eine fehlerhafte Kalibrierung. Ein auffälliger Ausreißer wurde bei einem Patienten im Stadium IIC mit kurzfristig folgender Progression beobachtet, was auf einen möglichen prädiktiven Wert erhöhter IL-4-Spiegel hindeuten könnte (5, 14). Weitere Untersuchungen wären notwendig, um diesen Befund zu validieren.

Auch die HAPLN1-Analyse war methodisch eingeschränkt. Die fast durchweg negativen Serumwerte deuten auf ein Verdünnungsproblem im ELISA-Protokoll hin. Bemerkenswert ist, dass alle wenigen positiven Messwerte bei Patienten mit primär lymphogener Metastasierung gefunden wurden – im Einklang mit Literaturdaten, die HAPLN1 als Marker für lymphogene, jedoch nicht hämatogene Dissemination beschreiben (13). Drei dieser erhöhten Werte traten bereits bei Erstdiagnose auf, was auf ein potenzielles prädiktives Potenzial hinweist.

Die Aussagekraft der serologischen Analysen ist insgesamt durch die geringe Zahl an verfügbaren ELISA-Platten und damit limitierten Patientenzahlen eingeschränkt. Dennoch lassen die beobachteten Trends vermuten, dass Marker wie CCL21 und IL-6 bei größeren Kohorten potenziell prognostisch relevant sein könnten.

Die immunhistochemische Analyse ergab eine signifikant höhere HAPLN1-Expression im Lymphknotenstroma von Patienten im Stadium II verglichen mit Stadium III, was auf eine abnehmende Expression in fortgeschrittener Erkrankung hinweist. Im Gegensatz zu Ecker et al. (13) zeigte sich in dieser Studie jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen progressionsfreien und progredienten Patienten innerhalb eines Stadiums. Auch hinsichtlich des Überlebens ergaben sich für HAPLN1 keine signifikanten Unterschiede; tendenziell war jedoch eine

niedrigere Expression mit einem besseren fernmetastasenfreien und Gesamtüberleben assoziiert. Interessanterweise war eine höhere HAPLN1-Expression im Stadium III mit größeren Metastasen verbunden, was die Annahme einer Barrierefunktion in der extrazellulären Matrix stützen könnte (13). Unklar bleibt jedoch, ob die intrametastasäre HAPLN1-Expression aus verbliebenem Lymphknotenstroma oder neoplastischem Stroma stammt.

Für CCL21 ließ sich in dieser Arbeit kein Unterschied in der Expression zwischen Stadien oder Progressionsstatus nachweisen. Entgegen früherer Berichte (12) war eine höhere CCL21-Expression im Stadium II mit einem signifikant schlechteren Gesamtüberleben verbunden. Dieser Befund steht im Widerspruch zur angenommenen Rolle von CCL21 in der T-Zell-Rekrutierung und antitumoralen Immunantwort (12). Eine maschinengestützte Quantifizierung könnte helfen, die Aussagekraft der Scores künftig zu verbessern.

Die Analyse von CXCL10 zeigte eine signifikant höhere Expression im Stadium III im Vergleich zu Stadium II. Innerhalb von Stadium III zeigten Patienten ohne Progression die höchsten Expressionswerte, auch wenn der Unterschied nicht signifikant war. Im Stadium II war die CXCL10-Expression bei Patienten mit späterer Progression signifikant höher als bei progressionsfreien Patienten. Diese Ergebnisse stimmen mit den serologischen Befunden überein, bei denen lymphogen metastasierte Patienten signifikant höhere CXCL10-Werte aufwiesen. Da CXCL10 einen pro-inflammatorischen Marker darstellt, könnten die höheren Serumspiegel bei lymphogen metastasierten Patienten ein Indiz für eine Immunaktivierung sein (24). Dadurch könnte das Risiko einer hämatogenen Metastasierung möglicherweise niedriger sein. Ein Überlebensvorteil bei hoher CXCL10-Expression konnte jedoch nicht gezeigt werden. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu Studien, die CXCL10 als Marker für gutes Ansprechen auf Immuntherapie im Stadium IV identifizieren (24, 25). Da unsere Kohorte ausschließlich therapienaive Patienten umfasste, könnten unterschiedliche Therapiebedingungen und Tumorstadien die abweichenden Ergebnisse erklären. Auch der Zusammenhang zwischen CXCL10 und Tumorwachstum, wie in früheren Arbeiten postuliert (20), konnte nicht bestätigt werden.

Insgesamt deuten die Befunde darauf hin, dass CXCL10 im Stadium II bei lymphogener Progression potenziell relevant ist, ein klarer prognostischer Nutzen konnte jedoch für HAPLN1, CCL21 und CXCL10 in dieser Kohorte nicht belegt werden.

Die Analyse der Kollagen-I-Expression anhand vier definierter Kriterien (fibrotische Reaktion, Kapsel, perimetastasäre und intrametastasäre Kollagenbildung) ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Stadien II und III sowie zwischen progressionsfreien und progressiven Verläufen. Eine tendenziell stärkere Kollagenbildung bei Patienten mit Progression im Sta-

dium III könnte jedoch reaktiv auf größere Metastasen zurückzuführen sein. Ein direkter Vergleich zum Stadium II ist in Bezug auf intrametastasäres Kollagen aufgrund fehlender Metastasen definitionsgemäß nicht möglich (51).

Bei der immunhistochemischen Untersuchung zeigten sich deutliche Unterschiede in der Expression immunologischer Marker: CD20 war im Stadium II signifikant höher exprimiert als in Stadium III, insbesondere bei progressiven Verläufen. Dies dürfte vor allem auf die strukturelle Verdrängung der B-Zell-Kompartimente durch Metastasen im Stadium III zurückzuführen sein. Im Stadium II war eine höhere CD20-Expression nicht prognostisch relevant, steht jedoch im Einklang mit Studien, die eine immunologische Aktivierung in tumordrainierenden Lymphknoten vermuten (27). Eine höhere CD20-Expression war mit einem besseren fernmetastasenfreien und Gesamtüberleben assoziiert, vermutlich als Ausdruck einer intakteren Immunarchitektur (37). Eine weitere Differenzierung der B-Zellen nach antitumoraler Aktivität könnte sinnvoll sein, um zielführende prognostische Einflüsse von CD20-positiven Zellen im Wächterlymphknoten zu detektieren.

Auch der Leukozytenmarker CD45 (30) zeigte im Stadium II eine signifikant höhere Expression als im Stadium III und war bei Patienten mit späterer Progression bereits zum Zeitpunkt der SLND signifikant reduziert, wofür es bereits in anderen Arbeiten Hinweise gab (25). Dies spricht für eine frühzeitige Beeinträchtigung der antitumoralen Immunantwort und potenzielle prognostische Relevanz von CD45 im Stadium II (25, 30). Im Stadium III reduzierte sich die CD45-Expression mit dem zunehmenden Verlust lymphatischen Gewebes durch Metastasen, was die prognostische Aussagekraft einschränkt.

Die CD68-Analyse ergab, dass Patienten im Stadium II ohne Progression mehr subkapsuläre Makrophagen aufwiesen als progressionsfreie Patienten im Stadium III – ein nahezu signifikanter Unterschied. Eine hohe subkapsuläre CD68-Expression im Stadium III korrelierte signifikant mit einem schlechteren Gesamtüberleben, was in der Literatur mit einer invasionsfördernden Rolle subkapsulärer Makrophagen übereinstimmt (31). Aufgrund der geringen Fallzahl (n=2 bei hoher Expression) sind diese Ergebnisse jedoch vorsichtig zu interpretieren. Die potenzielle Funktion von Makrophagen im Tumormikromilieu erfordert eine genauere Differenzierung nach pro- und antitumoraler Aktivität sowie in M1- und M2-Subtypen, um ihre prognostische Aussagekraft besser einordnen zu können (52).

Die Korrelationsanalyse der Marker ergab im Stadium II nur eine signifikante Korrelation zwischen HAPLN1 und der fibrotischen Kollagenexpression – konsistent mit der Funktion von HAPLN1 in der extrazellulären Matrix (13). Für CXCL10 und CD45 konnte hingegen kein Zusammenhang gezeigt werden, welcher in anderen Arbeiten gezeigt wurde (24). Im Stadium III

korrelierten CD20 und CD45 stark miteinander sowie jeweils invers mit kollagenhaltigen Strukturen innerhalb und um Metastasen. Diese Beziehungen spiegeln vor allem die tumorbedingte Verdrängung immunologischer Zellkompartimente bei zunehmender Metastasierung wider. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen HAPLN1 und Kollagenexpression blieb im Stadium III aus, könnte aber bei größeren Fallzahlen nachweisbar sein (13).

Abbildung 33 visualisiert die Expressionsunterschiede immunohistochemischer Marker in den Sentinellymphknoten zwischen progressionsfreien und progredienten Patienten im Stadium II.

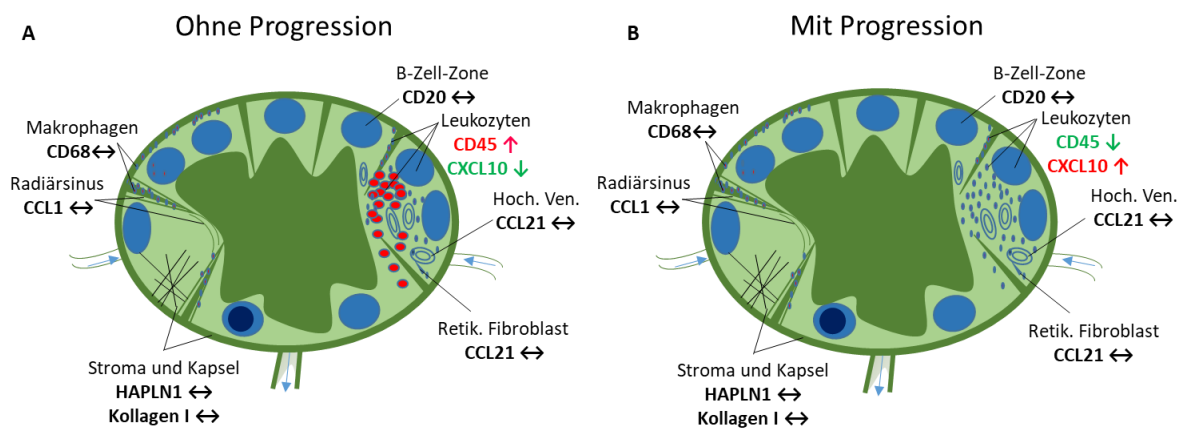


Abb. 33: Schematischer Vergleich der untersuchten Biomarker bei Patienten mit und ohne Melanomprogression im Stadium II. A: Schematischer Lymphknoten mit den untersuchten Biomarkern im Stadium II, ohne Tumorprogression. B: Schematischer Lymphknoten mit den untersuchten Biomarkern im Stadium II, mit Tumorprogression. Rot = Erhöhung, Grün = Erniedrigung.

In dieser Studie konnten für die Laborparameter LDH, CRP, Glukose und S100B keine signifikanten Unterschiede der Serumspiegel zwischen den Melanomstadien II und III sowie zwischen progressionsfreien und progressiven Verläufen festgestellt werden. Ein signifikanter Zusammenhang ergab sich jedoch für das CRP: Patienten mit erhöhten CRP-Werten zeigten ein signifikant schlechteres fernmetastasenfreies Überleben ($p = 0,034$). Im Stadium II war dieser Effekt nahezu signifikant ($p = 0,051$), was mit früheren Studienergebnissen übereinstimmt, die CRP als prädiktiven Marker für ein ungünstiges Outcome beschreiben (43). Der prognostische Wert im Stadium III war in dieser Kohorte aufgrund geringer Fallzahl ($n = 34$) und hoher Heterogenität nicht statistisch nachweisbar, deckt sich jedoch mit den Ergebnissen von Schildbach et al. (43).

Für LDH, Glukose und S100B ergaben sich keine signifikanten Überlebensunterschiede. Es zeigte sich jedoch eine Tendenz zu einem schlechteren Outcome bei niedrigen Glukosewerten im Stadium II (<100 mg/dl) sowie bei erhöhten Glukosespiegeln im Stadium III. Ein vergleichbarer Trend bestand für LDH, der mit einem tendenziell schlechteren Überleben assoziiert war, jedoch ohne statistische Signifikanz. In der Literatur ist die prognostische Relevanz von LDH

für das Stadium IV etabliert (37, 41, 42), während in den Stadien II und III keine signifikanten Unterschiede beobachtet wurden (53). Möglich ist, dass einzelne falsch-nicht-nüchterne Glukosemessungen das Ergebnis beeinflussten.

S100B zeigte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich Progression oder Überleben, was durch den Zeitpunkt der Blutabnahme (z. B. vor vollständiger Tumorresektion) beeinflusst sein könnte. Eine Assoziation von S100B mit der Tumorlast ist in höheren Stadien belegt (37, 40).

Das mittlere fernmetastasenfreie Überleben lag im Stadium II bei 59,97 Monaten, das Gesamtüberleben bei 90,41 Monaten. Im Stadium III betragen die Werte 45,31 und 68,81 Monate. Diese Ergebnisse reflektieren die schlechtere Prognose im Stadium III, wobei ausschließlich Patienten im Stadium IIIB und IIIC untersucht wurden (vgl. Kapitel 2.1.2.), sodass keine Aussage über das Stadium IIIA getroffen werden konnte. Die Überlebensverläufe entsprachen den Ergebnissen aus der Studie von Gershenwald et al. (54), was die Repräsentativität der Kohorte unterstreicht.

Zusammenfassend zeigten die Serumparameter in dieser Arbeit insgesamt nur geringe prognostische Aussagekraft. Lediglich das CRP-Niveau korrelierte signifikant mit dem fernmetastasenfreien Überleben. Im immunhistochemischen Kontext erwiesen sich eine erhöhte CXCL10-Expression und eine erniedrigte CD45-Expression im Stadium II als potenziell prognostisch ungünstig, ebenso wie eine hohe CCL21-Expression hinsichtlich des Gesamtüberlebens. Im Stadium III war eine vermehrte subkapsuläre Makrophagenanzahl mit einem signifikant schlechteren Gesamtüberleben assoziiert. Andere Marker im Stadium III zeigten überwiegend metastasengrößenabhängige Effekte und waren daher prognostisch schwer zu interpretieren (vgl. Abb. 34).

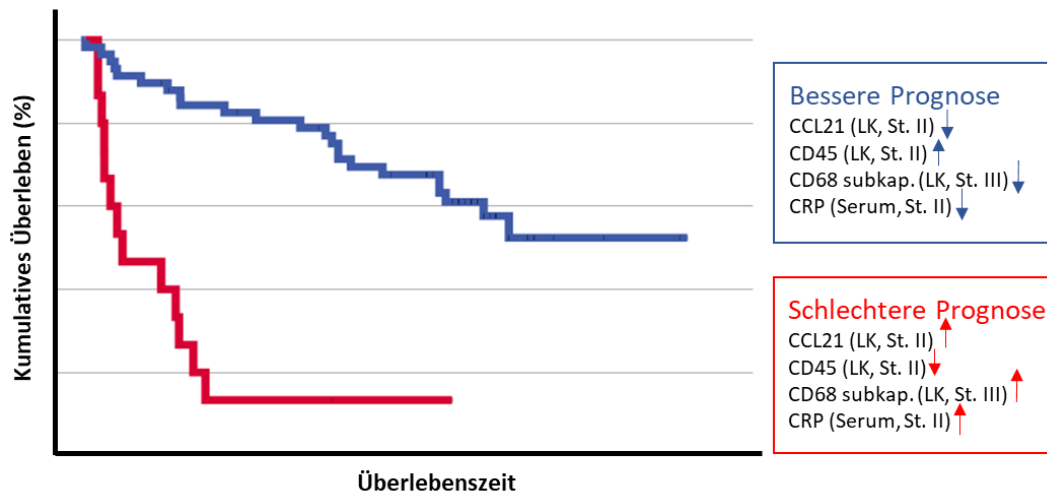


Abb. 34: Schematische Darstellung der in dieser Studie signifikant mit dem Überleben korrelierenden Biomarker. Blau: bessere Prognose. Rot: schlechtere Prognose. LK = Lymphknoten. St. = Stadium. Die Pfeile hinter den jeweiligen Markern geben eine Erhöhung/Erniedrigung der jeweiligen Konzentration/Expression an. Angabe mit dem betreffenden Stadium.

5.2. Chancen und Limitationen

Eine zentrale Limitation dieser Arbeit stellt die subjektive Bewertung der immunhistochemischen Färbungen dar. Trotz definierter Kriterien bleibt die qualitative Einschätzung interindividuell variabel. Eine standardisierte maschinelle Quantifizierung könnte hier objektivere und reproduzierbarere Ergebnisse liefern. Auch bei den serologischen Analysen ist die Aussagekraft eingeschränkt: Die geringe Anzahl verfügbarer Seren sowie deren lange Lagerung beeinflussen möglicherweise die Verlässlichkeit der Messergebnisse. Zudem waren die Messungen für IL-4 und HAPLN1 infolge technischer Probleme – insbesondere durch eine vermutlich zu starke Probenverdünnung – nicht verwertbar.

Hinsichtlich der untersuchten Lymphknoten bestand eine erhebliche Heterogenität bezüglich Größe, Metastasierungsgrad und Erhalt von Lymphknotengewebe. Diese Variation spiegelt zwar die klinische Realität wider, erschwert jedoch die Vergleichbarkeit. Eine gezieltere Auswahl homogener Lymphknotenproben hätte die interne Validität erhöhen können. Die Auswahl der untersuchten Fälle aus einer größeren Patientenkohorte birgt zudem ein gewisses Risiko für Selektionsbias.

Die geringe Fallzahl – insbesondere im Stadium III – limitiert die statistische Aussagekraft und erschwert multivariate Analysen. Diese wären jedoch notwendig gewesen, um die Unabhängigkeit signifikanter Marker von etablierten klinischen Prognosefaktoren zu prüfen. Eine externe Validierung an einer unabhängigen Kohorte wäre ebenfalls wünschenswert. Darüber hinaus ist die Interpretation der immunhistochemischen Ergebnisse im Stadium III aufgrund

der durch Metastasen bedingten Verdrängung von Lymphknotengewebe nur eingeschränkt möglich, während im Stadium II dieser Einfluss entfällt.

6. Literaturverzeichnis

1. G. Lodde, L. Zimmer et al. (2020): Malignant melanoma, In: Pathologe. May;41 (3), 281-292. doi: 10.1007/s00292-020-00776-x.
2. A. Krampe-Schneider, A. Forschner (2021): Malignes Melanom: schwarzer Hautkrebs, In: Deutsche Krebsgesellschaft, Onko-Internetportal: <https://www.krebsgesellschaft.de/onko-internetportal/basis-informationen-krebs/krebsarten/hautkrebs/malignes-melanom-schwarzer-hautkrebs.html>, zuletzt abgerufen am 04.04.2023.
3. N.A. Ipenburg, O.E. Nieweg, T. Ahmed et al. (2019): External validation of a prognostic model to predict survival of patients with sentinel node-negative melanoma. The British Journal of Surgery 2019; 106(10): 1319–26. doi: 10.1002/bjs.11262.
4. Onkologie L. S3 - Leitlinie zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms. J Dtsch Dermatol Ges Juli 2020; 18(10).
5. J.J. Luke, P.A. Ascierto, M.S. Carlino et al. (2020): KEYNOTE-716: Phase III study of adjuvant pembrolizumab versus placebo in resected high-risk stage II melanoma. Future Oncol 2020; 16(3): 4429–38. doi: 10.2217/fo-2019-0666.
6. J.J. Luke, P. Rutkowski, P. Queirolo et al. (2022): Pembrolizumab versus placebo as adjuvant therapy in completely resected stage IIB or IIC melanoma (KEYNOTE-716): a randomised, double-blind, phase 3 trial. The Lancet 2022; 399(10336): 1718–29 Link: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(22\)00562-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)00562-1) [PMID: 35367007 (zuletzt abgerufen am 25.09.2023)].
7. D. Berger (2022): Daten vom ASCO 2022, die die Praxis verändern. In: Fo Hämatol Onkol 2022; 25(9): 56. Link: <https://doi.org/10.1007/s15004-022-9184-2> (zuletzt abgerufen am 14.10.2023).
8. J. M. Kirkwood, M. Del Vecchio et al. (2023): Adjuvant nivolumab in resected stage IIB/C melanoma: primary results from the randomized, phase 3 CheckMate 76K trial. In: Nat Med. 2023 Nov; 29(11): 2835-2843. doi: 10.1038/s41591-023-02583-2.
9. CHMP. Keytruda, INN-pembrolizumab, in den Fachinformationen der EMA https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/keytruda-epar-product-information_de.pdf (zuletzt abgerufen am 20.09.2023).
10. M.A. Khattak, J.J. Luke, G.V. Long et al. Health-related quality of life (HRQoL) with pembrolizumab (pembro) in resected high-risk stage II melanoma in the phase 3 KEYNOTE-716 study. JCO 2022; 40(16_suppl): 9581 (https://doi.org/10.1200/JCO.2022.40.16_suppl.9581).
11. R. Reschke, A. H. Enk et al. (2024): Prognostic Biomarkers in Evolving Melanoma Immunotherapy. In: American Journal of Clinical Dermatology, 2024 Dec. 21, Vol. 26, 213-223. In: link.springer.com, <https://link.springer.com/article/10.1007/s40257-024-00910-y> (zuletzt abgerufen am 28.03.2025).
12. H. Takeuchi, A. Fujimoto et al. (2004): CCL21 Chemokine Regulates Chemokine Receptor CCR7 Bearing Malignant Melanoma Cells. In: Clinical Cancer Research, Vol. 10, 2351-58. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-03-0195.

13. B. Ecker, A. Kaur et al. (2018): Age-Related Changes in HAPLN1 Increase Lymphatic Permeability and Affect Routes of Melanoma Metastasis. In: *Cancer Discovery*, January 2019, 82-95. doi: 10.1158/2159-8290.CD-18-0168.
14. F. Mancuso, S. Lage et al. (2020): Serum markers improve current prediction of metastasis development in early-stage melanoma patients: a machine learning-based study, In: *Molecular Oncology* 14, 1705-1718. doi: 10.1002/1878-0261.12732.
15. J.S. Kang, Y. Kawakami et al. (2008): Molecular cloning and developmental expression of a hyaluronan and proteoglycan link protein gene, *crtl1/hapln1*, in zebrafish. In: *Zoological science* 25, 912-8. doi: 10.2108/zsj.25.912.
16. J.M. Karjalainen, R.H. Tammi et al. (2000): Reduced level of CD44 and hyaluronan associated with unfavorable prognosis in clinical stage I cutaneous melanoma. In: *Am J Pathology* 157, 957-65. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64608-1.
17. M.D. Gunn, S. Kyuwa, C. Tam et al. (1999): Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization. In: *J Exp Med* 199;189:451-60. doi: 10.1084/jem.189.3.451.
18. H.E. Wiley, E.B. Gonzales et al. (2001): Expression of CC chemokine receptor-7 and regional lymph node metastasis of B16 murine melanoma. In: *National Cancer Institute* 93, 1638-43. doi: 10.1093/jnci/93.21.1638.
19. A.F. Chambers, A.C. Groom, I.C. MacDonald (2002): Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. In: *Nat Rev Cancer* 2002;2:563-72. doi: 10.1038/nrc865.
20. S. Das, E. Sarrou et al. (2013): Tumor cell entry into the lymph node is controlled by CCL1 chemokine expressed by lymph node lymphatic sinuses. In: *Journal of Experimental Medicine* 210, 1509-28. doi: 10.1084/jem.20111627.
21. J. Van Snick, F. Houssiau et al. (1996): I-309/T cell activation gene-3 chemokine protects murine T cell lymphomas against dexamethasone-induced apoptosis. In: *J. Immunol.* 157, 2570-76. Link: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8805659/> (zuletzt abgerufen am 13.03.2024).
22. P. Schaerli, L. Ebert, K. Willmann et al. (2004): A skin-selective homing mechanism for human immune surveillance T cells. *J. Exp. Med.* 199:1265-1275. Link: <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20032177> (zuletzt abgerufen am 13.03.2024).
23. M. Gombert, M.C. Dieu-Nosjean, F. Winterberg et al., (2005): CCL1-CCR8 interactions: an axis mediating the recruitment of T cells and Langerhans-type dendritic cells to sites of atopic skin inflammation. *J. Immunol.* 174:5082-5091. doi: 10.4049/jimmunol.174.8.5082.
24. R. Reschke, J. Yu et al. (2021): Immune cell and tumor cell-derived CXCL10 is indicative of immunotherapy response in metastatic melanoma. In: *J Immunother Cancer*, Vol. 9. doi: 10.1136/jitc-2021-003521.
25. F. Antonicelli, J. Lorin, S. Kurdykowski (2011): CXCL10 reduces melanoma proliferation and invasiveness in vitro and in vivo: CXCL10 and melanoma progression. *BR J Dermatol* 2011; 164:720-8. doi: 10.1111/j.1365-2133.2010.10176.x.
26. G. Pavlasova, M. Mraz (2020): The regulation and function of CD20: an "enigma" of B-cell biology and targeted therapy. In: *Haematologica.* 2020 Jun;105(6): 1494-1506. doi: 10.3324/haematol.2019.243543.

27. A.D. Therien, G.M. Beasley et al. (2022): Spatial biology analysis reveals B cell follicles in secondary lymphoid structures may regulate anti-tumor responses at initial melanoma diagnosis, In: *Frontiers in Immunology*, 13:952220. doi: 10.3389/fimmu.2022.952220. eCollection 2022.
28. T.E. Grotz, J.W. Jakub et al. (2015): Evidence of Th2 polarization of the sentinel lymph node (SLN) in melanoma. *Oncoimmunology* (2015). 4:e1026504. doi: 10.1080/2162402X.2015.1026504.
29. A. Ruddell, M.I. Harrell et al. (2011): B Lymphocytes Promote Lymphogenous Metastasis of Lymphoma and Melanoma. In: *Neoplasia* (2011), 13, 748-757. doi: 10.1593/neo.11756.
30. A. Rheinländer, B. Schraven et al. (2018): CD45 in human physiology and clinical medicine. In: *Immunol Lett.* 2018 Apr;196:22-32. doi: 10.1016/j.imlet.2018.01.009.
31. M. Messaoudene, A. Perier et al. (2015): Characterization of the Microenvironment in Positive and Negative Sentinel Lymph Nodes from Melanoma Patients. In: *PLoS ONE* 10(7): e0133363. doi: 10.1371/journal.pone.0133363.
32. I. House, P. Savas et al. (2020): Macrophage-Derived CXCL9 and CXCL10 are required for antitumoral immune responses following immune checkpoint blockade. In: *Clin Cancer Res*; 26: 487-504. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-19-1868.
33. M. Sade-Feldman, K. Yizhak et al. (2018): Defining T cell states associated with response to checkpoint immunotherapy in melanoma. In: *Cell*; 175:998-1013. doi: 10.1016/j.cell.2018.10.038.
34. U. Welsch, W. Kummer et al. (2014): *Lehrbuch Histologie*, 4. Auflage, In: Urban&Fisher; Elsevier, SS. 102-114 & 284-290.
35. S. Bhattacharjee, F. Hamberger et al. (2021): Tumor restriction by type I collagen opposes tumor-promoting effects on cancer-associated fibroblasts. In: *J Clin Invest.*, Jun 1;131(11). doi: 10.1172/JCI146987.
36. L. Rich, P. Whittaker (2005): Collagen and Picrosirius Red Staining: A Polarized Light Assessment of Fibrillar Hue and Spatial Distribution. In: *Braz. J. morphol. Sci.* 2005, 22(2), 97-104, ISSN: 0102-9010.
37. A. Fernandez-Flores (2012): Prognostic factors for melanoma progression and metastasis: from Hematoxylin-Eosin to genetics. In: *Romanian Journal of Morphology & Embryology*, 2012, 53(3):449-459, ISSN online: 2066-8279.
38. R. Gaynor, R. Irie et al. (1980): S100 protein is present in cultured human malignant melanomas. In: *Nature*, 1980, 286(5771):400-401.
39. H.D. Abraha, L.C. Fuller et al. (1997): Serum S-100 protein. A potentially useful prognostic marker in cutaneous melanoma. In: *Br J Dermatol*, 1997, 137(3):381-385.
40. L.H. Smit, C.M. Korse et al. (2005): Normal values of serum S-100B predict prolonged survival for stage IV melanoma patients. In: *Eur J Cancer*, 2005, 41(3):386-392.
41. B.R. Hill, C. Levi (1954): Elevation of a serum component in neoplastic disease. In: *Cancer Research*, 1954, 14(7):513-515.
42. O. Eton, S.S. Legha et al. (1998): Prognostic factors for survival of patients treated systemically for disseminated melanoma. In: *J Clin Oncol*, 1998, 16(3):1103-1111.

43. V. Schildbach, S. Horn et al. (2023): C-Reactive Protein and Lymphocyte-to-Monocyte Ratio Predict Recurrence in Stage III Melanoma Patients with Microscopic Sentinel Lymph Node Metastasis. In: *Cancers*, 15, 702. doi: 10.3390/cancers15030702.
44. E. Mullarky, K.R. Mattaini et al. (2011): PHGDH amplification and altered glucose metabolism in human melanoma. In: *Pigment Cell Melanoma Res.*, 2011, Dec;24(6):1112-5. doi: 10.1111/j.1755-148X.2011.00919.x.
45. O. Warburg (1956): On the origin of cancer cells. In: *Science* 123, 309–314. doi: 10.1126/science.123.3191.309.
46. S. Aydin (2015): A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. In: *Peptides*, ELSEVIER, Vol. 72: 4-15. doi: 10.1016/j.peptides.2015.04.012.
47. H.M. Hussaini, B. Seo, A.M. Rich (2023): Immunohistochemistry and Immunofluorescence, In: *Methods Mol Biol.*, 2588: 439-450. doi: 10.1007/978-1-0716-2780-8_26.
48. S. Pavri, J. Clune et al. (2016): Malignant Melanoma: Beyond the Basics. In: *Plast Reconstr Surg.*, 138(2):330-340. doi: 10.1097/PRS.0000000000002367.
49. F. Antwerpes et al. (2024): DocCheck Flexikon, Laborparameter, In: Doccheck.com, <https://flexikon.doccheck.com/de/Kategorie:Laborparameter> (zuletzt abgerufen am 13.03.2024).
50. Buscher et al. (2024): Blutwerte Pro, Laborlexikon, In: laborwerte-app.de, <https://www.laborwerte-app.de/laborlexikon/> (zuletzt abgerufen am 13.03.2024).
51. C.M. Balch, J.E. Gershenwald et al. (2009): Final Version of 2009 AJCC Melanoma Staging and Classification. In: *J. Clin. Oncol.*, 2009 Dec. 20; 27(36): 6199-6206. doi: 10.1200/JCO.2009.23.4799.
52. A.J. Boutilier, S.F. ElSawa et al. (2021): Macrophage Polarization States in the Tumor Microenvironment, In: *International Journal of Molecular Sciences*, 22(13):6995. doi: 10.3390/ijms22136995.
53. M. V. de Lecea, T. Palomares et al. (2017): Indoleamine 2,3 dioxygenase as a prognostic and follow-up marker in melanoma. A comparative study with LDH and S100B. In: *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 2017 April 31(4):636-642. doi: 10.1111/jdv.13968.
54. J. E. Gershenwald, R. A. Scolyer et al. (2018): Melanoma Staging: Evidence-Based Changes in the American Joint Committee on Cancer Eighth Edition Cancer Staging Manual. In: *CA Canver J Clin*, 2017 Oct 13; 67(6): 472-492. doi: 10.3322/caac.21409.

7. Anhang

7.1. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Darstellung eines schematischen Lymphknotens und der histologischen Lokalisation der untersuchten Biomarker.

Abb. 2: Flussdiagramm mit dem Studiendesign.

Abb. 3: Darstellung repräsentativer Scorebilder für die Expression der Marker CD20, CD45, CD68 allgemein und speziell im subkapsulären Lymphknotenbereich.

Abb. 4: Darstellung repräsentativer Scorebilder für die Expression von HAPLN1 (Stroma und Metastasen), CCL21 und CXCL10.

Abb. 5: Darstellung repräsentativer Scorebilder für die Kollagen-I-Expression.

Abb. 6: Darstellung repräsentativer Scorebilder für die metastasäre Kollagen-I-Expression in Bezug auf die perimetastasäre Kapselbildung und intrametastasäre Fibrosierung.

Abb. 7: Darstellung des fernmetastasenfreien Überlebens in Monaten.

Abb. 8: Darstellung des Gesamtüberlebens in Monaten.

Abb. 9: Konzentrationsverteilung der Messwerte von Interleukin-6.

Abb. 10: Konzentrationsverteilung der Messwerte von CCL1.

Abb. 11: Konzentrationsverteilung der Messwerte von CCL21.

Abb. 12: Konzentrationsverteilung der Messwerte von CXCL10.

Abb. 13: Konzentrationsverteilung der Messwerte von HAPLN1.

Abb. 14: Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen von CCL21 im Wächterlymphknoten.

Abb. 15: Signifikanter Unterschied des Gesamtüberlebens bei CCL21 im Stadium II.

Abb. 16: Signifikanter Unterschied der CXCL10-Expression im Wächterlymphknoten im Vergleich von Stadium II und III-Melanompatienten.

Abb. 17: Signifikanter Unterschied der HAPLN1-Expression im Wächterlymphknoten im Vergleich von Stadium II und III-Melanompatienten.

Abb. 18: Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen von HAPLN1 im Stroma nach Alter und Stadien.

Abb. 19: Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen von HAPLN1 in den Metastasen.

Abb. 20: Signifikanter Unterschied der CD20-Expression im Wächterlymphknoten im Vergleich von Stadium II und III-Melanompatienten.

Abb. 21: Signifikanter Unterschied der CD45-Expression im Wächterlymphknoten im Vergleich von Stadium II und III-Melanompatienten.

Abb. 22: Signifikanter Unterschied des fernmetastasenfreien Überlebens in Abhängigkeit von der CD45-Expression im Wächterlymphknoten im Stadium II.

Abb. 23: Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen von CD68 im Wächterlymphknoten.

Abb. 24: Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen von CD68 im subkapsulären Bereich des Wächterlymphknotens.

Abb. 25: Signifikanter Unterschied des Gesamtüberlebens stratifiziert nach der Expressionsstärke des subkapsulär exprimierten CD68 im Stadium III.

Abb. 26: Ergebnisse der histochemischen Untersuchungen des Kollagens in fibrotischen Reaktionen.

Abb. 27: Ergebnisse der histochemischen Untersuchungen des Kollagens in der Lymphknotenkapsel, im intrametastasären Bereich sowie in perimetastasären Kapseln.

Abb. 28: Grafische Darstellung der klinisch-chemischen Parameter zum Zeitpunkt der SLND.

Abb. 29: Grafische Darstellung von S100B im Blut von Stadium II-Patienten.

Abb. 30: Fernmetastasenfreies Überleben stratifiziert nach den Serumspiegeln von CRP, LDH und Glukose.

Abb. 31: Gesamtüberleben der Patienten stratifiziert nach den Serumspiegeln von CRP, LDH und Glukose.

Abb. 32: Fernmetastasenfreies und Gesamtüberleben stratifiziert nach der Höhe des Tumormarkers S100B im Stadium II.

Abb. 33: Schematischer Vergleich der untersuchten Biomarker bei Patienten mit und ohne Melanomprogression im Stadium II.

Abb. 34: Schematische Darstellung der in dieser Studie signifikant mit dem Überleben korrelierenden Biomarker.

7.2. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Tumor- und Patientencharakteristika der in dieser Studie eingeschlossenen Patienten.

Tab. 2: Tumor- und Patientencharakteristika der Patienten, deren Lymphknotengewebe immunhistochemisch untersucht wurde.

Tab. 3: Ergebnisse der Korrelation der immunhistochemischen Biomarker miteinander mittels Spearman-Test mit 95%-Konfidenzintervall und p-Wert.