

Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
Fachbereich Klinische Medizin der Medizinischen Fakultät
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Thomas Vogt
Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

CD28-Autoantikörper als prognostischer Parameter des malignen Melanoms und deren mögliche Auswirkungen auf adjuvante Immuntherapien

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes, 2013

vorgelegt von Darius Matthias Madjidi
geboren am 29.11.1982 in Ulm/Donau

Inhalt

1. Zusammenfassung	3
1.1 Summary.....	3
1.2 Zusammenfassung.....	6
2. Einleitung	9
2.1 Das maligne Melanom	9
2.1.1 Allgemeines.....	9
2.1.2 Epidemiologie des malignen Melanoms.....	10
2.1.3 Ätiologie des malignen Melanoms.....	11
2.1.4 Diagnose des malignen Melanoms.....	11
2.1.5 Therapie des malignen Melanoms.....	12
2.2 Das Cluster of Differentiation 28 Molekül und CD28-Antikörper.....	14
2.3 Interferontherapie des malignen Melanoms	15
2.4 Autoimmunphänomene bei Melanompatienten.....	17
2.5 Ziele und Fragestellung der Arbeit.....	18
3. Material und Methoden	20
3.1 Dokumentation und Quellen.....	20
3.2 Erhobene Daten.....	20
3.3 Klassifikation für das maligne Melanom nach dem AJCC 2002.....	20
3.4 Patientenkollektiv	23
3.5 Kontrollgruppe.....	26
3.6 Etablierung des ELISA zur Detektion von CD28-Antikörpern	27
3.7 Progressfreies Überleben und Gesamtüberleben.....	29
3.8 Beobachtungszeitraum	30
3.9 Statistische Auswertung.....	30
4. Ergebnisse	31
4.1 Allgemeines.....	31
4.2 Gesamtüberleben	33
4.3 Progressfreies Überleben.....	39
4.4 Serokonversion	45
4.5 CD28-Antikörper und Interferontherapie.....	46

4.6 Kontrollgruppen.....	48
5. Diskussion.....	50
6. Anhang.....	56
6.1 Auswertungstabelle.....	56
7. Literaturverzeichnis.....	63
8. Dank.....	69
9. Lebenslauf.....	70

1. Zusammenfassung

1.1 Summary

CD28 autoantibodies as a prognostic parameter of malignant melanoma and their possible significance for adjuvant immunotherapies

In regulation of the immune response, CD28 and CTLA-4 play important roles in the activation of T cells. During the last decade, the search for blocking or activating antibodies that address either CD28 or CTLA-4 had been a challenge for scientists worldwide.

Autoantibodies against CD28 were detected in the serum of patients with atopic and autoimmune diseases. These antibodies could either act as superagonists and activate T cells without the need of further signals or have immunosuppressive effects through activation of regulatory T cells.

Occurrence and relevance of CD28 autoantibodies in patients with malignant melanoma has not been investigated so far. However, in literature there are numerous studies on the impact of autoimmunity on the clinical course of patients with malignant melanoma. In the recent years, the latter have been subject to controversial debates. Some studies have demonstrated a positive impact of autoimmunity on the prognosis in malignant melanoma. These results were relativized by other studies, however.

An established adjuvant therapy of malignant melanoma is interferon therapy. Its positive effect on the progression-free survival has been demonstrated several times; in some studies also an extension of overall survival is reported. The effect of interferon is based on its impact on the immune response.

The aim of this study is to investigate the incidence and prevalence of CD28 antibodies in melanoma patients and their possible impact on progress-free and overall survival.

Twenty-four of 230 melanoma patients enrolled in this investigation died of their disease. Eight of them showed increased CD28 antibody titres ($p = 0.043$). Thus, patients with CD28 antibodies in their sera have a significantly higher risk of dying from their disease. Fifty-two patients (22.6 %) suffered from a progression of their disease. However, a significant correlation between the stage of the disease and the presence of CD28 antibodies could not be detected ($p = 0.588$). No correlation was found neither for the primary melanoma type and the presence of CD28 autoantibodies ($p = 0.211$) nor for the Clark level ($p = 0.240$).

There was no significant correlation between patients with a positive detection of CD28 serum antibodies and the overall survival. However, a tendency towards prolonged overall survival in patients without CD28 antibodies could be observed. No significant correlation was found between the overall survival in CD28 antibody-positive patients with or without interferon therapy.

Eleven of 42 patients (26.8 %) with CD28 antibodies suffered from a progression of their disease during the observation period. No significant correlation could be found between the progress-free survival in melanoma patients with or without CD28 serum antibodies ($p = 0.952$).

Antibody titres could be measured in 6 patients over a period of several years. All patients were CD28 antibody negative at baseline. Four of these 6 patients showed a seroconversion during the observation period. Seroconversion was associated with a progression of the disease in all cases and all 4 patients died of melanoma.

Of 120 patients who received interferon therapy, in 21 (17.5 %) CD28 autoantibodies could be detected during the observation period. *Vice versa* also in 21 (19.1 %) of the 110 patients who did not receive any therapy with interferons CD 28 abs could be found.

In melanoma patients receiving interferon therapy CD28 antibodies were not found more often than in those who did not receive interferon ($p = 0.755$). However, including the other control groups a significant correlation between interferon therapy and the occurrence of CD28 autoantibodies could be detected ($p < 0.001$).

All in all a population of 855 patients was investigated, 332 patients received interferon therapy independently of the underlying disease. In these 332 patients, 66 had CD28 antibodies in their sera (19.9 %). Among 523 patients who were not receiving interferon therapies, serum antibodies could only be detected in 41 (7.7 %). The number of CD28 antibody-positive patients was highest in the groups with melanoma and hepatitis patients.

This study's data show that patients with malignant melanoma who develop CD28 autoantibodies are at higher risk of dying from their disease. A CD28 antibody detection test could possibly be used in the future to identify those patients.

It is imaginable that interferon therapy leads to the generation of CD28 antibodies as demonstrated in the present data. This hypothesis is supported by the fact that the percentage of patients with CD28 serum abs is equal in melanoma patients and in patients receiving interferon for the treatment of viral hepatitis. As our data show an increased risk of dying from melanoma in CD28 positive melanoma patients, a stop of an adjuvant immunotherapy with interferon should be critically discussed when these antibodies are detected.

1.2 Zusammenfassung

CD28-Autoantikörper als prognostischer Parameter des malignen Melanoms und deren mögliche Auswirkungen auf adjuvante Immuntherapien

Bei der Regulierung der Immunantwort spielen CD28 und CTLA-4 eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von T-Zellen. Die Suche nach blockierenden oder aktivierenden Antikörpern, welche entweder gegen CD28 oder CTLA-4 gerichtet sind, ist Gegenstand rezenter und aktueller Forschungen.

Autoantikörper gegen CD28 wurden im Serum von Patienten mit Erkrankungen aus dem atopischen Formenkreis und bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen nachgewiesen. Diese Antikörper könnten als Superagonisten fungieren und T-Zellen aktivieren oder immunsuppressive Effekte durch Aktivierung regulatorischer T-Zellen haben.

Vorkommen und Relevanz von CD28-Autoantikörpern bei Patienten mit malignem Melanom sind bislang noch nicht untersucht worden. Jedoch finden sich in der Literatur zahlreiche Studien über den Einfluss von Autoimmunphänomenen auf den Krankheitsverlauf von Patienten mit malignem Melanom. Letztere wurden in den letzten Jahren kontrovers diskutiert. Einige Studien konnten zeigen, dass Patienten mit Autoimmunphänomenen unter adjuvanter Immuntherapie mit Interferon eine günstigere Prognose aufwiesen. Diese Ergebnisse wurden von anderen Studien jedoch relativiert.

Eine etablierte adjuvante Therapie in der Behandlung des malignen Melanoms ist die Interferontherapie. Deren positiver Effekt auf das progressfreie Überleben wurde mehrfach nachgewiesen, auch eine Verlängerung des Gesamtüberlebens wird in einigen Studien berichtet. Die Wirkung von Interferon beruht auf seinem Einfluss auf die Immunantwort.

In dieser Studie sollen die Inzidenz und Prävalenz von CD28-Autoantikörpern bei Melanompatienten und deren mögliche Auswirkungen auf progressfreies und Gesamtüberleben untersucht werden.

Von 230 in diese Studie eingeschlossenen Melanompatienten verstarben 24 an ihrer Erkrankung. Acht davon wiesen erhöhte CD28-Antikörper-Titer auf ($p = 0,043$). Damit haben Patienten mit erhöhten CD28-Antikörpern ein signifikant höheres Risiko, an der Erkrankung zu versterben. 52 Patienten (22,6 %) erlitten einen Progress ihrer Erkrankung. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Stadium der Erkrankung und dem Vorhandensein von CD28-Antikörpern konnte jedoch nicht festgestellt werden ($p = 0,588$). Ebenfalls keine Korrelation bestand zwischen dem primären Melanomtyp ($p = 0,211$) oder dem Clark-Level ($p = 0,240$) und dem Vorhandensein von CD28-Autoantikörpern.

Es konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem positiven Nachweis von CD28-Autoantikörpern und dem Gesamtüberleben festgestellt werden ($p = 0,559$), jedoch wurde eine Tendenz zu verlängertem Gesamtüberleben bei Patienten ohne CD28-Antikörper-Nachweis beobachtet. Ebenfalls kein signifikanter Unterschied konnte festgestellt werden zwischen dem Gesamtüberleben bei CD28-Antikörper-positiven Patienten mit und ohne Interferontherapie.

11 von 42 Patienten (26,8 %) mit CD28-Antikörpern erlitten einen Progress während des Beobachtungszeitraumes. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen dem progressfreien Überleben mit und ohne CD28-Serumantikörpern festgestellt werden ($p = 0,952$).

Eine Verlaufsdokumentation der CD28-Autoantikörper-Titer von sechs Melanompatienten zeigte einen tendenziellen Zusammenhang zwischen Auftreten oder Erhöhung von Serumantikörpern und dem Progress der Erkrankung.

Von 120 Patienten, die eine Interferontherapie erhielten, konnte während des Beobachtungszeitraumes bei 21 (17,5 %) das Auftreten von CD28-Autoantikörpern festgestellt werden. Bei den 110 Patienten ohne Interferontherapie waren es ebenfalls 21 Patienten (19,1 %). Bei Melanompatienten unter Interferontherapie traten also nicht signifikant häufiger CD28-Antikörper auf als bei solchen, die kein Interferon erhielten ($p = 0,755$). Werden jedoch die Kontrollgruppen miteinbezogen, so ergibt sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen Interferontherapie und dem Auftreten von CD28-Autoantikörpern ($p < 0,001$).

Im Gesamtpatientenkollektiv von 855 Patienten erhielten 332 eine Interferonthe-

rapie. Von diesen wiederum waren bei 66 (19,9 %) CD28-Antikörper nachweisbar. Bei den 523 Patienten, welche keine Interferontherapie erhielten, konnten nur bei 41 (7,7 %) Serumantikörper nachgewiesen werden. Die Zahl der CD28-Antikörper-positiven Patienten war in den Gruppen der Melanompatienten und Hepatitispatienten am höchsten.

Die Daten in dieser Arbeit zeigen, dass Patienten mit malignem Melanom, welche CD28-Autoantikörper entwickeln, ein höheres Risiko haben, an ihrer Erkrankung zu versterben. Ein solcher Antikörpernachweis könnte zur Ermittlung von Patienten mit höherem Sterberisiko genutzt werden. Die vorliegenden Daten implizieren, dass eine Interferontherapie möglicherweise die Ursache der Entstehung dieser Antikörper sein kann. Damit könnte der Nachweis von CD28-Autoantikörpern dazu dienen, den Zeitpunkt zu bestimmen, eine Interferontherapie zu beenden.

2. Einleitung

2.1 Das maligne Melanom

2.1.1 Allgemeines

Das maligne Melanom ist eine bösartige Tumorerkrankung des melaninbildenden Zellsystems der Haut und Schleimhaut. Es handelt sich dabei um die maligne Entartung von Melanozyten. Das maligne Melanom kommt sowohl auf der behaarten wie auch der unbehaarten Haut und auf Schleimhäuten vor. Auch okuläre Melanome (Konjunktiva und Uvea) und Manifestationen an den Hirnhäuten sind bekannt [GARBE, HAUSCHILD *et al.* 2005]. Meist handelt es sich um stark pigmentierte Tumore, es kommen jedoch auch amelanotische Formen vor. Die Tendenz zu frühzeitiger Metastasierung im Verhältnis zur Tumormasse, welche vor allem lymphogen aber auch hämatogen stattfindet, bedingt eine ungünstige Prognose. 90 % der Mortalität an Hautkrebs ist auf das maligne Melanom zurückzuführen [GARBE, HAUSCHILD *et al.* 2005].

Klinisch und histologisch können folgende Melanomtypen unterschieden werden:

Das superfiziell spreitende Melanom (SSM) breitet sich zunächst intraepidermal horizontal aus. Es folgt meist ein flach erhabenes Wachstum mit vielfarbigem Bereichen und hellen Regressionszonen. Ein sekundär knotiges Wachstum ist möglich.

Das noduläre maligne Melanom (NMM) ist ein primär knotiger, meist schwarzbrauner Tumor, der häufig eine erosiv-blutige Komponente aufweist.

Das Lentigo-maligna Melanom (LMM) entsteht beinahe ausschließlich im Gesichtsbereich auf chronisch UV-exponierter Haut älterer Patienten aus einer Melanomvorstufe, der Lentigo maligna, welche zuvor jahre- oder jahrzehntelang bestehen kann.

Das akrolentiginöse Melanom (ALM) kommt vorwiegend palmoplantar bzw. sub-

oder periungual vor. In der Frühphase finden sich meist unscharf begrenzte, inkohärente Pigmentierungen, später folgt invasives Wachstum in knotigen Anteilen.

Als Sonderformen sind vor allem das amelanotische Melanom und extrakutane Melanome zu nennen [GARBE, HAUSCHILD *et al.* 2005].

2.1.2 Epidemiologie des malignen Melanoms

Die Häufigkeit des malignen Melanoms hat in den letzten Jahrzehnten gerade in der hellhäutigen Bevölkerung beständig zugenommen [DESMOND & SOONG 2003; FEARS *et al.* 2002]. Es gehört zu den häufigsten malignen Tumoren des Menschen. In Mitteleuropa beträgt die Inzidenz derzeit etwa 10-12 Fälle pro 100.000 Einwohner und Jahr, in den USA 10-20 Fälle pro 100.000 Einwohner und Jahr. Die höchsten Inzidenzen wurden in Australien erhoben mit 50-60 Fällen pro 100.00 Einwohner und Jahr [GARBE & BLUM 2001]. Auch in Deutschland steigt die Erkrankungsrate stetig. Im Jahr 2008 betrug die Inzidenz in Deutschland für Frauen 21,2 und für Männer 22,1 pro 100.000 Einwohner. Im Vorjahr betrug sie noch etwa 18 [RKI & GESELLSCHAFT DER EPIDEMIOLOGISCHEN KREBSREGISTER IN DEUTSCHLAND E. V. 2012].

Seltener kommt das maligne Melanom in Bevölkerungsgruppen mit stärkerer Pigmentierung vor und dort beinahe ausschließlich im Bereich der Schleimhäute sowie palmoplantar [GARBE 1997]. Eine hohe Nävuszahl oder das Vorliegen kongenitaler oder dysplastischer Nävi geht mit einem erhöhten Risiko für die Erkrankung an einem Melanom einher [GARBE *et al.* 1994]. Auch eine familiäre Häufung kann beobachtet werden [GREENE *et al.* 1985].

Im Gegensatz zu früheren Vermutungen, die eine höhere Erkrankungswahrscheinlichkeit bei Frauen konstatierten, ist das Verhältnis bezüglich des Erkrankungsrisikos bei den Geschlechtern ausgeglichen. Der Häufigkeitsgipfel der Altersinzidenz liegt zwischen dem 50. und 60. Lebensjahr [GARBE & BLUM 2001].

Eine positive Entwicklung wird bei neu diagnostizierten malignen Melanomen bezüglich der Tumordicke nach Breslow beobachtet, welche seit Mitte der 1980er Jahre um 0,5 mm gesunken ist. Dies spricht für eine verbesserte Früherkennung, was sich günstig auf die Prognose auswirken sollte [GARBE & BLUM 2001].

2.1.3 Ätiologie des malignen Melanoms

Die Mechanismen welche zur Entstehung eines malignen Melanoms führen, sind noch nicht vollständig bekannt. Die Beteiligung genetischer Faktoren an der Tumorentstehung konnte jedoch bewiesen werden [CURTIN *et al.* 2005].

Als wichtigster Faktor bei der Melanomentstehung muss den epidemiologischen Daten zufolge die UV-Exposition gesehen werden, wobei hier nicht die kumulative Sonnenlichtexposition eine Rolle spielt, sondern vielmehr die intermittierende, starke Exposition ansonsten vor UV-Strahlung geschützter Hautareale [VAN SCHANKE *et al.* 2005; LEITER & GARBE 2008]. Sonnenlichtbedingte Mutationen im BRAF-Gen von Melanozyten scheinen ebenfalls an der Entstehung des malignen Melanoms beteiligt zu sein [MALDONADO *et al.* 2003]. Viros *et al.* konnten einen Zusammenhang zwischen BRAF-Mutationen und phänotypisch-histopathologischen Merkmalen zeigen [VIROS *et al.* 2008].

2.1.4 Diagnose des malignen Melanoms

Melanozytäre Veränderungen werden mit der sogenannten „ABCD-Regel“ makroskopisch beurteilt: nämlich nach **A**symmetrie, unregelmäßiger **B**egrenzung, inhomogenem **C**olorit und **D**urchmesser (verdächtig größer 5 mm). Durch die weitere Beurteilung auffälliger Befunde mittels Auflichtmikroskopie wird eine größere Zuverlässigkeit bei der Diagnose des malignen Melanoms und Abgrenzung von anderen Pigmentläsionen erreicht. Zur Verlaufsbeobachtung kann die computergestützte Dermatoskopie hilfreich sein, um Änderungen der Befunde

leichter zu erkennen und besser bewerten zu können [KITTLER *et al.* 2002; GARBE, HAUSCHILD *et al.* 2005].

Eine histologische Diagnosesicherung muss immer erfolgen, wobei hier unter anderem der Melanomtyp sowie Tumordicke und Eindringtiefe neben weiteren Merkmalen, wie Ulzeration und Mitoserate, erfasst werden. Bei histologisch unklaren Tumoren kann die immunphänotypische Charakterisierung angewendet werden [GARBE, HAUSCHILD *et al.* 2005].

2.1.5 Therapie des malignen Melanoms

Die R0-Resektion mit ausreichendem Sicherheitsabstand stellt die erste und wichtigste Therapiemaßnahme dar, wobei sich der einzuhaltende Sicherheitsabstand bei der Exzision sich an der Tumordicke orientiert [GARBE, SCHA-DENDORF, STOLZ *et al.* 2008; GARBE, HAUSCHILD *et al.* 2005], da das Risiko für Metastasen in unmittelbarer Nähe des Primärtumors mit der Tumordicke steigt. Das Auftreten von Fernmetastasen kann durch operative Maßnahmen jedoch nicht beeinflusst werden [KAUFMANN, TILGEN, GARBE 1998; HAUSCHILD, EILING, LISCHNER *et al.* 2001].

Die Entfernung und histologische Untersuchung des ersten bzw. der ersten drainierenden Lymphknoten der regionären Lymphabflussbahn (Wächterlymphknotenbiopsie, Sentinel Node Biopsie) ist derzeit ein diagnostischer und nicht therapeutischer Eingriff. Der Status des Wächterlymphknotens erlaubt eine Aussage über die Prognose der Tumorerkrankung, da er signifikant mit der rezidivfreien Überlebenszeit korreliert. Bei Vorhandensein von Mikrometastasen sollte eine radikale Lymphadenektomie durchgeführt werden [GERSHENWALD, THOMPSON, MANSFIELD *et al.* 1999; GARBE, TERHEYDEN *et al.* 2008], ebenso wie bei einer klinisch manifesten Lymphknotenmetastasierung [COIT, ROGATKO, BRENNAN 1991; WHITE *et al.* 2002].

Auch bei bereits metastasierten Melanomen sollte die Möglichkeit einer operativen Therapie stets in Betracht gezogen werden, da besonders bei solitären Metastasen eine Heilungschance besteht. 5 % aller Patienten mit Fernmetastasen,

bei denen es möglich ist, eine R0-Situation zu erreichen, können geheilt werden. Kann keine klinische Tumorfreiheit erreicht werden, kann eine Operation der Palliation symptomatischer Metastasen dienen [GARBE, TERHEYDEN *et al.* 2008].

Bei Patienten mit inoperablen Primärtumoren weist die Strahlentherapie zwar eine schlechtere lokale Kontrollrate auf als die operative Therapie, dennoch kann man gute Erfolge erzielen. Bei 64 % dieser Patienten kann eine völlige Remission beobachtet werden [SEEGENSCHMIEDT, KEILHOLZ, PIERITZ *et al.* 1999]. Auch Resttumoren nach Operation von Primärtumoren oder regionären Lymphknotenmetastasen und auch inoperable Fernmetastasen stellen eine Indikation zur Strahlentherapie dar. Bei der palliativen Therapie des metastasierten malignen Melanoms zeigt die Strahlentherapie gute Ergebnisse im Hinblick auf die Linderung von Beschwerden [GARBE, TERHEYDEN *et al.* 2008].

Als adjuvante Therapiemethode hat sich die Behandlung mit Interferon-alpha als Wirkungsvoll erwiesen. Es konnte gezeigt werden, dass Melanompatienten von einer solchen Behandlung profitieren, und zwar hinsichtlich des rezidivfreien Überlebens und, wenn auch in geringem Maße, des Gesamtüberlebens [WHEATLY, IVES *et al.* 2007; GARBE, PERIS *et al.* 2012]. Ein signifikanter Unterschied der verschiedenen Dosisschemata konnte dabei nicht festgestellt werden [GARBE, PERIS *et al.* 2012].

Mit Ipilimumab, einem Antikörper gegen das T-Zell-Oberflächenprotein CTLA-4, konnten ebenfalls positive Effekte auf das Gesamtüberleben bei Patienten mit bereits vorbehandeltem metastasiertem malignem Melanom erzielt werden [HODI *et al.* 2010].

Neue Studien haben gezeigt, dass Patienten, deren Melanome BRAF-Mutationen aufweisen, von einer Behandlung mit BRAF-Inhibitoren profitieren. Wirkstoffe wie Vemurafenib könnten künftig bei diesen Patienten zur adjuvanten Therapie eingesetzt werden [FISHER & LARKIN 2012].

Chemotherapien oder Chemoimmuntherapien kommen in palliativen Situatio-

nen zum Einsatz und können eine Remission der Tumorerkrankung und damit eine Verminderung der Beschwerden bewirken [GARBE, TERHEYDEN *et al.* 2008]. Ein Überlebensvorteil kann mit der Durchführung einer Chemotherapie in der Regel allerdings nicht erreicht werden [EIGENTLER, CAROLI, RADNY *et al.* 2003].

2.2 Das Cluster of Differentiation 28 (CD28-) Molekül und CD28-Antikörper

Die Aktivierung von T-Zellen erfolgt über die Stimulation verschiedener Rezeptoren. Zusätzlich zum T-Zell-Rezeptor existieren Co-Rezeptoren, welche die Immunantwort der T-Zellen regulieren. Einer dieser Rezeptoren ist das CD28-Molekül [JUNE, LEDBETTER *et al.* 1990]. Zusammen mit CTLA-4, welches ebenfalls auf der Oberfläche von T-Zellen zu finden ist, spielt es eine wichtige Rolle in der Regulierung der Immunantwort. Während CTLA-4 eine Rolle bei der Hemmung der T-Zell-Aktivität spielt, ist CD28 mitverantwortlich für die Aktivierung der T-Zellen [WOLCHOK & SAENGER 2008]. Auch auf eosinophilen Granulozyten wurden CD28-Moleküle entdeckt, hier haben sie Anteil an der Regulation der Interleukin- und Interferonsekretion [WOERLY *et al.* 1999].

Wird CTLA-4 durch Antikörper wie Ipilimumab blockiert, führt dies zu einer ungebremsten Aktivierung von CD28. Die T-Zellen verlieren ihre Fähigkeit zur Unterscheidung körperfremder und körpereigener Strukturen, was zu Verlust der Eigentoleranz führt [BAKACS *et al.* 2011].

Durch sogenannte superagonistische anti-CD28-Antikörper kann die Aktivierung von T-Zellen direkt und unabhängig von weiteren T-Zell-Rezeptoren erfolgen. Im Tiermodell konnte so eine experimentell ausgelöste autoimmune Enzephalomyelitis erfolgreich behandelt werden. Erklärt wurde dies durch die Expansion und Aktivierung von regulatorischen CD4- und CD25-positiven T-Zellen, was zu einer Immunsuppression sowohl *in vitro* als auch *in vivo* führt [BEYERSDORF *et al.* 2005]. Während einer auf diesen Erkenntnissen beruhenden Phase-I-Studie zur Wirkung des monoklonalen superagonistischen anti-CD28-Antikörpers

TGN1412, kam es bei den sechs gesunden Probanden jedoch zu einem lebensgefährlichen Zytokinsturm, welcher zu schweren Nebenwirkungen führte und bei allen Probanden intensivmedizinische Betreuung erforderlich machte [SUNTHARALINGAM *et al.* 2006]. Dies konnte auf eine massive Aktivierung von CD4-positiven T-Effektor-Gedächtniszellen durch TGN1412 zurückgeführt werden. Im Gegensatz zu den für die präklinischen Studien herangezogenen Tierarten (Ratten, Rhesus- und Javaneraffen) wird beim Menschen auf den CD4-positiven T-Zellen das CD28-Molekül exprimiert, was die Erklärung dafür ist, dass das Auftreten eines solchen Zytokinsturms im Vorfeld nicht absehbar war [EASTWOOD *et al.* 2010].

Neuber *et al.* konnten 2006 CD28-Autoantikörper in den Seren von Patienten mit Erkrankungen aus dem atopischen Formenkreis nachweisen. Seren mit diesen Antikörpern steigern *in vitro* die T-Zell-Proliferation signifikant, was zu der Vermutung führte, dass CD28-Autoantikörper eine wichtige Rolle bei der Entstehung atopischer Erkrankungen wie Neurodermitis, Heuschnupfen oder allergischem Asthma spielen. Dieser Effekt konnte trotz gleichzeitiger Hemmung der T-Zellen durch Stimulation von CTLA-4 beobachtet werden [NEUBER *et al.* 2006].

2.3 Interferontherapie des malignen Melanoms

Schon in frühen Phasen der Tumorentstehung spielt die Dysfunktion des Immunsystems mit Veränderungen der T-Zell-Antwort eine entscheidende Rolle, welche sich mit der Tumorprogression und Metastasierung noch weiter verstärkt [STAVELEY-O'CAROLL *et al.* 1998]. Einer der Mechanismen scheint die negative Beeinflussung des Interferon (IFN) -Signalweges zu sein. Es wurde eine Verminderung der Signalübertragung durch IFN-alpha in T- und B-Zellen bei Brustkrebs, gastrointestinalen Tumoren und dem malignen Melanom festgestellt. Der IFN-gamma vermittelte Signalweg war in den B-Zellen vermindert, jedoch nicht in den T-Zellen und NK-Zellen [CRICHTLEY-THORNE, SIMONS *et al.* 2009].

Bereits 1996 konnten Kirkwood *et al.* zeigen, dass eine adjuvante Therapie mit Interferon-alpha im Stadium der lokoregionären Metastasierung (Stadium III) sowohl auf das progressfreie Überleben als auch das Gesamtüberleben von Melanompatienten einen positiven Effekt hat [KIRKWOOD, STRAWDERMAN *et al.* 1996]. Das Ergebnis dieser Studie konnte zunächst auch weiterhin gestützt werden, wobei ein Zusammenhang zwischen Höhe der Dosis und positivem Einfluss auf das Überleben nicht festgestellt werden konnte [WHEATLY, IVES *et al.* 2007]. Zahlreiche Studien der letzten Jahrzehnte legen einen positiven Effekt der adjuvanten Interferontherapie, insbesondere bezüglich der rezidivfreien Zeit, nahe [ASCIERTO & KIRKWOOD 2008]. Auch eine aktuelle systematische Übersicht kommt zu dem Schluss, dass adjuvante Therapien mit hochdosiertem oder pegyliertem Interferon zwar einen Einfluss auf das tumorfreie Überleben der behandelten Melanompatienten haben, jedoch nur einen geringen oder keinen positiven Effekt bezüglich des Gesamtüberlebens zeigen [PETRELLA *et al.* 2012; GARBE, PERIS *et al.* 2012].

Allerdings sprechen nicht alle Patienten gleich gut auf die Therapie an. Bei einem Drittel der Patienten zeigt sich ein gutes Ergebnis, bei zwei Dritteln konnte *in vitro* keine signifikante Wirkung von Interferon auf die Lymphozyten nachgewiesen werden [CRICHTLEY-THORNE, YAN *et al.* 2007].

Eine Empfehlung zur Therapie mit Interferon-alpha 3x3 Millionen Einheiten pro Woche über 18 Monate wird aktuell für Patienten mit einer Tumordicke größer oder gleich 1,5 mm ohne Nachweis von Lymphknotenmetastasen beziehungsweise ab Stadium II ausgesprochen, sofern keine Kontraindikationen bestehen [GARBE, SCHADENDORF, STOLZ *et al.* 2008; GARBE, PERIS *et al.* 2012]. Die „Leitlinie Malignes Melanom“ der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Onkologie (ADO) stützt sich hierbei vor allem auf die Ergebnisse dreier prospektiver randomisierter Studien mit niedrigdosiertem Interferon-alpha, welche alle eine signifikante Verlängerung des tumorfreien Überlebens aufzeigen konnten. Die größte der Studien zeigte auch einen Trend zur Verlängerung des Gesamtüberlebens [GROB *et al.* 1998, PEHAMBERGER *et al.* 1998, CAMERON *et al.* 2001].

Für das Melanom im Stadium III empfiehlt die Leitlinie nach operativer Sanie-

rung der Lymphknotenregion ein Hochdosisschema, da hierzu die klarsten Therapieergebnisse vorliegen. Alternativ kann jedoch auch eine Niedrigdosistherapie erwogen werden [GARBE, HAUSCHILD *et al.* 2005].

Bei der Interferon-alpha-Therapie des malignen Melanoms sind verschiedene unerwünschte Wirkungen bekannt, wobei sowohl somatische als auch neuropsychiatrische Symptome vorkommen können. Das Spektrum der sehr häufigen und häufigen Nebenwirkungen reicht von unspezifischen grippeähnlichen Symptomen wie Fieber, Schüttelfrost, Übelkeit, Muskelschmerzen und Abgeschlagenheit über dermatologische Beschwerdebilder wie Haarausfall, Exantheme und Pruritus bis hin zu gastrointestinalen Symptomen wie Übelkeit und Erbrechen [SCHAEFER, ENGELBRECHT *et al.* 2002; SCHAEFER, SCHMIDT *et al.* 2002; GUILLOT *et al.* 2004; ROCHE 2011]. Auch Blutbildveränderungen, Stoffwechselstörungen oder kardiologische Symptome können vorkommen. Schwerwiegendere und bedrohliche Symptome treten seltener auf [ROCHE 2011]. Häufige psychiatrische Nebenwirkungen sind Reizbarkeit, Schlaf- und Gedächtnisstörungen sowie Müdigkeit, Antriebsstörungen und Depressionen. Sehr selten wurde von Suizidsyndromen berichtet. Häufigste neurologische Nebenwirkung sind Kopfschmerzen. Neuropathien, Benommenheit, Tremor oder Somnolenz sind beschrieben, auch zerebrovaskuläre Ereignisse, Enzephalopathien und Koma [ASNIS *et al.* 2003; SCHAEFER, HORN *et al.* 2004; ROCHE 2011].

2.4 Autoimmunphänomene bei Melanompatienten

Autoimmunphänomene und deren klinische Relevanz bei Melanompatienten wurden in den letzten Jahren kontrovers diskutiert.

Gogas *et al.* konnten zeigen, dass Autoimmunphänomene, die unter adjuvanter Therapie mit Interferon-alpha auftraten, mit einem verlängerten progressfreien Überleben und Gesamtüberleben beim malignen Melanom in Zusammenhang stehen, zum Beispiel bei Vorhandensein von Schilddrüsenautoantikörpern in den Stadien IIB, IIC und III [GOGAS *et al.* 2006]. Weitere Studien kamen zu

ähnlichen Ergebnissen [STUCKERT, TARHINI *et al.* 2007].

Im Gegensatz dazu stehen jedoch die Ergebnisse mehrerer Studien von Bouwhuis *et al.* 220 Melanompatienten wurden auf das Vorhandensein von Autoantikörpern untersucht. Bei Melanompatienten unter Interferontherapie konnte ein vermehrtes Auftreten solcher Autoantikörper beobachtet werden. Jedoch waren diese lediglich von prognostischer Relevanz, wenn der sogenannte Guarantee-time-bias nicht beachtet wurde, also der Sachverhalt, dass Patienten mit einer längeren Überlebenszeit auch eine höhere Wahrscheinlichkeit haben, Autoantikörper zu entwickeln, während Patienten mit kürzerem Überleben weniger Zeit haben, solche Antikörper zu entwickeln.

Wurde der Guarantee-time-bias beachtet, fand sich weder ein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich des progressfreien Überlebens noch des Gesamtüberlebens von Patienten mit oder ohne Antikörper [BOUWHUIS *et al.* 2009; BOWHUIS *et al.* 2010; BOWHUIS *et al.* 2011].

2.5 Ziele und Fragestellung der Arbeit

Das Vorhandensein von CD28-Autoantikörpern bei Melanompatienten und deren prognostische Relevanz sind bisher nicht untersucht worden. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass diese Autoantikörper eine wichtige Rolle im komplexen Szenario der Immunaktivierung und Toleranz des malignen Melanoms spielen.

Ziel dieser Arbeit ist es, mögliche Unterschiede in Bezug auf progressfreies und Gesamtüberleben von Melanompatienten mit und ohne CD28-Antikörper zu untersuchen. Hierbei sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Treten CD28-Autoantikörper häufiger bei Melanompatienten als in der übrigen Bevölkerung auf?
2. Treten CD28-Autoantikörper häufiger bei Melanompatienten unter Interferontherapie auf, als bei solchen, die keine Interferontherapie erhalten?

3. Gibt es einen Unterschied bezüglich des Gesamtüberlebens zwischen Patienten mit CD28-Antikörpern und Patienten ohne CD28-Antikörper?
4. Gibt es einen Unterschied bezüglich des progressfreien Überlebens zwischen Patienten mit CD28-Antikörpern und Patienten ohne CD28-Antikörper?

3. Material und Methoden

3.1 Dokumentation und Quellen

Zur Beantwortung der Fragestellung wurden Patientenakten aus dem Archiv der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie des Universitätsklinikums des Saarlandes Homburg/Saar ausgewertet.

3.2 Erhobene Daten

Die Patientenakten dienten der Erhebung folgender Daten: Geburtsdatum, Geschlecht, Datum der Erstdiagnose, Melanomtyp, Tumordicke nach Breslow (in mm), Clark-Level (I - V), Tumorstadium nach der Tumorklassifikation des American Joint Committee on Cancer (AJCC 2002) zum Zeitpunkt der Erstdiagnose, zum Zeitpunkt der Serumentnahme und zum Zeitpunkt der letzten Untersuchung vor Abschluss der Datenerhebung, Therapiemaßnahmen mittels Interferon-alpha oder Chemotherapeutika, Zeitpunkte eines Krankheitsprogresses und gegebenenfalls das Sterbedatum.

3.3 Klassifikation für das maligne Melanom nach dem American Joint Committee on Cancer (AJCC)

Die Stadieneinteilung und Klassifikation des malignen Melanoms erfolgt gemäß den Empfehlungen des American Joint Committee on Cancer Staging Manual. Dabei erfolgt die Einteilung des T-Stadiums unter Berücksichtigung der Tumordicke, des Clark-Levels und des Ulzerationsstatus (Tab. 1). Die vom AJCC 2010 veröffentlichte 7. Auflage berücksichtigt zusätzlich die Mitoserate des Primärtumors [EDGE *et al.*]. Bei einem Großteil der in dieser Arbeit untersuchten Patienten erfolgte das Staging zum Zeitpunkt der Erstdiagnose vor Veröffentlichung

der aktuellen Auflage des AJCC Cancer Staging Manual von 2009. Die Mitoserate des Primärtumors war im Nachhinein meist nicht mehr ermittelbar, daher erfolgte die Stadieneinteilung für diese Arbeit gemäß den Empfehlungen des AJCC Cancer Staging Manual 2002 [GREENE *et al.*] (Tab. 2).

T-Klassifikation	Tumordicke	Ulzerationsstatus
TX	Tumordicke kann nicht festgestellt werden	
T0	Kein Anhalt für Primärtumor	
Tis	Melanoma in situ	
T1	≤ 1,0 mm	a: ohne Ulzeration und Level II/III b: mit Ulzeration oder Level IV/V
T2	1,01 – 2,0 mm	a: ohne Ulzeration b: mit Ulzeration
T3	2,01 – 4,0 mm	a: ohne Ulzeration b: mit Ulzeration
T4	> 4,0 mm	a: ohne Ulzeration b: mit Ulzeration
N-Klassifikation	Anzahl metastasierter Lymphknoten	Art der Lymphknotenmetastasen
NX	Regionale Lymphknoten können nicht untersucht werden	
N0	Kein Anhalt für Lymphknotenmetastasen	
N1	1 Knoten	
N2	2 – 3 Knoten	a: Mikrometastase(n)* b: Makrometastase(n)** c: In-transit-Metastase(n)/ Satellitenmetastase(n) ohne metastasierte Knoten
N3	4 oder mehr Knoten oder zusammengewachsene Knoten oder In-transit-Metastase(n) / Satellitenmetastase(n) mit metastasierten Knoten	
M-Klassifikation	Lokalisation	Serum-Laktatdehydrogenase (LDH)
M0	Kein Anhalt für Fernmetastasen	

M1a	Entfernte Hautlokalisation, subkutan oder knotige Metastase(n)	normal
M1b	Lungenmetastase(n)	normal
M1c	Alle anderen viszerale Metastasen Jede Fernmetastase	normal erhöht

Tab. 1: TNM-Klassifikation (AJCC 2002)

* Mikrometastasen: nach elektiver oder Sentinel-LK-Biopsie

** Makrometastasen: klinisch festgestellte LK-Metastasen durch therapeutische Lymphadenektomie bestätigt oder LK-Metastasen mit großer extrakapsulärer Ausdehnung

Stadium	Klinisches Staging			Pathologisches Staging		
	T	N	M	T	N	M
0	Tis	N0	M0	Tis	N0	M0
IA	T1a	N0	M0	T1a	N0	M0
IB	T1b	N0	M0	T1b	N0	M0
	T2a	N0	M0	T2a	N0	M0
IIA	T2b	N0	M0	T2b	N0	M0
	T3a	N0	M0	T3a	N0	M0
IIB	T3b	N0	M0	T3b	N0	M0
	T4a	N0	M0	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0	T4b	N0	M0
III	Jedes T	N1 – N3	M0			
IIIA				T1 – 4a	N1a	M0
IIIB				T1 – 4a	N2a	M0
				T1 – 4b	N1a	M0
				T1 – 4b	N2a	M0
				T1 – 4a	N1b	M0
				T1 – 4a	N2b	M0
				T1 – 4a/b	N2c	M0
IIIC				T1 – 4b	N1b	M0
				T1 – 4b	N2b	M0
				Jedes T	N3	M0
IV	Jedes T	Jedes N	Jedes M1	Jedes T	Jedes N	Jedes M1

Tab. 2: Stadieneinteilung (AJCC 2002)

3.4 Patientenkollektiv

Für diese Arbeit umfasste das Patientenkollektiv insgesamt 230 Patienten mit malignem Melanom, davon 123 Männer (53,5 %) im Alter von 22 bis 87 Jahren (Median: 63 Jahre, range 65: Jahre) und 107 Frauen (46,5 %) im Alter von 25 bis 88 Jahren (Median: 57,4 Jahre, range: 63 Jahre; Abb. 1).

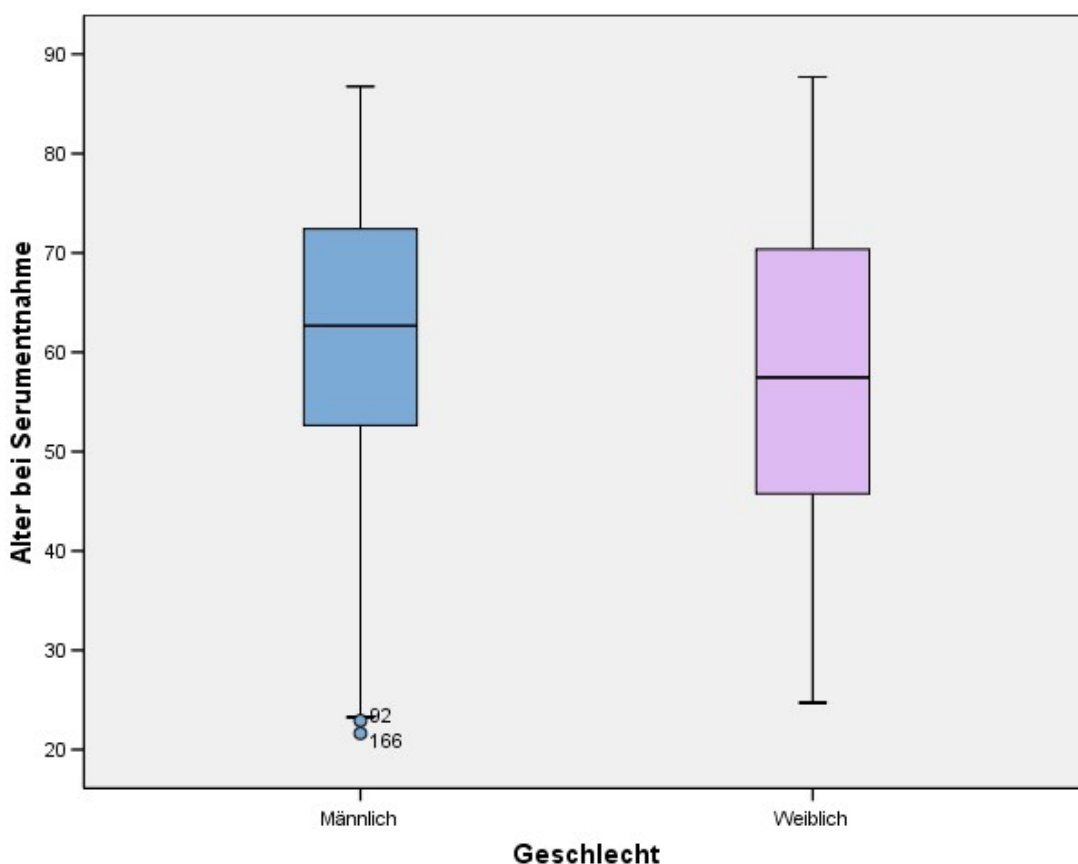


Abb.1: Box-Plot-Grafik zur Darstellung der Altersverteilung für männliche und weibliche Patienten

Nach der Stadieneinteilung des AJCC 2002 befanden sich zum Zeitpunkt der Serumentnahme 62 Patienten im Stadium I (26,96 %), 59 im Stadium II (25,65 %) 79 im Stadium III (34,35 %) und 28 im Stadium IV (12,17 %). Bei 2 Patienten (0,9 %) konnte das Stadium nicht ermittelt werden, da die Dicke des Primärtumors nicht bekannt war (Abb. 2).

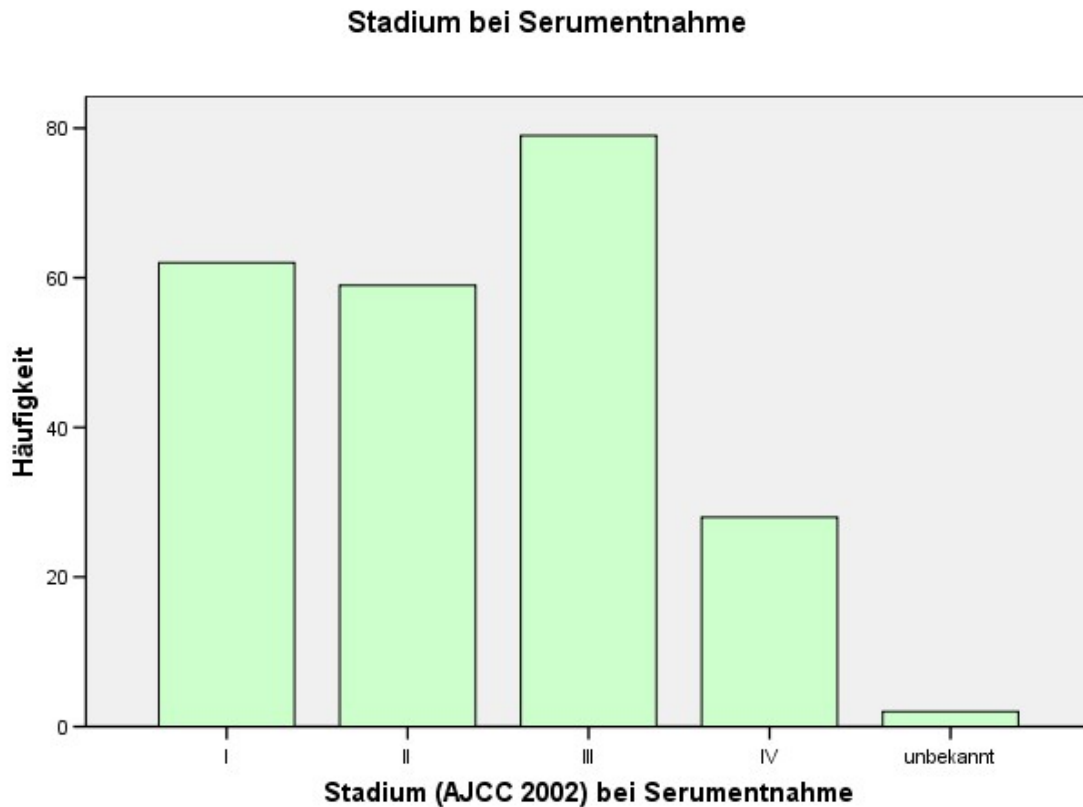


Abb.2: Balkendiagramm zur Darstellung der Häufigkeit von Patienten in den einzelnen Stadien (AJCC I-IV)

Die Tumordicke nach Breslow des Primärtumors lag zwischen 0,4 mm und 18 mm (Mittelwert 2,5 mm). Ein Tumor wies Clark-Level I (0,4 %), 12 Clark-Level II (5,2 %), 43 Clark-Level III (18,7 %), 130 Clark-Level IV (56,5 %) und 14 Clark-Level V (6,1 %) auf. Bei 30 Patienten war der Clark-Level des Primarius unbekannt (13 %; Abb. 3).

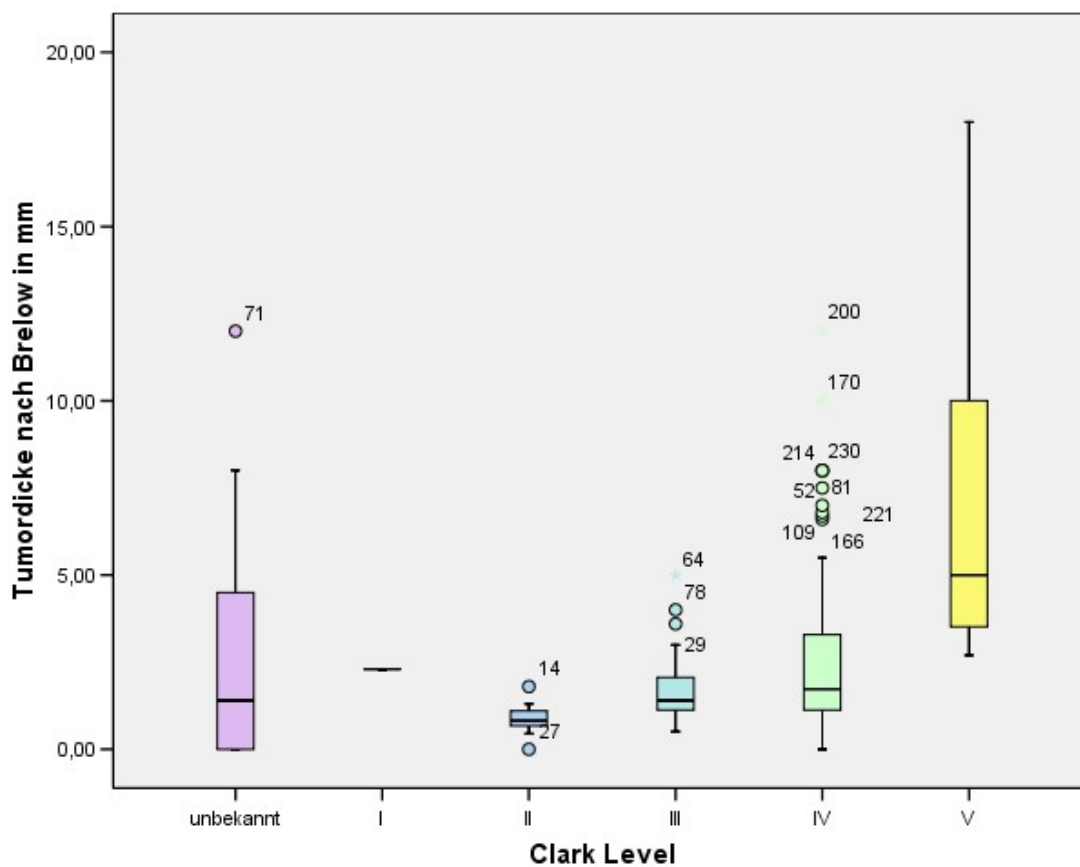


Abb. 3: Box-Plot-Grafik zur Darstellung der Tumordickenverteilung in Abhängigkeit von der Eindringtiefe (Clark Level).

Die Verteilung der Melanomtypen der Patienten stellte sich wie folgt dar: bei 71 Patienten (30,9 %) handelte es sich beim Primärtumor um ein superfiziell spreitendes Melanom (SSM) bei 95 Patienten (40,9 %) um ein nodulär malignes Melanom (NMM), bei 5 Patienten (2,2 %) um ein Lentigo-maligna Melanom (LMM), bei 13 Patienten (5,7 %) um ein akrolentiginöses Melanom (ALM), bei 28 Patienten (12,2 %) um ein amelanotisches malignes Melanom (AMM), bei 8 Patienten (3,5 %) um ein nicht klassifizierbares Melanom (UCM) und bei 11 Patienten (4,8 %) um andere Melanomtypen (Schleimhautmelanome und Uveamelanome; Abb. 4).

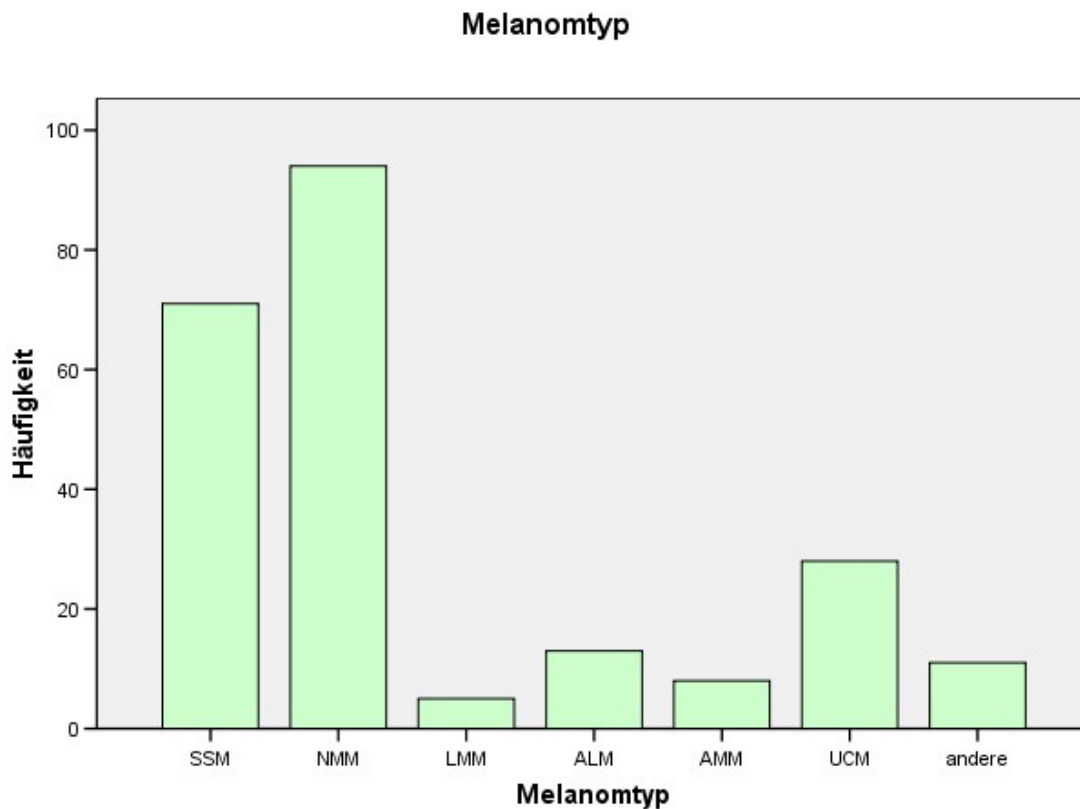


Abb. 4: Balkendiagramm zur Darstellung der Häufigkeiten der Primärtumoren.

SSM = Superfiziell spreitendes malignes Melanom

NMM = nodulär malignes Melanom

LMM = Lentigomaligna Melanom

ALM = Akrolentiginöses Melanom

AMM = Amelanotisches malignes Melanom

UCM = unklassifizierbares Melanom

andere = andere Melanomtypen (Schleimhautmelanome und Uveamelanome)

3.5 Kontrollgruppe

Die Kontrollgruppe umfasste 625 Patienten: 212 Patienten mit Hepatitis B oder C unter oder nach erfolgter Interferontherapie, 149 Patienten mit allergischer Rhinitis, allergischem Asthma oder Insektengiftallergie, 78 Patienten mit Psoriasis vulgaris, 46 Patienten mit Plasmozytom und 140 gesunde Blutspender.

3.6 Etablierung des ELISA zur Detektion von im Serum zirkulierenden CD28-Antikörpern

Die Analyse der Serumproben zur Detektion der CD28-Serumantikörper mittels ELISA erfolgte durch die Klinik für Innere Medizin I und das José Carreras Zentrum für Immun- und Gentherapie des Universitätsklinikums des Saarlandes in Homburg/Saar.

Der Antikörpernachweis erfolgte mittels Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Der CD28-Antikörper ELISA wurde etabliert mit rekombinantem full-length human FLAG tagged CD28. Zuerst wurden die Platten mit Maus-anti-FLAG-Antikörpern beschichtet, die zur Immobilisation von rekombinanten CD28 gebraucht wurden. Diese Prozedur erlaubt die spezifische Bindung von rekombinantem Protein und die Entfernung von kontaminierenden Substanzen durch Waschung. Die Spezifität des ELISA wurde mittels CD28 und anderen humanen Proteinen untersucht, welche durch dieselbe Prozedur hergestellt wurden. Es wurde keine Kreuzreaktion beobachtet (Abb. 5).

Aus der Jurkat-Zelllinie wurde ein vollständiges humanes CD28-Molekül amplifiziert und in einen pSFi-FLAG-Vektor eingebracht. In stabilen HEK193-Zellen erfolgte die Expression, worauf durch Lyse der Zellen mittels 10 mM Tris pH 8,0 CD28-FLAG gewonnen wurde.

Als coating-Antikörper dienten anti-FLAG-Antikörper, welche auf die Mikrotiterplatten (Nunc-Maxisorb-Platten) aufgebracht wurden (1:2500, 4 °C, 16 Stunden). Die Platten wurden eine Stunde bei Raumtemperatur mit 1,5 % Gelatine in Blockierungspuffer gewaschen, um freie Bindungsstellen abzusättigen, gefolgt von der Inkubation mit rekombinantem CD28-FLAG-Protein (10 µg/ml, 50 µl) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Jeder Schritt wurde gefolgt von gründlichem Waschen mit TBS/0,1 % Tx 100. Daraufhin wurde das Serum (1:100) aufgebracht, gefolgt von biotinylierten Detektions-Antikörpern gegen IgG (1:2500) und Strep-POX (1:50000), jeweils für eine Stunde bei Raumtemperatur. Entwickelt wurde der Test mit OPD für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Der Entwicklungsvorgang wurde mit HCl gestoppt, und die Extinkti-

on im Spektralphotometer bei 490 nm gemessen.

Seren von 47 gesunden Blutspendern wurden ebenfalls auf das Vorhandensein von CD28-Antikörpern untersucht. Von diesen Daten wurde ein Cut-off definiert als Mittelwert \pm 3 Standardabweichung ($MV \pm 3 SD$). Proben mit einer Absorption geringer als $MV \pm 10 SD$ wurden als negativ definiert; Proben mit einer Absorption höher als $MV \pm 10 SD$ wurden als positiv definiert (Abb. 6).

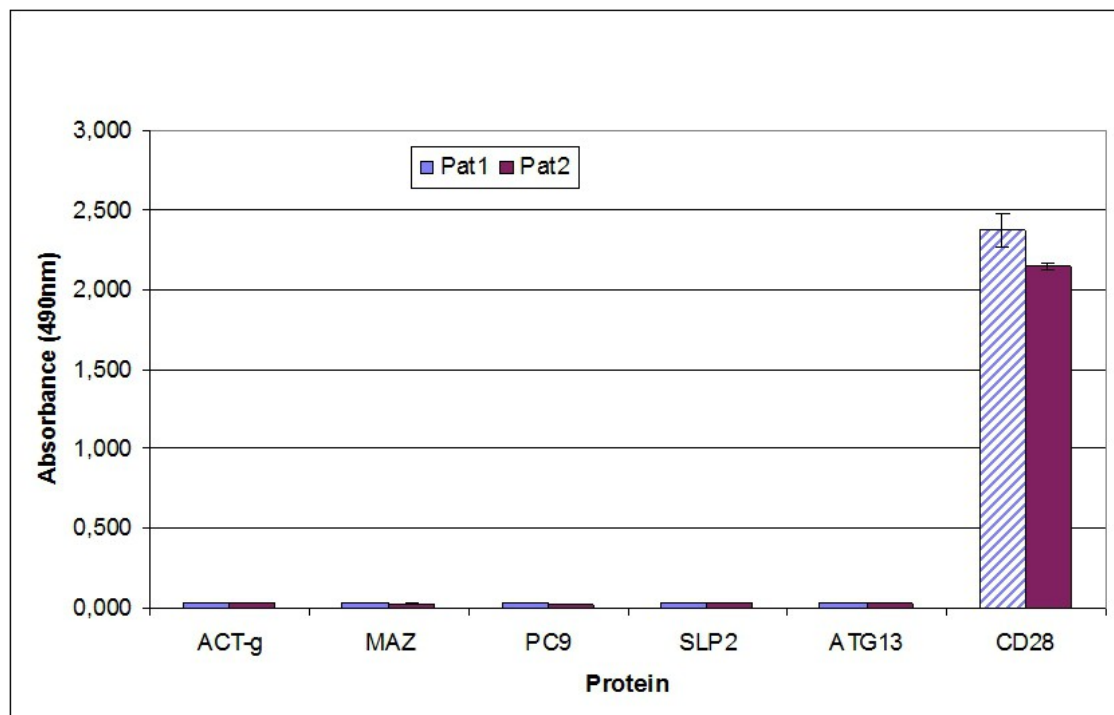


Abb 5: Balkendiagramm zur Darstellung der Spezifität des CD28-Antikörper ELISA
Humane rekombinante Proteine wurde immobilisiert und mittels ELISA gemessen wie in Kapitel 3 beschrieben. Serum von 2 verschiedenen Patienten wurde hierbei verwendet. Es wurde kein unspezifisches Signal entdeckt. ACT-g: actin- γ ; MAZ: myc-ass. zinc finger protein, PC9: pyruvate-carboxylase 9, SLP2: stomatin-like protein 2, ATG13: autophagy related 13 homolog.

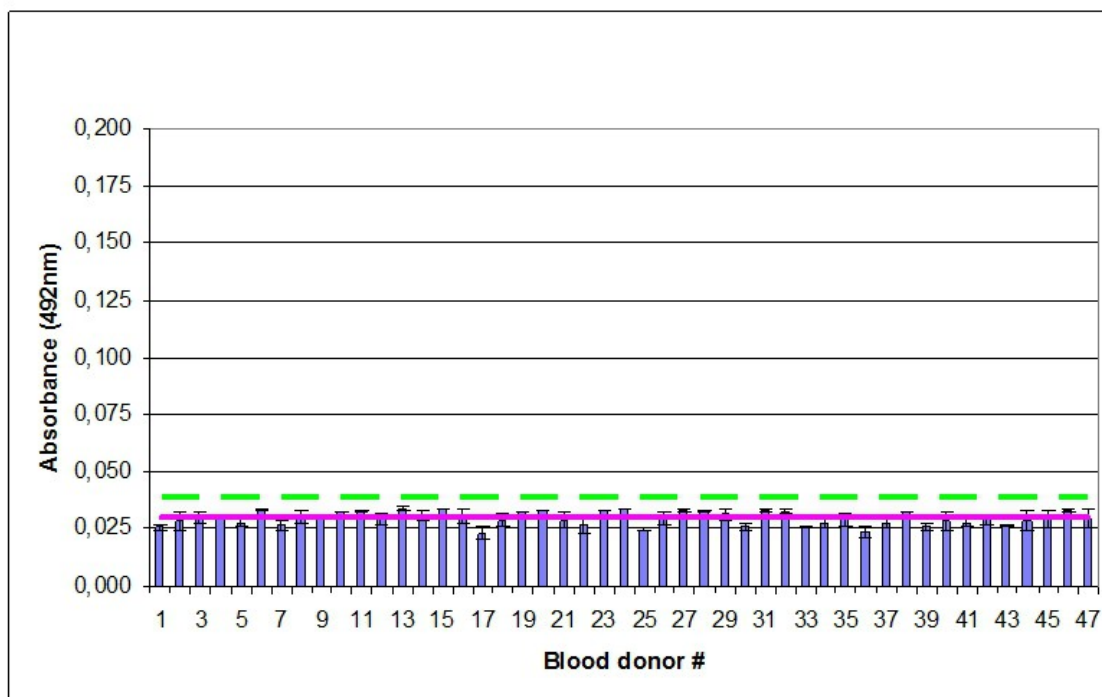


Abb. 6: Balkendiagramm zur Darstellung von CD28-Antikörper im Serum von gesunden Blutspendern

Serumproben von 47 gesunden Blutspendern wurden auf das Vorhandensein von CD28-Antikörpern untersucht. Durchgezogene Linie: Mittelwert (MV), gestrichelte Linie $MV \pm 3 SD$.

3.7 Progressfreies Überleben und Gesamtüberleben

Beginn des Beobachtungszeitraums war für alle Patienten das Datum der jeweiligen Serumentnahme. Diese fanden zwischen dem 06.11.1997 und dem 23.10.2010 in der onkologischen Ambulanz der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie in Homburg statt.

Für Patienten mit mehreren Serumentnahmen wurde jeweils das Datum der Serumentnahme mit dem ersten messbaren Antikörpertiter gewählt.

Als Endpunkt der Beobachtung wurde das Datum der letzten ärztlichen Untersuchung gewählt, unabhängig davon ob dies stationär in der Klinik für Dermatologie, in der dermato-onkologischen Hochschulambulanz, in ambulanter dermatologischer oder hausärztlicher Nachbetreuung geschehen ist. Bei verstorbenen Patienten wurde als Endpunkt der Beobachtung das Sterbedatum gewählt. Bei Patienten, bei denen als Sterbedatum nur Monat und Jahr bekannt waren, wur-

de der erste Tag des jeweiligen Monats als Enddatum gewählt.

Als Progress wurde jede neu aufgetretene Metastase oder Größenzunahme einer bestehenden Metastase um mehr als 25 % gewertet.

Bei Patienten, bei denen als Progresszeitpunkt lediglich der Monat und das Jahr bekannt waren, wurde als Progresszeitpunkt willkürlich der 15. des jeweiligen Monats festgelegt.

3.8 Beobachtungszeitraum

Als Beobachtungszeitraum wurde die Zeit zwischen Serumentnahme und Sterbedatum oder dem Datum der letzten dokumentierten ärztlichen Untersuchung gewählt. Die mediane Beobachtungszeit aller Patienten betrug 602 Tage (range 0 - 4108 Tage).

3.9 Statistische Auswertung

Sowohl die statistische Auswertung der Daten als auch die Erstellung der Tabellen und Diagramme erfolgte mit den Programmen SPSS 14.0 für Windows (SPSS GmbH München) und SPSS Statistics 20 (IBM). Um progressfreies und Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom Vorhandensein von CD28-Autoantikörpern zu vergleichen, wurde der Log-Rank-Test verwendet. Als statistisch signifikant wurde ein P-Wert $< 0,05$ erachtet.

Kaplan-Meier-Kurven, Box-Plots und Balkendiagramme dienten der graphischen Darstellung der Ergebnisse.

Eine Beratung bezüglich der statistischen Vorgehensweise bei Herrn Privatdozent Dr. med. Stefan Gräber am Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes diente der Absicherung der statistischen Ergebnisse.

4. Ergebnisse

4.1 Allgemeines

CD28-Antikörper kamen signifikant häufiger in der Gruppe der Melanompatienten ($42/230 = 18,3\%$) und bei Patienten mit Virushepatitis ($45/212 = 21,2\%$) vor, als in den anderen untersuchten Kontrollgruppen ($p < 0,001$; Chi-Quadrat-Test). Nur 11 von 149 Patienten mit Allergien ($7,4\%$), 4 von 46 Patienten mit multiplem Myelom ($8,7\%$), 3 von 78 Patienten mit Psoriasis vulgaris ($3,85\%$) und 2 der 140 gesunden Blutspender ($1,4\%$) wiesen CD28-Antikörper im Serum auf.

Von 230 Melanompatienten verstarben während des Beobachtungszeitraums 24 ($10,4\%$) an ihrer Erkrankung, 206 ($89,6\%$) überlebten (Tab. 3).

Überlebt	Männlich	Weiblich	Gesamt
Ja	111	95	206
Nein	12	12	24
Gesamt	123	107	230

Tab. 3: Anzahl der überlebenden und verstorbenen Patienten unterteilt nach Männern und Frauen

Während des Beobachtungszeitraumes erlitten 52 Patienten ($22,6\%$) einen Progress der Tumorerkrankung, 178 Patienten ($77,4\%$) waren progressfrei (Tab. 4).

Progress	Männlich	Weiblich	Gesamt
Ja	29	23	52
Nein	24	84	178
Gesamt	123	107	230

Tab. 4: Anzahl der Patienten mit und ohne Progress, unterteilt nach Männern und Frauen

Es konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von CD28-Antikörpern und dem Stadium der Erkrankung festgestellt werden ($p = 0,588$; Abb. 7).

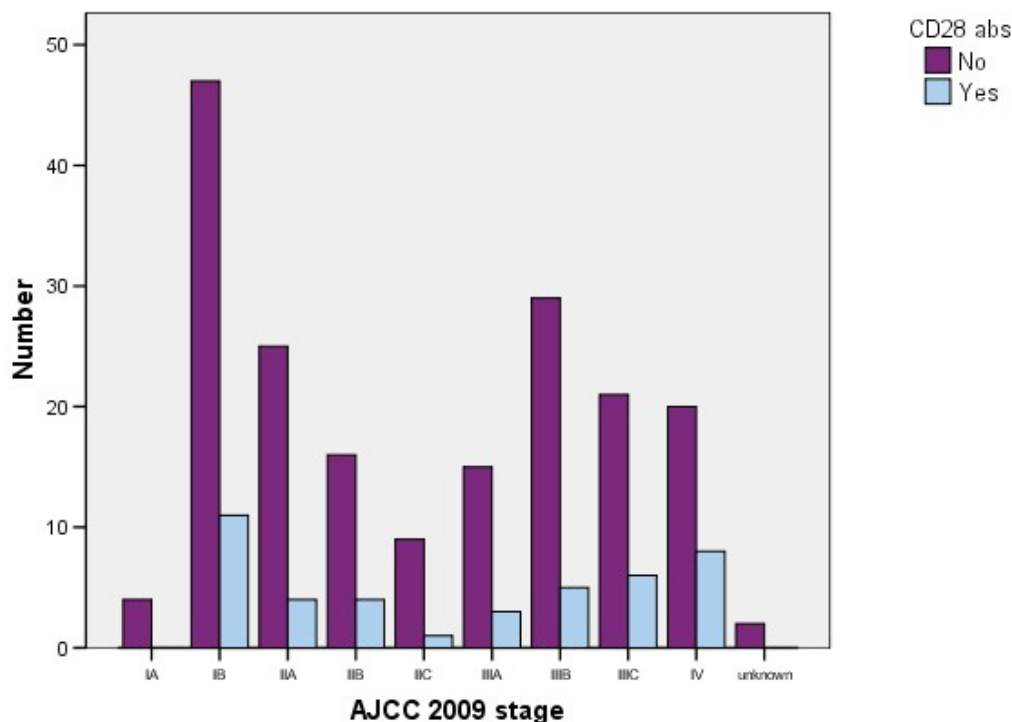


Abb. 7: Balkendiagramm zur Darstellung des Auftretens von CD28-Antikörpern in den unterschiedlichen Stadien.

Weiterhin korrelierten weder der primäre Typ des Melanoms ($p = 0,211$), noch der Clark-Level ($p = 0,240$) mit dem Vorhandensein von CD28-Antikörpern, wo-

bei jedoch bei 52 % der Patienten mit CD28-Antikörpern das primäre Melanom eine Eindringtiefe entsprechend Clark-Level IV oder V aufwies (Abb. 8).

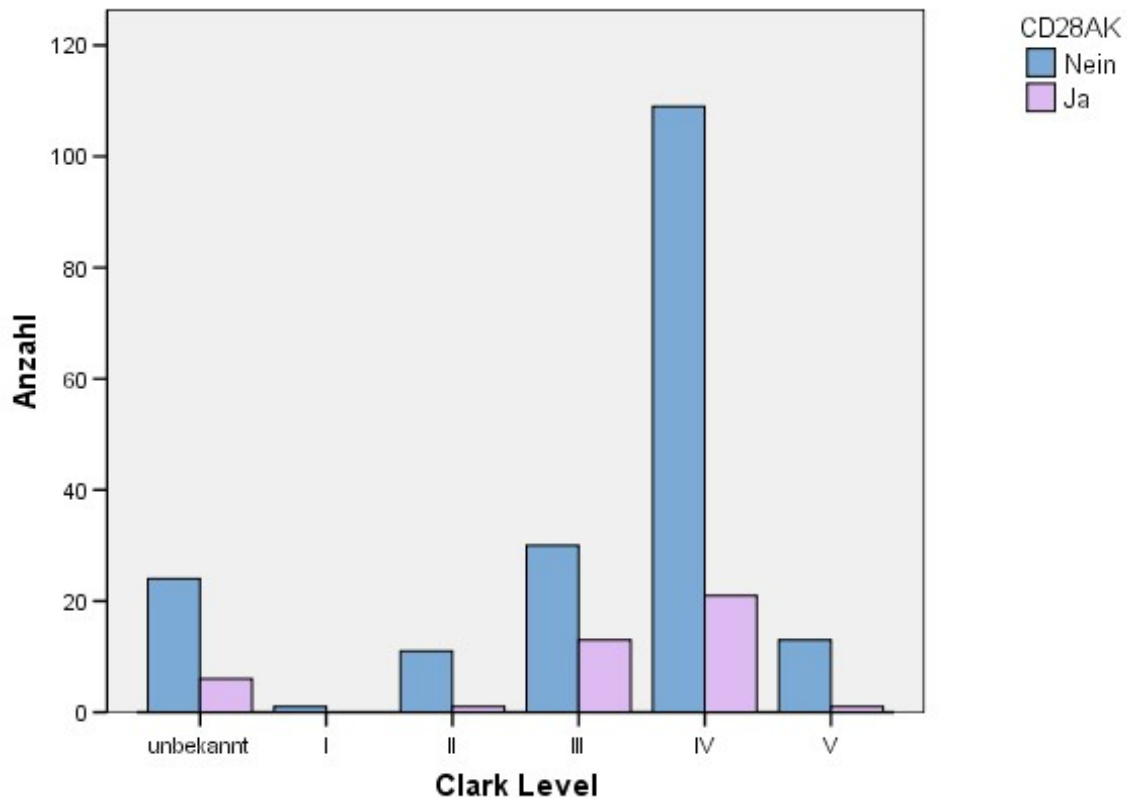


Abb. 8: Balkendiagramm zur Darstellung des Vorhandenseins von CD28-Antikörpern in Abhängigkeit vom Clark Level

4.2 Gesamtüberleben

Zwischen dem Vorhandensein von CD28-Autoantikörpern und dem Versterben am malignen Melanom konnte ein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden: von den verstorbenen 24 Melanompatienten wiesen 8 erhöhte CD28-Antikörper-Titer auf ($p = 0,043$; Chi-Quadrat-Test). Somit haben Patienten mit CD28-Serum-Antikörpern ein signifikant erhöhtes Risiko an ihrer Erkrankung zu versterben (Abb. 9).

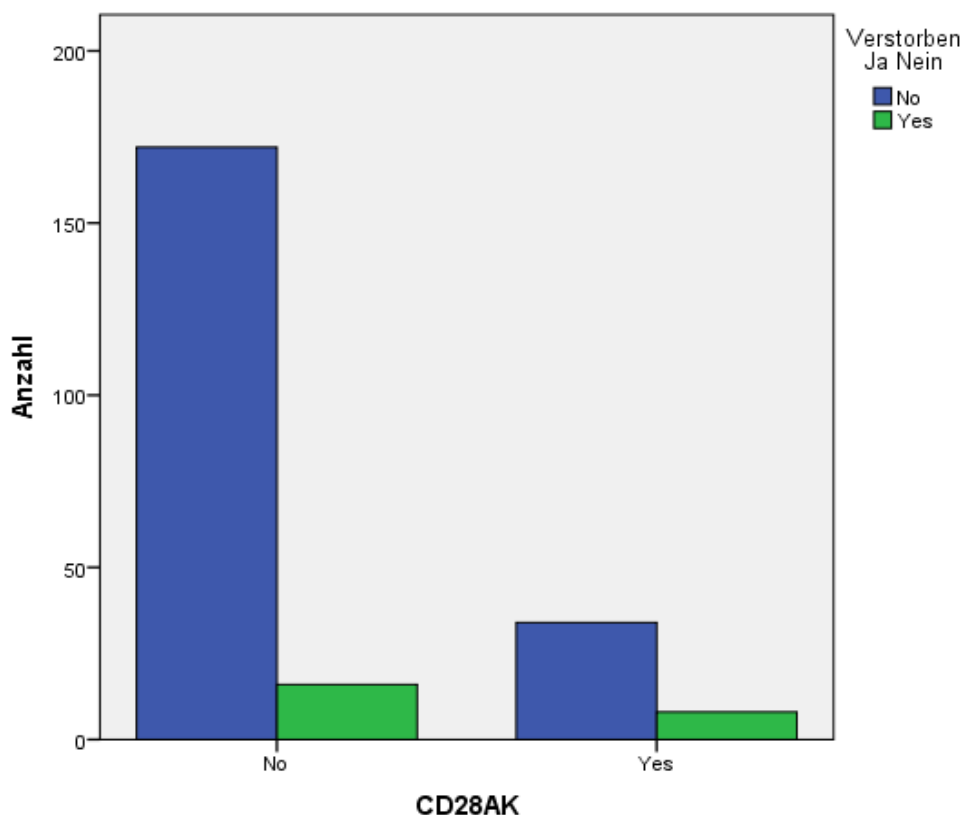


Abb. 9: Balkendiagramm: Überlebende und verstorbene Patienten mit und ohne CD28-Autoantikörper

Für Patienten ohne CD28-Autoantikörper betrug das mittlere Gesamtüberleben 2705 Tage, das mediane Gesamtüberleben 3322 Tage. Patienten mit CD28-Autoantikörpern wiesen ein mittleres Gesamtüberleben von 2294 Tagen auf. Da am Ende des Beobachtungszeitraumes noch mehr als 50 % dieser Patienten am Leben waren, konnte das mediane Gesamtüberleben der CD28-Autoantikörper-positiven Patienten nicht ermittelt werden (Tab. 5; Tab. 6).

Antikörper	Schätzer	Standardfehler	95 %-Konfidenzintervall	
			Untere Grenze	Obere Grenze
Nein	2705,115	323,913	2070,245	3339,986
Ja	2294,702	351,907	1604,964	2984,440
Gesamt	2681,179	258,202	2175,103	3187,255

Tab. 5: Mittelwert des Gesamtüberlebens für Patienten mit und ohne CD28-Autoantikörper

Antikörper	Schätzer	Standardfehler	95 %-Konfidenzintervall	
			Untere Grenze	Obere Grenze
Nein	3322,000	1502,865	376,384	3322,000
Ja
Gesamt	3322,000	.	.	3322,000

Tab. 6: Median des Gesamtüberlebens für Patienten mit und ohne CD28-Autoantikörper. Die Kaplan-Meier-Kurve zeigt jedoch die Tendenz zu einem längeren Gesamtüberleben.

Ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von CD28-Autoantikörpern und dem Gesamtüberleben konnte nicht festgestellt werden ($p = 0,559$; Log-Rank-Test), jedoch eine Tendenz für ein längeres Gesamtüberleben bei Patienten ohne CD28-Antikörper (Abb. 10).

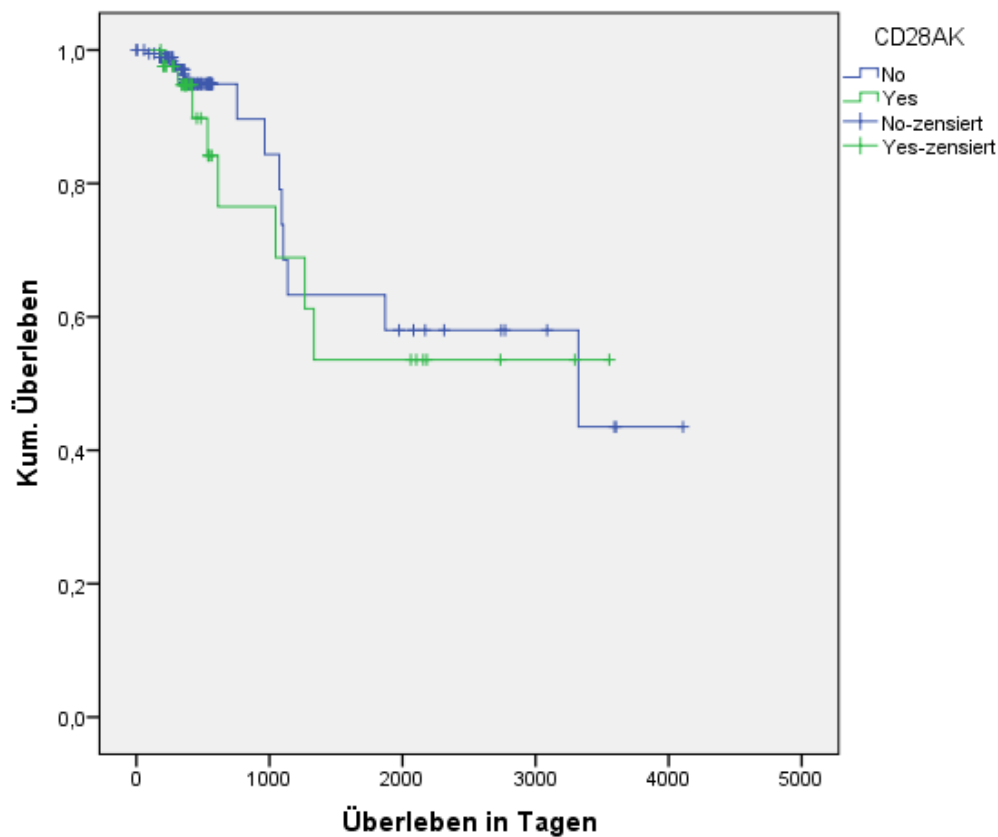


Abb. 10: Kaplan-Meier-Kurve: Gesamtüberleben mit und ohne Vorhandensein von CD28-Autoantikörpern

Das mittlere Gesamtüberleben für Patienten, die eine Interferontherapie erhielten, betrug 2888 Tage, das mediane Gesamtüberleben konnte nicht bestimmt werden, da bis zum Ablauf des Beobachtungszeitraumes mehr als 50 % dieser Patienten überlebt hatten. Für Patienten ohne Interferontherapie betrug das mittlere Gesamtüberleben 982 Tage, das mediane Gesamtüberleben 1046 Tage (Tab. 7; Tab. 8).

Interferon- therapie	Schätzer	Standardfehler	95 %-Konfidenzintervall	
			Untere Grenze	Obere Grenze
Nein	982,453	42,619	898,921	1065,986
Ja	2887,661	266,227	2365,857	3409,465
Gesamt	2681,179	258,202	2175,103	3187,255

Tab. 7: Mittelwert des Gesamtüberlebens für Patienten mit und ohne Interferontherapie

Interferon- therapie	Schätzer	Standardfehler	95 %-Konfidenzintervall	
			Untere Grenze	Obere Grenze
Nein	1046,000	66,259	916,133	1046,000
Ja
Gesamt	3322,000	.	.	3322,000

Tab. 8: Median des Gesamtüberlebens für Patienten mit Interferontherapie

Dabei wurde kein signifikanter Zusammenhang zwischen Interferontherapie und längerem Gesamtüberleben festgestellt ($p = 0,206$; Log-Rank-Test). Abbildung 11 zeigt die Kaplan-Meier-Kurven für das Gesamtüberleben mit und ohne Interferontherapie.

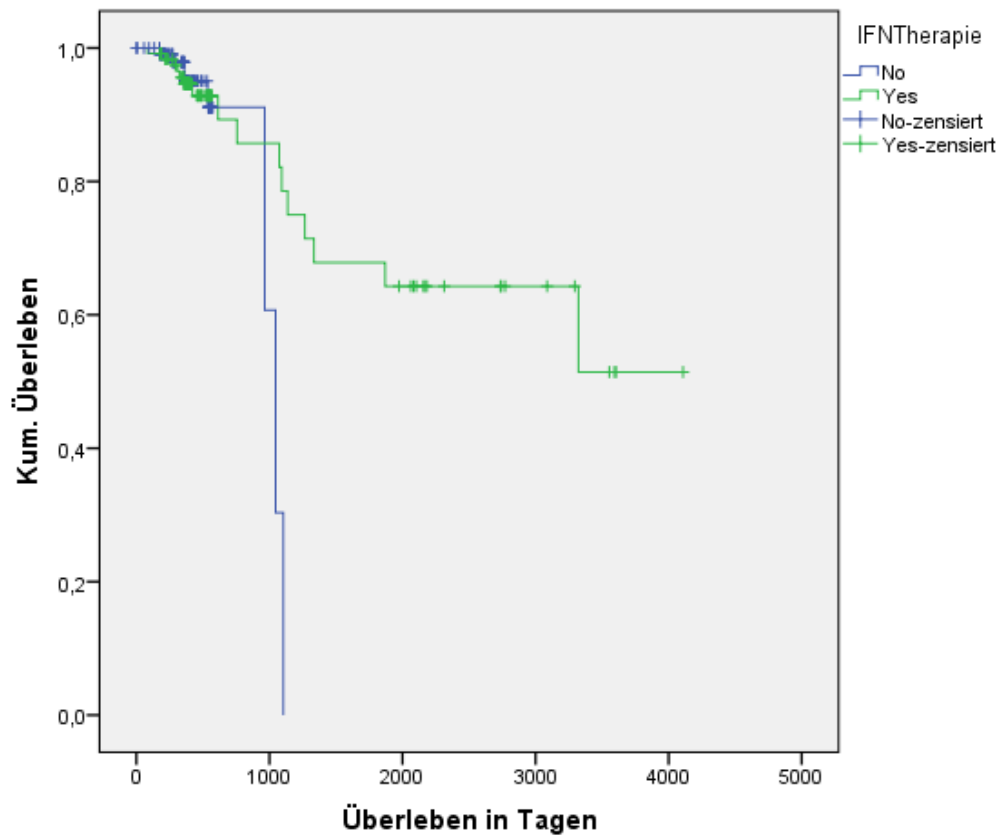


Abb. 11: Kaplan-Meier-Kurve: Gesamtüberleben mit und ohne Interferontherapie

Patienten, welche sowohl eine Interferontherapie erhielten als auch CD28-Antikörper aufwiesen, hatten ein mittleres Gesamtüberleben von 2394 Tagen. Das mediane Gesamtüberleben konnte nicht bestimmt werden, da bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes noch mehr als 50 % der Patient mit CD28-Antikörper unter Interferontherapie am Leben waren. Ein signifikanter Unterschied zwischen dem Gesamtüberleben bei Patienten mit und ohne Interferontherapie in Abhängigkeit von CD28-Antikörpern konnte nicht konstatiert werden (Abb. 12 und 13).

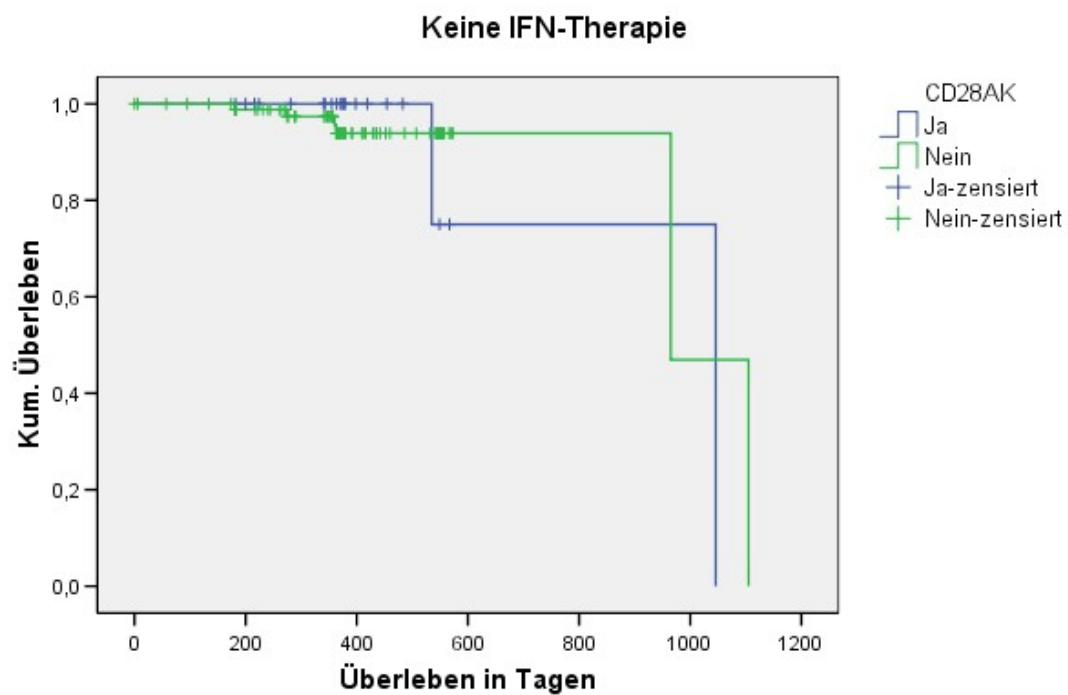


Abb. 12: Kaplan-Meier-Kurve: Gesamtüberleben von Patienten ohne Interferontherapie in Abhängigkeit vom Vorhandensein von CD28-Autoantikörpern

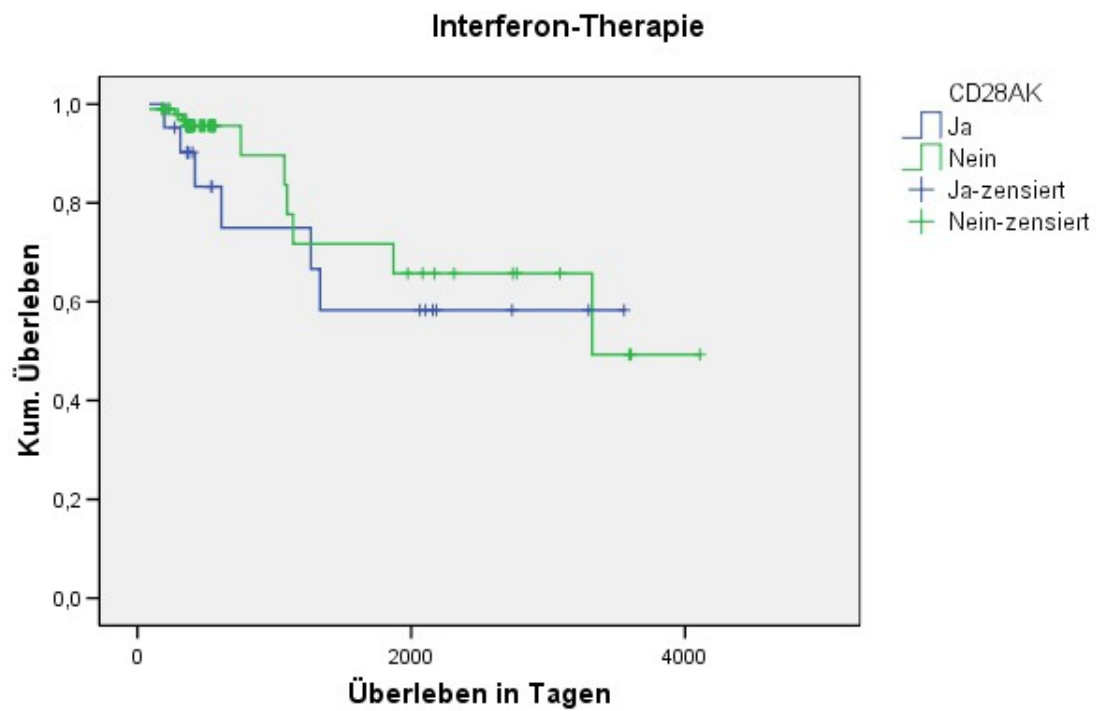


Abb. 13: Kaplan-Meier-Kurve: Gesamtüberleben von Patienten mit Interferontherapie in Abhängigkeit vom Vorhandensein von CD28-Autoantikörpern

4.3 Progressfreies Überleben

Von 230 Melanompatienten erlitten 52 einen Progress ihrer Erkrankung und 178 waren progressfrei.

Von 42 Patienten mit CD28-Antikörpern konnte bei 11 während des Beobachtungszeitraumes ein Progress festgestellt werden (26,8 %), bei den 188 Patienten ohne Serumantikörper erlitten 41 einen Progress ihrer Erkrankung (21,8 %; Abb. 14).

Von 52 Patienten, welche während des Beobachtungszeitraumes einen Progress ihres malignen Melanoms erlitten, konnten bei 11 CD28-Serumantikörper nachgewiesen werden (21,2 %; Tab. 9). Serumantikörper und Progress zeigen keinen signifikanten Zusammenhang ($p = 0,539$; Chi-Quadrat-Test).

Antikörper	Progress	Kein Progress	Gesamt
Nein	41	147	188
Ja	11	31	42
Gesamt	52	178	230

Tab. 9: Anzahl der Patienten mit und ohne CD28-Autoantikörper, aufgeteilt nach Progress und Progressfreiheit

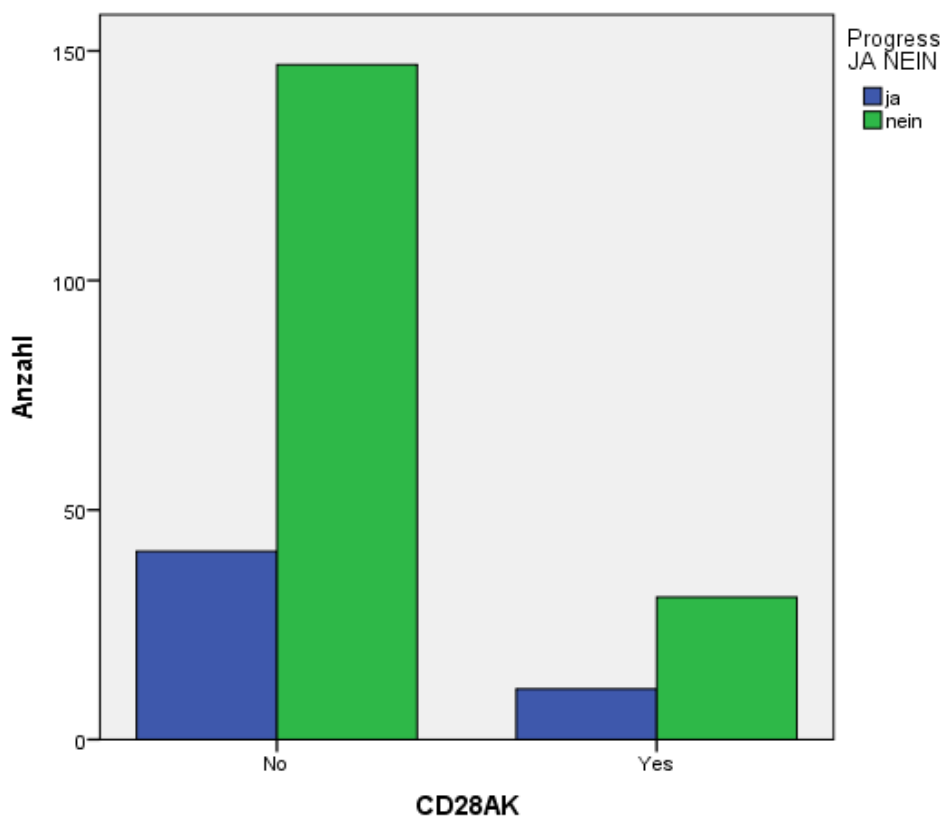


Abb. 14: Balkendiagramm: CD28-Antikörper-positive und -negative Patienten mit und ohne Progress ihrer Erkrankung

Das mittlere progressfreie Überleben betrug 1364 Tage (Tab. 10) für Patienten ohne und 1359 Tage für Patienten mit CD28-Antikörpern. Ebenso konnte keine deutliche Differenz im medianen progressfreien Überleben konstatiert werden. Es betrug 1406 Tage für Patienten ohne und 1387 Tage für Patienten mit CD28-Antikörpern (Tab. 11).

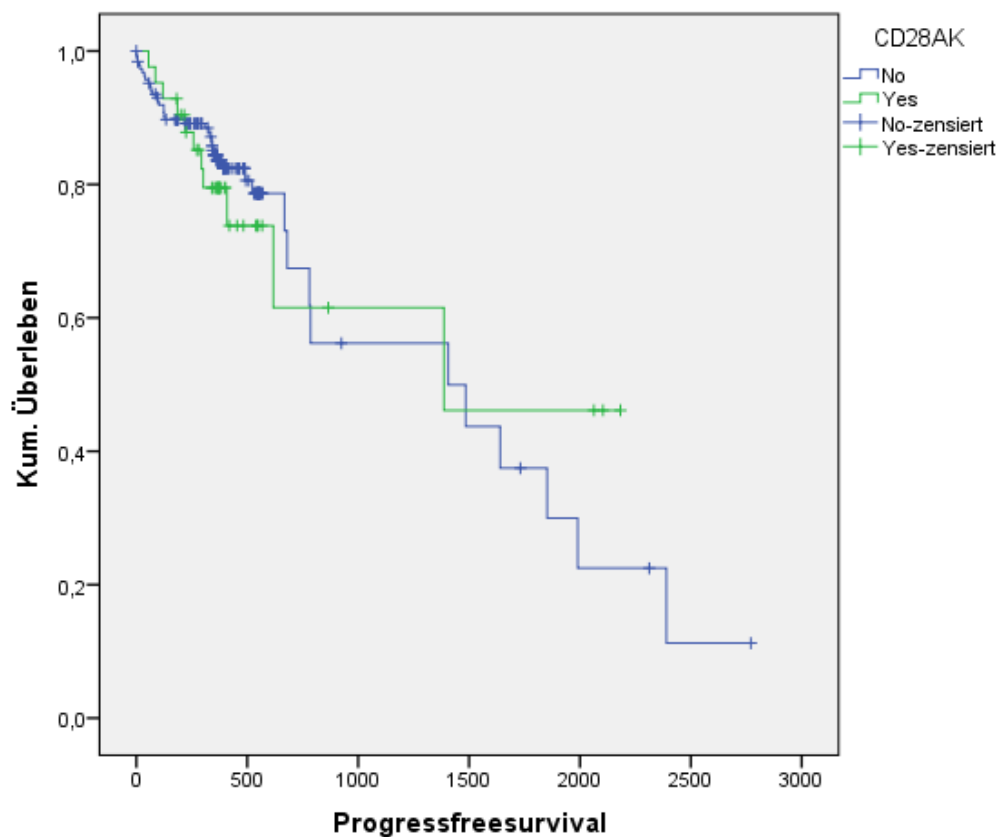
Antikörper	Schätzer	Standardfehler	95 %-Konfidenzintervall	
			Untere Grenze	Obere Grenze
Nein	1364,443	166,218	1038,657	1690,229
Ja	1359,802	221,929	924,821	1794,784
Gesamt	1430,520	149,840	1136,834	1724,206

Tab. 10: Mittelwert des progressfreien Überlebens mit und ohne CD28-Autoantikörper

Antikörper	Schätzer	Standardfehler	95 %-Konfidenzintervall	
			Untere Grenze	Obere Grenze
Nein	1406,000	593,515	242,710	1406,000
Ja	1387,000	.	.	1387,000
Gesamt	1406,000	464,144	496,277	1406,000

Tab. 11: Median des progressfreien Überlebens mit und ohne CD28-Autoantikörper

Die Analyse des progressfreien Überlebens nach Kaplan-Meier zeigte keinen signifikanten Unterschied bezüglich des progressfreien Überlebens der Patienten mit und ohne CD28-Antikörper ($p = 0.952$, Log-Rank Test; Abb. 15).



**Abb. 15: Kaplan-Meier-Kurve: progressfreies Überleben
In Abhängigkeit vom Vorhandensein von CD28-Autoantikörpern**

Für Patienten, welche eine Interferontherapie erhielten, betrug die Zeit des mittleren progressfreien Überlebens 1385 Tage, das mediane progressfreie Überleben 1406 Tage. Patienten ohne Interferontherapie hatten eine mittlere progressfreie Überlebenszeit von 509 Tagen (Tab. 12; Tab. 13). Da bei Ende des Beobachtungszeitraumes noch mehr als 50 % der Patienten ohne Interferontherapie noch am Leben waren, konnte das mediane progressfreie Überleben nicht ermittelt werden.

Interferon- therapie	Schätzer	Standardfehler	95 %-Konfidenzintervall	
			Untere Grenze	Obere Grenze
Nein	509,418	15,453	479,130	539,706
Ja	1385,265	151,881	1087,579	1682,952
Gesamt	1430,520	149,840	1136,834	1724,206

Tab. 12: Mittelwert des progressfreies Überlebens mit und ohne Interferontherapie

Interferon- therapie	Schätzer	Standardfehler	95 %-Konfidenzintervall	
			Untere Grenze	Obere Grenze
Nein
Ja	1406,000	475,762	473,507	1406,000
Gesamt	1406,000	464,144	496,277	1406,000

Tab. 13: Median des progressfreien Überlebens mit und ohne Interferontherapie

Die Analyse des progressfreien Überlebens in Abhängigkeit von der Interferontherapie zeigte keinen signifikanten Zusammenhang ($p = 0,177$, log-Rank-Test; Abb. 16).

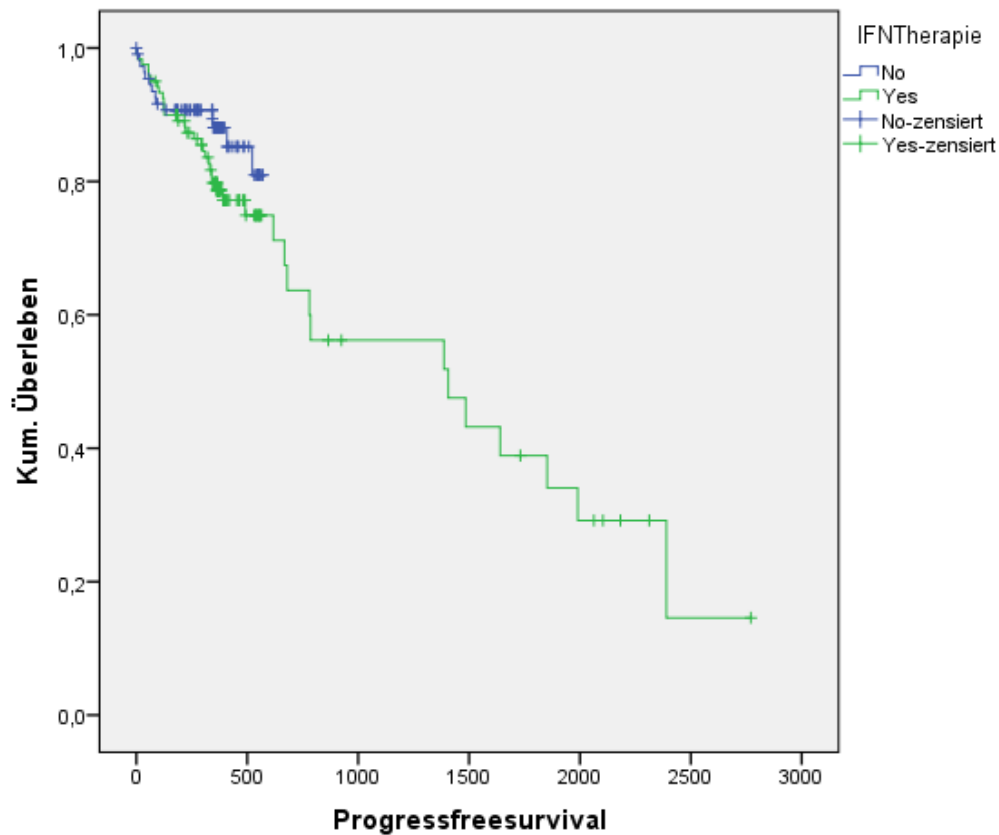


Abb. 16: Kaplan-Meier-Kurve: progressfreies Überleben mit und ohne Interferontherapie

Bei Patienten welche eine Interferontherapie erhielten und gleichzeitig CD28-Antikörper aufwiesen, betrug das mittlere progressfreie Überleben 1229 Tage. Es konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem progressfreien Überleben in Abhängigkeit von CD28-Antikörpern und Interferontherapie konstatiert werden ($p = 0,88$, Log-Rank-Test; Abb. 17 und 18).

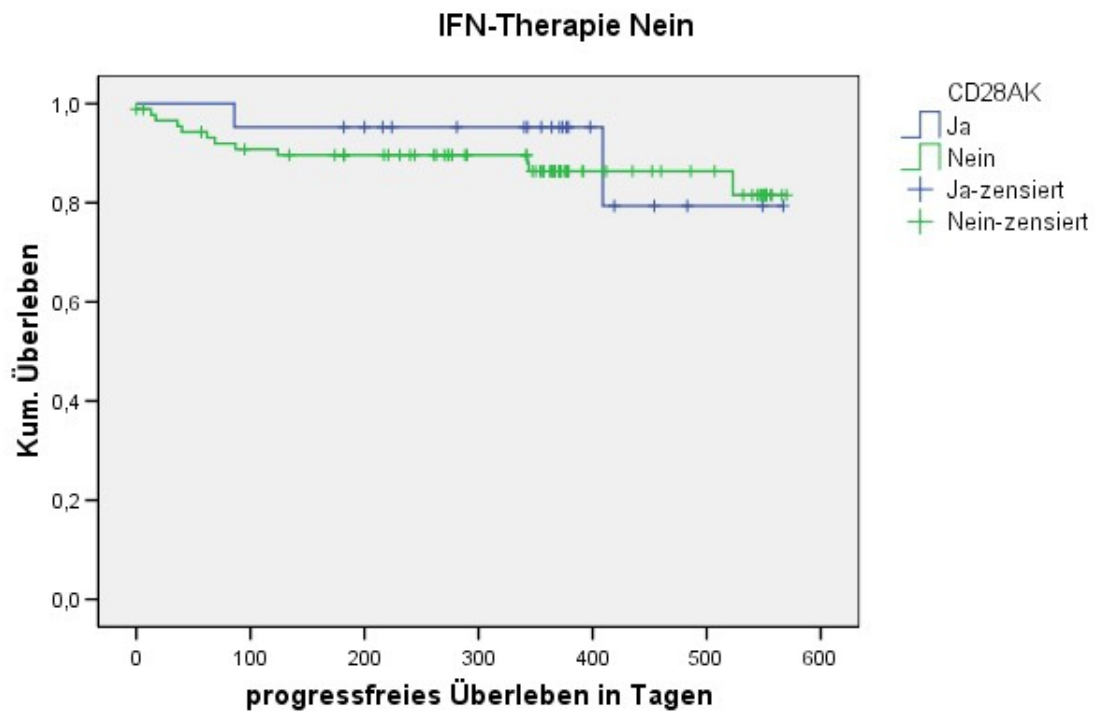


Abb. 17: Kaplan-Meier-Kurve: Progressfreies Überleben von Patienten ohne Interferontherapie in Abhängigkeit vom Vorhandensein von CD28-Autoantikörpern

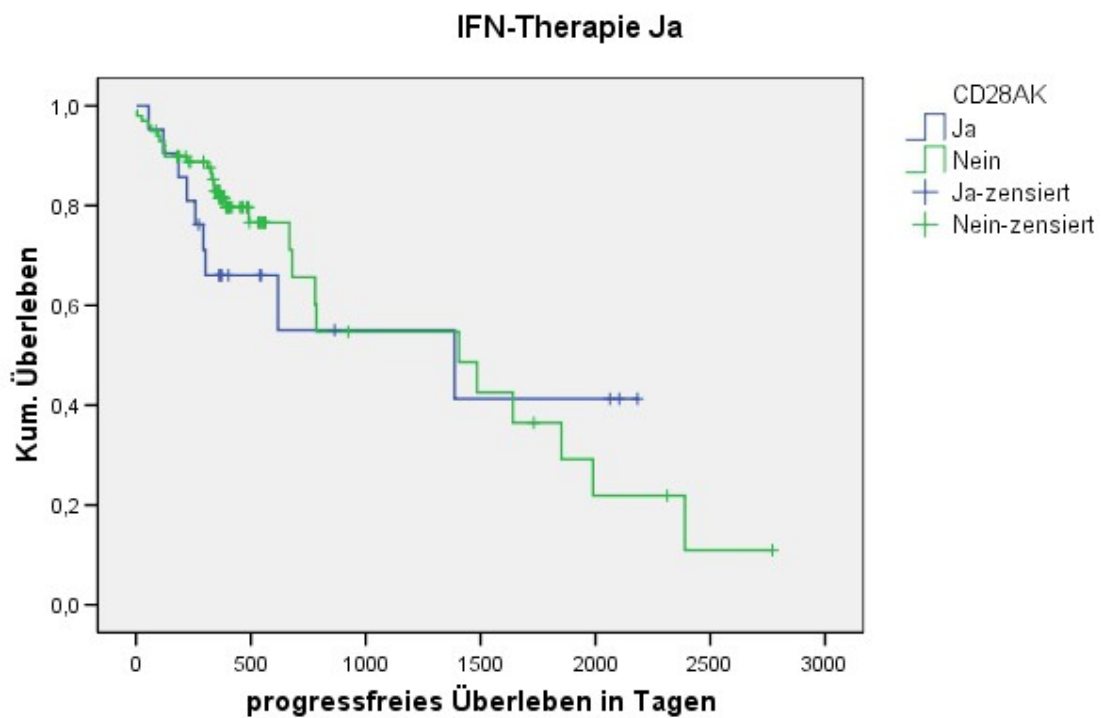


Abb. 18: Kaplan-Meier-Kurve: Progressfreies Überleben von Patienten ohne Interferontherapie in Abhängigkeit vom Vorhandensein von CD28-Autoantikörpern

4.4 Serokonversion

Bei sechs Melanompatienten konnte eine Verlaufsdokumentation der CD28-Autoantikörper-Titer über mehrere Jahre durchgeführt werden. Zunächst waren die Probanden seronegativ bezüglich der Antikörper, jedoch wurde bei vier Patienten während der Beobachtungszeit eine Serokonversion beobachtet. Diese Serokonversion stand immer in Verbindung mit einer Progression des malignen Melanoms. Alle vier Patienten verstarben an ihrer Erkrankung.

Bei einer Patientin konnte der Verlauf des CD28-Antikörpertiters über mehr als zehn Jahre dokumentiert werden. 1996 wurde bei der Patientin ein Melanom im Gesichtsbereich diagnostiziert, zu diesem Zeitpunkt konnten keine Serumantikörper nachgewiesen werden. Als im Juni 2005 Lungenmetastasen festgestellt wurden, waren noch immer keine CD28-Antikörper nachweisbar. Im Dezember 2005 konnte eine Serokonversion beobachtet werden und mit Progress der Erkrankung fand ein kontinuierlicher Anstieg der CD28-Antikörpertiter im Januar und März 2006 statt. Die höchsten Antikörperwerte konnten einhergehend mit Lebermetastasen im Mai 2007 beobachtet werden (Abb. 19). Kurz darauf verstarb die Patientin an ihrem metastasierten malignen Melanom.

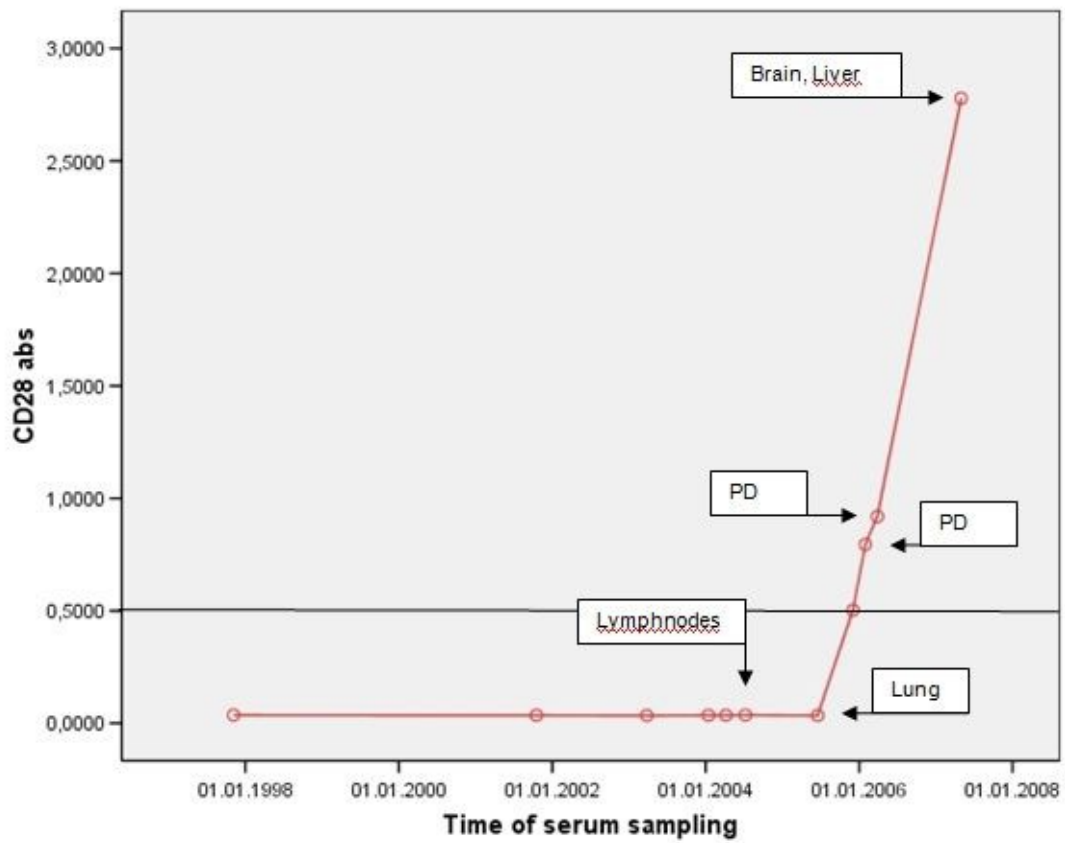


Abb. 19: Verlauf des Antikörpertiters über den Zeitraum von zehn Jahren
In Abhängigkeit vom Krankheitsverlauf bei einer Melanompatientin

4.5 CD28-Antikörper und Interferontherapie

110 Patienten (47,8 %) erhielten keine Interferontherapie, während 120 Patienten (52,2 %) mit einer Hoch- oder Niedrigdosis-Interferontherapie behandelt wurden.

Bei 21 der Melanompatienten, welche eine Interferontherapie erhielten, konnte während des Beobachtungszeitraumes ein Auftreten von CD28-Autoantikörpern beobachtet werden (17,5 %). Bei den Patienten, die keine Interferontherapie erhielten, waren es ebenfalls 21 (19,1 %; Tab. 14; Abb. 20).

Interferon- therapie	Antikörper		
	Nein	Ja	Gesamt
Nein	89	21	110
Ja	99	21	120
Gesamt	188	42	230

Tab. 14: Anzahl der Patienten mit und ohne Interferontherapie, aufgeteilt nach Vorhandensein von CD28-Autoantikörpern

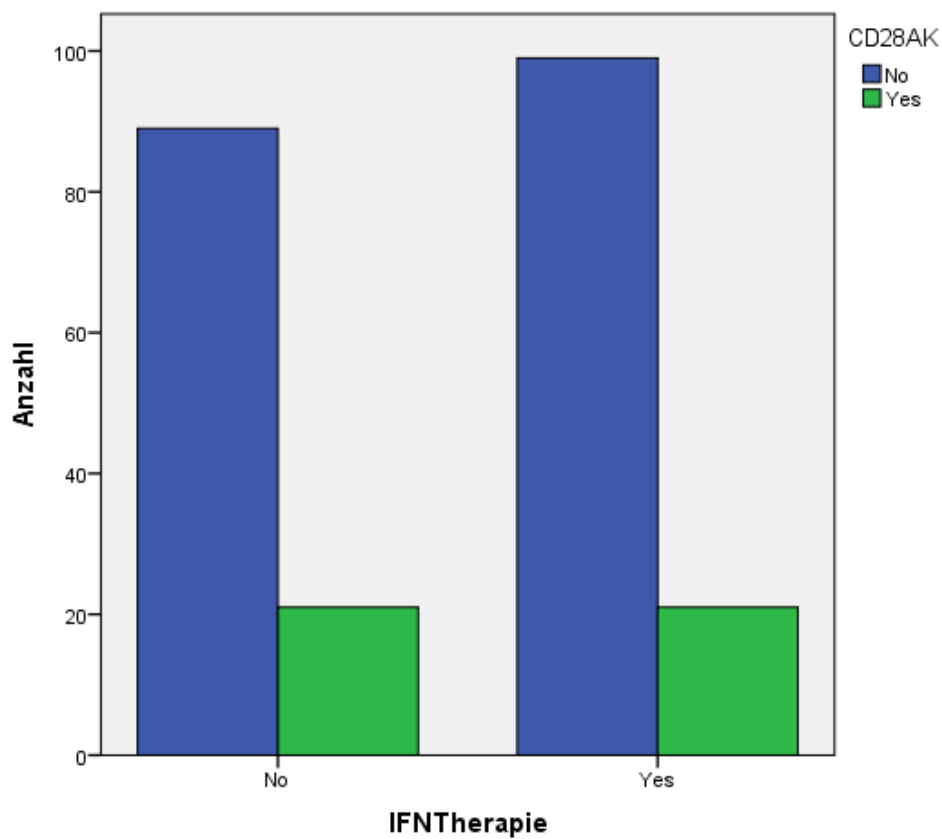


Abb. 20: Balkendiagramm: CD28-positive und -negative Patienten unter Interferontherapie und ohne Interferontherapie

Damit traten bei Patienten mit Interferontherapie nicht signifikant häufiger CD28-Autoantikörper auf als bei Patienten, die kein Interferon erhielten ($p = 0,755$; Chi-Quadrat-Test). Bezieht man jedoch die Kontrollgruppen in die

Auswertung ein, ergibt sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen Interferontherapie und dem Auftreten von CD28-Antikörpern ($p < 0,001$; Chi-Quadrat-Test).

Im gesamten Patientenkollektiv erhielten 332 Patienten eine Interferontherapie, davon waren 120 Melanompatienten und 212 Patienten mit einer Virushepatitis B oder C. Betrachtet im gesamten Patientenkollektiv von 855 Patienten konnten CD28-Antikörper bei 19,9 % (66/332) der Patienten, die Interferon erhielten detektiert werden und nur in 7,7 % (41/523) der Patienten, welche keine Interferone erhielten, unabhängig von der zugrunde liegenden Erkrankung (Abb. 21).

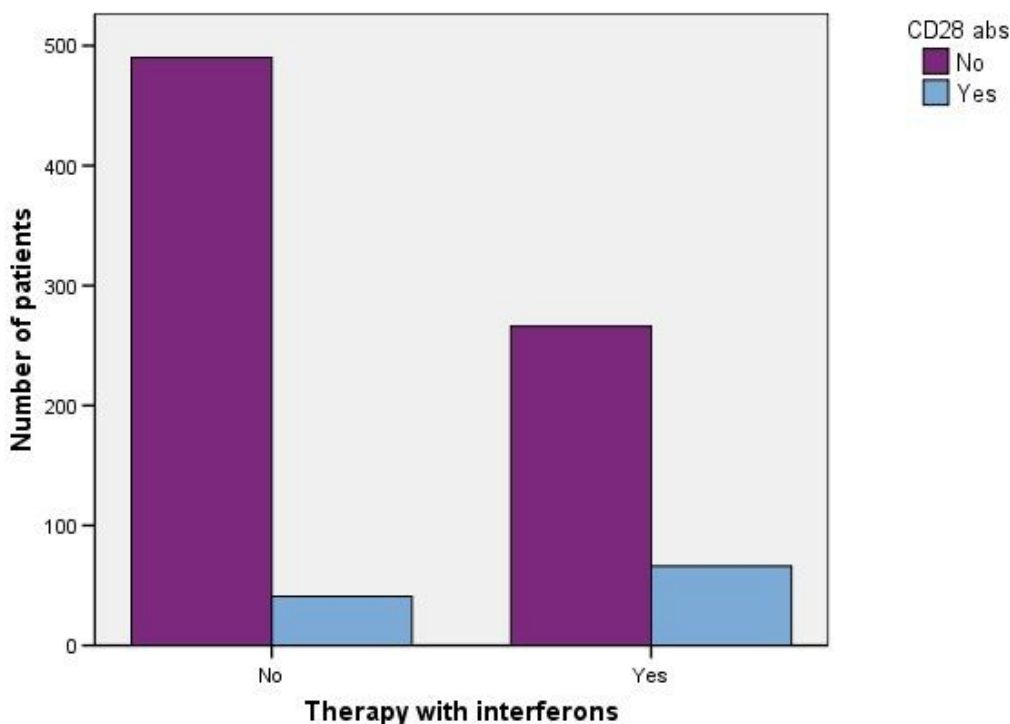


Abb. 21: Anzahl der Patienten mit CD28-Autoantikörpern bei Patienten mit und ohne Interferontherapie

4.6 Kontrollgruppen

Das Vorhandensein von CD28-Autoantikörpern war in den verschiedenen Patientengruppen unterschiedlich ausgeprägt und zeigte einen signifikanten Zu-

sammenhang mit der Art der Erkrankung ($p < 0,001$; Chi-Quadrat-Test; Abb. 22). Bei den Patienten mit Allergien wiesen 11 von 149 Patienten (7,4 %), bei den Patienten mit multiplm Myelom 4 von 46 (8,7 %), bei den Psoriatikern 3 von 75 (3,8 %) und bei den gesunden Blutspendern lediglich 2 von 140 (1,4 %) Serumantikörper auf.

Höher als in all diesen Gruppen war die Zahl der CD28-Antikörper-positiven Patienten in der Gruppe der Hepatitispatienten mit 45 von 212 Patienten (21,2 %) und der Melanompatienten. Hier wurden bei 42 von 230 Patienten CD28-Antikörper nachgewiesen (18,3 %).

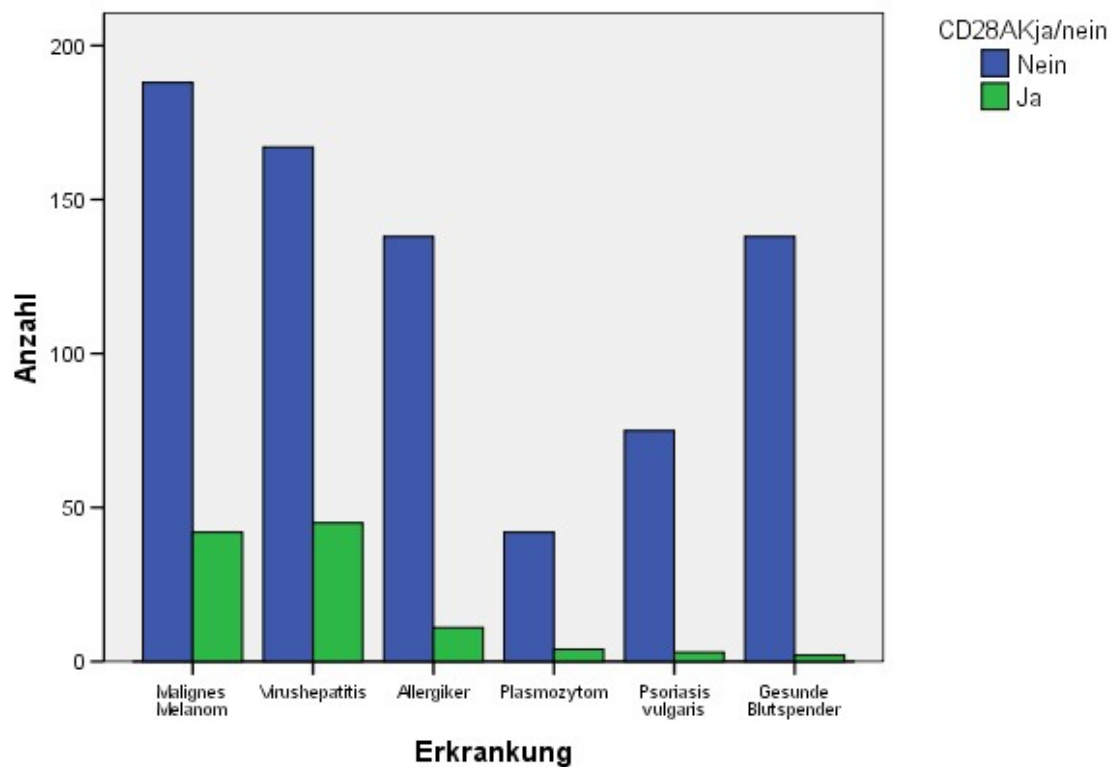


Abb. 22: Balkendiagramm zur Darstellung des Vorhandenseins von CD28-Antikörpern bei den verschiedenen Patientengruppen

5. Diskussion

CD28- und CTLA-4 spielen eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Immunantwort. Die beiden Moleküle haben dabei eine gegensätzliche Funktion: CTLA-4 hemmt die T-Zell-Aktivität, während CD28 an der Aktivierung von T-Zellen beteiligt ist [JUNE, LEDBETTER *et al.* 1990; WOLCHOK & SAENGER 2008].

Die Suche nach stimulierenden und hemmenden Antikörpern, welche den CTLA-4- oder den CD28-Rezeptor beeinflussen, war in den letzten Jahren eine herausfordernde Aufgabe, der sich Wissenschaftler auf der ganzen Welt gestellt haben.

CTLA-4-Antikörper, wie zum Beispiel Ipilimumab, wurden in den vergangenen Jahren für die Therapie des metastasierten malignen Melanoms entdeckt [Weber 2009]. Diese Antikörper führen zu einer Hemmung von CTLA-4. Dadurch kann CD28 ungehemmt arbeiten und es kommt zu einer Immunstimulation, einem Toleranzverlust und letztendlich zu einer Abnahme der Tumorlast [BAKACS *et al.* 2011; DI GIACOMO *et al.* 2010; WEBER 2009].

Ebenso wurde an der Entwicklung von superagonistischen CD28-Antikörpern gearbeitet, welche in der Lage sind, T-Zellen ohne die Mitwirkung anderer Signalkaskaden zu aktivieren. Diese Antikörper wurden vor allem entwickelt, um regulatorische T-Zellen zu aktivieren und somit immunsuppressive Wirkungen auszulösen. Präklinische Studien konnten die immunsuppressiven Effekte dieser Antikörper, wie beispielsweise JJ316 und TGN1412, weiter untermauern [BEYERSDORF *et al.* 2005; EASTWOOD *et al.* 2010; SUNTHARALINGAM *et al.* 2006].

Erstmals gelang es Neuber und Mitarbeitern 2006 CD28-Autoantikörper auch in Seren von Patienten mit Erkrankungen aus dem atopischen Formenkreis nachzuweisen. Sie nahmen an, dass diese Antikörper T-Zellen stimulieren und somit eine Rolle in der Entstehung chronisch allergischer Erkrankungen spielen. *In vitro* steigerten CD28-Antikörper-haltige Seren signifikant die Proliferation von T-Zellen, wodurch diese Annahme weiter bestärkt wurde [NEUBER *et al.* 2006].

Generell ist es denkbar, dass sowohl inhibitorische als auch stimulierende CD28-Antikörper existieren. Eine Aktivierung von T-Effektor-Zellen durch diese Antikörper würde dann zur Stimulierung des Immunsystems führen, während die Stimulation regulatorischer T-Zellen eine Verminderung der Immunantwort zur Folge hätte. Auch eine dosisabhängige Änderung des Wirkmechanismus ist denkbar. So könnte es sein, dass superagonistische CD28-Antikörper normalerweise regulatorische T-Zellen aktivieren und damit immunsuppressiv wirken, in hoher Dosierung jedoch auch T-Effektor-Zellen stimulieren und zur Immunaktivierung beitragen [MARSHALL 2006]. Inhibitorische Antikörper würden immer immunsuppressive Wirkungen haben.

In der Gruppe der Patienten mit malignem Melanom und der Gruppe der Patienten mit Virushepatitis konnte anhand der hier präsentierten Daten ein signifikant höheres Auftreten von CD28-Autoantikörpern festgestellt werden als in den anderen untersuchten Kontrollgruppen. Eine mögliche Ursache für die vermehrte Bildung von CD28-Antikörpern in den Gruppen der Melanom- und Hepatitispatienten könnte die Interferontherapie sein. Alle Hepatitispatienten und 120 der Melanompatienten erhielten aktuell oder in der Vergangenheit eine Interferontherapie. Betrachtete man ausschließlich die Gruppe der Melanompatienten, konnte jedoch kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Therapie mit Interferon und dem Auftreten von CD28-Antikörpern festgestellt werden, was möglicherweise jedoch an der zu geringen Fallzahl liegt. Bezogen auf alle untersuchten Kontrollgruppen, war das Auftreten von CD28-Antikörpern bei Patienten, welche Interferon erhielten, signifikant höher ($p < 0,001$ Chi-Quadrat-Test). Wenn also eine Interferontherapie die Entstehung von CD28-Antikörpern begünstigt und letztere zur Immunsuppression durch Aktivierung von regulatorischen T-Zellen führen, sollte die Fortsetzung einer adjuvanten Interferontherapie bei Melanompatienten, welche im Verlauf CD28-Antikörper entwickeln, kritisch überdacht werden. Dies gilt vor allem, da in dieser Studie das Auftreten von CD28-Antikörpern mit einem erhöhten Risiko vergesellschaftet war, an der Melanomerkrankung zu versterben.

Sowohl bei Multipler Sklerose als auch chronischer Hepatitis C konnte ein Zusammenhang mit einer veränderten Signalübertragung durch Interferon hergestellt werden [FENG *et al.* 2002; HE *et al.* 2006]. Crichtley-Thorne *et al.* konnten eine verminderte Signalübertragung durch Interferon-alpha in T- und B-Zellen bei Tumorpatienten nachweisen [CRITCHLEY-THORNE, SIMONS *et al.* 2009]. Um eine vollständige Immunantwort zu erreichen, benötigen CD8-positive T-Zellen ein drittes Signal zusätzlich zur Stimulation durch das Antigen und durch Co-Stimulatoren. Interferon kann als dieses dritte Signal fungieren und eine vollständige Immunantwort ermöglichen [CURTSINGER, VALENZUELA *et al.* 2005; CRITCHLEY-THORNE, SIMONS *et al.* 2009].

Eine weitere Studie an Melanompatienten zeigte ebenfalls, dass Defekte in der Interferon-Signalübertragung einen wichtigen Aspekt für den Progress von Melanomen darstellen. Dabei konnten zwei Subgruppen von Melanompatienten unterschieden werden. Ein Teil der Patienten sprach auf die Gabe von Typ 1 Interferon an, zwei Drittel der Patienten zeigte ein vermindertes Ansprechen auf die Interferontherapie. Bei dieser Gruppe der Low-Responder zeigten sich funktionelle Störungen der T-Zellen, unter anderem eine verminderte T-Zell-Aktivierung und eine verringerte Lebensdauer der T-Zellen nach Stimulierung durch anti-CD3- und anti-CD28-Antikörper. Diese erheblichen funktionellen Störungen beruhen vermutlich auf einem verminderten Ansprechen auf Interferon. Das Resultat ist ein Fehlen des dritten Signals, welches nötig ist für die Differenzierung, die Entwicklung und das Überleben der Gedächtnis- und Effektorzellen [CRITCHLEY-THORNE, YAN *et al.* 2007].

Es wäre denkbar, dass eine solche Funktionsstörung der T-Zellen mit verminderter Interferon-Signalübertragung durch eine möglicherweise immunsuppressive Wirkung der CD28-Antikörper noch verstärkt wird. Das könnte für entsprechend disponierte Patienten auch *in vivo* eine Gefahr darstellen.

Verlieren T-Zellen ihre CD28-Rezeptoren oder werden diese inaktiv, verlieren die Zellen ihre Fähigkeit zu klonaler Expansion und neigen, insbesondere in Kombination mit erhöhter Expression von CD95, vermehrt zur Apoptose [EFFROS 2000]. Bouwhuis *et al.* stellten in ihrer Studie bei Melanompatienten mit Polymorphismen des CD28-Gens ein verkürztes progressfreies Überleben

fest [BOUWHUIS *et al.* 2012].

In Anbetracht dieser Beobachtungen stellt sich die Frage, ob CD28-Serumantikörper bei Melanompatienten einen ähnlichen Effekt haben, indem sie die ordnungsgemäße Funktion der CD28-Rezeptoren behindern oder blockieren. Hier sind weitere T-Zell-Assays nötig, um zu prüfen, ob und inwieweit CD28-Antikörper hemmend oder aktivierend auf T-Zellen einwirken.

Die vorliegenden Daten zeigen, dass das Vorhandensein von CD28-Autoantikörpern bei Melanompatienten mit einem signifikant erhöhten Risiko, an der Erkrankung zu versterben, vergesellschaftet ist. Daher könnten diese Antikörpernachweise in Zukunft möglicherweise dazu genutzt werden, diejenigen Melanompatienten zu erkennen, bei welchen ein erhöhtes Risiko für einen Progress vorliegt.

Die Frage, ob Autoimmunphänomene positive Auswirkungen auf das Überleben von Melanompatienten haben, wurde in letzter Zeit kontrovers diskutiert. Gogas *et al.* stellten fest, dass Autoimmunphänomene, wie zum Beispiel das Auftreten von Schilddrüsenautoantikörpern bei Melanompatienten, unter Interferontherapie mit einem verlängerten Gesamt- und progressfreien Überleben vergesellschaftet sind [GOGAS *et al.* 2006]. Die Gruppe um Stuckert konnte diese Beobachtungen durch ihre Ergebnisse weiter untermauern [STUCKERT, TARHINI *et al.* 2007].

In verschiedenen EORTC-Studien untersuchten BOUWHOUIS *et al.* 220 Melanompatienten, die mit Interferon behandelt wurden. Zu Beginn der Studie wies keiner der Patienten Autoantikörper im Serum auf. Bei Patienten, die mit pegyliertem Interferon behandelt wurden, konnte vermehrt ein Auftreten von Autoantikörpern festgestellt werden [BOUWHUIS *et al.* 2010]. Das Vorliegen von Autoantikörpern war jedoch nur dann prognostisch relevant, wenn der sogenannte Guarantee-time-bias nicht berücksichtigt wurde. Guarantee-time bedeutet, dass Patienten, die eine längere Überlebenszeit haben, auch länger Zeit haben, Autoantikörper zu entwickeln, während Patienten mit Frührezidiven oder einer frühen Progression ihres malignen Melanoms aufgrund der verkürzten Zeit, in der sich die Antikörper bilden können, eher seronegativ sind. Sobald dies in Be-

tracht gezogen wurde, konnte kein signifikanter Zusammenhang mehr zwischen dem Auftreten von Autoantikörpern und der Prognose festgestellt werden [BOUWHUIS *et al.* 2009; BOUWHUIS *et al.* 2012]. Die Autoren schlossen daraus, dass der Nachweis von Autoantikörpern kein positiver prognostischer Faktor für Melanompatienten unter Interferontherapie ist. Weitere Studien konnten zeigen, dass Autoimmunphänomene häufiger bei Patienten zu beobachten sind, die eine Immuntherapie jedweder Form erhalten, sei es eine Interleukin-, Interferon- oder anti-CTLA-4-Behandlung. Allerdings bestand auch hier bezüglich Interleukin- und Interferontherapie nur dann ein Zusammenhang zwischen dem Ansprechen auf die Therapie und den Autoimmuneffekten, wenn der Garantie-ti-me-bias nicht berücksichtigt wurde [BOUWHUIS *et al.* 2011].

Auch PFÖHLER *et al.* konnten zeigen, dass Autoimmunphänomene bei Melanompatienten nicht immer mit einem längeren Überleben vergesellschaftet sind. Sie fanden keinen Unterschied für das progressfreie Überleben und Gesamtüberleben für Patienten mit und ohne anti-retinale Serumantikörper. Es zeigte sich jedoch eine Tendenz zu verlängertem progressfreiem und Gesamtüberleben bei Patienten ohne anti-retinale Antikörper [PFÖHLER, SCHMALTZ *et al.* 2008].

In der vorliegenden Studie konnte für Melanompatienten mit und ohne Nachweis von CD28-Antikörpern kein Unterschied bezüglich des progressfreien Überlebens und des Gesamtüberlebens festgestellt werden. An dem Ergebnis änderte sich auch dann nichts, wenn das Auftreten von CD28-Autoantikörpern als zeitabhängiger Faktor in die Überlebenszeitanalyse mittels Cox-Regression einfluss.

Bislang ist unklar, welche Konditionen die Bildung von CD28-Antikörpern bei Melanompatienten begünstigen, jedoch ist denkbar, dass eine Therapie mit Interferonen ein möglicher Faktor ist, wie mit Hilfe der vorliegenden Daten gezeigt werden konnte. Diese Hypothese wird auch dadurch unterstützt, dass der Prozentsatz der CD28-Antikörper-positiven Patienten in der Gruppe der Melanom- und Hepatitispatienten gleich hoch ist und dabei gleichzeitig deutlich höher, als

in den anderen Kontrollgruppen. Die Daten zeigen auch, dass das Auftreten von CD28-Antikörpern mit einem erhöhten Risiko vergesellschaftet ist, am malignen Melanom zu versterben. Der Nachweis dieser Antikörper bei Melanompatienten könnte künftig zum einen dazu dienen, Patienten mit einem erhöhten Risiko zu detektieren, zum anderen, den Zeitpunkt zu bestimmen, an dem die Beendigung einer adjuvanten Interferontherapie in Betracht gezogen werden sollte.

6. Anhang

6.1 Auswertungstabelle

Nr.	Sex	ED	Typ	TD	Stadium	AK	Prog.	Verst.	IFN
1	1	01.06.2002	1	1,60	1	1	2	0	1
2	1	01.06.2001	2	2,75	2	1	2	0	1
3	2	01.05.2001	2	3,70	2	1	1	0	1
4	1	01.02.2004	2	1,50	2	0	2	0	1
5	1	01.06.2001	2	2,04	3	1	1	0	1
6	1	01.12.2002	4	5,00	2	0	1	0	1
7	2	01.10.2001	1	2,40	2	0	2	0	1
8	2	01.07.2003	2	3,45	3	0	2	0	1
9	2	01.04.2004	2	4,00	2	0	2	0	1
10	2	01.02.2002	1	3,90	2	0	1	1	1
11	2	01.04.2005	4	3,70	3	1	2	0	1
12	2	01.08.2000	2	1,12	2	0	1	0	1
13	1	01.09.1991	1	1,40	3	1	2	0	1
14	1	01.03.1994	1	1,80	3	0	2	0	1
15	1	01.06.2005	2	2,65	3	0	1	0	1
16	2	01.06.2004	3	1,14	3	1	2	0	1
17	2	01.02.1999	2	,00	2	0	1	0	1
18	1	01.09.2001	4	2,82	3	0	1	0	1
19	1	01.03.2002	2	2,20	2	1	1	0	1
20	2	01.12.2005	1	3,70	3	0	1	1	1
21	2	01.07.1999	1	1,80	4	1	1	1	1
22	2	01.08.2000	1	2,50	3	0	1	1	1
23	2	01.06.2005	2	3,09	3	1	1	1	1
24	1	01.01.2004	4	12,50	3	0	1	1	1
25	1	01.05.2002	1	1,29	3	0	1	1	1
26	1	01.10.2002	1	,89	1	1	1	1	1
27	2	01.01.1978	6	,00	3	0	1	1	1
28	1	01.11.2003	6	,00	4	1	1	1	0
29	2	01.11.2002	2	3,60	1	0	1	1	0
30	2	01.09.1998	1	1,10	4	1	1	1	1

31	2	01.05.1996	2	2,00	4	0	1	0	1
32	2	01.09.2009	1	1,41	1	0	2	0	0
33	1	01.02.2006	1	1,12	1	0	2	0	0
34	1	01.08.2009	2	10,00	2	1	2	0	0
35	1	01.09.2006	2	3,00	3	0	1	0	1
36	1	01.03.2006	1	1,10	3	1	1	1	1
37	2	01.08.2008	4	1,20	1	0	2	0	0
38	1	01.12.2007	6	,95	3	0	1	0	0
39	1	01.04.2005	2	1,00	3	0	2	0	1
40	1	01.05.2008	2	5,04	2	0	2	0	1
41	2	01.02.2007	1	,80	1	0	2	0	0
42	2	01.12.2004	6	,00	4	0	2	0	1
43	2	01.06.2005	2	3,55	4	0	2	0	0
44	2	01.07.2005	1	1,10	1	1	2	0	0
45	1	01.06.2009	1	1,10	1	0	2	0	0
46	1	01.08.2003	2	11,00	4	0	2	0	0
47	2	01.06.2008	2	,95	1	0	2	0	0
48	1	01.08.2008	1	1,80	2	0	2	0	0
49	1	01.04.2006	2	1,06	1	0	2	0	0
50	1	01.09.2004	2	1,80	4	0	1	0	1
51	1	01.03.2006	1	2,20	2	0	2	0	1
52	1	01.02.2006	2	8,00	2	1	2	0	1
53	2	01.12.2005	2	1,45	3	0	2	0	1
54	1	01.09.2006	2	2,20	2	0	2	0	1
55	2	01.12.2005	2	3,80	2	0	2	0	1
56	2	01.02.2007	1	,90	1	0	2	0	0
57	1	01.05.2002	2	3,70	3	0	1	0	1
58	2	01.07.2008	2	1,20	3	0	2	0	1
59	1	01.12.2005	3	,00	3	0	2	0	1
60	2	01.06.2008	2	3,00	2	0	2	0	1
61	1	01.09.2009	2	2,50	3	1	2	0	1
62	1	01.02.2008	2	,90	3	1	2	0	0
63	2	01.02.2007	7	1,30	1	0	2	0	0
64	1	01.07.2006	2	5,00	2	0	2	0	1
65	1	01.11.2009	1	1,27	1	0	2	0	0
66	2	01.08.2008	1	,95	1	0	2	0	0
67	2	01.02.2008	2	3,00	3	0	2	0	0
68	1	01.01.2006	6	,00	4	1	2	0	0
69	1	01.04.2009	1	1,40	1	0	2	0	0

70	2	01.02.2007	2	3,20	4	0	2	0	1
71	2	01.07.2009	7	12,00	2	0	2	0	1
72	2	01.02.2007	2	1,14	3	0	2	0	0
73	1	01.10.2008	1	2,50	2	0	2	0	1
74	2	01.01.2008	2	2,00	1	1	2	0	1
75	2	01.07.2006	1	,64	3	0	2	0	0
76	1	01.05.2007	6	,86	1	0	2	0	0
77	2	01.08.1995	1	1,05	4	0	2	0	0
78	1	01.10.2002	2	4,00	2	0	2	0	1
79	1	01.07.2003	2	1,60	3	1	2	0	0
80	2	01.05.2004	2	3,00	3	0	2	0	0
81	2	01.08.2008	2	7,00	3	0	1	1	1
82	2	01.04.2008	4	4,20	3	0	2	0	0
83	2	01.12.2004	7	,00	5	0	2	0	1
84	1	01.09.2005	1	,70	1	0	2	0	0
85	1	01.07.2005	6	,00	4	1	2	0	0
86	1	01.10.1996	2	1,30	4	0	2	0	1
87	2	01.10.2004	5	5,50	3	0	1	0	1
88	1	01.09.2003	1	1,30	3	0	1	0	0
89	1	01.05.2007	6	1,20	2	0	2	0	1
90	1	01.03.2009	6	18,00	3	0	1	0	1
91	2	01.06.2002	1	1,80	3	1	2	0	1
92	1	01.10.2009	2	1,10	1	0	2	0	0
93	1	01.05.2007	2	2,50	2	0	2	0	1
94	2	01.07.2004	4	1,50	3	1	2	0	1
95	1	01.10.2008	1	1,20	3	1	2	0	0
96	1	01.10.2009	6	5,00	3	0	1	1	0
97	1	01.10.2006	1	1,50	1	0	2	0	0
98	1	01.09.2006	2	1,65	3	0	2	0	1
99	1	01.05.2006	6	5,00	3	0	2	0	1
100	1	01.09.2008	6	5,00	4	0	1	0	0
101	1	01.09.2009	1	2,63	3	0	2	0	1
102	2	01.02.2008	6	,00	4	0	2	0	1
103	2	01.01.2004	1	3,40	4	1	2	0	0
104	1	01.08.2007	1	1,04	1	1	2	0	0
105	2	01.08.2006	2	2,56	3	0	1	0	1
106	1	01.05.2010	2	1,80	1	0	2	0	0
107	1	01.07.2008	1	1,15	1	0	1	0	0
108	1	01.01.1988	6	5,00	3	0	2	0	1

109	2	01.02.2010	2	6,80	2	0	2	0	0
110	2	01.05.2009	2	1,60	1	1	2	0	0
111	1	01.11.2009	6	3,29	2	0	2	0	1
112	1	01.08.2007	2	1,50	1	0	2	0	1
113	2	01.07.2008	2	6,00	2	0	2	0	1
114	2	01.05.2008	1	1,50	3	0	2	0	1
115	1	01.11.2004	2	3,80	3	1	2	0	1
116	2	01.05.2008	6	,00	4	0	1	1	0
117	1	01.05.2000	2	1,80	3	0	1	1	0
118	1	01.03.2010	1	1,10	1	0	2	0	0
119	1	01.05.2005	2	4,50	3	0	2	1	1
120	1	01.06.2006	2	2,90	3	0	2	0	1
121	1	01.09.2008	2	1,25	1	0	2	0	0
122	1	01.03.2008	1	1,03	3	0	1	1	0
123	1	01.10.2006	5	5,00	3	0	2	0	0
124	2	01.05.2005	1	,95	1	0	2	0	0
125	1	01.03.2009	4	1,30	1	0	2	0	0
126	1	01.11.2007	1	2,20	3	0	2	0	0
127	2	01.11.2009	2	1,70	3	0	2	0	1
128	1	01.05.2010	2	1,33	2	0	2	0	0
129	2	01.06.2004	2	1,13	2	0	2	0	0
130	2	01.05.2009	3	2,40	2	1	2	0	0
131	2	01.12.2008	2	,80	1	0	2	0	0
132	2	01.12.2006	6	1,10	1	0	2	0	0
133	2	01.11.2005	1	,40	1	0	2	0	0
134	2	01.03.2006	1	2,35	2	0	2	0	1
135	2	01.01.2007	1	1,40	1	0	2	0	0
136	2	01.03.2008	2	8,00	2	0	1	0	1
137	2	01.08.2008	1	1,10	4	0	1	0	1
138	1	01.06.2010	2	4,05	2	1	2	0	0
139	1	01.06.2007	1	1,60	3	0	1	0	1
140	1	01.07.2006	7	5,10	2	0	2	0	1
141	1	01.03.2010	5	1,65	3	0	2	0	0
142	1	01.08.2006	4	5,00	2	0	2	0	1
143	1	01.11.2008	2	,80	1	0	2	0	0
144	1	01.07.2006	1	3,20	2	0	2	0	1
145	1	01.11.2009	2	2,15	2	0	2	0	1
146	2	01.05.2010	2	1,20	1	0	2	0	0
147	2	01.09.2009	2	1,75	3	0	1	0	1

148	2	01.12.2009	2	3,90	2	1	2	0	0
149	2	01.02.2008	2	,82	1	0	2	0	0
150	1	01.02.2005	5	2,70	4	0	1	0	1
151	1	01.11.2007	2	2,12	3	0	1	0	1
152	2	01.04.2007	2	5,00	2	0	2	0	1
153	1	01.03.2007	4	1,60	1	0	2	0	1
154	2	01.12.2009	3	,90	1	0	2	0	0
155	1	01.01.2006	6	,65	1	1	2	0	0
156	2	01.09.2006	1	1,30	2	0	2	0	0
157	2	01.07.2006	1	,60	1	0	2	0	0
158	1	01.05.2006	1	,88	3	0	2	0	0
159	1	01.01.2008	1	1,20	1	0	2	0	0
160	2	01.12.2009	1	3,90	3	0	1	0	1
161	1	01.05.2007	2	3,00	2	0	2	0	0
162	1	01.08.2008	6	,00	4	0	2	0	0
163	2	01.01.2006	1	,56	3	0	2	0	1
164	1	01.01.2009	1	,85	1	0	2	0	0
165	1	01.09.2007	1	1,30	1	0	2	0	0
166	1	01.03.2010	5	6,60	3	0	2	0	1
167	2	01.03.2007	2	1,30	3	0	2	0	0
168	2	01.05.2006	1	5,50	2	0	2	0	1
169	2	01.06.2006	1	,96	1	1	2	0	0
170	2	01.10.2009	2	10,00	3	0	2	0	1
171	2	01.07.1988	6	1,68	3	1	2	0	0
172	2	01.08.2006	5	,00	5	0	2	0	0
173	1	01.10.2009	1	1,10	3	0	2	0	1
174	1	01.03.2006	7	6,50	4	0	1	0	1
175	1	01.12.2009	7	3,10	2	0	2	0	0
176	2	01.02.2010	6	,45	1	0	2	0	0
177	2	01.02.2006	6	,00	4	0	2	0	0
178	2	01.10.2007	2	1,65	4	0	2	0	1
179	1	01.03.2009	1	3,52	2	0	2	0	1
180	1	01.06.2009	6	,00	4	0	2	0	0
181	1	01.02.2006	1	1,20	2	0	2	0	0
182	1	01.07.2006	6	2,80	2	0	2	0	1
183	1	01.10.2006	3	1,10	1	1	2	0	0
184	2	01.04.2002	2	1,15	1	0	2	0	0
185	2	01.08.1997	2	1,35	3	0	2	0	0
186	2	01.06.2008	1	1,50	1	0	2	0	1

187	2	01.05.2007	1	,85	1	1	2	0	0
188	1	01.06.2007	4	3,20	2	0	2	0	0
189	2	01.02.2003	2	1,45	3	0	2	0	1
190	1	01.12.2009	2	,80	1	0	2	0	0
191	2	01.09.2006	4	3,00	2	0	2	0	0
192	1	01.08.2007	7	1,10	1	1	2	0	0
193	2	01.09.2007	1	,95	3	0	1	0	0
194	2	01.01.1999	6	,00	3	0	2	0	0
195	1	01.09.2009	6	1,20	1	0	2	0	0
196	2	01.02.2009	2	2,50	3	0	2	0	1
197	2	01.06.2008	1	1,20	1	0	2	0	0
198	1	01.01.2007	1	,65	1	0	2	0	0
199	1	01.06.2008	1	1,45	1	0	2	0	0
200	2	01.03.2010	4	12,00	2	0	2	0	0
201	1	01.04.2008	2	1,83	3	0	2	1	1
202	2	01.03.2006	1	4,50	2	0	2	0	1
203	1	01.05.2008	2	3,35	2	0	2	0	1
204	1	01.08.2008	1	1,20	1	0	2	0	0
205	2	01.10.2009	2	3,00	3	0	2	0	1
206	1	01.09.2007	2	3,80	3	0	1	0	1
207	1	01.02.2007	2	1,30	1	0	2	0	0
208	2	01.05.2004	7	2,30	2	0	2	0	1
209	1	01.05.2008	2	3,00	3	0	2	0	1
210	1	01.05.2010	2	,90	1	0	2	0	0
211	1	01.05.2009	6	8,00	2	0	2	0	1
212	1	01.11.2007	1	1,70	3	0	2	0	1
213	2	01.06.2006	2	1,20	2	0	2	0	0
214	2	01.10.2008	2	8,00	3	0	2	0	1
215	2	01.08.2006	5	1,80	3	0	2	0	1
216	1	01.07.2006	2	5,00	4	0	1	1	0
217	1	01.07.2008	2	2,10	2	0	2	0	0
218	2	01.07.2009	1	2,00	1	0	2	0	1
219	2	01.05.2007	2	,90	1	0	2	0	0
220	1	01.03.2010	6	2,40	3	0	2	0	1
221	2	01.06.2008	2	6,70	2	0	2	0	1
222	1	01.05.2006	1	,88	3	0	1	0	0
223	1	01.06.2004	1	,51	2	0	2	0	1
224	1	01.09.2007	2	4,00	2	1	2	0	1
225	2	01.12.2007	7	,70	1	0	2	0	0

226	2	01.10.1996	7	,00	4	1	1	1	0
227	2	01.09.1992	7	,00	4	1	1	1	1
228	2	01.08.2002	2	7,50	3	0	2	0	1
229	1	01.05.2009	2	4,50	2	0	2	0	1
230	1	01.06.2009	5	8,00	4	0	1	1	1

Tab. 15: Individuelle Daten der in die Studie eingeschlossenen Patienten

Sex = Geschlecht (1 = weiblich, 2 = männlich)

ED = Zeitpunkt der Erstdiagnose

Typ = Melanomtyp (1 = SSM, 2 = NMM, 3 = LMM, 4 = ALM, 5 = UCM, 6 = AMM,

7 = andere, 8 = unbekannt)

TD = Tumordicke nach Breslow in mm

Stadium = Tumorstadium gemäß AJCC 2002 bei der Serumentnahme

AK = CD28-Autoantikörper im Serum (0 = keine Antikörper, 1 = Antikörper vorhanden)

Prog. = Progress nach Serumentnahme (1 = ja, 2 = nein)

Verst. = Verstorben während des Beobachtungszeitraumes (1 = verstorben,

0 = nicht verstorben)

IFN = Interferontherapie erhalten (1 = ja, 0 = nein)

7. Literaturverzeichnis

1. Ascierto PA, Kirkwood JM (2008) Adjuvant therapy of melanoma with interferon: lessons of the past decade. *J Transl Med* 6: 62
2. Asnis GM, De la Garza R, Kohn SR, Reinus JF, Henderson M, Shah J (2003) IFN-induced depression: a role for NSAIDs. *Psychopharmacol Bull* 37(3): 29-50
3. Bakacs T, Mehrishi J, Moss R (2011) Ipilimumab (Yervoy) and the TGN1412 catastrophe. *Immunobiology* doi: 10.1016/j.imbio.2011.07.005
4. Beyersdorf N, Gaupp S, Balbach K, Schmidt J, Toyka KV, Lin CH, Hanke T, Hünig T, Kerkau T, Gold R (2005) Selective targeting of regulatory T cells with CD28 superagonists allows effective therapy of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 202(3): 445-55
5. Bouwhuis MG, Suci S, Colette S, Amdal S, Kruit WH, Bastholt L, Stierner U, Sales F, Patel P, Punt CJ, Hernberg M, Spatz A, Ten Hagen TL, Hansson J, Eggermont AM (2009) Autoimmune antibodies and recurrence-free interval in melanoma patients treated with adjuvant interferon. *J Natl Cancer Inst* 101(12): 869-77
6. Bouwhuis MG, Suci S, Testori A, Kruit WH, Sales F, Patel P, Punt CJ, Santinami M, Spatz A, Ten Hagen TL, Eggermont AM (2010) Phase III trial comparing adjuvant treatment with pegylated interferon Alfa-2b versus observation: prognostic significance of autoantibodies--EORTC 18991. *J Clin Oncol* 28(14): 2460-6
7. Bouwhuis MG, Ten Hagen TL, Suci S, Eggermont AM (2011) Autoimmunity and treatment outcome in melanoma. *Curr Opin Oncol* 23(2): 170-6
8. Braun-Falco O, Plewig G, Wolff HH, Burgdorf WHC, Landthaler M (eds) (2005) *Dermatologie und Venerologie*, 5. Auflage, Springer Medizin Verlag, Heidelberg
9. Cameron DA, Cornbleet MC, MacKie RM, Hunter JA, Gore M, Hancock B, Smyth JF (2001) Adjuvant interferon alpha 2b in high risk melanoma - the Scottish study. *Br J Cancer* 84: 1146-1149
10. Coit DG, Rogatko A, Brennan MF (1991) Prognostic factors in patients with melanoma metastatic to axillary or inguinal lymph nodes. A multivariate analysis. *Ann Surg* 214: 627-636
11. Critchley-Thorne R, Yan N, Nacu S, Weber J, Holmes S, Lee P (2007) Down-Regulation of the Interferon signaling pathway in T lymphocytes from patients with

-
- metastatic melanoma. *PLoS Med* 4(5): e176
12. Critchley-Thorne RJ, Simons DL, Yan N, Miyahira AK, Dirbas FM, Johnson DL, Swetter SM, Carlson RW, Fisher GA, Koong A, Holmes S, Lee PP (2009) Impaired interferon signaling is a common immune defect in human cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(22): 9010–9015
 13. Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T (2005) Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med* 353: 621- 47
 14. Curtsinger JM, Valenzuela JO, Agarwal P, Lins D, Mescher MF (2005) Type I IFNs provide a third signal to CD8 T cells to stimulate clonal expansion and differentiation. *J Immunol* 174(8):4465-9
 15. Desmond RA, Soong SJ (2003) Epidemiology of malignant melanoma. *Surg Klin North Am.* 83: 1-19
 16. Eastwood D, Findlay L, Poole S, Bird C, Wadhwa M, Moore M, Burns C, Thorpe R, Stebbings R (2010) Monoclonal antibody TGN1412 trial failure explained by species differences in CD28 expression on CD4⁺ effector memory T-cells. *Br J Pharmacol* 161(3): 512-26
 17. Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A (eds) (2010) AJCC Cancer Staging Manual, 7th Edition, Springer Verlag, New York
 18. Effros RB (2000) Long-term immunological memory against viruses. *Mech Ageing Dev* 121: 161-71
 19. Eigentler TK, Caroli UM, Radny P *et al.* (2003) Palliative therapy of disseminated malignant melanoma: a systematic review of 41 randomised clinical trials. *Lancet Oncol* 4: 748–59
 20. Fears TR, Bird CC, Guerry D 4th, Sagebiel RW, Gail MH, Elder DE, Halpern A, Holly EA, Hartge P, Tucker MA (2002) Average midrange ultraviolet radiation flux and time outdoors predict melanoma risk. *Cancer Res* 69: 3992- 3996
 21. Feng X, Petraglia AL, Chen M, Byskosh PV, Boos MD, Reder AT (2002) Low expression of interferon-stimulated genes in active multiple sclerosis is linked to subnormal phosphorylation of STAT1. *J Neuroimmunol* 129(1-2): 205-15.
 22. Fisher R, Larkin J (2012) Vemurafenib: a new treatment for BRAF-V600 mutated advanced melanoma. *Cancer Manag Res* 4: 243-52
 23. Garbe C, Blum A (2001) Epidemiology of Cutaneous Melanoma in Germany and

-
- Worldwide. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 14(5): 280-90
24. Garbe C, Büttner P, Weiss J, Soyer HP, Stocker U, Kruger S, Roser M, Weckbecker J, Panizzon R, Bahmer F, *et al.* (1994) Risk factors for developing cutaneous melanoma and criteria for identifying persons at risk: multicenter case-control study of the Central Malignant Melanoma Registry of the German Dermatological Society. *J Invest Dermatol* 102: 695-699
 25. Garbe C, Dummer R, Kaufmann R, Tilgen W (eds) (1997) Dermatologische Onkologie. Springer Verlag, Berlin
 26. Garbe C, Hauschild A *et al.* (2005) Leitlinie Malignes Melanom Vers. 15, Arbeitsgemeinschaft dermatologische Onkologie (ADO)
 27. Garbe C, Peris K, Hauschild A, Saiag P, Middleton M, Spatz A, Grob J, Malveyh, J, Newton-Bishop J, Stratigos A, Pehamberger H, Eggermont AM (2012) Diagnosis and treatment of melanoma. European consensus-based interdisciplinary guideline-update 2012. *Eur J Cancer* 48(15): 2375-90
 28. Garbe C, Schadendorf D, Stolz W *et al.* (2008) Kurzleitlinie – Malignes Melanom der Haut. *JDDG* 6: Supp 1: S20–6
 29. Garbe C, Terheyden P, Keilholz U, Kölbl O, Hauschild A (2008) Therapie des Melanoms. *Dtsch Arztebl* 105(49): 845-51
 30. Gershenwald JE, Thompson W, Mansfield PF *et al.* (1999) Multi-institutional melanoma lymphatic mapping experience: the prognostic value of sentinel lymph node status in 612 stage I or II melanoma patients. *J Clin Oncol* 17: 976–83
 31. Gogas H, Ioannovich J, Dafni U, Stavropoulou-Giokas C, Frangia K, Tsoutsos D, Panagiotou P, Polyzos A, Papadopoulos O, Stratigos A, Markopoulos C, Bafaloukos D, Pectasides D, Fountzilias G, Kirkwood JM (2006) Prognostic significance of autoimmunity during treatment of melanoma with interferon. *N Engl J Med* 354(7): 709-18
 32. Greene FL, Compton CC, Fritz AG, Shah JP, Winchester DP (eds) (2006) AJCC Cancer Staging Atlas, Springer Verlag, New York
 33. Greene FL, Page DL, Fleming ID, Fritz A, Balch CM, Haller DG, Morrow M (eds) (2002) AJCC Cancer Staging Manual, 6th Edition, Springer Verlag, New York
 34. Greene MH, Clark WHJ, Tucker MA, Kraemer KH, Elder DE, Fraser MC (1985) High risk of malignant melanoma in melanoma-prone families with dysplastic nevi.

Ann Intern Med 102: 458-465

35. Grob JJ, Dreno B, de la Salmoniere P, Delaunay M, Cupissol D, Guillot B, Souteyrand P, Sassolas B, Cesarini JP, Lionnet S, Lok C, Chastang C, Bonerandi JJ (1998) Randomised trial of interferon alpha-2b as adjuvant therapy in resected primary melanoma thicker than 1.5 mm without clinically detectable node metastases. *Lancet* 351(9120): 1905–1910
36. Guillot B, Blazquez L et al, Bessis D, Dereure O, Guilhaud JJ (2004) A Prospective Study of Cutaneous Adverse Events Induced by Low-Dose Alpha- Interferon Treatment for Malignant Melanoma. *Dermatology* 208: 49-54
37. Hauschild A, Eiling S, Lischner S et al. (2001) Safety margins in the excision of primary malignant melanoma. Proposals based on controlled clinical trials. *Hautarzt* 52: 1003–10
38. He XS, Ji X, Hale MB, Cheung R, Ahmed A, Guo Y, Nolan GP, Pfeffer LM, Wright TL, Risch N, Tibshirani R, Greenberg HB (2006) Global transcriptional response to interferon is a determinant of HCV treatment outcome and is modified by race. *Hepatology* 44: 352-9
39. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, Gonzalez R, Robert C, Schadendorf D, Hassel JC, Akerley W, van den Eertwegh AJ, Lutzky J, Lorigan P, Vaubel JM, Linette GP, Hogg D, Ottensmeier CH, Lebbé C, Peschel C, Quirt I, Clark JI, Wolchok JD, Weber JS, Tian J, Yellin MJ, Nichol GM, Hoos A, Urban WJ (2010) Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 363(8): 771-23
40. June CH, Ledbetter JA, Linsley PS, Thompson CB (1990) Role of the CD28 receptor in T-cell activation. *Immunol Today* 11(6): 211-6
41. Kaufmann R, Tilgen W, Garbe C (1998) Diagnostische und therapeutische Standards in der Dermatologischen Onkologie. *Hautarzt* 49: 30-38
42. Kirkwood JM, Hunt Strawderman M et al. (1996) Interferon alfa-2b adjuvant therapy of resected cutaneous melanoma: The eastern cooperative oncology group trial EST 1684. *J Clin Oncol* 14(1): 7-17
43. Kittler H, Pehamberger H, Wolff K, Binder M (2002) Diagnostic accuracy of dermoscopy. *Lancet Oncol* 3: 159-165
44. Leiter U, Garbe C (2008) Epidemiology of melanoma and nonmelanoma skin cancer – the role of sunlight. *Adv Exp Med Biol* 624: 89-103

-
45. Maldonado JL, Fridlyand J, Patel H, Jain AN, Busam K, Kageshita T, Ono T, Albertson DG, Pinkel D, Bastian BC (2003) Determinants of BRAF mutations in primary melanomas. *J Natl Cancer Inst* 95(24): 1878-90.
 46. Marshall E (2006) Drug trials. Violent reaction to monoclonal antibody therapy remains a mystery. *Science* 311(5768):1688-9
 47. Neuber K, Mähns B, Hübner C, Gergely H, Weichenthal M (2006) Autoantibodies against CD28 are associated with atopic diseases. *Clin Exp Immunol* 146(2): 262–269
 48. Pehamberger H, Soyer HP, Steiner A, Kofler R, Binder M, Mischer P, Pachinger W, Aubock J, Fritsch P, Kerl H, Wolff K (1998) Adjuvant interferon-alpha2a treatment in resected primary stage II cutaneous melanoma. Austrian Malignant Melanoma Cooperative Group. *J Clin Oncol* 16: 1425–1429
 49. Petrella T, Verma S, Spithoff K, Quirt I, McCready D (2012) Adjuvant Interferon Therapy for Patients at High Risk for Recurrent Melanoma: An Updated Systematic Review and Practice Guideline. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*
 50. Pföhler C, Schmaltz R, Graeber S, Tilgen W (2008) 'Autoimmunity' is not always associated with prolonged survival in melanoma patients. *Br J Dermatol* 159: 735-6
 51. Roche Pharma AG (2011) Fachinformation Roferon-A 18 Mio. I.E./0,6 ml Patrone m it Injektionslösung URL: <http://www.fachinfo.de/FachInfo/data/fi/pdf/00/31/003136.pdf> (20.02.2012)
 52. Robert Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (2012) Krebs in Deutschland 2007/2008, 8. Ausgabe
 53. Schaefer M, Engelbrecht MA, Gut O, Fiebich BL, Bauer J, Schmidt F, Grunze H, Lieb K. (2002) Interferon alpha (IFNalpha) and psychiatric syndromes: a review. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 26 (4): 731-746
 54. Schaefer M, Horn M, Schmidt F, Schmid-Wendtner MH, Volkenandt M, Ackenheil M, Mueller N, Schwarz MJ (2004) Correlation between sICAM-1 and depressive symptoms during adjuvant treatment of melanoma with interferon-alpha. *Brain Behav Immun* 18(6): 555-62
 55. Schaefer M, Schmidt F, Neumer R, Scholler G, Schwarz M (2002) Interferon-alpha, cytokines and possible implications for mood disorders. *Bipolar Disord* 4 Suppl 1: 111-113

-
56. Seegenschmiedt MH, Keilholz L, Pieritz A *et al.* (1999) Lokal rezidiviertes und metastasiertes malignes Melanom. Langzeitergebnisse und Prognosefaktoren nach perkutaner Radiotherapie. *Strahlenther Onkol* 175: 450–7
 57. Staveley-O'Carroll K, Sotomayor E, Montgomery J, Borrello I, Hwang L, Fein S, Pardoll D, Levitsky H (1998) Introduction of antigen-specific T cell anergy: An early event in the course of tumor progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 1178-1183
 58. Stuckert JJ, Tarhini AA, Lee S, Sander C, Kirkwood JM (2007) Interferon alfa-induced autoimmunity and serum S100 levels as predictive and prognostic biomarkers in high-risk melanoma in the ECOG-intergroup phase II trial E2696. *Proc Am Soc Clin Oncol* 25(18): 8506
 59. Suntharalingam G, Meghan F, Perry M, Ward S, Brett SJ, Castello-Cortes A, Brunner MD, Panoskaltsis N (2006) Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *N Engl J Med* 355: 1018-1028
 60. van Schanke A, Jongsma MJ, Bisschop R, van Venrooij GM, Rebel H, de Gruijl FR (2005) Single UVB overexposure stimulates melanocyte proliferation in murine skin, in contrast to fractionated or UVA-1 exposure *J Invest Dermatol* 124(1): 241-7
 61. Viros A, Fridlyand J, Bauer J, Lasithiotakis K, Garbe C, Pinkel D, Bastian BC (2008) Improving melanoma classification by integrating genetic and morphologic features *PLoS Med* 5(6): e120
 62. Wheatley K, Ives N, Eggermont A, Kirkwood J, Cascinelli N, Markovic SN, Hancock B, Lee S, Suci S (2007) Interferon-alpha as adjuvant therapy for melanoma: an individual patient data meta-analysis of randomised trials. *J Clin Oncol* 25: 8526
 63. White RR, Stanley WE, Johnson JL, Tyler D, Seigler HF (2002) Long-term survival in 2,505 patients with melanoma with regional lymph node metastasis. *Ann Surg* 235: 879-887
 64. Woerly G, Roger N, Loiseau S, Dombrowicz D, Capron A, Capron M (1999) Expression of CD28 and CD86 by human eosinophils and role in the secretion of type 1 cytokines (interleukin 2 and interferon gamma): inhibition by immunoglobulin a complexes. *J Exp Med* 190(4):487-95
 65. Wolchok JD, Saenger Y (2008) The mechanism of anti-CTLA-4 activity and the negative regulation of T-cell activation. *Oncologist* 13 Suppl 4: 2-9

8. Dank

Meiner Doktormutter Frau Privatdozentin Dr. Claudia Pföhler danke ich für die Überlassung des interessanten Themas und die ausgesprochen gute Betreuung.

Sehr herzlich danke ich meiner Betreuerin Frau Dr. Rebecca Körner für die stetige Unterstützung und die Zeit, die sie sich genommen hat, um Fragen zu beantworten und Anregungen zu geben sowie für viele aufmunternde Worte.

Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Abteilung Innere Medizin I und des José Carreras Zentrums für Immun- und Gentherapie danke ich dafür, dass sie mir die Ergebnisse aus den Serumproben zur Verfügung gestellt haben.

Für ihre Unterstützung und das Schaffen einer freundlichen Atmosphäre während der Aktendurchsicht danke ich den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie.

Meinen Eltern Marlene und Ardeshir Madjidi danke ich für ihre immerwährende Fürsorge und Unterstützung.

Ebenfalls für ihre großartige Unterstützung danke ich meinen Großeltern Anna und Eustach Dietrich sowie meiner Großtante Maria Dlouhy und meinem Großonkel Franz Dlouhy, ohne die mein Studium nicht möglich gewesen wäre. Nur meine Großmutter durfte das Ende meines Studiums miterleben.

Ganz besonderer Dank gilt meinem Lebensgefährten Wolfgang Schwarz für seine umfassende Unterstützung und stetige Motivation in allen Lebensbereichen. Ohne ihn wäre diese Arbeit nicht entstanden.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Darius Matthias Madjidi
Geburtsdatum	29. November 1982
Geburtsort	Ulm/Donau

Ärztliche Tätigkeit

seit Oktober 2012	Augenarztpraxis Dres. Nietgen, Schütte und Roth, Ulm Assistenzarzt
-------------------	---

Studium

Mai 2012	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und Approbation
2011 – 2012	Praktisches Jahr an der Universität Ulm, Bundeswehrkrankenhaus Ulm
August – Dezember 2009	Auslandssemester an der Universität von Turku, Finnland
April 2008	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2005 – 2010	Studium der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
2003 – 2005	Studium der Sozialwissenschaften an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg (Abschluss des Vordiploms)

Schule und Zivildienst

2002 – 2003	Zivildienst im Ulmer Kinderladen
1993 – 2002	Hans und Sophie Scholl-Gymnasium Ulm