

**Aus der Universitäts-Hautklinik
Tübingen**

**Untersuchungen zur Wachstumskontrolle beim
Melanom**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Berdel, Julia Denise

2019

Für meine Familie

Dekan: Professor Dr. I.B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. M. Röcken

2. Berichterstatter: Professor Dr. B. Sipos

Datum der Promotion: 28.05.2019

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Der Tumorbegriff und Tumoren der Haut.....	1
1.2 Melanome.....	2
1.2.1 Epidemiologie.....	2
1.2.2 Pathogenese und Mechanismen der Tumorgenese.....	2
1.2.3 Diagnostik: Histologie des Melanoms und Subtypen.....	4
1.2.4 Stadieneinteilung und Prognose.....	7
1.2.5 Therapie.....	12
1.3 Mechanismen der Tumorkontrolle und Regression.....	15
1.3.1 Progression versus Regression in Melanomen.....	15
1.3.2 Vertikale versus horizontale Wachstumsphase.....	16
1.3.3 Tumorsuppressorgene.....	17
1.3.4 Immunsystem (angeborenes versus erlerntes).....	19
1.3.5 Die Rolle der Seneszenz in Tumoren.....	21
1.4 Immunhistochemische Marker.....	23
1.4.1 Proliferationsmarker.....	23
1.4.2 p53 und Caspase-3.....	23
1.4.3 Seneszenzmarker.....	24
1.4.4 T-Lymphozyten Marker.....	25
2. Fragestellung.....	26
3. Material und Methoden.....	27
3.1 Patientenkollektiv.....	27
3.2 Antikörper.....	27
3.3 Schneiden der FFPE Blöcke.....	28
3.4 Immunhistochemische Färbung.....	28
3.4.1 Geräte und Materialien.....	29
3.4.2 Reagenzien und Medien.....	29
3.4.3 Immunhistologie.....	30
3.4.4 Auswertung.....	32
3.5 Hämatoxylin-Eosin Färbung.....	37
3.5.1 Geräte.....	37
3.5.2 Reagenzien und Medien.....	37
3.5.3 Durchführung.....	38
3.6 Statistik.....	39
4. Ergebnisse.....	41
4.1 Zellproliferation.....	41
4.2 Marker für DNS-Schäden und Apoptose.....	44
4.2.1 p53.....	45
4.2.2 Caspase-3.....	48
4.3 Onkogene Seneszenz.....	50
4.3.1 p16INK4a.....	50
4.3.1 p14ARF.....	53
4.3.3 p16INK4a versus p14ARF.....	56
4.4 Tumor-infiltrierende Lymphozyten.....	65
4.4.1 CD8 und CD4.....	66

4.4.2	CD4 versus CD8.....	70
4.4.3	CD4/CD8-Quotient	78
4.4.4	p16INK4a versus CD4.....	81
4.5	Korrelation von p16INK4a/MIB-1 und p14ARF/MIB-1	89
4.5.1	Korrelation von p16INK4a zu MIB-1.....	90
4.5.2	Korrelation von p14ARF zu MIB-1	94
4.6	Fallübersichten.....	98
5.	Diskussion.....	100
5.1	Proliferationsmarker	104
5.2	Marker für DNS-Schäden und Apoptose.....	105
5.2.1	p53	105
5.2.2	Caspase-3.....	106
5.3	Seneszenzmarker p16INK4a und p14ARF	106
5.3.1	p16INK4a	107
5.3.2	p14ARF	108
5.3.3	p16INK4a versus p14ARF	108
5.4	Marker des Immunsystems	109
5.4.1	CD8 und CD4	109
5.4.2	CD4/CD8 Quotient.....	110
5.4.3	p16INK4a versus CD4.....	111
5.4	Korrelation von p16INK4a/MIB-1 und p14ARF/MIB-1	112
5.6	Fazit zur Fragestellung.....	113
6.	Zusammenfassung.....	115
7.	Literaturverzeichnis	117
8.	Abbildungsverzeichnis.....	127
9.	Tabellenverzeichnis.....	130
10.	Danksagung	134
11.	Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift	136

II. Abkürzungsverzeichnis

A

AJCC	American Joint Committee on Cancer
ALM	Akrolentiginöses Melanom
Aqua dest.	Aqua destillata

B

Bax	Bcl-2-associated X protein
BOLD-Schema	Bleomycin, Vincristin, Lomustin, Dacarbazin
BRAF (V600E)	Proto-onkogene B-Raf Mutation (Codon V600 auf Exon 15)
BrdU	Bromdesoxyuridin

C

CarboTAX-Schema	Carboplatin, Paclitaxel
Casp.-3	Caspase 3 (Cystein-Aspartate-specific Protein 3)
CD4	Cluster of differentiation 4
CD8	Cluster of differentiation 8
CD25	Cluster of differentiation 25
CD95/Fas	Cluster of differentiation 95/Fas
CDK4 und 6	Cyclin dependent kinase 4 und 6
CDKN2A	Cyclin dependent kinase Inhibitor 2A
CTLA-4 Blockade	Zytotoxische T-Lymphozyten-assoziierte Antigen-4

D

Derm.N	Dermaler Nävus
DNS	Desoxyribonukleinsäure

E

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EDNRB	Endothelin-Rezeptor B Gen
E2F	Gruppe von Genen, die für Transkriptionsfaktoren kodieren

F

FFPE Schnitte formalinfixierte Paraffin-eingebettete Schnitte

FoxP3 Forkhead-Box-Protein P3

G

gp 100 Glykoprotein 100

H

Halon.C Halonävus vom Compound-Typ

Halon.J Halonävus vom Junktional-Typ

HE Hämatoxylin-Eosin

I

IFN- α Interferon- α

IFN- γ Interferon- γ

IL-12 Interleukin-12

IQR Interquartilsabstand (Interquartile range)

IS Immunsystem

K

KI Konfidenzintervall

Ki-67 Protein Kiel-67

L

LDH Laktatdehydrogenase

LK Lymphknoten

LMM Lentigo-maligna Melanom

M

M Metastase

MAPK Mitogen aktivierte Protein Kinase

MDSC Myeloid derived suppressor cells

MDM2 murine double minute 2

MHC I und II	Major Histocompatibility Complex Klasse I und II oder Haupthistokompatibilitätskomplex
MIB-1	Monoklonaler Antikörper zur immunhistochemischen Anfärbung des Ki-67 Proteins
MITF	Microphthalmie assoziierter Transkriptionsfaktor
SSM-mit-Reg	Melanom mit Regression
SSM-ohne-Reg	Melanom ohne Regression
MW	Mittelwert
N	
N	Nodus
n	Number
NM	Noduläres Melanom
P	
PD-1	Molekül Programmed Death 1
p-Wert	Überschreitungswahrscheinlichkeit (probability value)
PKB	Protein Kinase B
Polymer AP	Polymer Alkalische Phosphatase
PTEN/MMAC1	Phosphatase und Tensin Homolog/mutiert in multiplen fortgeschrittenen Tumoren 1
PUVA-Therapie	Psoralen- und UVA-Therapie
p14ARF	Protein 14 alternate reading frame
p16INK4a benannt)	Protein 16INK4a (nach seinem molekularen Gewicht
p21	Protein 21
p21CIP-1	regulatorisches Protein des Zellzyklus, welches mit CDK2 und CDK4 interagiert
R	
Rb	Retinoblastom-Protein
RGP	Radiale/horizontale Wachstumsphase (radial growth phase)
rho	Korrelationskoeffizient

RNS	Ribonukleinsäure(n)
S	
SA-β-Gal	Seneszenz-assoziierte β-Galaktosidase
SD	Standardabweichung (Standard Deviation)
SSM	Superfiziell spreitendes Melanom
STAT 1	Signal transducer and activator of transcription 1
T	
T	Tumor
TBS`T Puffer	Tris-gepufferte Saline mit 0,05% Tween
Th1	T-Helferzellen 1
Tis	Primärtumor in situ
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR1	Tumornekrosefaktor Rezeptor 1
TNM	Tumor Nodus Metastasen
TP53	Tumorsuppressor-Gen 53
T _{Reg}	regulatorische T-Zellen
Tx	Primärtumor ist nicht beurteilbar
V	
VGP	Vertikale Wachstumsphase (vertical growth phase)

1. Einleitung

1.1 Der Tumorbegriff und Tumoren der Haut

Eine abnorme Gewebemasse körpereigener und entarteter Zellen, welche sich trotz Verlust der physiologischen Wachstumsstimulatoren weiterhin unkoordiniert und ungebremst vergrößert, wird als Tumor oder Neoplasie bezeichnet (Böcker et al., 2001, Stricker and Kumar, 2007). In derart transformierten Zellen liegen häufig Regulationsstörungen im Rahmen der Zellhomöostase vor. Bei einer gesunden, nicht entarteten Zelle wird durch verschiedene Regulationsmechanismen ein gewisses Gleichgewicht zwischen Proliferation, Differenzierung, Zell-Zell-Kontakten und Apoptose eingehalten, wodurch die Masse eines Zellverbandes relativ konstant bleibt (Böcker et al., 2001, Held et al., 2011). Hanahan und Weinberg definierten acht Veränderungen der Zellphysiologie, die malignes Tumorstadium steuern: Unabhängigkeit/Autarkie von Wachstumssignalen, Evasion der Apoptose, unlimitedes Replikationspotential, anhaltende Angiogenese, Gewebeinvasion, Metastasierung, Veränderung des Energiehaushaltes der Zelle und Evasion von der Immunüberwachung (Hanahan and Weinberg, 2011).

Tumoren können aus unterschiedlichen Geweben hervorgehen und werden allgemein in benigne, semimaligne und maligne Tumoren unterteilt (Böcker et al., 2001, Stricker and Kumar, 2007).

Betrachtet man alle Organe, so finden sich in der Haut die höchste Inzidenz als auch Vielfalt an Tumoren, wobei die meisten den benignen Tumoren zuzuordnen sind. Zum einen ist diese Tatsache durch die Größe des Hautorgans zu erklären zum anderen aber auch durch ihre Exposition gegenüber Noxen und Stimuli aus der Umwelt. Die Neoplasien der Haut können nach ihrer Dignität und nach ihrem Ursprung eingeteilt werden. Man unterscheidet Tumoren epidermalen, mesenchymalen und ektodermalen Ursprungs (Röcken et al., 2010).

1.2 Melanome

1.2.1 Epidemiologie

Durch die zunehmende Häufigkeit hat das kutane Melanom in den letzten 40 Jahren mehr und mehr Aufmerksamkeit erlangt. Hauptsächlich findet man kutane maligne Melanome in der kaukasischen Bevölkerung, seltener hingegen in dunkelhäutigen Bevölkerungsgruppen (Hauttyp IV-VI). Vor allem in hellhäutigen Bevölkerungsgruppen der industrialisierten Länder wird über eine Steigerung der Melanomneuerkrankungen berichtet (Garbe and Blum, 2001, Tronnier et al., 2013, Garbe and Bauer, 2012). So weisen Australien und Neuseeland die höchsten Inzidenzraten von 50-60 Fällen/100 000 Einwohner und Jahr auf. Das Auftreten in europäischen Ländern ist hingegen deutlich geringer. Im Zeitraum von 1970 bis 2008 ist in Deutschland ein Anstieg der altersstandardisierten Inzidenzraten von 3 Fällen auf 21 Fälle/100 000 Einwohner und Jahr zu erkennen. Als Ursache der Zunahme der Erkrankung vermutet man das veränderte Verhalten zur Sonnenexposition (Garbe et al., 2013).

1.2.2 Pathogenese und Mechanismen der Tumorgenese

Das Melanom stellt einen hochaggressiven Tumor der Haut dar, der aus den Melanozyten hervorgeht. Diese Zellen finden sich im Stratum basale der Epidermis und produzieren das Pigment Melanin, welches für die Farbe der Haut und für die unterschiedlichen Brauntöne benigner Naevi verantwortlich ist. Durch den Prozess der Melanogenese entstehen diese Zellen aus den sogenannten Melanozytenstammzellen. Hierbei verändert sich die Balance verschiedener Gene, epigenetischer Faktoren und Faktoren des Mikromilieus, welches letztendlich entweder zur Proliferation der Melanozytenstammzellen und deren Differenzierung zu Melanozyten führt oder dieselbe eben verhindert. Eine Störung dieser Balance,

zum Beispiel durch dauerhaftes Aktivieren oder Inaktivieren bestimmter Regulatorgene des Zellzyklus dieser Stammzellen kann letztlich zur Melanomentstehung beitragen (Regad, 2013).

Melanozyten werden hauptsächlich in der Haut gefunden, sie können aber auch in anderen Organen des Körpers vorkommen, wie beispielsweise auf der Conjunctiva und im Gastrointestinaltrakt. Primäre Melanome treten daher auch in anderen Organen als der Haut auf (Bandarchi et al., 2013).

Wie bei allen Tumoren so ist auch bei Melanomen eine Mutation der DNS entscheidend. Diese kann genetisch vererbt sein und beeinflusst so das relative Risiko Melanome zu entwickeln. Alternativ ist sie durch exogene Schädigung bedingt und wird dann als wichtig für die Initiierung von Melanomen angesehen. Als Indikatoren für angeborene Risikofaktoren der Melanomentstehung gelten: Familiäre Häufung, stattgehabtes Melanom, heller Hauttyp, blonder oder roter Haartyp sowie zahlreiche Nävi. Zu den erworbenen Risikofaktoren zählen extensive Sonnenexposition, ultraviolettes Licht, (PUVA-Therapie), Chemikalien und Immunsuppression (Bandarchi et al., 2013, Garbe et al., 2013).

Es gibt genetische Veränderungen, welche die Suszeptibilität der Melanomentstehung steigern. Eine Mutation betrifft den Cyklin-abhängigen Kinase Inhibitor 2A (CDKN2A). Das CDKN2A-Gen kodiert für die Proteine p16INK4a und p14ARF (Weischer et al., 2012). Diese agieren als CDK4 Inhibitoren. p14ARF stabilisiert p53, indem es mit MDM2 (murine double minute 2) interagiert, einem Protein, welches den Abbau von p53 fördert. Das Tumorsuppressorprotein p53 reguliert wichtige Kontrollpunkte des Zellzyklus, wie die Induktion von Apoptose, DNS-Reparatur und Wachstumsarrest. Das Protein p16INK4a inhibiert direkt die Zyklin D-abhängigen Kinasen CDK4 und CDK6. Diese hemmen die Dephosphorylierung des Retinoblastom Proteins (Rb) und stoppen so die Progression des Zellzyklus in der G1-S-Phase. Das Fehlen der funktionstüchtigen Proteine p14ARF und p16INK4a trägt somit zur Tumorigenese bei (Regad, 2013).

Eine weitere Mutation betrifft das Tumorsuppressorgen PTEN/MMAC1 (Phosphatase und Tensin Homolog/mutiert in multiplen fortgeschrittenen Tumoren 1). PTEN arretiert Tumorzellen in der G1-Phase des Zellzyklus und induziert deren Apoptose. Ein Funktionsverlust des PTEN/MMAC1-Gens führt ebenfalls zu einem gesteigerten Risiko der Melanomenentstehung (Tsao et al., 2003).

Weitere bekannte molekulare Veränderungen in Melanomen sind die Hochregulierung von MAPK (Mitogen-aktivierte Protein-Kinase) und PKB (Protein Kinase B), die Überexpression von MITF (Microphthalmie assoziierter Transkriptionsfaktor) und EDNRB (Endothelin-Rezeptor-B-Gen) und die BRAF(V600E) Mutation (Bandarchi et al., 2013, Regad, 2013, Garraway et al., 2005).

Die Dysregulation von microRNS spielen eine wichtige Rolle in der Entstehung und Progression von Melanomen. Die microRNS regulieren die Proteinexpression einer Vielfalt von Tumorsuppressorgen und Onkogenen, die mit der Entstehung, Progression und Invasion des Melanoms assoziiert sind (Regad, 2013, Mueller and Bosserhoff, 2009).

1.2.3 Diagnostik: Histologie des Melanoms und Subtypen

Jede neue aufgetretene oder sich umwandelnde Pigmentveränderung sollte dermatologisch untersucht werden. Die Deutsche Dermatologische Gesellschaft empfiehlt bei auffälligen Nävi eine solche Untersuchung einmal im Jahr. Zu den wichtigsten Hilfsmitteln der Melanomdiagnostik gehören neben der klinisch-dermatoskopischen Beurteilung die fotografische Dokumentation auffälliger Läsionen, die histopathologische Untersuchung, das Mikro staging, die Immunhistopathologie und die molekulare Analyse (Garbe and Bauer, 2012). Verdächtige Nävi werden zunächst nach der ABCDE-Regel beurteilt, dabei stehen

die Buchstaben für fünf Merkmale, die in Tabelle 1 erläutert werden (Abbasi et al., 2004).

A	Asymmetrie	asymmetrische Form, nicht spiegelbar
B	Begrenzung	unregelmäßiger Rand mit unscharfer Begrenzung
C	Color/Farbe	unterschiedliche Pigmentierung
D	Durchmesser	>5mm
E	Erhabenheit	cave: In-situ-Melanome sind nicht erhaben

Tabelle 1: ABCDE-Regel modifiziert nach (Abbasi et al., 2004)

Auch das sogenannte „ugly duckling-sign“ dient als Hinweis für Malignität: Es beschreibt die morphologischen Unterschiede zwischen einem einzelnen auffälligen Nävus im Vergleich mit den umliegenden unauffälligen Nävi des Patienten (Scope et al., 2008). Erst bei fortgeschrittenen Primärmelanomen treten auch Symptome wie Blutungen und Ulzerationen auf (Garbe and Bauer, 2012).

Das Melanom kann klinisch-histologisch in vier Subtypen unterteilt werden: Das superfiziell spreitende Melanom (SSM), das primär noduläre Melanom (NM), das lentigo-maligna Melanom (LMM) und das akrolentiginöse Melanom (ALM) (Garbe and Bauer, 2012).

SSM

Das SSM ist der häufigste Melanomtyp. Zu Beginn kennzeichnend sind eine intraepidermale, horizontale und radiale Wachstumsphase. Klinisch präsentiert sich das SSM als langsam wachsende Makula oder Plaque unregelmäßiger Pigmentierung und Begrenzung. Teilweise sind bei Melanomen depigmentierte Areale zu finden. Die bevorzugte Lokalisation des SSM ist der Rumpf. Bei Frauen tritt es auch häufig an den Extremitäten auf. Mikroskopisch kennzeichnend sind in Nestern angeordnete, große Melanozyten entlang der dermo-epidermalen

Junktionszone sowie die vertikale Invasion der Epidermis. Sekundär kann das SSM auch in ein noduläres Melanom übergehen (Soyer et al., 2007, Garbe et al., 2012, Garbe and Bauer, 2012).

NM

Das NM stellt den zweithäufigsten Melanomtyp dar und ist die aggressivste Form des Melanoms mit der schlechtesten Prognose. Der Grund hierfür liegt darin, dass das NM sehr schnell vertikal wächst. Klinisch imponiert das NM als ein nodulärer, exophytisch wachsender, braun-schwarzer Tumor. Die Oberfläche kann hierbei glatt oder ulzeriert sein. Das Wachstum erfolgt kaum in horizontaler Ebene sondern hauptsächlich in vertikaler Richtung. Dies begründet die schon nach kurzer Wachstumszeit einsetzende hämatogene und lymphogene Metastasierung (Garbe et al., 2012, Garbe and Bauer, 2012).

LMM

Das LMM entsteht auf dem Boden einer Lentigo maligna (melanoma in situ). Die Prädilektionsstellen dieser Form des Melanoms sind Bereiche der chronisch sonnenexponierten Haut, insbesondere Gesicht und Kopf. Das LMM wächst zunächst sehr langsam und vornehmlich radial und horizontal. Die vertikale/invasive Wachstumsphase stellt sich oft erst nach Jahren ein. Dies erklärt die geringe Metastasenneigung und somit auch die oft günstigere Prognose des LMM. Histologisch kennzeichnend sind die lentiginöse Proliferation atypischer Melanozyten in der dermoepidermalen Junktionszone, sowie die Zeichen chronisch lichtgeschädigter Haut (Garbe et al., 2012, Garbe and Bauer, 2012).

ALM

Das ALM tritt typischerweise palmoplantar, subungual und in der Mundschleimhaut auf. Vom Aussehen her ähnelt das ALM dem LMM, durch sein schnelleres Wachstum erweist es sich jedoch als beträchtlich aggressiver. Es sind alle Menschen von dieser Form des Melanoms etwa gleich häufig betroffen. Dadurch

wird es, neben den Schleimhautmelanomen zum häufigsten Melanom dunkelhäutiger Menschen (Garbe et al., 2012, Garbe and Bauer, 2012).

In Tabelle 2 sind die Häufigkeiten und die Altersverteilung der einzelnen Melanomformen aufgelistet. Einige Subtypen sind noch nicht klassifiziert oder repräsentieren Mischformen, beispielsweise das amelanotische Melanom und Melanome der Schleimhaut.

Typ	Anteil in %	Medianes Erkrankungsalter
Superfiziell spreitendes Melanom (SSM)	57,4%	51 Jahre
Noduläres Melanom (NM)	21,4%	56 Jahre
Lentigo-maligna Melanom (LMM)	8,8%	68 Jahre
Akral-lentiginöses Melanom (ALM)	4,0%	63 Jahre
Nicht-klassifizierbares Melanom	3,8%	54 Jahre
Sonstige	4,9%	54 Jahre

Tabelle 2: Darstellung der Subtypen des Melanoms im deutschsprachigen Raum mit prozentualem Anteil und medianem Erkrankungsalter modifiziert nach (Garbe et al., 2005)

1.2.4 Stadieneinteilung und Prognose

Handelt es sich bei einem Pigmenttumor nach histopathologischer Untersuchung tatsächlich um ein Melanom, so benötigt man eine Abschätzung der Tumorausbreitung und Stadienzuordnung. Diese ist wichtig zur Prognoseeinschätzung und zur Einleitung der optimalen Therapie und Nachsorge. Wichtige prognostische Parameter beim primären Melanom sind hierbei (Garbe et al., 2005, Garbe et al., 2013):

1. das TNM-Stadium

2. die Tumordicke nach Breslow
3. das Vorhandensein von Ulzerationen
4. Mikrometastasen im Sentinellymphknoten
5. Mitosen im subepidermalen Anteil des Melanoms, besonders bei dünnen Melanomen, T1
6. der Clark-Level (die relative Eindringtiefe in die Haut)

Zusammengefasst wird dies in der TNM-Klassifikation der AJCC aus dem Jahr 2009 (Balch et al., 2009). Die wichtigsten drei Faktoren, welche T definieren, sind die Tumordicke nach Breslow, die Mitoserate bei Primärmelanomen und histopathologische Anzeichen von Ulzerationen (Tabelle 3). Die N-Klassifikation beschreibt die Ausbreitung des Tumors im regionalen Lymphknotengebiet (Tabelle 4). Die wichtigsten prognostischen Faktoren stellen hierbei die Anzahl an metastatisch befallenen Lymphknoten, die Unterscheidung von mikroskopischem oder makroskopischem Lymphknotenbefall und das Vorhandensein von Satelliten- oder In-transit-Metastasen dar. Bei der M-Klassifikation (Tabelle 5) spielen der anatomische Ort der Metastasen im Körper und die Höhe der Serum-Laktatdehydrogenase (LDH) eine wichtige Rolle (Garbe and Bauer, 2012).

T-Klassifikation	Tumordicke	Weitere prognostische Parameter
Tis		Melanoma in situ, keine Tumorerinvasion
Tx	Keine Angabe	Stadium nicht bestimmbar*
T1	≤1,0mm	a: ohne Ulzeration, Mitoserate/mm ² <1 b: mit Ulzerationen oder Mitoserate/mm ² ≥1
T2	1,1-2,0mm	a: ohne Ulzeration b: mit Ulzeration
T3	2,1-4,0mm	a: ohne Ulzeration b: mit Ulzeration
T4	>4,0mm	a: ohne Ulzeration b: mit Ulzeration

*Fehlen einer Bestimmung der Tumordicke und/oder Ulzeration oder unbekannter Primärtumor

Tabelle 3: T-Klassifikation des Primärtumors beim Melanom modifiziert nach (Garbe et al., 2013)

N-Klassifikation	Zahl metastatisch befallener Lymphknoten (LK)	Ausmaß der Lymphknotenmetastasierung
N1	1 LK	a: nur mikroskopische Metastasen (klinisch okkult) b: nur makroskopische Metastasen (klinisch nachweisbar)
N2	2-3 LK	a: nur mikroskopische nodale Metastasen b: nur makroskopische nodale Metastasen c: Satelliten oder In-transit-Metastasen ohne regionäre Lymphknotenmetastasen
N3	≥4 LK oder verbackene LK oder Satelliten oder In-transit-Metastasen mit regionärer Lymphknotenbeteiligung	

Tabelle 4: N-Klassifikation des Primärtumors beim Melanom modifiziert nach (Garbe et al., 2013)

M-Klassifikation	Art der Fernmetastasierung	LDH
M1a	Metastasen in Haut, Subkutis oder LK jenseits der regionären LK (auch iliakale LK)	normal
M1b	Lungenmetastasen	normal
M1c	Fernmetastasen anderer Lokalisation oder Fernmetastasen jeder Lokalisation mit erhöhten Serumwerten der Laktatdehydrogenase (LDH)	erhöht

Tabelle 5: M-Klassifikation des Primärtumors beim Melanom modifiziert nach (Garbe et al., 2013)

Hieraus ergibt sich durch Kombination der T-, N- und M-Klassifikation die in Tabelle 6 dargestellte Stadieneinteilung. Dabei steht das Stadium 0 für ein Melanoma in situ. Stadium I und II beschreiben ein lokalisiertes Geschehen. Zu Stadium I gehören Patienten mit einem niedrigen Risiko (Breslow Index <1mm), zu Stadium II hingegen zählen Patienten mit höherem Risiko (Breslow Index >2mm oder mit Ulzerationen). Stadium III umfasst Patienten mit regionalen Lymphknotenmetastasen und/oder intralymphatischen Metastasen. Im Stadium IV sind Fernmetastasen vorhanden (Garbe and Bauer, 2012).

Stadium	Primärtumor (pT)	Regionäre Lymphknotenmetastasen (N)	Fernmetastasen (M)
0	In-situ-Tumoren	keine	keine
IA	T1a	keine	keine
IB	T1b	keine	keine
	T2a	keine	keine
IIA	T2b	keine	keine
	T3a	keine	keine
IIB	T3b	keine	keine
	T4a	keine	keine
IIC	T4b	keine	keine
IIIA	Jedes T, keine Ulzeration	N1a, N2a	keine
IIIB	Jedes T, mit Ulzeration	N1a, N2a	keine
	Jedes T, keine Ulzeration	N1b, N2b	keine
	Jedes T, keine Ulzeration	N2c	keine
IIIC	Jedes T mit Ulzerationen	N2c	keine
	Jedes T +/- Ulzerationen	N3	keine
IV	Jedes T	Jedes N	Jedes M

Tabelle 6: Stadieneinteilung des Melanom gemäß der AJCC-Klassifikation modifiziert nach (Garbe et al., 2013)

Die Prognose bei Patienten mit Melanom ist abhängig vom Stadium der Erkrankung zum Zeitpunkt der Diagnose. Patienten im Stadium I und II haben generell eine gute Prognose, da noch keine Lymphknoten- oder Fernmetastasen vorliegen. In späteren Stadien ist die Prognose deutlich schlechter, wie in Tabelle 7 zusammengefasst.

Stadium nach AJCC	5-Jahresüberleben in %
IA	97%
IB	93%
IIA	82-79%
IIB	68-71%
IIC	53%
IIIA	78%
IIIB	59%
IIIC	40%
IV	9-27%

Tabelle 7: 5-Jahresüberleben in Abhängigkeit des AJCC-Stadiums modifiziert nach (Garbe and Bauer, 2012)

1.2.5 Therapie

Den primären Therapieansatz beim Melanom ohne Metastasen (Stadien I und II) stellt die chirurgische Exzision in toto mit angemessenem Sicherheitsabstand dar (Tabelle 8). Dies ist bisher die einzige kurative Therapie eines Melanoms, wobei die Exzisionstiefe bis zur Faszie reichen sollte (Garbe et al., 2013). Oft muss das chirurgische Vorgehen individuell angepasst werden, beispielsweise aufgrund von schwierigen anatomischen Gegebenheiten (Gesicht, distale Extremitäten), was zu einem höheren Rezidivrisiko führt. Eine Besonderheit stellen das LMM und das ALM dar, hier sollte daher der Sicherheitsabstand mittels histologisch mikrographischer Kontrolle überprüft werden (Garbe et al., 2012). Ab einer Tumordicke von ≥ 1 mm wird den Patienten eine Wächterlymphknotenbiopsie angeboten. Falls in der histopathologischen Aufarbeitung des Wächterlymphknotens Tumorzellen gefunden werden, so folgt die totale Lymphadnektomie des betroffenen Gebietes als Standardtherapie (Garbe and Bauer, 2012).

Tumordicke	Sicherheitsabstand
------------	--------------------

In situ	0,5cm
≤1mm	1,0cm
1,01-2mm	1,0-2,0cm
>2mm	2,0cm

Tabelle 8: Sicherheitsabstand bei chirurgischer Exzision in Abhängigkeit von der Tumordicke modifiziert nach (Garbe and Bauer, 2012)

Ein adjuvanter Therapieansatz wird bei Patienten ohne erkennbare Metastasen aber hohem Risikoprofil für Mikrometastasen angewandt (Stadium II und III). Ziel dieser Therapie ist die langfristige Kontrolle potentieller Mikrometastasen nach der chirurgischen Exzision des Primärtumors. Als adjuvante Therapie wird eine 1,5-jährige Immuntherapie mit 3x3 Millionen i.E. Interferon- α (IFN- α) empfohlen.

In fortgeschrittenen Stadien mit Fernmetastasen (Stadium IV) hatte sich das 5-Jahresüberleben bis 2015 nicht signifikant verbessert und lag bei 9-27% (Tabelle 7). Hier kommen Therapien, wie Strahlentherapie, Chemotherapie und Immuntherapie sowie palliative Therapien zum Einsatz. Eine Radiatio zeigt bei inoperablen Melanomen, Skelett- und Lymphknotenmetastasen sowie In-transit-Metastasen der Haut gute Erfolge (Garbe and Bauer, 2012, Garbe et al., 2012). Die Kombination von Bestrahlung und chirurgischem Vorgehen bei Hirnmetastasen ermöglicht ein mittleres Überleben von 10 Monaten verglichen mit 3-5 Monaten ohne diese Therapie (Young, 1998, Garbe et al., 2012).

Für die systemische Chemotherapie des fortgeschrittenen Melanoms sind einige Mittel bekannt, die zur Tumorregression und Reduktion der tumorassoziierten Symptome führen können. Im Vergleich zu Monotherapien, beispielsweise mit Dacarbazin, erreichen Kombinationen mehrerer Chemotherapeutika miteinander und/oder in Kombination mit Zytokinen (Polychemoimmuntherapie) höhere Remissionsraten, allerdings wird die Gesamtüberlebenszeit nicht verlängert. Zu diesen Kombinationstherapien gehören unter anderem das BOLD-Schema (Bleomycin, Vincristin, Lomustin, Dacarbazin) und das CarboTax-Schema,

(Carboplatin, Paclitaxel). Letzteres wird derzeit häufiger eingesetzt, da es eine überraschend lange progressionsfreie Überlebenszeit von 4 Monaten zeigte (Hauschild et al., 2009). Wegen der teilweise erheblichen Beeinträchtigung der Lebensqualität sollte die Indikation zur Chemotherapie stets individuell abgewogen und mit dem Patienten besprochen werden.

Als Immuntherapie werden Therapieansätze bezeichnet, die das Immunsystem in die Lage versetzen, den Tumor zu bekämpfen. Hierzu zählt beispielsweise die zytotoxische T-Lymphozyten-assoziierte Antigen-4 Blockade (CTLA-4). Aktuell stellen Antikörper gegen das Molekül Programmed Death 1 (PD-1) die wirksamste Immuntherapie dar. Die monoklonalen Antikörper gegen CTLA-4 oder PD-1 blockieren inhibitorische Signale und führen so zur Reaktivierung von T-Zellen und deren Proliferation (Agarwala, 2010, Robert and Ghiringhelli, 2009). Die Kombination der immuntherapeutischen Ansätze der CTLA-4 und PD-1 Blockade zeigen beim Melanom eine signifikant gesteigerte Tumorabstoßungsreaktion im Vergleich zu einer singulären Blockade von CTLA-4 oder PD-1 (Curran et al., 2010). In einer Studie von Robert et al. wird die Superiorität der Kombination von Ipilimumab und Dacarbazin gegenüber einer Dacarbazin-Monotherapie beim Menschen gezeigt (Robert et al., 2011). Dies war die erste „proof of concept“ Studie, die zeigt, dass eine Immuntherapie zu einer sehr geringen, aber statistisch gesicherten Verbesserung im Stadium III oder IV führen kann. Ein weiterer immuntherapeutischer Ansatz ist die Hochdosis-Interleukin-2 Therapie. Als Monotherapie bewirkt diese keine signifikante Verlängerung des progressionsfreien Intervalls. In Kombination mit einem gp 100 Peptid-Vakzin wird in einer neuen Studie jedoch ein gesteigertes Ansprechen sowie ein längeres progressionsfreies Intervall dargestellt (Schwartzentruber et al., 2011, Garbe and Bauer, 2012).

Ein neuerer molekularer Ansatz in der Therapie des Melanoms stellt die Gabe von Inhibitoren für mutiertes BRAF dar. Diese Behandlung erzielt Remissionen bei Patienten mit Tumoren, die eine BRAF V600E Mutation tragen. Chapman et al. zeigten 2011 die Überlegenheit der Vemurafenib Therapie im Vergleich zur Therapie

mit Dacarbazin in Bezug auf das progressionsfreie Intervall und bestätigter Ansprechrate (Chapman et al., 2011).

In der Studie von Flaherty et al. zeigte die Kombination des BRAF V600E-Inhibitors Dabrafenib und des MAPK-Inhibitors Trametinib beim metastasierten Melanom eine deutliche Verlängerung der progressionsfreien Überlebenszeit im Vergleich zu der Monotherapie mit einer der beiden Substanzen. Ferner konnte bei Einnahme der dualen Therapie mittels Dabrafenib und Trametinib im Vergleich zu der Monotherapie ein vermindertes Auftreten von Plattenepithelkarzinomen festgestellt werden (Flaherty et al., 2012).

Die Suche nach weiteren möglichen molekularen Ansatzpunkten stellt somit bei noch immer niedrigen 5-Jahresüberlebensraten bei den fortgeschrittenen Stadien des Melanoms ein wichtiges Thema der Melanomtherapie dar.

1.3 Mechanismen der Tumorkontrolle und Regression

1.3.1 Progression versus Regression in Melanomen

Ein Melanom kann entweder weiter wachsen oder sich aufgrund noch ungeklärter Ursachen spontan durch Regression zurückbilden. Veränderungen wie Wachstumsbeschleunigung und Tumorinvasion zählen zu den Zeichen der Progression. In der histopathologischen Untersuchung finden sich oft auch Zonen der Regression, also der Rückbildung. Man kann diesen Prozess anhand bestimmter Merkmale in drei Stadien unterteilen (Tronnier et al., 1997):

1. Frühstadium:

Vorhandensein von entzündlichem Infiltrat zwischen der Melanozytenaggregation und der Epidermis, keine Fibrose und keine zerstörten Tumoranteile

2. Fortgeschrittenes Stadium:

Variable Dichte des Entzündungsinfiltrates, fokale Fibrose und Gefäßvermehrung, Melanophagenablagerungen, Epidermisatrophie

3. Endstadium

Vollständige Regression, kein Melanozytennachweis, oberflächliche Vernarbung, kein entzündliches Infiltrat, kaum bis keine Tumoranteile nachweisbar

Ferner lassen sich zwei Varianten der Regression unterscheiden, der Fibrose-Typ (mehr Fibrose) und der Melanose-Typ (mehr Melanophagen) (Emanuel et al., 2008, Tronnier et al., 1997).

Das T-Zell-Infiltrat in entzündeten Melanozyten ist oligo- oder monoklonal (Yazdi et al., 2006). Das Vorliegen einer Regression in Melanomen kann neueren Studien zufolge als prognostisch günstig gewertet werden (Kaur et al., 2008, Ribero et al., 2013). Daher stellt die weitere Erforschung der Mechanismen der spontanen Regression einen interessanten Ansatzpunkt für die Melanomtherapie dar.

1.3.2 Vertikale versus horizontale Wachstumsphase

Histopathologisch kann die Entwicklung eines Melanoms in zwei Wachstumsphasen unterteilt werden: die radiale/horizontale und die vertikale Wachstumsphase (RGP und VGP). Das SSM wächst in aller Regel zunächst in horizontaler Richtung. Charakteristisch für die RGP sind die zentrifugale Ausbreitung der Tumorzellen innerhalb der Epidermis sowie die Infiltration der papillären Dermis durch einzelne Zellen oder kleinere Zellnester. Während der rein intraepidermalen Phase A(T0) findet noch keine Metastasierung statt. Das Risiko beginnt, sobald die VGP einsetzt

und die Basalmembran durchbrochen ist. In der VGP sind dermale Nester atypischer Melanozyten vorhanden, die größer sind und zytologische Unterschiede aufweisen verglichen mit intraepidermalen Nestern (Garbe and Bauer, 2012).

Der menschliche Körper besitzt Möglichkeiten, Tumoren zu bekämpfen und deren Entstehung zu verhindern. Einige dieser Mechanismen werden im Folgenden dargestellt.

1.3.3 Tumorsuppressorgene

Tumorsuppressorgene kodieren für Proteine, die als supprimierende Effektoren den Zellzyklus anhalten oder Apoptose induzieren. Die Funktionen der Tumorsuppressorproteine können wie folgt zusammengefasst werden (Böcker et al., 2001, Sherr, 2004):

1. Hemmung der Gene, die das Voranschreiten der Zelle im Zellzyklus ermöglichen
2. Aktivierung der DNS-Reparatur bei DNS-Schäden
3. Koppelung der Zellteilung an die Unversehrtheit der DNS
4. Verknüpfung irreparabler DNS-Schädigung an die Induktion von Apoptose
5. Vermeidung einer Metastasierung durch bestimmte Proteine der Zelladhäsion

Es wurden viele dieser Tumorsuppressorgene in den letzten Jahren identifiziert, einige sind in Tabelle 9 aufgelistet (Sherr, 2004).

Gen	Funktion	Assoziiertes familiäres Tumorsyndrom
p53	Transkriptionsfaktor	Li-Fraumeni Syndrom

RB	Transkriptionale Korepression	Retinoblastom
INKa (p16INK4a)	CDK-Inhibitor (RB-Aktivierung)	Melanom, Nierenzellkarzinom, Mammakarzinom
ARF	Mdm2 Antagonist (p53 Aktivierung)	Melanom
APC	Wnt/wingless signaling	Familiäre adenomatöse Polyposis
PTCH	Hedgehog signaling (Rezeptor)	Gorlin Syndrom
PTEN	Lipidphosphatase	Cowden Syndrom
TSC 1,2	GTPase Aktivierungs-Proteinkomplex (mTOR Inhibition)	Tuberöse Sklerose (Harmatome)
NF1	GTPase Aktivierungsprotein für Ras	Neurofibromatose, Melanom (Nissan et al., 2014)
WT1	Transkriptionsfaktor	Wilms Tumor
ATM	DNS-Schadensensor (Proteinkinase)	Ataxia teleangiectasia (T-Zell Lymphom)
NBS1	DNS Reparatur, S-Phasen Checkpoint Kontrolle	Nijmegen breakage Syndrom (T- Zell Lymphom)
CHK2	Proteinkinase (G1 Checkpoint Kontrolle)	Li-Fraumeni Syndrom
BRCA 1 und BRCA 2	DNS Reparatur	Familiäre Mamma- und Ovarialkarzinome
FA Gene	DNA Reparatur, S-Phasen Checkpoint	Fanconi Anämie
VHL	E3 Ligase Erkennungsfaktor für HIF α	Von-Hippel-Lindau-Syndrom

Tabelle 9: Auswahl an bisher identifizierten Tumorsuppressorgenen mit Funktion und assoziiertem Tumorsyndrom modifiziert nach (Sherr, 2004)

Eine Funktionsänderung, in der Regel Funktionsverminderung, eines dieser Gene oder ein fehlerhaftes Genprodukt kann somit entweder die Entstehung von Tumoren erleichtern oder zu Tumorwachstum führen. Um einen Funktionsverlust zu bewirken, müssen bei diesen Genen üblicherweise beide Allele inaktiviert oder beschädigt sein (Two-hit-Model) (Berger et al., 2011).

Ein wichtiges Tumorsuppressorgen ist das TP53. p53 ist bei der Entstehung von mehr als 60% aller menschlichen Tumoren involviert (Greenblatt et al., 1994). Es

kodiert für das Protein p53 und stellt einen wichtigen Kontrollpunkt im Zellzyklus dar, welcher durch zellulären Stress (Strahlung, Hypoxie, Onkogenaktivierung, medikamenten-induzierten DNS-Schaden) aktiviert wird. In geschädigten Zellen wird p53 kurzfristig hochreguliert und akkumuliert innerhalb dieser Zellen. Liegt ein DNS-Schaden vor, so wird die betroffene Zelle im Zellzyklus arretiert und der Schaden behoben. Falls dies nicht möglich ist, induziert p53 die Transkription von Genen wie Bax, welche die Apoptose einleiten (Böcker et al., 2001, Sherr, 2004). Apoptose bezeichnet den programmierten Zelltod. Dieser kann über intrinsische (DNS-Schäden) oder extrinsische (über den CD95/Fas death receptor) Signalkaskaden aktiviert werden. Beide Wege enden in der Aktivierung einer Reihe proteolytischer Caspasen und der Zerstörung der Zelle (Hanahan and Weinberg, 2011).

Die meisten menschlichen Tumoren weisen eine Störung der Wachstumsregulation auf, die durch die beiden Tumorsuppressorproteine p53 und RB (Retinoblastoma protein) vermittelt wird. Der Studie von Bates et. al. zufolge ist es nötig, dass sowohl der p53 als auch der RB Signalweg für die Tumorentstehung gestört sein müssen. Ein RB-Verlust führt zur Dysregulation der E2F Transkriptionsfaktoren und somit zu erhöhter Proliferation, gleichzeitig aber auch zur Aktivierung von p53, welches wiederum Zellwachstum supprimiert. Die Verknüpfung des RB- und p53-Signalweges erfolgt über E2F-1 und p14ARF (Bates et al., 1998).

1.3.4 Immunsystem (angeborenes versus erlerntes)

Das Immunsystem (IS) spielt bei der Tumorsuppression eine wichtige Rolle und bildet den Ansatzpunkt für weitere Tumorthérapien. Schon 1957 wurde das Konzept der Immunüberwachung von Burnet und Thomas vorgestellt, nach deren Theorie Lymphozyten als Wächter des Immunsystems tumorös veränderte Zellen aufspüren und beseitigen (Burnet, 1957). Diese Theorie wurde in das heute gültige Konzept des „Immunoediting“ aufgenommen, in dem entsprechend der dualen Funktion des

IS immunologische Prozesse sowohl bei der Tumorvermeidung als auch bei der Tumorentstehung agieren. Die Immuneditation kann in drei Phasen unterteilt werden: die Eliminationsphase (entspricht der Immunüberwachung), die Phase des Equilibriums und letztlich die Escapephase. Die Eliminationsphase kann wiederum in vier Einzelschritte unterteilt werden (Dunn et al., 2002):

1. Schritt:

Zellen des angeborenen IS reagieren auf einen Tumor, der durch invasives Wachstum und Stroma-Umbau lokal Gewebeschäden verursacht. Es kommt zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren, die Zellen des angeborenen IS (Natürliche Killerzellen und Natürliche Killer-T-Zellen, Makrophagen und dendritische Zellen) anlocken. Die infiltrierenden T-Lymphozyten setzen IFN- γ frei.

2. Schritt:

IFN- γ induziert zu einem gewissen Grad den Untergang der Tumorzellen durch Aktivierung antiproliferativer und apoptotischer Prozesse. Ferner ist es wichtig für den Wachstumsarrest und die Seneszenzinduktion von Tumorzellen (Braumuller et al., 2013, Muller-Hermelink et al., 2008). Weiter fördert es die Chemokinproduktion. Diese Chemokine hemmen ebenfalls Tumorzellen durch Blockade der Angiogenese (Muller-Hermelink et al., 2008). Dendritische Zellen nehmen die Reste der untergegangenen Tumorzellen auf und wandern in nahegelegene Lymphknoten.

3. Schritt:

Natürliche Killer Zellen und Makrophagen aktivieren sich gegenseitig über wechselseitige IFN- γ und IL-12 Produktion (Mocikat et al., 2003). Weitere Tumorzellen werden durch diese Zellen beseitigt, indem Apoptose induziert wird und reaktive Sauerstoff- und Stickstoff-Zwischenprodukte entstehen. Ferner präsentieren die abgewanderten dendritischen Zellen in den ableitenden Lymphknoten tumorspezifische Antigene, was die

Differenzierung von Th1-Zellen triggert und auch die Produktion von tumorspezifischen CD8+ T-Zellen fördert (Mocikat et al., 2003).

4. Schritt:

Der letzte Schritt umfasst die Migration tumorspezifischer CD4+ und CD8+ T-Zellen zum Tumor und die Zerstörung der restlichen Tumorzellen durch zytolytische T-Lymphozyten.

Nach erfolgloser Eliminierung der Tumorzellen stellt sich entweder ein Gleichgewicht zwischen tumorsupprimierendem Mechanismen des IS und der Tumorausbreitung ein (Phase des Equilibriums), oder die Tumorzellen überwinden die Schutzmechanismen des IS und wachsen ungehemmt weiter (Escapephase) (Dunn et al., 2002).

Immuntherapien induzieren nicht nur komplette Tumorremission, sondern auch einen Wachstumsstopp mit partieller Tumorregression (Robert et al., 2011). Neuere Daten können ferner zeigen, dass Tumorregression und Wachstumsarrest vielmehr mit tumor-spezifischen, IFN- γ -produzierenden CD4+ T-Helferzellen-1 (Th1) als mit zytotoxischen T-Lymphozyten korrelieren (Braumuller et al., 2013, Muller-Hermelink et al., 2008). Dies lässt die Induktion von Seneszenz zu einem attraktiven Angriffspunkt für Tumorthapien werden.

1.3.5 Die Rolle der Seneszenz in Tumoren

Die Phase, in der eine normale Zelle proliferiert und sich repliziert, ist zeitlich begrenzt. Hiernach beginnt eine Phase des irreversiblen Wachstumsstillstandes (G1/G0), die in menschlichen Zellen vermutlich durch die Verkürzung der Telomere eingeleitet wird (Giuliano et al., 2011). Diese sogenannte replikative Seneszenz zeichnet sich durch bestimmte morphologische und biochemische Veränderungen und durch bestimmte strukturelle Veränderungen des Chromatins aus. Hierbei kann mikroskopisch beobachtet werden, dass seneszente Zellen ihren Umfang

vergrößern und abflachen und sich mit Vakuolen anreichern. Ferner sind eine erhöhte Aktivität der Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase (SA- β -Gal) und eine Verminderung des Bromdesoxyuridin (BrdU) nachweisbar (Kurz et al., 2000). Auf molekularer Ebene gibt es diverse Stimuli, welche Seneszenz auf unterschiedlichen Wegen auslösen können. Diese Wege scheinen sich aber letztendlich in der Aktivierung von p53 und Rb zu vereinigen und somit zur Seneszenzinduktion in einer Zelle zu führen. Bei der stressinduzierten frühzeitigen Seneszenz wird die Aktivierung von p53 durch p14ARF vermittelt. Auch der CDK-Inhibitor p16INK4a ist für die Seneszenz-Induktion wichtig, da eine Zunahme von p16INK4a zur Rb-Hypophosphorylierung führt (Kong et al., 2011). Braumüller et al. haben kürzlich herausgefunden, dass die kombinierte Wirkung von den Th1 produzierten Zytokinen IFN- γ und TNF in Tumorantigen-exprimierenden Tumorzellen Seneszenz einleiten. TNF (tumor necrosis factor) und IFN- γ bewerkstelligen dies über einen permanenten Wachstumsarrest in der G0/G1 Phase des Zellzyklus, die Aktivierung von p16INK4a und die Rb-Hypophosphorylierung. Diese Zytokin-induzierte Seneszenz erfordert neben p16INK4a grundsätzlich auch eine Signalübermittlung via STAT1 (signal transducer and activator 1) und TNFR1 (tumor necrosis factor receptor 1) (Braumüller et al., 2013).

Die meisten Tumorzellen scheinen im Rahmen der Tumorigenese ihre Fähigkeit verloren zu haben, auf endogene Signale hin Seneszenz zu induzieren. Insofern war es überraschend, dass die beiden exogenen Signale IFN- γ und TNF offensichtlich noch in einer großen Anzahl von Tumoren die endogenen, Tumor-induzierenden Signale dominieren und Seneszenz induzieren können (Braumüller et al., 2013). Die Einleitung der Seneszenz in Tumorzellen stellt somit eine attraktive Therapieoption dar, da durch die meisten Tumorthapien Tumorzellen auf Dauer eine Apoptoserestistenz entwickeln. Somit würde für Apoptose-restistente Tumorzellen die Induktion der Seneszenz einen alternativen Therapieansatz bieten. Zur Induktion der Seneszenz in Tumorzellen gibt es bereits verschiedene Herangehensweisen, beispielsweise Therapien, deren Angriffspunkt die Telomeraseaktivität beeinflusst,

oder die Wiederherstellung der Funktion von p53, oder die Aktivierung von p16INK4a und p21 (Kong et al., 2011).

1.4 Immunhistochemische Marker

1.4.1 Proliferationsmarker

Der monoklonale Antikörper MIB-1 stellt einen immunhistochemischen Marker zu Anfärbung des Ki-67 Antigens dar, das von Gerdes et al. 1983 erstmals beschrieben wurde (Gerdes et al., 1983). In der Immunhistochemie von Ki-67 zeigen proliferierende Zellen, eine nukleäre Färbung (Gerdes et al., 1983). Als Proliferationsmarker kann MIB-1 in allen proliferationsassoziierten Zellzyklusphasen (G1-, S-, M- und G2-Phase) im Zytoplasma detektiert werden. Dagegen exprimieren Zellen in der Ruhephase (G0-Phase) kein Ki-67 (Gimotty et al., 2005). In Melanomen gilt MIB-1 als aussagekräftiger Biomarker (Gimotty et al., 2005, Ramsay et al., 1995, Sparrow et al., 1998).

1.4.2 p53 und Caspase-3

p53

In humanen Tumoren sind bei ca. 60% Mutationen im Tumorsuppressorgen p53 zu finden, dadurch wird p53 in Tumoren zu dem am häufigsten veränderten Gen (Greenblatt et al., 1994). p53 ist ein multifunktionelles Protein, dessen Aufgabe es ist die Zelle und somit den gesamten Organismus vor DNS-Schäden zu schützen. Eine Aktivierung von p53 kann zur Induktion eines Zellzyklusarrest (von G1- in S-Phase oder G2- in M-Phase) und/oder zur Aktivierung der Apoptose führen (Agarwal et al., 1995, Bates and Vousden, 1999). Bei DNS-Schädigung wird p53 aktiviert, akkumuliert in der Zelle und führt zu einem Wachstumsstopp in der G1-Phase oder der G2-Phase. Kann die Zelle den DNS-Schaden nicht reparieren, so wird über

Induktion von Apoptose-Proteinen, wie das Bax-Protein die Apoptose eingeleitet. p53 schützt somit die Zelle und den Organismus vor Tumorentstehung (Lane, 1992).

Caspase-3

Die **Cystein-Aspartate-specific Proteinase** spielt eine zentrale Rolle in der Ausführungsphase der Apoptose (Marks et al., 1998). Eine Aktivierung der Caspase-3 kann über die extrinsische oder intrinsische Signalkaskade stattfinden. Initiator-Caspasen (z. B. Caspase-8 und -9) werden aktiviert und spalten die Vorläuferform nachgeschalteter Effektor-Caspasen (unter anderem Caspase-3, -7 und -6) (Nicholson, 2001). Caspase-3 ist unter anderem essentiell für die proapoptotische Chromatin Kondensation und DNS-Fragmentierung (Porter and Janicke, 1999). Die meisten Caspasen sind im Zytoplasma lokalisiert. Es gibt jedoch auch einige Ausnahmen, die in der Kernmembran, dem Golgi-Apparat (Caspase-12) oder in den Mitochondrien (Caspase-2, -3 und -9) zu finden sind (Bratton and Cohen, 2001).

1.4.3 Seneszenzmarker

Der CDKN2A-Genlocus kodiert für zwei unterschiedliche Proteine, p16INK4a und p14ARF. Der Tumorsuppressor p16INK4a kann einen Zellzyklusarrest beim Übergang in die G1/S-Phase durch Hemmung der Phosphorylierung des Rb-Proteins mittels CDK 4 und 6 einleiten (Braumuller et al., 2013). p16INK4a agiert unter normalen Umständen als Inhibitor der CDK 4 und 6. Eine Zunahme von p16INK4a in alternden Zellen ist bekannt, somit gilt dieses Antigen als Marker für Seneszenz (Omura-Minamisawa et al., 2001). Im Gegensatz dazu kann p14ARF über eine p53-Aktivierung erstens zu erhöhter Menge von MDM2 und p21CIP-1 und zweitens zum Zellzyklusarrest in der G1- und in der G2-/M-Phase führen. Als Antwort auf eine Onkogenaktivierung akkumuliert p14ARF in der Zelle, wodurch die

Zelle arretiert wird. p14ARF kann aber auch über p53 Apoptose induzieren. In Tumoren ist p14ARF häufig inaktiviert (Stott et al., 1998). p16INK4a und p14ARF werden als Seneszenzmarker genutzt, da sie im Zellzyklus arretierte Zellen darstellen.

1.4.4 T-Lymphozyten Marker

Die T-Lymphozyten gehören zum System der mononukleären Zellen und haben zentrale Bedeutung in der adaptiven Immunabwehr. CD4-positive Lymphozyten, oder T-Helferzellen, regulieren Immunantworten primär über die Zytokine, die sie produzieren. CD4-Zellen werden von Antigen präsentierenden Zellen über den MHC Klasse II aktiviert. Daraufhin beginnen sie sich schnell zu teilen und sezernieren Zytokine, über die sie den Verlauf von Immunantworten steuern (Röcken et al., 2010). Unter den CD4-positiven Zellen befindet sich aber auch eine Population von regulatorischen T-Zellen, die zusätzlich CD25- und FoxP3-positiv sind. Diese T_{Reg} Zellen hemmen Immunantworten und scheinen das Wachstum und die Ausbreitung von Tumoren zu fördern (Shang et al., 2015, Wolf et al., 2015). Die CD8-positiven Lymphozyten (zytotoxische T-Zellen) sind in der Lage, viral infizierte Zellen und auch manche Tumorzellen zu zerstören. Sie erkennen ihre Zielzellen durch Bindung an das spezifische Antigen, das durch MHC Klasse I präsentiert wird (Gutcher and Becher, 2007, Jiang and Chess, 2004).

2. Fragestellung

Mechanismen der Zellzyklusinhibition und Seneszenz bieten bei Tumoren vielversprechende Angriffspunkte für Therapien. Daher werden hier auf der Basis von Proteinexpressionsanalysen in histologischen Gewebeschnitten mögliche Mechanismen der Wachstumskontrolle beim Melanom untersucht. Mögliche Mechanismen sind Apoptose, Seneszenz und eine Immunaktivierung, z.B. zytotoxischer T-Zellen.

Die vorliegende Dissertation vergleicht mittels immunhistologischer Färbungen diese Mechanismen der Wachstumskontrolle bei regressiven und nicht regressiven Melanomen, und unterschiedlichen Nävustypen.

Hierdurch soll beantwortet werden, ob Proliferation und Regression mit unterschiedlich zusammengesetzten T-Zell-Infiltraten, Apoptose oder der Aktivierung der Seneszenz korreliert.

3. Material und Methoden

3.1 Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv wurde aus dem Archiv der Universitäts-Hautklinik Tübingen ausgewählt und dann anonymisiert. Die Suche lief unter folgenden Kriterien: Für die Melanome ohne Regression (SSM-ohne-Reg): Melanom: ja; Regression: nein; Nävusassoziation: nein; Ulzeration: nein. Für die Melanome mit Regression (SSM-mit-Reg) galten folgende Kriterien: Melanom: ja; Regression: ja; Nävusassoziation: nein; Ulzeration: nein. Aus diesem Kollektiv wurden folgende histologische Melanomtypen ausgewählt:

- 9 SSM ohne Regression mit einer Tumordicke zwischen 0,05-2,5mm und Clark Level III-IV
- 8 SSM mit Regression mit einer Tumordicke zwischen 0,43-1,55mm und Clark Level II-IV und 1 Melanoma in situ mit Regression
- 8 Nävi als Kontrollen: 2 dermale Nävi, 3 Halonävi vom Junktions-Typ und 3 Halonävi vom Compound-Typ

Ein positives Votum der Ethikkommission der Universität Tübingen lag vor (Projektnummer 072/2011BO2).

3.2 Antikörper

In der vorliegenden Arbeit wurden für die immunhistochemischen Färbungen formalinfixierter Paraffin-eingebetteter (FFPE) Schnitte folgende Antikörper verwendet (Tabelle 10):

AK	Firma	Klon	Verdünnung	Puffer
MIB-1	DAKO (Hamburg, Deutschland)	Anti-Human Ki-67 Antigen, Klon MIB-1	1:100	Zitrat pH 6
p53	DAKO	monoklonaler Maus Anti-Human p53 Protein, Klon DO-7	1:200	EDTA pH 9
Casp.-3	GeneTex (USA)	monoklonaler Maus Antikörper Caspase-3, Klon 3CSP03	1:100 manuell	TBS'T
p16INK4a	CINtec (Holland)	monoklonaler Maus Antikörper p16INK4a RTU	RTU (ready to use)	EDTA pH 8
p14ARF	Cell Signaling (Frankfurt am Main, Deutschland)	monoklonaler Maus Antikörper p14ARF, Klon 4C6/4	1:50	EDTA pH 8
CD4	Novocastra TM (Wetzlar, Deutschland)	monoklonaler Maus Antikörper CD4, Klon 1F6	1:15	EDTA pH 8
CD8	DAKO	monoklonaler Mouse Anti-Human CD8, Klon C8/144B	1:100	EDTA pH 8

Tabelle 10: Verwendete Antikörper und ihre Verdünnung

3.3 Schneiden der FFPE Blöcke

Am Rotationsmikrotom von Leica Microsystems, Gerätetyp RM2125RT, wurden von den Paraffinblöcken 3-4µm dicke Schnitte hergestellt und auf Superfrost plus Objektträger aufgezogen.

3.4 Immunhistochemische Färbung

Es kam eine Polymer AP (Alkalische Phosphatase) Fast Red Färbung zum Einsatz. Es wurde eine Methode der immunhistochemischen Färbung benutzt, ähnlich wie von Wang et al. und Böcker et al. beschrieben (Böcker et al., 2001, Wang et al., 2004). In der dieser Arbeit wurde diese Methode nach der Arbeitsanweisung des Labors der Universitäts-Hautklinik Tübingen für Dermatohistologie unter der Leitung von Dr. med. Gisela Metzler und Prof. Dr. med. Jürgen Bauer modifiziert übernommen.

3.4.1 Geräte und Materialien

- Trockenschrank 55°C, B6000, Heraeus Instruments (Hanau, Deutschland)
- Dampfgarer, Tefal Vita cuisine (Offenbach, Deutschland)
- Färbeautomat mit Objektträgerständern: DAKO-Autostainer
- Objektträger Superfrost plus: Thermo Scientific 999100x (Schwerte, Deutschland)
- Einfache Glasküvetten
- Kurzzeitmesser
- Pipette mit Magnetunterstützung: Pipet-Lite TM, digitale Mikroliter-Pipette, 11 Pipetten für Volumenbereiche von 0,1 µl bis 20ml
- Kühlakkus
- Objektträger-Eindeckautomat, RCM 7000, Medite Group (Burgdorf, Deutschland)

3.4.2 Reagenzien und Medien

- Xylol: Fa. Merck (Darmstadt, Deutschland)
- Alkohol vergällt, SAV-Liquid Production GMBH (Flintsbach am Inn, Deutschland)
- Aqua destilatum (vollentsalztes Wasser)
- Waschpuffer (TBS und Tween): Thermo Scientific, TA-999-T
- Puffer 4 zur Vorbehandlung: EDTA pH 9, Thermo Scientific, TA-125-Puffer 2 zur Vorbehandlung: EDTA pH 8, Thermo Scientific, TA-125-PM2X
- Puffer 1 zur Vorbehandlung: Citrat pH 6, Thermo Scientific, TA-125-PM1X
- Protease XXV, Thermo Scientific, AP-9006-005, 002
- Antikörper, siehe oben
- Antikörper-Verdünnungsmedium, Thermo Scientific, TA-125-UC

- Ultravision LP, AP Polymer (Detection System), Thermo Scientific, TL-125-AL
- Liquid Fast Red Substrate (Alkalische Phosphatase), Thermo Scientific, TA-125-AL
- Hämatoxylin, DAKO, S2020
- Untersuchungsmaterial: 3-4µm dicke Paraffingewebeschnitte aus formalinfixierten Proben

3.4.3 Immunhistologie

Die folgende Zusammenfassung der einzelnen Arbeitsschritte wurde aus einer Arbeitsanweisung aus dem Labor der Universitäts-Hautklinik Tübingen für Dermatohistologie unter der Leitung von Dr. med. Gisela Metzler und Prof. Dr. med. Jürgen Bauer modifiziert übernommen:

Zur Probenvorbereitung wurden 3-4µm dicke Paraffinschnitte hergestellt. Die Schnitte wurden bei 55°C für mindestens zwei Stunden getrocknet und danach mittels einer absteigenden Alkoholreihe und Aqua destilatum im Färbeautomat entparaffiniert. Bis zur Weiterverarbeitung standen die Schnitte in Aqua destilatum-Bad.

Zur Reagenzvorbereitung wurden die Puffer 1, 2 und 4 1:100 mit destilliertem Wasser verdünnt und in die Küvetten gefüllt. Die Küvetten wurden im Dampfgerar 35 Minuten erhitzt:

- Antikörper entsprechend der Programmübersicht mit dem Verdünnungsmedium manuell verdünnen
- Protease XXV in 5ml beziehungsweise in 2ml Aqua destilatum auflösen
- Enhancer und Poly-Alkalische Phosphatase waren gebrauchsfertig
- Hämatoxylin 1:5 mit Aqua destilatum verdünnen

- Substrat-Enzym-Komplex erst kurz vor Gebrauch ansetzen, hierzu wird Substrat und Chromogen entsprechend der Herstellerangabe pipettiert
- Waschpuffer in ausreichender Menge einfüllen (1:20 verdünnt)
- Wasser ebenfalls in ausreichender Menge einfüllen, pro 10l Aqua destilatum 2,5ml Tween zusetzen
- Abfallbehälter kontrollieren

Nun wurden die Nummern der Schnitte in das Färbeprogramm des Färbeautomaten eingegeben und im Programm die Antikörper aus der AK-Liste ausgewählt. Die Programmübersicht und die Objektträger-Etiketten wurden ausgedruckt. Dann konnten die Objektträger in die jeweiligen Küvetten einsortiert werden:

- EDTA-Puffer pH 9 => Puffer 4
- EDTA-Puffer pH 8 => Puffer 2
- Citrat-Puffer pH 6 => Puffer 1
- enzymatische Vorbehandlung => Waschpuffer

In Tabelle 11 sind die einzelnen Schritte der immunhistochemischen Färbung der tabellarisch aufgeführt:

Schritte	Dauer
Inkubationszeit im Dampfgerar	Puffer 2 und 4: 20 Minuten
	Puffer 1: 30 Minuten
Kühlung der präparat-beladenen Küvetten	10 Minuten
Waschpuffer	10 Minuten
Objekträger einspannen	
Pumpen (Wasser und Puffer) je 1 x spülen und Lauf starten	
Enzym-Substrat-Komplex ansetzen	
Präparate im Ständer sammeln	
Bläuen in Leitungswasser	2 Minuten
Spülen mit Aqua destilatum	5 Minuten
70% Alkohol	kurz 3-4 x tauchen
70% Alkohol	kurz 3-4 x tauchen
96% Alkohol	kurz 3-4 x tauchen
96% Alkohol	kurz 3-4 x tauchen
100% Alkohol	kurz 3-4 x tauchen
100% Alkohol	kurz 3-4 x tauchen
Xylol	1 Minute
Xylol	1 Minute
Xylol	1 Minute
Anschließend eindecken und trocknen	

Tabelle 11: Auflistung der einzelnen Schritte der Immunhistochemischen Färbung

3.4.4 Auswertung

Zur Auswertung wurden die Schnitte unter dem Olympus Japan Mikroskop, Gerätetyp BH-2, durch zwei Dermatopathologen unabhängig voneinander mikroskopiert und die Färbeintensität der einzelnen Antikörper in Prozent bewertet. Hierbei wurden pro Schnitt je nach Antikörper die angefärbten Zellkerne oder die zytoplasmatische Färbung in Prozent ermittelt. Die erhobenen Werte wurden je nach

Anteil markierter Zellen in Gruppen eingeteilt. Die zur Auswertung genutzten Färbeskalen sind in Tabelle 12-15 dargestellt:

Level der MIB-1 Färbung	Nukleäre Färbung in %
schwach	<5%
moderat	6-15%
mittelstark	16-25%
stark	>26%

Tabelle 12: MIB-1 Färbeskala modifiziert nach (Sparrow et al., 1998)

Level der p53 Färbung	Nukleäre Färbung in %
schwach	<5%
moderat	6-25%
mittelstark	26-50%
stark	>50%

Tabelle 13: p53 Färbeskala modifiziert nach (Sirigu et al., 2006)

Level der Caspase-3 Färbung	Zytoplasmatische Färbung in %
schwach	<1%
moderat	1-10%
mittelstark	11-50%
stark	>50%

Tabelle 14: Caspase-3 Färbeskala modifiziert nach (Woenckhaus et al., 2003)

Level der p16INK4a und p14ARF Färbung	Zytoplasmatische Färbung in %
schwach	0-5%
moderat	6-20%
mittelstark	21-50%
stark	>50%

Tabelle 15: p16INK4a und p14ARF Färbeskala modifiziert nach (Fauri et al., 2011)

Aus den Werten der CD4 und CD8 Färbungen wurde der CD4/CD8-Quotient berechnet und dieser anhand der Skala in drei Stufen eingeteilt (Tabelle 16).

Level des CD4/CD8-Quotienten	CD4/CD8-Quotient
erniedrigt	<1,34
normal	1,34-2,0
erhöht	>2,0

Tabelle 16: Skala des CD4/CD8-Quotienten modifiziert nach (You et al., 2009)

Bei Abweichungen der beiden Ergebnisse um mehr als 10% wurde eine abschließende Bewertung über einen Konsens der beiden Histologen gewonnen, indem beide die Schnitte gemeinsam mikroskopierten. Lagen die jeweiligen Ergebnisse unter 10% auseinander so wurde der Mittelwert verwendet.

Als Beispiele für die beschriebenen Färbeskalen werden in den Abbildungen 1-4 Beispiele von uns als positiv und negativ gewerteter Färbungen für CD4 und CD8 aufgeführt. Abbildung 1 zeigt ein SSM-ohne-Reg mit wenig CD8 Nachweisbarkeit. Eine starke CD8 Infiltration in einem SSM-mit-Reg kann in Abbildung 2 gesehen werden. Ebenso werden in Abbildung 3 eine schwache CD4-Infiltration bei einem SSM-mit-Reg und in Abbildung 4 eine starke CD4 Anfärbbarkeit in einen SSM-ohne-Reg gezeigt.

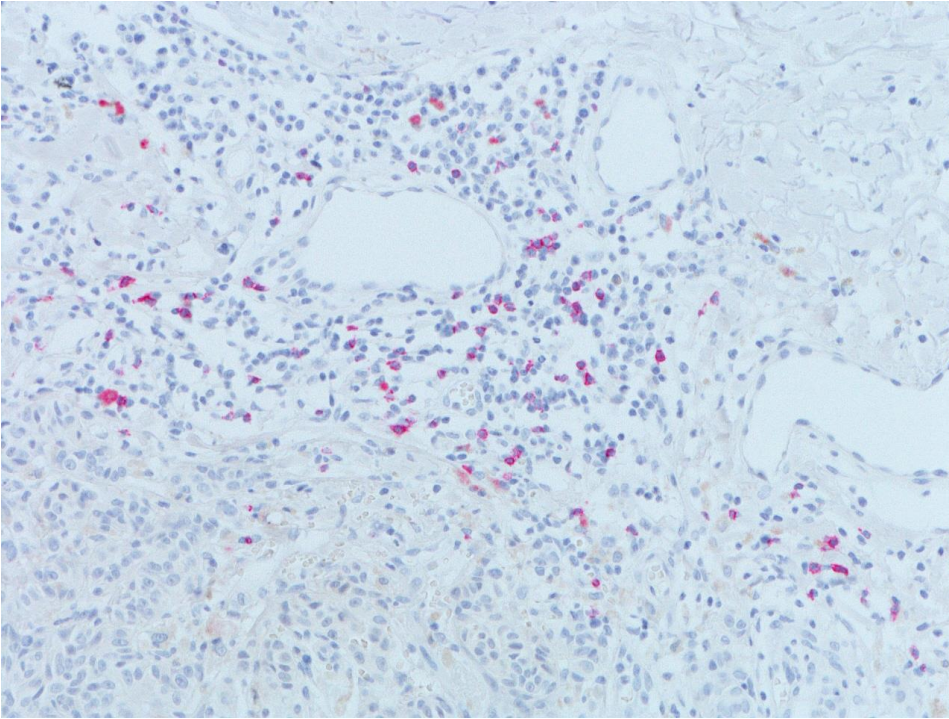


Abbildung 1: Beispiel einer als negativ gewerteten CD8 Färbung eines SSM-ohne-Reg (459/92)

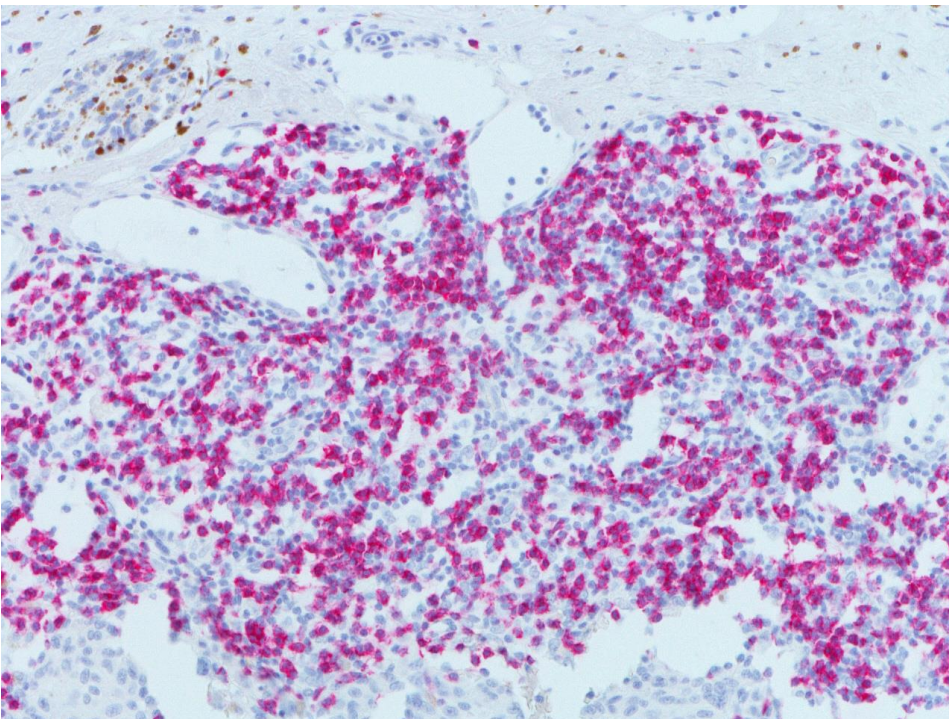


Abbildung 2: Beispiel einer als positiv gewerteten CD8 Färbung eines SSM-mit-Reg (17546/07)

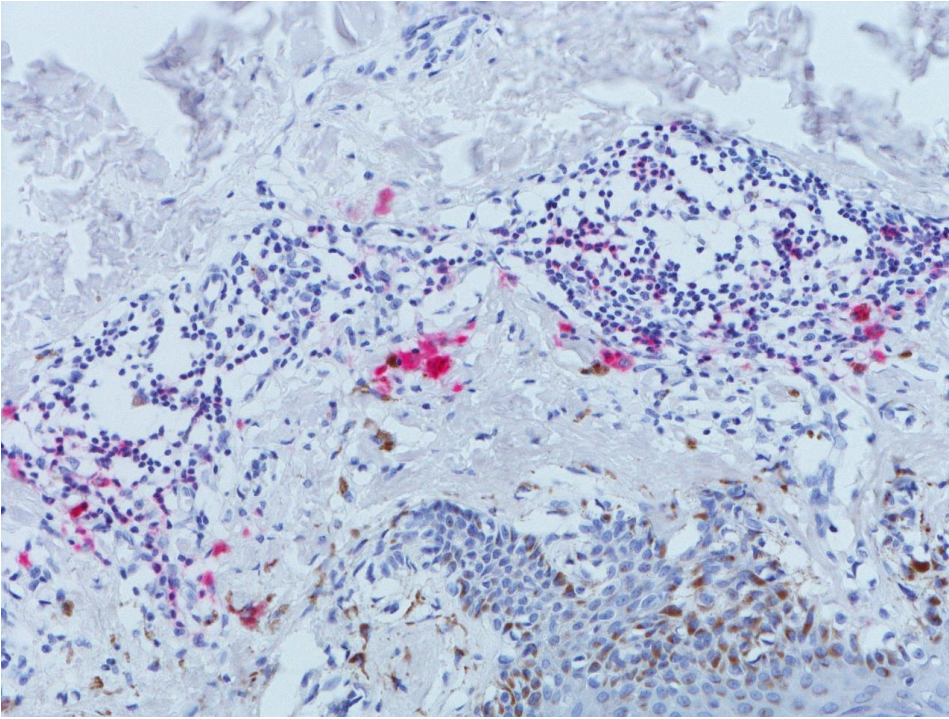


Abbildung 3: Beispiel einer als negativ gewerteten CD4 Färbung eines SSM-mit-Reg (23528/07)

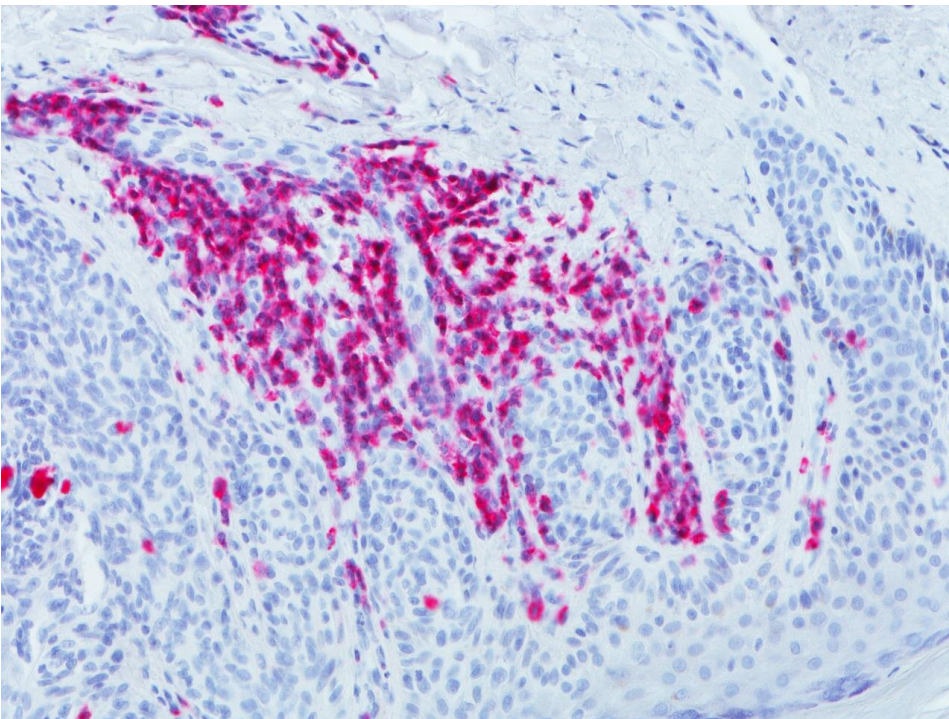


Abbildung 4: Beispiel einer als positiv gewerteten CD4 Färbung eines SSM-ohne-Reg (563/06)

3.5 Hämatoxylin-Eosin Färbung

HE-Färbungen wurden als Kontrollen für die immunhistochemischen Färbungen zu jedem Präparat angefertigt. Es wurde eine Methode der HE-Färbung benutzt, ähnlich wie von Böcker et al. beschrieben (Böcker et al., 2001). In dieser Arbeit wurde die Methode nach der internen Laborarbeitsanweisung modifiziert übernommen (Labor für Dermatohistologie der Universitäts-Hautklinik Tübingen unter der Leitung von Dr. med. Gisela Metzler und Prof. Dr. med. Jürgen Bauer).

3.5.1 Geräte

- Färbeautomat und Metallkörbchen mit Bügel: Medite Tissue-Stainer TST 44C (Burgdorf, Deutschland)
- Waage, Sartorius 1212 MP (USA)
- Objektträger-Eindeckautomat, RCM 7000, Medite Group

3.5.2 Reagenzien und Medien

- Hämatoxylin nach Gill (gebrauchsfertig), Fa. Merck – 1.05174.2500
- Essigsäure 100%, Fa. Merck – 1.00063-1011
- Eosin G, Fa. Merck – 1.15935.0100
- 100% Alkohol, SAV-Liquid Production GMBH
- 70%, 80% und 96% Alkohol, eigene Herstellung
- Xylol, Fa. Merck
- Pertex (gebrauchsfertig), Medite, PER 300000
- Aqua destilatum
- Warmes Leitungswasser
- Untersuchungsmaterial: 3-4µm dicke Paraffinschnitte, Gewebe in 4-5% gepuffertem Formalin fixiert

3.5.3 Durchführung

Die folgende Zusammenfassung der einzelnen Arbeitsschritte wurde aus einer internen Laborarbeitsanweisung modifiziert übernommen (Labor für Dermatohistologie der Universitäts-Hautklinik Tübingen unter der Leitung von Dr. med. Gisela Metzler und Prof. Dr. med. Jürgen Bauer):

Zur Probenvorbereitung wurden die Schnitte zuerst im Gerät entparaffiniert und anschließend gefärbt. Zur Vorbereitung der Eosin-Stammlösung wurden 4g Eosin G in 100ml Aqua destilatum gelöst und mit 400ml 96%igem Alkohol verdünnt. Die Eosin Gebrauchslösung bestand aus 190ml Eosin-Stammlösung, die mit 570ml 80%igem Alkohol und 2ml Eissessig (Essigsäure 100%) vermischt wurde. Letztlich wurde das Essigwasser zubereitet, dies bestand aus 1000ml Aqua destilatum gemischt mit 5,7ml Eissessig (Essigsäure 100%).

Folgende Schritte wurden bei der Färbung dieser Reihenfolge nach durchlaufen Tabelle 17:

Schritte	Dauer
Hämatoxilin nach Gill	5 Minuten
Aqua destilatum	15 Sekunden
Essigwasser	1 Minuten
Leitungswasser warm	2 Minuten
Leitungswasser warm	4 Minuten
80% Alkohol	15 Sekunden
Eosin-Gebrauchslösung	1 Minute
80% Alkohol	15 Sekunden
96% Alkohol	15 Sekunden
96% Alkohol	15 Sekunden
100% Alkohol	15 Sekunden
100% Alkohol	15 Sekunden
Xylol	15 Sekunden
Xylol	15 Sekunden
Xylol	15 Sekunden
Zuletzt werden die Schnitte mit Pertex eingedeckt	

Tabelle 17: Auflistung der einzelnen Schritte der Hämatoxylin-Eosin Färbung

3.6 Statistik

Aufgrund der geringen Fallzahl wurde keine Normalverteilung angenommen und es wurden nicht-parametrische Tests durchgeführt. Beim Vergleich von mehr als zwei Gruppen wurde der Kruskal-Wallis-Test für nicht verbundene Daten durchgeführt. Die paarweisen Tests wurden mittels des Mann-Whitney-U-Tests mit Adjustierung nach der Holm-Methode und dem gepaarten Wilcoxon-Test durchgeführt. Deskriptive Parameter wurden als Median und IQR angegeben (25.-75. Perzentile). Die graphische Darstellung erfolgte in Form von Boxplots.

Der Zusammenhang zweier metrischer Größen wurde mit Hilfe des Spearman Korrelations-Koeffizienten für nicht normverteilte Daten ermittelt. Die

Übereinstimmung von zwei Methoden wurde mit Hilfe der Bland-Altman-Analyse untersucht (Bland and Altman, 1986).

Alle Tests wurden zweiseitig durchgeführt bei einer Signifikanzgrenze von $p=0,05$. Die Daten wurden mit Hilfe der Software R Version 3.1.1 (the R Foundation for statistical computing) analysiert (R-Development-Core-Team, 2008).

Bei der statistischen Auswertung wurden die dermalen Nävi bei allen Vergleichen aufgrund der geringen Fallzahl nicht miterfasst.

4. Ergebnisse

In der vorliegenden Dissertation wurden neun regressive superfiziell spreitende Melanome (SSM-mit-Reg 1-9) mit neun superfiziell spreitenden Melanomen ohne Regression (SSM-ohne-Reg 1-9) mittels immunhistologischer Marker verglichen. Sechs Halonävi (Halon.J 1-3 und Halon.C 1-3) sowie zwei dermale Nävi (Derm.N 1-2) dienten als Kontrollen.

In den Tabellen 18-22, 27-28 und 33 wurden die statistischen Ergebnisse (Median, Interquartilsabstand (IQR), Spannweite (min-max), Mittelwerte (MW) und Standardabweichung (SD)) der Färbungen pro Gruppe (SSM-ohne-Reg, SSM-mit-Reg, Derm.N und Halonävi) aufgelistet. In den Abbildungen 5-15, 24-26, 35-37 wurden die zu den einzelnen Färbungen zugehörigen Boxplots und die Färbungen pro Fall gezeigt.

Die Ergebnisse der Korrelationsanalysen zu p14ARF versus p16INK4a, CD4 versus CD8 und CD4 versus p16INK4a wurden in Bland-Altman Diagrammen und Boxplots (Abbildungen 16-23, 27-34 und 38-45) sowie den zugehörigen Tabellen (Tabelle 23-26, 29-32, 34-37) dargestellt.

Im Folgenden werden nun die Ergebnisse genauer beschrieben.

4.1 Zellproliferation

In Abbildung 5 wurde die MIB-1 Färbung pro Fall im Spaltendiagramm dargestellt. MIB-1 gehört zu den Proliferationsmarkern und kann während der G1-, S-, M- und G2-Phase des Zellzyklus im Zytoplasma detektiert werden. In der Ruhephase der Zelle (G0-Phase) ist MIB-1 nicht detektierbar.

Bei den SSM-ohne-Reg, vor allem SSM-ohne-Reg 1, 4 und 5 war MIB-1 mit >15% mittelstark nachweisbar. In den meisten SSM-ohne-Reg Schnitten (SSM-ohne-Reg 2, 3, 6-9) wurde MIB-1 moderat exprimiert. In regressiven Melanomen färbte MIB-1

in den meisten Fällen unter 5% an (SSM-mit-Reg 1, 3-7 und 9), nur in zwei Fällen (SSM-mit-Reg 2 und 8) exprimierte MIB-1 mit 10%. Bei SSM-mit-Reg 4 und 7 war MIB-1 überhaupt nicht nachweisbar. Die dermalen Nävi zeigten keinen MIB-1 Nachweis. Bei den Halonävi färbte kein Fall mehr als 5% an.

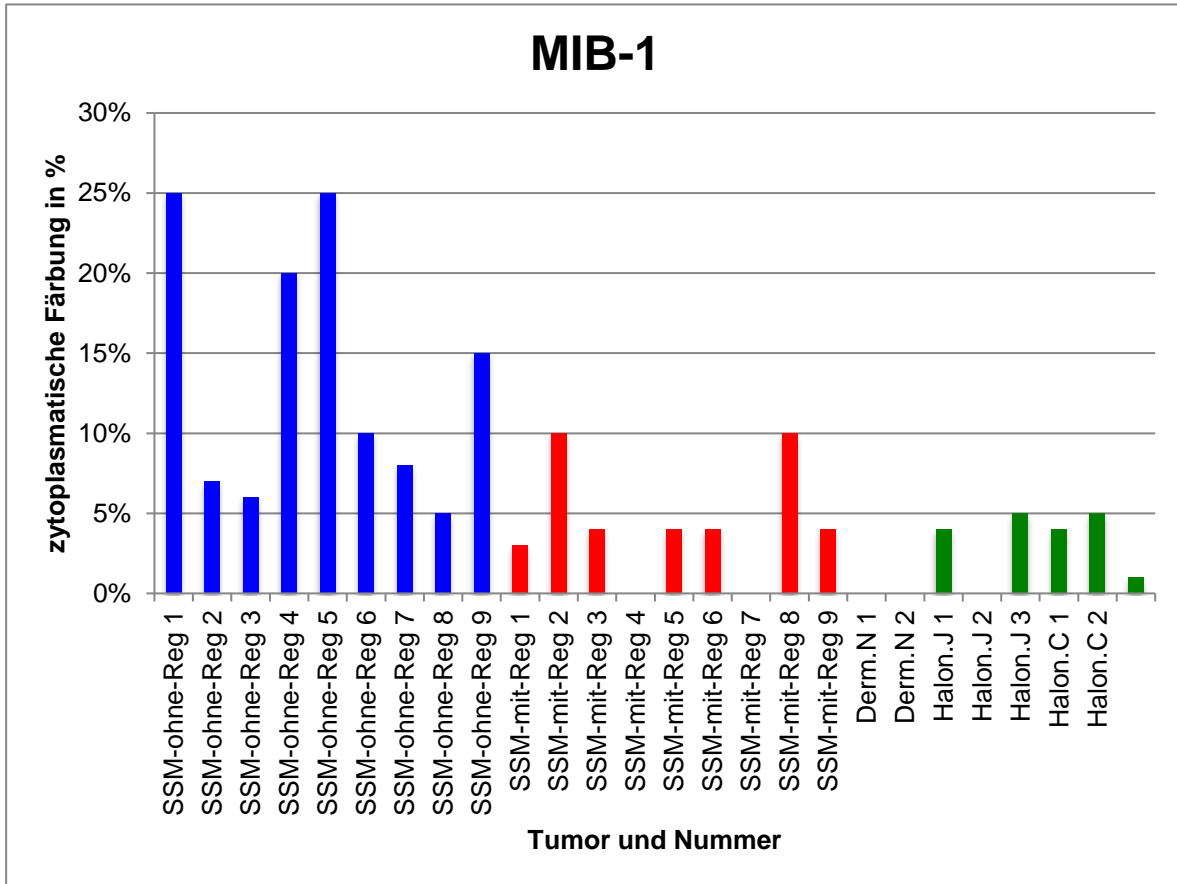


Abbildung 5: MIB-1 Färbung pro Fall

Tabelle 18 zeigt den Median, den IQR (interquartile range=Interquartilsabstand), die Spannweite (min-max), den Mittelwert und dessen Standardabweichung (SD=Standard Deviation) pro Gruppe für die MIB-1 Färbungen.

Der Vergleich der Gruppen mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests ergab einen signifikanten p-Wert von 0,002. Der Mann-Whitney-U-Test mit Adjustierung nach der Holm Methode zeigte, dass die SSM-ohne-Reg (Median: 0,1; IQR: 0,07-0,2) signifikant ($p < 0,05$) mehr MIB-1 aufwies als die SSM-mit-Reg (Median: 0,04; IQR: 0,03-0,04). Auch im Vergleich der SSM-ohne-Reg (Median 0,01; IQR: 0,07-0,2) mit den Halonävi (Median: 0,04; IQR: 0,02-0,05) zeigte sich ein signifikanter Unterschied. Bei den regressiven Melanomen konnte im Vergleich mit den Halonävi kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

	Gruppen		
	SSM-ohne-Reg (n=9)	SSM-mit-Reg (n=9)	Halonävi (n=6)
Median	0,1	0,04	0,04
IQR	0,07-0,2	0,03-0,04	0,02-0,05
min-max	0,2	0,1	0,05
MW \pm SD	0,13 \pm 0,08	0,04 \pm 0,04	0,03 \pm 0,02

Tabelle 18: Auflistung des Medians, IQR (interquartile range=Interquartilsabstand), min-max=Spannweite, des Mittelwertes und dessen Standardabweichung (SD=Standard Deviation) pro Gruppe für die MIB-1 Färbungen

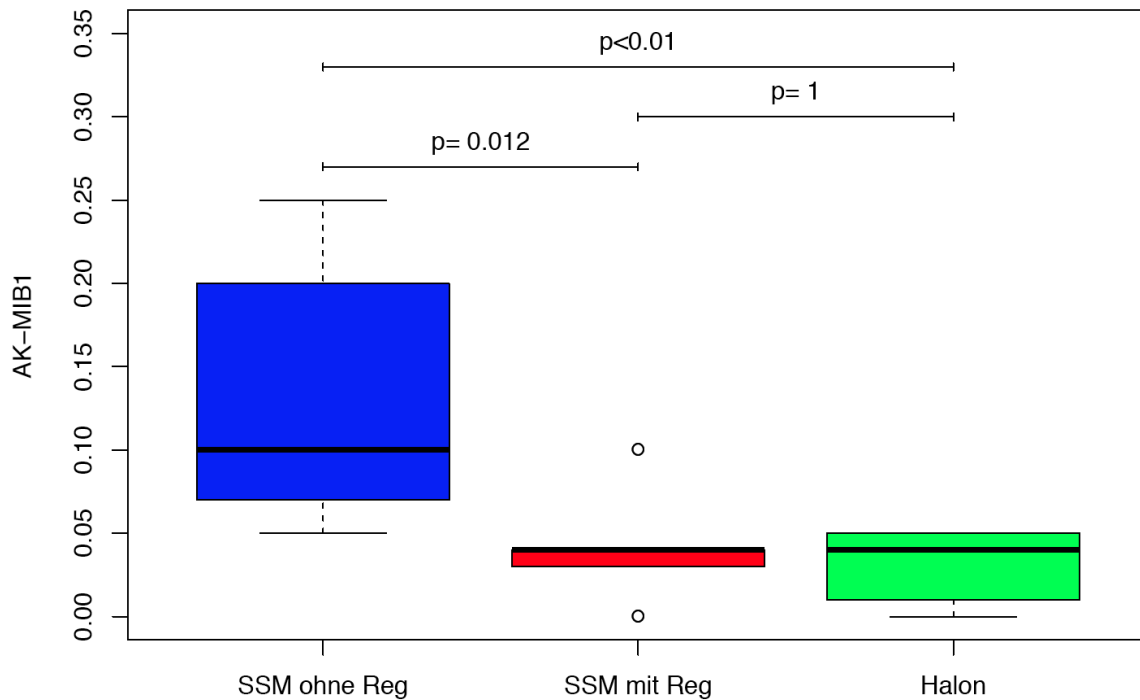


Abbildung 6: Boxplot der MIB-1 Färbung

Zusammenfassend sind SSM-ohne-Reg im Vergleich zu den regressiven Melanomen und auch im Vergleich zu den Halonävi signifikant stärker proliferativ aktiv. Die Gegenüberstellung der regressiven Melanome mit den Halonävi ergab keinen signifikanten Unterschied. Die geringste proliferative Aktivität war bei den dermalen Nävi (Abbildung 6) festzustellen. Bei diesen benignen Tumoren wurde auch keine erhöhte Proliferation erwartet.

4.2 Marker für DNS-Schäden und Apoptose

Als Marker für DNS-Schäden und Apoptose wurden in dieser Arbeit p53 und Caspase-3 verwendet. Bei DNS-Schädigung akkumuliert p53 in der Zelle. Diese Aktivierung von p53 kann zu einem Zellzyklusarrest und/oder zur Induktion der

Apoptose führen. Caspase-3 spielt eine zentrale Rolle in der Ausführungsphase der Apoptose.

4.2.1 p53

In Abbildung 7 wurden die p53 Färbungen pro Fall dargestellt. Wurden die einzelnen Fälle in ihrer jeweiligen Gruppe untereinander verglichen, so fielen bei den SSM-mit-Reg kaum Unterschiede auf. Die meisten SSM-mit-Reg zeigten keine (SSM-mit-Reg 1-4,7 und 9) oder nur eine sehr geringe (<10%) Akkumulation von p53 (SSM-mit-Reg 5 und 6). Lediglich SSM-mit-Reg 8 erreichte 20%. Bei der SSM-ohne-Reg-Gruppe waren die Unterschiede deutlicher. Zwei SSM-ohne-Reg exprimierten p53 bis zu 100% aller Tumorzellen (SSM-ohne-Reg 7 und 8). Die meisten blieben aber deutlich unter 10% (SSM-ohne-Reg 1-5). Die dermalen Nävi wiesen kein p53 auf, die Halonävi färbten immer unter 20% an.

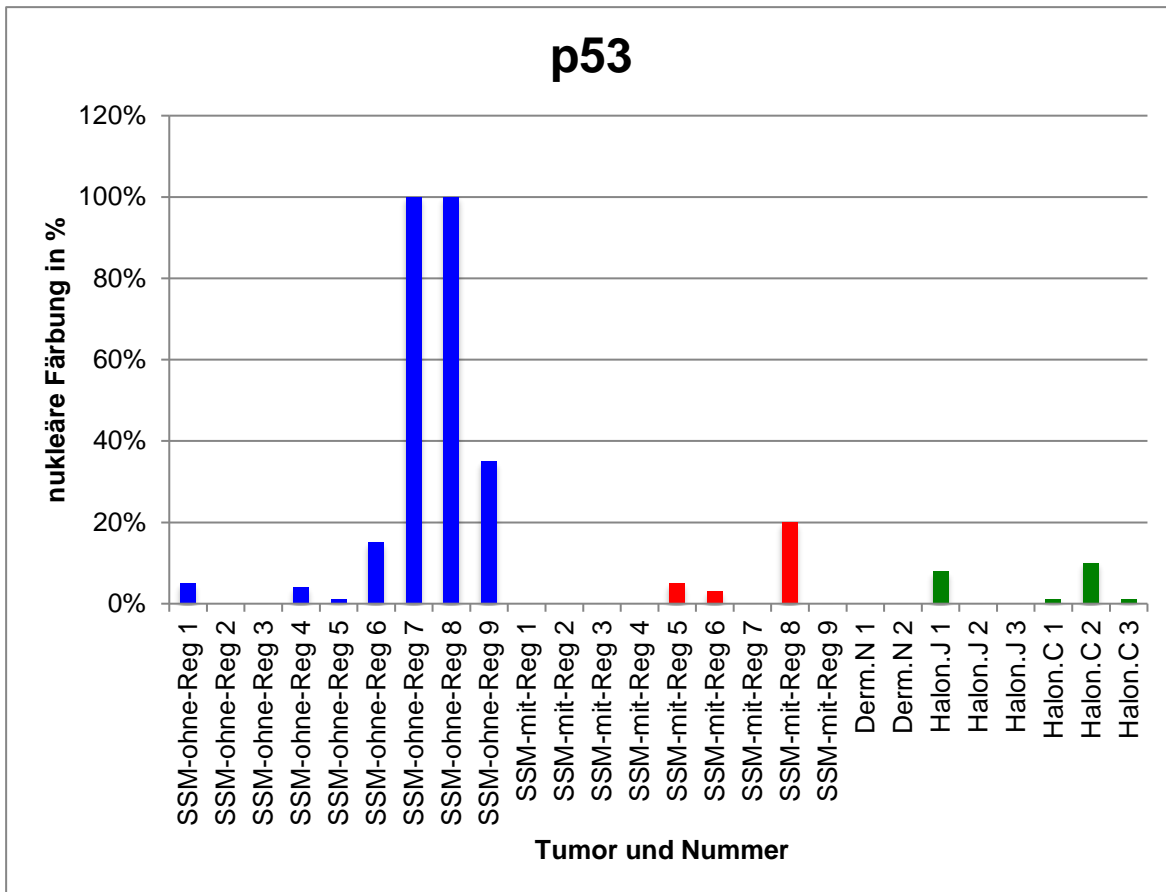


Abbildung 7: p53 Färbung pro Fall

In Tabelle 19 und Abbildung 8 wurden die statistischen Ergebnisse der p53 Färbung dargestellt, wobei die dermalen Nävi nicht in die Statistik miteinbezogen wurden. Es konnte hier bei einem p-Wert von 0,121 kein signifikanter Unterschied im Vergleich der einzelnen Gruppen festgestellt werden. Es fiel jedoch auf, dass der Vergleich der Gruppen SSM-mit-Reg (Median 0; IQR: 0-0,03), SSM-ohne-Reg (Median 0,05; IQR: 0,01-0,35) und Halonävi (Median: 0,01; IQR: 0-0,06) nur knapp über der Signifikanzgrenze lagen.

	Gruppen		
	SSM-ohne-Reg (n=9)	SSM-mit-Reg (n=9)	Halonävi (n=6)
Median	0,05	0	0,01
IQR	0,01-0,35	0-0,03	0-0,06
min-max	1	0,2	0,1
MW \pm SD	0,29 \pm 0,42	0,03 \pm 0,07	0,03 \pm 0,04

Tabelle 19: Auflistung des Medians, IQR (interquartile range=Interquartilsabstand), min-max=Spannweite und des Mittelwertes und dessen Standardabweichung (SD=Standard Deviation) pro Gruppe für die p53 Färbungen

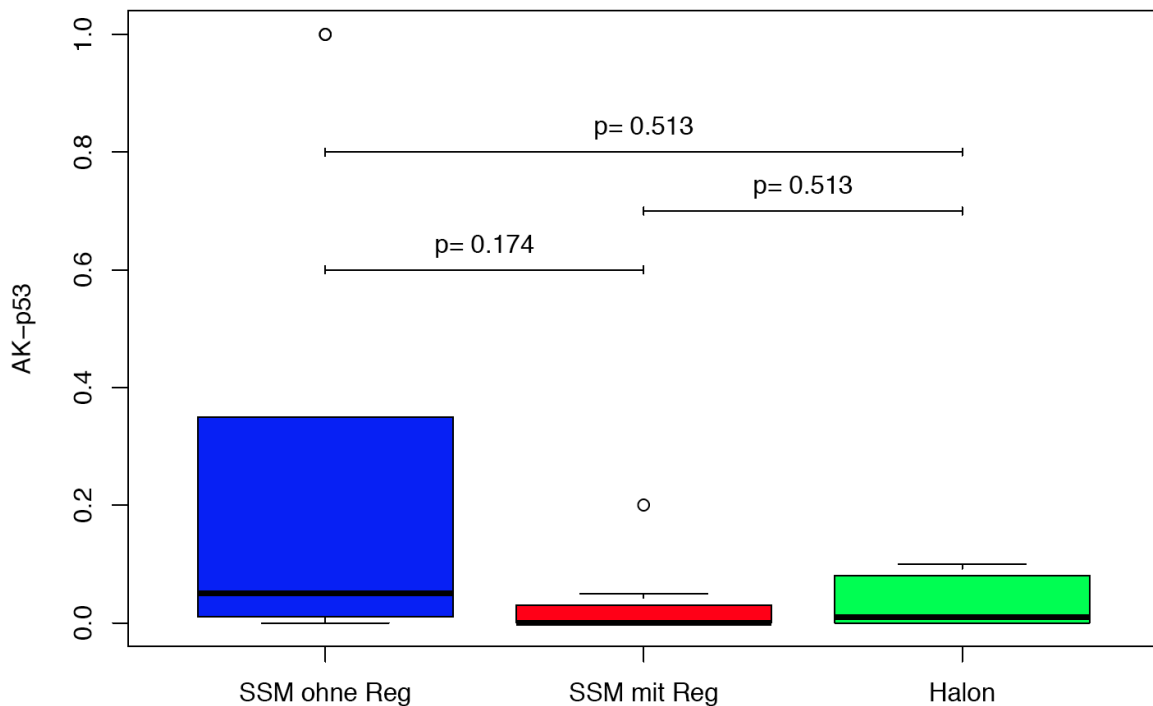


Abbildung 8: Boxplot der p53 Färbung

Es war in dieser Population kein signifikanter Unterschied in der Akkumulation von p53 bei den Melanomen feststellbar. Einige SSM-ohne-Reg zeigten in der Einzelbetrachtung eine deutlich stärkere Aktivierung von p53 als die SSM-mit-Reg, bei denen kaum p53 nachweisbar war.

4.2.2 Caspase-3

In Abbildung 9 wurden die Caspase-3 Färbungen pro Fall dargestellt. Bei allen drei Gruppen (SSM-ohne-Reg, SSM-mit-Reg und Halonävi) war Caspase-3 in den meisten Fällen sehr stark anfärbbar, das heißt über 50%. Alle Halonävi, bis auf Halon.J 2, färbten Caspase-3 mit 100% an. Bei den SSM-ohne-Reg und SSM-mit-Reg gab es einzelne Fälle, die $\leq 100\%$ färbten (SSM-ohne-Reg 3, 4, 6 und SSM-mit-Reg 4, 5, 7-9). Nur die Schnitte SSM-mit-Reg 4 und 7 färben wenig bis gar nicht an.

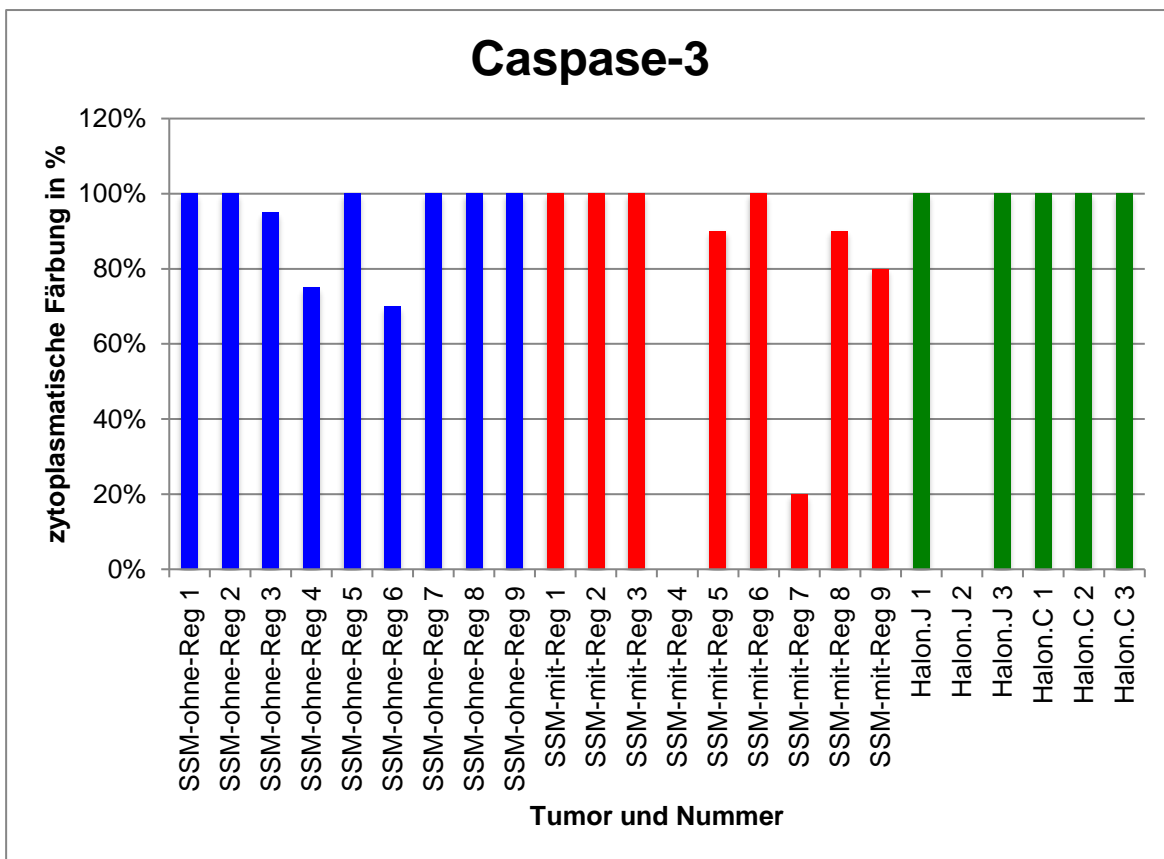


Abbildung 9: Caspase-3 Färbungen pro Fall

In Tabelle 20 und dem zugehörigen Boxplot (Abbildung 10) wurden die statistischen Auswertungen der Caspase-3 Färbungen dargestellt. Im Vergleich der SSM-ohne-Reg (Median: 1; IQR: 0,95-1), den SSM-mit-Reg (Median: 0,9; IQR 0,8-1) und den Halonävi (Median: 1; IQR: 1-1) war bezüglich der Caspase-3 Färbung kein signifikanter Unterschied (p -Wert=0,405) feststellbar.

Insgesamt wies bei beiden Melanomgruppen und auch bei den Halonävi die starke Anfärbung für Caspase-3 auf eine erhöhte apoptotische Aktivität hin.

	Gruppen		
	SSM-ohne-Reg (n=9)	SSM-mit-Reg (n=9)	Halonävi (n=6)
Median	1	0,9	1
IQR	0,95-1	0,8-1	1-1
min-max	0,3	1	1
MW \pm SD	0,93 \pm 0,12	0,76 \pm 0,38	0,83 \pm 0,41

Tabelle 20: Auflistung des Medians, IQR (interquartile range=Interquartilsabstand), min-max=Spannweite und des Mittelwertes und dessen Standardabweichung (SD=Standard Deviation) pro Gruppe für die Caspase-3 Färbungen

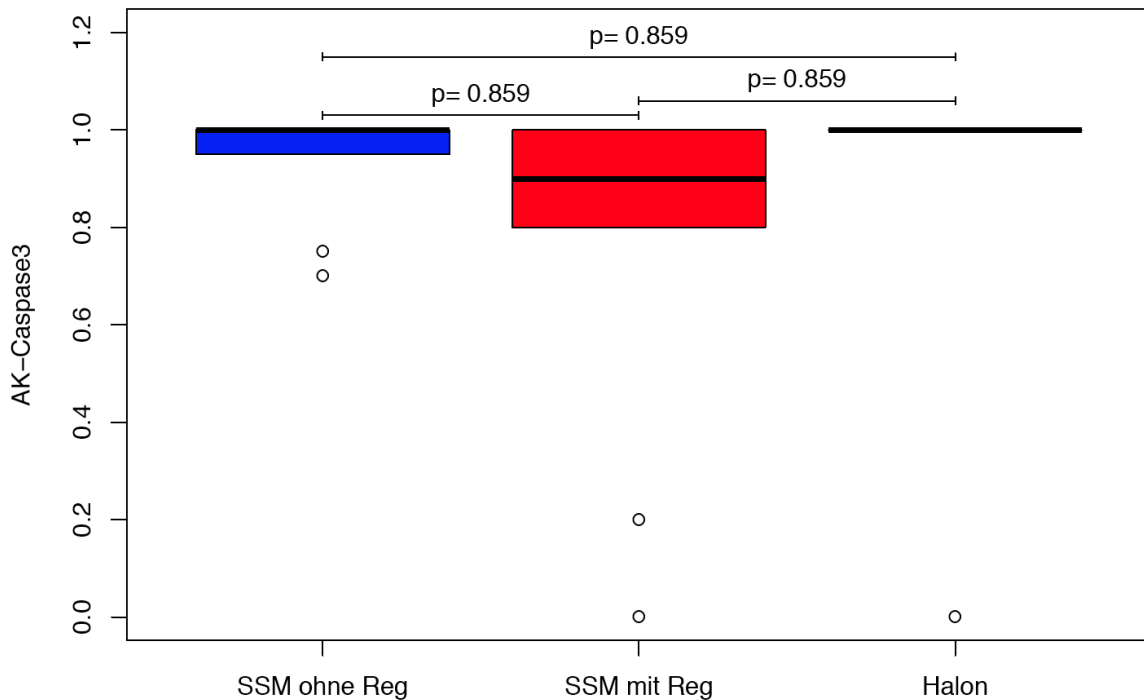


Abbildung 10: Boxplot der Caspase-3 Färbung

4.3 Onkogene Seneszenz

Als Seneszenzmarker wurden p16INK4a und p14ARF untersucht. p16INK4a ist ein wichtiger Inhibitor der CDK 4 und 6 und spielt als Zellzyklusregulator für den Übergang in die G1/S-Phase eine wichtige Rolle. p14ARF stellt einen proapoptotischen Zellzyklusregulator dar.

4.3.1 p16INK4a

Die p16INK4a Färbung (Abbildung 11) war bei den SSM-ohne-Reg und SSM-mit-Reg sehr unterschiedlich ausgeprägt. SSM-ohne-Reg 1-3 und 8 wiesen mit $\geq 50\%$ die stärksten Färbungen auf. In der Gruppe der SSM-ohne-Reg gab es zwischen den einzelnen Tumoren eine große Streuung (IQR: 0,03-0,9): SSM-ohne-Reg 7 lag

mit 45% im mittleren Färbereich, während SSM-ohne-Reg 4-6 und 9 unter 5% p16INK4a tragende Zellen aufzeigten. Bei den regressiven Melanomen zeigten ebenfalls starke Unterschiede in der p16INK4a Färbbarkeit: vier Fälle eine Färbestärke unter 5% (SSM-mit-Reg 2, 4, 7 und 9), aber es kamen nur zwei Fälle über 50% (SSM-mit-Reg 5 und 8). Bei den dermalen Nävi und Halonävi zeigten die meisten Fälle eine mittelstarke Färbung (21-50%). Zwei Fälle färbten stark über 50% der Zellen an (Halon.C 2 und Halon.C 3). Halon.J 2 und Halon.C 1 blieben unter 10%. Die dermalen Nävi exprimierten p16INK4a mit 25% und 50%.

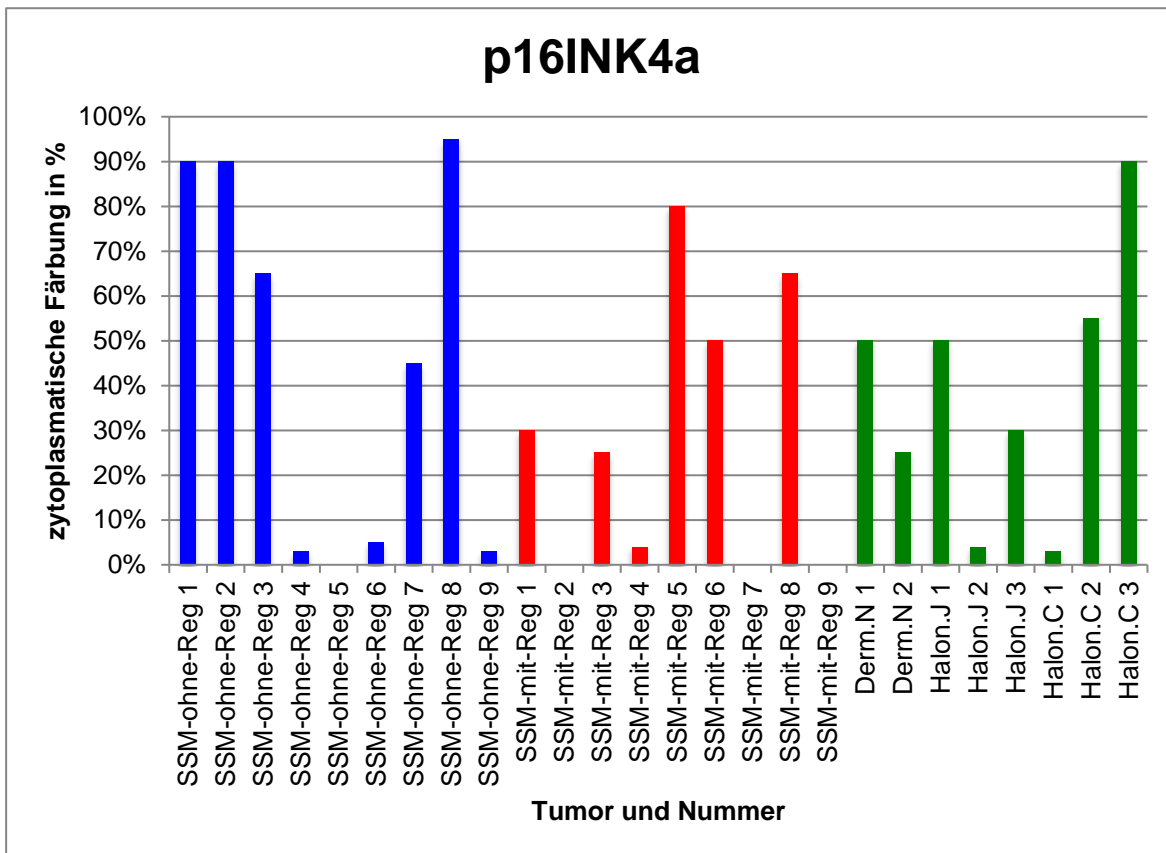


Abbildung 11: p16INK4a Färbung pro Fall

In der Statistik kam im Vergleich der SSM-mit-Reg (Median: 0,25; IQR: 0-0,5), SSM-ohne-Reg (Median: 0,45; IQR: 0,03-0,9) und Halonävi (Median: 0,4; IQR: 0,1-0,54) bei einem p-Wert von 0,521 kein signifikanter Unterschied zur Darstellung (Tabelle 21 und Abbildung 12). Die dermalen Nävi wurden in der statistischen Auswertung aufgrund der geringen Fallzahl nicht berücksichtigt. Somit bleibt anzumerken, dass die p16INK4a Färbung in den Melanomen mit und ohne Regression sehr stark unterschiedlich nachweisbar war. Ähnlich verhielt es sich bei der Betrachtung der Halonävi und der dermalen Nävi.

	Gruppen		
	SSM-ohne-Reg (n=9)	SSM-mit-Reg (n=9)	Halonävi (n=6)
Median	0,45	0,25	0,4
IQR	0,03-0,9	0-0,5	0,10-0,54
min-max	0,95	0,8	0,87
MW ± SD	0,44 ± 0,42	0,28 ± 0,31	0,39 ± 0,33

Tabelle 21: Auflistung des Medians, IQR (interquartile range nterquartilsabstand), min-max=Spannweite und des Mittelwertes und dessen Standardabweichung (SD=Standard Deviation) pro Gruppe für die p16INKa Färbungen

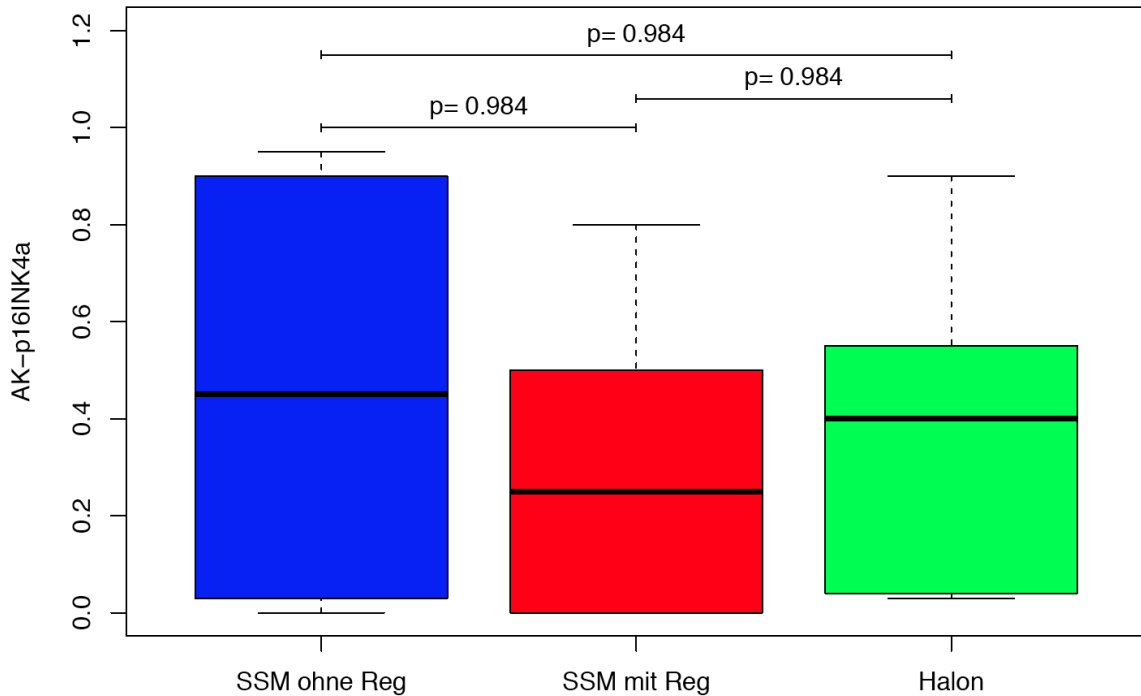


Abbildung 12: Boxplot der p16INK4a Färbung

Zusammenfassend wurde p16INK4a in allen Gruppen sehr unterschiedlich stark exprimiert. In der statistischen Auswertung (Tabelle 21 und Abbildung 12) ließ sich kein signifikanter Unterschied im Vergleich der einzelnen Gruppen nachweisen.

4.3.1 p14ARF

In Abbildung 13 wurden die p14ARF Färbungen dargestellt. Hier zeigt sich analog zu p16INK4a eine in den jeweiligen Gruppen sehr unterschiedliche p14ARF Nachweisbarkeit. So waren drei SSM-ohne-Reg (SSM-ohne-Reg 7-9) mit über 50% stark, eines moderat (SSM-ohne-Reg 6) und fünf SSM-ohne-Reg (SSM-ohne-Reg 1-5) schwach färbbar. Bei den regressiven Melanomen wiesen sechs Schnitte kaum (SSM-mit-Reg 1-4, 6 und 8), einer eine moderate (SSM-mit-Reg 7), einer eine mittlere (SSM-mit-Reg 9) und einer eine hohe (SSM-mit-Reg 5) Anzahl p14ARF

positiver Zellen auf (Abbildung 13). Auch bei den Halonävi konnten sehr unterschiedliche Stärken der p14ARF Färbung festgestellt werden. Die dermalen Nävi zeigten keinen Nachweis von p14ARF.

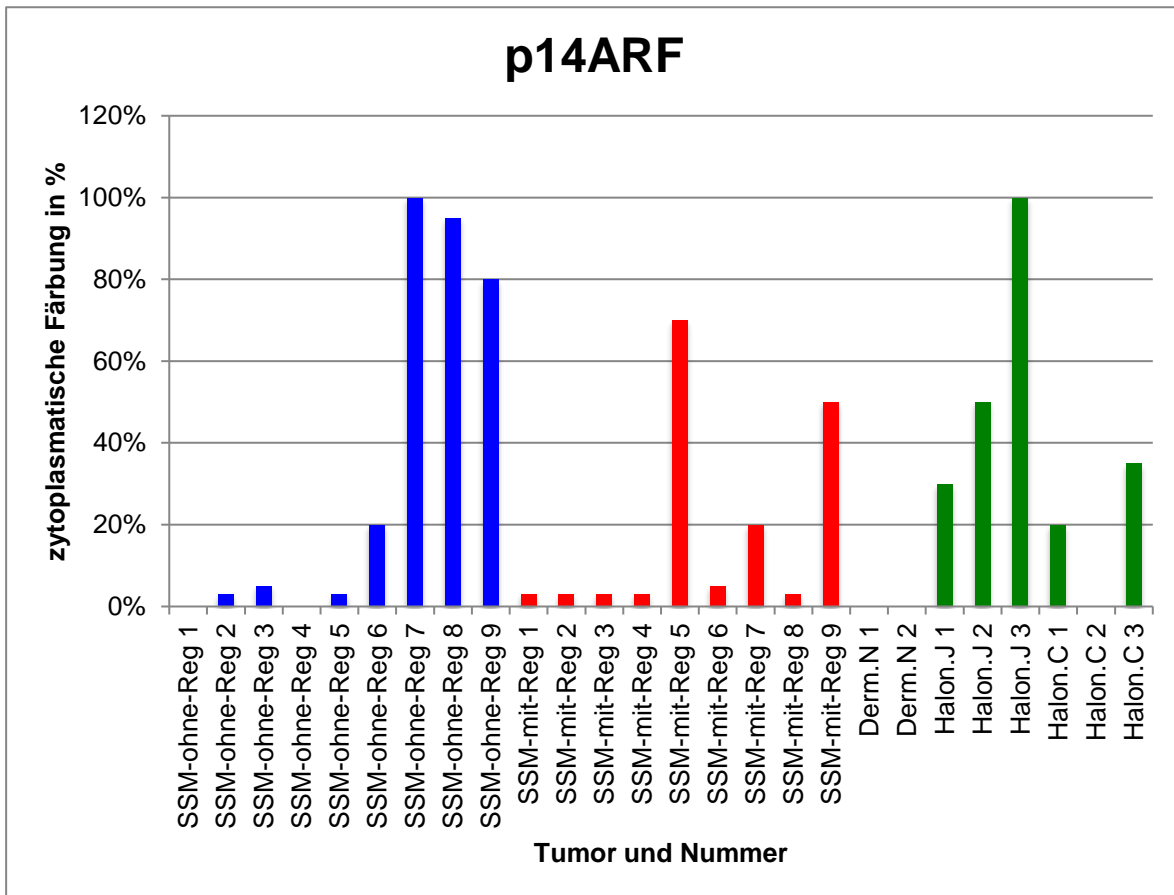


Abbildung 13: p14ARF Färbung pro Fall

In Tabelle 22 und dem zugehörigen Boxplot (Abbildung 14) wurden die statistischen Ergebnisse der p14ARF Färbung dargestellt. Die dermalen Nävi wurden in der Statistik aufgrund ihrer geringen Fallzahl nicht berücksichtigt. Der Vergleich der Gruppen mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests ergab keinen signifikanten p-Wert ($p=0,519$). Somit kam kein signifikanter Unterschied im Vergleich der SSM-ohne-

Reg (Median: 0,05; IQR: 0,03-0,8), SSM-mit-Reg (Median: 0,03; IQR: 0,03-0,2) und Halonävi (Median: 0,32; IQR: 0,23-0,46) zur Feststellung.

	Gruppen		
	SSM-ohne-Reg (n=9)	SSM-mit-Reg (n=9)	Halonävi (n=6)
Median	0,05	0,03	0,32
IQR	0,03-0,8	0,03-0,2	0,23-0,46
min-max	1	0,67	1
MW \pm SD	0,34 \pm 0,44	0,18 \pm 0,25	0,39 \pm 0,34

Tabelle 22: Auflistung des Medians, IQR (interquartile range=Interquartilsabstand), min-max=Spannweite und des Mittelwertes und dessen Standardabweichung (SD=Standard Deviation) pro Gruppe für die p14ARF Färbungen

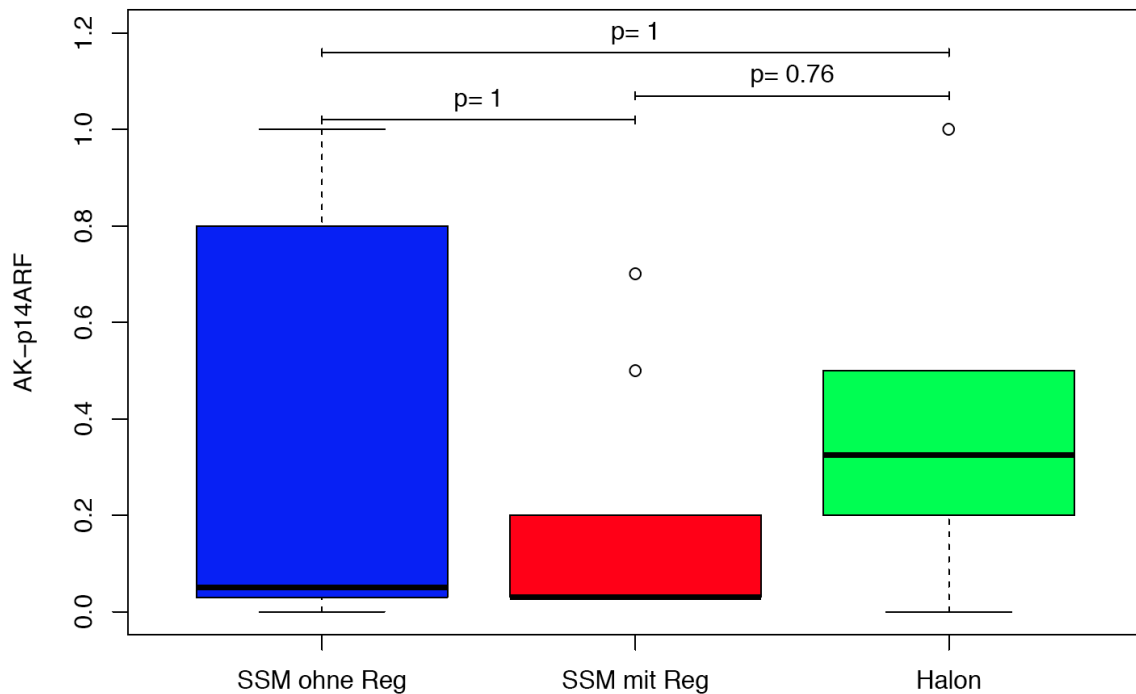


Abbildung 14: Boxplot der p14ARF Färbung

Insgesamt zeigten somit p16INK4a als auch p14ARF keinen signifikanten ($p < 0,05$) Unterschied im Vergleich der einzelnen Gruppen (Halonävi, SSM-mit-Reg und SSM-ohne-Reg) untereinander. Es fiel jedoch auf, dass in der Einzelbetrachtung der Gruppen p14ARF als auch p16INK4a jeweils eine sehr unterschiedliche Nachweisbarkeit innerhalb einer Gruppe bestand.

4.3.3 p16INK4a versus p14ARF

In Abbildung 15 wurden die einzelnen p16INK4a und p14ARF Färbungen pro Fall verglichen. Es fiel auf, dass sich p16INK4a und p14ARF oft gegenläufig verhielten, bei wenigen Schnitten aber auch gleichartig. In den Schnitten SSM-ohne-Reg 1-4, SSM-mit-Reg 1, 3, 5, 6 und 8 sowie beiden dermalen Nävi, Halon.J 1 und Halon.C 2 und 3 überwog p16INK4a, während p14ARF nur sehr schwach oder gar nicht nachweisbar war. Wenn p14ARF stark exprimiert wurde, so blieb p16INK4a oft nur schwach oder gar nicht nachweisbar (SSM-ohne-Reg 5-7 und 9 sowie SSM-mit-Reg 2, 7 und 9, Halon.J 2 und 3, Halon.C 1). Nur bei zwei Fällen (SSM-ohne-Reg 8 und SSM-mit-Reg 4) waren p16INK4a und p14ARF ähnlich stark in ihrer Färbung.

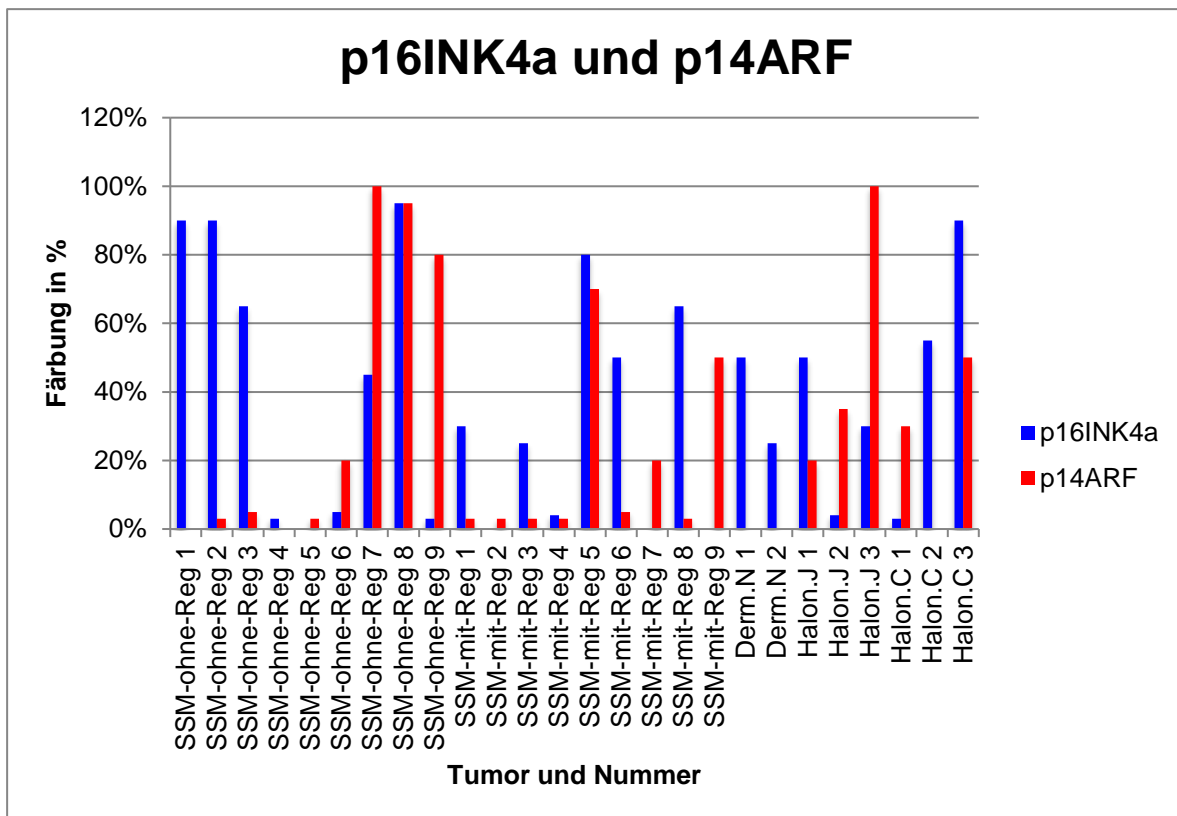


Abbildung 15: p16INK4a und p14ARF Färbungen im Vergleich

In Abbildungen 16-23 wurde der Zusammenhang von p14ARF und p16INK4a Färbungen im Vergleich mittels Bland-Altman Diagrammen und den jeweils zugehörigen Boxplots untersucht. Hierdurch wird im Genaueren herausgefunden, ob eine Korrelation im positiven oder negativen Sinne der beiden Antikörperfärbungen vorliegt. In den zugehörigen Tabellen (23-26) wurden die statistischen Ergebnisse für die Bland-Altman Analyse der p14ARF und p16INK4a Färbungen abgebildet.

Tabelle 23, Abbildung 16 und 17 zeigen diese Ergebnisse in Bezug auf alle untersuchten Gruppen (SSM-ohne-Reg, SSM-mit-Reg und Halonävi). Hierbei lag das 95%-Konfidenzintervall (KI) zwischen 0,82 und -1,02. Die Korrelationsanalyse zu p16INK4a und p14ARF ergab bei einem Korrelationskoeffizienten (ρ) von 0 keinen signifikanten ($p=0,991$) Zusammenhang. Im gepaarten Wilcoxon-Test war

kein signifikanter Unterschied ($p=0,258$) im Vergleich der p14ARF (Median: 0,05; IQR: 0,03-0,46) und der p16INK4a Färbung (Median: 0,3; IQR: 0,03-0,62) feststellbar. Dies bedeutet, dass in Bezug auf alle Gruppen weder eine positive noch eine negative Korrelation vorliegt.

	alle Gruppen (n=24)	
	p14ARF	p16INK4a
Median	0,05	0,3
IQR	0,03-0,46	0,03-0,62
min-max	1	0,95
MW \pm SD	0,27 \pm 0,35	0,37 \pm 0,34

Tabelle 23: Auflistung des Medians, IQR (interquartile range=Interquartilsabstand), min-max=Spannweite und des Mittelwertes und dessen Standardabweichung (SD=Standard Deviation) für die p14ARF und p16INK4a Färbungen in Bezug auf alle Gruppen

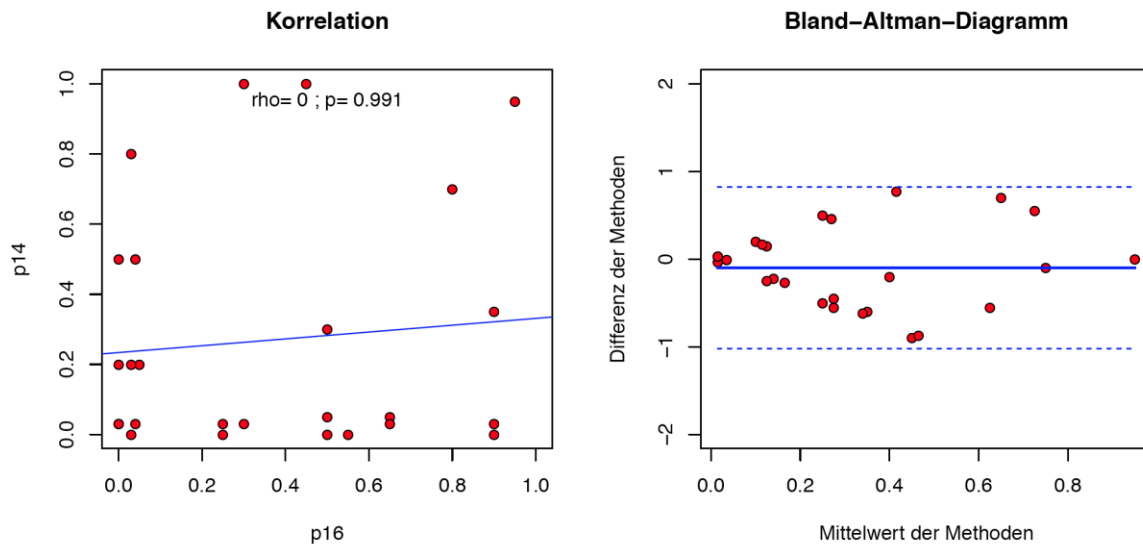


Abbildung 16: Bland-Altman Diagramm zu den p14ARF und p16INK4a Färbungen (alle Gruppen), KI: 0,82 und -1,02

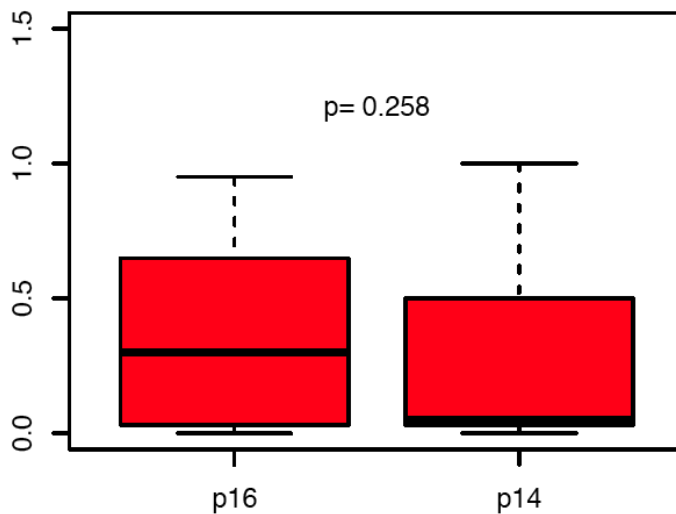


Abbildung 17: Boxplot zu p16INK4a und p14ARF im Vergleich in Bezug auf alle Gruppen

Die folgenden Abbildungen 18-23 zeigen die Ergebnisse in Bezug auf jeweils eine Gruppe (SSM-ohne-Reg, SSM-mit-Reg oder Halonävi).

In Tabelle 24, dem zugehörigen Bland-Altman Diagramm (Abbildung 18) und Boxplot (Abbildung 19) wurden die statistischen Ergebnisse der Korrelationsanalyse zu p16INK4a und p14ARF in Bezug auf die Gruppe der SSM-ohne-Reg abgebildet. Der Korrelationskoeffizient (ρ) lag bei 0,14. Es galt ein 95%-Konfidenzintervall (KI) von 1,07 und -1,27. Die Korrelationsanalyse ergab keinen signifikanten ($p=0,76$) Zusammenhang. Auch im gepaarten Wilcoxon-Test ließ sich im Vergleich der beiden Färbungen p14ARF (Median: 0,05; IQR: 0,03-0,8) und p16INK4a (Median: 0,45; IQR: 0,03-0,9) kein signifikanter Unterschied ($p=0,674$) nachweisen. Somit liegt in der statistischen Analyse der SSM ohne Regression keine Korrelation in Bezug auf p16INK4a oder p14ARF vor.

	SSM-ohne-Reg (n=9)	
	p14ARF	p16INK4a
Median	0,05	0,45
IQR	0,03-0,8	0,03-0,9
min-max	1	0,95
MW \pm SD	0,34 \pm 0,44	0,44 \pm 0,42

Tabelle 24: Auflistung des Medians, IQR (interquartile range=Interquartilsabstand), min-max=Spannweite und des Mittelwertes und dessen Standardabweichung (SD=Standard Deviation) für die p14ARF und p16INK4a Färbungen in Bezug auf die SSM-ohne-Reg

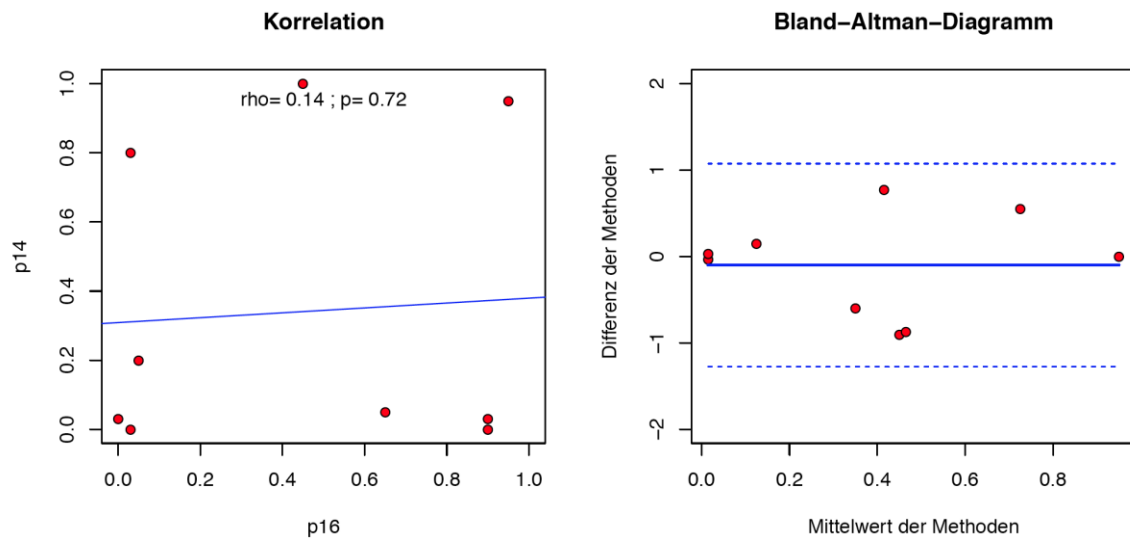


Abbildung 18: Bland-Altman Diagramm zu den p14ARF und p16INK4a Färbungen in Bezug auf die SSM-ohne-Reg, KI: 1,07 und -1,27

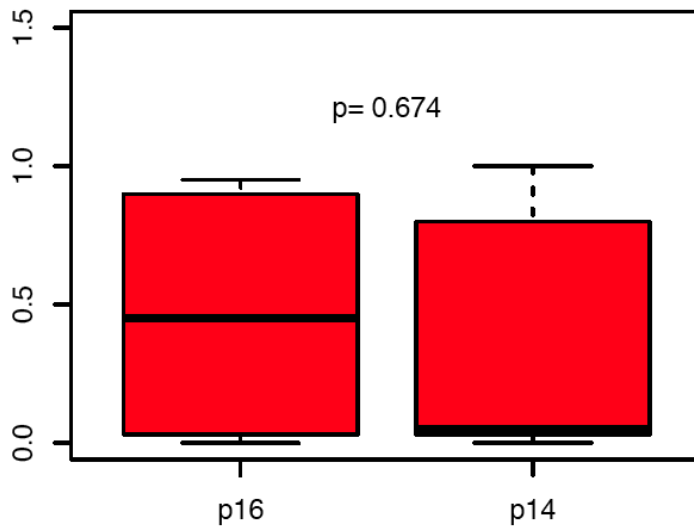


Abbildung 19: Boxplot zu p16INK4a und p14ARF im Vergleich in Bezug auf die SSM-ohne-Reg

Ebenso ergab die Betrachtung der SSM-mit-Reg (Tabelle 25, Abbildung 20 und 21) in der Korrelationsanalyse zu p16INK4a (Median: 0,25; IQR: 0-0,5) und p14ARF (Median: 0,03; IQR: 0,03-0,2) mit einem Spearman Korrelationskoeffizienten (ρ) von 0,06 keine Signifikanz ($p=0,887$). Das 95%-Konfidenzintervall (KI) lag bei 0,57 und -0,78. Im gepaarten Wilcoxon-Test zu diesen Färbungen ließ sich kein signifikanter Unterschied ($p=0,359$) feststellen. Auch hier liegt somit weder eine positive noch eine negative Korrelation vor.

	SSM-mit-Reg (n=9)	
	p14ARF	p16INK4a
Median	0,03	0,25
IQR	0,03-0,2	0-0,5
min-max	0,67	0,8
MW \pm SD	0,18 \pm 0,25	0,28 \pm 0,31

Tabelle 25: Auflistung des Medians, IQR (interquartile range=Interquartilsabstand), min-max=Spannweite und des Mittelwertes und dessen Standardabweichung (SD=Standard Deviation) für die p14ARF und p16INK4a Färbungen in Bezug auf die SSM-mit-Reg

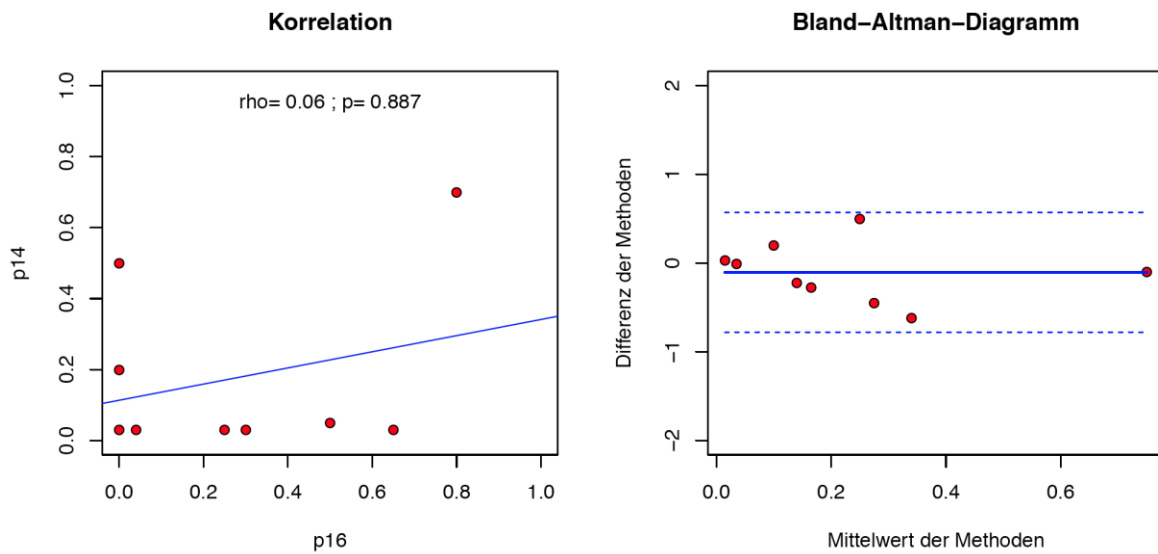


Abbildung 20: Bland-Altman Diagramm zu p14ARF und p16INK4a Färbungen in Bezug auf die SSM-mit-Reg, KI: 0,57 und -0,78

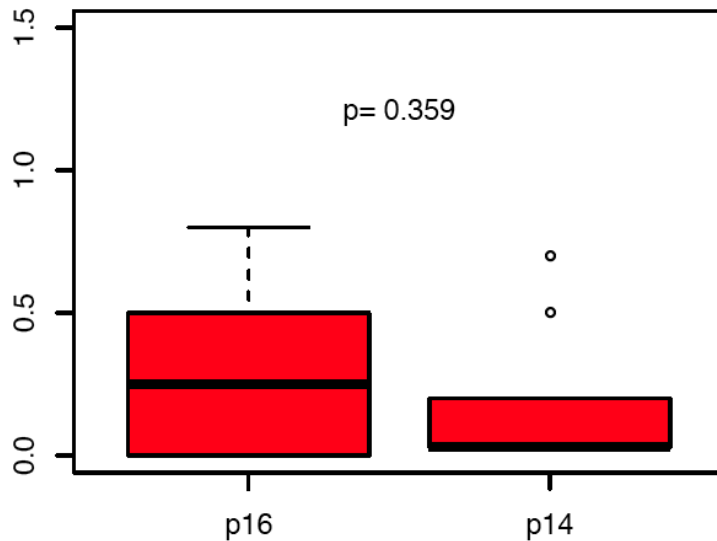


Abbildung 21: Boxplot zu p16INK4a und p14ARF im Vergleich in Bezug auf die SSM-mit-Reg

In Abbildung 22, 23 und Tabelle 26 wurden die Ergebnisse der Korrelationsanalyse zu p16INK4a (Median: 0,4; IQR: 0,1-0,54) und p14ARF (Median: 0,32; IQR: 0,23-0,46) bezogen auf die Halonävi als Bland-Altman Diagramm und Boxplot (KI: 1,05 und -1,04) dargestellt. In der Korrelationsanalyse konnte kein signifikanter ($p=0,803$) Zusammenhang der beiden Färbungen in Bezug auf die Gruppe der Halonävi bei einem Spearman Korrelationseffizienten (ρ) von -0,14 festgestellt werden. Der Boxplot zu p16INK4a und p14ARF im Vergleich mit Hilfe des gepaarten Wilcoxon-Test ergab ebenfalls keinen signifikanten Unterschied ($p=1$). Es liegt somit auch in Betrachtung der Halonävi weder eine negative noch eine positive Korrelation vor.

	Halonävi
--	----------

	(n=6)	
	p14ARF	p16INK4a
Median	0,32	0,4
IQR	0,23-0,46	0,1-0,54
min-max	1	0,87
MW \pm SD	0,39 \pm 0,34	0,39 \pm 0,33

Tabelle 26: Auflistung des Medians, IQR (interquartile range=Interquartilsabstand), min-max=Spannweite und des Mittelwertes und dessen Standardabweichung (SD=Standard Deviation) für die p14ARF und p16INK4a Färbungen in Bezug auf die Halonävi

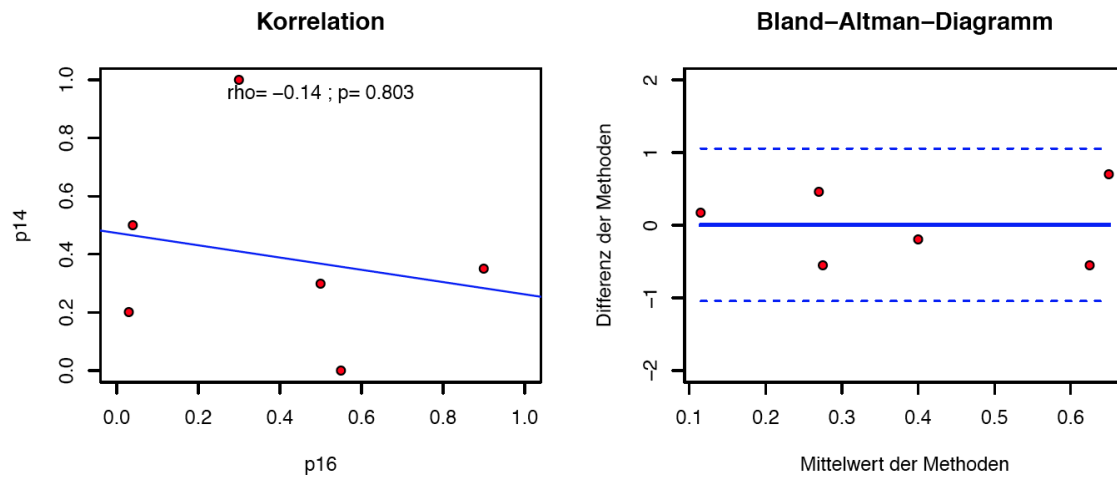


Abbildung 22: Bland-Altman Diagramm zu p14ARF und p16INK4a Färbungen in Bezug auf die Halonävi, KI: 1,05 und -1,04

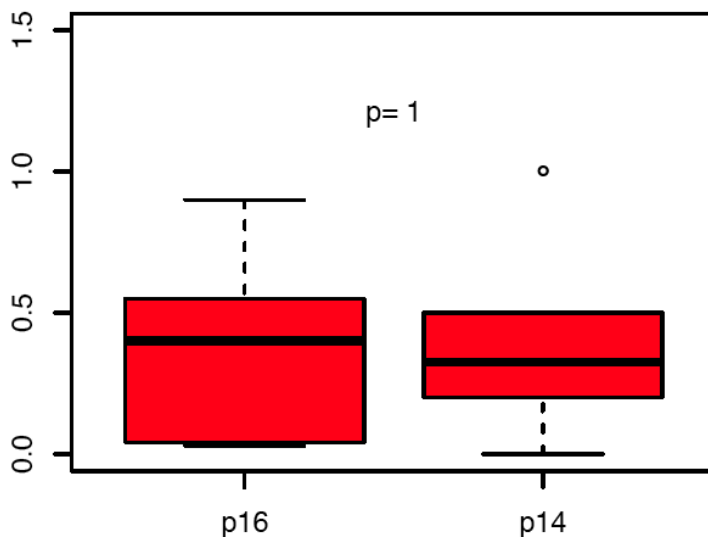


Abbildung 23: Boxplot zu p16INK4a und p14ARF im Vergleich in Bezug auf die Halonävi

Somit konnte in der graphischen Darstellung der einzelnen Färbungen (Abb. 15) zwar eine vermeindliche Gegenläufigkeit festgestellt werden. In den statistischen Untersuchungen ließ sich jedoch kein linearer Zusammenhang in den einzelnen Gruppen im Vergleich der p14ARF und p16INK4a Färbungen feststellen.

4.4 Tumor-infiltrierende Lymphozyten

Bei der adaptiven Immunabwehr sind die T-Lymphozyten, welche zu den mononukleären Zellen gehören, von großer Bedeutung. So wirken bei der Induktion von Plasma- und Gedächtniszellen die CD4-positiven Zellen, sogenannte T-Helferzellen mit (Röcken et al., 2010). Zu dieser Gruppe zählen auch die T_{Reg}, welche auch beim Wachstum von Tumoren fördernd mitwirken (Shang et al., 2015, Wolf et al., 2015). IFN- γ produzierende Th1-Lymphozyten hemmen das Tumorwachstum, während Interleukin-4-produzierende Th2-Lymphozyten jenes eher fördern (Egeter et al., 2000, Rocken, 2010, Ziegler et al., 2009). CD8-positive Zellen (zytotoxische T-Zellen) erkennen mit Unterstützung der Helferzellen körperfremde

Zellen oder infektionsassoziierte Antigene direkt und beseitigen die erkannten Zellen durch Zytolyse oder Apoptoseinduktion (Gutcher and Becher, 2007, Jiang and Chess, 2004). Um die zytotoxischen T-Zellen von T-Helferzellen abzugrenzen, wurden die Schnittpräparate auf CD4 und CD8 untersucht.

4.4.1 CD8 und CD4

In Abbildung 24 wurden die CD4 und CD8 Färbungen im Vergleich dargestellt. Es fiel auf, dass tendenziell die CD4 Färbung gegenüber der CD8 Färbung überwog (SSM-ohne-Reg 1-3, 5-9, SSM-mit-Reg 1, 2, 5-9, Halon.J 1, 2 und Halon.C 1, 2). Nur SSM-ohne-Reg 4 und SSM-mit-Reg 4 zeigten stärkere CD8 Färbungen. Bei SSM-mit-Reg 3, Halon.J 3 und Halon.C 3 waren CD4 und CD8 gleichstark nachweisbar. Insgesamt wiesen die SSM-ohne-Reg eine größere Diskrepanz zwischen der CD4 und CD8 Färbung auf als in den SSM-mit-Reg und Halonävi, das heißt in den SSM-mit-Reg und Halonävi war der CD4/CD8-Quotient ausgeglichener.

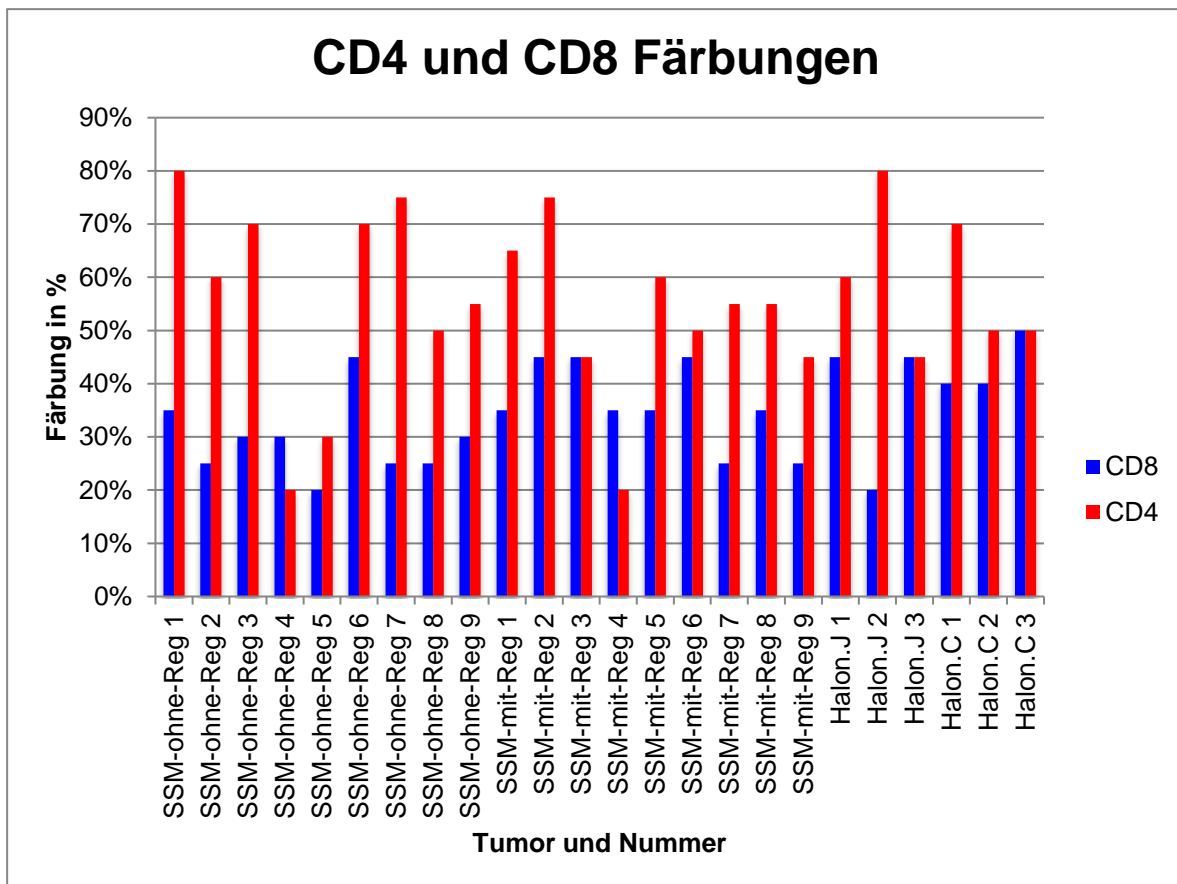


Abbildung 24: CD8 und CD4 Färbungen pro Fall im Vergleich

In Tabelle 27 und der zugehörigen Boxplotdarstellung (Abbildung 25) wurden die statistischen Ergebnisse der CD8 Färbung dargestellt. Die dermalen Nävi wurden bei den statistischen Darstellungen aufgrund der geringen Fallzahl nicht miteffasst.

Tabelle 27 zeigt den Median, den IQR (interquartile range=Interquartilsabstand), die Spannweite (min-max), den Mittelwert und dessen Standardabweichung (SD=Standard Deviation) pro Gruppe für die CD8 Färbungen. Die statistische Auswertung der CD8 Färbungen in Bezug auf alle Gruppen ergab einen p-Wert von 0,072, der somit nur knapp über dem Signifikanzlevel ($p < 0,05$) lag. In der genaueren Untersuchung der einzelnen Gruppen (Halonävi (Median: 0,43; IQR: 0,4-0,45), SSM-ohne-Reg (Median: 0,3; IQR: 0,25-0,3) und SSM-mit-Reg (Median: 0,35; IQR:

0,35-0,45)) konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Es war aber zumindest die deutliche Tendenz festzustellen, dass bei den nicht regressiven Melanomen weniger CD8-positive Zellen nachweisbar waren als bei den regressiven Melanomen und Halonävi. Diese Tendenz zeigt der Unterschied der Mediane in der Abbildung 25. Es ist möglich, dass bei einer höheren Fallzahl auch in der statistischen Analyse ein signifikanter Unterschied zustande kommen könnte.

	Gruppen		
	SSM-ohne-Reg (n=9)	SSM-mit-Reg (n=9)	Halonävi (n=6)
Median	0,3	0,35	0,43
IQR	0,25-0,3	0,35-0,45	0,4-0,45
min-max	0,25	0,2	0,3
MW ± SD	0,29 ± 0,07	0,36 ± 0,08	0,4 ± 0,1

Tabelle 27: Auflistung des Medians, IQR (interquartile range=Interquartilsabstand), min-max=Spannweite und des Mittelwertes und dessen Standardabweichung (SD=Standard Deviation) pro Gruppe für die CD8 Färbungen

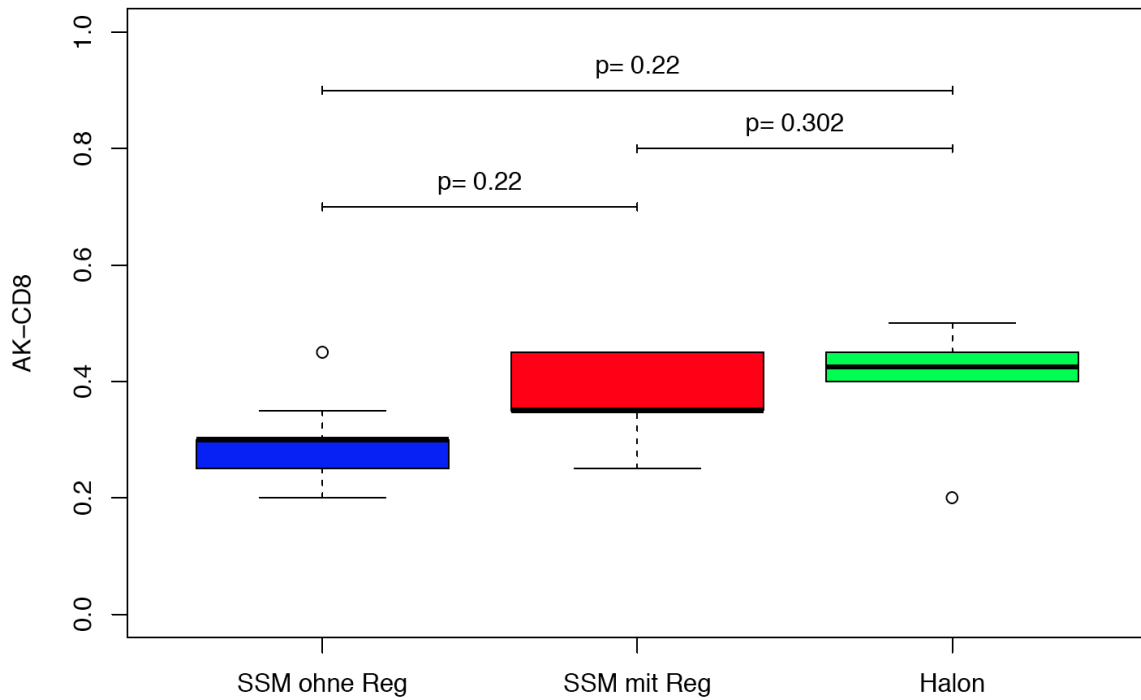


Abbildung 25: Boxplot der CD8 Färbung

Tabelle 28 und Abbildung 26 zeigen die statistische Auswertung der CD4 Färbungen. Auch hier konnte kein signifikanter ($p < 0,05$) Unterschied im Vergleich der einzelnen Gruppen festgestellt werden. Der p-Wert lag bei 0,663.

	Gruppen		
	SSM-ohne-Reg (n=9)	SSM-mit-Reg (n=9)	Halonävi (n=6)
Median	0,6	0,55	0,55
IQR	0,5-0,7	0,45-0,6	0,5-0,68
min-max	0,6	0,55	0,35
MW \pm SD	0,57 \pm 0,2	0,52 \pm 0,15	0,59 \pm 0,14

Tabelle 28: Auflistung des Medians, IQR (interquartile range=Interquartilsabstand), min-max=Spannweite und des Mittelwertes und dessen Standardabweichung (SD=Standard Deviation) pro Gruppe für die CD4 Färbungen

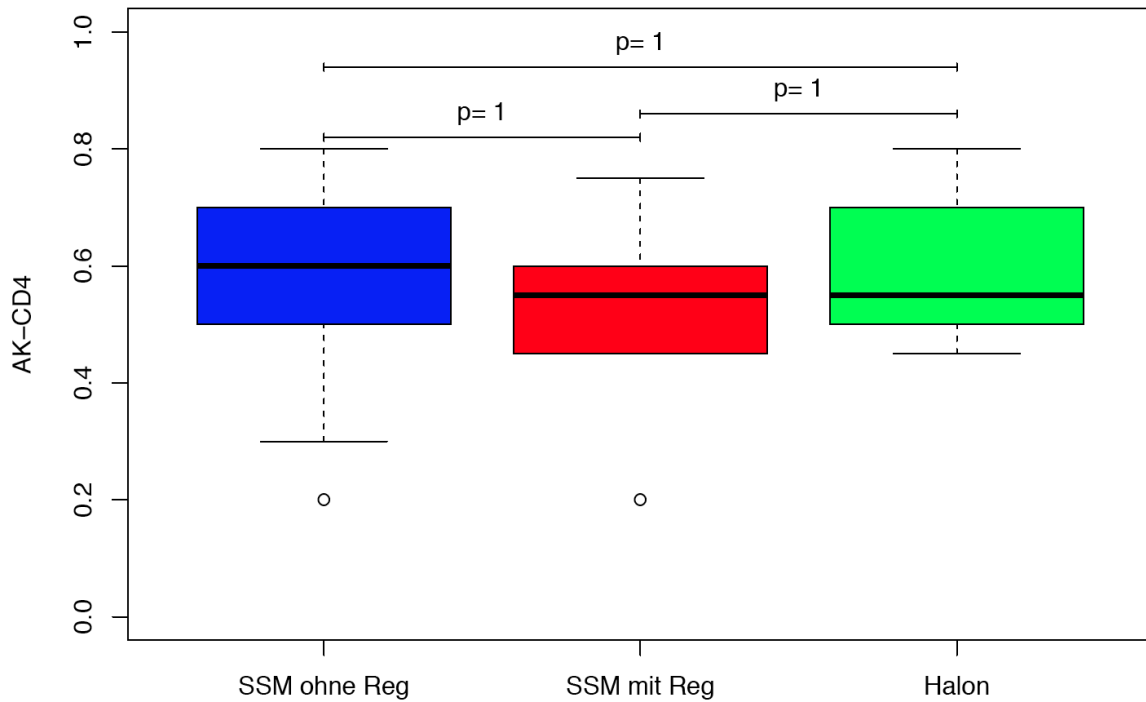


Abbildung 26: Boxplot der CD4 Färbung

4.4.2 CD4 versus CD8

In den Bland-Altman Diagrammen und zugehörigen Boxplots (Abbildungen 27-34) und Tabellen 29-32 wurden die Ergebnisse der Korrelationsanalyse für die CD4 und

CD8 Färbungen untersucht. Hierdurch wird im Genaueren herausgefunden, ob eine positive oder negative Korrelation der beiden Antikörperfärbungen vorliegt.

Abbildungen 27 und 28 zeigen das Ergebnis dieser Untersuchung bezogen auf alle Gruppen (SSM-ohne-Reg, SSM-mit-Reg und Halonävi) der statistischen Analyse. Hierbei lag das 95%-Konfidenzintervall bei 0,58 und -0,16. Die Korrelationsanalyse zu den CD4 (Median: 0,55; IQR: 0,49-0,7) und CD8 Färbungen (Median: 0,35; IQR: 0,25-0,45) ergab keinen signifikanten ($p=0,882$) Zusammenhang bei einem Spearman Korrelationskoeffizienten (ρ) von -0,03. In der Auswertung des gepaarten Wilcoxon-Tests konnte ein signifikanter Unterschied ($p<0,001$) festgestellt werden. In Betrachtung der Mediane in Bezug auf alle drei Gruppen zeigt sich CD4 stärker exprimiert als CD8. Im Folgenden wird dies noch in Bezug auf die einzelnen Gruppen (SSM-ohne-Reg, SSM-mit-Reg und Halonävi) weiter untersucht.

	alle Gruppen (n=24)	
	CD4	CD8
Median	0,55	0,35
IQR	0,49-0,7	0,25-0,45
min-max	0,6	0,3
MW \pm SD	0,56 \pm 0,17	0,35 \pm 0,09

Tabelle 29: Auflistung des Medians, IQR (interquartile range=Interquartilsabstand), min-max=Spannweite und des Mittelwertes und dessen Standardabweichung (SD=Standard Deviation) für die CD4 und CD8 Färbungen in Bezug auf alle Gruppen

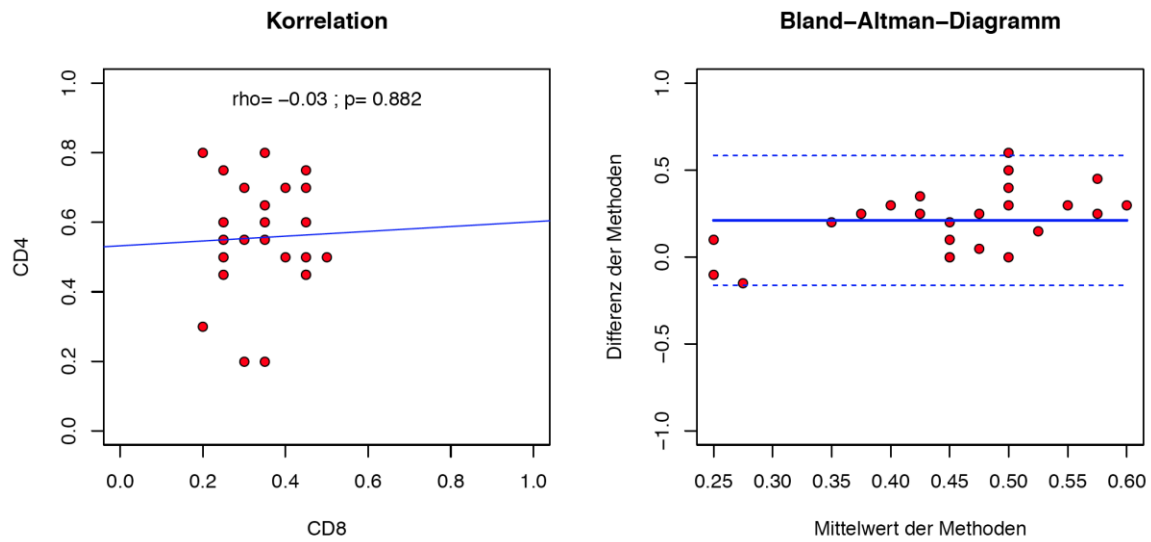


Abbildung 27: Bland-Altman Diagramm zu den CD4 und CD8 Färbungen (alle Gruppen), KI: 0,58 und -0,16

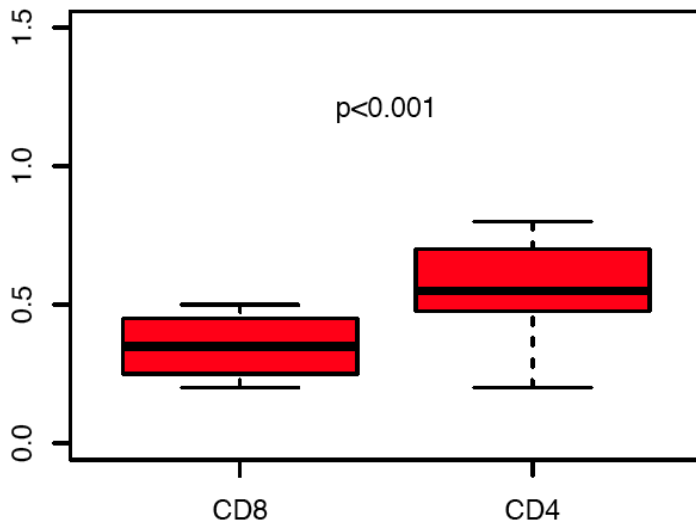


Abbildung 28: Boxplot zu CD4 und CD8 im Vergleich in Bezug auf alle Gruppen

In Tabelle 30, Abbildung 29 und 30 wurden die Ergebnisse der Korrelationsanalyse von CD4 (Median: 0,6; IQR: 0,5-0,7) und CD8 (Median: 0,3; IQR: 0,25-0,3) in Bezug auf die SSM-ohne-Reg darstellt. Hier konnte kein signifikanter Zusammenhang ($p=0,225$) bei einem Spearman Korrelationskoeffizienten (ρ) von 0,42 festgestellt

werden. Das KI lag bei 0,64 und -0,1. Im gepaarten Wilcoxon-Test konnte jedoch ein signifikanter Unterschied ($p=0,015$) nachgewiesen werden. Somit war bei den nicht regressiven Melanomen insgesamt mehr CD4 als CD8 nachweisbar. Dieses verdeutlicht der Unterschied der Mediane in der Abbildung 30 als Boxplot.

	SSM-ohne-Reg (n=9)	
	CD4	CD8
Median	0,6	0,30
IQR	0,5-0,7	0,25-0,3
min-max	0,6	0,25
MW \pm SD	0,57 \pm 0,2	0,29 \pm 0,07

Tabelle 30: Auflistung des Medians, IQR (interquartile range=Interquartilsabstand), min-max=Spannweite und des Mittelwertes und dessen Standardabweichung (SD=Standard Deviation) für die CD4 und CD8 Färbungen in Bezug auf die SSM-ohne-Reg

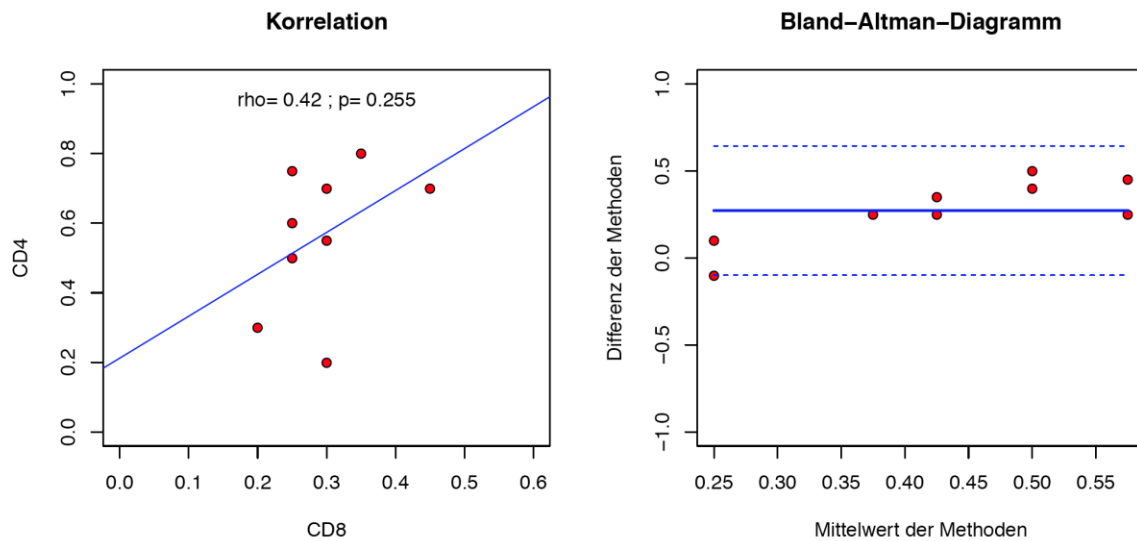


Abbildung 29: Bland-Altman Diagramm zu den CD4 und CD8 Färbungen in Bezug auf die SSM-ohne-Reg, KI: 0,64 und -0,1

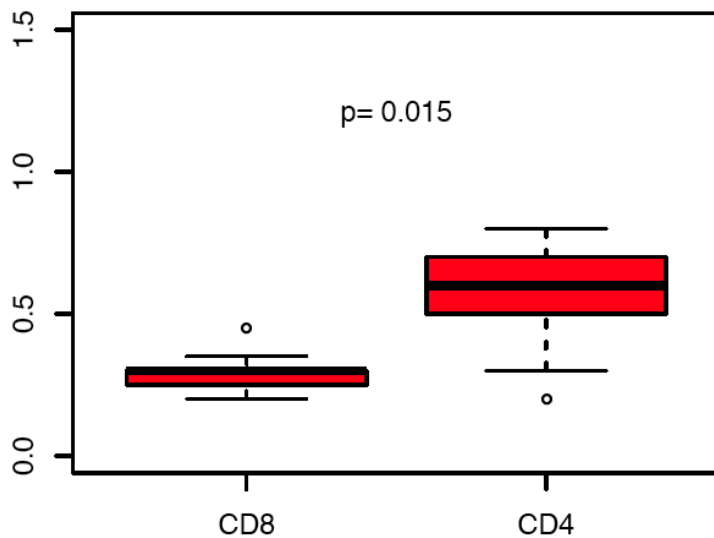


Abbildung 30: Boxplot zu CD4 und CD8 im Vergleich in Bezug auf die SSM-ohne-Reg

Die Korrelationsanalyse (Tabelle 31, Abbildung 31 und 32) zu CD4 (Median: 0,55; IQR: 0,45-0,6) und CD8 (Median: 0,35; IQR: 0,35-0,45) ergab bei den SSM-mit-Reg (KI: 0,48 und -0,16) keine Signifikanz ($p=0,721$). Somit konnte bei dem Vergleich beider Färbungen in Bezug auf die SSM-mit-Reg kein linearer Zusammenhang nachgewiesen werden. Der Korrelationskoeffizient lag bei $\rho=0,14$. Der gepaarte Wilcoxon-Test ergab jedoch einen signifikanten Unterschied ($p=0,03$). Bei den regressiven Melanomen war somit ebenfalls mehr CD4 als CD8 nachweisbar. Dies wurde im zugehörigen Boxplot (Abbildung 32) dargestellt.

	SSM-mit-Reg (n=9)	
	CD4	CD8
Median	0,55	0,35
IQR	0,45-0,6	0,35-0,45
min-max	0,55	0,2
MW \pm SD	0,52 \pm 0,15	0,36 \pm 0,08

Tabelle 31: Auflistung des Medians, IQR (interquartile range=Interquartilsabstand), min-max=Spannweite und des Mittelwertes und dessen Standardabweichung (SD=Standard Deviation) für die CD4 und CD8 Färbungen in Bezug auf die SSM-mit-Reg

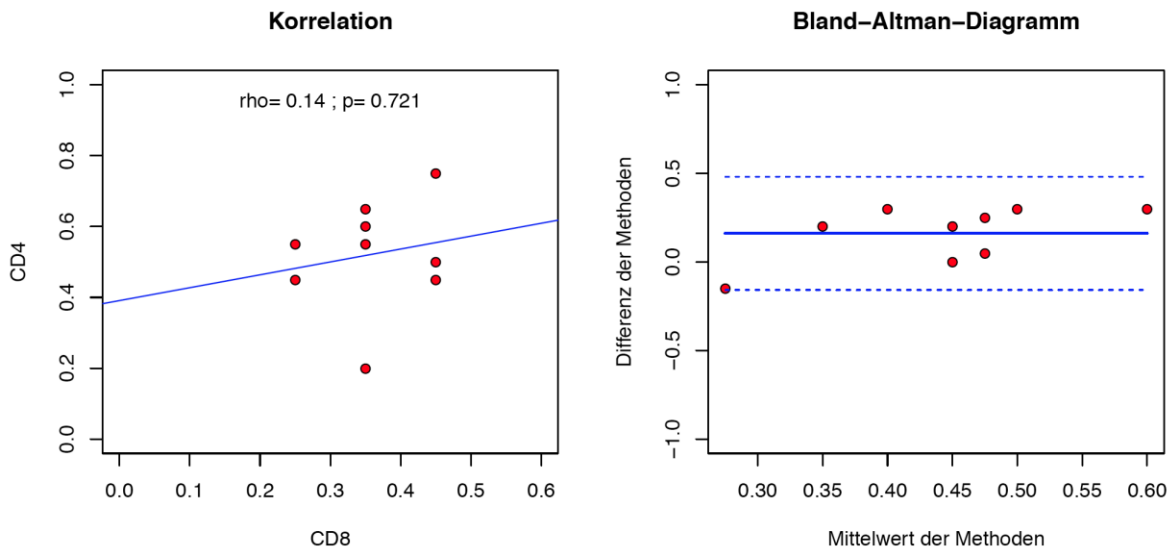


Abbildung 31: Bland-Altman Diagramm zu den CD4 und CD8 Färbungen in Bezug auf die SSM-mit-Reg, KI: 0,48 und -0,16

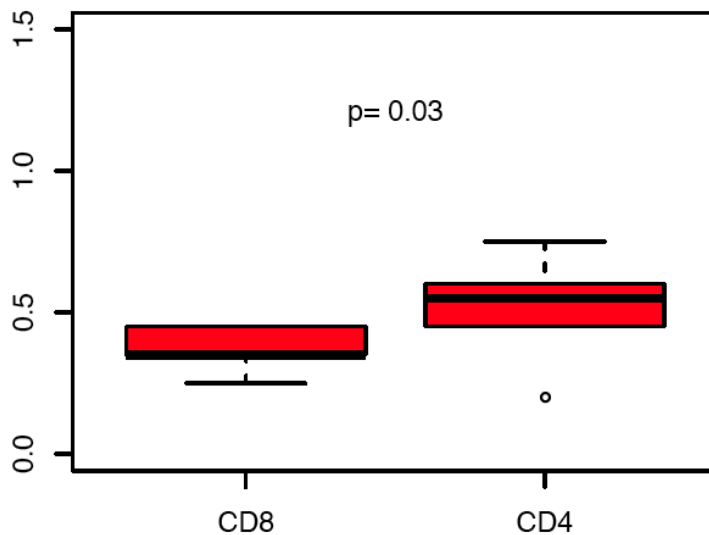


Abbildung 32: Boxplot zu CD4 und CD8 im Vergleich in Bezug auf die SSM-mit-Reg

Auch in Betrachtung der Halonävi (Tabelle 32, Abbildung 33 und 34) ergab die Korrelationsanalyse der CD4 (Median: 0,55; IQR: 0,5-0,68) und CD8 Färbungen (Median: 0,43; IQR: 0,4-0,45) keinen signifikanten ($p=0,144$) Zusammenhang. Der Korrelationskoeffizient lag bei $-0,67$ und als 95%-Konfidenzintervall galt $0,65$ und $-0,27$. Auch der gepaarte Wilcoxon-Test ergab keinen signifikanten Unterschied ($p=0,1$).

	Halonävi (n=6)	
	CD4	CD8
Median	0,55	0,43
IQR	0,5-0,68	0,4-0,45
min-max	0,35	0,3
MW \pm SD	0,59 \pm 0,14	0,4 \pm 0,1

Tabelle 32: Auflistung des Medians, IQR (interquartile range=Interquartilsabstand), min-max=Spannweite und des Mittelwertes und dessen Standardabweichung (SD=Standard Deviation) für die CD4 und CD8 Färbungen in Bezug auf die Halonävi

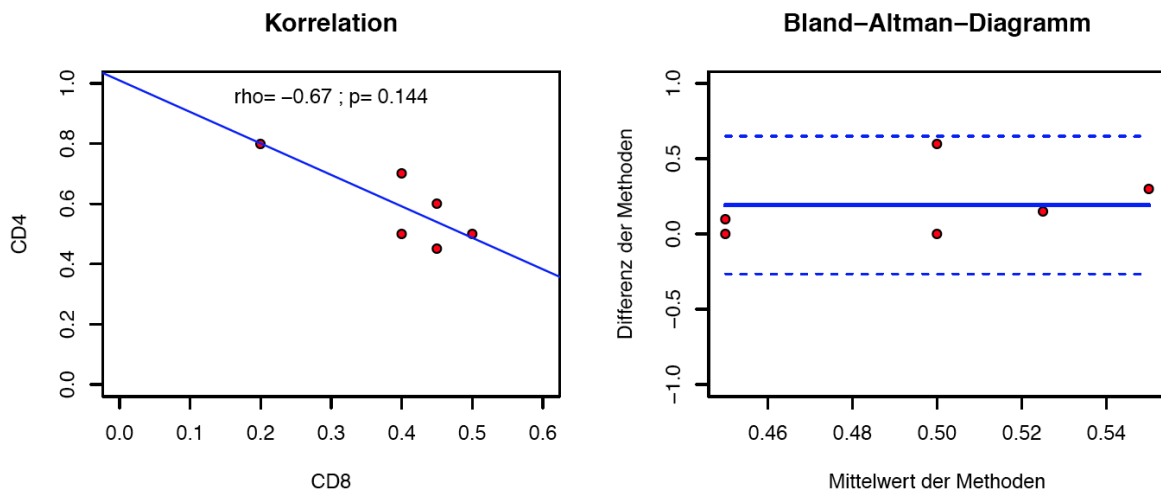


Abbildung 33: Bland-Altman Diagramm zu den CD4 und CD8 Färbungen in Bezug auf die Halonävi, KI: 0,65 und -0,27

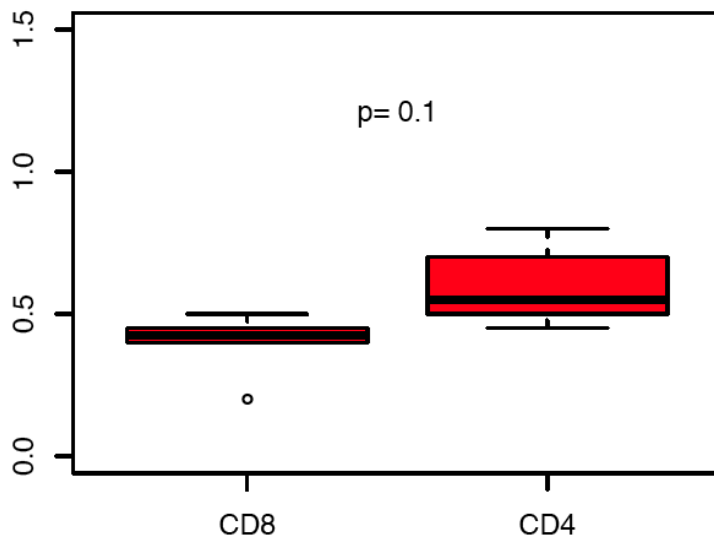


Abbildung 34: Boxplot zu CD4 und CD8 im Vergleich in Bezug auf die Halonävi

Somit konnte in der graphischen Darstellung (Abb. 24) der einzelnen Färbungen ein generelles Überwiegen der CD4 Färbungen in allen Gruppen festgestellt werden. Es zeigte sich im gepaarten Wilcoxon-Test nur bei den Melanomen ein Überwiegen der CD4 Zellen, aber nicht bei den Halonävi. Die Korrelationsanalyse von CD4 zu CD8

ergab jedoch bei keiner Gruppe einen signifikanten Zusammenhang. Es liegt somit weder eine positive noch eine negative Korrelation vor.

4.4.3 CD4/CD8-Quotient

Der CD4/CD8-Quotient gibt das numerische Verhältnis der Lymphozytensubpopulationen CD4 (T-Helferzellen, T_{Reg}) und CD8 (zytotoxische T-Lymphozyten) an.

In Abbildung 35 wurde dieser berechnete Quotient anhand der CD4 und CD8 Färbungen pro Fall dargestellt. Normale Werte (für peripheres Blut 1,34-2,0) für Tumordinfiltrationen durch T-Lymphozyten sind nicht etabliert. Wir konnten also nur die Quotienten der Gruppen untereinander vergleichen. Werte zwischen 1,34 und 2,0 erbrachten insgesamt 10 Fälle (SSM-ohne-Reg 5, 6, 8, 9, SSM-mit-Reg 1, 2, 5, 8, 9, Halo.C 1). Alle anderen Schnitte lagen entweder >2,0 (davon 4 Fälle von SSM-ohne-Reg 1-3, 7, und nur 1 Fall mit SSM-mit-Reg 7, und 1 Fall mit Halo.J 2) oder <1,34 (davon 1 Fall mit SSM-ohne-Reg 4, und 3 Fälle von SSM-mit-Reg 3, 4, 6, Halo.J 1, 3, Halo.C 2, 3). Die SSM-ohne-Reg zeigten zu gleicher Anzahl entweder einen Quotienten zwischen 1,34 und 2,0 (insges. 4 Fälle) oder einen höheren (insges. 4 Fälle) und nur in einem Fall einen niedrigeren Quotienten. Die SSM-mit-Reg hingegen zeigten in 5 von 9 Fällen einen Quotienten zwischen 1,34 und 2,0. Bei 4 Fällen wurde ein niedriger und nur in einem Fall ein höherer Quotient festgestellt. Die Halonävi wiesen keinen eindeutigen Trend bei Betrachtung des CD4/CD8-Quotienten auf (Abbildung 35).

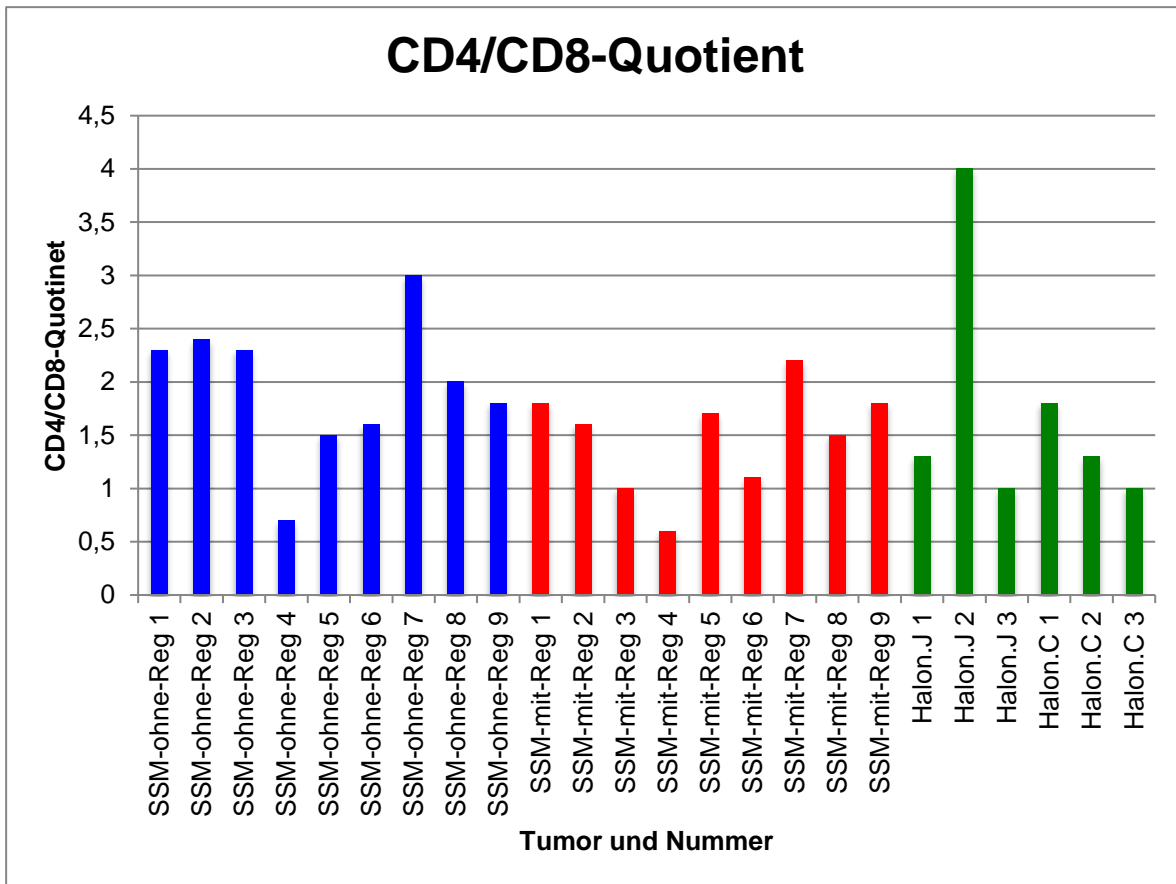


Abbildung 35: CD4 und CD8 Färbung dargestellt als CD4/CD8-Quotient pro Fall

In Tabelle 33 und der zugehörigen Boxplotdarstellung (Abbildung 36) wurden die statistischen Auswertungen des CD4/CD8-Quotienten festgehalten. Diese zeigten, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen vorlag. Bei einem p-Wert von 0,231 ergab sich keine Signifikanz im Vergleich der Halonävi (Median: 1,29; IQR: 1,06-1,65), der SSM-ohne-Reg (Median: 2; IQR: 1,56-2,33) und der SSM-mit-Reg (Median: 1,67; IQR: 1,11-1,8).

	Gruppen		
	SSM-ohne-Reg (n=9)	SSM-mit-Reg (n=9)	Halonävi (n=6)
Median	2	1,67	1,29
IQR	1,56-2,33	1,11-1,8	1,06-1,65
min-max	2,33	1,63	3
MW \pm SD	1,95 \pm 0,67	1,5 \pm 0,51	1,72 \pm 1,15

Tabelle 33: Auflistung des Medians, IQR (interquartile range=Interquartilsabstand), min-max=Spannweite und des Mittelwertes und dessen Standardabweichung (SD=Standard Deviation) pro Gruppe für den CD4/CD8-Quotient

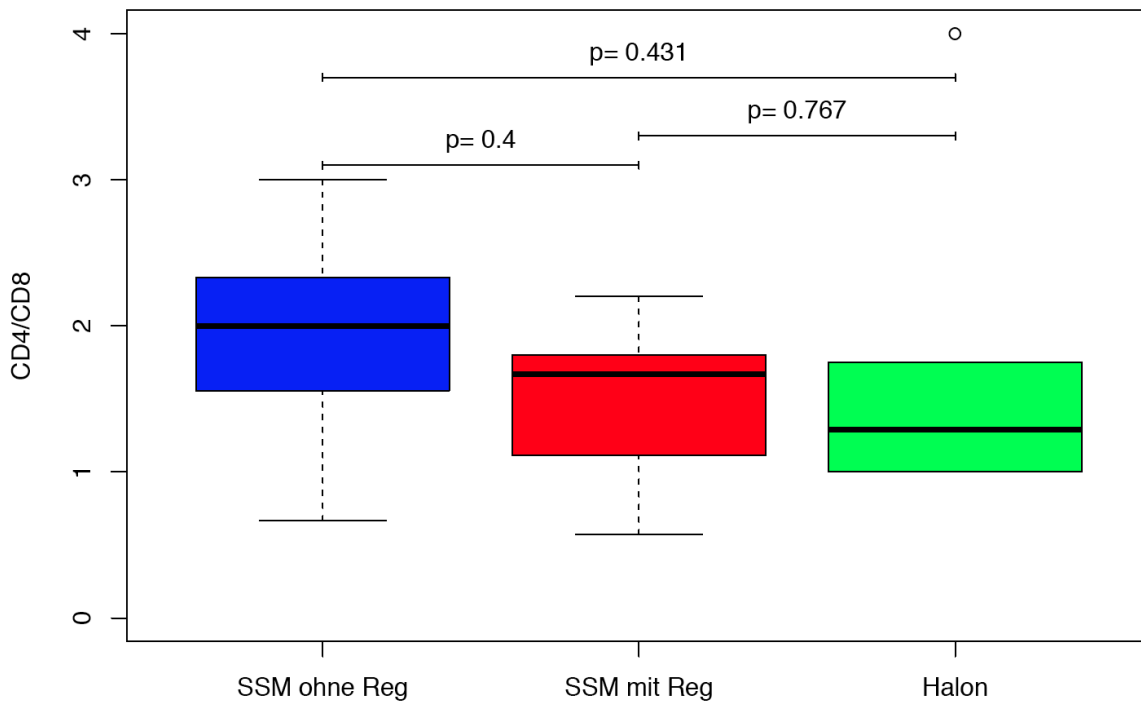


Abbildung 36: Boxplot des CD4/CD8-Quotienten

Somit wurde bei der Untersuchung des CD4/CD8-Quotienten bei den regressiven Melanomen und den Halonävi ein CD4/CD8-Quotient unter oder im Bereich zwischen 1,34 und 2,0 festgestellt. Bei den Melanomen ohne Regression lag dieser hingegen eher darüber. In den statistischen Untersuchungen konnte in Bezug auf den CD4/CD8-Quotienten kein signifikanter Unterschied im Vergleich der Gruppen

festgestellt werden. Die Frage, welche CD4-positiven Lymphozyten-Subpopulationen in den SSM-ohne-Reg im Quotienten einen Trend zu erhöhten Werten zeigt, konnte in dieser Arbeit noch nicht geklärt werden. Dazu sind weitere Färbungen von T-Zell Subpopulationen notwendig.

4.4.4 p16INK4a versus CD4

In Abbildung 37 wurden die p16INK4a und CD4 Färbungen pro Fall in den jeweiligen Gruppen verglichen, um eine mögliche Verknüpfung der beiden Mechanismen (Seneszenzsignalwege und Infiltration mit T-Lymphozyten) zu prüfen. Es gab Schnitte, bei denen die CD4 Nachweisbarkeit überwog (SSM-ohne-Reg 3-7, 9, SSM-mit-Reg 1-4, 7, 9, Halon.J 1-3 und Halon.C 1). In den Schnitten SSM-ohne-Reg 1, 2, 8, SSM-mit-Reg 5, 8, Halon.C 2 und 3 war der Nachweis von p16INK4a stärker. Somit verhielten sich CD4 und p16INK4a oft gegenläufig. Nur bei dem Schnitt SSM-mit-Reg 6 färbten beide Antikörper 50% an. Insgesamt konnte festgestellt werden, dass in allen Gruppen CD4 tendenziell etwas stärker nachweisbar war als p16INK4a.

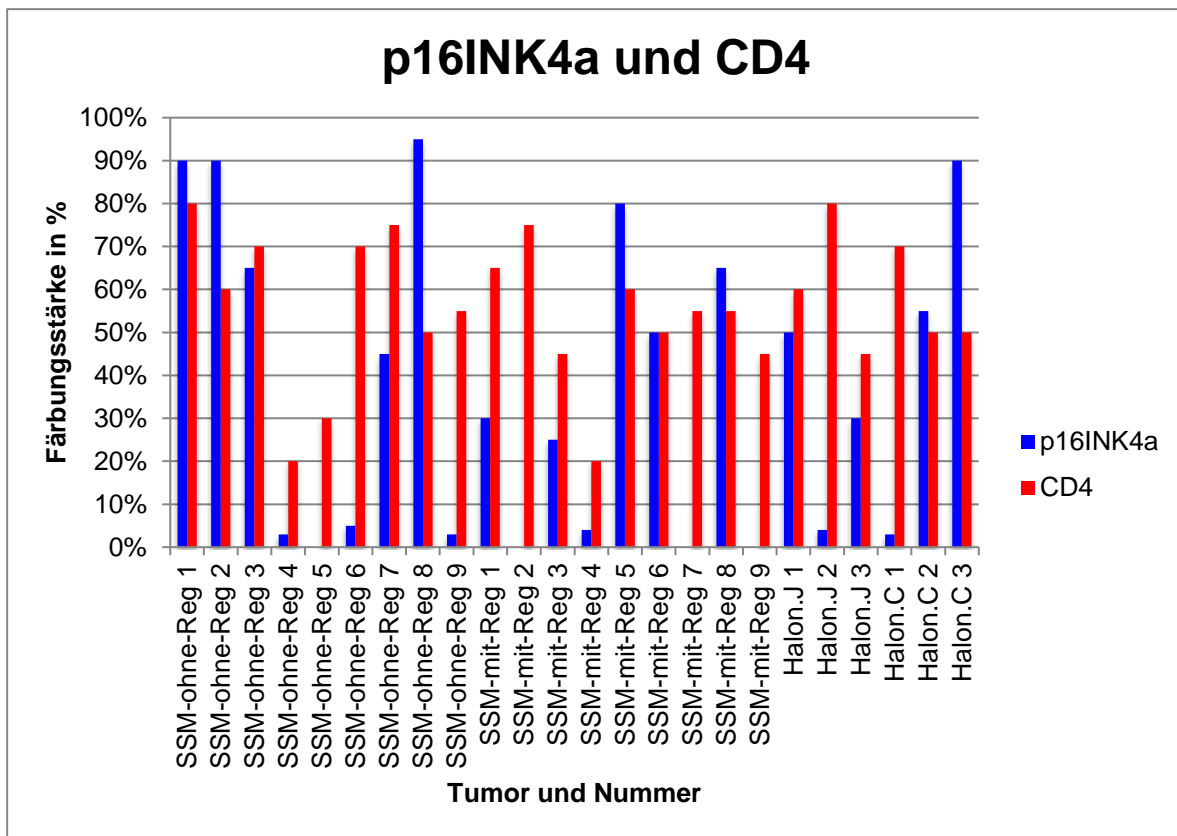


Abbildung 37: p16INK4a und CD4 Färbungen pro Fall im Vergleich

In Tabellen 34-37 wurden die statistischen Ergebnisse der Korrelationsanalysen für die p16INK4a und CD4 Färbungen mittels Bland-Altman Diagrammen und den zugehörigen Boxplots der jeweiligen gepaarte Wilcoxon-Test (Abbildungen 38-45) dargestellt. So wurde geprüft, ob bei p16INK4a und CD4 eine positive oder negative Korrelation vorliegt.

Tabelle 34, das zugehörige Bland-Altman Diagramm und der Boxplot (Abbildungen 38 und 39) zeigen das Ergebnis der Korrelationsanalyse der CD4 (Median: 0,55; IQR: 0,49-0,7) und p16INK4a Färbungen (Median: 0,3; IQR: 0,03-0,62) bezogen auf alle Gruppen, der statistischen Analyse (SSM-ohne-Reg, SSM-mit-Reg und Halonävi). Es galt ein 95%-Konfidenzintervall von 0,9 und -0,52. Die Korrelationsanalyse der p16INK4a und CD4 Färbungen ergab keinen signifikanten

($p=0,405$) Zusammenhang bei einem Spearman Korrelationskoeffizienten (ρ) von 0,18. Das Ergebnis des gepaarten Wilcoxon-Tests ergab jedoch einen signifikanten Unterschied ($p=0,025$) (Abb. 39). Im Folgenden wurde dies nun in Bezug auf die einzelnen Gruppen genauer untersucht.

	alle Gruppen (n=24)	
	CD4	p16INK4a
Median	0,55	0,3
IQR	0,49-0,7	0,03-0,62
min-max	0,6	0,95
MW \pm SD	0,56 \pm 0,17	0,37 \pm 0,34

Tabelle 34: Auflistung des Medians, IQR (interquartile range=Interquartilsabstand), min-max=Spannweite und des Mittelwertes und dessen Standardabweichung (SD=Standard Deviation) für die CD4 und p16INK4a Färbungen in Bezug auf alle Gruppen

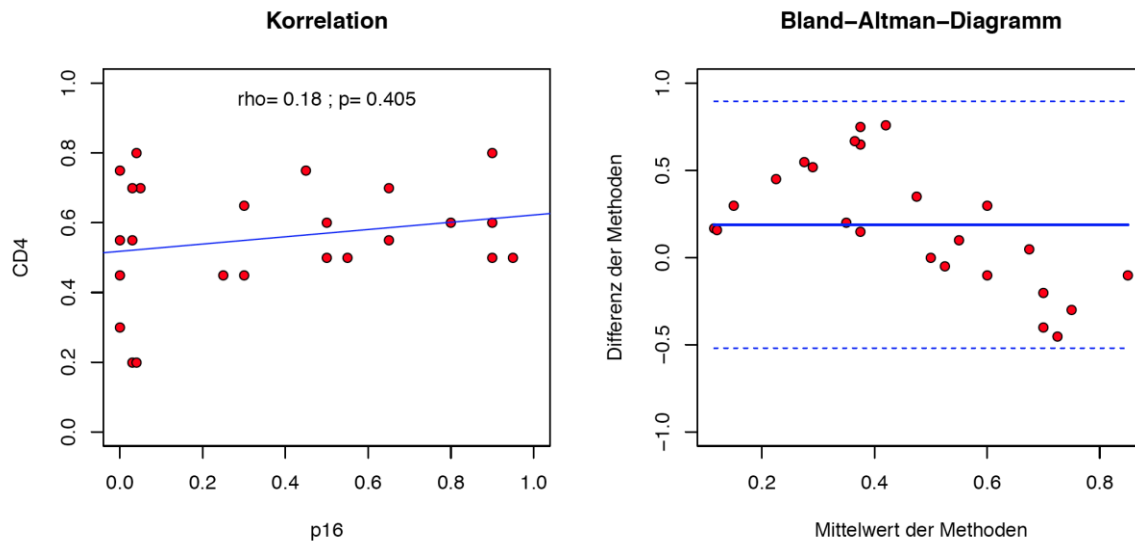


Abbildung 38: Bland-Altman Diagramm zu den p16INK4a und CD4 Färbungen (alle), KI: 0,9 und -0,52

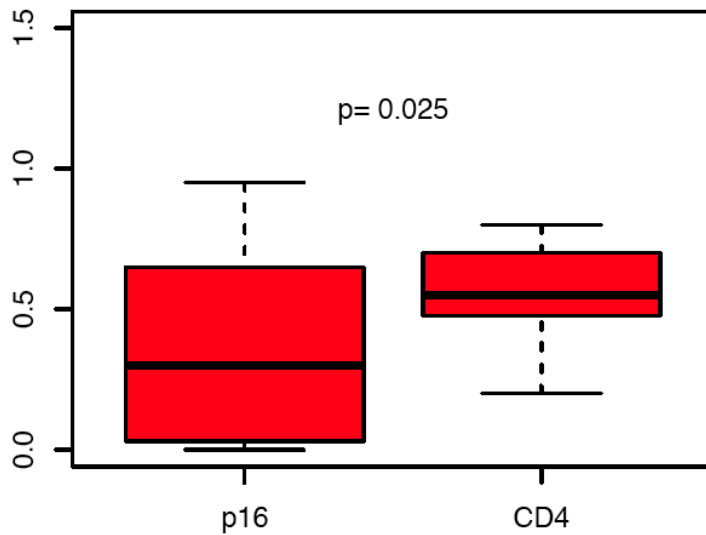


Abbildung 39: Boxplot zu CD4 und p16INK4a im Vergleich in Bezug auf alle Gruppen

In Tabelle 35, Abbildungen 40 und 41 wurde die Korrelationsanalyse von CD4 (Median: 0,6; IQR: 0,5-0,7) und p16INK4a (Median: 0,45; IQR: 0,03-0,9) in Bezug auf die SSM-ohne-Reg darstellt. Bei einem 95%-Konfidenzintervall von 0,86 und -0,6 konnte in der Korrelationsanalyse kein signifikanter ($p=0,227$) Zusammenhang bei einem Spearman Korrelationskoeffizienten (ρ) von 0,45 festgestellt werden. Der gepaarte Wilcoxon-Test ergab ebenfalls keinen signifikanten Unterschied ($p=0,407$) (Abb. 41).

	SSM-ohne-Reg (n=9)	
	CD4	p16INK4a
Median	0,6	0,45
IQR	0,5-0,7	0,03-0,9
min-max	0,6	0,95
MW \pm SD	0,57 \pm 0,2	0,44 \pm 0,42

Tabelle 35: Auflistung des Medians, IQR (interquartile range=Interquartilsabstand), min-max=Spannweite und des Mittelwertes und dessen Standardabweichung (SD=Standard Deviation) für die CD4 und p16INK4a Färbungen in Bezug auf die SSM-ohne-Reg

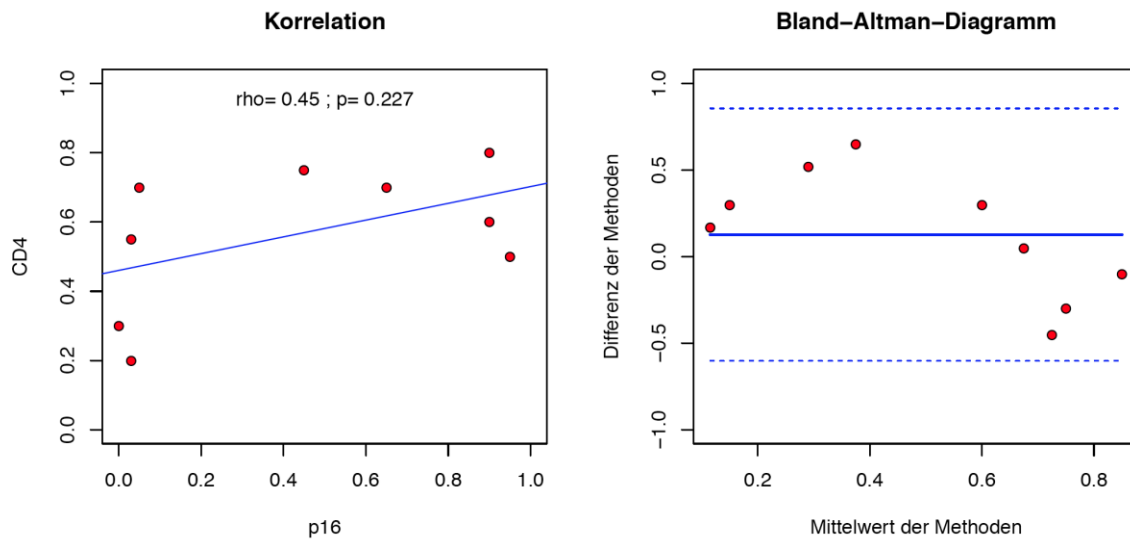


Abbildung 40: Bland-Altman Diagramm zu den p16INK4a und CD4 Färbungen in Bezug auf die SSM-ohne-Reg, KI: 0,86 und -0,6

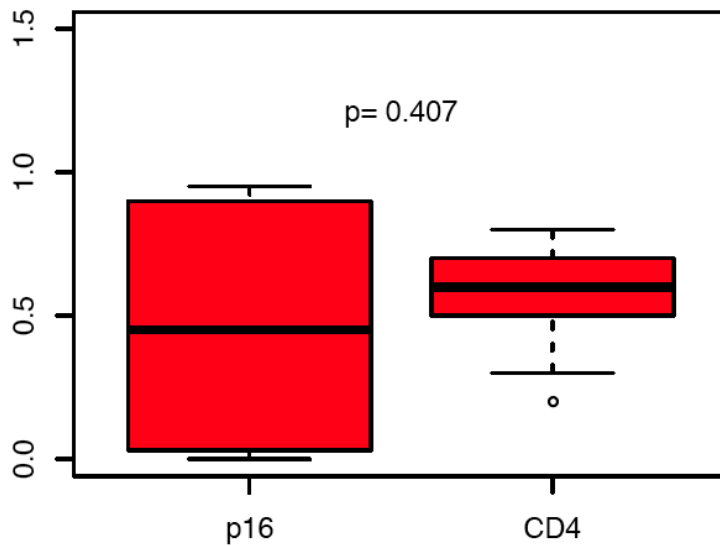


Abbildung 41: Boxplot zu CD4 und p16INK4a im Vergleich in Bezug auf die SSM-ohne-Reg

Die Korrelationsanalyse (Tabelle 36 und Abbildung 42 und 43) zu den CD4 (Median: 0,55; IQR: 0,45-0,6) und p16INK4a Färbungen (Median: 0,25; IQR: 0-0,5) ergab bei den SSM-mit-Reg (KI: 0,87 und -0,39) keine Signifikanz ($p=0,709$). Der Korrelationskoeffizient lag bei $\rho=0,15$. Der gepaarte Wilcoxon-Test ergab auch keinen signifikanten Unterschied ($p=0,08$), wobei der p-Wert nur knapp über der Signifikanzgrenze ($p<0,05$) lag (Abb. 43).

	SSM-mit-Reg (n=9)	
	CD4	p16INK4a
Median	0,55	0,25
IQR	0,45-0,6	0-0,5
min-max	0,55	0,8
MW \pm SD	0,52 \pm 0,15	0,28 \pm 0,31

Tabelle 36: Auflistung des Medians, IQR (interquartile range=Interquartilsabstand), min-max=Spannweite und des Mittelwertes und dessen Standardabweichung (SD=Standard Deviation) für die CD4 und p16INK4a Färbungen in Bezug auf die SSM-mit-Reg

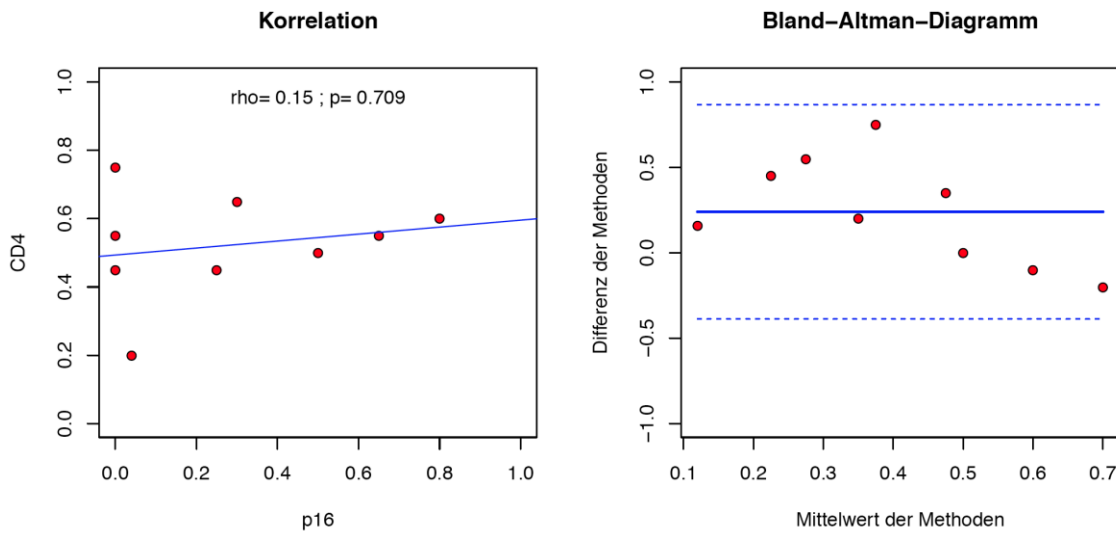


Abbildung 42: Bland-Altman Diagramm zu den p16INK4a und CD4 Färbungen in Bezug auf die SSM-mit-Reg, KI: 0,87 und -0,39

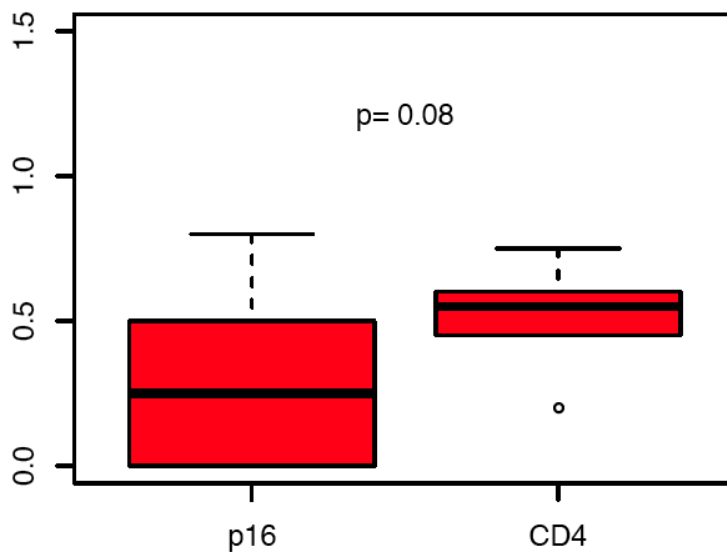


Abbildung 43: Boxplot zu CD4 und p16INK4a im Vergleich in Bezug auf die SSM-mit-Reg

Auch in Betrachtung der Halonävi (Tabelle 37, Abbildungen 44 und 45) ergab die Korrelationsanalyse zu der CD4 (Median: 0,55; IQR: 0,5-0,68) und p16INK4a Färbung (Median: 0,4; IQR: 0,1-0,54) bei einem 95%-Konfidenzintervall von 1,09 und -0,68 keinen signifikanten ($p=0,228$) Zusammenhang. Der

Korrelationskoeffizient lag bei -0,58. Im gepaarten Wilcoxon-Test kam ebenfalls kein signifikanter Unterschied ($p=0,313$) zur Darstellung (Abb. 45).

	Halonävi (n=6)	
	CD4	p16INK4a
Median	0,55	0,4
IQR	0,5-0,68	0,1-0,54
min-max	0,35	0,87
MW \pm SD	0,59 \pm 0,14	0,39 \pm 0,33

Tabelle 37: Auflistung des Medians, IQR (interquartile range=Interquartilsabstand), min-max=Spannweite und des Mittelwertes und dessen Standardabweichung (SD=Standard Deviation) für die CD4 und p16INK4a Färbungen in Bezug auf die Halonävi

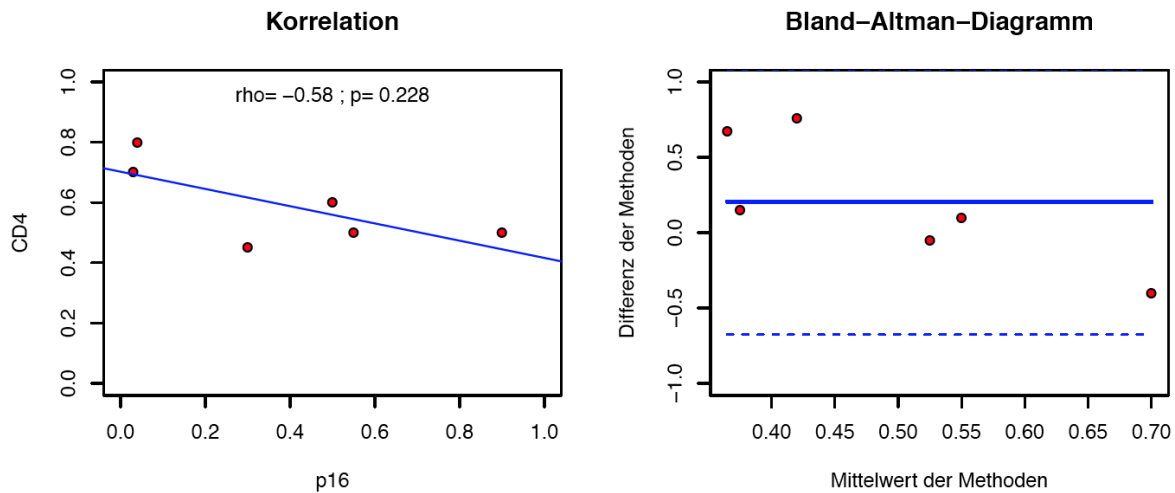


Abbildung 44: Bland-Altman Diagramm zu den p16INK4a und CD4 Färbungen in Bezug auf die Halonävi, KI: 1,09 und -0,68

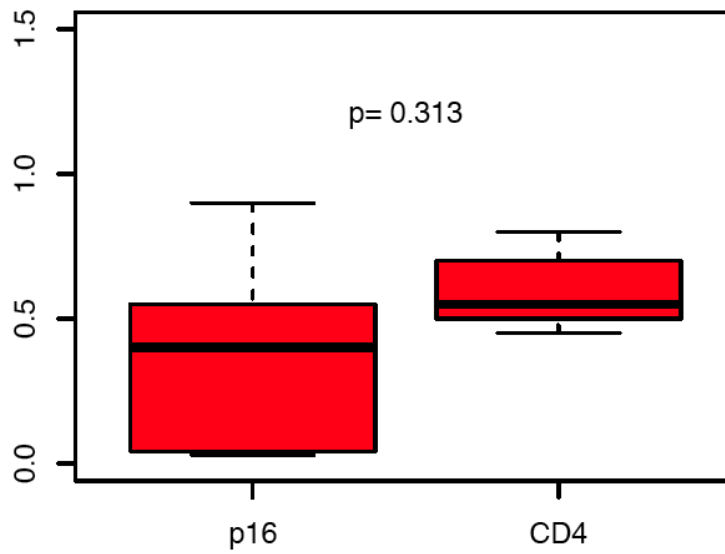


Abbildung 45: Boxplot zu CD4 und p16INK4a im Vergleich in Bezug auf die Halonävi

Somit konnte in der graphischen Darstellung (Abb. 37) der einzelnen Färbungen ein insgesamt vorhandenes Überwiegen der CD4 Färbungen in allen Gruppen festgestellt werden. Dies konnte im gepaarten Wilcoxon-Test bestätigt werden. Ferner zeigte sich die CD4 und p16INK4a Nachweisbarkeit in Bezug auf die einzelnen Fälle oft gegenläufig. In der statistischen Auswertung ließ sich jedoch kein signifikanter Unterschied im Vergleich der einzelnen Gruppen feststellen. Auch die Korrelationsanalyse zu CD4 und p16INK4a ergab keinen signifikanten Zusammenhang.

4.5 Korrelation von p16INK4a/MIB-1 und p14ARF/MIB-1

In den folgenden Abbildungen (Abb. 46-53) und Tabellen 38 und 39 wurden die Korrelation von p16INK4a zu MIB-1 und p14ARF zu MIB-1 mittels Bland-Altman Analysen untersucht. Hierdurch soll im Genaueren untersucht werden, ob ein

Zusammenhang zwischen der p16INK4a beziehungsweise der p14ARF Expression und der Expression von MIB-1 vorliegt.

4.5.1 Korrelation von p16INK4a zu MIB-1

In den Abbildungen 46-49 und Tabelle 38 wurden die statistischen Ergebnisse der Korrelation von p16INK4a zu MIB-1 dargestellt.

Tabelle 38 und Abbildung 46 zeigen diese Ergebnisse in Bezug auf alle untersuchten Gruppen (SSM-ohne-Reg, SSM-mit-Reg, dermale Nävi und Halonävi). Die Korrelationsanalyse zu p16INK4a und MIB-1 in Bezug auf alle Gruppen ergab bei einem Korrelationskoeffizienten (ρ) von 0,02 keinen signifikanten ($p=0,904$) Zusammenhang.

	alle Gruppen (n=26)	
	p16INK4a	MIB-1
Median	0,3	0,04
IQR	0,03-0,62	0,03-0,1
min-max	0,95	0,25
MW \pm SD	0,37 \pm 0,34	0,07 \pm 0,07

Tabelle 38: Auflistung des Medians, IQR (interquartile range=Interquartilsabstand), min-max=Spannweite und des Mittelwertes und dessen Standardabweichung (SD=Standard Deviation) für die p16INK4a und MIB-1 Färbungen in Bezug auf alle Gruppen

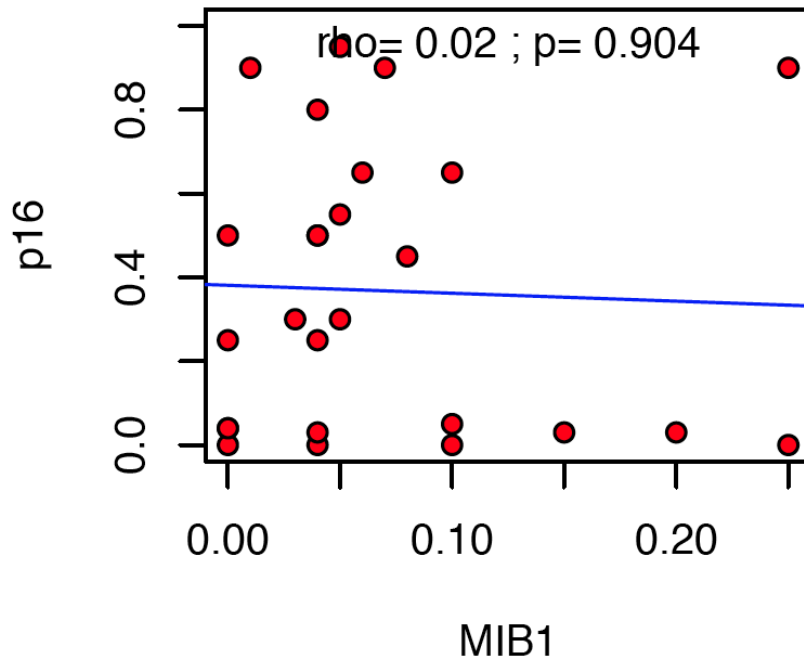


Abbildung 46: Korrelation von p16INK4a zu MIB-1 in Bezug auf alle Gruppen (Halonävi, SSM-mit-Reg, SSM-ohne-Reg)

Die folgenden Abbildungen 47-49 zeigen die Ergebnisse in Bezug auf jeweils eine Gruppe (SSM-ohne-Reg, SSM-mit-Reg oder Halonävi), wobei die Gruppe der dermalen Nävi als Kontrollgruppe nicht untersucht wurden.

Abbildung 47 stellt die Assoziation von p16INK4a zu MIB-1 bei den SSM-ohne-Reg dar. Hier kann bei $p=0,075$ zumindest eine Tendenz zur negativen Korrelation ($\rho=-0,62$) festgestellt werden. Dies bedeutet also, dass bei einer Expression von p16INK4a, MIB-1 tendenziell weniger nachweisbar ist.

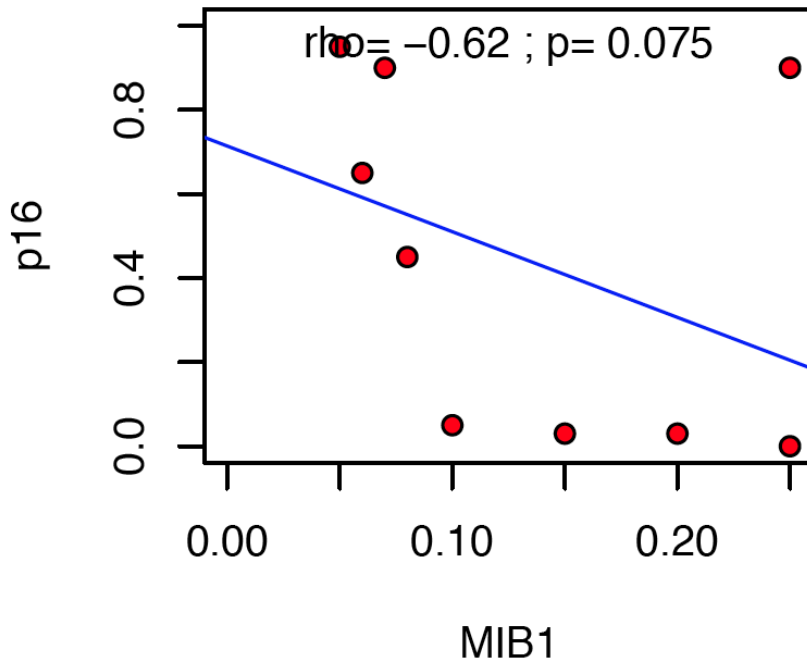


Abbildung 47: Korrelation von p16INK4a zu MIB-1 in Bezug auf die SSM-ohne-Reg

In Abbildungen 48 und 49 kommen die Ergebnisse der Korrelationsanalysen von p16INK4a zu MIB-1 in Bezug auf die SSM-mit-Reg (Abb. 48) und Halonävi (Abb. 49) zur Darstellung. Sowohl bei den SSM-mit-Reg ($\rho=0,24$, $p=0,532$) als auch bei den Halonävi ($\rho=0,12$, $p=0,824$) war keine signifikante Korrelation feststellbar.

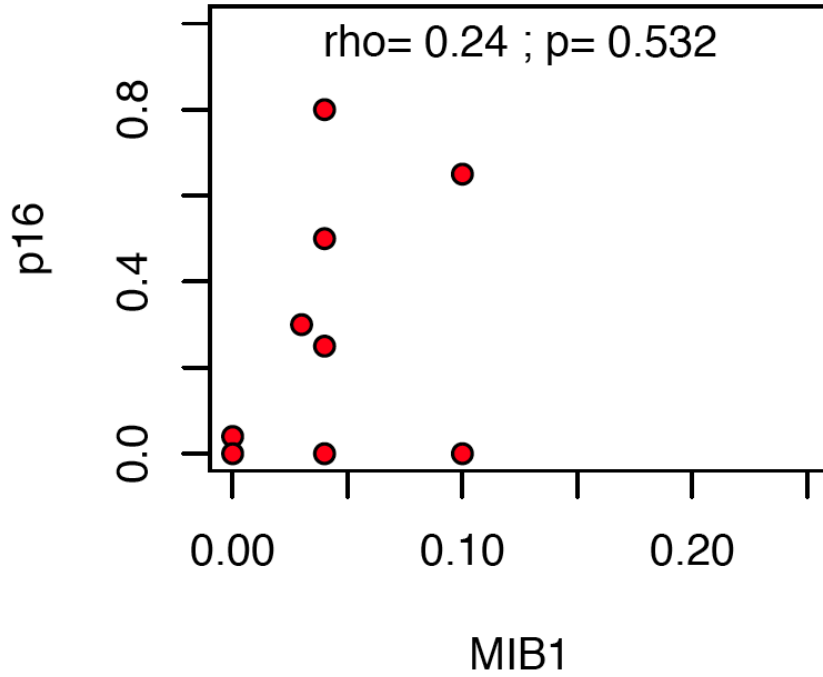


Abbildung 48: Korrelation von p16INK4a zu MIB-1 in Bezug auf die SSM-mit-Reg

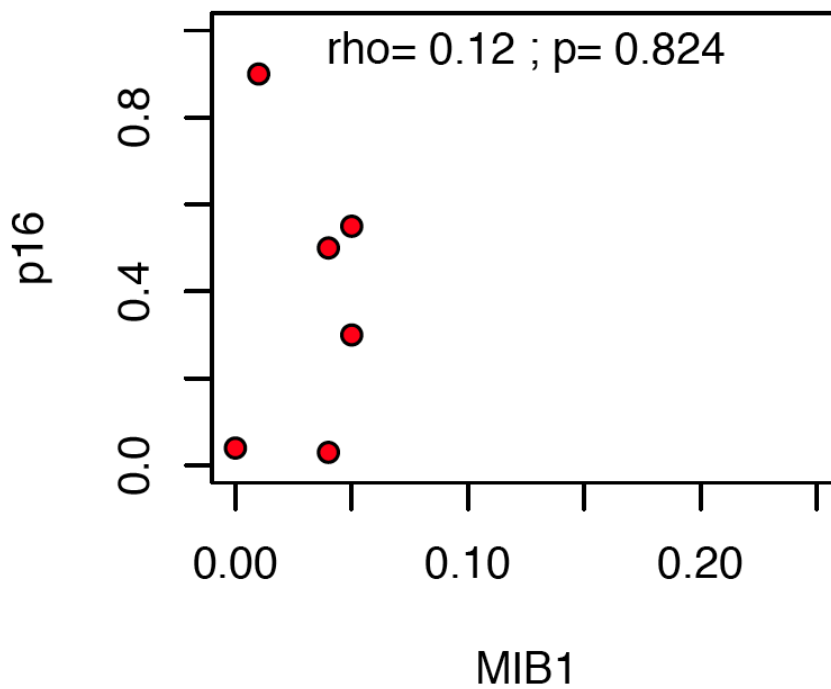


Abbildung 49: Korrelation von p16INK4a zu MIB-1 in Bezug auf die Halonävi

4.5.2 Korrelation von p14ARF zu MIB-1

Im Folgenden werden die statistischen Ergebnisse der Korrelationsanalyse von p14ARF zu MIB-1 gezeigt (Abb. 50-53, Tabelle 39).

Tabelle 39 und Abbildung 50 geben die Resultate in Bezug auf alle Gruppen (SSM-ohne-Reg, SSM-mit-Reg, dermale Nävi und Halonävi) wieder. Bei einem Korrelationskoeffizienten (ρ) von $-0,06$ zeigte sich hier kein signifikanter Zusammenhang ($p=0,778$).

	alle Gruppen (n=26)	
	p14ARF	MIB-1
Median	0,05	0,04
IQR	0,03-0,46	0,03-0,1
min-max	1	0,25
MW \pm SD	0,27 \pm 0,35	0,07 \pm 0,07

Tabelle 39: Auflistung des Medians, IQR (interquartile range=Interquartilsabstand), min-max=Spannweite und des Mittelwertes und dessen Standardabweichung (SD=Standard Deviation) für die p14ARF und MIB-1 Färbungen in Bezug auf alle Gruppen

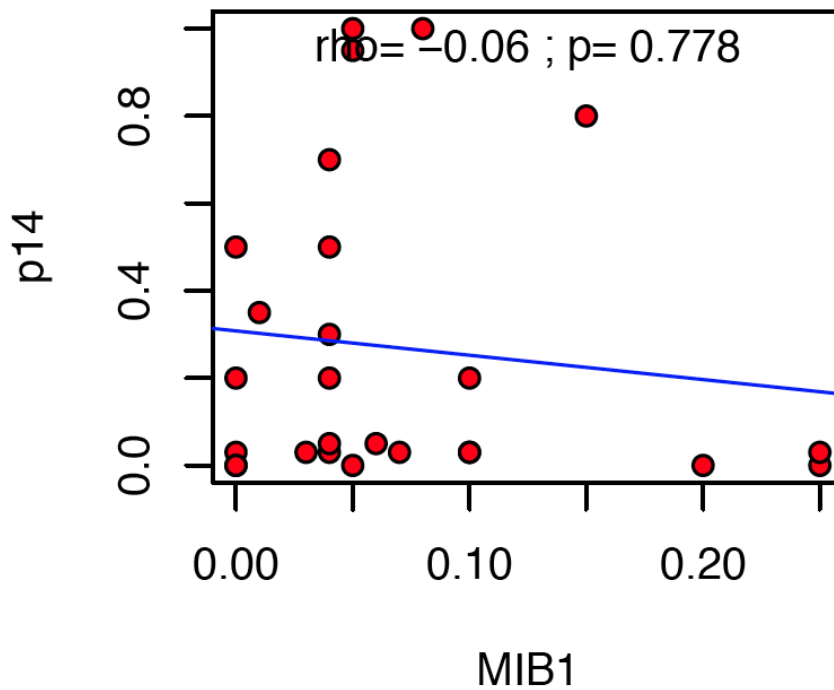


Abbildung 50: Korrelation von p14ARF zu MIB-1 in Bezug auf alle Gruppen (Halonävi, SSM-mit-Reg, SSM-ohne-Reg)

Bei der Untersuchung der SSM-ohne-Reg fiel bei einem Korrelationskoeffizienten von $\rho = -0,6$ und $p = 0,088$ die Tendenz zu negativen Korrelation der beiden Marker auf (Abb. 51). Wenn in einem Schnitt p14ARF exprimiert wurde, zeigte sich nur wenig MIB-1 Expression.

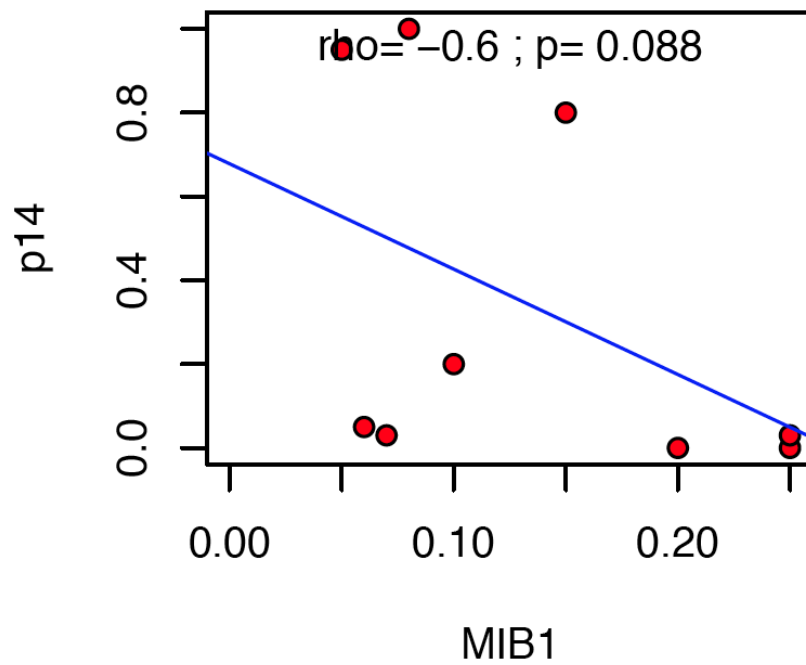


Abbildung 51: Korrelation von p14ARF zu MIB-1 in Bezug auf die SSM-ohne-Reg

Bei den SSM-mit-Reg (Abb 52) und den Halonävi (Abb. 53) ließ sich dies nicht feststellen. Es gab sowohl bei den SSM-mit-Reg ($\rho=-0,13$, $p=0,73$) als auch bei den Halonävi ($\rho=-0,26$, $p=0,612$) keine signifikante Korrelation.

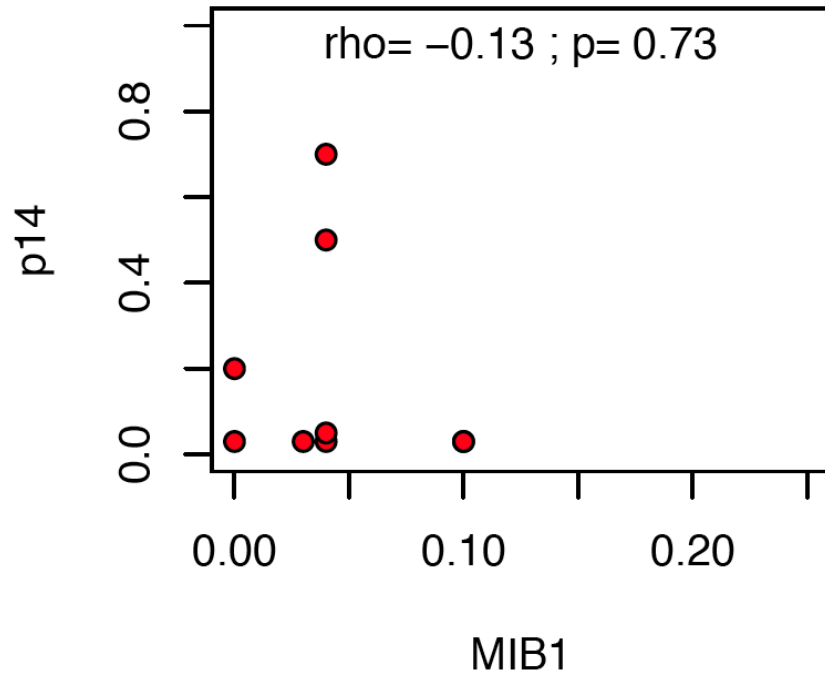


Abbildung 52: Korrelation von p14ARF zu MIB-1 in Bezug auf die SSM-mit-Reg

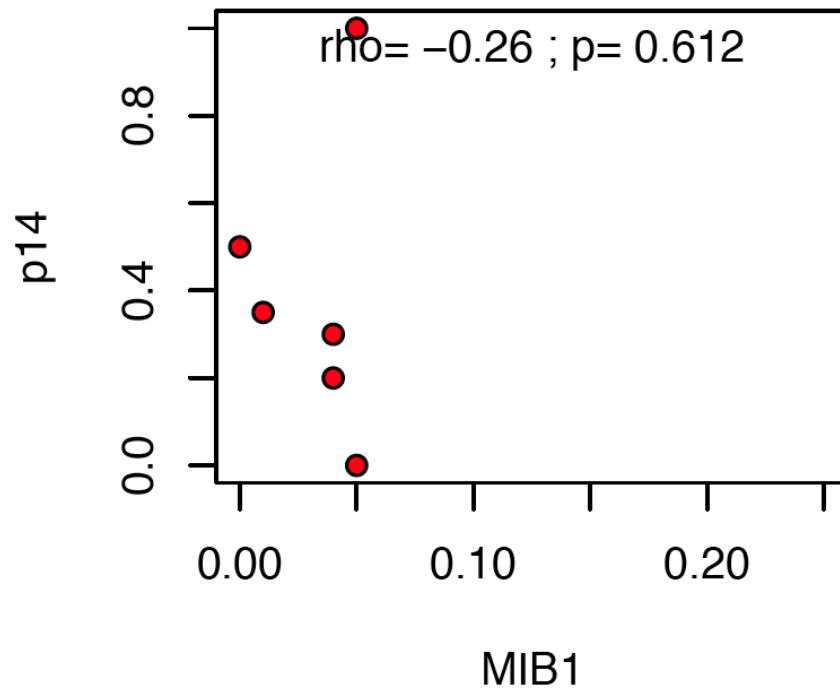


Abbildung 53: Korrelation von p14ARF zu MIB-1 in Bezug auf die Halonävi

Zusammenfassend ergeben die Untersuchungen der Korrelation von p16INK4a und p14ARF zu MIB-1 keine insgesamt signifikanten Zusammenhänge. Jedoch lassen sich Tendenzen zur negativen Korrelation bei den SSM-ohne-Reg sowohl bei der Korrelation von p16INK4a zu MIB-1 als auch bei der Korrelation von p14ARF zu MIB-1 feststellen. Es liegt also die Tendenz vor, dass wenn p16INK4a oder p14ARF in einem der SSM-ohne-Reg Schnitte exprimiert werden, MIB-1 nur wenig nachweisbar ist.

4.6 Fallübersichten

In den Abbildungen 46 und 47 wurden alle durchgeführten Immunfärbungen für jeweils einen Tumor dargestellt. Hierbei wurden die Marker farblich wie folgt unterteilt:

- Violett: Proliferationsmarker (MIB-1)
- Rottöne: Marker für DNS-Schäden und Apoptose (p53 und Caspase-3)
- Grüntöne: Seneszenzmarker (p16INK4a und p14ARF)
- Blautöne: T-Zell Marker (CD8 und CD4).

Auch hier zeigte sich eine Heterogenität der einzelnen Fälle einer Gruppe in Bezug auf die Antikörpernachweise. Bei der Auswertung der Antikörperfärbungen pro Fall einer Gruppe war kein Muster erkennbar.

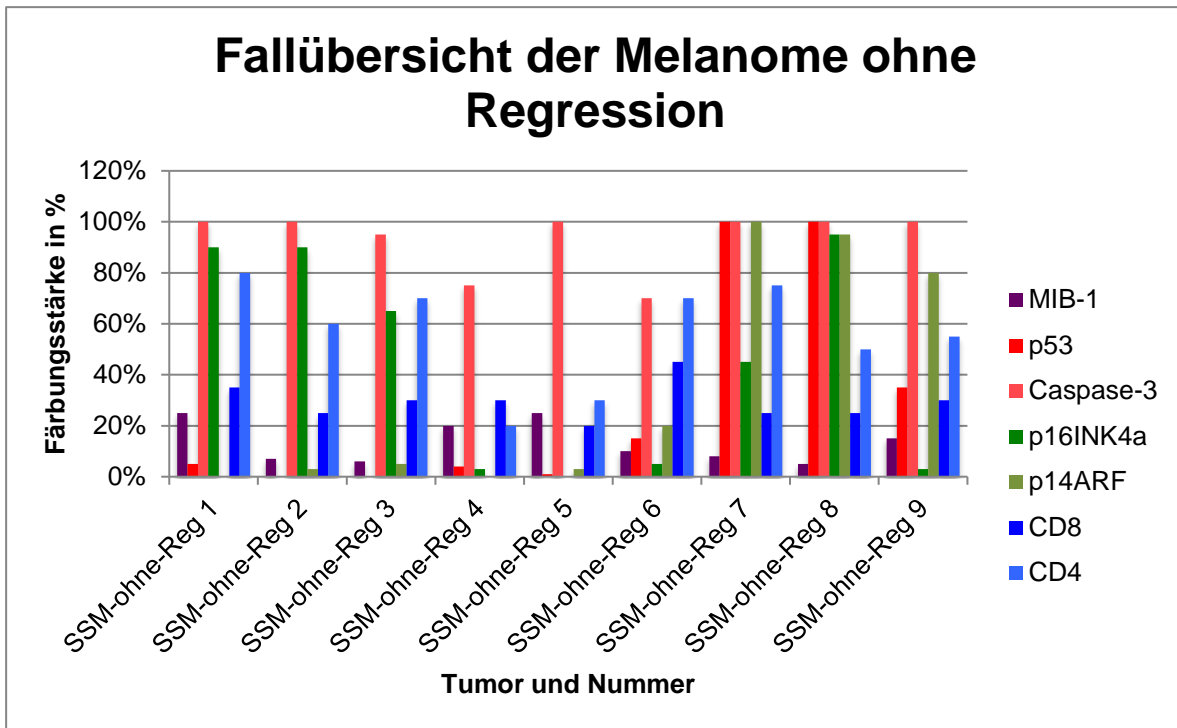


Abbildung 54: Übersicht aller Antikörper pro Fall (SSM-ohne-Reg)

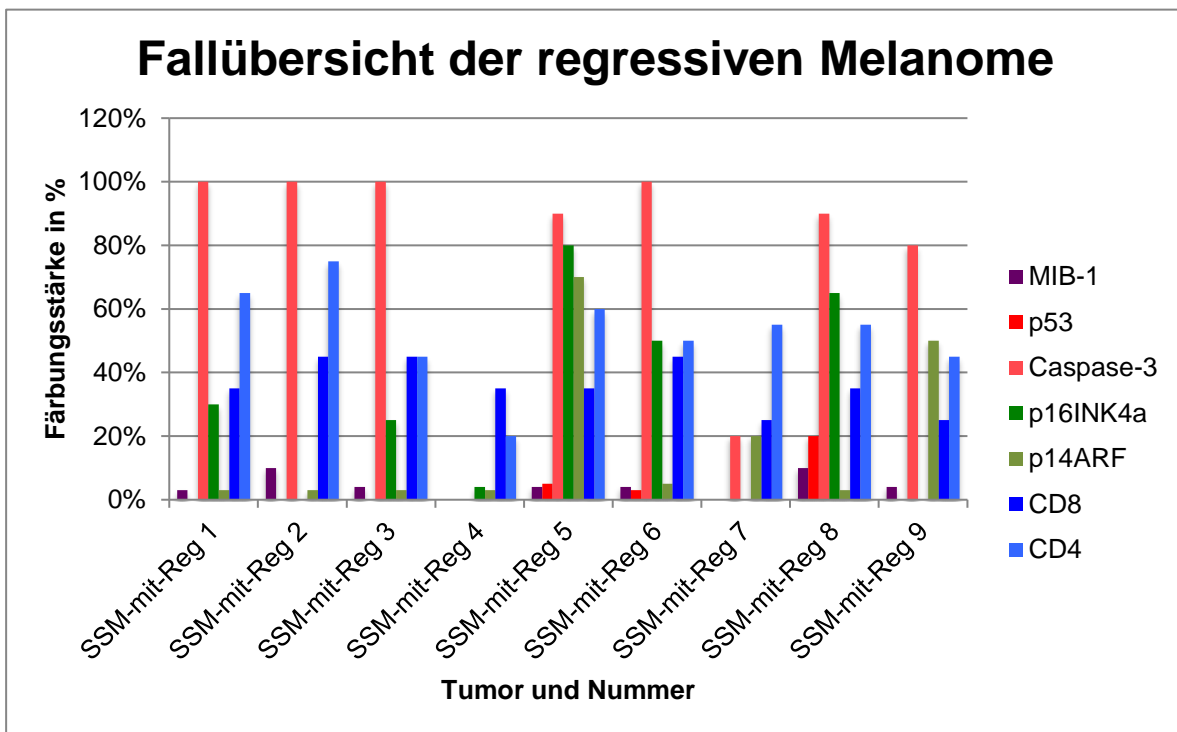


Abbildung 55: Übersicht aller Antikörper pro Fall (SSM-mit-Reg)

5. Diskussion

Es wurde in der vorliegenden Arbeit mittels immunhistologischer Marker für Proliferation, Apoptose und DNS-Schäden, Seneszenz und Zeichen einer Immunantwort einige Mechanismen der Wachstumskontrolle bei Melanomen mit und ohne Regression untersucht.

Die Untersuchungen der Zellproliferation bildeten die Basis für die anschließend durchgeführten Untersuchungen zu möglichen Mechanismen der Kontrolle des Wachstums bei Melanomen.

Die Zellproliferation bei den dermalen Nävi war insgesamt am geringsten ausgeprägt. Dermale Nävi sind benigne Tumoren, daher wurde hier auch keine erhöhte proliferative Aktivität erwartet. Nicht-regressive Melanome hatten gemessen am Marker MIB-1 einen signifikant höheren Proliferationsnachweis als Melanome mit Regression. Dieses unterstreicht die Bedeutung des Zellwachstums für das Vorliegen einer Regression bei Melanomen. Melanome in Regression sind demnach weniger proliferativ aktiv als Melanome ohne Regression. Es kam auch ein signifikanter Unterschied beim Vergleich der nicht regressiven Melanome mit den Halonävi zur Darstellung: Melanome ohne Regression wiesen eine höhere proliferative Aktivität auf als Halonävi. Stellte man jedoch die proliferative Aktivität der Halonävi und der regressiven Melanome gegenüber, so konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Dies könnte für eine Ähnlichkeit des Regressionsmechanismus bei Melanomen und Nävi sprechen.

Als Nächstes wurden Untersuchungen bezüglich möglicher Mechanismen der Wachstumskontrolle bei den unterschiedlichen Melanom- und Nävus-Gruppen durchgeführt.

Die Marker für Apoptose und Zellzyklusarrest, p53 und Caspase-3, zeigten keine signifikante Korrelation zum Vorliegen einer Regression. p53 zeigte nur in einigen SSM-ohne-Reg eine starke Färbung, ansonsten ließ sich in allen Gruppen nur wenig p53 nachweisen. Als Tumorsuppressorprotein ist eine niedrige p53-Expression bei

malignen Tumoren, wie beispielsweise Melanomen, nicht unerwartet. Die insgesamt niedrige Expression von p53 in Melanomen unabhängig von dem Vorliegen einer Regression könnte bedeuten, dass der Regressionsmechanismus über andere Signalkaskaden, die keine p53-Aktivierung beinhalten, abläuft. Allerdings ist die Expression von p53 nicht statisch sondern verläuft in Wellen, so dass indirekte down-stream Proteine wie p21 eventuell klarere Signale geben. Ebenso könnte dies die niedrige p53-Expression bei Halonävi erklären, was für eine gewisse Ähnlichkeit der Regressionsmechanismen bei Nävi und Melanomen sprechen würde. Die Beobachtung der erhöhten p53-Expression in einigen Melanomen ohne Regression könnte durch eine erhöhte Stabilität des p53 bei eingeschränkter Funktionstüchtigkeit durch Mutationen im p53-Gen erklärt werden.

Caspase-3 war sowohl in nicht regressiven als auch in regressiven SSM und Halonävi stark positiv nachweisbar. Die statistischen Untersuchungen ergaben keinen signifikanten Unterschied im Vergleich der einzelnen Gruppen. Dies könnte für eine erhöhte apoptotische Aktivität in den Melanomen, aber auch in den Halonävi sprechen, da Caspase-3 eine wichtige Rolle in der Ausführungsphase der Apoptose darstellt. Allerdings ist zu beachten, dass beim Menschen aktivierte Caspasen nicht darstellbar sind und die Färbung nur einen fraglichen Hinweis auf die Aktivierung der Apoptose gibt.

Eine Korrelation zwischen Regression und Aktivierung der Tumorseneszenz konnte nicht nachgewiesen werden. Sowohl in Bezug auf die p16INK4a als auch p14ARF Färbung war kein signifikanter Unterschied zwischen den regressiven und nicht regressiven Melanomen feststellbar. Es fiel jedoch auf, dass in der Betrachtung der einzelnen Fälle in allen Gruppen sehr große Unterschiede in der Stärke der Nachweisbarkeit zur Darstellung kamen. In der Korrelationsanalyse zu p14ARF und p16INK4a konnte kein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden. Es ist wichtig die Seneszenzmarker p14ARF und p16INK4a nicht isoliert zu betrachten; nur die Kombination von verschiedenen Markern erlaubt eine Aussage über den Seneszenzstatus. Eine wichtige erste Analyse ist die Korrelation des

Proliferationsmarkers MIB-1 mit p16INK4a oder p14ARF. Hieraus war keine signifikante Korrelation ableitbar. Aber es war eine Tendenz zur negativen Korrelation von p16INK4a zu MIB-1 und p14ARF zu MIB-1 nachweisbar.

Als Zeichen einer Immunantwort wurden die CD4- und CD8-positiven Zellen sowie der CD4/CD8-Quotient untersucht. Die CD4 und CD8 Färbungen ließen keine signifikanten Unterschiede im Vergleich der Gruppen untereinander erkennen. Wobei in Bezug auf die CD8 Färbung beim Vergleich der SSM-mit-Reg, SSM-ohne-Reg und Halonävi der p-Wert nur knapp über der Signifikanzgrenze lag. Es lag hier eine deutliche Tendenz vor, dass bei den regressiven Melanomen und Halonävi mehr CD8-positive Zellen nachweisbar waren als bei den Melanomen ohne Regression. Dieses weist darauf hin, dass bei der Regression von Melanomen und Halonävi eine Infiltration durch CD8-positive zytotoxische T-Zellen eine Rolle spielt, da Melanome mit Immunantwort ein mono-/oligoklonales Infiltrat aufweisen (Yazdi et al.).

Bei der Korrelationsanalyse von CD4 zu CD8 ergab keine der Gruppen einen signifikanten Zusammenhang. Im gepaarten Wilcoxon-Test konnte aber ein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Melanome festgestellt werden. Sowohl bei den nicht regressiven Melanomen als auch bei den regressiven Melanomen war mehr CD4 als CD8 nachweisbar. Nur in Bezug auf die Halonävi konnte im gepaarten Wilcoxon-Test kein signifikanter Unterschied gefunden werden. Im Gegensatz zu den Melanomen war somit bei den Halonävi kein vermehrtes Vorkommen CD4-positiver Zellen zu vermerken. Bei den Melanomen scheint jedoch unabhängig vom Vorliegen einer Regression ein relatives Überwiegen von CD4-positiven Zellen gegenüber CD8-positiven Zellen vorzuliegen.

Als Nächstes untersuchten wir die quantitativen Verhältnisse der CD4- und CD8-positiven Zellinfiltrate bei den unterschiedlichen Melanom- und Nävusgruppen.

Bei den regressiven Melanomen als auch den Halonävi zeigte der sich der CD4/CD8-Quotient unter oder im Bereich der Normverteilung im peripheren Blut zwischen 1,34 und 2,0 verteilt. Bei den Melanomen ohne Regression lag dieser hingegen eher darüber. Dieses war insbesondere in der Anzahl der Fälle im Bezug zum Normbereich des peripheren Blutes sichtbar. In den statistischen Untersuchungen konnte in Bezug auf den CD4/CD8-Quotienten allerdings kein signifikanter Unterschied im Vergleich der Gruppen festgestellt werden.

In der Gegenüberstellung der p16INK4a und CD4 Färbungen ließ die Betrachtung der einzelnen Fälle auf ein oft gegenläufiges Färbeverhalten der beiden Antikörper nachweisen. Ferner konnte in allen Gruppen tendenziell ein Überwiegen der CD4 Expression gesehen werden. In der Korrelationsanalyse zeigte sich jedoch auch hier kein signifikanter Zusammenhang der beiden Färbungen. Im gepaarten Wilcoxon-Test konnte zwar in Betrachtung aller Gruppen ein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Dies ließ sich jedoch beim Vergleich der CD4 und p16INK4a Färbungen nicht nachvollziehen, wenn nur eine Gruppe betrachtet wurde. Bei den regressiven Melanomen lag der p-Wert jedoch erneut nur knapp über der Signifikanzgrenze. Diese Ergebnisse könnten ebenfalls dafür sprechen, dass die Regression in Melanomen vor allem über eine Immunantwort erfolgt.

Zusammenfassend ließ der Vergleich der Regression bei Nävi und Melanomen vermuten, dass es beim Mechanismus der Regression gewisse Ähnlichkeiten geben könnte. Dafür sprach das ähnliche Färbeverhalten bei regressiven Melanomen und Halonävi in Bezug auf die Antikörper MIB-1, p53, Caspase-3 und CD4. In Bezug auf die Seneszenzmarker p16INK4a und p14ARF als auch die CD8 Nachweisbarkeit zeigten Halonävi und regressive Melanome hingegen deutliche Unterschiede auf. Es handelt sich anscheinend also nicht gänzlich um den gleichen Kontroll-Mechanismus.

Da die Aussagen dieser Arbeit auf den Ergebnissen einer geringen Fallzahl beruhen, sind sie eher als hypothesenbildend, nicht aber als beweisend zu werten. Somit kann diese Arbeit als Ausgangspunkt für weitere eingehende Studien dienen.

Im Folgenden werden nun die einzelnen Ergebnisse dieser Arbeit diskutiert.

5.1 Proliferationsmarker

Die MIB-1 Färbungen zeigten bei den SSM-ohne-Reg im Vergleich zu regressiven Melanomen mehr proliferative Aktivität. Eine geringere MIB-1 Expression könnte also auf ein in seiner Proliferation durch Regression kontrolliertes Melanom hinweisen.

Ob das Vorliegen einer Regression bei Melanomen mit einer guten Prognose einhergeht wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Kaur beschrieb Regression vor allem in dünnen Melanomen (<1mm) als vorteilhaften Prozess, da dies mit einer niedrigeren Wahrscheinlichkeit für Lymphknotenmetastasen einherging (Kaur et al., 2008). Ähnliche Ergebnisse erbrachte auch die systemische Metaanalyse und Review von Ribero. Hier konnte festgestellt werden, dass Patienten mit histologisch nachgewiesener Regression ein signifikant vermindertes Risiko für einen Tumornachweis in den Wächterlymphknoten hatten im Gegensatz zu Patienten ohne histologischem Nachweis einer Regression (Ribero et al., 2015).

Die MIB-Nachweisbarkeit wurde bei Ramsay et al. als ein unabhängiger prognostischer Faktor für das Gesamtüberleben bei Patienten mit Melanomen identifiziert. Ein niedriger MIB-Level war mit einer besseren Prognose verbunden (Ramsay et al., 1995). Vergleichbare Ergebnisse konnten in der Studie von Boni et al. gezeigt werden. Hier korrelierte bei dicken Melanomen (Tumordicke nach Breslow >1,5 mm) ein erhöhtes MIB-1 mit einer erhöhten Metastasierungswahrscheinlichkeit (Boni et al., 1996). In Bezug auf die Ergebnisse dieser Arbeit war bei regressiven Melanomen der MIB-1 Nachweis signifikant

geringer als bei den Melanomen ohne Regression. In Abhängigkeit von der Tumordicke könnte dies bei regressiven Melanomen für eine geringere Metastasierungswahrscheinlichkeit und somit für eine bessere Prognose sprechen.

Allerdings scheint ein erhöhter proliferativer Index beim Melanom allein nicht als ausreichender Hinweis auf eine schlechte Prognose zu sein, sondern nur in Kombination mit anderen prädiktiven klinisch-pathologischen Parametern (Hazan et al., 2002).

Diese Ergebnisse könnten ferner als Hinweis für das Vorliegen der Seneszenz in Halonävi und SSM-mit-Reg gedeutet werden, da seneszente Zellen sich in einer Art Ruhephase (G0-Phase) befinden, in der geringe bis gar keine Proliferation stattfindet.

5.2 Marker für DNS-Schäden und Apoptose

5.2.1 p53

p53 zeigte in dieser Arbeit eine unterschiedlich starke Nachweisbarkeit in den SSM-ohne-Reg. Ähnliche Resultate wurden schon in anderen Studien gefunden (Albino et al., 1994). Eine mögliche Erklärung für diese Unterschiede bieten die Studien von Weiss et al. und Houben et al.. Hier wurde gezeigt, dass mutierte Versionen von p53 in den Zellen gebildet werden können, die ebenfalls mittels immunhistochemischen Antikörper nachweisbar, aber funktionslos sind (Weiss et al., 1993, Houben et al., 2011).

In den statistischen Ergebnissen ließ sich jedoch im Vergleich der Gruppen kein signifikanter Unterschied nachweisen.

5.2.2 Caspase-3

Die Ergebnisse der Caspase-3 Färbung zeigten, dass sowohl in den Melanomen als auch in den Halonävi Caspase-3 meist sehr stark nachweisbar war. Dies könnte für eine erhöhte apoptotische Aktivität in allen Melanomen und auch den Halonävi sprechen. Allerdings handelt es sich hier um nicht aktivierte Caspase-3. Der Antikörper erkennt einen Vorläufer der aktivierten Caspase-3. Diese gilt eher als Risikoindikator für Apoptose anstatt als direkter Apoptosemarker. So wurde ein Zusammenhang zwischen erhöhtem immunhistologischen Caspase-3 Nachweis und apoptotischen Zellen bei Tumoren von Hadjiloucas et al. für das Mammakarzinom gezeigt (Hadjiloucas et al., 2001). Gegen diese Erklärung steht die Studie von Liu et al., in der dargelegt wurde, dass es beim Melanom auch in nicht-apoptotischen Melanomzellen eine erhöhte Caspase-3 Aktivierung gibt, welche mit Metastasierung und vaskulärer Mimikry in Verbindung gebracht wurde (Liu et al., 2013). Weitere Studien zum Melanom und anderen Tumoren (Mammakarzinom, B-Zell Lymphom und Kolorektales Karzinom) belegen ebenfalls, dass die Aktivierung von Caspasen eine Tumorprogression begleiten kann (Donoghue et al., 1999, Jonges et al., 2001, Vakkala et al., 1999, Woenckhaus et al., 2003). In wieweit dieses auch mit der Caspasen Aktivierung und der Apoptoseinduktion korreliert bleibt offen.

5.3 Seneszenzmarker p16INK4a und p14ARF

Für die Einzelanalyse von p16INK4a und p14ARF konnte keine eindeutige Tendenz gefunden werden. Es wurden starke Unterschiede in der Anzahl markierter Zellen innerhalb jeder Gruppe festgestellt. Im Vergleich der einzelnen Gruppen war kein signifikanter Unterschied nachweisbar.

5.3.1 p16INK4a

p16INK4a zeigte bei den Melanomen unabhängig vom Vorliegen einer Regression eine recht unterschiedliche Nachweisbarkeit. Somit scheint es eine gewisse Variabilität bei Melanomen oder aber auch innerhalb eines Melanoms zu geben, was die p16INK4a-Expression betrifft. Zu einem vergleichbaren Ergebnis kommt Bennett, der in seiner Arbeit ein genetisches Modell der Melanomprogression propagiert, wonach meist vier Schritte zur Entstehung eines metastasierenden Melanoms notwendig sind. Der zweite Schritt beschreibt die Suppression der Seneszenz unter anderem mittels p16INK4a-Verlust. Dieses wurde jedoch nicht als obligatorischer Schritt für bei der Entstehung aller Melanome gewertet (Bennett, 2015). Auch andere Studien zeigten einen p16INK4a-Verlust im Melanom gegenüber Nävi (Gray-Schopfer et al., 2006, Keller-Melchior et al., 1998, Straume et al., 2000, Talve et al., 1997).

In der Literatur wird ferner darüber berichtet, dass regressive Melanome eine bessere Prognose haben als Melanome ohne Regression (Zugna et al., 2018). Ein wichtiger Marker für den Wachstumsarrest bei Nävi ist die Expression von p16INK4a. Bei den Nävi blieb die p16INK4a-Expression in dieser Arbeit unabhängig vom Vorliegen einer Regression jedoch nahezu gleich. Keller-Melchior et al. fanden ebenfalls in ihrer Arbeit eine reguläre p16INK4a-Expression in melanozytären Nävi (Keller-Melchior et al., 1998). Michaloglou et al. zeigten in ihrer Arbeit, dass in Nävi eine anhaltende BRAF (V600E) Expression sowohl mit einer Induktion von p16INK4a als auch mit einem Zellzyklusarrest assoziiert ist (Michaloglou et al., 2005).

In Bezug auf Melanome ist noch unklar, welche molekularen Ereignisse die Regression einleiten und über welche Marker dies gut erkennbar gemacht werden kann. Dies bleibt somit ein Thema weitergehender Forschung. p16INK4a als isolierter Marker für Regression erscheint auch nach den Ergebnissen dieser Arbeit

unwahrscheinlich. Denkbar ist jedoch eine Kombination aus Markern, die Ki67 mit einschließt.

5.3.2 p14ARF

Bei der p14ARF Färbung verhielt es sich ähnlich wie bei p16INK4a. Es war kein signifikanter Unterschied im Vergleich der einzelnen Gruppen feststellbar und es gab bei den Melanomen unabhängig vom Vorliegen einer Regression eine große färberische Variabilität. Nur die dermalen Nävi zeigten gar keinen Nachweis von p14ARF. Bei den Halonävi hingegen konnten unterschiedliche Stärken der p14ARF-Färbung gesehen werden. Im Gegensatz zu unseren Beobachtungen zeigten Dobrowolski et al. in ihrer Arbeit, dass melanozytäre Nävi im Vergleich zu Melanomen deutlich mehr p14ARF exprimierten. Ein p14ARF-Verlust könnte somit für die Entstehung eines Melanoms eine wichtige Rolle spielen (Dobrowolski et al., 2002). In der Arbeit von Chandler und Peters konnte die Rolle von ARF als Mediator der onkogen-induzierten Seneszenz in Menschen noch nicht ausreichend bewiesen werden (Chandler and Peters, 2013).

5.3.3 p16INK4a versus p14ARF

Beim Vergleich der beiden Färbungen p16INK4a und p14ARF konnte in der Betrachtung der Einzelfärbungen in 30 von 38 Fällen ein gegenläufiges Verhalten festgestellt werden. In den statistischen Untersuchungen konnte jedoch kein signifikanter Zusammenhang gefunden werden.

Ähnliche Ergebnisse wurden in einer Arbeit über den immunhistochemischen Nachweis von p14ARF und p16INK4a in Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen und Pankreaskarzinomen gefunden. Hier wurde jedoch in den meisten Fällen ein

gleichsinniger Nachweis an p14ARF und p16INK4a gefunden, in einem kleineren Teil aber auch eine Gegenläufigkeit der beiden AK (Geradts et al., 2001).

Die Rolle von p14ARF und p16INK4a in der Regression beim Melanom sind zum aktuellen Zeitpunkt in der Literatur noch nicht weiter untersucht worden.

5.4 Marker des Immunsystems

5.4.1 CD8 und CD4

Die CD4 und CD8 Färbungen ergaben keine signifikanten Unterschiede im Vergleich der Gruppen. In Bezug auf die CD8 Färbung konnte jedoch die Tendenz festgestellt werden, dass bei den SSM-mit-Reg und den Halonävi eine stärkere Infiltration durch CD8-positive T-Lymphozyten nachweisbar war. Dieses könnte bedeuten, dass bei der Regression von Melanomen und Halonävi die Immunabwehr vor allem durch CD8-positive zytotoxische Zellen vermittelt wird. In der Arbeit von Bayer-Garner et al. konnte in Halonävi ebenfalls ein vermehrtes Vorkommen von CD8-positiven Zellen gefunden werden. Hier wurde ebenfalls vermutet, dass bei der Regression in Halonävi CD8-positive Zellen eine wichtige Rolle einnehmen (Bayer-Garner et al., 2004). In einer weiteren Arbeit konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe von CD8+ angereicherten, jungen, tumorinfiltrierenden Lymphozyten im Rahmen einer adaptiven T-Zell-Immunantwort als Tumorthherapie in lymphozytendepletierten Patienten eine Regression von Melanommetastasen herbeigeführt werden konnte (Dudley et al., 2010). Dies könnte indirekt für die Richtigkeit der Resultate dieser Arbeit sprechen, da das Immunsystem mittels CD8-positiver Zellen offensichtlich in der Lage ist die Zellen eines Melanoms zu erkennen und zu zerstören.

Eine andere Untersuchung zeigte zwar die Anwesenheit von T-Zellen in regressiven Melanomen, wies aber auch darauf hin, dass diese nicht unbedingt mit einer direkten Anti-Tumor-Antwort des Immunsystems in Verbindung stehen muss (Bernsen et al., 2004).

Bei der Korrelationsanalyse von CD4 zu CD8 konnte kein signifikanter Zusammenhang in Bezug auf die Halonävi und Melanome festgestellt werden. Bei den Melanomen war im gepaarten Wilcoxon-Test jedoch ein signifikanter Unterschied nachweisbar. Bei den Melanomen war unabhängig vom Vorliegen einer Regression mehr CD4 als CD8 nachweisbar. Bei den Halonävi konnte dies nicht nachgewiesen werden. Das Vorhandensein von malignen Melanomzellen könnte somit zu einer komplexen Aktivierung des Immunsystems führen.

Des Weiteren wiesen die SSM-ohne-Reg insgesamt größere Unterschiede in Bezug auf die Nachweisbarkeit der beiden Zellpopulationen pro Fall auf als die SSM-mit-Reg und die Halonävi. Bei den SSM-ohne-Reg lag die Nachweisbarkeit von CD4 und CD8 also weiter auseinander als bei den SSM-mit-Reg und den Halonävi. Dies könnte sich bei den regressiven Melanomen und den Halonävi als eine Antwort der adaptiven Immunabwehr über CD8-positive T-Zellen interpretieren lassen, da hier im Vergleich zu den SSM-ohne-Reg mehr CD8-positive Zellen vorzufinden waren. Das Vorhandensein beider Lymphozytenpopulationen konnte ebenfalls in der Arbeit von Bernsen et al. nachgewiesen werden (Bernsen et al., 2004).

5.4.2 CD4/CD8 Quotient

Die Betrachtung der Einzelfärbungen der SSM-ohne-Reg zeigten einen eher normalwertigen bis erhöhten CD4/CD8-Quotienten im Vergleich zu den SSM-mit-Reg und Halonävi, bei denen der CD4/CD8-Quotient unter oder im Bereich zwischen 1,34 und 2,0 verteilt lag. Dieses wurde insbesondere in der zahlenmäßigen Verteilung bei den Fällen mit versus ohne Regression deutlich. In den statistischen Untersuchungen konnte in Bezug auf den CD4/CD8-Quotienten allerdings kein signifikanter Unterschied im Vergleich der Gruppen festgestellt werden.

Ein erhöhter CD4/CD8-Quotient wurde auch bei anderen Tumorerkrankungen gefunden, beispielsweise bei malignen Lymphomen (Wahlin et al., 2012). Das

Ergebnis, dass bei regressiven Melanomen und Halonävi der Quotient tendenziell niedriger war, könnte daher durch die Rückbildung des Tumors unter dem Einfluss von CD8-positiven zytotoxischen T-Zellen erklärt werden. Dieses würde auch erklären, weshalb der CD4/CD8-Quotient bei den Halonävi im Vergleich zu den Melanomen am niedrigsten ist. Eine Verminderung des CD4/CD8-Quotienten bei reduzierter Tumormasse beobachtete auch die Studie von Muhonen et al., in der ein sinkender CD4/CD8-Quotient in chemotherapierten Melanompatienten gefunden wurde, der mit einer Reduktion des Tumors einherging (Muhonen et al., 1994). Eine andere Arbeit zeigte hingegen, dass chemotherapierte Melanompatienten mit anfänglich steigendem CD4/CD8-Quotienten eine längere mittlere Überlebenszeit hatten als Patienten mit anfänglich sinkendem CD4/CD8-Quotient (Hernberg et al., 2004). Eine wesentliche Subpopulation der CD4-positiven T-Zellen sind die sogenannten regulatorischen T_{Reg} Lymphozyten. Sie zeichnen sich durch Positivität für die Marker CD4, CD25, und Positivität für den „transcription factor forkhead box P3“ (FoxP3) aus und sind als tumorfördernd beschrieben (Shang et al., 2015, Wolf et al., 2015).

5.4.3 p16INK4a versus CD4

In der Gegenüberstellung der p16INK4a und CD4 Färbungen ließ die Betrachtung der einzelnen Fälle auf ein oft gegenläufiges Färbeverhalten der beiden Antikörper schließen. In der Korrelationsanalyse ließ sich jedoch kein signifikanter Zusammenhang nachweisen. Ferner konnte der Vergleich der p16INK4a und CD4 Färbung aufzeigen, dass CD4 in bei den Halonävi und regressiven Melanomen tendenziell stärker nachweisbar war als p16INK4a. Der Unterschied, dass in allen Gruppen mehr CD4 als p16INK4a nachweisbar war konnte im gepaarten Wilcoxon-Test bestätigt werden.

Dies könnte darauf hinweisen, dass bei der Regression von Melanomen das Immunsystem eine wichtige Rolle einnimmt. Eine Verknüpfung der Signalkaskaden

des Immunsystems und der Seneszenz kann aufgrund des gleichzeitigen Vorkommens von CD4 und p16INK4a in regressiven Melanomen und Halonävi vermutet werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit reichen jedoch nicht aus, um dies zu beweisen. Dies erbrachte auch die These von Braumüller et al., dass zu der Th1 Antwort des Immunsystems auch die Aktivierung der Seneszenz über den p16INK4a-Rb Signalweg gehört (Braumüller et al., 2013). Die Literaturrecherche ergab bisher keine Arbeit mit gegensätzlichen Befunden.

Insgesamt unterstützen diese Ergebnisse viele andere Beobachtungen, nach denen Melanome zu den immunologisch kontrollierten Tumoren gehören. Bei Patienten mit metastasierten Melanomen konnte jetzt gezeigt werden, dass ein therapeutischer Eingriff am zellulären Immunsystem über die Blockade von PD-1 oder PD-1 und CTLA-4 es zu einer deutlichen Tumorreduktion und einer signifikanten Verlängerung der Überlebenszeit bei Patienten mit metastasierten Melanomen kommen kann (Larkin et al., 2015, Robert et al., 2015, Wolchok et al., 2013).

5.4 Korrelation von p16INK4a/MIB-1 und p14ARF/MIB-1

In den Korrelationsanalysen von p16INK4a zu MIB-1 und p14ARF zu MIB-1 ließen sich keine signifikanten Zusammenhänge feststellen. Bei den SSM-ohne-Reg konnte jedoch in Bezug auf beide Marker, p16INK4a ($p=0,075$) und auch p14ARF ($p=0,088$), eine Tendenz zu negativen Korrelation nachgewiesen werden. Bei den Melanomen ohne Regression zeigte sich also tendenziell bei einer vermehrten Expression von p14ARF und p16INK4a, eine verminderte MIB-1 Expression. Dies könnte bedeuten, dass bei den Melanomen ohne Regression über die Expression von p14ARF und p16INK4a MIB-1 supprimiert wird. Ähnliche Ergebnisse konnten in der Arbeit von Bouvier-Labit et al. gezeigt werden. Hier wurde eine p16INK4a Expression mit einem niedrigen Ki67 Labelling Index bei Glioblastomen nachgewiesen (Bouvier-Labit et al., 1999). Für die Korrelation von p14ARF zu MIB-1 ergab die Literaturrecherche keine vergleichbaren Ergebnisse.

5.6 Fazit zur Fragestellung

Die Frage, ob eine Korrelation der Regression zu T-Zell-Infiltraten, Apoptose oder der Aktivierung der Seneszenz-Signalwege vorliegt, kann nach den Ergebnissen der vorliegenden Dissertation folgendermaßen beantwortet werden:

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation weisen darauf hin, dass eine Antwort des zellulären Immunsystems, unter Betonung der CD8-positiven T-Zellen in der Regression von Melanomen zu beobachten ist. Die Aktivierung der Tumorseneszenz konnte hier nicht nachgewiesen werden, jedoch gibt es Hinweise, dass die Mechanismen des Immunsystems und der Seneszenz miteinander verknüpft sein könnten. Eine Korrelation der Regression und Zeichen der Apoptose konnte festgestellt werden. So war bei der alleinigen Betrachtung der MIB-1 Färbung, die MIB-1 Expression bei den Melanomen ohne Regression signifikant höher als bei den Melanomen mit Regression. Es bleibt somit die Feststellung, dass ein MIB-1 Verlust mit Regression assoziiert ist. MIB-1 ist als Marker für die Proliferation derjenige, welcher am Besten den Wachstumsarrest, sei es klassischer Arrest des Zellzyklus oder Arrest im Rahmen von Seneszenz, angibt. Zur Bestimmung des genauen Ursache und Charakterisierung dieses Zellzyklusarrests sind jedoch weitere Analysen nötig.

Die Grundhypothese, dass Regression mit einem Wachstumsarrest einhergeht ist somit bestätigt worden. Die Ursache dieses Arrests muss jedoch noch weiter geklärt werden. Weshalb die p16INK4a Immunhistologie für Regression ein schlechter Marker ist bleibt offen. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass in der weiteren Signalkaskade von p16INK4a beispielsweise im Molekül Rb1, Störungen vorliegen, durch welche p16INK4a zwar stark exprimiert wird, aber unwirksam geworden ist. Diese These stützt beispielsweise die Arbeit von Robinson et al., welche bei der Sequenzierung von Metastasen bei etwa 25-30% aller Metastasen eine genomische Aberration von p16INK4a oder Rb1 zeigt (Robinson et al., 2017).

Die beobachtete unterschiedlich ausgeprägte Infiltration der einzelnen Melanomtypen durch T-Lymphozyten-Subpopulationen legt als grundsätzliche Hypothese eine unterschiedlich regulierte immunologische Tumorkontrolle mit Auswirkung auf die Melanomregression nahe: Bei den regressiven Melanomen überwiegt eine zytotoxische CD8-positive Lymphozyteninfiltration, die über eine verminderte Tumorpheriferation Seneszenz induziert. Bei den Melanomen ohne Regression könnte dieser Immunüberwachungseffekt durch eine regulatorische CD4-positive T-Zellinfiltration behindert werden, was so eine stärkere Tumorzellproliferation erlaubt. Diese Hypothese müsste in Folgeuntersuchungen zur quantitativen Infiltration und Funktion insbesondere durch CD4-, CD25-, und FoxP3-positive T_{Reg} Zellen überprüft werden.

Weitere Untersuchungen zu unterschiedlichen anderen Tumor-regulatorischen Stromazell-Populationen wie zu den „myeloid derived suppressor cells“ (MDSC) (Draghiciu et al., 2015, Kato and Watanabe, 2015) erscheinen ebenfalls notwendig um zu einem vollständigeren Verständnis der immunologischen Regulation des Wachstums und der Ausbreitung maligner Melanome zu kommen und dadurch effektivere Therapien zu entwickeln.

6. Zusammenfassung

Die Entwicklung der letzten fünf Jahre hat gezeigt, dass durch eine Aktivierung des Immunsystems Melanommetastasen zur Regression gebracht werden können. Ein wichtiger Mechanismus der Rückbildung von Metastasen liegt darin, dass die Tumoren durch das Immunsystem zerstört werden. Es ist aber anzunehmen, dass andere Mechanismen der Immunabwehr, wie Zellzyklusinhibition oder Seneszenz von Tumoren, ebenfalls eine wichtige Rolle spielen. Beim Melanom ist die Regression nicht nur bei Metastasen beobachtet worden, sondern auch bei Primärtumoren. Die zugrundeliegenden Mechanismen hierfür sind weiter Thema aktiver Forschung. Mittels Immunhistologie wurde deswegen in der vorliegenden Dissertationsarbeit untersucht, ob Melanome, die sich zurückbilden (regressive Melanome), sich von Melanomen unterscheiden, die keine Regression zeigen. Untersucht wurden der Proliferationsmarker MIB-1, die Apoptose-Marker p53 und Caspase-3 sowie die Seneszenz-Marker p16INK4a und p14ARF. Weiterhin wurde das Tumordinfiltrat auf die Präsenz von CD4-positiven und CD8-positiven T-Helferzellen hin analysiert. Verglichen wurden dabei neun regressive Melanome mit neun nicht regressiven Melanomen; als Kontrolle dienten sechs Nävi in Regression (Halonävi) und zwei dermale Nävi.

Zentrales Ergebnis der Arbeit war, dass Melanomzellen in den regressiven Melanomen offensichtlich weniger stark proliferieren als in den nicht regressiven, da in den regressiven Melanomen die MIB-1-Expression deutlich verringert war. Als isolierte Marker scheinen sich die Expression von p16INK4a oder p14ARF nicht dafür zu eignen, regressive Melanome zu charakterisieren. Wird jedoch p16INK4a oder p14ARF mit MIB-1 korreliert, dann zeigt sich, dass interessanterweise bei Melanomen ohne Regressionszeichen eine geringe Proliferationsneigung mit starker p16INK4a oder p14ARF-Expression einhergeht. Weiter wurde in der Arbeit bestätigt, dass die Regression von Melanomen mit einem verstärkten Infiltrat an CD8-positiven zytotoxischen T-Zellen einhergeht. Interessant ist auch, dass die Präsenz zahlreicher CD4-positiver T-Lymphozyten und die Expression von

p16INK4a beobachtet wurde. Diese explorativen Daten zeigen, dass Melanome mit oder ohne Regression nicht nur ein unterschiedliches Infiltrat an Lymphozyten haben, sondern sich auch bezüglich ihrer Neigung zur Proliferation der Melanomzellen unterscheiden. Anhand größerer Analysen und insbesondere durch die Korrelation von Immunhistologie mit Überlebensdaten wird es wichtig sein, ausgehend von dieser Arbeit, zu untersuchen, inwieweit eine zunehmend genauere Charakterisierung der Proliferationseigenschaften von Primärmelanomen die Prognose bestimmt.

7. Literaturverzeichnis

- ABBASI, N. R., SHAW, H. M., RIGEL, D. S., FRIEDMAN, R. J., MCCARTHY, W. H., OSMAN, I., KOPF, A. W. & POLSKY, D. 2004. Early diagnosis of cutaneous melanoma: revisiting the ABCD criteria. *JAMA*, 292, 2771-6.
- AGARWAL, M. L., AGARWAL, A., TAYLOR, W. R. & STARK, G. R. 1995. p53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 8493-7.
- AGARWALA, S. S. 2010. Novel immunotherapies as potential therapeutic partners for traditional or targeted agents: cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 blockade in advanced melanoma. *Melanoma Res*, 20, 1-10.
- ALBINO, A. P., VIDAL, M. J., MCNUTT, N. S., SHEA, C. R., PRIETO, V. G., NANUS, D. M., PALMER, J. M. & HAYWARD, N. K. 1994. Mutation and expression of the p53 gene in human malignant melanoma. *Melanoma Res*, 4, 35-45.
- BALCH, C. M., GERSHENWALD, J. E., SOONG, S. J., THOMPSON, J. F., ATKINS, M. B., BYRD, D. R., BUZOID, A. C., COCHRAN, A. J., COIT, D. G., DING, S., EGGERMONT, A. M., FLAHERTY, K. T., GIMOTTY, P. A., KIRKWOOD, J. M., MCMASTERS, K. M., MIHM, M. C., JR., MORTON, D. L., ROSS, M. I., SOBER, A. J. & SONDAK, V. K. 2009. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol*, 27, 6199-206.
- BANDARCHI, B., JABBARI, C. A., VEDADI, A. & NAVAB, R. 2013. Molecular biology of normal melanocytes and melanoma cells. *J Clin Pathol*, 66, 644-8.
- BATES, S., PHILLIPS, A. C., CLARK, P. A., STOTT, F., PETERS, G., LUDWIG, R. L. & VOUSDEN, K. H. 1998. p14ARF links the tumour suppressors RB and p53. *Nature*, 395, 124-5.
- BATES, S. & VOUSDEN, K. H. 1999. Mechanisms of p53-mediated apoptosis. *Cell Mol Life Sci*, 55, 28-37.
- BAYER-GARNER, I. B., IVAN, D., SCHWARTZ, M. R. & TSCHEN, J. A. 2004. The immunopathology of regression in benign lichenoid keratosis, keratoacanthoma and halo nevus. *Clin Med Res*, 2, 89-97.
- BENNETT, D. C. 2015. Genetics of melanoma progression: the rise and fall of cell senescence. *Pigment Cell Melanoma Res*.
- BERGER, A. H., KNUDSON, A. G. & PANDOLFI, P. P. 2011. A continuum model for tumour suppression. *Nature*, 476, 163-9.
- BERNSEN, M. R., DIEPSTRA, J. H., VAN MIL, P., PUNT, C. J., FIGDOR, C. G., VAN MUIJEN, G. N., ADEMA, G. J. & RUITER, D. J. 2004. Presence and localization of T-cell subsets in relation to melanocyte differentiation antigen expression and tumour regression as assessed by immunohistochemistry and molecular analysis of microdissected T cells. *J Pathol*, 202, 70-9.
- BLAND, J. M. & ALTMAN, D. G. 1986. STATISTICAL METHODS FOR ASSESSING AGREEMENT BETWEEN TWO METHODS OF CLINICAL MEASUREMENT. *Lancet*, 327, 307-310.

- BÖCKER, W., HÖFLER, H. K., KLEIHUES, P., DENK, H. & HEITZ, P. U. 2001. Allgemeine Tumorpathologie. *Pathologie*. 2. Auflage ed. Jena: Urban & Fischer Verlag München.
- BONI, R., DOGUOGLU, A., BURG, G., MULLER, B. & DUMMER, R. 1996. MIB-1 immunoreactivity correlates with metastatic dissemination in primary thick cutaneous melanoma. *J Am Acad Dermatol*, 35, 416-8.
- BOUVIER-LABIT, C., CIVATTE, M., BARTOLI, C., RENAUD, W., PELLISSIER, J. F. & FIGARELLA-BRANGER, D. 1999. p16INK4a and p19INK4d mRNA expression in neuroglial tumours: correlation with Ki67 proliferation index. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 25, 408-16.
- BRATTON, S. B. & COHEN, G. M. 2001. Apoptotic death sensor: an organelle's alter ego? *Trends Pharmacol Sci*, 22, 306-15.
- BRAUMULLER, H., WIEDER, T., BRENNER, E., ASSMANN, S., HAHN, M., ALKHALED, M., SCHILBACH, K., ESSMANN, F., KNEILLING, M., GRIESSINGER, C., RANTA, F., ULLRICH, S., MOCIKAT, R., BRAUNGART, K., MEHRA, T., FEHRENBACHER, B., BERDEL, J., NIESSNER, H., MEIER, F., VAN DEN BROEK, M., HARING, H. U., HANDGRETINGER, R., QUINTANILLA-MARTINEZ, L., FEND, F., PESIC, M., BAUER, J., ZENDER, L., SCHALLER, M., SCHULZE-OSTHOFF, K. & ROCKEN, M. 2013. T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence. *Nature*, 494, 361-5.
- BURNET, M. 1957. Cancer; a biological approach. I. The processes of control. *Br Med J*, 1, 779-86.
- CHANDLER, H. & PETERS, G. 2013. Stressing the cell cycle in senescence and aging. *Curr Opin Cell Biol*, 25, 765-71.
- CHAPMAN, P. B., HAUSCHILD, A., ROBERT, C., HAANEN, J. B., ASCIERTO, P., LARKIN, J., DUMMER, R., GARBE, C., TESTORI, A., MAIO, M., HOGG, D., LORIGAN, P., LEBBE, C., JOUARY, T., SCHADENDORF, D., RIBAS, A., O'DAY, S. J., SOSMAN, J. A., KIRKWOOD, J. M., EGGERMONT, A. M., DRENO, B., NOLOP, K., LI, J., NELSON, B., HOU, J., LEE, R. J., FLAHERTY, K. T. & MCARTHUR, G. A. 2011. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med*, 364, 2507-16.
- CURRAN, M. A., MONTALVO, W., YAGITA, H. & ALLISON, J. P. 2010. PD-1 and CTLA-4 combination blockade expands infiltrating T cells and reduces regulatory T and myeloid cells within B16 melanoma tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 4275-80.
- DOBROWOLSKI, R., HEIN, R., BUETTNER, R. & BOSSERHOFF, A. K. 2002. Loss of p14ARF expression in melanoma. *Arch Dermatol Res*, 293, 545-51.
- DONOGHUE, S., BADEN, H. S., LAUDER, I., SOBOLEWSKI, S. & PRINGLE, J. H. 1999. Immunohistochemical localization of caspase-3 correlates with clinical outcome in B-cell diffuse large-cell lymphoma. *Cancer Res*, 59, 5386-91.
- DRAGHICIU, O., LUBBERS, J., NIJMAN, H. W. & DAEMEN, T. 2015. Myeloid derived suppressor cells-An overview of combat strategies to increase immunotherapy efficacy. *Oncoimmunology*, 4, e954829.

- DUDLEY, M. E., GROSS, C. A., LANGHAN, M. M., GARCIA, M. R., SHERRY, R. M., YANG, J. C., PHAN, G. Q., KAMMULA, U. S., HUGHES, M. S., CITRIN, D. E., RESTIFO, N. P., WUNDERLICH, J. R., PRIETO, P. A., HONG, J. J., LANGAN, R. C., ZLOTT, D. A., MORTON, K. E., WHITE, D. E., LAURENCOT, C. M. & ROSENBERG, S. A. 2010. CD8+ enriched "young" tumor infiltrating lymphocytes can mediate regression of metastatic melanoma. *Clin Cancer Res*, 16, 6122-31.
- DUNN, G. P., BRUCE, A. T., IKEDA, H., OLD, L. J. & SCHREIBER, R. D. 2002. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*, 3, 991-8.
- EGETER, O., MOCIKAT, R., GHORESCHI, K., DIECKMANN, A. & ROCKEN, M. 2000. Eradication of disseminated lymphomas with CpG-DNA activated T helper type 1 cells from nontransgenic mice. *Cancer Res*, 60, 1515-20.
- EMANUEL, P. O., MANNION, M. & PHELPS, R. G. 2008. Complete regression of primary malignant melanoma. *Am J Dermatopathol*, 30, 178-81.
- FAURI, J., RICARDI, F., DIEHL, E., CARTELL, A., FURIAN, R., BAKOS, L. & EDELWEISS, M. 2011. P16 protein expression in primary cutaneous melanoma with positive and negative lymph node biopsies: Particular aspects of a study performed at the Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Brazil. *Can J Plast Surg*, 19, 77-81.
- FLAHERTY, K. T., INFANTE, J. R., DAUD, A., GONZALEZ, R., KEFFORD, R. F., SOSMAN, J., HAMID, O., SCHUCHTER, L., CEBON, J., IBRAHIM, N., KUDCHADKAR, R., BURRIS, H. A., 3RD, FALCHOOK, G., ALGAZI, A., LEWIS, K., LONG, G. V., PUZANOV, I., LEBOWITZ, P., SINGH, A., LITTLE, S., SUN, P., ALLRED, A., OUELLET, D., KIM, K. B., PATEL, K. & WEBER, J. 2012. Combined BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAF V600 mutations. *N Engl J Med*, 367, 1694-703.
- GARBE, C. & BAUER, J. 2012. Melanoma. *Dermatology*. Third edition ed.: Elsevier Saunders.
- GARBE, C. & BLUM, A. 2001. Epidemiology of cutaneous melanoma in Germany and worldwide. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*, 14, 280-90.
- GARBE, C., EIGENTLER, T. & LEITER, U. 2013. Epidemiologie. In: AWMF, DEUTSCHE KREBSGESELLSCHAFT E.V. & E.V., D. K. (eds.) *S3 Leitlinie "Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms"*. AWMF, Deutsche Krebsgesellschaft e.V., Deutsche Krebshilfe e.V.
- GARBE, C., HAUSCHILD, A., VOLKENANDT, M., SCHADENDORF, D., STOLZ, W., REINHOLD, U., KORTMANN, R.-D., KETTELHACK, C., FRERICH, B., KEILHOLZ, U., DUMMER, R., SEBASTIAN, G., TILGEN, W., SCHULER, G., MACKENSEN, A. & KAUFMANN, R. 2005. Deutsche Leitlinie: Malignes Melanom. In: KREBSGESELLSCHAFT, D. (ed.).
- GARBE, C., PERIS, K., HAUSCHILD, A., SAIAG, P., MIDDLETON, M., SPATZ, A., GROB, J., MALVEHY, J., NEWTON-BISHOP, J., STRATIGOS, A.,

- PEHAMBERGER, H. & EGGERMONT, A. M. 2012. Diagnosis and treatment of melanoma. European consensus-based interdisciplinary guideline – Update 2012. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 48, 2375-2390.
- GARRAWAY, L. A., WIDLUND, H. R., RUBIN, M. A., GETZ, G., BERGER, A. J., RAMASWAMY, S., BEROUKHIM, R., MILNER, D. A., GRANTER, S. R., DU, J., LEE, C., WAGNER, S. N., LI, C., GOLUB, T. R., RIMM, D. L., MEYERSON, M. L., FISHER, D. E. & SELLERS, W. R. 2005. Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature*, 436, 117-22.
- GERADTS, J., WILENTZ, R. E. & ROBERTS, H. 2001. Immunohistochemical Detection of the Alternate INK4a-Encoded Tumor Suppressor Protein p14ARF in Archival Human Cancers and Cell Lines Using Commercial Antibodies: Correlation with p16INK4a Expression. *Mod Pathol*, 14, 1162-1168.
- GERDES, J., SCHWAB, U., LEMKE, H. & STEIN, H. 1983. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer*, 31, 13-20.
- GIMOTTY, P. A., VAN BELLE, P., ELDER, D. E., MURRY, T., MONTONE, K. T., XU, X., HOTZ, S., RAINES, S., MING, M. E., WAHL, P. & GUERRY, D. 2005. Biologic and prognostic significance of dermal Ki67 expression, mitoses, and tumorigenicity in thin invasive cutaneous melanoma. *J Clin Oncol*, 23, 8048-56.
- GIULIANO, S., OHANNA, M., BALLOTTI, R. & BERTOLOTTO, C. 2011. Advances in melanoma senescence and potential clinical application. *Pigment Cell Melanoma Res*, 24, 295-308.
- GRAY-SCHOPFER, V. C., CHEONG, S. C., CHONG, H., CHOW, J., MOSS, T., ABDEL-MALEK, Z. A., MARAIS, R., WYNFORD-THOMAS, D. & BENNETT, D. C. 2006. Cellular senescence in naevi and immortalisation in melanoma: a role for p16? *Br J Cancer*, 95, 496-505.
- GREENBLATT, M. S., BENNETT, W. P., HOLLSTEIN, M. & HARRIS, C. C. 1994. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res*, 54, 4855-78.
- GUTCHER, I. & BECHER, B. 2007. APC-derived cytokines and T cell polarization in autoimmune inflammation. *J Clin Invest*, 117, 1119-27.
- HADJILOUCAS, I., GILMORE, A. P., BUNDRED, N. & STREULI, C. H. 2001. Assessment of apoptosis in human breast tissue using an antibody against the active form of caspase 3: relation to tumour histopathological characteristics. *British Journal of Cancer*, 85, 1522-1526.
- HANAHAH, D. & WEINBERG, R. A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144, 646-74.
- HAUSCHILD, A., AGARWALA, S. S., TREFZER, U., HOGG, D., ROBERT, C., HERSEY, P., EGGERMONT, A., GRABBE, S., GONZALEZ, R., GILLE, J., PESCHEL, C., SCHADENDORF, D., GARBE, C., O'DAY, S., DAUD, A., WHITE, J. M., XIA, C., PATEL, K., KIRKWOOD, J. M. & KEILHOLZ, U. 2009.

- Results of a phase III, randomized, placebo-controlled study of sorafenib in combination with carboplatin and paclitaxel as second-line treatment in patients with unresectable stage III or stage IV melanoma. *J Clin Oncol*, 27, 2823-30.
- HAZAN, C., MELZER, K., PANAGEAS, K. S., LI, E., KAMINO, H., KOPF, A., CORDON-CARDO, C., OSMAN, I. & POLSKY, D. 2002. Evaluation of the proliferation marker MIB-1 in the prognosis of cutaneous malignant melanoma. *Cancer*, 95, 634-40.
- HELD, L., EIGENTLER, T. K., MEIER, F., HELD, M., ROCKEN, M., GARBE, C. & BAUER, J. 2011. Oncogenetics of melanoma: basis for molecular diagnostics and therapy. *J Dtsch Dermatol Ges*, 9, 510-6.
- HERNBERG, M. M., HAHKA-KEMPPINEN, M. H. & PYRHONEN, S. O. 2004. The prognostic role of CD4+ and CD8+ lymphocytes during chemoimmunotherapy in metastatic melanoma. *Melanoma Res*, 14, 493-500.
- HOUBEN, R., HESBACHER, S., SCHMID, C. P., KAUCZOK, C. S., FLOHR, U., HAFERKAMP, S., MULLER, C. S. L., SCHRAMA, D., WISCHHUSEN, J. & BECKER, J. C. 2011. High-Level Expression of Wild-Type p53 in Melanoma Cells is Frequently Associated with Inactivity in p53 Reporter Gene Assays. *Plos One*, 6.
- JIANG, H. & CHESS, L. 2004. An integrated view of suppressor T cell subsets in immunoregulation. *J Clin Invest*, 114, 1198-208.
- JONGES, L. E., NAGELKERKE, J. F., ENSINK, N. G., VAN DER VELDE, E. A., TOLLENAAR, R. A. E. M., FLEUREN, G. J., VAN DE VELDE, C. J. H., MORREAU, H. & KUPPEN, P. J. K. 2001. Caspase-3 activity as a prognostic factor in colorectal carcinoma. *Laboratory Investigation*, 81, 681-688.
- KATOH, H. & WATANABE, M. 2015. Myeloid-Derived Suppressor Cells and Therapeutic Strategies in Cancer. *Mediators Inflamm*, 2015, 159269.
- KAUR, C., THOMAS, R. J., DESAI, N., GREEN, M. A., LOVELL, D., POWELL, B. W. & COOK, M. G. 2008. The correlation of regression in primary melanoma with sentinel lymph node status. *J Clin Pathol*, 61, 297-300.
- KELLER-MELCHIOR, R., SCHMIDT, R. & PIEPKORN, M. 1998. Expression of the tumor suppressor gene product p16INK4 in benign and malignant melanocytic lesions. *J Invest Dermatol*, 110, 932-8.
- KONG, Y., CUI, H., RAMKUMAR, C. & ZHANG, H. 2011. Regulation of senescence in cancer and aging. *J Aging Res*, 2011, 963172.
- KURZ, D. J., DECARY, S., HONG, Y. & ERUSALIMSKY, J. D. 2000. Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci*, 113 (Pt 20), 3613-22.
- LANE, D. P. 1992. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*, 358, 15-6.
- LARKIN, J., CHIARION-SILENI, V., GONZALEZ, R., GROB, J. J., COWEY, C. L., LAO, C. D., SCHADENDORF, D., DUMMER, R., SMYLIE, M., RUTKOWSKI, P., FERRUCCI, P. F., HILL, A., WAGSTAFF, J., CARLINO, M. S., HAANEN, J. B., MAIO, M., MARQUEZ-RODAS, I., MCARTHUR, G. A., ASCIERTO, P. A., LONG, G. V., CALLAHAN, M. K., POSTOW, M. A., GROSSMANN, K.,

- SZNOL, M., DRENO, B., BASTHOLT, L., YANG, A., ROLLIN, L. M., HORAK, C., HODI, F. S. & WOLCHOK, J. D. 2015. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N Engl J Med*, 373, 23-34.
- LIU, Y. R., SUN, B., ZHAO, X. L., GU, Q., LIU, Z. Y., DONG, X. Y., CHE, N. & MO, J. 2013. Basal caspase-3 activity promotes migration, invasion, and vasculogenic mimicry formation of melanoma cells. *Melanoma Res*, 23, 243-53.
- MARKS, N., BERG, M. J., GUIDOTTI, A. & SAITO, M. 1998. Activation of caspase-3 and apoptosis in cerebellar granule cells. *J Neurosci Res*, 52, 334-41.
- MICHALOGLOU, C., VREDEVELD, L. C., SOENGAS, M. S., DENOYELLE, C., KUILMAN, T., VAN DER HORST, C. M., MAJLOOR, D. M., SHAY, J. W., MOOI, W. J. & PEEPER, D. S. 2005. BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature*, 436, 720-4.
- MOCIKAT, R., BRAUMULLER, H., GUMY, A., EGETER, O., ZIEGLER, H., REUSCH, U., BUBECK, A., LOUIS, J., MAILHAMMER, R., RIETHMULLER, G., KOSZINOWSKI, U. & ROCKEN, M. 2003. Natural killer cells activated by MHC class I(low) targets prime dendritic cells to induce protective CD8 T cell responses. *Immunity*, 19, 561-9.
- MUELLER, D. W. & BOSSERHOFF, A. K. 2009. Role of miRNAs in the progression of malignant melanoma. *Br J Cancer*, 101, 551-6.
- MUHONEN, T., HAHKA-KEMPPINEN, M., PAKKALA, S. & PYRHONEN, S. 1994. Decreasing CD4/CD8 ratio during prolonged four-drug chemotherapy plus interferon treatment for metastatic melanoma. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol*, 15, 67-73.
- MULLER-HERMELINK, N., BRAUMULLER, H., PICHLER, B., WIEDER, T., MAILHAMMER, R., SCHAACK, K., GHORESCHI, K., YAZDI, A., HAUBNER, R., SANDER, C. A., MOCIKAT, R., SCHWAIGER, M., FORSTER, I., HUSS, R., WEBER, W. A., KNEILLING, M. & ROCKEN, M. 2008. TNFR1 signaling and IFN-gamma signaling determine whether T cells induce tumor dormancy or promote multistage carcinogenesis. *Cancer Cell*, 13, 507-18.
- NICHOLSON, D. W. 2001. Apoptosis: Baiting death inhibitors. *Nature*, 410, 33-34.
- NISSAN, M. H., PRATILAS, C. A., JONES, A. M., RAMIREZ, R., WON, H., LIU, C., TIWARI, S., KONG, L., HANRAHAN, A. J., YAO, Z., MERGHOUB, T., RIBAS, A., CHAPMAN, P. B., YAEGER, R., TAYLOR, B. S., SCHULTZ, N., BERGER, M. F., ROSEN, N. & SOLIT, D. B. 2014. Loss of NF1 in cutaneous melanoma is associated with RAS activation and MEK dependence. *Cancer Res*, 74, 2340-50.
- OMURA-MINAMISAWA, M., DICCIANNI, M. B., CHANG, R. C., BATOVA, A., BRIDGEMAN, L. J., SCHIFF, J., COHN, S. L., LONDON, W. B. & YU, A. L. 2001. p16/p14(ARF) cell cycle regulatory pathways in primary neuroblastoma: p16 expression is associated with advanced stage disease. *Clin Cancer Res*, 7, 3481-90.
- PORTER, A. G. & JANICKE, R. U. 1999. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ*, 6, 99-104.

- R-DEVELOPMENT-CORE-TEAM 2008. R: A Language and Environment for Statistical Computing.
- RAMSAY, J. A., FROM, L., ISCOE, N. A. & KAHN, H. J. 1995. MIB-1 proliferative activity is a significant prognostic factor in primary thick cutaneous melanomas. *J Invest Dermatol*, 105, 22-6.
- REGAD, T. 2013. Molecular and cellular pathogenesis of melanoma initiation and progression. *Cell Mol Life Sci*.
- RIBERO, S., GUALANO, M. R., OSELLA-ABATE, S., SCAIOLI, G., BERT, F., SANLORENZO, M., BALAGNA, E., FIERRO, M. T., MACRIPO, G., SAPINO, A., SILIQUINI, R. & QUAGLINO, P. 2015. Association of Histologic Regression in Primary Melanoma With Sentinel Lymph Node Status: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Dermatol*, 151, 1301-1307.
- RIBERO, S., OSELLA-ABATE, S., SANLORENZO, M., SAVOIA, P., ASTRUA, C., CAVALIERE, G., TOMASINI, C., SENETTA, R., MACRIPO, G., BERNENGO, M. G. & QUAGLINO, P. 2013. Favourable prognostic role of regression of primary melanoma in AJCC stage I-II patients. *Br J Dermatol*, 169, 1240-5.
- ROBERT, C. & GHIRINGHELLI, F. 2009. What is the role of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma? *Oncologist*, 14, 848-61.
- ROBERT, C., SCHACHTER, J., LONG, G. V., ARANCE, A., GROB, J. J., MORTIER, L., DAUD, A., CARLINO, M. S., MCNEIL, C., LOTEM, M., LARKIN, J., LORIGAN, P., NEYNS, B., BLANK, C. U., HAMID, O., MATEUS, C., SHAPIRA-FROMMER, R., KOSH, M., ZHOU, H., IBRAHIM, N., EBBINGHAUS, S. & RIBAS, A. 2015. Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med*, 372, 2521-32.
- ROBERT, C., THOMAS, L., BONDARENKO, I., O'DAY, S., M, D. J., GARBE, C., LEBBE, C., BAURAIN, J. F., TESTORI, A., GROB, J. J., DAVIDSON, N., RICHARDS, J., MAIO, M., HAUSCHILD, A., MILLER, W. H., JR., GASCON, P., LOTEM, M., HARMANKAYA, K., IBRAHIM, R., FRANCIS, S., CHEN, T. T., HUMPHREY, R., HOOS, A. & WOLCHOK, J. D. 2011. Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N Engl J Med*, 364, 2517-26.
- ROBINSON, D. R., WU, Y. M., LONIGRO, R. J., VATS, P., COBAIN, E., EVERETT, J., CAO, X., RABBAN, E., KUMAR-SINHA, C., RAYMOND, V., SCHUETZE, S., ALVA, A., SIDDIQUI, J., CHUGH, R., WORDEN, F., ZALUPSKI, M. M., INNIS, J., MODY, R. J., TOMLINS, S. A., LUCAS, D., BAKER, L. H., RAMNATH, N., SCHOTT, A. F., HAYES, D. F., VIJAI, J., OFFIT, K., STOFFEL, E. M., ROBERTS, J. S., SMITH, D. C., KUNJU, L. P., TALPAZ, M., CIESLIK, M. & CHINNAIYAN, A. M. 2017. Integrative clinical genomics of metastatic cancer. *Nature*, 548, 297-303.
- ROCKEN, M. 2010. Early tumor dissemination, but late metastasis: insights into tumor dormancy. *J Clin Invest*, 120, 1800-3.
- RÖCKEN, M., SCHALLER, M., SATTLER, E. & BURGDORF, W. C. 2010. *Taschenatlas Dermatologie*, Thieme Georg Verlag.

- SCHWARTZENTRUBER, D. J., LAWSON, D. H., RICHARDS, J. M., CONRY, R. M., MILLER, D. M., TREISMAN, J., GAILANI, F., RILEY, L., CONLON, K., POCKAJ, B., KENDRA, K. L., WHITE, R. L., GONZALEZ, R., KUZEL, T. M., CURTI, B., LEMING, P. D., WHITMAN, E. D., BALKISSOON, J., REINTGEN, D. S., KAUFMAN, H., MARINCOLA, F. M., MERINO, M. J., ROSENBERG, S. A., CHOYKE, P., VENA, D. & HWU, P. 2011. gp100 peptide vaccine and interleukin-2 in patients with advanced melanoma. *N Engl J Med*, 364, 2119-27.
- SCOPE, A., DUSZA, S. W., HALPERN, A. C., RABINOVITZ, H., BRAUN, R. P., ZALAUDEK, I., ARGENZIANO, G. & MARGHOOB, A. A. 2008. The "ugly duckling" sign: agreement between observers. *Arch Dermatol*, 144, 58-64.
- SHANG, B., LIU, Y., JIANG, S. J. & LIU, Y. 2015. Prognostic value of tumor-infiltrating FoxP3(+) regulatory T cells in cancers: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*, 5, 15179.
- SHERR, C. J. 2004. Principles of tumor suppression. *Cell*, 116, 235-46.
- SIRIGU, P., PIRAS, F., MINERBA, L., MURTAS, D., MAXIA, C., COLOMBARI, R., CORBU, A., PERRA, M. T. & UGALDE, J. 2006. Prognostic prediction of the immunohistochemical expression of p16 and p53 in cutaneous melanoma: a comparison of two populations from different geographical regions. *Eur J Histochem*, 50, 191-8.
- SOYER, H. P., ARGENZIANO, G., RAINER HOFMANN-WELLENHOF, R. & JOHR, R. H. 2007. Melanoma of the Trunk and Limbs Including Superficial and Nodular Melanoma. *In*: SOYER, H. P., ARGENZIANO, G., HOFMANN-WELLENHOF, R. & JOHR, R. H. (eds.) *Color Atlas of Melanocytic Lesions of the Skin*. Springer Berlin Heidelberg.
- SPARROW, L. E., ENGLISH, D. R., TARAN, J. M. & HEENAN, P. J. 1998. Prognostic significance of MIB-1 proliferative activity in thin melanomas and immunohistochemical analysis of MIB-1 proliferative activity in melanocytic tumors. *Am J Dermatopathol*, 20, 12-6.
- STOTT, F. J., BATES, S., JAMES, M. C., MCCONNELL, B. B., STARBORG, M., BROOKES, S., PALMERO, I., RYAN, K., HARA, E., VOUSDEN, K. H. & PETERS, G. 1998. The alternative product from the human CDKN2A locus, p14ARF, participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. *EMBO J*, 17, 5001-5014.
- STRAUME, O., SVILAND, L. & AKSLEN, L. A. 2000. Loss of nuclear p16 protein expression correlates with increased tumor cell proliferation (Ki-67) and poor prognosis in patients with vertical growth phase melanoma. *Clin Cancer Res*, 6, 1845-53.
- STRICKER, T. P. & KUMAR, V. 2007. Neoplasia *Robins Basic Pathology*. 8th ed. Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier.
- TALVE, L., SAUROJA, I., COLLAN, Y., PUNNONEN, K. & EKFORSS, T. 1997. Loss of expression of the p16INK4/CDKN2 gene in cutaneous malignant melanoma correlates with tumor cell proliferation and invasive stage. *Int J Cancer*, 74, 255-9.

- TRONNIER, M., GARBE, C., BRÖCKER, E.-B., STADLER, R., STEINKRAUS, V., SOYER, H. P. & WOLFF, H. H. 1997. Standards der histo- pathologischen Diagnose maligner Melanome Empfehlungen der Arbeitsgruppe des Zentralregisters Malignes Melanom der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft. *Der Hautarzt*, 48, 720-729.
- TRONNIER, M., SEMKOVA, K., WOLLINA, U. & TCHERNEV, G. 2013. Malignant melanoma: epidemiologic aspects, diagnostic and therapeutic approach. *Wien Med Wochenschr.*
- TSAO, H., MIHM, M. C., JR. & SHEEHAN, C. 2003. PTEN expression in normal skin, acquired melanocytic nevi, and cutaneous melanoma. *J Am Acad Dermatol*, 49, 865-72.
- VAKKALA, M., PAAKKO, P. & SOINI, Y. 1999. Expression of caspases 3, 6 and 8 is increased in parallel with apoptosis and histological aggressiveness of the breast lesion. *British Journal of Cancer*, 81, 592-599.
- WAHLIN, B. E., SANDER, B., CHRISTENSSON, B., OSTENSTAD, B., HOLTE, H., BROWN, P. D., SUNDSTROM, C. & KIMBY, E. 2012. Entourage: the immune microenvironment following follicular lymphoma. *Blood Cancer J*, 2, e52.
- WANG, J. L., ZHENG, B. Y., LI, X. D., ANGSTROM, T., LINDSTROM, M. S. & WALLIN, K. L. 2004. Predictive significance of the alterations of p16INK4A, p14ARF, p53, and proliferating cell nuclear antigen expression in the progression of cervical cancer. *Clin Cancer Res*, 10, 2407-14.
- WEISCHER, M., HEERFORDT, I. M., BOJESEN, S. E., EIGENTLER, T., GARBE, C., ROCKEN, M., HOLMICH, L. R., SCHMIDT, H., KLYVER, H., BASTHOLT, L. & NORDESTGAARD, B. G. 2012. CHEK2*1100delC and risk of malignant melanoma: Danish and German studies and meta-analysis. *J Invest Dermatol*, 132, 299-303.
- WEISS, J., SCHWECHHEIMER, K., CAVENEE, W. K., HERLYN, M. & ARDEN, K. C. 1993. Mutation and expression of the p53 gene in malignant melanoma cell lines. *Int J Cancer*, 54, 693-9.
- WOENCKHAUS, C., GIEBEL, J., FAILING, K., FENIC, I., DITTBERNER, T. & POETSCH, M. 2003. Expression of AP-2alpha, c-kit, and cleaved caspase-6 and -3 in naevi and malignant melanomas of the skin. A possible role for caspases in melanoma progression? *J Pathol*, 201, 278-87.
- WOLCHOK, J. D., KLUGER, H., CALLAHAN, M. K., POSTOW, M. A., RIZVI, N. A., LESOKHIN, A. M., SEGAL, N. H., ARIYAN, C. E., GORDON, R. A., REED, K., BURKE, M. M., CALDWELL, A., KRONENBERG, S. A., AGUNWAMBA, B. U., ZHANG, X., LOWY, I., INZUNZA, H. D., FEELY, W., HORAK, C. E., HONG, Q., KORMAN, A. J., WIGGINTON, J. M., GUPTA, A. & SZNOL, M. 2013. Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med*, 369, 122-33.
- WOLF, D., SOPPER, S., PIRCHER, A., GASTL, G. & WOLF, A. M. 2015. Treg(s) in Cancer: Friends or Foe? *J Cell Physiol*, 230, 2598-605.
- YAZDI, A. S., MORSTEDT, K., PUCHTA, U., GHORESCHI, K., FLAIG, M. J., ROCKEN, M. & SANDER, C. A. Heterogeneity of T-Cell Clones Infiltrating

- Primary Malignant Melanomas. *Journal of Investigative Dermatology*, 126, 393-398.
- YAZDI, A. S., MORSTEDT, K., PUCHTA, U., GHORESCHI, K., FLAIG, M. J., ROCKEN, M. & SANDER, C. A. 2006. Heterogeneity of T-cell clones infiltrating primary malignant melanomas. *J Invest Dermatol*, 126, 393-8.
- YOU, J., ZHUANG, L., ZHANG, Y. F., CHEN, H. Y., SRIPLUNG, H., GEATER, A., CHONGSUVIVATWONG, V., PIRATVISUTH, T., MCNEIL, E., YU, L., TANG, B. Z. & HUANG, J. H. 2009. Peripheral T-lymphocyte subpopulations in different clinical stages of chronic HBV infection correlate with HBV load. *World J Gastroenterol*, 15, 3382-93.
- YOUNG, R. F. 1998. Radiosurgery for the treatment of brain metastases. *Semin Surg Oncol*, 14, 70-8.
- ZIEGLER, A., HEIDENREICH, R., BRAUMULLER, H., WOLBURG, H., WEIDEMANN, S., MOCIKAT, R. & ROCKEN, M. 2009. EpCAM, a human tumor-associated antigen promotes Th2 development and tumor immune evasion. *Blood*, 113, 3494-502.
- ZUGNA, D., SENETTA, R., OSELLA-ABATE, S., FIERRO, M. T., PISACANE, A., ZACCAGNA, A., SAPINO, A., BATAILLE, V., MAURICHI, A., PICCIOTTO, F., CASSONI, P., QUAGLINO, P. & RIBERO, S. 2018. Favourable prognostic role of histological regression in stage III positive sentinel lymph node melanoma patients. *Br J Cancer*, 118, 398-404.

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Beispiel einer als negativ gewerteten CD8 Färbung eines SSM-ohne-Reg (459/92)	35
Abbildung 2: Beispiel einer als positiv gewerteten CD8 Färbung eines SSM-mit-Reg (17546/07)	35
Abbildung 3: Beispiel einer als negativ gewerteten CD4 Färbung eines SSM-mit-Reg (23528/07)	36
Abbildung 4: Beispiel einer als positiv gewerteten CD4 Färbung eines SSM-ohne-Reg (563/06)	36
Abbildung 5: MIB-1 Färbung pro Fall	42
Abbildung 6: Boxplot der MIB-1 Färbung.....	44
Abbildung 7: p53 Färbung pro Fall.....	46
Abbildung 8: Boxplot der p53 Färbung.....	47
Abbildung 9: Caspase-3 Färbungen pro Fall.....	48
Abbildung 10: Boxplot der Caspase-3 Färbung	50
Abbildung 11: p16INK4a Färbung pro Fall.....	51
Abbildung 12: Boxplot der p16INKa Färbung.....	53
Abbildung 13: p14ARF Färbung pro Fall.....	54
Abbildung 14: Boxplot der p14ARF Färbung.....	55
Abbildung 15: p16INK4a und p14ARF Färbungen im Vergleich	57
Abbildung 16: Bland-Altman Diagramm zu den p14ARF und p16INK4a Färbungen (alle Gruppen), KI: 0,82 und -1,02	58
Abbildung 17: Boxplot zu p16INK4a und p14ARF im Vergleich in Bezug auf alle Gruppen.....	59
Abbildung 18: Bland-Altman Diagramm zu den p14ARF und p16INK4a Färbungen in Bezug auf die SSM-ohne-Reg, KI: 1,07 und -1,27	60
Abbildung 19: Boxplot zu p16INK4a und p14ARF im Vergleich in Bezug auf die SSM-ohne-Reg	61

Abbildung 20: Bland-Altman Diagramm zu p14ARF und p16INK4a Färbungen in Bezug auf die SSM-mit-Reg, KI: 0,57 und -0,78.....	62
Abbildung 21: Boxplot zu p16INK4a und p14ARF im Vergleich in Bezug auf die SSM-mit-Reg.....	63
Abbildung 22: Bland-Altman Diagramm zu p14ARF und p16INK4a Färbungen in Bezug auf die Halonävi, KI: 1,05 und -1,04.....	64
Abbildung 23: Boxplot zu p16INK4a und p14ARF im Vergleich in Bezug auf die Halonävi.....	65
Abbildung 24: CD8 und CD4 Färbungen pro Fall im Vergleich.....	67
Abbildung 25: Boxplot der CD8 Färbung.....	69
Abbildung 26: Boxplot der CD4 Färbung.....	70
Abbildung 27: Bland-Altman Diagramm zu den CD4 und CD8 Färbungen (alle Gruppen), KI: 0,58 und -0,16.....	72
Abbildung 28: Boxplot zu CD4 und CD8 im Vergleich in Bezug auf alle Gruppen .	72
Abbildung 29: Bland-Altman Diagramm zu den CD4 und CD8 Färbungen in Bezug auf die SSM-ohne-Reg, KI: 0,64 und -0,1.....	73
Abbildung 30: Boxplot zu CD4 und CD8 im Vergleich in Bezug auf die SSM-ohne-Reg.....	74
Abbildung 31: Bland-Altman Diagramm zu den CD4 und CD8 Färbungen in Bezug auf die SSM-mit-Reg, KI: 0,48 und -0,16.....	75
Abbildung 32: Boxplot zu CD4 und CD8 im Vergleich in Bezug auf die SSM-mit-Reg.....	76
Abbildung 33: Bland-Altman Diagramm zu den CD4 und CD8 Färbungen in Bezug auf die Halonävi, KI: 0,65 und -0,27.....	77
Abbildung 34: Boxplot zu CD4 und CD8 im Vergleich in Bezug auf die Halonävi...	77
Abbildung 35: CD4 und CD8 Färbung dargestellt als CD4/CD8-Quotient pro Fall.	79
Abbildung 36: Boxplot des CD4/CD8-Quotienten	80
Abbildung 37: p16INK4a und CD4 Färbungen pro Fall im Vergleich	82
Abbildung 38: Bland-Altman Diagramm zu den p16INK4a und CD4 Färbungen (alle), KI: 0,9 und -0,52.....	83

Abbildung 39: Boxplot zu CD4 und p16INK4a im Vergleich in Bezug auf alle Gruppen.....	84
Abbildung 40: Bland-Altman Diagramm zu den p16INK4a und CD4 Färbungen in Bezug auf die SSM-ohne-Reg, KI: 0,86 und -0,6.....	85
Abbildung 41: Boxplot zu CD4 und p16INK4a im Vergleich in Bezug auf die SSM-ohne-Reg	86
Abbildung 42: Bland-Altman Diagramm zu den p16INK4a und CD4 Färbungen in Bezug auf die SSM-mit-Reg, KI: 0,87 und -0,39.....	87
Abbildung 43: Boxplot zu CD4 und p16INK4a im Vergleich in Bezug auf die SSM-mit-Reg.....	87
Abbildung 44: Bland-Altman Diagramm zu den p16INK4a und CD4 Färbungen in Bezug auf die Halonävi, KI: 1,09 und -0,68.....	88
Abbildung 45: Boxplot zu CD4 und p16INK4a im Vergleich in Bezug auf die Halonävi.....	89
Abbildung 46: Korrelation von p16INK4a zu MIB-1 in Bezug auf alle Gruppen (Halonävi, SSM-mit-Reg, SSM-ohne-Reg).....	91
Abbildung 47: Korrelation von p16INK4a zu MIB-1 in Bezug auf die SSM-ohne-Reg	92
Abbildung 48: Korrelation von p16INK4a zu MIB-1 in Bezug auf die SSM-mit-Reg	93
Abbildung 49: Korrelation von p16INK4a zu MIB-1 in Bezug auf die Halonävi	93
Abbildung 50: Korrelation von p14ARF zu MIB-1 in Bezug auf alle Gruppen (Halonävi, SSM-mit-Reg, SSM-ohne-Reg).....	95
Abbildung 51: Korrelation von p14ARF zu MIB-1 in Bezug auf die SSM-ohne-Reg	96
Abbildung 52: Korrelation von p14ARF zu MIB-1 in Bezug auf die SSM-mit-Reg..	97
Abbildung 53: Korrelation von p14ARF zu MIB-1 in Bezug auf die Halonävi	97
Abbildung 54: Übersicht aller Antikörper pro Fall (SSM-ohne-Reg)	99
Abbildung 55: Übersicht aller Antikörper pro Fall (SSM-mit-Reg).....	99

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: ABCDE-Regel modifiziert nach (Abbasi et al., 2004).....	5
Tabelle 2: Darstellung der Subtypen des Melanoms im deutschsprachigen Raum mit prozentualem Anteil und medianem Erkrankungsalter modifiziert nach (Garbe et al., 2005).....	7
Tabelle 3: T-Klassifikation des Primärtumors beim Melanom modifiziert nach (Garbe et al., 2013).....	9
Tabelle 4: N-Klassifikation des Primärtumors beim Melanom modifiziert nach (Garbe et al., 2013).....	9
Tabelle 5: M-Klassifikation des Primärtumors beim Melanom modifiziert nach (Garbe et al., 2013).....	10
Tabelle 6: Stadieneinteilung des Melanom gemäß der AJCC-Klassifikation modifiziert nach (Garbe et al., 2013)	11
Tabelle 7: 5-Jahresüberleben in Abhängigkeit des AJCC-Stadiums modifiziert nach (Garbe and Bauer, 2012)	12
Tabelle 8: Sicherheitsabstand bei chirurgischer Exzision in Abhängigkeit von der Tumordicke modifiziert nach (Garbe and Bauer, 2012)	13
Tabelle 9: Auswahl an bisher identifizierten Tumorsuppressorgenen mit Funktion und assoziiertem Tumorsyndrom modifiziert nach (Sherr, 2004).....	18
Tabelle 10: Verwendete Antikörper und ihre Verdünnung.....	28
Tabelle 11: Auflistung der einzelnen Schritte der Immunhistochemischen Färbung	32
Tabelle 12: MIB-1 Färbeskala modifiziert nach (Sparrow et al., 1998).....	33
Tabelle 13: p53 Färbeskala modifiziert nach (Sirigu et al., 2006).....	33
Tabelle 14: Caspase-3 Färbeskala modifiziert nach (Woenckhaus et al., 2003).....	33
Tabelle 15: p16INK4a und p14ARF Färbeskala modifiziert nach (Fauri et al., 2011)	34
Tabelle 16: Skala des CD4/CD8-Quotienten modifiziert nach (You et al., 2009)	34
Tabelle 17: Auflistung der einzelnen Schritte der Hämatoxylin-Eosin Färbung.....	39

Tabelle 18: Auflistung des Medians, IQR (interquartile range=Interquartilsabstand), min-max=Spannweite, des Mittelwertes und dessen Standardabweichung (SD=Standard Deviation) pro Gruppe für die MIB-1 Färbungen.....	43
Tabelle 19: Auflistung des Medians, IQR (interquartile range=Interquartilsabstand), min-max=Spannweite und des Mittelwertes und dessen Standardabweichung (SD=Standard Deviation) pro Gruppe für die p53 Färbungen.....	47
Tabelle 20: Auflistung des Medians, IQR (interquartile range=Interquartilsabstand), min-max=Spannweite und des Mittelwertes und dessen Standardabweichung (SD=Standard Deviation) pro Gruppe für die Caspase-3 Färbungen	49
Tabelle 21: Auflistung des Medians, IQR (interquartile range=Interquartilsabstand), min-max=Spannweite und des Mittelwertes und dessen Standardabweichung (SD=Standard Deviation) pro Gruppe für die p16INKa Färbungen.....	52
Tabelle 22: Auflistung des Medians, IQR (interquartile range=Interquartilsabstand), min-max=Spannweite und des Mittelwertes und dessen Standardabweichung (SD=Standard Deviation) pro Gruppe für die p14ARF Färbungen	55
Tabelle 23: Auflistung des Medians, IQR (interquartile range=Interquartilsabstand), min-max=Spannweite und des Mittelwertes und dessen Standardabweichung (SD=Standard Deviation) für die p14ARF und p16INK4a Färbungen in Bezug auf alle Gruppen.....	58
Tabelle 24: Auflistung des Medians, IQR (interquartile range=Interquartilsabstand), min-max=Spannweite und des Mittelwertes und dessen Standardabweichung (SD=Standard Deviation) für die p14ARF und p16INK4a Färbungen in Bezug auf die SSM-ohne-Reg.....	60
Tabelle 25: Auflistung des Medians, IQR (interquartile range=Interquartilsabstand), min-max=Spannweite und des Mittelwertes und dessen Standardabweichung (SD=Standard Deviation) für die p14ARF und p16INK4a Färbungen in Bezug auf die SSM-mit-Reg.....	62
Tabelle 26: Auflistung des Medians, IQR (interquartile range=Interquartilsabstand), min-max=Spannweite und des Mittelwertes und dessen Standardabweichung (SD=Standard Deviation) für die p14ARF und p16INK4a Färbungen in Bezug auf die Halonävi.....	64
Tabelle 27: Auflistung des Medians, IQR (interquartile range=Interquartilsabstand), min-max=Spannweite und des Mittelwertes und dessen Standardabweichung (SD=Standard Deviation) pro Gruppe für die CD8 Färbungen.....	68
Tabelle 28: Auflistung des Medians, IQR (interquartile range=Interquartilsabstand), min-max=Spannweite und des Mittelwertes und dessen Standardabweichung (SD=Standard Deviation) pro Gruppe für die CD4 Färbungen.....	70

Tabelle 29: Auflistung des Medians, IQR (interquartile range=Interquartilsabstand), min-max=Spannweite und des Mittelwertes und dessen Standardabweichung (SD=Standard Deviation) für die CD4 und CD8 Färbungen in Bezug auf alle Gruppen.....	71
Tabelle 30: Auflistung des Medians, IQR (interquartile range=Interquartilsabstand), min-max=Spannweite und des Mittelwertes und dessen Standardabweichung (SD=Standard Deviation) für die CD4 und CD8 Färbungen in Bezug auf die SSM-ohne-Reg	73
Tabelle 31: Auflistung des Medians, IQR (interquartile range=Interquartilsabstand), min-max=Spannweite und des Mittelwertes und dessen Standardabweichung (SD=Standard Deviation) für die CD4 und CD8 Färbungen in Bezug auf die SSM-mit-Reg.....	75
Tabelle 32: Auflistung des Medians, IQR (interquartile range=Interquartilsabstand), min-max=Spannweite und des Mittelwertes und dessen Standardabweichung (SD=Standard Deviation) für die CD4 und CD8 Färbungen in Bezug auf die Halonävi.....	76
Tabelle 33: Auflistung des Medians, IQR (interquartile range=Interquartilsabstand), min-max=Spannweite und des Mittelwertes und dessen Standardabweichung (SD=Standard Deviation) pro Gruppe für den CD4/CD8-Quotient	80
Tabelle 34: Auflistung des Medians, IQR (interquartile range=Interquartilsabstand), min-max=Spannweite und des Mittelwertes und dessen Standardabweichung (SD=Standard Deviation) für die CD4 und p16INK4a Färbungen in Bezug auf alle Gruppen.....	83
Tabelle 35: Auflistung des Medians, IQR (interquartile range=Interquartilsabstand), min-max=Spannweite und des Mittelwertes und dessen Standardabweichung (SD=Standard Deviation) für die CD4 und p16INK4a Färbungen in Bezug auf die SSM-ohne-Reg.....	85
Tabelle 36: Auflistung des Medians, IQR (interquartile range=Interquartilsabstand), min-max=Spannweite und des Mittelwertes und dessen Standardabweichung (SD=Standard Deviation) für die CD4 und p16INK4a Färbungen in Bezug auf die SSM-mit-Reg.....	86
Tabelle 37: Auflistung des Medians, IQR (interquartile range=Interquartilsabstand), min-max=Spannweite und des Mittelwertes und dessen Standardabweichung (SD=Standard Deviation) für die CD4 und p16INK4a Färbungen in Bezug auf die Halonävi.....	88
Tabelle 38: Auflistung des Medians, IQR (interquartile range=Interquartilsabstand), min-max=Spannweite und des Mittelwertes und dessen Standardabweichung	

(SD=Standard Deviation) für die p16INK4a und MIB-1 Färbungen in Bezug auf alle Gruppen..... 90

Tabelle 39: Auflistung des Medians, IQR (interquartile range=Interquartilsabstand), min-max=Spannweite und des Mittelwertes und dessen Standardabweichung (SD=Standard Deviation) für die p14ARF und MIB-1 Färbungen in Bezug auf alle Gruppen..... 94

10. Danksagung

Sehr herzlich möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. med. M. Röcken, Universitäts-Hautklinik der Eberhard Karls Universität Tübingen für die Überlassung des Themas und für die engagierte Betreuung und Motivation während der Entstehung dieser Arbeit bedanken.

Meinen beiden Betreuern, Professor Dr. med. Jürgen Bauer und Privatdozent Dr. med. Amir Yadzi der Universitäts-Hautklinik der Eberhard Karls Universität Tübingen, danke ich ebenfalls sehr herzlich für ihre tatkräftige Unterstützung bei meiner Dissertation, insbesondere für die engagierte Betreuung, Geduld, Motivation und stetige Hilfsbereitschaft während der gesamten Erstellung dieser Arbeit.

Vielen Dank allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des histologischen Labors für die Hilfsbereitschaft und Zugewandtheit.

Ferner möchte ich mich für die Hilfsbereitschaft und die Expertise von Dr. med. Dipl. Ing. I.G. Steffen bedanken, in dessen Kooperation die Statistik dieser Arbeit entstand.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie für die stetige, uneingeschränkte, liebevolle und vielseitige Begleitung und Motivation während meines Studiums und der Doktorarbeit danken.

11. Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde in der Universitäts-Hautklinik der Eberhard Karls Universität Tübingen unter der Betreuung von Herrn Professor Dr. med. M. Röcken durchgeführt.

Hiermit erkläre ich, Julia Denise Berdel, dass die eingereichte Dissertation mit dem Titel

“Untersuchungen zur Wachstumskontrolle beim Melanom”

selbst verfasst wurde und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt wurden.

Die Konzeption dieser Arbeit erfolgte durch Herrn Professor Dr. med. M. Röcken, Ärztlicher Direktor der Universitäts-Hautklinik der Eberhard Karls Universität Tübingen.

Die Versuche wurden nach Einarbeitung durch die Labormitglieder Betreuern, Professor Dr. med. Jürgen Bauer und Privatdozent Dr. med. Amir Yadzi der Universitäts-Hautklinik der Eberhard Karls Universität Tübingen, von mir eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte in Kooperation mit Dr. med. Dipl. Ing. I.G. Steffen.

Die Arbeit wurde ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst und stellt auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dar.

Berlin, den 23.04.2018

Julia D. Berdel