

Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
(Direktor: Prof. Dr. med. Thomas Schwarz)
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**UNTERSUCHUNGEN ZUR
VASKULARISATION UND ANTIANGIOGENESE THERAPIE
BEIM
METASTASIIERTEN MALIGNEN MELANOM**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
ANDRÉ KRATH
aus Kiel

Kiel 2011

1. Berichtstatter: Prof. Dr. med. M. Weichenthal

2. Berichtstatter: Prof. Dr. med. J. Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung: 19.12.2011

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 07.11.2011

gez. Prof. Dr. med. I. Cascorbi

Glossar

bFGF	basic fibroblast growth factor
BSA	bovine serum albumin
CD-31	Cluster of Differentiation 31 (PECAM-1)
D2-40	Anti-Podoplanin-Antikörper
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assays
i.v.	intravenös
kMet	kutane Melanommetastase
LYVE-1	Lymphatic Vessel Endothelial Receptor 1
MM	primäres malignes Melanom
NZN	benigner Navuszellnävus
NH	Normalhaut
PFS	Progression free survival
p.o.	per os
Podoplanin	Transmembranprotein lymphatischer Endothelzellen
VA	vessel area
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VD	vessel density
VS	vessel size
TBS	TRIS-gepufferte Kochsalzlösung
TRIS	Tromethamin (Trishydroxymethylaminomethan)

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	
1.1 Das maligne Melanom.....	1
1.1.1 Fakten.....	1
1.1.2 Charakteristik der Metastasierung.....	1
1.1.3 Prognostische Relevanz der Metastasierung.....	2
1.1.4 Bisherige Therapie.....	3
1.2 Angiogenese und Lymphangiogenese.....	5
1.2.1 Physiologische und pathologische Bedeutung.....	5
1.2.2 Bisherige Erkenntnisse zum malignen Melanom.....	7
1.3 Angiogenese-Inhibitoren.....	8
1.3.1 Wirkmechanismen und klinische Anwendung.....	8
1.3.2 Klinische Studien am malignen Melanom.....	9
1.3.3 PTK/ZK.....	10
2. Ziele der vorliegenden Arbeit.....	12
3. Material und Methoden	
3.1 Analysen zur Angiogenese und Lymphangiogenese in kutanen Melanommetastasen.....	13
3.1.1 Material.....	13
3.1.2 Methodik.....	14
3.1.2.1 Immunhistochemie.....	14
3.1.2.2 Protokoll.....	15
3.1.2.3 Gefäßanalysen.....	16
3.2 Analysen zur Wirkung von PTK/ZK auf metastasierte Melanome.....	18
3.2.1 Material.....	18
3.2.2 Methodik.....	18

3.2.2.1 Immunoassay.....	19
3.2.2.2 Protokoll.....	20
3.3 Statistische Auswertung.....	20
4. Ergebnisse	
4.1 Angiogenese und Lymphangiogenese in kutanen Melanommetastasen.....	21
4.1.1 Angiogenese.....	21
4.1.2 Lymphangiogenese.....	27
4.1.3 Einflussfaktoren.....	29
4.1.3.1 Tumordicke und Ulzeration.....	32
4.2 Wirkung von PTK/ZK auf metastasierte Melanome.....	33
4.2.1 Klinischer Verlauf.....	33
4.2.2 Einfluss auf kutane Melanommetastasen.....	33
4.2.3 VEGF-Plasmakonzentration.....	35
4.3 LYVE-1 positive Makrophagen.....	36
5. Diskussion	38
5.1 Angiogenese und Lymphangiogenese in kutanen Melanommetastasen.....	39
5.2 Einflussfaktoren.....	42
5.3 Antiangiogenesetherapie beim metastasierten malignen Melanom.....	43
5.4 LYVE-1 positive Makrophagen.....	47
6. Zusammenfassung und Ausblick	49
7. Literatur	50
8. Danksagung	59
9. Lebenslauf	60

1. Einleitung

Das maligne Melanom ist ein hochaggressiver Tumor der von Melanozyten ausgeht und sich überwiegend an der Haut manifestiert. Bisher fehlen ausreichend effektive systemische Therapeutika in der Behandlung eines bereits metastasierten schwarzen Hautkrebses. Das Inhibieren der tumorassoziierten Gefäßneubildung stellt einen neuen vielversprechenden Therapieansatz dar.

1.1 Das maligne Melanom

1.1.1 Fakten

Die Inzidenz des malignen Melanoms ist in den letzten Jahrzehnten deutlich gestiegen (Jemal et al., 2008). Weltweit geht man jährlich nun von 160.000 Neuerkrankten aus. Die höchsten Inzidenzraten des malignen Melanoms weisen Länder mit vorwiegend hellhäutiger Bevölkerung wie Australien, Nordamerika und Nordeuropa auf (Parkin et al., 2005). So wurde in den USA fürs Jahr 2009 mit 8650 melanombedingten Todesfällen gerechnet (Jemal et al., 2009). Mit anderen Worten: Jede Stunde stirbt ein US-Bürger an den Folgen seines metastasierten Melanoms. Betroffen sind vor allem Menschen im jungen und mittleren Lebensalter (Geller et al., 2002). Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung liegt das mediane Alter bei 54 Jahren (Buettner et al., 2005). Hohe intermittierende UV-Exposition in der Kindheit sowie eine Vielzahl von gutartigen melanozytären Nävi stellen neben dem hellen Hauttyp die wichtigsten Risikofaktoren dar (Veierod et al., 2003). Beide Geschlechter sind gleichermaßen betroffen.

1.1.2 Charakteristik der Metastasierung

Das Potential zur frühzeitigen Streuung ist beim schwarzen Hautkrebs ausgesprochen hoch. Die Ausbreitung erfolgt zunächst meist lymphogen. Nicht selten gehen lokale, intra-lymphatische Tumordinvasionen dem Befall der drainierenden Lymphknoten voraus. Diese, vorwiegend kutanen Filiae, werden in tumornahe „Satelliten-Metastasen“ und tumorferne „In-transit-Metastasen“ differenziert. Darüber hinaus kann die Ausbreitung des malignen

Melanoms auch primär hämatogen verlaufen. Fernmetastasen befallen häufig Haut, Lunge, Leber, Knochen und Gehirn (Dadras et al., 2005). Prinzipiell können Melanommetastasen aber nahezu in jedes Organ des Körpers streuen.

1.1.3 Prognostische Relevanz der Metastasierung

Die klinische Bewertung eines diagnostizierten malignen Melanoms erfolgt durch das weltweit anerkannte, evidenzbasierte Staging-System des American Joint Committee on Cancer (AJCC) von 2009 (Balch et al., 2009). Vier Tumor-Stadien wurden in diesem System mittels prognostisch hochsignifikanter Kriterien festgelegt und durch die TNM-Klassifikation beschrieben. Je höher das ermittelte Stadium, desto schlechter die Prognose des Patienten. Während die maximale vertikale Tumordicke nach Breslow (Breslow, 1970), das Vorhandensein von Ulzeration und der Mitoseindex das Stadium I und II definieren, werden maligne Melanome allein durch den Nachweis von regionalen Mikro- oder Makrometastasen dem Stadium III und durch den Nachweis von Fernmetastasen dem Stadium IV zugeordnet. Im Stadium IV geht eine erhöhte Laktatdehydrogenase-Konzentration im Blut mit einer weiteren Verschlechterung der Prognose einher. Die histologische Eindringtiefe nach Clark (Clark et al., 1969) findet im aktuellen Staging-System auf Grund fehlender prognostischer Relevanz keine Berücksichtigung mehr. Tabelle 1 zeigt die mittlere 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit (5-JÜW) eines an malignem Melanom erkrankten Patienten unter Berücksichtigung des AJCC-Stadiums zum Zeitpunkt der Diagnosestellung.

Tabelle 1: AJCC-Stadien und deren mittlere 5-JÜW

Stadium	T	N	M	5-JÜW¹
I	T1a – T2a	N0	M0	93 - 97%
II	T2b – T4b	N0	M0	53 - 82%
III	irrelevant	N1a – N3	M0	39 - 70%
IV	irrelevant	irrelevant	M1a – M1c	9 - 27%

¹5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit; vereinfachte Darstellung, Original siehe: (Balch et al., 2001) ;

An Hand der Tabelle 1 wird deutlich, dass für Patienten mit metastasiertem malignen Melanom lediglich die operative R0-Resektion als potentiell kurative Intervention anzusehen ist. So liegt die mittlere Überlebenszeit für Patienten mit zumeist inoperablem AJCC-Stadium IV bei nur etwa 6 bis 9 Monaten (Tarhini and Agarwala, 2006) und die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit bei ungefähr 12 Prozent. Trotz der Erkenntnis, dass durch eine frühzeitige Diagnose des malignen Melanoms die Prognose erheblich verbessert werden kann und trotz der daraus resultierenden weltweiten Zunahme an Screening- und Vorsorgemaßnahmen, werden noch immer eine Vielzahl von Melanomen erst in einem späten, fortgeschrittenem Stadium entdeckt (Demierre et al., 2005).

1.1.4 Bisherige Therapie

Aus medizinischer Sicht ist eine mit hoher Wahrscheinlichkeit kurative Behandlung des malignen Melanoms derzeit nur durch die vollständige Exzision des Primärtumors in einem frühen, nicht metastasierten Stadium möglich. Bis heute verfügt die Dermatologie über kein systemisches Therapieverfahren, welches das Gesamtüberleben von Patienten im fortgeschrittenen Stadium in einem ausreichenden Maße verbessert.

International anerkannte Therapieempfehlungen für das maligne Melanom stellen die auf Evidenz und interdisziplinären Konsens basierenden Leitlinien der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Onkologie (ADO) dar. So sollte jedes diagnostizierte maligne Melanom nach Möglichkeit mit einem durch die Tumordicke bestimmten Sicherheitsabstand zwischen 0,5 cm und 2,0 cm operativ entfernt werden (Garbe et al., 2008a). Liegt die vertikale Tumordicke in der histopathologischen Untersuchung über 1,0 mm oder zeigen sich weitere ungünstige Prognosefaktoren wie Ulzeration, ist zusätzlich eine Sentinel-Node-Biopsie durchzuführen, sofern nicht schon im Rahmen der Ausbreitungsdiagnostik eine Metastasierung nachgewiesen werden konnte (Garbe et al., 2008c). Die Entnahme des Wächterlymphknotens hat vermutlich keine therapeutische Bedeutung, hilft aber eine genauere Prognose für den Patienten abgeben zu können. Ist die Biopsie frei von Mikrometastasen, die Tumordicke jedoch größer als 1,5 mm, wird eine Immuntherapie mit niedrigdosiertem Interferon $\alpha 2$ empfohlen. Prospektive Studien konnten unter dieser Therapie bei jenen Patienten mit sogenannten Hochrisiko-Melanomen (Stadium II) eine zusätzliche Verlängerung der rezidivfreien Überlebenszeit nachweisen (Cameron et al., 2001).

Hat das maligne Melanom ein metastasiertes Stadium erreicht, schwinden die Chancen auf Heilung eines solchen Patienten mit zunehmender Ausbreitung der Filiae. Der Grund dafür liegt zum einen in der hohen Resistenz des fortgeschrittenen Melanoms gegenüber den bisherigen Therapeutika und zum anderen in der hohen Rezidivneigung trotz operativer Intervention. Nicht selten werden Rezidive selbst nach Jahren der Tumorfreiheit diagnostiziert.

Die im Tumorstadium III mit Befall der regionären Lymphknoten empfohlene radikale Lymphadenektomie, welche die krankheitsfreie Überlebenszeit signifikant verlängert (Morton et al., 2006), erzielt vielfach keine Kuration (Garbe and Eigentler, 2007). Studien bezüglich einer postoperativen, adjuvanten Interferontherapie im Stadium III zeigten zwar eine Verbesserung der Rezidiv- und Heilungsrate in einer Subgruppe von Melanompatienten. Diese Subgruppe ist derzeit aber durch keinen Biomarker zu detektieren (Hauschild et al., 2008). Die Frage nach der optimalen Dosierung wird noch kontrovers diskutiert (Rass et al., 2008). Eine Hochdosistherapie mit Interferon α 2b zeigte in bisherigen klinischen Studien aber die deutlichsten Ergebnisse.

Im Tumorstadium IV sind die Möglichkeiten zur Heilung des Patienten meist erschöpft. Nur die radikale Resektion sämtlicher Fernmetastasen kann in seltenen Fällen eine kurative Intervention darstellen (Leo et al., 2000). Disseminierte Fernmetastasen sind aber häufig mit inoperablen Metastasen gleichzusetzen und stellen somit eine Indikation zur palliativen Therapie dar. Neben der operativen Resektion symptomatischer Metastasen, der stereotaktischen Bestrahlung von Hirnfiliae sowie der Radiotherapie von Knochenmetastasen und inoperablen Filiae hat sich bisher die Chemotherapie mit Dacarbazin (DTIC) für die Palliation etabliert. Eine Verlängerung der Gesamtüberlebenszeit konnte jedoch nicht erzielt werden (Garbe et al., 2008b). Neue Chemotherapeutika wie Temozolomid und Fotemustin zeigten in bisherigen Studien erste Vorteile gegenüber DTIC (Avril et al., 2004). Polychemo- und Chemoimmuntherapie selbst in Kombination mit Zytokinen konnten im Vergleich zu einer Monotherapie bisher nur die Remissionsrate nicht aber die Überlebenszeit signifikant erhöhen (Dorval et al., 1999) und werden auf Grund der deutlich höheren Toxizität nur in Einzelfällen empfohlen. Grundsätzlich sinkt die Wirksamkeit einer Chemotherapie mit zunehmender Ausbreitung der Metastasen.

Zwar wurde die Therapie des malignen Melanoms durch die Leitlinien der ADO deutschlandweit an neueste, wissenschaftliche Erkenntnisse angepasst, die Prognose von Patienten mit disseminierten beziehungsweise inoperablen Fernmetastasen ist aber weiterhin infaust. Trotz intensiver Forschung der letzten Jahrzehnte konnte kein entscheidender Durchbruch in

der palliativen Behandlung fortgeschrittener maligner Melanome erzielt werden. Dennoch keimt seit wenigen Jahren neue Hoffnung. Auslöser dafür sind wachsende Erkenntnisse über die melanomspezifische Tumorbilologie, welche der Medizin neue Perspektiven für eine gezielte Therapie („Targeted-Therapie“) eröffnen. Die Targeted-Therapie umfasst eine Vielzahl von innovativen Wirkstoffen mit unterschiedlichsten Angriffsziele auf Pathophysiologie sowie Immunologie des malignen Melanoms. Einen bedeutenden Ansatz stellt dabei die Hemmung der Blut- und Lymphgefäßneubildung mittels Angiogenese-Inhibitoren dar. Grund dafür ist die nachweislich immense Bedeutung von Angiogenese und Lymphangiogenese für Wachstum und Streuung eines jeden Tumors. Eine andere vielversprechende Targeted-Therapie sind c-Kit-Inhibitoren wie Imatinibmesylat, die in Studien an Melanompatienten mit einer nachweislich aktivierenden c-Kit-Mutation ein hohes therapeutisches Ansprechen zeigten (Carvajal et al., 2009). Eindrucksvoll waren auch die Studienergebnisse des selektiven Inhibitors von mutagenem B-Raf PLX4032. Hierbei wiesen siebzig Prozent der Patienten mit V600E-Mutation des B-Raf-Gens eine partielle oder komplette Remission unter einer Monotherapie mit PLX4032 auf (Flaherty et al., 2010). Ebenfalls hohe Erwartungen steckt man in den CTLA-4-Antikörper Ipilimumab. Dieser stimuliert die antitumorale T-Zell-Antwort und zeigte erstmals in einer Phase-III-Studie im Vergleich zu einer Kontrollgruppe mit dem Vakzin gp100 eine signifikante Verlängerung des Gesamtüberlebens von Patienten mit fortgeschrittenem Melanomstadium (Hodi et al., 2010). Da Patienten mit metastasiertem malignen Melanom jedoch derzeit keine bewiesenermaßen effektive Standardtherapie angeboten werden kann, muss die Behandlung im Rahmen klinischer Studien als therapeutisches Vorgehen der Wahl angesehen werden.

1.2 Angiogenese und Lymphangiogenese

1.2.1 Physiologische und pathologische Bedeutung

Die Neubildung von Kapillaren aus bestehenden Blutgefäßen wird Angiogenese genannt. Sie ist für Wundheilung ebenso notwendig wie für Menstruation und Embryogenese. Die Regulation der Angiogenese erfolgt durch ein komplexes Zusammenspiel diverser inhibierender und induzierender Faktoren. Eine proangiogenetische Schlüsselfunktion kommt dabei der Vascular-Endothelial-Growth-Factor (VEGF)-Familie zu. Die Signaltransduktion

dieser parakrin sezernierten Wachstumsfaktoren erfolgt über Tyrosinkinase-Rezeptoren, welche vorwiegend auf Endothelzellen exprimiert werden (Ferrara et al., 2003). VEGF-A, von dem bisher fünf Isomere beschrieben wurden, wird in Interaktion mit VEGF-Rezeptor 1 (flt-1), VEGF-Rezeptor 2 (flk-1/KDR) und Neuropilin die größte Bedeutung aller fünf VEGF-Zytokine für die Neubildung sowie Permeabilität von Blutgefäßen zugeschrieben (Ferrara, 2004).

Neben dem physiologischen Nutzen besitzt die Angiogenese aber auch ein enormes pathologisches Potential. So wird die Fähigkeit zur Gefäßneubildung als ein entscheidender Entwicklungsschritt für die Progression von Tumoren angesehen (Naumov et al., 2008). Das zuvor von Diffusion angrenzender Gefäße abhängige Tumorgewebe wird nun mittels neuformierter, einwachsender Kapillaren aktiv mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt. Dies hat ein enormes Wachstum des zuvor nur mikroskopisch detektierbaren Krebses sowie ein erhöhtes Risiko zur hämatogenen Metastasierung zur Folge (Folkman, 2002). Auslöser dieser pathologischen Gefäßneubildung sind neben mechanischem und metabolischem Stress vor allem genetische Mutationen des Tumors, die eine hormonelle Dysbalance zu Gunsten angiogenesestimulierender Faktoren bewirken (Carmeliet and Jain, 2000). So konnte eine erhöhte Sekretion an VEGF-A in einer Vielzahl von malignen Tumoren nachgewiesen werden (Masood et al., 2001). Die Summe der Faktoren, welche zur angiogenetischen Aktivität von Tumoren führt, wird als „angiogenic switch“ bezeichnet (Folkman et al., 1989). Schon 1971 postulierte Judah Folkman die Angiogenese-Abhängigkeit von Tumoren und schlussfolgerte für die Tumorthherapie ein enormes Potential antiangiogenetischer Medikamente (Folkman, 1971). Seither wird die Neubildung von Blutgefäßen in malignen Tumoren intensiv erforscht.

Ebenso steht die Neubildung von Lymphgefäßen, die sogenannte Lymphangiogenese, seit einigen Jahren im Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses. VEGF-C und VEGF-D in Interaktion mit dem VEGF-Rezeptor 3 (flt-4) wurden dabei als Schlüsselfaktoren identifiziert (Karkkainen et al., 2004). Der physiologische Nutzen von Lymphgefäßen liegt im Abtransport von Flüssigkeit und Proteinen aus dem Gewebe. Sie drainieren jedoch auch Tumorzellen, was eine lymphogene Metastasierung des Malignoms zur Folge hat (Mandriota et al., 2001). Klinische Studien zeigten eine positive Korrelation von tumorbedingter Lymphangiogenese und Befall des Sentinel-Lymphknoten (Skobe et al., 2001, Stacker et al., 2001)

Dem Wissen über den enormen Einfluss der Angiogenese und Lymphangiogenese für Wachstum und Metastasierung von Tumoren folgte in logischer Konsequenz die Entwicklung spezifischer Inhibitoren.

1.2.2 Bisherige Erkenntnisse zum malignen Melanom

Das maligne Melanom gilt als besonders gefäßreicher Tumor. Schon vor vierzig Jahren wurde eine vermehrte Blutgefäßneubildung nach Transplantation humaner Melanome auf Versuchstiere beschrieben (Warren and Shubik, 1966). Viele Studien wiesen im Weiteren einen engen Zusammenhang zwischen Angiogenese und Progression des malignen Melanoms nach. So konnte sowohl in Ultraschall-Untersuchungen (Srivastava et al., 2003) wie auch in immunhistochemischen Analysen (Einspahr et al., 2007) eine deutliche Zunahme der Durchblutung maligner Melanome mit Zunahme des Tumorstadium beobachtet werden. Analog dazu wurde eine vermehrte Expression diverser proangiogenetischer Faktoren wie VEGF-A in fortgeschrittenen Melanomstadien festgestellt (Graeven et al., 1999). Die Fähigkeit zur Angiogenese-Stimulation wird u.a. als Voraussetzung für den Eintritt in das prognostisch ungünstigere, vertikale Tumorwachstum gesehen (Erhard et al., 1997).

Die Lymphangiogenese des malignen Melanoms wird auf Grund der vorwiegend lymphogenen Erstausbreitung ebenfalls intensiv erforscht. Immunhistochemische Untersuchungen konnten eine deutlich gesteigerte Lymphangiogenese bei metastasierten Primärtumoren nachweisen (Dadras et al., 2003). Weiterführende Analysen am Primärtumor sowie dessen Sentinel-Lymphknoten bescheinigten der peritumoralen Lymphgefäßdichte sogar eine hohe prognostische Aussagekraft für das Metastasierungsrisiko dieses Tumors (Dadras et al., 2005).

Die Erkenntnisse der letzten Jahre lassen somit einen engen Zusammenhang zwischen Angiogenese und Lymphangiogenese des malignen Melanoms und dessen Wachstum sowie Metastasierung vermuten. Die hieraus resultierende Hoffnung der Medizin, mit Hilfe innovativer Angiogenese-Inhibitoren, die Prognose von Melanompatienten entscheidend verbessern zu können, basiert jedoch im Wesentlichen auf Untersuchungen am Primärtumor. Spezifische Analysen zur Gefäßneubildung in Melanommetastasen in Hinblick auf die Antiangiogenesetherapie wurden bisher vernachlässigt. Dabei sind die Metastasen - und nicht der Primärtumor selbst - das Angriffsziel dieser systemischen Therapie bei Patienten mit fortgeschrittenem Melanomstadium. Spezifische Untersuchungen auf diesem Gebiet sind

somit dringend notwendig, um das Potential angiogenesehemmender Therapeutika besser beurteilen zu können.

1.3 Angiogenese-Inhibitoren

1.3.1 Wirkmechanismen und klinische Anwendung

Im Jahr 2004 wurde mit Bevacizumab (Avastin®), einem neutralisierenden Antikörper gegen VEGF-A, der erste Angiogenese-Inhibitor für die systemische Therapie von Tumorpatienten durch die U.S. Food and Drug Administration (FDA) zugelassen. Unter Hinzunahme dieses Wirkstoffes konnte sowohl das Gesamtüberleben als auch das progressionsfreie Überleben in einer Studie mit 813 an metastasiertem kolorektalem Karzinom erkrankten Patienten signifikant erhöht werden (Hurwitz et al., 2004). Damit wurde die von Judath Folkman dreiunddreißig Jahre zuvor formulierte These, Angiogenese-Inhibitoren seien in der Lage, Tumorerkrankungen in eine chronisch, kontrollierbare Erkrankung zu überführen, enorm bekräftigt. Die Forschung weltweit reagierte mit einer massiven Zunahme an Entwicklung und Erprobung neuer, vielversprechender Angiogenese-Inhibitoren.

Auf Grund der physiologisch zumeist untergeordneten Bedeutung von Gefäßneubildung wird dieser Therapie eine hohe Tumorselektivität sowie ein geringes Nebenwirkungsprofil zugesprochen und sie somit der Targeted-Therapie zugeordnet. Dass die Inhibition pathologischer Gefäßneubildungen eine wichtige tumorsuppressive Funktion darstellt, konnte dank der Entdeckung und Untersuchung endogener Angiogenese-Inhibitoren wie Tumstatin und Endostatin erstmals demonstriert werden. So zeigen Tumstatin-defiziente Mäuse ein hochsignifikant beschleunigtes und Endostatin-überexprimierende Mäuse hingegen ein hochsignifikant verlangsamtes Tumorwachstum (Sund et al., 2005). Interferon alpha war das erste körpereigene Molekül, dem antiangiogenetische Aktivität nachgewiesen wurde (Ezekowitz et al., 1992). Es wird noch heute bei der Therapie lebensbedrohlicher Hämangiome eingesetzt.

Angiogenese-Inhibitoren unterscheiden sich mitunter erheblich in ihrem Wirkmechanismus und in ihrer klinischen Anwendung. Der monoklonale Antikörper Bevacizumab beispielsweise ist heutzutage zur First-Line-Therapie fortgeschrittener Tumore des Dickdarms, der Lunge und der Brust zugelassen. Des Weiteren wird er mit großem Erfolg als Off-Label-

Therapie gegen die altersabhängige Makuladegeneration eingesetzt (Michels et al., 2005). Im Sinne der Wirkungssteigerung wurden Tyrosinkinase-Inhibitoren wie Sunitinib (Sutent®) entwickelt, welche die VEGF-Rezeptoren 1-3 sowie die PDGF-Rezeptoren α und β inhibieren und damit neben der Angiogenese auch die Lymphangiogenese sowie die Tumorpheriferation hemmen. Sunitinib ist gegen fortgeschrittene, gastrointestinale Stromatumoren zugelassen (Demetri et al., 2006). Hohe Erwartungen steckt man auch in Multikinase-Inhibitoren wie Sorafenib (Nexavar®). Er hemmt die proangiogenetischen VEGF-Rezeptoren und die proliferativ wirkenden Raf-Kinasen. Erst kürzlich wurde dieser Wirkstoff für die Behandlung metastasierter Nieren- und Leberzellkarzinome zugelassen (Kane et al., 2006). So zeigt Sorafenib auch als Monotherapie eine Verlängerung des Gesamtüberlebens von Patienten mit fortgeschrittenem Leberzellkarzinom (Llovet et al., 2008).

Bedingt durch wachsende Erkenntnisse bezüglich der molekularen Mechanismen der Gefäßneubildung, werden laufend neue Angiogenese-Inhibitoren entwickelt. Wie vielseitig die Angriffspunkte von Angiogenese-Inhibitoren sind, wird an Dalteparin (Fragmin®), dem Hemmstoff der Metalloprotease Aggrecanase deutlich (Thodiyil and Kakkar, 2002). In einer Phase-II-Studie zum Ovarialkarzinom wird derzeit geprüft, wie sehr die dadurch unterdrückte Fähigkeit zur partiellen Gewebeauflösung das Aussprossen neuer Gefäße hemmt und die Prognose von Patienten verbessert.

1.3.2 Klinische Studien am malignen Melanom

Da es bisher keine effektiven Therapieansätze gegen den schwarzen Hautkrebs im fortgeschrittenen Stadium gibt, wurden in den letzten Jahren viele klinische Studien mit Angiogenese-Inhibitoren initiiert, in der Hoffnung, ähnlich beeindruckende Ergebnisse wie vorzugsweise beim Kolon- oder Nierenzellkarzinom zu erzielen.

In verschiedenen Phase-II-Studien zeigten Thalidomid sowie dessen Analogon Lenalidomid am metastasierten Melanom eine gut verträgliche, antitumorale Wirksamkeit in Kombination mit Zytostatika (Hwu et al., 2003). Eine Phase-III-Studie mit Lenalidomid in der Monotherapie mußte jedoch auf Grund fehlender Wirksamkeit abgebrochen werden (Lorigan et al., 2008). Ähnliche Ergebnisse erzielte man mit dem Angiogenese-Hemmer Bevacizumab. Während unter Monotherapie vielversprechende Ergebnisse ausblieben (Varker et al., 2007), konnte eine gute Wirksamkeit unter Kombination mit Chemotherapeutika gezeigt werden

(Perez et al., 2009). Der zu vermutende Synergieeffekt von Angiogenese-Inhibitoren und Zytostatika offenbarte sich auch für den Wirkstoff Sorafenib. Erst unter der Kombination mit DTIC beobachtete man in einer placebokontrollierten Phase-II-Studie ein hohes Potential in der palliativen First-line-Behandlung von Patienten. So erzielte die Kombinationstherapie eine Verlängerung des mittleren, progressionsfreien Überlebens von 1,5 auf 2,7 Monate (McDermott et al., 2008). Dieser Erfolg von Sorafenib konnte in Kombination mit Carboplatin und Paclitaxel in einer kürzlich publizierten Second-Line-Phase-III-Studie mit Patienten im fortgeschrittenen Melanomstadium nicht wiederholt werden (Hauschild et al., 2009). Unter der Kombination mit pegyliertem Interferon α 2b konnte erst kürzlich in einer Phase-II-Studie eine begrenzte klinische Wirksamkeit, aber auch deutliche Nebenwirkungen auf Grund vermehrter Blutungsneigung beobachtet werden (Egberts et al., 2011). Dennoch deuten weitere kürzlich veröffentlichte Studienergebnisse darauf hin, dass die kombinierte Anwendung empfehlender Chemotherapeutika mit Angiogenese-Inhibitoren zukunftsweisend ist. So zeigten erste Ergebnisse der Phase-II-Studie BEAM in der Behandlung von Patienten mit metastasiertem malignen Melanom eine statistisch signifikante Verlängerung des Gesamtüberlebens von 8,6 auf 12,3 Monaten unter der Kombination von Carboplatin und Paclitaxel mit Bevacizumab. Ebenfalls war eine deutliche Zunahme in der Ansprechrate und im progressionsfreien Überleben unter dieser Kombinationstherapie zu verzeichnen (O'Day et al., 2009). Auf Grund dieser und ähnlicher Studiendaten ist die Initiierung entsprechender Phase-III-Studien mit Angiogenese-Inhibitoren wie Bevacizumab wohl nur noch eine Frage der Zeit.

1.3.3 PTK/ZK

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals die Wirksamkeit des Tyrosinkinase-Inhibitors PTK787/ZK222 584 (PTK/ZK, Vatalanib®) an Patienten mit inoperabel metastasiertem Melanom analysiert. Hierzu wurden neben der Klinik der Patienten, der Histologie und der Gefäßarchitektur der kutanen Melanommetastasen auch die VEGF-Plasmakonzentration im Therapieverlauf untersucht.

PTK/ZK gehört in die Gruppe der oral verfügbaren Tyrosinkinase-Inhibitoren und wurde von dem Pharmaunternehmen Novartis in Kooperation mit der Bayer Schering AG entwickelt. Der Wirkstoff hemmt sämtliche VEGF-Rezeptoren, den PDGF-Rezeptor β sowie den c-Kit- und c-Fms-Rezeptor (Hess-Stumpp et al., 2005). In experimentellen Studien am Tiermodell

fürte PTK/ZK zu einer signifikanten Reduktion der Angiogenese, des Wachstums und der Metastasierung von Tumoren (Dreys et al., 2000). Ebenso wurde in Studien am Melanommodell eine Überlegenheit gegenüber selektiven VEGF-Antikörpern und eine deutliche Wirkungssteigerung von Chemotherapeutika nach Hinzugabe dieses Tyrosinkinase-Inhibitors beschrieben (Sini et al., 2008). Zwar erbrachten zwei große Phase III-Studien am metastasierten kolorektalen Karzinom (CONFIRM-1/2) keinen signifikanten Vorteil im Gesamtüberleben durch Kombination mit der Standardtherapie Folfox-4 (Koehne et al., 2006), eine Metaanalyse zeigte jedoch unter dieser Therapie eine signifikante Verlängerung des progressionsfreien Überlebens von Patienten mit hohen LDH-Spiegeln (Major et al., 2006). Vor allem auch die vielversprechenden Ergebnisse präklinischer PTK/ZK-Studien am malignen Melanom begründeten die hohen Erwartungen an diese klinische Studie.

2. Ziele der vorliegenden Arbeit

Betrachtet man die wissenschaftlichen Erkenntnisse hinsichtlich der Bedeutung von Angiogenese und Lymphangiogenese für Wachstum und Metastasierung des primären malignen Melanoms, so erscheint es widersprüchlich, dass Angiogenese-Inhibitoren bisher keinen Durchbruch in der Behandlung jenes Tumors erzielen konnten. Ziel der Arbeit war es, mögliche Ursachen für dieses Paradoxon zu finden, um zukünftig die Wirksamkeit der Antiangiogenesetherapie und damit auch die Prognose von Patienten mit metastasiertem malignen Melanom verbessern zu können.

Hierzu wurden erstmals die Metastasen des schwarzen Hautkrebs, als konkretes Zielgewebe der Antiangiogenesetherapie, in Form kutaner Melanomfiliae in den Mittelpunkt spezifischer Analysen zur Angiogenese und Lymphangiogenese gestellt. Primär sollte untersucht werden, ob das Ausmaß der Blut- und Lymphgefäßneubildung im Metastasengewebe tatsächlich mit dem in Primärtumoren vergleichbar ist. Darüber hinaus sollte erstmalig die Wirkung des Angiogenese-Inhibitors PTK/ZK auf kutane Melanommetastasen und deren Vaskularisation in einer klinischen Phase-II-Studie analysiert werden. Dabei sollte auch nach möglichen Escapemechanismen der Melanommetastasen gegenüber Angiogenese-Inhibitoren und nach Ursachen für den häufig beschriebenen Synergieeffekt von Chemotherapeutika und jener Targeted-Therapie gesucht werden. In Hinblick auf die bis dato infauste Prognose von Patienten mit fortgeschrittenem Melanomstadium bestand eine weitere Aufgabe dieser Arbeit darin, auf immunhistochemischer, immunserologischer und auch klinischen Ebene nach möglichen Einflussfaktoren und Biomarkern zu finden, deren Kenntnis relevant für eine Verbesserung der Antiangiogenesetherapie beim metastasierten malignen Melanom sein könnten.

3. Material und Methoden

3.1 Analysen zur Angiogenese und Lymphangiogenese in kutanen Melanommetastasen

3.1.1 Material

Die Gewebeproben, welche im Rahmen dieser Arbeit auf Angiogenese und Lymphangiogenese analysiert wurden, sind in der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie des Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, im Jahr 2007 entnommen worden. Die eindeutige Befundung dieser Exzisionen durch mindestens zwei Dermatohistopathologen bildete die Grundlage für die Unterteilung in folgende 4 Gruppen:

- Gruppe kMet: 20 Proben kutaner Melanommetastasen
- Gruppe NH: 21 Proben normaler Haut
- Gruppe NZN: 20 Proben benigner Nävuszellnävi
- Gruppe MM: 21 Proben primärer maligner Melanomen

Dabei wurden in Gruppe MM nur primäre maligne Melanome der verhornten Haut sowie einer Tumordicke nach Breslow von mindestens 1,0 mm berücksichtigt und die Normalhaut in Gruppe NH durch deren tumorfreie Randbereiche repräsentiert. In Gruppe NZN durften die epidermokoriale Nävuszellnävi keine dysplastischen Anteile aufweisen. Die Proben wurden unabhängig von Lokalisation und Geschlecht ausgewählt. Die Patienten waren volljährig und befanden sich bis zum Zeitpunkt der Exzision in keiner antivaskulären therapeutischen Behandlung. Relevante Informationen über jene Patienten wurden den Krankenakten sowie den histopathologischen Befunden entnommen.

Die Operationsresektate wurden nach Entnahme in 4,5%-igem, gepuffertem Formaldehyd fixiert und in Paraffinblöcken eingebettet. Insgesamt bildeten 82 Paraffinblöcke die Basis anschließender Untersuchungen. Tabelle 2 zeigt die wesentlichen Eigenschaften dieser vier Patientengruppen.

Tabelle 2: Eigenschaften der Patientengruppen

Eigenschaften	Gruppe kMET	Gruppe MM / NH	Gruppe NZN
Zahl der Patienten	20	21	20
Frauen	14	11	7
Männer	6	10	13
Alter bei Probenexzision			
Mittelwert	65	73	51
Spannweite	36-87	49-98	18-101
Lokalisation			
Kopf/Hals	2	3	2
Rumpf	6	6	9
obere Extremität	6	4	4
untere Extremität	6	8	5

3.1.2 Methodik

Um das Ausmaß der Gefäßneubildung in den verwendeten Gewebeproben untersuchen zu können, wurden 5 µm dünne Paraffinschnitte mittels eines Rotationsmikrotom angefertigt, auf silanbeschichtete Objektträger aufgezogen und anschließend immunhistochemisch angefärbt. Die morphometrische Gefäßanalyse erfolgte computerassistent mit Hilfe der IP-Lab-Software (Scanalytics, Fairfax, USA).

3.1.2.1 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie nutzt die Spezifität von Antikörpern um das Verteilungsmuster bestimmter Antigene auf einem histologischen Schnitt sichtbar zu machen. Das wenige Mikrometer dünne Gewebe wird mit einem mono- bzw. polyklonalen Antikörper in vitro inkubiert und dieser wiederum nach Bindung an das Epitop des nachzuweisenden Antigens mit Hilfe einer Färbereaktion, die durch ein antikörpergebundenes Enzym katalysiert wird, visualisiert. Man unterscheidet dabei zwischen der direkten Nachweismethode, in der der primäre Antikörper enzymmarkiert ist und der indirekten Nachweismethode, wo mindestens

ein weiterer Antikörper verwendet wird, der gegen den unmarkierten primären Antikörper gerichtet ist und diesen mittels eines Detektionssystems sichtbar macht. Die direkte Methode ist schnell in der Durchführung, jedoch ist ihr die indirekte Methode in Farbtintensität, Sensitivität und im Kostenpunkt deutlich überlegen. Häufig verwendetes Enzym ist die alkalische Phosphatase und die Peroxidase.

Für die immunhistochemische Darstellung der Architektur von Blut- und Lymphgefäßen in den unterschiedlichen histologischen Geweben wurde in dieser Arbeit die Avidin-Biotin-Komplex-Methode verwendet. Die ABC-Färbemethode gehört in die Gruppe der indirekten Nachweisverfahren und ist durch eine hohe Sensitivität und Spezifität gekennzeichnet. Sie macht sich die hohe Bindungsaffinität von Avidin (Glykoprotein im Hühnereiweiß) bzw. Steptavidin (Pilz-Protein) gegenüber Biotin (Vitamin H) zunutze. Ein biotinylierter sekundärer Brückenantikörper, der an den primären Antikörper bindet, ist dadurch die Zielstruktur eines ABC-Komplexes, welcher aus Avidin und dem verwendeten biotinylierten Enzym besteht. Dieser bewirkt dann die Färbung der gewünschten Zielstruktur nach Zufuhr des spezifischen Chromogen-Substrates.

3.1.2.2 Protokoll

Die zu färbenden Schnittpräparate wurden in Xyloersatz (Histo-Clear®, Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland) entparaffiniert (2x 10min) und mittels einer absteigenden Alkoholreihe bis 70% sowie Aqua dest. (10min) rehydriert. Die anschließende Hitzedemaskierung erfolgte im mit Citratpuffer gefüllten Dampfgerät (20min). Nach Blockierung der Gewebe durch 1% TBS + 12% BSA (20min) wurde der primäre Antikörper auf den Objektträger aufgetragen und unter den zuvor definierten Bedingungen inkubiert. Im Anschluss an eine Spülung mit 1% TBS + Tween (2x 3min) wurde der sekundäre Antikörper auf das Gewebe pipettiert. Nach erneuter Spülung wurde den Geweben der ABC-Komplex (Vectastain ABC AP-Kit, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA) zugegeben (30min). Sie wurden danach mit Tris-Puffer-Base gewaschen (3x 3min) und mit dem Substrat (Alkaline Phosphatase Substrate Kit I, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA) inkubiert (30min). Im Anschluss an die erfolgte Farbreaktion wurden die Objektträger in Aqua dest. gespült (5min) und dann einer Zellkernfärbung mittels Hämalaun unterzogen (30sek mit 10min Bläuen). Im abschließenden Schritt fand eine Dehydrierung der Gewebeschnitte mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe bis 100% statt und die gefärbten, histologischen

Schnittpräparate wurden mit Eukitt eingedeckt. Für die Spezifitätskontrolle wurde jeweils der primäre Antikörper bei allen immunhistochemischen Färbungen weggelassen.

Um die Angiogenese in den Gewebeschnitten darstellen zu können, wurde der panvaskuläre Marker CD-31 verwendet. Für eine separate Analyse der Lymphangiogenese wurde LYVE-1 als spezifische Lymphgefäßmarker genutzt. Dieser wies in Vorversuchen eine höhere Spezifität als der Lymphgefäßmarker Podoplanin auf. Sämtliche verwendeten Antikörper zuzüglich relevanter Informationen sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Verwendete Antikörper für die immunhistochemische Diagnostik

Primärer Antikörper	Firma / Typ	Verdünnung	Anwendung
Anti-CD-31	DAKO, monoklonal, mouse	1:40	1h (RT)
Anti-LYVE-1	RELIA-Tech, monoklonal, rabbit	1:200	üN (4°C)
Anti-Podoplanin	RELIA-Tech, monoklonal, mouse	1:50	üN (4°C)
Anti-CD-68	DAKO, monoklonal, mouse	1:200	üN (4°C)
Sekundärer Antikörper			
Anti-Mouse	DAKO, polyklonal, rabbit	1:200	30min (RT)
Anti-Rabbit	DAKO, polyklonal, swine	1:200	30min (RT)

(RT = Raumtemperatur, üN = über Nacht)

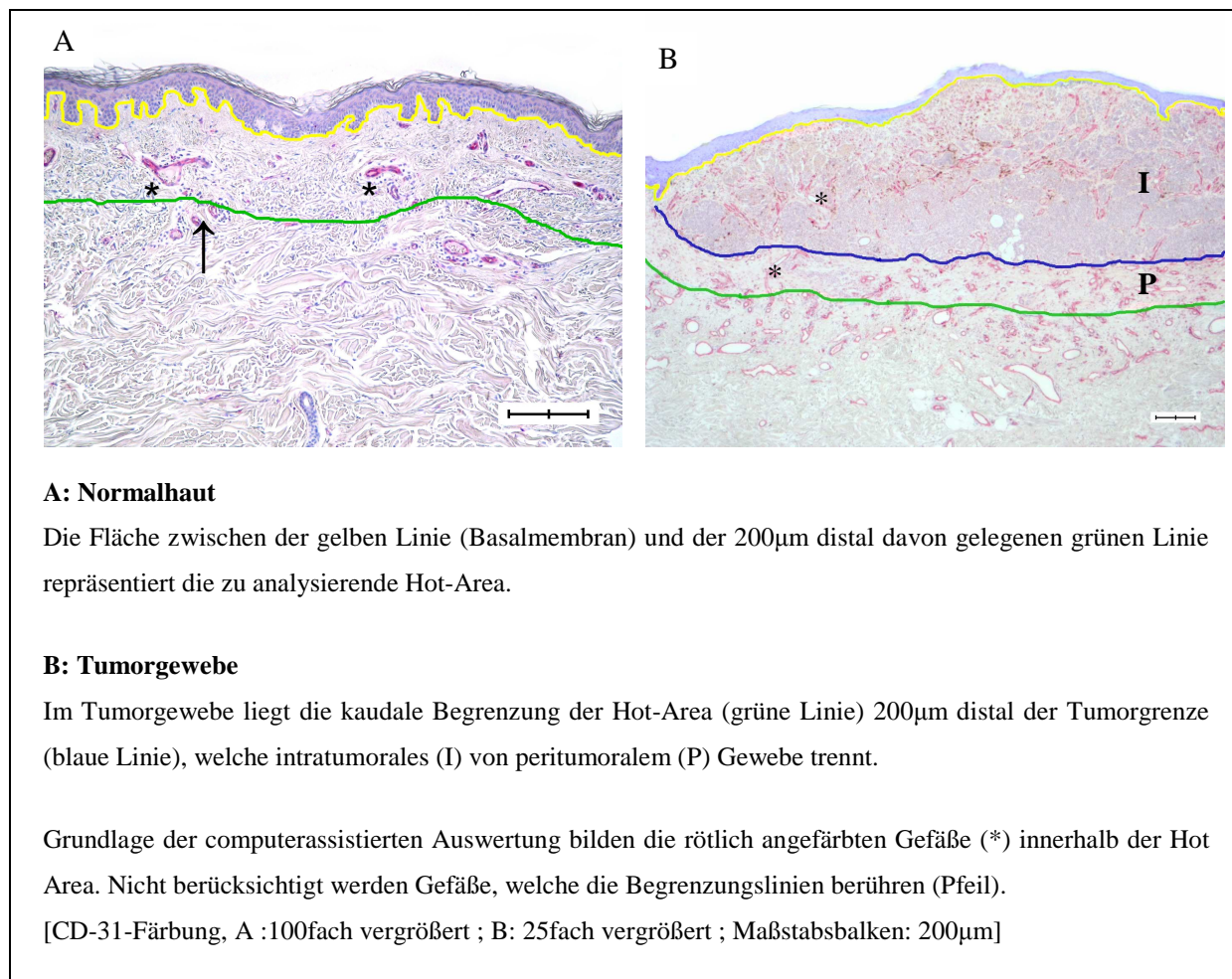
3.1.2.3 Gefäßanalysen

Für die Beurteilung der Angiogenese und Lymphangiogenese von kutanen Melanommetastasen, primären malignen Melanomen, benignen Nävuszellnävus und Normalhaut wurden die immunhistochemisch angefärbten Schnittpräparate unter einem Nikon E-600 Lichtmikroskop untersucht und das jeweilige Areal mit der höchsten sichtbaren Dichte an angefärbten Blut- bzw. Lymphgefäßstrukturen unter 25x Vergrößerung lokalisiert. Dieses Areal wurde mit einer SPOT-Digitalkamera bei 100facher Vergrößerung fotografiert, digital gespeichert und als "Hot-Area" definiert. Diese Hot-Area bildete die Grundlage für die mittels IP-Lab-Software® (Scanalytics, Fairfax, USA) durchgeführten Gefäßanalyse. Folgende Eigenschaften der Hot-Area wurden mit Hilfe dieser Software berechnet:

- Gefäßdichte (VD, vessel density): Gefäßanzahl / Fläche [mm^{-2}]
- relative Gefäßfläche (VA, vessel area): gesamte Gefäßfläche / Fläche [%]
- mittlere Gefäßgröße (VS, vessel size): gesamte Gefäßfläche / Gefäßanzahl [μm^2]

Die Grenze der Hot-Area in normaler Haut wurde zur Tiefe mit einem Abstand von 200 μm zur epithelialen Basalmembran festgelegt. In Bezug auf die kutanen Melanommetastasen, primären malignen Melanomen und benignen Nävuszellnävi wurde die Grenze der Hot-Area mit einem Abstand von 200 μm zur Tumorgrenze definiert. Die Tumorgrenze wurde unter Beurteilung der Hämatoxylin/Eosin-Färbung sowie der Hoechst-Kernfärbung bestimmt. Sie diente in tiefergreifenden Untersuchungen zur Hot-Area von kutanen Metastasen und Primärtumoren ebenfalls als Trennlinie zwischen intratumoralem und peritumoralem Gewebe. Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Prinzip zur Erforschung der Gefäßneubildung in den jeweiligen Gewebearten wird in Abbildung 1 veranschaulicht.

Abbildung 1: Erläuterungen zur Festlegung und Analyse der Hot-Area



3.2 Analysen zur Wirkung von PTK/ZK auf metastasierte maligne Melanome

3.2.1 Material

Die Wirkung des Tyrosinkinase-Inhibitors PTK/ZK bei Patienten mit fortgeschrittenem malignen Melanom wurde an einer multizentrischen, randomisierten Phase-II-Studie retrospektiv untersucht. Unter der Leitung der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie des Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel wurden in dieser klinischen Studie folgende zwei Therapiearme parallel durchgeführt, um den therapeutischen Effekt von PTK/ZK in Monotherapie und in Kombination mit Dacarbazin nachweisen zu können:

- Arm A: täglich 1250 mg PTK/ZK (p.o.) in Monotherapie
- Arm B: täglich 1250 mg PTK/ZK (p.o.) in Kombination mit 850 mg/m² Dacarbazin (i.v.)

Auf Grund einer veränderten Entwicklungsstrategie von Seiten der Bayer Schering AG wurde die im August 2006 initiierte PTK/ZK-Studie im Jahr 2007 vorzeitig beendet. Im Rahmen dieser wissenschaftlichen Arbeit konnte jedoch der klinische Verlauf und das Material von zwei Patienten des Studienarms A und drei Patienten des Studienarms B analysiert werden. Die Grundlage dafür bildeten zum einen die patientenbezogenen Fallberichte und zum anderen Tumorgewebe kutaner Melanommetastasen und Blutplasma, welches den Probanden vor und nach 57 Behandlungstagen entnommen wurde.

3.2.2 Methodik

Die relevanten Informationen über die Probanden, deren Tumorausbreitung sowie deren klinischen Verlauf unter der Behandlung mit dem Angiogenese-Inhibitor PTK/ZK wurden in den Fallberichten dieser klinischen Studie ausführlich dokumentiert. Es wurden in diese Studie nur Patienten mit einem inoperablen Tumorstadium von III oder IV aufgenommen, welche bis zu diesem Zeitpunkt mit Ausnahme einer adjuvanten Immuntherapie keine systemische Behandlung erhalten haben. Um die Angiogenese und Lymphangiogenese in den kryokonservierten, kutanen Melanommetastasen untersuchen zu können, wurden 8 µm dünne Gefrierschnitte angefertigt. Diese wurden unter Verwendung des CD-31- und LYVE-1-

Markers immunohistochemisch angefärbt und hinsichtlich der Gefäßarchitektur ausgewertet. Das in Kapitel 3.1 beschriebene Färbeprotokoll wurde an die Verfahrensweise bei kryokonservierten Gewebeschnitten angepasst. Anstelle der alkalischen Phosphatase wurde Peroxidase als Katalysator der Farbreaktion verwendet. Zusätzlich wurde die Konzentration an VEGF-A sowie VEGF-C und VEGF-D in den Plasmaproben der Patienten mit Hilfe quantitativer Immunoassays bestimmt, um die Reaktion maligner Melanometastasen auf PTK/ZK unter dem Gesichtspunkt der Angiogenese und Lymphangiogenese genauer zu erforschen. Es wurde dabei Citrat-Theophyllin-Adenosin-Dipyridamol (CTAD)-Plasma verwendet, welches nach derzeitigen Erkenntnissen für die Messung der VEGF-Konzentration im Blut am geeignetesten ist (Wynendaele et al., 1999).

3.2.2.1 Immunoassay

Unter dem Begriff Immunoassay werden Methoden der Bioanalytik zusammengefasst, mit denen Analyte in Flüssigkeiten nachgewiesen werden können. Ebenso wie die Immunhistochemie machen sich Immunoassays dabei die hohe Spezifität und Bindungsstärke von Antigen und Antikörper zu nutze. Die zu bestimmende Struktur bindet an einen hochaffinen Partner, welcher wiederum an eine feste Phase fixiert ist. Das Analyt wird anschließend mit einem Nachweisträger markiert und durch ein passendes Detektionsprinzip qualitativ oder quantitativ gemessen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden spezifische, quantitative Sandwich-ELISAs (Quantikine®, R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland) zur Bestimmung der jeweiligen VEGF-Konzentration im Plasma verwendet. Deren Mikrotiterplatten im 96-Well-Format sind mit einem hochaffinen Primärantikörper beschichtet. An das daran bindende VEGF-Molekül heftet sich in einem nächsten Schritt ein nichtkompetitiver Sekundärantikörper. Dieser wiederum ist mit Peroxidase konjugiert, welche die gewünschte Farbreaktion katalysiert. Mit Hilfe eines Absorbtiions-Photometers (Sunrise Remote®, Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz) und der erstellten Standardkurve wird im Anschluss die Konzentration des Analyts bestimmt.

3.2.2.2 Protokoll

In die mit 100 µl Pufferlösung gefüllten, beschichteten Wells wurden 100 µl der Standardlösungen oder der zu analysierenden Plasmaproben pipettiert. Nach 2-stündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Wells in 3 Zyklen gewaschen und 200 µl des konjugierten, polyklonalen Sekundärantikörpers für ebenfalls 2 Stunden hinzugegeben. Die Wells wurden im nächsten Schritt erneut in 3 Zyklen gewaschen und anschließend mit 200 µl Substratlösung gefüllt. Die im Dunkeln ablaufende Farbreaktion wurde nach 25 Minuten durch die Hinzugabe von 50 µl Schwefelsäure gestoppt. Innerhalb von 30 Minuten wurde dann die Absorption der verfärbten Wells-Lösungen unter dem ELISA-Plattenleser bei einer Wellenlänge von 450 nm photometrisch gemessen. Für jede Platte wurde eine eigene Standardkurve erzeugt. Sämtliche Standards und Proben wurden als Trippelwerte bestimmt.

3.3 Statistische Auswertung

Die erhobenen Daten wurden mit Hilfe der Software GraphPad Prism (Version 4.0, GraphPad Software Inc. ©1992-2003) statistisch ausgewertet und die dazugehörigen Diagramme im Ergebnisteil ebenfalls mit dieser Software erstellt. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Ergebnisse als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angezeigt. Ein p-Wert $\leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant festgelegt. Der statistische Vergleich zweier Datenmengen wurde mit Hilfe des ungepaarten Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Für drei zu vergleichende Datenmengen wurde der Kruskal-Wallis-Test angewendet und für intraindividuelle Vergleiche der Wilcoxon Vorzeichen-Rangtest.

4. Ergebnisse

4.1 Angiogenese und Lymphangiogenese in kutanen Melanommetastasen

4.1.1 Angiogenese

Das Ausmaß der Gefäßneubildung in kutanen Melanommetastasen wurde immunhistochemisch mit dem panvaskulären Endothelmarker CD-31 analysiert. Die mittels der IP-Lab-Software erhobenen Daten aus jenem Gewebe wurden mit denen aus benignen Nävuszellnävus und normaler Haut verglichen.

Hierbei wies die Hot-Area der 20 kutanen Melanomfiliae eine signifikant höhere Gefäßdichte [BVD] ($89,8 \pm 10,6$ Gefäße/mm²) sowohl gegenüber den 20 epidermokorialischen Nävuszellnävus (56,8 ± 2,8 Gefäße/mm²; p=0,0019) als auch gegenüber den 21 Proben der Normalhaut ($49,5 \pm 2,2$ Gefäße/mm²; p<0,0001) auf. Die mittlere Gefäßgröße [BVS] der Melanommetastasen ($354,8 \pm 36,5$ µm²) war hingegen deutlich kleiner als die der Nävuszellnävus ($442,4 \pm 31,7$ µm²; p=0,02) und der Normalhaut ($380 \pm 28,8$ µm²; p=0,38). Die hohe Dichte und geringe Größe der Gefäße in den kutanen Melanommetastasen im Vergleich zum gutartigen Gewebe deuten auf ein vermehrtes Vorkommen feiner, neugebildeter Gefäßkapillaren und somit auf eine gesteigerte Angiogenese hin. Der Flächenanteil der Gefäße an der Gesamtfläche der Hot-Area [BVA] war bei den Melanommetastasen ($3,1 \pm 0,4\%$) bedingt durch die hohe Gefäßdichte trotz kleinster mittlerer Gefäßgröße signifikant höher als bei der untersuchten Normalhaut ($1,9 \pm 0,2\%$; p=0,034). Nävuszellnävus und Normalhaut wiesen in einer vergleichenden Analyse keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich ihrer Gefäßarchitektur auf.

In Abbildung 2 ist exemplarisch die Hot-Area von kutanen Melanommetastasen, benignen Nävuszellnävus und Normalhaut nach immunhistochemischer Färbung mit CD-31 abgebildet. Zur besseren Illustration der unterschiedlichen Gefäßarchitektur wurde hierbei jeweils eine Ausschnittsvergrößerung des histologischen Gewebes vorgenommen. Die Ergebnisse der computerassistierten Gefäßanalyse sowie deren statistische Auswertung werden in Abbildung 3 graphisch veranschaulicht.

Abbildung 2: Hot-Area von kutaner Melanommetastase, benignem Nävuszellnävus und Normalhaut (CD-31-Färbung)

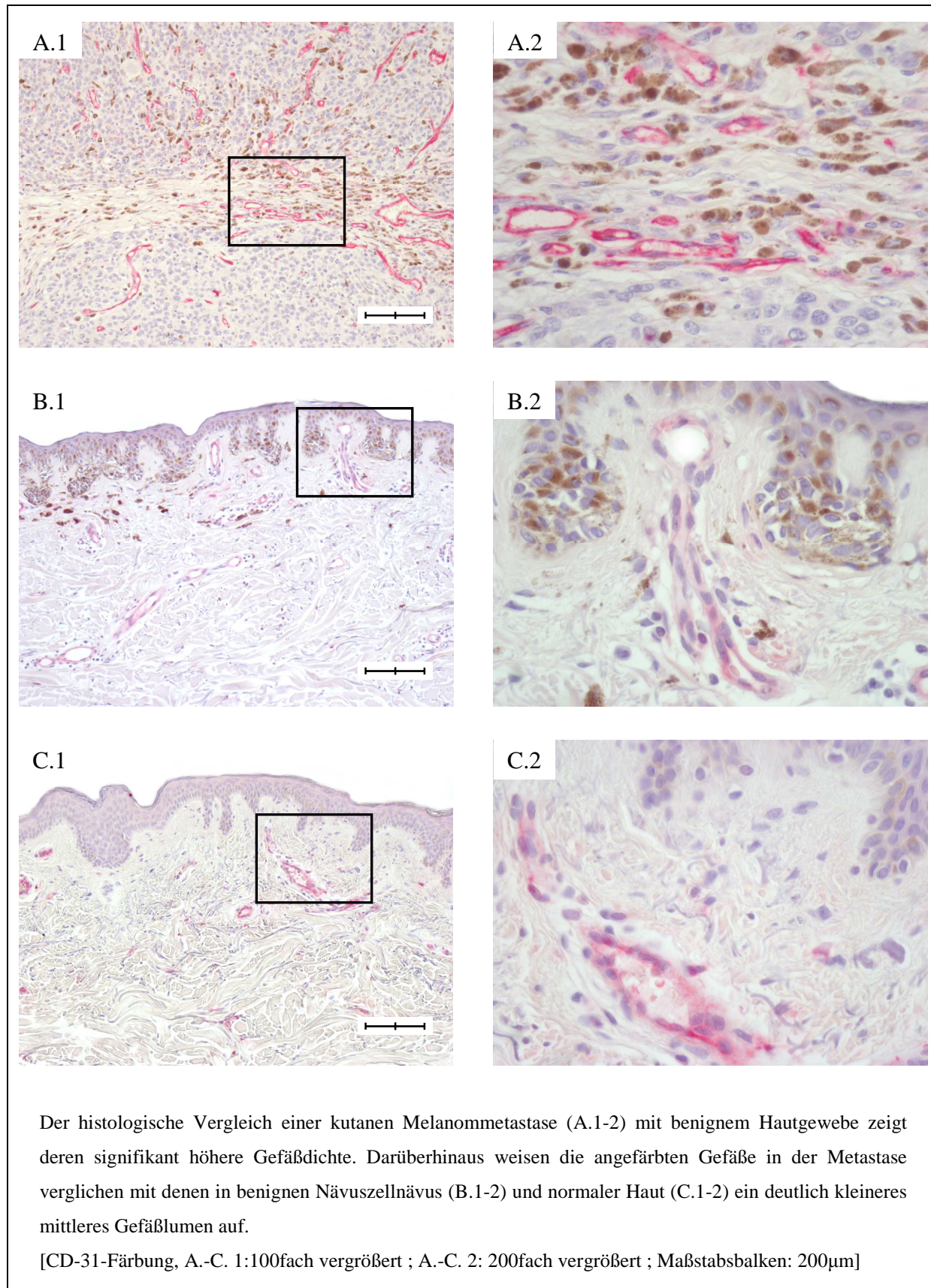
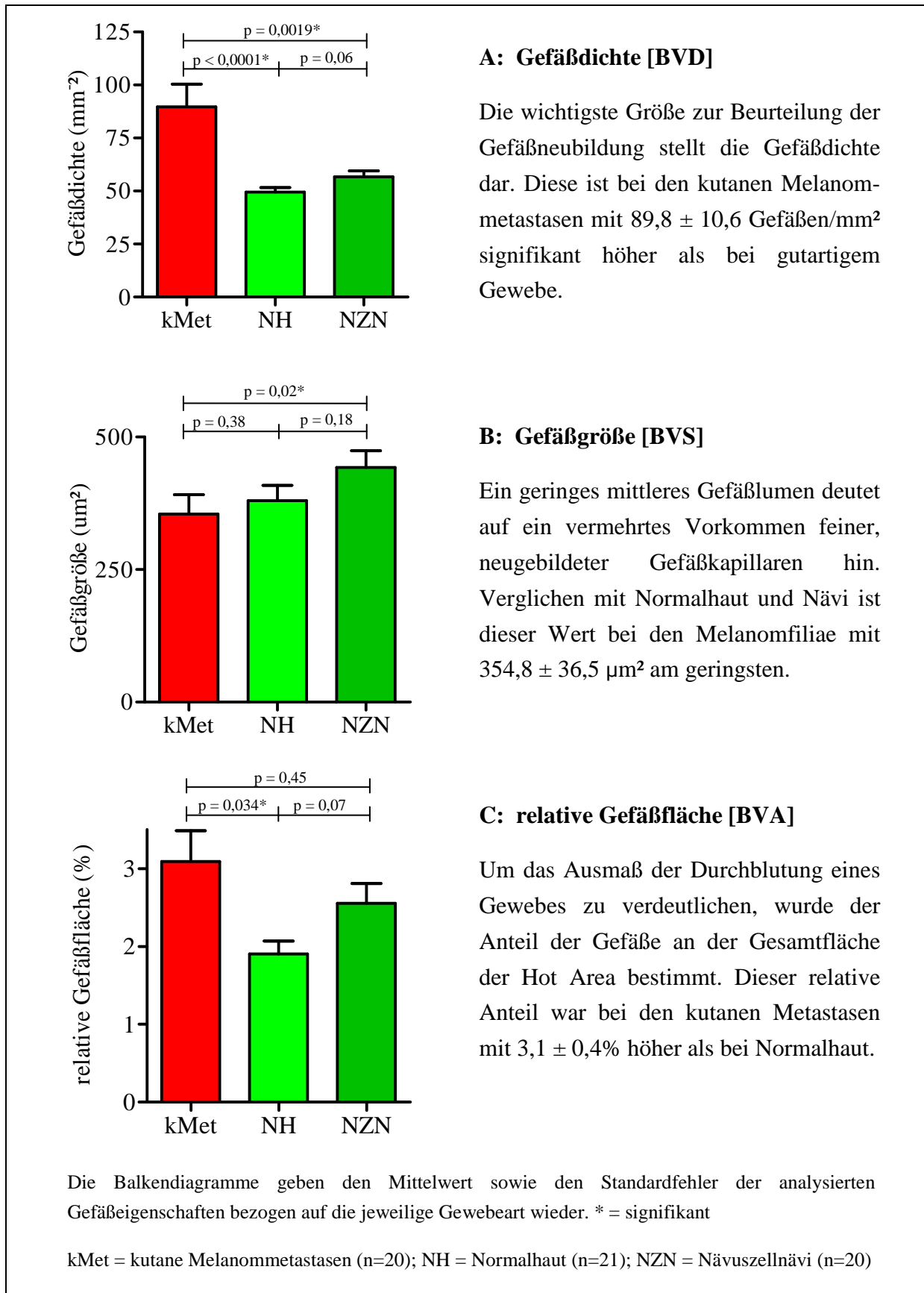


Abbildung 3: Gefäßanalyse von kutanen Melanommetastasen, benignen Nävuszellnävi und Normalhaut (CD-31-Färbung)



Um das Ausmaß der gesteigerten Angiogenese in kutanen Melanometastasen besser bewerten zu können, wurden ebenfalls 21 kutane Primärmelanome untersucht und die Ergebnisse beider Gruppen miteinander verglichen. Mit einer Tumordicke nach Breslow von über 1,0 mm repräsentierten die Primärtumore jenes Gewebe, in welchem in bisher publizierten Studien eine deutlich erhöhte angiogenetische Aktivität beschrieben wurde (Srivastava et al., 1986).

Auch diese malignen Melanome wiesen in den CD-31-angefärbten Schnittpräparaten sämtliche charakteristischen Zeichen einer vermehrten Durchblutung auf. So waren in der Hot-Area die Gefäßdichte [BVD] ($108,1 \pm 8,8$ Gefäße/mm²) wie auch die relative Gefäßfläche [BVA] ($4,1 \pm 0,4\%$) gegenüber Normalhaut und Nävuszellnävi signifikant erhöht. Diese Daten sprechen wie erwartet für eine gesteigerte Angiogenese, welche in ihrem Ausmaß mit der kutanen Metastasen vergleichbar ist. Auf der Basis dieser Erkenntnis wurden genauere Untersuchungen zur melanominduzierten Gefäßneubildung durchgeführt. Dabei konnte eine getrennte Analyse von intratumoralem und peritumoralem Gewebe zeigen, dass sowohl in Primärtumoren als auch in Metastasen die höchste Dichte an Gefäßen im tumorangrenzenden Gewebe lokalisiert ist. Zwar konnte auch im Tumorgewebe selbst eine erhöhte Gefäßdichte bei kutanen Metastasen ($86,9 \pm 15,1$ Gefäße/mm²) und Primärtumoren ($91,1 \pm 9,1$ Gefäße/mm²) nachgewiesen werden, verglichen mit dem intratumoralen Gewebe wurden im peritumoralen Gewebe der Metastasen ($98,1 \pm 8,9$ Gefäße/mm²; $p=0,126$) und der Ursprungstumoren ($144,2 \pm 13,7$ Gefäße/mm²; $p=0,003$) aber nochmals deutlich höhere Dichtewerte gemessen. Diese und weitere interessante Beobachtungen zur Gefäßbiologie beider Malignitäten sind in Abbildung 4 zusammengefasst.

In der intraindividuellen Analyse der Primärtumoren und ihrer korrespondierenden tumorfreien Randbereiche offenbarte sich, dass maligne Melanome die Durchblutung im Ursprungsgewebe tatsächlich signifikant erhöhen und zwar unabhängig von der zuvor bestehenden Gefäßdichte ($p=0,0001$). An Hand des Balkendiagramms in Abbildung 5 wird diese Erkenntnis verdeutlicht.

Abbildung 4: Vergleichsanalyse zur Durchblutung in kutanen Melanommetastasen und primären malignen Melanomen (CD31-Färbung)

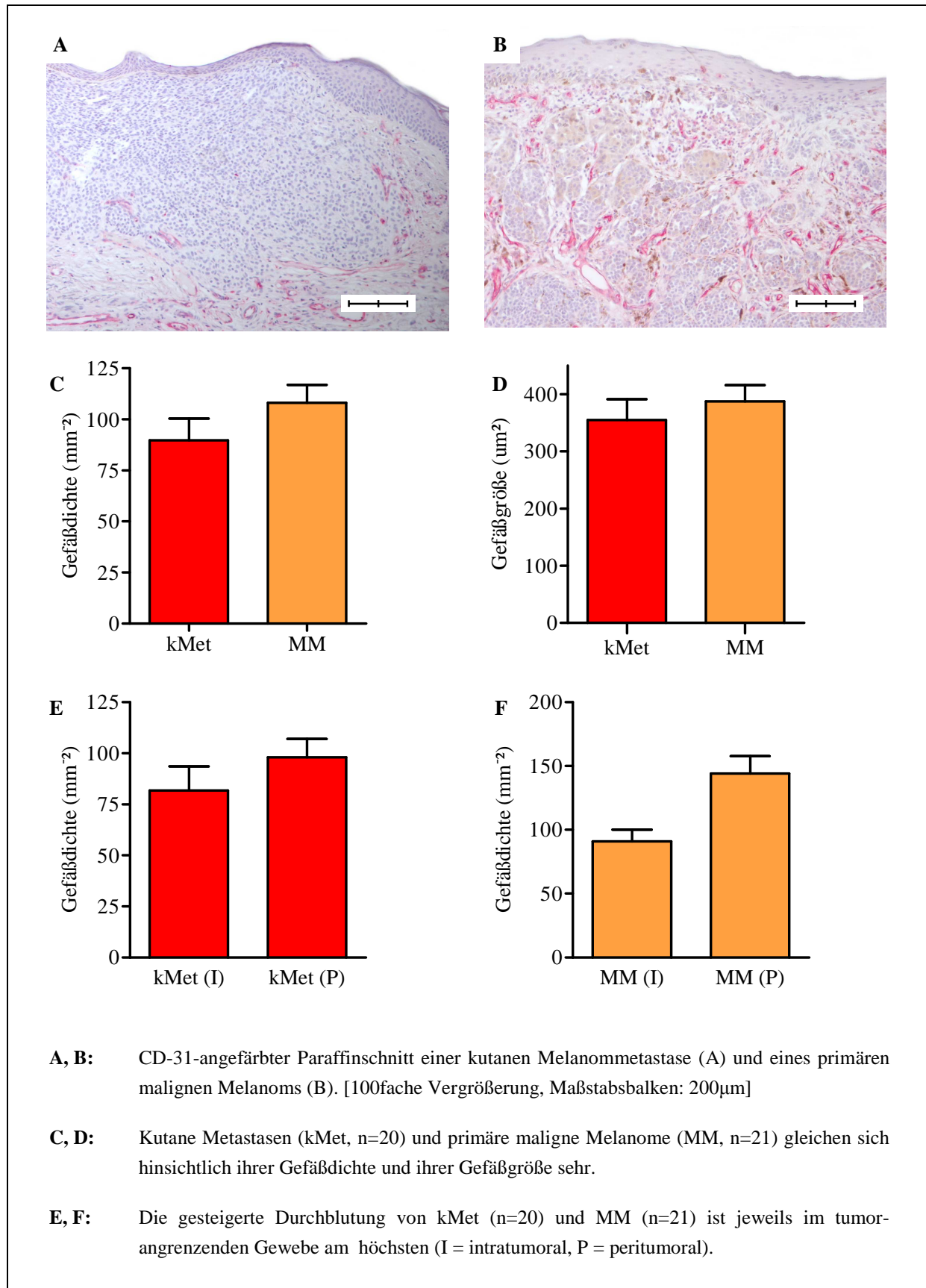
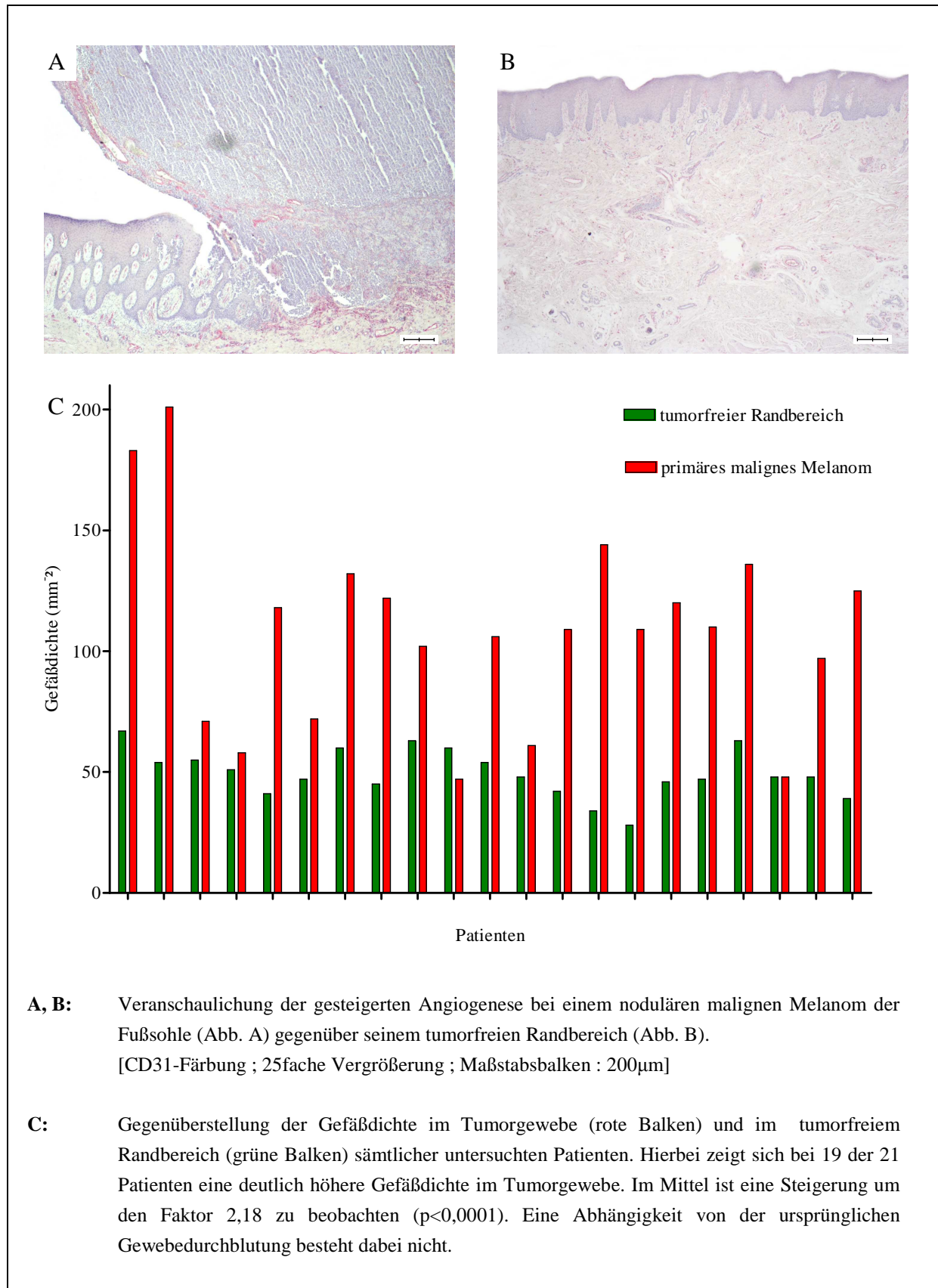


Abbildung 5: Intraindividuelle Analyse zur Durchblutung maligner Melanome und ihrer tumorfreien Randbereiche



4.1.2 Lymphangiogenese

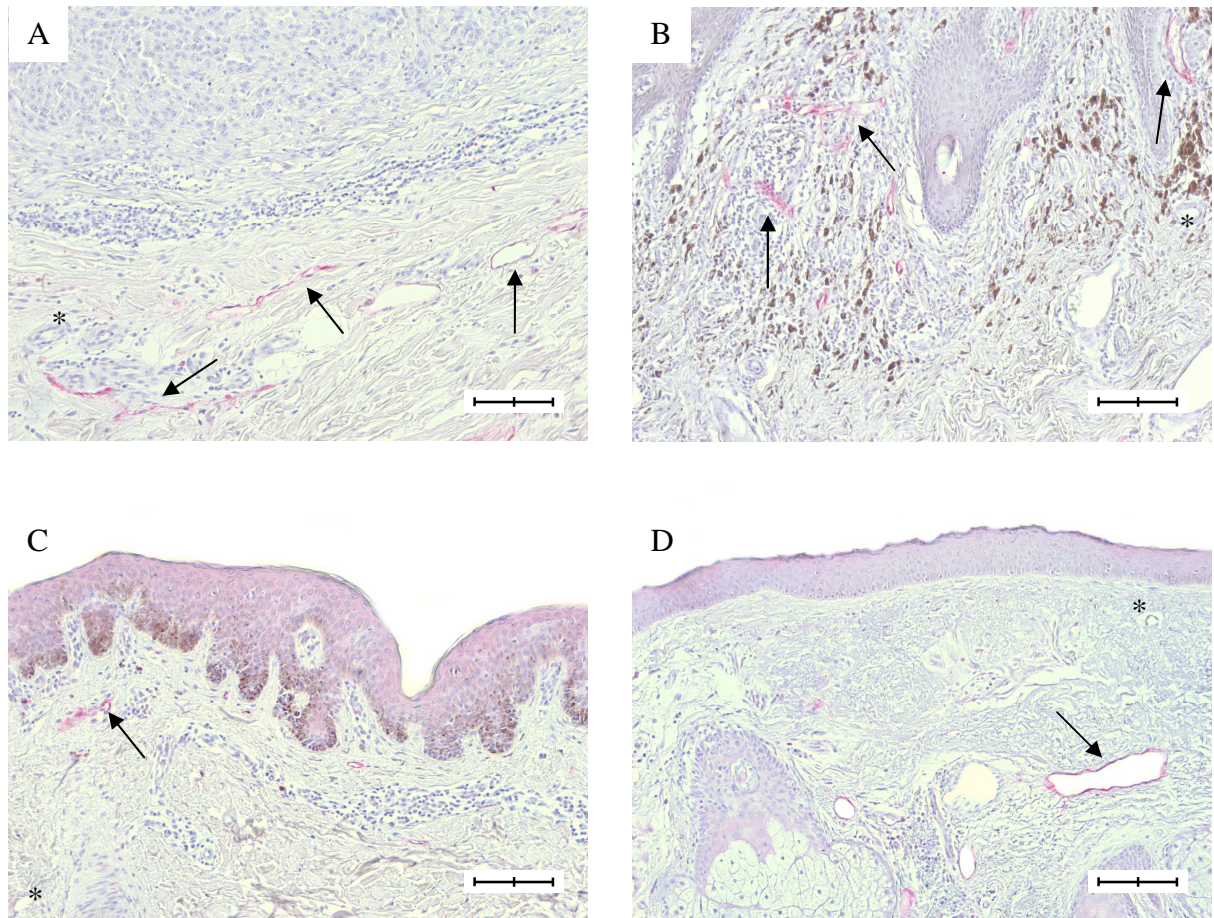
In der immunhistochemischen Untersuchung kutaner Melanommetastasen mit LYVE-1 als spezifischen Lymphgefäßmarker zeigte sich analog zu der zuvor durchgeführten panvaskulären Gefäßanalyse im tumorangrenzenden Gewebe ($15,8 \pm 1,9$ Gefäße/mm²) eine signifikant höhere Dichte an Lymphgefäßen [LVD] als im Tumorgewebe selbst ($8,9 \pm 1,6$ Gefäße/mm²; $p=0,0068$). Die peritumorale Lymphgefäßdichte ($539,4 \pm 94,1$ µm²) waren signifikant größer als die intratumorale Lymphgefäßdichte ($232,3 \pm 40,7$ µm²; $p=0,0054$).

Vergleicht man die peritumorale Lymphgefäßdichte kutaner Melanommetastasen ($15,8 \pm 1,9$ Gefäße/mm²) mit gutartigem Gewebe, so ist diese sowohl gegenüber der Lymphgefäßdichte in normaler Haut ($10,5 \pm 1,2$ Gefäße/mm²; $p=0,029$) als auch der im Peritumorgewebe benigner Nävuszellnävus ($9,2 \pm 1,3$ Gefäße/mm²; $p=0,008$) signifikant erhöht.

Um das Ausmaß der gesteigerten Lymphgefäßdichte in den kutanen Melanommetastasen besser bewerten zu können, wurden die Gewebeschnitte der primären malignen Melanome ebenfalls nach LYVE-1-Färbung immunhistologisch analysiert. Auch hier zeigte sich eine vermehrte Lymphgefäßdichte ($13,7 \pm 1,9$ Gefäße/mm²). Im Gegensatz zu den kutanen Melanommetastasen war jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen intratumoralem ($14,1 \pm 2,4$ Gefäße/mm²) und peritumoralem ($13,3 \pm 1,6$ Gefäße/mm²) Gewebe nachweisbar. Die peritumorale Lymphgefäßdichte der Primärtumore war gegenüber dem Peritumorgewebe benigner Nävuszellnävus signifikant erhöht ($p=0,042$). Fünf der 21 untersuchten Primärtumore waren zum Zeitpunkt der Exzision bereits metastasiert. Unterschiede hinsichtlich der Lymphgefäßdichte waren zwischen diesen und den 15 anderen primären malignen Melanomen jedoch nicht zu verzeichnen.

In Abbildung 6 ist die Lymphangiogenese der analysierten Gewebeentitäten mittels abgebildeter Hot-Areas nach LYVE-1-Färbung veranschaulicht. Die Erkenntnisse der Lymphgefäßanalyse sind in Form eines Balkendiagramms in Abbildung 7 dargestellt.

Abbildung 6: Hot-Area von kutaner Melanommetastase, primärem malignem Melanom und benignem Gewebe (LYVE-1-Färbung)



A-D: Die angefärbten Lymphgefäße sind bedingt durch ihren meist kleinen Durchmesser vor allem im Längsschnitt gut zu erkennen (siehe Pfeile). Die dickwandigen Blutgefäße zeigen keine immunhistochemische Anfärbung unter dem Marker LYVE-1 (siehe *)

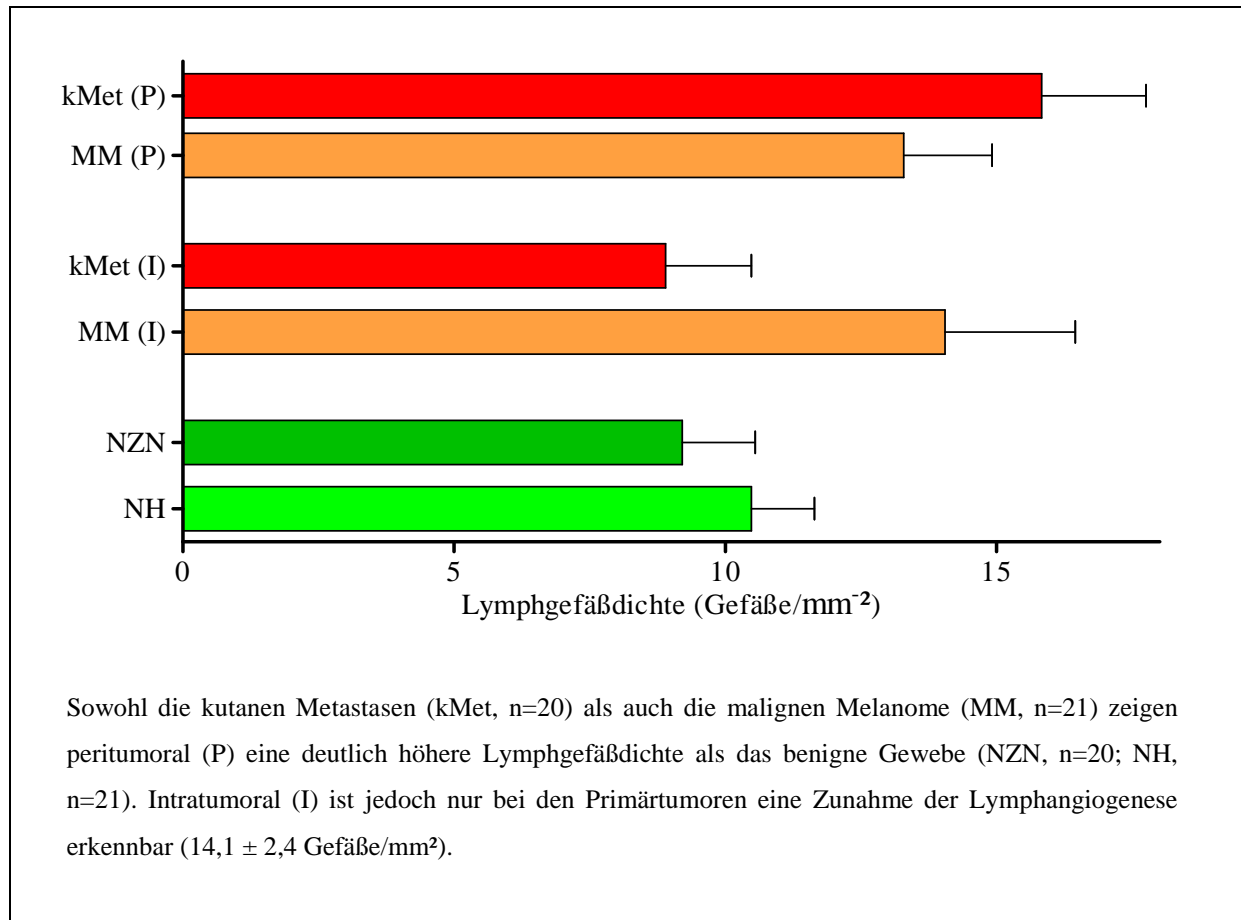
A: kutane Melanommetastase; größere Lymphgefäßformationen sind vorwiegend peritumoral zu finden. Die hohe Zelldichte ermöglicht eine sichere Abgrenzung des Tumorgewebes und bedingt womöglich die geringe intratumorale Lymphgefäßdichte.

B: primäres malignes Melanom vom nodulären Typ; eine im Tumorgewebe, verglichen mit der kutanen Metastase (Abb.1) geringere Zelldichte und ein vermehrtes Einwachsen von Lymphgefäßen.

C, D: Nävuszellnävus (C) und Normalhaut (D) weisen weniger Lymphgefäße aus das Tumorgewebe auf. Darüber hinaus besitzen viele der Lymphgefäße ein größeres Lumen.

[LYVE-1-Färbung; 100fache Vergrößerung; Maßstabsbalken : 200µm]

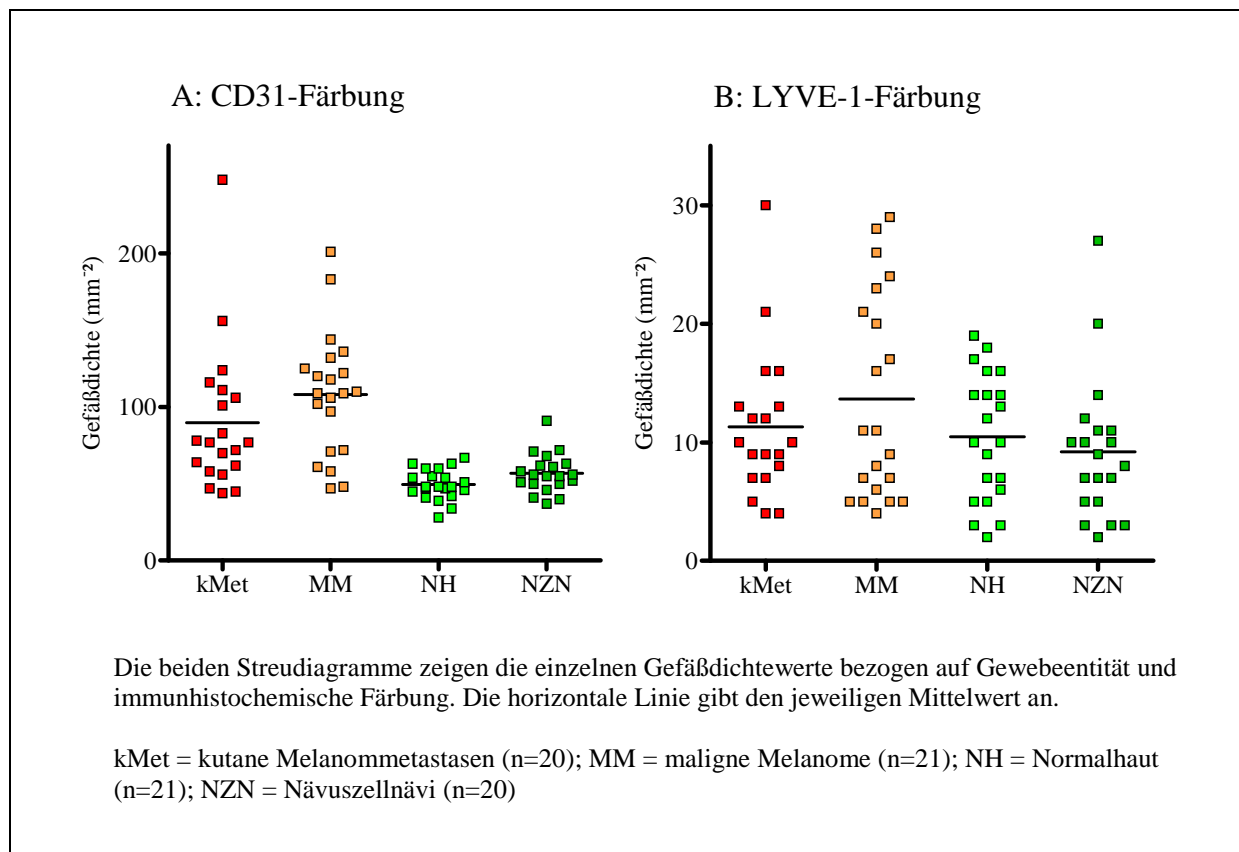
Abbildung 7: Vergleichsanalyse zur Lymphangiogenese in kutanen Melanommetastasen, primären Melanomen und benignem Gewebe (LYVE-1-Färbung)



4.1.3 Einflussfaktoren

Die vorausgegangenen Untersuchungen dieser Arbeit wiesen im Melanomgewebe insgesamt eine signifikant gesteigerte Vaskularisation gegenüber gesundem Gewebe nach. Gleichwohl zeigte sich in den immunhistochemisch angefärbten Schnittpräparaten der primären und sekundären Melanome eine gewisse Variabilität hinsichtlich der Gefäßdichte. So waren unter den CD-31-angefärbten malignen Melanomgeweben neben wenigen Extremwerten mit einer Vaskularisation von bis zu 248 Gefäßen/mm² auch einige Schnittpräparate zu verzeichnen, die mit beispielsweise 56 Gefäßen/mm² hinsichtlich der Blutgefäßdichte gutartigem Gewebe glichen. In Abbildung 8 sind die erhobenen Gefäßdichten der einzelnen mittels CD-31 und LYVE-1 angefärbten Gewebeschnitte graphisch dargestellt.

Abbildung 8: Gefäßdichte der immunhistochemisch analysierten Schnittpräparate



Ob diesem Umstand lediglich natürliche Abweichungen oder aber einflussnehmende Faktoren zu Grunde liegen, sollte im Weiteren analysiert werden. Zu diesem Zweck wurden Geschlecht, Patientenalter und Tumorlokalisierung sowie histologische Eigenschaften des Tumors in Hinblick auf dessen Angiogenese und Lymphangiogenese untersucht. Auf Grund des von der Arbeitsgruppe um Soheil Dadras beschriebenen Zusammenhanges zwischen peritumorale Lymphgefäßdichte und Metastasierungsrisiko des primären malignen Melanoms (Dadras et al., 2005) könnte das Identifizieren von lymphangiogenesebeeinflussenden Faktoren von hohem prognostischem Nutzen sein.

Im Rahmen dieser Analyse zeigte sich für das primäre maligne Melanom (Tabelle 4) ein Zusammenhang zwischen der Blutgefäßdichte (BVD) und den prognostisch relevanten Faktoren Tumordicke und Ulzeration. So wiesen Primärtumore mit einer Tumordicke nach Breslow von mindestens 3.0 mm und/oder Ulzeration eine signifikant höhere Blutgefäßdichte ($128,2 \pm 11,1$ Gefäße/mm²) als dünnere, nicht-ulzerierte Primärtumoren auf ($86,1 \pm 10,4$ Gefäße/mm²; $p=0,0221$). Für die anderen untersuchten Eigenschaften könnte im Rahmen

dieser Analysen kein signifikanter Zusammenhang mit der proangiogenetischen oder prolymphangiogenetischen Aktivität des Primärtumors beobachtet werden.

Tabelle 4: Einfluss diverser Faktoren auf Angiogenese und Lymphangiogenese primärer maligner Melanome

Eigenschaften	n	BVD¹	P-Wert	LVD²	P-Wert	
Geschlecht	m	10	100,1 ± 10,5	0,65	13,4 ± 2,8	
	w	11	115,5 ± 13,9		13,9 ± 2,7	0,81
Alter	< 70J	11	112,1 ± 10,6	0,57	14,6 ± 2,7	
	> 70J	10	103,8 ± 14,8		12,7 ± 2,8	0,58
Lokalisation	Kopf,Hand,Fuß	5	111,2 ± 23,6	0,90	19,2 ± 4,0	
	Rumpf	7	98,9 ± 14,1		10,0 ± 1,9	0,37
	Extremitäten	9	113,7 ± 12,9		13,4 ± 3,3	
Histologie	SSM	10	105,9 ± 9,7	0,86	12,6 ± 2,8	
	NM	11	110,2 ± 14,8		14,6 ± 2,7	0,69
Eindringtiefe	< 3mm	10	86,1 ± 10,4	0,02*	11,2 ± 2,1	
	≥ 3mm/ulz ³	11	128,2 ± 11,1		15,9 ± 3,0	0,44

(¹Blutgefäßdichte: Gefäßanzahl / Fläche [mm⁻²]; ²Lymphgefäßdichte: Gefäßanzahl / Fläche [mm⁻²]; ³ulzeriert; *Mann-Whitney-U-Test)

Im darauf folgenden Schritt wurde nach möglichen Einflussfaktoren auf Angiogenese und Lymphangiogenese in kutanen Melanometastasen gesucht (Tabelle 5). Hierbei ließen sich jedoch keinerlei Zusammenhänge erkennen. So zeigten selbst kutane Metastasen eines nach Breslow mindestens 3mm dicken und/oder ulzerierten Primärtumors keine signifikant erhöhte Gefäßdichte (p=0,35). Ebenso wenig wiesen die Faktoren Geschlecht (p=0,65) und Alter (p=0,46) des Patienten sowie Lokalisation der Metastasen (p=0,89) einen Einfluss auf die Vaskularisation des Metastasengewebes auf. Die gesonderte Betrachtung der Lymphgefäßdichte blieb ebenfalls unauffällig.

Tabelle 5: Einfluss diverser Faktoren auf Angiogenese und Lymphangiogenese kutaner Melanommetastasen

Eigenschaften	n	BVD¹	P-Wert	LVD²	P-Wert	
Geschlecht	m	6	103,0 ± 30,3	0,9	11,8 ± 5,7	
	w	14	84,1 ± 8,7		11,4 ± 1,1	0,25
Alter	< 60J	8	78,8 ± 10,4	0,46	8,6 ± 1,1	
	> 60J	12	97,1 ± 16,3		13,6 ± 2,5	0,16
Lokalisation	Kopf,Hand,Fuß	4	115,3 ± 46,1	0,89	16,5 ± 6,1	
	Rumpf	8	78,5 ± 9,3		7,7 ± 1,3	0,16
	Extremitäten	8	88,3 ± 12,6		12,4 ± 1,6	
Histologie des Primarius	SSM	7	79,0 ± 10,1	0,87	9,9 ± 2,9	
	NM	8	83,1 ± 13,9		12,6 ± 1,9	0,62
Eindringtiefe des Primarius	< 3mm	8	84,3 ± 8,2	0,35	10,0 ± 0,8	
	≥ 3mm/ulz ³	6	78,3 ± 19,4		12,8 ± 2,3	0,66

(¹Blutgefäßdichte: Gefäßanzahl / Fläche [mm⁻²]; ²Lymphgefäßdichte: Gefäßanzahl / Fläche [mm⁻²]; ³ulzeriert)

4.1.3.1 Tumordicke und Ulzeration

Vor dem Hintergrund der zuvor beschriebenen, signifikant höheren Gefäßdichte in mindestens 3 mm dicken und/oder ulzerierten Primärtumoren, wurden nun Tumordicke und Ulzeration hinsichtlich ihres Einflusses auf die Tumordurchblutung getrennt untersucht. Jeweils sieben der insgesamt 21 analysierten Primärtumoren wurden durch den Dermatohistopathologen mit einer Tumordicke von mindestens 3 mm beziehungsweise als ulzeriert beschrieben. Drei dieser Präparate wiesen beide histologischen Eigenschaften gemeinsam auf. Gegenüber nicht-ulzerierten und < 3mm dicken Primärtumoren (86,1 ± 10,4 Gefäße/mm²) zeigte das mindestens 3mm dicke Melanomgewebe eine signifikant höhere Gefäßdichte (137,7 ± 14,6 Gefäße/mm²; p=0,03) und das ulzerierte Melanomgewebe einen deutlichen Trend hinsichtlich einer höheren Gefäßdichte (114,6 ± 8,8 Gefäße/mm²; p=0,07). Somit scheinen Tumordicke aber auch Ulzeration unabhängig von einander mit der proangiogenetischen Aktivität des Primärtumors zu korrelieren. In Hinblick auf kutane Metastasen konnte auch bei der getrennte Analyse dieser beiden Faktoren der jeweiligen Primärtumore keine Assoziation mit der Gefäßdichte beobachtet werden.

4.2 Wirkung von PTK/ZK auf metastasierte maligne Melanome

4.2.1 Klinischer Verlauf

Die Auswertung der PTK/ZK-Studie bezüglich des therapeutischen Nutzens dieses Angiogenese-Inhibitors für Patienten mit metastasiertem malignen Melanom erfolgte an Hand der patientenbezogenen Fallberichte. Das mittlere progressionsfreie Überleben (PFS) der fünf retrospektiv untersuchten Patienten lag bei $67,0 \pm 22,6$ Tagen. Eine getrennte Analyse beider Studienarme offenbarte dabei ein längeres mittleres PFS der kombi-therapierten Patienten ($84,3 \pm 35,1$ Tage; $n=3$) gegenüber den mit PTK/ZK monotherapierten Patienten ($41,0 \pm 17,0$ Tage; $n=2$). Eine komplette oder partielle Remission des Tumorgewebes ließ sich an Hand der Fallberichte jedoch in keinem der beiden Therapiearme beobachten. Gemäß dem Studienprotokoll wurden sämtliche Patienten, sobald diese unter der angiogenesehemmenden Behandlung ein deutliches Fortschreiten der Tumorerkrankung aufwiesen, der jeweils empfohlenen Standardtherapie zugeführt. Therapiebedingte Nebenwirkungen machten hingegen für keinen der Probanden eine vorzeitige Beendigung der Targeted-Therapie notwendig.

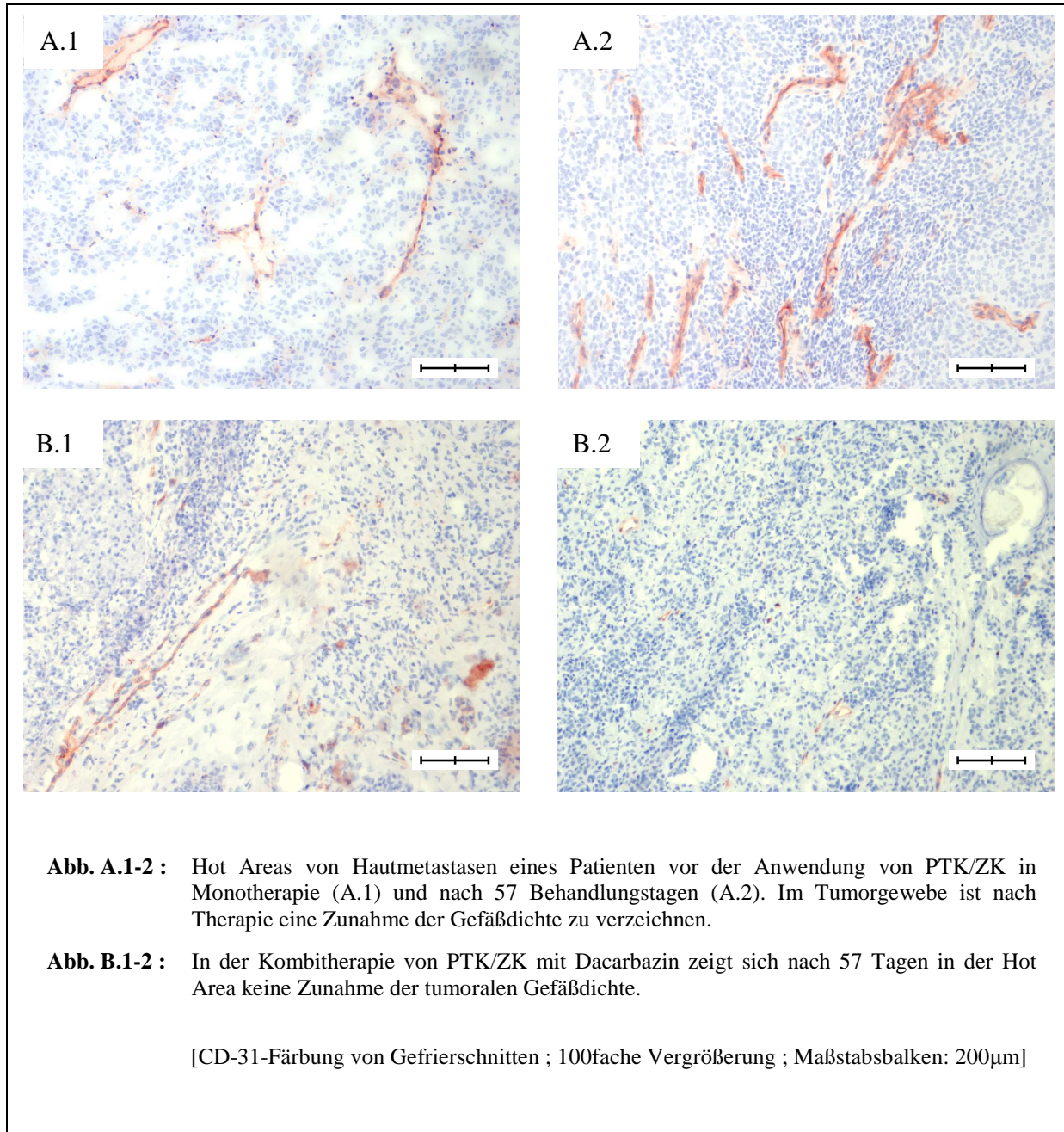
4.2.2 Einfluss auf kutane Melanommetastasen

Unter Verwendung der Immunhistochemie wurde untersucht, inwieweit sich der klinische Verlauf der behandelten Probanden in der Gefäßarchitektur ihrer entnommenen kutanen Melanommetastasen widerspiegelt.

Hierbei zeigte der histologische Vergleich der Tumorgewebe, welche den Patienten vor Studienbeginn und nach 57 Tagen Behandlung entnommen wurden, weder nach Monotherapie noch nach Kombitherapie mit Dacarbazin eine erkennbare Abnahme der Gefäßdichte. Ebensowenig ließen sich unter dem Mikroskop Anzeichen für Nekrosen im Metastasengewebe nachweisen. Diese Beobachtungen können somit als histologisches Korrelat des zuvor klinisch beschriebenen Ausbleibens von Regressionsprozessen angesehen werden. In Therapiearm A ließ sich unter Monotherapie mit PTK/ZK sogar eine geringe Zunahme der Gefäßdichte beobachten. Auf Grund der geringen Patientenzahl musste jedoch auf statistische Nachweise verzichtet werden. In Abbildung 9 sind die Hot-Areas der kutanen

Melanommetastasen unter Verwendung des panvaskulären Marker CD-31 unter Berücksichtigung des jeweiligen Therapiekonzeptes abgebildet.

Abbildung 9: CD-31-angefärbte kutane Melanommetastasen vor und nach angiogenesehemmender Therapie



4.2.3 VEGF-Plasmakonzentration

Der proangiogenetische Wachstumsfaktor VEGF-A sowie die prolymphangiogenetischen Wachstumsfaktoren VEGF-C und VEGF-D gelten als Schlüsselfaktoren der Melanombedingten Gefäßneubildung. Mit Hilfe spezifischer ELISAs sollte untersucht werden, ob ein Zusammenhang zwischen eben diesen Zytokinen und dem beobachteten Resistenzverhalten besteht, welches die Melanommetastasen vor allem unter einer Monotherapie mit PTK/ZK sowohl klinisch als auch histologisch aufwies. Dazu wurde die Plasmakonzentration der drei VEGF-Moleküle vor und nach 57 Behandlungstagen quantitativ gemessen.

Hierbei wiesen die beiden monotherapierten Patienten nach der Behandlung mit PTK-ZK eine höhere VEGF-Konzentration im Plasma auf als zu Beginn der Phase-II-Studie. So ließ sich im Plasma beider Probanden eine VEGF-A Konzentration von etwa 40 pg/ml nachweisen, welche jeweils zuvor unterhalb der Nachweisgrenze lag. Darüber hinaus war unter der angiogenesehemmenden Therapie eine Erhöhung der VEGF-C- und VEGF-D-Konzentration ebenfalls bei beiden Patienten aus Studienarm A zu verzeichnen.

In Studienarm B konnte nur bei einem der drei Probanden eine Zunahme der Wachstumsfaktoren im Blut beobachtet werden. So zeigte dieser Patient nach Behandlung mit PTK/ZK und Dacarbazin eine VEGF-A-Konzentration im Plasma von 49,6 pg/ml sowie eine Erhöhung der VEGF-C und VEGF-D-Konzentration vergleichbar mit Studienarm A. Dennoch wirkte sich dieser Befund unter Chemotherapie nicht negativ auf das progressionsfreie Überleben des Patienten aus. Im Falle der beiden anderen Patienten dieses kombinierten Therapiekonzeptes blieb die VEGF-A-Konzentration auch nach 57 Behandlungstagen unterhalb der Nachweisgrenze. Darüber hinaus war unter Chemotherapie sogar eine Abnahme an VEGF-C und VEGF-D im Plasma beider Probanden zu messen. Tabelle 6 fasst die Ergebnisse aus den ELISA-Messungen der fünf Patienten in Abhängigkeit vom Therapiearm, vom klinischen Verlauf und von der therapiebedingten Gefäßentwicklung der kutanen Melanommetastasen zusammen.

Tabelle 6: VEGF-Plasma-Konzentrationen unter dem Gesichtspunkt der bisherigen Erkenntnisse dieser klinischen Studie

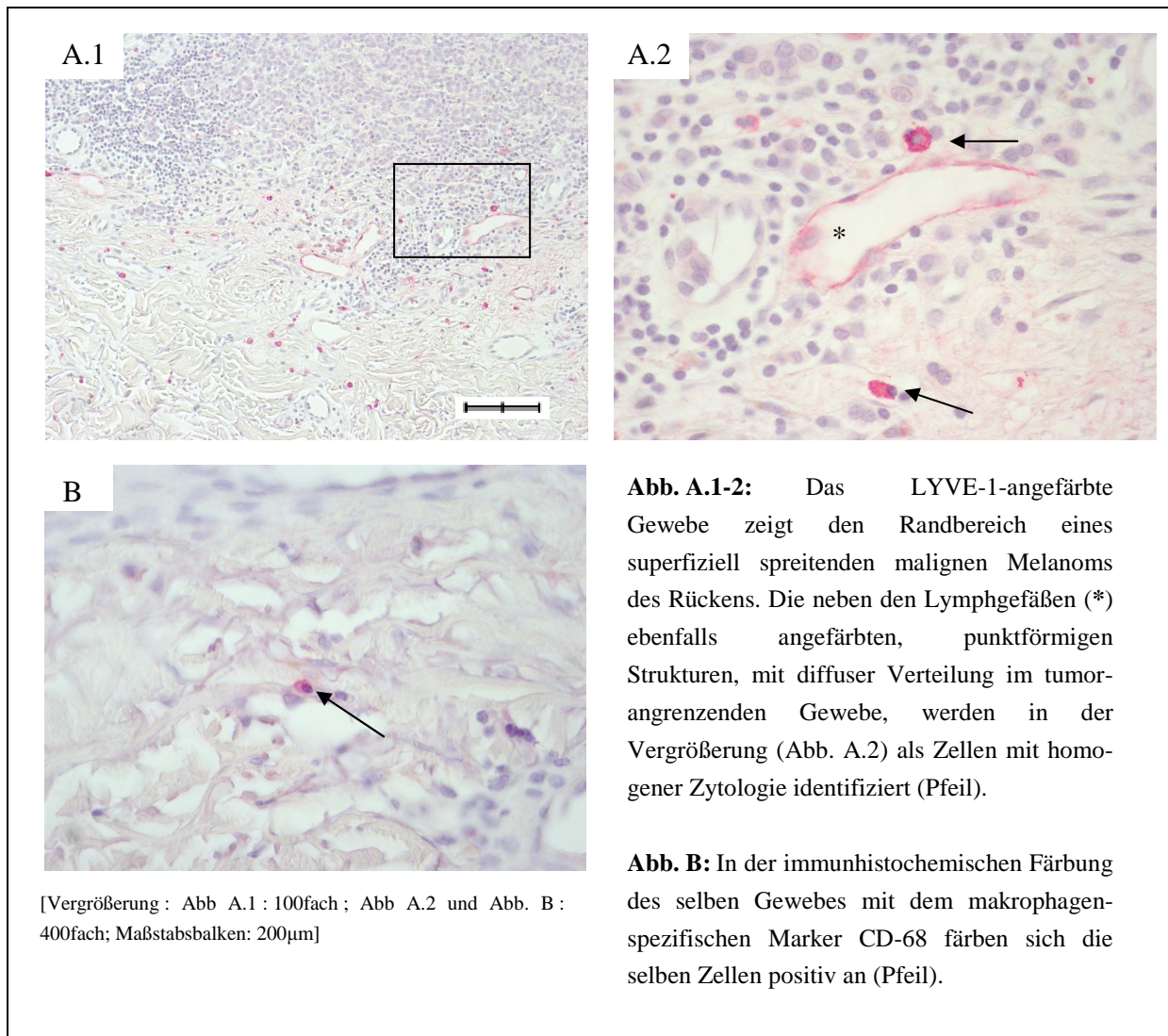
			Nach 57 Behandlungstagen			
Studienarm	Patient	PFS ¹	VD ²	VEGF-A	VEGF-C	VEGF-D
A (PTK/ZK)	1	24 d	(▲)	▲ (Ø → 42,4 ³)	▲ (317,3 → 674,5)	▲ (243,2 → 275,7)
	2	58 d		▲ (Ø → 38,8)	▲ (356,7 → 371,3)	▲ (351,8 → 370,1)
B (PTK/ZK+DTIC)	3	63 d	(▼)	Ø	▼ (290,2 → 138,2)	▼ (184,8 → 138,9)
	4	37 d		Ø	▼ (826,1 → 346,1)	▼ (174,8 → 160,5)
	5	153 d		▲ (Ø → 49,6)	▲ (276,7 → 896,8)	▲ (138,9 → 193,3)

(¹ Progressionsfreies Überleben (d = Tage); ² Aussagen zur Gefäßdicke, basierend auf Beobachtungen. Eine statistische Auswertung konnte aufgrund der geringen Datenmenge jedoch nicht folgen; ³ Angaben der VEGF-Konzentrationen in pg/ml)

4.3 LYVE-1-positive Makrophagen

Um die Lymphangiogenese in kutanen Melanometastasen sowie anderen Geweben immunhistochemisch untersuchen zu können, wurde im Rahmen dieser wissenschaftlichen Arbeit LYVE-1 als lymphspezifischer Marker verwendet. Dabei fielen LYVE-1-positive Zellen mit homogener Morphologie unter dem Lichtmikroskop auf, welche vor allem in malignem Gewebe gehäuft auftraten. Der Verdacht, es könnte sich hierbei um spezielle Gewebe-Makrophagen handeln, wurde mit Hilfe einer immunhistochemischen Doppelfärbung mit LYVE-1 und dem makrophagenspezifischen Marker CD-68 bestätigt (Abb. 10). Die als LYVE-1-positive Makrophagen identifizierten Zellen fanden somit keine Berücksichtigung in den quantitativen Analysen zur Lymphangiogenese.

Abbildung 10: LYVE-1-positive Makrophagen in malignen Melanomen



5. Diskussion

Vor 38 Jahren stellte der US-Krebsforscher Judath Folkman die These auf, dass Neubildung von Blut- und Lymphgefäßen grundlegend für Wachstum und Filialisierung von Tumoren sei. Die Erkenntnisse aus daraufhin durchgeführten Untersuchungen sprachen für die Richtigkeit seiner Hypothese und läuteten somit die Ära einer neuen, tumoraushungernden Krebstherapie ein. Seitdem haben sich Angiogenese-Inhibitoren in der Behandlung vieler bösartiger Tumoren etabliert.

Auch hinsichtlich des primären malignen Melanoms gilt eine gesteigerte Angiogenese und Lymphangiogenese dank umfassender Analysen allgemein als bewiesen, ebenso deren Notwendigkeit für Wachstum und Metastasierung des Primärtumors. Ein Durchbruch unter Antiangiogenesetherapie blieb bisher trotz großer Zuversicht jedoch aus. Um mehr Licht in diesen an sich widersprüchlichen Umstand zu bringen, wurden in dieser Arbeit erstmals umfangreiche Analysen zur Gefäßneubildung in Melanommetastasen durchgeführt. Ursächlich für die bisher geringe Beachtung der Melanomfiliae ist vermutlich die Annahme, dass deren Angiogenese und Lymphangiogenese im selben Maße wie in primären malignen Melanomen, auf Grund gleichartiger Zellpopulationen sowie vergleichbarer nutritiver Bedürfnisse gesteigert sein müsse. Die bisher zumeist unbefriedigenden Ergebnisse klinischer Studien mit Angiogenese-Inhibitoren an Patienten mit metastasiertem malignen Melanom machen eine kritische Betrachtung dieser Hypothese jedoch notwendig. Es gilt zu klären, ob die Bedeutung der Gefäßneubildung in Melanommetastasen tatsächlich mit der in Primärtumoren gleichzusetzen ist. So wäre es beispielsweise auch denkbar, dass die hämatogen beziehungsweise lymphogen streuenden Melanomzellen vorwiegend bereits gut durchblutete Gewebe infiltrieren um dort heranzuwachsen. Im Gegensatz zum Primärtumor hätte das Einsproßen neuer Gefäßkapillaren somit eine untergeordnete Bedeutung für die Tochtergeschwülste und folglich wäre den Angiogenese-Inhibitoren der wesentliche Wirkansatz entzogen.

Der Umstand des schwarzen Hautkrebses, vorwiegend auch auf kutaner Ebene zu streuen, ermöglicht dank guter operativer Zugänglichkeit eine äußerst komplikationsarme Entnahme von Hautmetastasen. Somit konnte in dieser Arbeit die Vaskularisation in kutanen Melanommetastasen wie auch deren Beeinflussung unter Antiangiogenesetherapie mittels einer weiteren Probeentnahme nach definiertem Therapieintervall problemlos histologisch

analysiert werden. Das maligne Melanom nimmt somit eine Sonderstellung auf dem Gebiet der immunhistologischen Angiogeneseforschung von Metastasen ein.

5.1 Angiogenese und Lymphangiogenese in kutanen Melanommetastasen

In dieser Arbeit bildete die Immunhistochemie, als Goldstandard für die quantitative und qualitative Evaluation von Gefäßverhältnissen in Gewebeproben, die Grundlage zur Erforschung der Angiogenese und Lymphangiogenese in kutanen Melanommetastasen. Die Auswertung richtete sich dabei primär nach den von Vermeulen publizierten, international anerkannten Analyse Kriterien, um möglichst vergleichbare, objektive Messdaten zu erhalten (Vermeulen et al., 2002). So wurde mikroskopisch unter 25facher Vergrößerung in jedem zu untersuchenden Paraffinschnitt jenes Areal mit der höchsten Gefäßdichte lokalisiert. Im Weiteren wurden jedoch nicht nur einige wenige "Hot-Spots" dieser Fläche unter starker Vergrößerung manuell oder mit Hilfe der Chalkley-Overlap-Technik untersucht. Stattdessen wurde unter 100facher Vergrößerung eine definierte "Hot-Area" im lokalisierten Areal analysiert. Diese Hot-Area wurde im Ganzen ausgewertet, um eine möglichst authentisch Wiedergabe der tatsächlich vorherrschenden Gefäßverhältnisse zu ermöglichen. Mit einer mittleren Größe von $1,12 \pm 0,03 \text{ mm}^2$ lag die Hot-Area der malignen Gewebe deutlich über der von Weidner geforderten Mindestgröße von $0,76 \text{ mm}^2$ (Weidner et al., 1991). Um bei der Auswertung mögliche Messfehler eines automatischen Gefäßscans auf Grund farblich falschpositiver Gewebestrukturen zu vermeiden (Choi et al., 2005), wurden die spezifisch angefärbten Gefäßstrukturen computerassistent von zwei unabhängigen Untersuchern markiert. Die objektive Auswertung erfolgte mit Hilfe der IP-Lab-Software (Scanalytics, Fairfax, USA), um Gefäßdichte, mittlere Gefäßgröße und relative Gefäßfläche der jeweiligen Hot Area exakt bestimmen zu können.

Durch die im Rahmen dieser Arbeit an zwanzig kutanen Melanommetastasen durchgeführten Untersuchungen konnte tatsächlich eine gegenüber gutartigem Gewebe signifikant gesteigerte Gefäßneubildung in den Tochtergeschwülsten des schwarzen Hautkrebses nachgewiesen werden. Betrachtet man die Auswertungen der immunhistochemischen CD-31-Färbungen, so war zum einen die Gefäßdichte [BVD] in den Melanommetastasen, als wichtigster indirekter Marker für Angiogenese, signifikant höher als in normaler Haut und benignen Nävuszellnävi und zum anderen war die mittlere Gefäßgröße [BVS] im

Metastasengewebe verglichen mit gutartigem Gewebe signifikant vermindert. Dies ist ebenfalls als histologisches Korrelat für die vermehrte Neubildung feinelumiger Gefäßkapillaren im Tumorgewebe zu werten. Bemerkenswert ist hierbei, dass der Flächenanteil der Gefäße an der Gesamtfläche der Hot-Area [BVA] im Metastasengewebe auf Grund der enorm gesteigerten Gefäßdichte trotz geringstem mittlerem Gefäßdurchmessers am größten war. Folglich muss den kutanen Melanometastasen eine beachtliche proangiogenetische Aktivität zugesprochen werden.

Wie bereits erwähnt, wurde ein Zusammenhang zwischen gesteigerter Gefäßneubildung und Prognoseverschlechterung bisher nur an primären malignen Melanomen nachgewiesen (Kashani-Sabet et al., 2002). Um das klinische Potential der nachgewiesenen Gefäßzunahme in den Melanomfiliae besser einschätzen zu können, wurden im Rahmen dieser Arbeit deshalb zusätzlich 21 Primärtumoren immunhistochemisch untersucht und beide Analysearme eingehend miteinander verglichen. Es wurden hierbei bewusst nur primäre maligne Melanome mit einer Tumordicke nach Breslow von mindestens 1,0 mm berücksichtigt (mittlere Tumordicke: 2,7mm), da diesen in vorherigen Studien eindeutig eine vermehrte Gefäßneubildung (Marcoval et al., 1997) und ein erhöhtes Metastasierungsrisiko (Breslow, 1970) einhergehend mit einer deutlichen Prognoseverschlechterung nachgewiesen werden konnte. Die daraufhin durchgeführte Vergleichsanalyse offenbarte, dass das Ausmaß der Gefäßneubildung in Melanometastasen tatsächlich mit dem in primären malignen Melanomen vergleichbar ist. Folglich haben gestreute Melanomzellen dieselbe proangiogenetische Aktivität wie mindestens 1,0 mm dicke Primärtumoren und darüber hinaus ist eine ebenso große Bedeutung der Gefäßneubildung für Wachstum und Streuung von Melanometastasen anzunehmen.

Im Rahmen der getrennten Analyse von intratumoralem und peritumoralem Gewebe innerhalb der CD-31-angefärbten Hot-Area wiesen sowohl die Primärtumore als auch die Metastasen im tumorangrenzenden Gewebe die höchste Vaskularisation auf. Zu vergleichbaren Ergebnissen kam eine Arbeitsgruppe aus Norwegen nach immunhistochemischer Färbung des Blutgefäßmarkers Faktor-VIII in Gewebeschnitten primärer und sekundärer maligner Melanome (Straume and Akslen, 2001). Als ursächlich hierfür werden eine vermehrte Sekretion von Wachstumsfaktoren an der Invasionsfront, sowie Interaktionen zwischen Tumorzellen, Stromazellen und Entzündungszellen diskutiert (Freeman et al., 1995). Diese genauere Gefäßanalyse spricht also dafür, dass die Stimulation der Gefäßneubildung in Melanomfiliae und Primärtumoren den gleichen molekularen Prinzipien unterliegt.

Hinsichtlich der tumorinduzierten Lymphangiogenese haben diverse Studien am Primärtumor des schwarzen Hautkrebs eine deutliche Korrelation zwischen der peritumoralen Lymphgefäßdichte [LVD] und dem Risiko einer Filialisierung nachweisen können (Shields et al., 2004). In einer Studie wurde ihr sogar der höchste prognostische Wert in Hinblick auf den Befall des Sentinellymphknoten zugesprochen (Dadras et al., 2005). Da es sich bei CD-31 um einen panvaskulären Marker handelt, wurden im Rahmen dieser Arbeit zusätzlich immunhistochemische Analysen mit dem lymphspezifischen Marker LYVE-1 an Primärtumoren und erstmals auch an kutanen Melanommetastasen durchgeführt, um deren Fähigkeit zur Lymphangiogenese erforschen zu können. Erste Beobachtungen hinsichtlich einer gesteigerten Lymphangiogenese in Melanomfiliae stammen aus einer 2005 publizierten Studie der Arbeitsgruppe um Soheil Dadras. Darin wurden in etwa vierzig Prozent der von Melanomzellen befallenen Sentinel-Lymphknoten prominente Lymphgefäßansammlungen beschrieben (Dadras et al., 2005).

Durch die computerassistierte Gefäßanalyse der LYVE-1-angefärbten Schnittpräparate kutaner Melanommetastasen konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmalig eine gegenüber gutartigem Gewebe signifikant höhere Dichte an Lymphgefäßen auch im tumorangrenzenden Gewebe von Melanommetastasen statistisch nachgewiesen werden. Die peritumorale Lymphgefäßdichte der Melanommetastasen war sogar höher als die der untersuchten Primärtumoren. Somit ist davon auszugehen, dass Melanommetastasen ebenso wie Primärtumoren neben den Blutgefäßen auch die Lymphgefäße in ihrem Wachstum stimulieren. Die Daten sprechen im Weiteren dafür, dass Tochtergeschwülste des schwarzen Hautkrebses ein vermutlich mindestens ebenso hohes Risiko zur lymphogenen Streuung wie primäre maligne Melanome mit einer Tumordicke nach Breslow von mindestens 1,0 mm besitzen.

Die intraindividuelle Analyse von Primärtumoren und ihren korrespondierenden tumorfreien Randbereichen machte deutlich, dass maligne Melanome die Vaskularisation im tumorangrenzenden Gewebe tatsächlich signifikant steigern und zwar unabhängig von der zuvor im Gewebe bestehenden Gefäßdichte.

Fasst man die bisher diskutierten Ergebnisse zusammen, so sprechen die immunhistochemischen Analysen für eine signifikant gesteigerte Angiogenese und Lymphangiogenese im Gewebe der Melanommetastasen und somit theoretisch für ein hohes therapeutisches Potential von Angiogenese-Inhibitoren bei Patienten mit metastasiertem malignen Melanom.

5.2 Einflussfaktoren

Das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Melanomgewebe zeigte zwar insgesamt eine gegenüber gutartigem Gewebe signifikant gesteigerte Gefäßdichte, dennoch war eine gewisse Inhomogenität hinsichtlich der Vaskularisation in den immunhistochemisch angefärbten Schnittpräparaten der primären und sekundären Melanomen zu beobachten. Ob diesem Umstand einflussnehmende Faktoren zu Grunde liegen, sollte im Rahmen dieser Studie durchleuchtet werden. Die hierbei gewonnenen Erkenntnisse wurden unter Berücksichtigung des jeweiligen, prognostischen Wertes der untersuchten Faktoren diskutiert.

Dabei zeigten mindestens 3.0 mm dicke Primärtumore in der Tat eine signifikant höhere Gefäßdichte gegenüber dünneren, nicht-ulzerierten Primärtumoren und untermauern damit die häufig beschriebene Abhängigkeit zwischen Tumorwachstum und Durchblutung. Ein Zusammenhang zwischen dem mit zunehmender Melanomdicke steigenden Metastasierungsrisiko (Schultz et al., 1990) und der nachweislich zunehmenden Gefäßdichte ist im weiteren anzunehmen. So gilt die Tumordicke nach Breslow, dank umfangreicher Studien wie der von Balch et al. an über 38000 Melanompatienten, auch als das wichtigste Prognosekriterium für Patienten im Melanomstadium I und II (Balch et al., 2009). Ob das laut AJCC-Validierungsstudie zweitwichtigste, prognostische Kriterium für Patienten im Melanomstadium I und II, nämlich die Ulzeration, ebenfalls einen Einfluss auf die Tumorangiogenese hat, war bislang unklar. Eine erst kürzlich veröffentlichte, klinische Studie an Patienten mit fortgeschrittenem Melanomstadium, beschrieb für ulzerierte maligne Melanome ein besseres Ansprechen auf die Behandlung mit Interferon- α als für nicht-ulzerierte Primärtumoren (Eggermont et al., 2008). Da Interferon- α nachweislich auch eine angiogenesehemmende Wirkung besitzt, wurde in der Dermatookologie seither neben einer veränderten Tumorbilogie auch eine stärkere Durchblutung ulzerierter Melanome als mögliche Ursache für dieses Studienergebniss diskutiert. Tatsächlich zeigten ulzerierte Primärtumore in dieser Arbeit einen deutlichen Trend für eine gesteigerte Angiogenese gegenüber kleiner 3mm dicken, nicht-ulzerierten Primärtumoren. Dies zumindest könnte eine Erklärung für das nachweislich erhöhte Metastasierungsrisiko ulzerierter maligner Melanome (Reintgen et al., 1992) und die damit verbundene Prognoseverschlechterung sein. Um die Rolle der Ulzeration in Bezug auf die tumorale Gefäßneubildung abschließend klären zu können, sind weiterführende Analysen notwendig.

Die von Austin et al. beobachtete Abnahme des rezidivfreien Überlebens mit zunehmendem Patientenalter (Austin et al., 1994) ließ sich im Rahmen dieser Arbeit nicht durch eine Assoziation des Alters mit der Tumervaskularisation erklärt. Ebenso wenig spiegelte sich der häufig genannte Prognosevorteil des weiblichen Geschlechts (Garbe et al., 1995) in einer gegenüber dem männlichen Geschlecht signifikant veränderten Blut- oder Lymphgefäßdichte in Primärtumoren oder kutanen Metastasen wider. Auch der prognostisch relevante Faktor der Tumorlokalisation (Wong et al., 1991) zeigte immunhistochemisch keine Assoziation mit der Tumervaskularisation primärer und sekundärer Melanomgewebe.

Somit wiesen die Analysen an Melanommetastasen lediglich für die Eindringtiefe nach Breslow und die Ulzeration eine proangiogenetische Aktivität nach. Das Ausmaß der Lymphangiogenese zeigte weder in den Melanomfiliae noch in den Primärtumoren eine Verbindung mit den untersuchten Faktoren. Inwieweit genetische Faktoren oder der Mitoseindex als Biomarker für das Ausmaß der Gefäßneubildung im schwarzen Hautkrebs genutzt werden können, müssen weiterführende Studien klären. Bekanntermaßen sind Chemotherapeutika besonders effektiv in der Behandlung von schnell proliferierenden Tumorerkrankungen, wie beispielsweise einer akuten Leukämie. Angenommen die Antiangiogenesetherapie ist analog hierzu vom Ausmaß der Gefäßproliferation abhängig, so wäre das Wissen um angiogenesebeeinflussende Faktoren womöglich von therapeutischem Nutzen. Dann könnten künftig gezielter jene Patienten in Studien mit Angiogenese-Inhibitoren aufgenommen werden, die auf Grund einer vermutlich hohen Angiogenese und Lymphangiogenese ein besonders gutes Ansprechen auf diese Form der Behandlung vermuten lassen. Die prognostisch hochrelevanten Faktoren Tumordicke und möglicherweise auch Ulzeration korrelierten zwar mit einer höheren Vaskularisation des Primärtumors, ob ein direkter Zusammenhang zwischen der Durchblutung primärer maligner Melanome und seiner Metastasen besteht, ließ sich in dieser Arbeit jedoch nicht eruiert. Folglich ist die Forschung auf diesem Gebiet noch nicht abgeschlossen.

5.3 Antiangiogenesetherapie beim metastasierten malignen Melanom

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte, retrospektive Analyse einer klinischen Phase-II-Studie an Patienten mit metastasiertem malignen Melanom offenbarte eine Verlängerung des mittleren, progressionsfreien Überleben (PFS) von 41 auf 84 Tage unter Kombination der

PTK/ZK-Therapie mit Dacarbazin (DTIC). Ob es sich hierbei um einen Synergieeffekt handelt, ließ sich auf Grund des geringen Patientenkollektivs statistisch nicht untersuchen, entsprechende Studien zeigten jedoch Erfolge unter kombinierter Einnahme von Zytostatika und Angiogenese-Inhibitoren. Auch am malignen Melanom konnten erste Arbeiten unter dieser Kombinationstherapie ein verbessertes Outcome für Patienten nachweisen (McDermott et al., 2008). Dieser Therapieerfolg wird vor allem der gleichzeitigen Hemmung des Tumorgewebes auf zellulärer und versorgender Ebene zugesprochen. Weitere mögliche Ursachen werden in der Literatur kontrovers diskutiert. So wird beispielsweise eine gesteigerte Wirksamkeit der Chemotherapie durch den Einfluss von Angiogenese-Inhibitoren auf die Vaskularisation des Tumorgewebes vermutet. Die Hemmung der VEGF-Signalkaskade führe zu einer Normalisierung der Architektur und Permeabilität tumoraler Gefäße, und damit auch des interstitiellen Druckes (Jain, 2001). Dieser Prozess, so die Annahme, steigere die tumorale Bioverfügbarkeit der Chemotherapie (Tong et al., 2004). Auf der anderen Seite wird eine effektivere Hemmung der Angiogenese unter Chemotherapie angenommen. So würden durch antineoplastische Substanzen neben den Tumorzellen auch die Endothelzellen am Wachstum gehindert werden. Die dabei auf tumorversorgende Endothelzellen antiapoptotisch wirkende VEGF-Signalkaskade, welche normalerweise unter Chemotherapie gesteigert ist, werde wiederum durch die Angiogenese-Inhibitoren unterbunden (Tran et al., 2002). Zusammenfassend wird also eine gegenseitige Wirkverstärkung beider Medikamentengruppen vermutet.

In der Monotherapie haben selektive Angiogenese-Inhibitoren bisher jedoch weder das Gesamtüberleben noch das progressionsfreie Überleben von Tumorpatienten signifikant verlängern können. Somit ist anzunehmen, dass Tumoren wie das maligne Melanom über Escapemechanismen verfügen, die eine Zunahme der Gefäßneubildung und folglich auch der Tumormasse selbst unter angiogenesehemmender Behandlung ermöglichen. Auch das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Metastasengewebe aus Studienarm A zeigte nach 57 Behandlungstagen trotz täglicher Einnahme von 1250mg PTK/ZK immunhistologisch eine höhere Gefäßdichte als das vor Therapiebeginn untersuchte Tumorgewebe. Analog hierzu zeigten sich weder klinisch noch histologisch Hinweise auf eine Regression der Tumormasse. Interessanterweise wies die Analyse der VEGF-Plasmakonzentrationen mit Hilfe spezifischer Immunoassays auf einen möglichen Escapemechanismus des schwarzen Hautkrebses hin. So war im Blutplasma der beiden monotherapierten Patienten eine deutliche Konzentrationszunahme an VEGF-A, VEGF-C und VEGF-D nach 57 Tagen reiner Antiangiogenesetherapie festgestellt worden. Das maligne Melanome vermehrt proangiogenetische Wachstums-

faktoren sezernieren (Graeven et al., 1999) und dies wiederum die Gefäßdichte, das Tumorwachstum und die Metastasierung steigert (Claffey et al., 1996), ist ebenso hinlänglich bekannt, wie die damit einhergehende Prognoseverschlechterung (Brychtova et al., 2008). Aber auch über den Aspekt der Gefäßneubildung hinaus scheinen diese Wachstumsfaktoren wichtig für die Progression metastasierter maligner Melanome zu sein. So stabilisiere VEGF bereits bestehende Endothelzellen durch Induktion der Bcl-2-Expression (Nor et al., 1999) und stimulierte Melanomzellen mittels so genannter „autokrine loops“ (Liu et al., 1995). In diesem Zusammenhang zeigte eine erst kürzlich veröffentlichte Arbeit ein schlechteres Therapieansprechen von Patienten, deren Melanomzellen eine erhöhte VEGF-3-Rezeptordichte aufwiesen (Mouawad et al., 2009).

Somit liegt die Vermutung nahe, dass Melanomfiliae im Rahmen dieser Studie mit einer kompensatorisch gesteigerten VEGF-Sekretion auf die aushungernde Wirkung des Angiogenese-Inhibitors PTK/ZK reagierten. Hypoxie als Trigger dieser Reaktion ist wahrscheinlich. Auch der hemmenden Wirkung von PTK/ZK auf die Lymphangiogenese scheint auf Grund erhöhter Plasmaspiegel von VEGF-C und VEGF-D entgegengewirkt worden zu sein. Damit wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals ein derartiger Escape-Mechanismus des malignen Melanoms gegenüber der Antiangiogenesetherapie beschrieben. Andere Tumorentitäten, wie beispielsweise das Pankreaskarzinom, zeigten in Studien mit Angiogenese-Inhibitoren den selben Resistenzmechanismus (Casanovas et al., 2005).

In den letzten Jahren haben Untersuchungen auf diesem Gebiet eine Vielzahl weiterer, tumoraler Resistenzmechanismen auf unterschiedlichsten Ebenen zu Tage gebracht. So wurde neben VEGF auch eine gesteigerte Expression anderer proangiogenetischer Faktoren, wie beispielsweise bFGF und SDF-1 unter angiogenesehemmender Therapie beobachtet (Batchelor et al., 2007). Darüber hinaus wurden Alternativmechanismen wie Vaskulogenese (Ding et al., 2008), „vessel cooption“ (Holash et al., 1999) und „vascular mimicry“ (Maniotis et al., 1999) in Tumoren beschrieben, welche eine angiogeneseunabhängige Tumorausbreitung ermöglichen sollen. Auch tumorangrenzende Zellen wie Fibroblasten (Orimo et al., 2005) und Makrophagen (Sica et al., 2008) scheinen in Interaktion mit Tumorzellen die Vaskularisation positiv zu beeinflussen. Dass diese Resistenzmechanismen von klinischer Relevanz sind, wird an Hand von Studien deutlich, in denen Tumoren auf Angiogenese-Inhibitoren sogar mit einer Progression auf Grund reaktiv gesteigerter Angiogenese reagierten (Loges et al., 2009).

Vor dem Hintergrund der Fülle an möglichen, proangiogenetischen Resistenzmechanismen ist die verminderte Wirksamkeit des Tyrosinkinaseinhibitors PTK/ZK in Monotherapie

vermutlich nicht allein auf eine gesteigerte VEGF-Sekretion zurückzuführen. So zeigten Melanomzelllinien in experimentellen Studien ebenfalls eine vermehrte Expression weiterer, proangiogenetischer Wachstumsfaktoren wie beispielsweise bFGF (Westphal et al., 2000). Eine umfassende Analyse hinsichtlich der genauen Resistenzantwort maligner Melanome auf antiangiogenetische Wirkstoffe wäre von großem Interesse um zukünftig die Targeted-Therapie gezielter danach ausrichten zu können.

Erstaunlicherweise zeigte das Metastasengewebe der drei Patienten aus Studienarm B unter Hinzunahme von Dacarbazin nach 57 Behandlungstagen keine histologischen Zeichen einer vermehrten Vaskularisation. Die Vermutung, dass Dacarbazin hemmend auf antiangiogenetische Escapemechanismen der Melanommetastasen wirken könnte, wurde durch die Ergebnisse der Plasmaanalyse unterstützt. So wies lediglich ein Patient dieses Studienarmes eine vermehrte Plasmakonzentration an VEGF-A, VEGF-C und VEGF-D unter dieser Kombitherapie auf. Im Plasma der beiden anderen Patienten blieb die VEGF-A-Konzentration sogar unterhalb der Nachweisgrenze. Für VEGF-C und VEGF-D war darüber hinaus eine Abnahme der Plasmakonzentration zu verzeichnen. Möglicherweise ist die verminderte VEGF-Expression auf die zytostatische Wirkung von Dacarbazin zurückzuführen. In jedem Fall machen die Ergebnisse aus Studienarm B aber deutlich, dass eine Kombination von Angiogenese-Inhibitor und Chemotherapeutikum effektiver die Gefäßneubildung und somit auch die Progression der Melanomerkrankung hemmt.

Ein Ziel dieser Arbeit war es, nach Biomarkern zu fahnden, die helfen das Ansprechen von Angiogenese-Inhibitoren vor Therapie individuell besser vorhersagen und unter Therapie besser beurteilen zu können. Auf Grund der Erkenntnisse im Rahmen dieser Arbeit stellt sich die Frage, welche Bedeutung die VEGF-Plasmakonzentration als prognostischer Biomarker haben könnte. Faktisch hängt das Ansprechen einer Targeted-Therapie entscheidend vom Ausmaß der Expression seines Targets ab. Demzufolge könnte ein erhöhter VEGF-Plasmaspiegel vor Therapiebeginn, ähnlich wie eine hohe HER-2-Expression bei der Behandlung eines Mammakarzinoms mit dem Antikörper Trastuzumab (Vogel et al., 2002), auf ein gutes Ansprechen gegenüber VEGF-Antikörpern hindeuten. Auf der anderen Seite könnte eine Zunahme der VEGF-Plasmakonzentration unter Antiangiogenesetherapie hinweisend auf ein gesteigertes Resistenzverhalten der Melanommetastasen und somit auf ein Versagen der bisherigen Behandlung sein. Diese Annahmen konnten bisher jedoch nur in wenigen Studien bestätigt werden. So zeigten Patienten mit initial hoher VEGF-Plasmakonzentration in einer Publikation zum kleinzelligen Bronchialkarzinom zwar tatsächlich ein besseres Therapieansprechen unter Hinzunahme von Bevacizumab, jedoch keine Verlängerung des

Gesamtüberlebens (Dowlati et al., 2008). In einer klinischen Studie an Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom hingegen war das progressionsfreie Überleben bei initial hohem VEGF-Plasmaspiegeln unter angiogenesehemmender Behandlung sogar verkürzt (Burstein et al., 2008). Zusätzlich zur inhomogenen Datenlage ist zu bedenken, dass Angiogenese und Lymphangiogenese ebenso wie Tumorprogression von einer Vielzahl von Faktoren abhängen. Darüber hinaus ist die quantitative Analyse der VEGF-Plasmakonzentrationen bisher wenig standardisiert. Die womöglich aussagekräftigere Analyse VEGF-angefärbter Schnittpräparate von Melanometastasen unter Antiangiogenesetherapie ist für die Verlaufsbeobachtung und Nachsorge jedoch ungeeignet.

Das Fehlen nennenswerter, PTK/ZK-induzierter Nebenwirkungen in der Follow-Up-Dokumentation dieser Studie weist auf einen potentiellen Vorteil von Angiogenese-Inhibitoren hin. Das gegenüber Chemotherapeutika sichtlich geringe Nebenwirkungsprofil lässt sich vermutlich durch das Wirkprinzip dieser Targeted-Therapie erklärt. So hemmen Angiogenese-Inhibitoren wie PTK/ZK lediglich die Neubildung von Gefäßen. Hierbei handelt es sich um einen biologischer Prozess, welcher abgesehen von Wundheilung für den menschlichen Organismus von sehr untergeordneter Bedeutung ist. Nachteil dieser spezifischen Wirkung von Angiogenese-Inhibitoren ist jedoch, dass bereits in den Tumor eingewachsene Gefäßkapillaren und somit das durch sie versorgte Melanomgewebe vermutlich nicht inhibiert werden. Welche klinische Bedeutung dies hat, wurde im Rahmen dieser Antiangiogenesestudie deutlich. So konnte weder in Studienarm A noch in Studienarm B eine Tumorregression auf klinischer oder histologischer Ebene nachgewiesen werden. Die Indikation zur Antiangiogenesetherapie sollte somit primär palliativ motiviert sein. Eine „Umwandlung“ fortgeschrittener Melanomstadien in chronische, langsam progrediente Krankheitsbilder im Sinne einer palliativen Behandlung ist vermutlich das primär durch Angiogenese-Inhibitoren anzustrebende Ziel.

5.4 LYVE-1 positive Makrophagen

Im Rahmen dieser Arbeit fielen im tumorangrenzenden Gewebe gehäuft LYVE-1-positive Zellen auf, die im Weiteren als CD-68-positive Makrophagen identifiziert werden konnten. Hiermit tat sich eine interessante Nebenbeobachtung auf, da aktuelle Publikationen auch am malignen Melanom LYVE-1-positive Makrophagen mit erhöhter tumoraler Angiogenese und

Lymphangiogenese in Zusammenhang bringen (Schledzewski et al., 2006). Das Makrophagen proangiogenetische Zytokine sezernieren können, ist zwar bekannt (Mantovani et al., 2002), neuere Studie zeigten jedoch speziell für LYVE-1-positive Makrophagen ein besonders hohes proangiogenetische Potential durch Aktivierung des VEGF-VEGFR2-Systems sowie durch Sekretion angiogeneserelevanter Metalloproteasen (Cho et al., 2007). Wie schon zuvor erwähnt, könnten diese Gewebezellen somit eine wichtige Rolle im Rahmen der Escapemechanismen von Melanommetastasen gegenüber Angiogenese-Inhibitoren wie PTK/ZK spielen und demzufolge ein weiteres potentiellles Angriffsziel der angiogenesehemmende Therapie darstellen.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Bisher haben klinische Studien mit Angiogenese-Inhibitoren keinen entscheidenden Vorteil für Patienten mit metastasiertem malignen Melanom erbringen können. Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe grundlegender Analysen das therapeutische Potential dieser neuen Therapieform zu hinterfragen und nach möglichen Ursachen für die fehlende Wirksamkeit zu suchen.

Hierzu wurde der Fokus erstmals auf die Metastasen des malignen Melanoms gerichtet. Dank spezifischer Antikörper konnte die Bedeutung der Angiogenese und Lymphangiogenese für kutane Melanomfiliae immunhistochemisch untersucht und mit anderen Gewebeentitäten verglichen werden. Die computerassistierte Auswertung offenbarte für Melanommetastasen ebenso wie für primäre maligne Melanome eine gegenüber gesunder Haut signifikant gesteigerte Gefäßneubildung und bescheinigt Angiogenesehemmern damit einen hohen potentiellen Nutzen.

Weshalb Patienten im fortgeschrittenen Melanomstadium bisher jedoch nicht von dieser Therapieform profitieren, wurde möglicherweise durch die in dieser Arbeit dargestellte Auswertung einer Phase-II-Studie mit dem Angiogenese-Inhibitor PTK/ZK beantwortet. Hierbei wiesen beide monotherapierten Patienten im Melanomstadium IV aus Studienarm A nach 57 Behandlungstagen eine Zunahme der VEGF-A, VEGF-C und VEGF-D Plasmakonzentration auf. Unter Kombination mit dem Chemotherapeutikum Dacarbazin in Studienarm B konnte dies nur bei einem von drei Patienten beobachtet werden. Dazu waren das mittlere, progressionsfreie Überleben in Studienarm A erniedrigt und die Gefäßdichte nach 57 Behandlungstagen sogar erhöht. Dies deutet auf einen womöglich durch Hypoxie getriggerten Escapemechanismus durch vermehrte Sekretion proangiogenetischer Wachstumsfaktoren hin, welcher unter Chemotherapie negativ beeinflusst wird.

In der vorliegenden Arbeit konnte somit gezeigt werden, dass Angiogenese-Inhibitoren eine klare Berechtigung in der Entwicklung neuer Behandlungsmethoden bei metastasierten malignen Melanomen besitzen. Die Entfaltung ihres Potentials wird jedoch von einem komplexen Zusammenspiel unterschiedlicher Faktoren beeinflusst, welches noch genauer verstanden werden muss. Die Zukunft einer wirksamen Antiangiogenesetherapie ist aus den Erkenntnissen dieser Arbeit zu möglichen Resistenzmechanismen vermutlich in einer Kombination mit effektiven Chemotherapeutika zu sehen.

7. Literatur

Austin PF, Cruse CW, Lyman G, Schroer K, Glass F, Reintgen DS. Age as a prognostic factor in the malignant melanoma population. *Ann Surg Oncol* 1994;1(6):487-94.

Avril MF, Aamdal S, Grob JJ, Hauschild A, Mohr P, Bonerandi JJ, Weichenthal M, Neuber K, Bieber T, Gilde K, Guillem Porta V, Fra J, Bonnetterre J, Saiag P, Kamanabrou D, Pehamberger H, Sufliarsky J, Gonzalez Larriba JL, Scherrer A, Menu Y. Fotemustine compared with dacarbazine in patients with disseminated malignant melanoma: a phase III study. *J Clin Oncol* 2004;22(6):1118-25.

Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG, Fleming ID, Gershenwald JE, Houghton A, Jr., Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MF, Morton DL, Reintgen DS, Ross MI, Sober A, Thompson JA, Thompson JF. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 2001;19(16):3635-48.

Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, Buzaid AC, Cochran AJ, Coit DG, Ding S, Eggermont AM, Flaherty KT, Gimotty PA, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MC, Jr., Morton DL, Ross MI, Sober AJ, Sondak VK. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol* 2009;27(36):6199-206.

Batchelor TT, Sorensen AG, di Tomaso E, Zhang WT, Duda DG, Cohen KS, Kozak KR, Cahill DP, Chen PJ, Zhu M, Ancukiewicz M, Mrugala MM, Plotkin S, Drappatz J, Louis DN, Ivy P, Scadden DT, Benner T, Loeffler JS, Wen PY, Jain RK. AZD2171, a pan-VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor, normalizes tumor vasculature and alleviates edema in glioblastoma patients. *Cancer Cell* 2007;11(1):83-95.

Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg* 1970;172(5):902-8.

Brychtova S, Bezdekova M, Brychta T, Tichy M. The role of vascular endothelial growth factors and their receptors in malignant melanomas. *Neoplasma* 2008;55(4):273-9.

Buettner PG, Leiter U, Eigentler TK, Garbe C. Development of prognostic factors and survival in cutaneous melanoma over 25 years: An analysis of the Central Malignant Melanoma Registry of the German Dermatological Society. *Cancer* 2005;103(3):616-24.

Burstein HJ, Chen YH, Parker LM, Savoie J, Younger J, Kuter I, Ryan PD, Garber JE, Chen H, Campos SM, Shulman LN, Harris LN, Gelman R, Winer EP. VEGF as a marker for outcome among advanced breast cancer patients receiving anti-VEGF therapy with bevacizumab and vinorelbine chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2008;14(23):7871-7.

Cameron DA, Cornbleet MC, Mackie RM, Hunter JA, Gore M, Hancock B, Smyth JF. Adjuvant interferon alpha 2b in high risk melanoma - the Scottish study. *Br J Cancer* 2001;84(9):1146-9.

Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000;407(6801):249-57.

Carvajal RD, Chapman PB, Wolchok JD, Cane L, Teitche JB, Lutzky J, Pavlick AC, Bastian BC, Antonescu CR, Schwartz GK. A phase II study of imatinib mesylate (IM) for patients with advanced melanoma harboring somatic alterations of KIT. *J Clin Oncol* 2009; 27:15s; abstr 9001.

Casanovas O, Hicklin DJ, Bergers G, Hanahan D. Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors. *Cancer Cell* 2005;8(4):299-309.

Cho CH, Koh YJ, Han J, Sung HK, Jong Lee H, Morisada T, Schwendener RA, Brekken RA, Kang G, Oike Y, Choi TS, Suda T, Yoo OJ, Koh GY. Angiogenic role of LYVE-1-positive macrophages in adipose tissue. *Circ Res* 2007;100(4):e47-57.

Choi WW, Lewis MM, Lawson D, Yin-Goen Q, Birdsong GG, Cotsonis GA, Cohen C, Young AN. Angiogenic and lymphangiogenic microvessel density in breast carcinoma: correlation with clinicopathologic parameters and VEGF-family gene expression. *Mod Pathol* 2005;18(1):143-52.

Claffey KP, Brown LF, del Aguila LF, Tognazzi K, Yeo KT, Manseau EJ, Dvorak HF. Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by melanoma cells increases tumor growth, angiogenesis, and experimental metastasis. *Cancer Res* 1996;56(1):172-81.

Clark WH, Jr., From L, Bernardino EA, Mihm MC. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res* 1969;29(3):705-27.

Dadras SS, Lange-Asschenfeldt B, Velasco P, Nguyen L, Vora A, Muzikansky A, Jahnke K, Hauschild A, Hirakawa S, Mihm MC, Detmar M. Tumor lymphangiogenesis predicts melanoma metastasis to sentinel lymph nodes. *Mod Pathol* 2005;18(9):1232-42.

Dadras SS, Paul T, Bertoncini J, Brown LF, Muzikansky A, Jackson DG, Ellwanger U, Garbe C, Mihm MC, Detmar M. Tumor lymphangiogenesis: a novel prognostic indicator for cutaneous melanoma metastasis and survival. *Am J Pathol* 2003;162(6):1951-60.

Demetri GD, van Oosterom AT, Garrett CR, Blackstein ME, Shah MH, Verweij J, McArthur G, Judson IR, Heinrich MC, Morgan JA, Desai J, Fletcher CD, George S, Bello CL, Huang X, Baum CM, Casali PG. Efficacy and safety of sunitinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumour after failure of imatinib: a randomised controlled trial. *Lancet* 2006;368(9544):1329-38.

Demierre MF, Chung C, Miller DR, Geller AC. Early detection of thick melanomas in the United States: beware of the nodular subtype. *Arch Dermatol* 2005;141(6):745-50.

Ding YT, Kumar S, Yu DC. The role of endothelial progenitor cells in tumour vasculogenesis. *Pathobiology* 2008;75(5):265-73.

Dorval T, Negrier S, Chevreau C, Avril MF, Baume D, Cupissol D, Oskam R, de Peuter R, Vinke J, Herrera A, Escudier B. Randomized trial of treatment with cisplatin and interleukin-2 either alone or in combination with interferon-alpha-2a in patients with metastatic

melanoma: a Federation Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer Multicenter, parallel study. *Cancer* 1999;85(5):1060-6.

Dowlati A, Gray R, Sandler AB, Schiller JH, Johnson DH. Cell adhesion molecules, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in patients with non-small cell lung cancer treated with chemotherapy with or without bevacizumab--an Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Clin Cancer Res* 2008;14(5):1407-12.

Dreys J, Hofmann I, Hugenschmidt H, Wittig C, Madjar H, Muller M, Wood J, Martiny-Baron G, Unger C, Marme D. Effects of PTK787/ZK 222584, a specific inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases, on primary tumor, metastasis, vessel density, and blood flow in a murine renal cell carcinoma model. *Cancer Res* 2000;60(17):4819-24.

Egberts F, Gutzmer R, Ugurel S, Becker JC, Trefzer U, Degen A, Schenck F, Frey L, Wilhelm T, Hassel JC, Schadendorf D, Livingstone E, Mauch C, Garbe C, Berking C, Rass K, Mohr P, Kaehler KC, Weichenthal M, Hauschild A. Sorafenib and pegylated interferon- α 2b in advanced metastatic melanoma: a multicenter phase II DeCOG trial. *Ann Oncol* 2011.

Eggermont AM, Suci S, Santinami M, Testori A, Kruit WH, Marsden J, Punt CJ, Sales F, Gore M, Mackie R, Kusic Z, Dummer R, Hauschild A, Musat E, Spatz A, Keilholz U. Adjuvant therapy with pegylated interferon alfa-2b versus observation alone in resected stage III melanoma: final results of EORTC 18991, a randomised phase III trial. *Lancet* 2008;372(9633):117-26.

Einspahr JG, Thomas TL, Saboda K, Nickolof BJ, Warneke J, Curiel-Lewandrowski C, Ranger-Moore J, Duckett L, Bangert J, Fruehauf JP, Alberts DS. Expression of vascular endothelial growth factor in early cutaneous melanocytic lesion progression. *Cancer* 2007;110(11):2519-27.

Erhard H, Rietveld FJ, van Altena MC, Brocker EB, Ruitter DJ, de Waal RM. Transition of horizontal to vertical growth phase melanoma is accompanied by induction of vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis. *Melanoma Res* 1997;7 Suppl 2:S19-26.

Ezekowitz RA, Mulliken JB, Folkman J. Interferon alfa-2a therapy for life-threatening hemangiomas of infancy. *N Engl J Med* 1992;326(22):1456-63.

Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* 2004;25(4):581-611.

Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003;9(6):669-76.

Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, Ribas A, McArthur GA, Sosman JA, O'Dwyer PJ, Lee RJ, Grippo JF, Nolop K, Chapman PB. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2010;363(9):809-19.

Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971;285(21):1182-6.

Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol* 2002;29(6 Suppl 16):15-8.

Folkman J, Watson K, Ingber D, Hanahan D. Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature* 1989;339(6219):58-61.

Freeman MR, Schneck FX, Gagnon ML, Corless C, Soker S, Niknejad K, Peoples GE, Klagsbrun M. Peripheral blood T lymphocytes and lymphocytes infiltrating human cancers express vascular endothelial growth factor: a potential role for T cells in angiogenesis. *Cancer Res* 1995;55(18):4140-5.

Garbe C, Buttner P, Bertz J, Burg G, d'Hoedt B, Drepper H, Guggenmoos-Holzmann I, Lechner W, Lippold A, Orfanos CE, et al. Primary cutaneous melanoma. Identification of prognostic groups and estimation of individual prognosis for 5093 patients. *Cancer* 1995;75(10):2484-91.

Garbe C, Eigentler TK. Diagnosis and treatment of cutaneous melanoma: state of the art 2006. *Melanoma Res* 2007;17(2):117-27.

Garbe C, Hauschild A, Volkenandt M, Schadendorf D, Stolz W, Reinhold U, Kortmann RD, Kettelhack C, Frerich B, Keilholz U, Dummer R, Sebastian G, Tilgen W, Schuler G, Mackensen A, Kaufmann R. Evidence and interdisciplinary consensus-based German guidelines: surgical treatment and radiotherapy of melanoma. *Melanoma Res* 2008a;18(1):61-7.

Garbe C, Hauschild A, Volkenandt M, Schadendorf D, Stolz W, Reinhold U, Kortmann RD, Kettelhack C, Frerich B, Keilholz U, Dummer R, Sebastian G, Tilgen W, Schuler G, Mackensen A, Kaufmann R. Evidence-based and interdisciplinary consensus-based German guidelines: systemic medical treatment of melanoma in the adjuvant and palliative setting. *Melanoma Res* 2008b;18(2):152-60.

Garbe C, Schadendorf D, Stolz W, Volkenandt M, Reinhold U, Kortmann RD, Kettelhack C, Frerich B, Keilholz U, Dummer R, Sebastian G, Tilgen W, Schuler G, Mackensen A, Kaufmann R, Hauschild A. Short German guidelines: malignant melanoma. *J Dtsch Dermatol Ges* 2008c;6 Suppl 1:S9-S14.

Geller AC, Miller DR, Annas GD, Demierre MF, Gilchrist BA, Koh HK. Melanoma incidence and mortality among US whites, 1969-1999. *Jama* 2002;288(14):1719-20.

Graeven U, Fiedler W, Karpinski S, Ergun S, Kilic N, Rodeck U, Schmiegel W, Hossfeld DK. Melanoma-associated expression of vascular endothelial growth factor and its receptors FLT-1 and KDR. *J Cancer Res Clin Oncol* 1999;125(11):621-9.

Hauschild A, Agarwala SS, Trefzer U, Hogg D, Robert C, Hersey P, Eggermont A, Grabbe S, Gonzalez R, Gille J, Peschel C, Schadendorf D, Garbe C, O'Day S, Daud A, White JM, Xia C, Patel K, Kirkwood JM, Keilholz U. Results of a Phase III, Randomized, Placebo-Controlled Study of Sorafenib in Combination With Carboplatin and Paclitaxel As Second-Line Treatment in Patients With Unresectable Stage III or Stage IV Melanoma. *J Clin Oncol* 2009.

Hauschild A, Rass K, Tilgen W. [Systemic treatment of melanoma. Current clinical trials]. *Hautarzt* 2008;59(6):484-91.

Hess-Stumpp H, Haberey M, Thierauch KH. PTK 787/ZK 222584, a tyrosine kinase inhibitor of all known VEGF receptors, represses tumor growth with high efficacy. *Chembiochem* 2005;6(3):550-7.

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, Lebbe C, Peschel C, Quirt I, Clark JI, Wolchok JD, Weber JS, Tian J, Yellin MJ, Nichol GM, Hoos A, Urba WJ. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2010;363(8):711-23.

Holash J, Maisonpierre PC, Compton D, Boland P, Alexander CR, Zagzag D, Yancopoulos GD, Wiegand SJ. Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science* 1999;284(5422):1994-8.

Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E, Ferrara N, Fyfe G, Rogers B, Ross R, Kabbinavar F. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004;350(23):2335-42.

Hwu WJ, Krown SE, Menell JH, Panageas KS, Merrell J, Lamb LA, Williams LJ, Quinn CJ, Foster T, Chapman PB, Livingston PO, Wolchok JD, Houghton AN. Phase II study of temozolomide plus thalidomide for the treatment of metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 2003;21(17):3351-6.

Jain RK. Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy. *Nat Med* 2001;7(9):987-9.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* 2008;58(2):71-96.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* 2009;59(4):225-49.

Kane RC, Farrell AT, Saber H, Tang S, Williams G, Jee JM, Liang C, Booth B, Chidambaram N, Morse D, Sridhara R, Garvey P, Justice R, Pazdur R. Sorafenib for the treatment of advanced renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2006;12(24):7271-8.

Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K, Partanen J, Taipale J, Petrova TV, Jeltsch M, Jackson DG, Talikka M, Rauvala H, Betsholtz C, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol* 2004;5(1):74-80.

Kashani-Sabet M, Sagebiel RW, Ferreira CM, Nosrati M, Miller JR, 3rd. Tumor vascularity in the prognostic assessment of primary cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 2002;20(7):1826-31.

Leo F, Cagini L, Rocmans P, Cappello M, Geel AN, Maggi G, Goldstraw P, Pastorino U. Lung metastases from melanoma: when is surgical treatment warranted? *Br J Cancer* 2000;83(5):569-72.

Liu B, Earl HM, Baban D, Shoaibi M, Fabra A, Kerr DJ, Seymour LW. Melanoma cell lines express VEGF receptor KDR and respond to exogenously added VEGF. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;217(3):721-7.

Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, de Oliveira AC, Santoro A, Raoul JL, Forner A, Schwartz M, Porta C, Zeuzem S, Bolondi L, Greten TF, Galle PR, Seitz JF, Borbath I, Haussinger D, Giannaris T, Shan M, Moscovici M, Voliotis D, Bruix J. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2008;359(4):378-90.

Loges S, Mazzone M, Hohensinner P, Carmeliet P. Silencing or fueling metastasis with VEGF inhibitors: antiangiogenesis revisited. *Cancer Cell* 2009;15(3):167-70.

Lorigan P, Eisen T, Hauschild A. Systemic therapy for metastatic malignant melanoma--from deeply disappointing to bright future? *Exp Dermatol* 2008;17(5):383-94.

Mandriota SJ, Jussila L, Jeltsch M, Compagni A, Baetens D, Prevo R, Banerji S, Huarte J, Montesano R, Jackson DG, Orci L, Alitalo K, Christofori G, Pepper MS. Vascular endothelial growth factor-C-mediated lymphangiogenesis promotes tumour metastasis. *Embo J* 2001;20(4):672-82.

Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, Seftor EA, Gardner LM, Pe'er J, Trent JM, Meltzer PS, Hendrix MJ. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol* 1999;155(3):739-52.

Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* 2002;23(11):549-55.

Marcocal J, Moreno A, Graells J, Vidal A, Escriba JM, Garcia-Ramirez M, Fabra A. Angiogenesis and malignant melanoma. Angiogenesis is related to the development of vertical (tumorigenic) growth phase. *J Cutan Pathol* 1997;24(4):212-8.

Masood R, Cai J, Zheng T, Smith DL, Hinton DR, Gill PS. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is an autocrine growth factor for VEGF receptor-positive human tumors. *Blood* 2001;98(6):1904-13.

McDermott DF, Sosman JA, Gonzalez R, Hodi FS, Linette GP, Richards J, Jakub JW, Beeram M, Tarantolo S, Agarwala S, Frenette G, Puzanov I, Cranmer L, Lewis K, Kirkwood J, White JM, Xia C, Patel K, Hersh E. Double-blind randomized phase II study of the combination of sorafenib and dacarbazine in patients with advanced melanoma: a report from the 11715 Study Group. *J Clin Oncol* 2008;26(13):2178-85.

Michels S, Rosenfeld PJ, Puliafito CA, Marcus EN, Venkatraman AS. Systemic bevacizumab (Avastin) therapy for neovascular age-related macular degeneration twelve-week results of an uncontrolled open-label clinical study. *Ophthalmology* 2005;112(6):1035-47.

Morton DL, Thompson JF, Cochran AJ, Mozzillo N, Elashoff R, Essner R, Nieweg OE, Roses DF, Hoekstra HJ, Karakousis CP, Reintgen DS, Coventry BJ, Glass EC, Wang HJ. Sentinel-node biopsy or nodal observation in melanoma. *N Engl J Med* 2006;355(13):1307-17.

Mouawad R, Spano JP, Comperat E, Capron F, Khayat D. Tumoural expression and circulating level of VEGFR-3 (Flt-4) in metastatic melanoma patients: correlation with clinical parameters and outcome. *Eur J Cancer* 2009;45(8):1407-14.

Naumov GN, Folkman J, Straume O, Akslen LA. Tumor-vascular interactions and tumor dormancy. *Apmis* 2008;116(7-8):569-85.

Nor JE, Christensen J, Mooney DJ, Polverini PJ. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis is associated with enhanced endothelial cell survival and induction of Bcl-2 expression. *Am J Pathol* 1999;154(2):375-84.

Orimo A, Gupta PB, SgROI DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, Carey VJ, Richardson AL, Weinberg RA. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* 2005;121(3):335-48.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005;55(2):74-108.

Perez DG, Suman VJ, Fitch TR, Amatruda T, 3rd, Morton RF, Jilani SZ, Constantinou CL, Egner JR, Kottschade LA, Markovic SN. Phase 2 trial of carboplatin, weekly paclitaxel, and biweekly bevacizumab in patients with unresectable stage IV melanoma: a North Central Cancer Treatment Group study, N047A. *Cancer* 2009;115(1):119-27.

Rass K, Diefenbacher M, Tilgen W. [Experimental treatment of malignant melanoma and its rationale]. *Hautarzt* 2008;59(6):475-83.

Reintgen DS, Cox C, Slingluff CL, Jr., Seigler HF. Recurrent malignant melanoma: the identification of prognostic factors to predict survival. *Ann Plast Surg* 1992;28(1):45-9.

Schledzewski K, Falkowski M, Moldenhauer G, Metharom P, Kzhyshkowska J, Ganss R, Demory A, Falkowska-Hansen B, Kurzen H, Ugurel S, Geginat G, Arnold B, Goerdts S. Lymphatic endothelium-specific hyaluronan receptor LYVE-1 is expressed by stabilin-1+, F4/80+, CD11b+ macrophages in malignant tumours and wound healing tissue in vivo and in

bone marrow cultures in vitro: implications for the assessment of lymphangiogenesis. *J Pathol* 2006;209(1):67-77.

Schultz S, Kane M, Roush R, Miller V, Berd D, Goldman L, Mastrangelo M. Time to recurrence varies inversely with thickness in clinical stage 1 cutaneous melanoma. *Surg Gynecol Obstet* 1990;171(5):393-7.

Shields JD, Borsetti M, Rigby H, Harper SJ, Mortimer PS, Levick JR, Orlando A, Bates DO. Lymphatic density and metastatic spread in human malignant melanoma. *Br J Cancer* 2004;90(3):693-700.

Sica A, Larghi P, Mancino A, Rubino L, Porta C, Totaro MG, Rimoldi M, Biswas SK, Allavena P, Mantovani A. Macrophage polarization in tumour progression. *Semin Cancer Biol* 2008;18(5):349-55.

Sini P, Samarzija I, Baffert F, Littlewood-Evans A, Schnell C, Theuer A, Christian S, Boos A, Hess-Stumpp H, Foekens JA, Setyono-Han B, Wood J, Hynes NE. Inhibition of multiple vascular endothelial growth factor receptors (VEGFR) blocks lymph node metastases but inhibition of VEGFR-2 is sufficient to sensitize tumor cells to platinum-based chemotherapeutics. *Cancer Res* 2008;68(5):1581-92.

Skobe M, Hawighorst T, Jackson DG, Prevo R, Janes L, Velasco P, Riccardi L, Alitalo K, Claffey K, Detmar M. Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. *Nat Med* 2001;7(2):192-8.

Srivastava A, Laidler P, Hughes LE, Woodcock J, Shedden EJ. Neovascularization in human cutaneous melanoma: a quantitative morphological and Doppler ultrasound study. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1986;22(10):1205-9.

Srivastava A, Ralhan R, Kaur J. Angiogenesis in cutaneous melanoma: pathogenesis and clinical implications. *Microsc Res Tech* 2003;60(2):208-24.

Stacker SA, Caesar C, Baldwin ME, Thornton GE, Williams RA, Prevo R, Jackson DG, Nishikawa S, Kubo H, Achen MG. VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. *Nat Med* 2001;7(2):186-91.

Straume O, Akslen LA. Expression of vascular endothelial growth factor, its receptors (FLT-1, KDR) and TSP-1 related to microvessel density and patient outcome in vertical growth phase melanomas. *Am J Pathol* 2001;159(1):223-35.

Sund M, Hamano Y, Sugimoto H, Sudhakar A, Soubasakos M, Yerramalla U, Benjamin LE, Lawler J, Kieran M, Shah A, Kalluri R. Function of endogenous inhibitors of angiogenesis as endothelium-specific tumor suppressors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(8):2934-9.

Tarhini AA, Agarwala SS. Cutaneous melanoma: available therapy for metastatic disease. *Dermatol Ther* 2006;19(1):19-25.

Thodiyil P, Kakkar AK. Can low-molecular-weight heparins improve outcome in patients with cancer? *Cancer Treat Rev* 2002;28(3):151-5.

Tong RT, Boucher Y, Kozin SV, Winkler F, Hicklin DJ, Jain RK. Vascular normalization by vascular endothelial growth factor receptor 2 blockade induces a pressure gradient across the vasculature and improves drug penetration in tumors. *Cancer Res* 2004;64(11):3731-6.

Tran J, Master Z, Yu JL, Rak J, Dumont DJ, Kerbel RS. A role for survivin in chemoresistance of endothelial cells mediated by VEGF. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(7):4349-54.

Varker KA, Biber JE, Kefauver C, Jensen R, Lehman A, Young D, Wu H, Lesinski GB, Kendra K, Chen HX, Walker MJ, Carson WE, 3rd. A randomized phase 2 trial of bevacizumab with or without daily low-dose interferon alfa-2b in metastatic malignant melanoma. *Ann Surg Oncol* 2007;14(8):2367-76.

Veierod MB, Weiderpass E, Thorn M, Hansson J, Lund E, Armstrong B, Adami HO. A prospective study of pigmentation, sun exposure, and risk of cutaneous malignant melanoma in women. *J Natl Cancer Inst* 2003;95(20):1530-8.

Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, Colpaert C, Marson LP, Gion M, Belien JA, de Waal RM, Van Marck E, Magnani E, Weidner N, Harris AL, Dirix LY. Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumours. *Eur J Cancer* 2002;38(12):1564-79.

Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, Gutheil JC, Harris LN, Fehrenbacher L, Slamon DJ, Murphy M, Novotny WF, Burchmore M, Shak S, Stewart SJ, Press M. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2002;20(3):719-26.

Warren BA, Shubik P. The growth of the blood supply to melanoma transplants in the hamster cheek pouch. *Lab Invest* 1966;15(2):464-78.

Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991;324(1):1-8.

Westphal JR, Van't Hullenaar R, Peek R, Willems RW, Crickard K, Crickard U, Askaa J, Clemmensen I, Ruiten DJ, De Waal RM. Angiogenic balance in human melanoma: expression of VEGF, bFGF, IL-8, PDGF and angiostatin in relation to vascular density of xenografts in vivo. *Int J Cancer* 2000;86(6):768-76.

Wong JH, Wanek L, Chang LJ, Goradia T, Morton DL. The importance of anatomic site in prognosis in patients with cutaneous melanoma. *Arch Surg* 1991;126(4):486-9.

Wynendaele W, Derua R, Hoylaerts MF, Pawinski A, Waelkens E, de Bruijn EA, Paridaens R, Merlevede W, van Oosterom AT. Vascular endothelial growth factor measured in platelet poor plasma allows optimal separation between cancer patients and volunteers: a key to study an angiogenic marker in vivo? *Ann Oncol* 1999;10(8):965-71.

8. Danksagung

Die Dissertation wurde an der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel durchgeführt. Hiermit möchte ich all jenen danken, die am Zustandekommen dieser Arbeit beteiligt waren.

Mein Dank gilt zuallererst meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Michael Weichenthal für das interessante Dissertations-Thema und für die nötige Freiheit zur eigenständigen Entfaltung. Im Weiteren für seine analytischen Anregungen und seine scharfsinnige und konstruktive Kritik, die wesentlich zur Qualität dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein ganz besonderer Dank geht an meinen Betreuer Dr. med. Rainer Hügel, der mich für die Angiogenese-Forschung begeistert und in allen Phasen dieser Arbeit tatkräftig und kompetent unterstützt hat. Der immer für gute Laune sorgte und mir das wissenschaftliche Arbeiten und Präsentieren lehrte.

Danken möchte ich auch allen wissenschaftlichen Mitarbeitern für deren Unterstützung und gute Zusammenarbeit. Insbesondere Christel Martensen-Kerl, die mir die Techniken der Immunfluoreszenz beigebracht hat und immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Für immerwährenden Zuspruch, den nötigen Ausgleich und viel Geduld danke ich meiner Liebe Victoria.

Meine Eltern haben mir durch vielseitige Unterstützung den medizinischen Werdegang und diese Dissertation überhaupt erst ermöglicht. Ihnen möchte ich zutiefst danken und diese Arbeit widmen.

9. Lebenslauf

André Krath

Geburtsdatum 09.06.1984 in Kiel
Familienstand ledig
Konfession evangelisch

Schulbildung

1990 – 1994 Friedrich-Junge-Grundschule, Kiel
1994 - 2003 Allgemeine Hochschulreife, Käthe-Kollwitz-Gymnasium, Kiel

Grundwehrdienst

07/2003 - 10/2003 Grundausbildung zum Gebirgssanitäter, Kempten
10/2003 - 04/2004 Sanitätsdienst im Schifffahrtsmedizinischen Institut, Kiel

Studium

10/2004 - 12/2010 Medizinstudium an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
08/2006 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
11/2010 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Praktisches Jahr

Chirurgie Spital Zollikerberg, Zürich, Schweiz (2009)
Innere Medizin Klinikum Itzehoe (2009/2010)
Anästhesie Universitätsklinikum Kiel (2010)

Famulaturen

Dermatologie Klinikum Augsburg (2007)
HNO Kaiser-Franz-Josef-Spital Wien, Österreich (2007)
Anästhesie Kaiser-Franz-Josef-Spital Wien, Österreich (2007)
Innere Medizin Universitätsklinikum Kiel (2007)
Gefäßchirurgie Universitätsklinikum Heidelberg (2008)
Thoraxchirurgie Universitätsklinikum Freiburg (2009)
Orthopädie Gemeinschaftspraxis Dotzer, Wagner, Schweiger Kiel (2009)