

Aus der Hautklinik und Poliklinik
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Differentielle Markeranalyse in Patienten mit kutanem malignem Melanom im Vergleich zu
anderen immunologisch-basierten Krankheitsbildern

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Theodora Tsimpaki
aus Athen, Griechenland

Mainz, 2023

Wissenschaftlicher Vorstand: [REDACTED]

1. Gutachter: [REDACTED]

2. Gutachter: [REDACTED]

Tag der Promotion: 02.02.2024

Widmung



Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	V
1. Einleitung / Ziel der Dissertation	1
2. Literaturdiskussion.....	3
2.1. Das maligne Melanom	3
2.1.1. Definition	3
2.1.2. Stadieneinteilung.....	4
2.1.3. Epidemiologie und Prognose.....	6
2.1.4. Therapie.....	7
2.1.5. Marker des malignen Melanoms.....	9
2.2. Psoriasis.....	12
2.2.1. Definition	12
2.2.2. Epidemiologie und Pathophysiologie	12
2.2.3. Klassifikation	14
2.2.4. Therapie.....	16
2.2.4.1. Topische Therapie.....	16
2.2.4.2. Phototherapie.....	16
2.2.4.3. Systemtherapie	17
2.2.5. Marker für Psoriasis.....	19
2.3. Afamin	21
2.4. Pigment-Epithelium Derived Factor-PEDF.....	23
3. Materialien und Methoden	25
3.1. Patientenkollektiv.....	25
3.2. Afamin-Bestimmung mittels ELISA	25
3.3. Bestimmung der PEDF- Konzentration mittels ELISA.....	28
3.4. Statistische Auswertung	31
4. Ergebnisse	32
4.1. Deskription der Patientenkohorten.....	32
4.1.1. Gruppe 1-Malignes Melanom unter INF-Therapie.....	32
4.1.2. Gruppe 2- Malignes Melanom I-IV	32
4.1.3. Gruppe 3-Psoriasis.....	33
4.1.4. Gruppe 4-gesunde Patienten.....	33
4.2. Afamin und PEDF.....	34
4.2.1. Deskriptive Statistik	34
4.2.2. Gruppe 1	35
4.2.3. Gruppe 2	40
4.2.4. Gruppe 3	44
4.2.5. Gruppe 4	49

5.	Diskussion	55
5.1.	Afamin und PEDF in onkologischen Patienten.....	55
5.1.1.	Afamin	56
5.1.2.	PEDF.....	60
5.2.	Afamin und PEDF in entzündlichen und immunologischen Krankheiten ...	64
5.2.1.	Afamin	65
5.2.2.	PEDF.....	68
6.	Zusammenfassung.....	73
7.	Literaturverzeichnis	75
8.	Danksagung	90
9.	Tabellarischer Lebenslauf	91

Abkürzungsverzeichnis

Immunhistochemie	IHC
Human Melanoma Black 45	HMB-45
Melanoma Cell Adhesion Molecule	MCAM
Psoriasis Area and Severity Index	PASI
Pigment Epithelium-Derived factor	PEDF
Superfiziell Spreitendes Malignes Melanom	SSM
Noduläres Melanom	NM
Lentigo Maligna Melanom	LMM
Akrolentiginöses Melanom	ALM
American Joint Committee on Cancer	AJCC
Laktatdehydrogenase	LDH
Programmed Death-1	PD-1
Rezeptor-Tyrosinkinase	RTKs
Talimogen laherparepvec	T-VEC
Mikrophthalmia associated Transcription Factor	MITF
Melanoma-Inhibiting Activity	MIA
Psoriasis Arthritis	PsA
Psoriasis Cutanea	PsC
Antimicrobial Peptide	AMPs
Plasmacytoid Dendritic Cells	pDCs
Myeloid Dendritic Cells	mDC
Tumor Necrosis Factor	TNF
Interleukin	IL
Minimal Erythema Dose	MED
Selective Ultraviolet Phototherapy	SUP

Metothrexat	MTX
Cyclic Adenosine Monophosphate	cAMP
Body Surface Area	BSA
Dermatology Life Quality Index	DLQI
Interferon-a	INF-a
Enzyme-Linked Immunosorbent assay	ELISA
Horseradish peroxidase	HRP
Serpin Proteinase-Inhibitor E	SERPINE
Dual Oxidase	DUOX
Non-Small Cell Lung Cancer	NSCLC
Prostate Cancer	PCa
Benign Prostatic Hyperplasia	BPH
Juvenile Dermatomyositis	JDM
Anti-Neutrophil Cytoplasmatic Antibody	ANCA
ANCA-Associated Vasculitis	AAV
Cerebrospinal Fluid	CSF
Experimental autoimmune Encephalomyelitis	EAE
high sensitivity C-Reaktiv Protein	hsCRP
Blood Brain Barrier	BBB
Kallikrein-related peptidase-7	KLK-7
Macrophage-Derived Chemokine	MDC
Angiopoetin-Like 4	ANGPTL-4
Low-Density Lipoprotein	LDL
Glomerular Filtration Rate	GFR
Retinol-Binding Protein-4	RBP-4

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Beispiel einer idealen linearen Standardkurve.	28
Abbildung 2: Verdünnung der Human Serpin F1 Standardlösung nach Herstellerangaben. .29	
Abbildung 3: Darstellung der Werte für Afamin und PEDF im Serum und EDTA vor Therapiebeginn sowie nach Therapie über die gesamte Beobachtungszeit, in Patienten mit malignem Melanom unter INF-Therapie (Gruppe 1).	35
Abbildung 4: Darstellung der Werte für Afamin und PEDF im Serum und EDTA vor Therapiebeginn sowie 12 Monate nach Therapie (Visite 3) mit INF.	36
Abbildung 5: Afamin und PEDF im Serum und EDTA vor als auch nach Therapiebeginn, pro Visite, im Verlauf der Beobachtungszeit.	37
Abbildung 6: Afamin und PEDF im Serum und EDTA in der Gruppe 1 vor und nach Therapie mit INF je nach Progression im Verlauf der Beobachtungszeit.....	38
Abbildung 7: Korrelation von LDH mit Afamin sowie mit PEDF im Serum und EDTA in der Gruppe 1.	39
Abbildung 8: Afamin und PEDF im Serum in Patienten mit malignem Melanom in Stadium I-IV (Gruppe 2).	40
Abbildung 9: Korrelation von LDH und S-100 mit Afamin und PEDF im Serum und EDTA in Patienten mit malignem Melanom in unterschiedlichen Stadien (Gruppe 2).	41
Abbildung 10: Vergleich der Afamin und PEDF-Konzentration im Serum in der Gruppe 1 vor und nach Therapie mit IFN sowie in der Gruppe 2.....	42
Abbildung 11: Vergleich der Afamin- und PEDF-Konzentration im Serum der Gruppe 1 vor und nach Therapie mit der Gruppe 2 (links) sowie der Werte der Gruppe 1 12 Monate nach Therapiebeginn mit der Gruppe 2 (mittig und rechts).....	43
Abbildung 12: Vergleich der Afamin- und PEDF-Konzentration im Serum vor und neuen Monate nach Immuntherapie in Patienten mit Psoriasis (Gruppe 3).	44
Abbildung 13: Mittelwerte der Konzentration von Afamin und PEDF im Serum sowie des PASI-Index mit Standardabweichung in Patienten mit Psoriasis vor und neun Monate nach Therapie (Gruppe 3).....	45
Abbildung 14: Vergleich der Afamin- und PEDF-Konzentration vor und nach Therapiebeginn in Psoriasispatienten je nach Gelenkbeteiligung.	46
Abbildung 15: Darstellung der Afamin- und PEDF-Konzentration in den Gruppen 1-3 je nach Vorliegen eines metabolischen Syndroms.	48

Abbildung 16: Vergleich der Afamin- und PEDF-Konzentrationen im Serum und EDTA in gesunden Probanden (Gruppe 4).....	49
Abbildung 17: Vergleich der Afamin- und PEDF-Konzentration in der Gruppe 1 vor und nach Therapie mit der Gruppe 4 (Healthy Donors).	50
Abbildung 18: Vergleich der Afamin- und PEDF-Konzentration im Serum und EDTA in der Gruppe 1 nach 12 Monaten Therapie sowie in der Gruppe 4.....	51
Abbildung 19: Vergleich der Afamin- und PEDF-Konzentration im Serum in der Gruppe 3 bei Psoriasispatienten vor und 9 Monate nach Therapiebeginn mit der Gruppe 4 bei gesunden Probanden.	52
Abbildung 20: Vergleich der Afamin- und PEDF-Konzentration im Serum in den vier untersuchten Gruppen. In den Gruppen 1 und 3 werden zusätzlich die Werte vor und nach Therapie dargestellt.....	53

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Stadieneinteilung des malignen Melanoms entsprechend der AJCC, basierend auf der aktuellen AWMF-Leitlinie zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms 2020.	6
Tabelle 2: Klinische Varianten der Psoriasis nach Altmeyer.....	14
Tabelle 3: Klassifikation der Psoriasis Arthritis nach den CASPAR-Kriterien.	15
Tabelle 4: Übersicht der ELISA-Kit-Reagenzien nach Herstellerangaben (BioVendor Research and Diagnostic Products).	26
Tabelle 5: Herstellung der Standardverdünnungsreihe (BioVendor Research and Diagnostic Products).....	27
Tabelle 6: Beispiel einer Elisa Platte für Afamin nach den Herstellerangaben.	27
Tabelle 7: Übersicht der ELISA Kit Reagenzien für PEDF nach Hersteller (DuoSet ELISA, R&D).	28
Tabelle 8: Liste der hergestellten Reagenzien außer den enthaltenen Kit-Komponenten. ...	29
Tabelle 9: Beispiel einer Elisa Platte für PEDF nach den Herstellerangaben.	30
Tabelle 10: Afamin und PEDF im Serum in den Gruppen 1-4.	34
Tabelle 11: Afamin und PEDF in EDTA in den Gruppen 1-4.	34

1. Einleitung / Ziel der Dissertation

Das Melanom entsteht durch Schädigung und unkontrollierte Proliferation von Melanozyten. Während sich das kutane maligne Melanom die häufigste Form darstellt, kann dies auch auf Schleimhautoberflächen, in dem Uvealtrakt und den Leptomeningen auftreten. In den letzten Jahren wurde eine stetige Zunahme der Inzidenz beobachtet. Mit 325.000 neu diagnostizierten Fällen pro Jahr stellt das maligne Melanom zwar lediglich 3-5% aller Hauttumore dar, jedoch repräsentiert es über 90% der verursachten Todesfälle. Die Überlebenswahrscheinlichkeit verringert sich deutlich bei Zeichen von Progression mit regionalen oder Fernmetastasen. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt beispielweise bei 29,8% für Patienten diagnostiziert im Stadium IV. Durch verstärkte Aufklärungskampagnen und Screeningmaßnahmen kann die Diagnose des malignen Melanoms heutzutage in früheren Stadien gestellt werden, wodurch eine bessere Prognose und eine nahezu unveränderte Lebenserwartung erreicht werden können. Da die Mortalitätsrate des progredienten Melanoms trotz aller Früherkennungsprogramme jedoch hochsignifikant bleibt, ist die weitere Exploration neuer prognostischer und/oder prädiktiver Marker essenziell.

Tumormarker nehmen eine bedeutende Position in der Onkologie und Immunologie ein. Sie ermöglichen eine präzisere Prognose und potenzielle Therapieoptimierung durch die prädiktive Bestimmung der Wahrscheinlichkeit des Ansprechens. Ein prognostischer Marker ist ein Merkmal, das objektiv gemessen werden kann und als Indikator für normale biologische Prozesse, pathogene Prozesse oder pharmakologische Reaktionen auf eine therapeutische Intervention bewertet wird. In der klinischen Praxis können sie als diagnostische Hilfsmittel, zum Staging von Krankheiten, als Indikatoren für die Prognose oder zur Überwachung des klinischen Ansprechens nach einer Intervention verwendet werden. Diese können entweder Proteine, Peptide und andere biologische Substanzen von Tumorzellen oder regulatorische und strukturelle Proteine durch genetische und immunologische zelluläre Aktivität in Autoimmunkrankheiten sein.

Für das kutane maligne Melanom stehen konventionelle histologische prognostische Marker wie Clark Level, Tumordicke nach Breslow, Mitosen, Ulzeration, diverse diagnostische immunohistochemische (IHC) Biomarker, wie S-100, Human Melanoma Black 45 (HMB-45), Melan-A, Chondroitinsulfat Proteoglykan 4, prognostische molekulare Biomarker, wie die Proteine der Multigen-Familie S-100(A6, A13), Ki67 als Proliferationsmarker, Melanoma Cell Adhesion Molecule (MCAM) sowie genetische Marker, wie Mutationen von KIT (Rezeptortyrosinkinase), BRAF (protoonkogene Serine/Threonine Kinase) und NRAS (Neuroblastoma RAS) zur Verfügung. Diese Tumormarker können in histologischen

Präparaten detektiert werden oder zirkulieren im Blutkreislauf und eignen sich sowohl für ein Screening, für die frühzeitige Rezidiverkennung als auch für eine zielgerichtete Immuntherapie. Aufgrund der zunehmenden Inzidenz und der hohen Morbidität ist das Interesse an neuen Prognosefaktoren und deren Wertigkeit sehr groß.

Bei Autoimmunkrankheiten, wie der Psoriasis, werden Indices, wie der PASI Score, zur Ermittlung des Schweregrades anhand der Ausprägung des Erythems und der Dicke der Plaques verwendet. Die Reliabilität dieser Scores ist nicht gewährleistet und kann je nach Untersucher subjektiv sein. Weiterhin zeigen sie aus diesen Gründen eine hohe Variabilität und eine geringe Reproduzierbarkeit. Die Untersuchung und Identifikation objektiv bewertbarer Biomarker sind essenziell, um die Messung des Schweregrades der Psoriasis zu standardisieren. Die Anwendung von Biomarkern in der Psoriasis gehört nicht standardmäßig zur Routineuntersuchung, wie entsprechende Tumormarker in der Vorsorge onkologischer Patienten, jedoch werden diese und deren Rolle zunehmend recherchiert.

Ziel der vorliegenden Dissertation war die Bestimmung der Konzentration zwei Proteine, Afamin und PEDF (Pigment epithelium-derived factor) als potenzielle diagnostische sowie prognostische Biomarker in Serum- und EDTA-Blutproben von Patienten mit malignem Melanom mittels ELISA. Patienten mit malignem Melanom unter Interferon-alpha-Therapie (Gruppe 1) wurden analysiert und mit Patienten mit einer Autoimmunkrankheit (Psoriasis/Psoriarthritis) unter Biologika Therapie (Gruppe 3) verglichen. Die Untersuchung erfolgte zu unterschiedlichen Zeitpunkten, vor und nach Therapiebeginn für beide Gruppen. Weiterhin wurden Patienten in unterschiedlichen Stadien des malignen Melanoms (Gruppe 2) mit oder ohne Immuntherapie und gesunde Probanden (Gruppe 4) als weitere Kontrollgruppe untersucht.

2. Literaturdiskussion

2.1. Das maligne Melanom

2.1.1. Definition

Das maligne Melanom ist ein aus den Melanozyten ausgehender maligner Tumor, der sich primär auf der Haut manifestiert. Diese besitzen die Eigenschaft durch Pigmentbildung eine Barriere gegen UV-Strahlen aufzubauen. Die Melanozyten befinden sich zwischen den Basalzellen, in der unteren Schicht der Epidermis und synthetisieren das Hauptpigment Melanin. Die Zellen liegen sowohl auf der Haut als auch auf der Mundschleimhaut, der Aderhaut und den Meningen. Darüber hinaus sind Melanozyten im Bulbus und in der Wurzelscheide der Haarfollikel zu finden. Melanome können auch okular, insbesondere auf der Uvea, der Konjunktiva und dem Ziliarkörper, den Meningen und auf Schleimhäuten vorkommen.

Das maligne Melanom lässt sich klinisch und histopathologisch in vier Subtypen unterteilen (1,2). Das superfizielle spreitende maligne Melanom (SSM) ist mit einem relativen Anteil von circa 50% aller Melanome die häufigste Form. Seine Entwicklung kann eine intraepidermale, horizontale oder eine radiale Wachstumsphase vorzeigen. Klinisch imponiert das SSM als asymmetrische, unscharf begrenzte Pigmentläsion, teilweise mit exzentrischen papulösen Anteilen.

Das noduläre Melanom (NM) manifestiert sich als knotig, exophytisch wachsender Tumor mit erosiver Blutung und wächst primär vertikal. NM repräsentiert ca. 20% aller Melanome und variiert farblich von schwarz braun bis bläulich. Aufgrund der aggressiven vertikalen Phase ist das NM mit einer schlechten Prognose assoziiert.

Bei ca. 10% der Subtypen handelt es sich um ein Lentigo-maligna-Melanom (LMM), das fast ausschließlich an sonnenexponierten Hautarealen, insbesondere im Gesicht von älteren Patienten vorkommt. Es wächst zunächst vor allem radial und horizontal. Das LMM fällt als großer und flacher Herd auf. Es kann verschiedene Brauntöne aufweisen und entwickelt sich oft auf der Basis eines Melanoma in situ (Lentigo maligna) (3).

Der vierte Subtyp sind die akrolentiginösen Melanome (ALM) mit ca. 4-5 % und tritt palmoplantar sowie subungual auf. Es kann sich initial als inhomogene flache Pigmentierung und im Verlauf mit knotigen Anteilen als Zeichen eines invasiven Wachstums zeigen.

Seltene, nicht klassifizierte Melanome, wie nävoide, spitzoide, amelanotische Melanome oder Melanome in einem Riesennävus stellen ungefähr 5 % der malignen Melanome dar und werden als Sonderformen klassifiziert. Die unterschiedlichen Subtypen scheinen markante Unterschiede in ihrer anatomischen Verteilung, Erkrankungsalter, Verhältnis zur UV-Strahlung und dem Muster der somatischen Mutationen aufzuweisen (5,6).

2.1.2 Stadieneinteilung

Circa 90% der Melanome werden als primäre Tumoren diagnostiziert, ohne Nachweis von Metastasen (7). Ein Tumorprogress wird bei 1/3 aller Patienten, die an einem primären Melanom erkrankt sind, diagnostiziert (8,9). Die Tumorklassifikation ist eine entscheidende Grundlage für die Einordnung der Tumoren hinsichtlich Prognose und diagnostischem sowie therapeutischem Vorgehen.

Das maligne Melanom wird nach der TNM-Klassifikation der AJCC (American Joint Committee on Cancer) aus dem Jahr 2017 klassifiziert (10,11). Diese setzt sich aus der Klassifikation des Primärtumors (T-Klassifikation), der Klassifikation regionärer Lymphknoten (N-Klassifikation) und der Klassifikation der Fernmetastasen (M-Klassifikation) zusammen (12). Bei der T-Klassifikation wird die Tumordicke nach Breslow und die Tumorulzeration berücksichtigt (13). Die Mitoserate (Mitosen/mm²) sowie die Invasionstiefe (CLARK-Level) finden aktuell keine Anwendung mehr (10). Die N-Klassifikation bezieht sich auf die Ausbreitung des Tumors auf regionale Lymphknoten und auf die Anzahl befallener Lymphknoten. Der rein mikroskopische oder auch klinisch darstellbare Tumorbefall („clinically occult“ vs. „clinically detected“) werden darüber hinaus dargestellt. Das Vorhandensein von Satellitenmetastasen (2-5 cm um den Primärtumor) oder Intransitmetastasen (5 cm vom Primärtumor entfernt, zwischen Primärtumor und regionalem Lymphknoten) wird miteinbezogen. Das Melanom kann sowohl primär lymphogen als auch primär hämatogen metastasieren. Die M-Klassifikation differenziert zwischen nicht-viszerale Metastasen (M1a), Lungenmetastasen (M1b), Fernmetastasen anderer, viszeraler Lokalisation (M1c) sowie Fernmetastasen des zentralen Nervensystems (M1d) und erhöhte Serumwerte der Laktatdehydrogenase (LDH) werden eingeschlossen (10,11,12,13).

Stadium		Primärtumor(pT)	Regionäre Lymphknotenmetastasen(N)	Fernmetastasen (M)
0		In-situ Tumore	Keine	Keine
I	A	< 0,8 mm, keine Ulzeration	Keine	Keine
	B	< 0,8 mm, mit Ulzeration	Keine	Keine
		1,0-2,0mm, keine Ulzeration	Keine	Keine
II	A	1,0-2,0mm mit Ulzeration	Keine	Keine
		2,0-4,0mm, keine Ulzeration	Keine	Keine
	B	2,0-4,0mm mit Ulzeration	Keine	Keine
		> 4,0 mm, keine Ulzeration	Keine	Keine
	C	> 4,0 mm, mit Ulzeration	Keine	Keine
III	A	Jede Tumordicke, keine Ulzeration	Mikroskopische Metastasen (klinisch okkult) in bis zu 3 Lymphknoten	Kleine
	B	Jede Tumordicke mit Ulzeration	Mikroskopische Metastasen (klinisch okkult) in bis zu 3 Lymphknoten	Keine
		Jede Tumordicke, keine Ulzeration	Bis zu drei makroskopische nodale Metastasen	Keine
		Jede Tumordicke, keine Ulzeration	Keine, aber Satelliten- und/oder in-transit Metastasen	Keine
	C	Jede Tumordicke mit Ulzeration	Bis zu drei makroskopische nodale Metastasen Oder Satelliten- und/oder in-transit Metastasen ohne regionäre Lymphknotenmetastasen	Keine

		Jede Tumordicke mit und ohne Ulzeration	Vier oder mehr makroskopische nodale Metastasen Oder verbackenes Lymphknotenkonglomerat Oder Satelliten- und/oder in-transit Metastasen mit regionären Lymphknotenmetastasen	Keine
IV				Fernmetastasen

Tabelle 1: Stadieneinteilung des malignen Melanoms entsprechend der AJCC, basierend auf der aktuellen AWMF-Leitlinie zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms 2020.

2.1.3 Epidemiologie und Prognose

Die Inzidenz des malignen Melanoms ist in den letzten Jahrzehnten dramatisch gestiegen. Bereits 2016 stellte das maligne Melanom in Deutschland bei Männern den fünfthäufigsten und bei Frauen den vierthäufigsten soliden Tumor dar. Hierbei muss berücksichtigt werden, dass es durch die Einführung des Hautkrebsscreenings im Jahr 2008 und die Umstellung der Freizeit- und Urlaubsgewohnheiten mit deutlich vermehrter UV-Exposition zu einem deutlichen Anstieg der Neudiagnosen gekommen ist. Im Jahr 2016 erkrankten in Deutschland 20 von 100.000 Frauen und 21 von 100.000 Männern (12,15). Mit 325.000 neu diagnostizierten Melanomen im Jahr 2020 repräsentiert das MM in den USA 1,7% aller Tumordiagnosen (16).

Das Lebenszeitrisiko aller Kaukasier, ein malignes Melanom zu entwickeln, ist weltweit von 1:1500 (im Jahr 1935) auf 1:75 (im Jahr 2000) gestiegen (17). Die Melanominzidenz nimmt insbesondere bei starkexponierten hellhäutigen Bevölkerungsgruppen zu. Die höchsten Inzidenzraten wurden in Europa in den skandinavischen Ländern und weltweit in Australien und Neuseeland mit 30-60 Fälle pro 100.000 Einwohner und Jahr dokumentiert (18). Die Inzidenz des malignen Melanoms ist bei hellhäutigen, UV-empfindlichen Personen (Hauttyp I und II) deutlich erhöht gegenüber dunkelhäutigen Personen (Hauttyp III und IV). In Bevölkerungen mit stärkerer Pigmentierung (Afrikaner, Asiaten) hingegen ist das Melanom selten und kommt nahezu ausschließlich palmoplantar oder im Schleimhautbereich vor. Die UV-Strahlbelastung in der Kindheit und Jugend sowie die Anzahl der Sonnenbrände im Baby- sowie im frühen Kindesalter scheinen das Risiko zu erhöhen (19). Bei Frauen

manifestieren sich Melanome öfter an den unteren Extremitäten, während bei Männern diese häufiger am Rumpf, insbesondere am Rücken auftreten (20).

Mutationen in Onkogenen und Tumorsuppressoren, am ehesten induziert durch UV-Strahlen, führen zur Entstehung des malignen Melanoms. Die BRAF und NAS-Mutationen gelten als die häufigsten Mutationen und können zur Wachstumsinduktion und Daueraktivierung von Signalwegen führen und somit zur Tumorentstehung beitragen (21). Ein weiterer Risikofaktor für die Entstehung eines malignen Melanoms ist das Auftreten von multiplen Vorläuferläsionen (≥ 100 gewöhnliche melanozytäre Nävi oder ≥ 5 atypische melanozytäre Nävi und ≥ 50 gewöhnliche melanozytäre Nävi). Bei 5-10% der Patienten ist eine familiäre Häufung zu beobachten (22).

Eine deutliche Steigerung der Mortalitätsrate im Zeitraum von 1970–2009, von ca. 1,5 auf 4,2 Fälle/100 000 Einwohner und Jahr bei Männern und von ca. 1,5 auf 3,8 Fälle/100 000 Einwohner und Jahr bei Frauen ist erkennbar (23). Jedoch fällt dieser Anstieg im Vergleich zu dem der Inzidenzrate geringer aus. Ungefähr 57.000 starben an malignem Melanom im Jahr 2000, was zu einer altersstandardisierten Mortalität von 7/100,000 bei Männern und 0,4/100,000 bei Frauen weltweit ergibt (24). Die Mortalität unter hellhäutigen beträgt 9 bei Männern und 1,7/100,000 bei Frauen. Die 5-Jahres-Überlebensrate ist 99,4% für ein neu diagnostiziertes Melanom im Stadium I-II, 68,0% im Stadium III und 29,8% im Stadium IV. Nur 4% der Melanompatienten werden im Stadium IV diagnostiziert, wobei 83% der neuen Diagnosen erfolgen im Stadium I und II (16).

2.1.4 Therapie

Unter kurativer Intention ist die wichtigste Therapieform des malignen Melanoms die operative Exzision des Primärtumors. Ziel ist die vollständige Entfernung des Tumors, um eine Streuung in die Blut- und Lymphbahn zu vermeiden. Die Tumorexzision erfolgt bis auf die Muskelfaszie unter Mitnahme eines Sicherheitsabstandes von 1 oder 2 mm je nach Tumordicke (14). Bei einer Tumordicke über 1mm sollte der erstrandrierte Lymphknoten nach Lymphszintigraphie operativ entfernt und pathologisch untersucht werden (25). Die Lymphknotenbiopsie empfiehlt sich weiterhin bereits ab einer Tumordicke von 0,75mm beim Vorliegen von Ulzerationen, Mitosen oder bei Patienten jüngeren Lebensalters (13). Sind bereits die biopsierten Sentinellymphknoten von Tumorzellen befallen, ohne weiteren Nachweis einer Fernmetastasierung, sollten die nahegelegenen Lymphknoten vollständig entfernt werden (26).

In fortgeschrittenen Stadien ohne die Möglichkeit einer kurativen Exzision besteht die Indikation einer medikamentösen Therapie. Das Vorliegen von molekularpathologischen Mutationen sowie die Tumorlast bestimmen die weiteren therapeutischen Strategien. Über Jahrzehnte bestand die standardisierte Systemtherapie für das fortgeschrittene maligne Melanom aus Chemotherapie mit Dacarbazin oder Fotemustin. Die aktuellen Therapieansätze beim Melanom beruhen auf der Blockade molekularer Prozesse in der Signaltransduktion der Zelle. In den letzten zehn Jahren wurde die Immuntherapie mit Ipilimumab (CTLA4-Inhibitor), Nivolumab (Anti-PD1), BRAF-Inhibitoren sowie Trametinib (MEK-Inhibitor) zur Erstlinientherapie bei fortgeschrittenem Melanom zugelassen. Ab Stadium IIB/C und IIIA-C sollte bis 2019 eine adjuvante Interferontherapie angeboten werden. Aktuell sollte ab Stadium III eine adjuvante Therapie mit einem Anti-PD1-Antikörper oder bei Vorliegen der Mutationen mit einem BRAF- und MEK-Inhibitor angeboten werden (27). Erste prospektive-randomisierte Studien zur Anwendung von Interferon bei Melanompatienten wurden 1996 von Kirkwood publiziert. Es konnte gezeigt werden, dass mehr Patienten mit einer Hochdosis-Interferontherapie im Vergleich zu unbehandelten nach fünf Jahren rezidivfrei lebten (28,29).

Ipilimumab ist ein ein sogenannter Immun-Checkpoint-Inhibitor, der über eine CTLA-4-Blockade als T-Zellaktivator wirkt. Dies weist darauf hin, dass das Immunsystem auf den Tumor abzielt, da seine Immuntoleranz aufgehoben wird. Nach Einführung dieser neuen Therapieoption zeigte sich eine Steigerung der Lebenserwartung sowie der Lebensqualität mit einer Verlängerung des Gesamtüberlebens von 6,4 auf 10,1 Monate (30).

Programmed death-1 (PD-1) ist ein Molekül, welches ebenfalls an der Regulierung der T-Zellaktivität beteiligt ist. Bei Nivolumab handelt es sich um einen vollständig humanen monoklonalen Antikörper, der an den PD-1-Rezeptor auf T-Zellen bindet und die Wechselwirkung mit dem eigentlich hier bindenden PD1-Rezeptor-Ligand verhindert. Dadurch wird das Immunsystem indirekt stimuliert (31). Nivolumab und Pembrolizumab wurden für die Monotherapie des fortgeschrittenen Melanoms bei therapienaiven und vorbehandelten Patienten zugelassen. Die beiden Antikörper erzielen im Vergleich zur Monotherapie mit Ipilimumab eine höhere objektive Ansprechrates, eine höhere progressionsfreie Zeit und ein verlängertes Gesamtüberleben (32,33).

Mutationen im B-RAF Onkogen treten bei ca. 45-50% der Melanompatienten auf. Dabei liegen etwa 95% als BRAF V600E- oder V600K –Mutationen vor. Die ausgelöste Kaskade führt zur Transduktion mitogener Signale von extrazellulären Wachstumsfaktoren, wie HGF, PDGF, über transmembranöse Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs) nach intrazellulär in Richtung Zellkern zu transkriptionellen Zielgenen, wie Cyclin D1. MAPK-Mutationen wie BRAF-V600E führen zu einer konstitutiven Überstimulation der Zellteilung bei verlängertem

Zellüberleben und stellen daher wichtige therapeutische Ziele dar (34,35). In Phase-III Studien zeigte Vemurafenib Ansprechraten von 48 % und ein progressionsfreies Überleben von 5,3 Monaten (36). Dabrafenib hemmt das mutierte B-RAF Protein in den Melanomen mit B-RAFV600E und B-RAFV600K Genotypen (37). In einer weiteren Phase-III Studie mit Dabrafenib, wurde ein um 45% höheres objektives Ansprechen aufgezeigt. Darüber hinaus konnten signifikant höhere Überlebensraten nach 6 Monaten dargestellt werden (38). Eine weitere therapeutische Option ist die selektive Inhibition der MEK1 und MEK2- Aktivierung und Kinaseaktivität durch Trametinib. Bei Patienten mit metastasiertem Melanom und histologisch nachweisbarer BRAFV600 Mutation wurde eine signifikante Verlängerung des progressionsfreien Überlebens und des Gesamtüberlebens gegenüber einer Chemotherapie mit Dacarbazin oder Paclitaxel gezeigt werden (39). Weiterhin wurde es postuliert, dass eine Mutation des c-KIT-Gens vor allen in akrolentiginösen und Schleimhautmelanomen sowie bei Patienten mit chronisch-sonnengeschädigter Haut vorkommt. Bei diesen Mutationen haben sich KIT-Inhibitoren als wirksam erwiesen (40,41). Die hohe Mutationsrate sowie die Entwicklung von Resistenzen erfordert die weitere Recherche neuer therapeutischer Optionen sowie die Entwicklung Behandlungsprotokolle bezüglich möglicher Kombinationstherapien. Neue Onkogene, wie das MAPK1/2, ERBB4, GRIN2A, GRM3, RAC1 und PREX2 wurden so identifiziert könnten das Ziel neuer personalisierter Therapien darstellen (42).

Die Strahlentherapie wird nicht mehr als Monotherapie in der primär-kurativen und adjuvanten Therapie angewandt, jedoch spielt sie eine essenzielle Rolle bei der Symptomkontrolle, insbesondere schmerzhafter Skelettmetastasen, multipler Hirnmetastasen oder regional disseminierter Hautmetastasen. Eine stereotaktische Konvergenzbestrahlung wird bei isolierten, inoperablen Hirnmetastasen favorisiert. Wenn die vollständige Entfernung von Intransit- und Satellitenmetastasen nicht möglich ist, stehen diverse Verfahren, wie die intratumorale Injektion von interleukin-2, die intratumorale Elektrochemotherapie mit Bleomycin oder Cisplatin und Talimogen laherparepvec (T-VEC) zur Verfügung (43-45).

2.1.5 Marker des malignen Melanoms

Tumormarker sind Proteine oder andere biologische Substanzen, die zu der Früherkennung, zur Diagnosesicherung von Erkrankungen und Malignitäten sowie zur genaueren Prognose sowie Vorhersage des Ansprechens auf eine Therapie beitragen. Wenn Tumormarker im Tumorgewebe stärker im Vergleich zum gesunden Gewebe exprimiert sind, dienen sie als

diagnostische Marker. Wenn Marker vorwiegend im fortgeschrittenen Stadium vermehrt exprimiert werden, können diese als prognostische Faktoren verwendet werden. Ebenso können Marker bei der Kontrolle des Therapieverlaufes und des Ansprechens eine wertvolle Rolle spielen (46)

Histologische Kriterien, wie die vertikale Tumordicke, die Ulzerationen des Primärtumors sowie die Mitoserate werden als aussagekräftige Prognosemarker für das Gesamtüberleben und zur Risikostratifizierung betrachtet (14). Bei Primären mit Ulzerationen verringert sich die progressionsfreie Zeit und das Gesamtüberleben signifikant (47). Der Einbruch von Tumorzellen in Venen- oder Lymphgefäße ist ein weiteres ungünstiges histologisches Kriterium (48). Human Melanoma Black-45 (HMB-45), Melan-A, Tyrosinase, Mikrophthalmieassoziiertes Transkriptionsfaktor (MITF) und S100 sind die bekanntesten immunhistochemischen Marker, die zur Diagnosesicherung beim malignen Melanom untersucht werden müssen (49). HMB45 ist ein monoklonaler Antikörper der Maus, der für ein mit Prämelanosomen assoziiertes Antigen spezifisch erscheint. Dadurch kann dieser für die Identifizierung von differenzierten melanozytären Tumoren verwendet werden und weist eine hohe Spezifität, aber nur eine Sensitivität von 67 - 93% auf (50). Hingegen zeigt das S-100 Protein eine hohe Sensivität, aber mangelt es an Spezifität. Melan-A ist ein Antigen, das in Melanozyten, Melanomzellen und dem pigmentierten Retinaepithel exprimiert wird. Dies geht mit einer Sensitivität von 93% und einer Spezifität von 98% bei der Differenzierung zwischen melanotischen und nicht-melanotischen Neoplasien einher. Seine Sensitivität beträgt 75-92% bzw. seine Spezifität 95-100% in der Erkennung von Melanomzellen (51).

Der Vorteil serologischer Marker ist die Meidung invasiver Verfahren zur Gewinnung von Tumormaterial. Bei S-100 handelt sich um eine Gruppe von kalzium-bindenden Proteinen. Die S100 Freisetzung ins Serum beim malignen Melanom ist stadienabhängig und spiegelt die Tumormasse wider. Bei Patienten mit progressiver Tumorerkrankung konnte ein erhöhter S100 β -Spiegel mit Metastasierung, Rezidiven und verkürztem Gesamtüberleben assoziiert werden (49, 52). Darüber hinaus ist die Laktatdehydrogenase ein Enzym, welches in nahezu jeder Zelle des menschlichen Körpers gelöst im Zytoplasma vorliegt. Klinisch gilt es als Marker für Zellschädigung und dessen Verlauf, wodurch es nicht spezifisch für Malignität ist (46). Studien postulieren die Erhöhung von LDH bei Melanom-Patienten in fortgeschrittenen Stadien (53). Patienten mit malignem Melanom im Stadium IV und erhöhtem LDH-Wert schienen, eine schlechtere Überlebensrate im Vergleich zu Patienten im selben Stadium ohne LDH Erhöhung zu haben (14). LDH wurde des Weiteren in der AJCC-Tumorklassifikation aufgenommen (12). Als unspezifischer Marker gilt weiterhin das C-Reaktives Protein (CRP) und sein Anstieg ist mit der Progression vom Stadium I-III zu Stadium IV assoziiert (54). Melanoma-inhibiting activity (MIA) ist ein Protein, das als Wachstumsfaktor fungiert. Obwohl Melanome höhere Werte im Vergleich zu benignen

melanozytären Nävi aufweisen, ist MIA nicht spezifisch für Melanome, da dieser Anstieg auch in anderen Neoplasien, bei Kindern oder auch während der Schwangerschaft beobachtet wurde (55). Eine Korrelation des Stadiums und der Höhe von MIA ist bei Melanompatienten bereits beschrieben (56). Zur Prävention der Dissemination und Besserung der Morbidität können heutzutage zirkulierende Tumorzellen bei Patienten mit soliden Tumoren detektiert werden (57). Es konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der zirkulierenden Zellen eine Korrelation mit der Tumorlast und dem Therapieansprechen aufweist (58). Zirkulierende Tumorzellen existieren schon früh im Krankheitsverlauf und spielen eine entscheidende Rolle bei der metastasierenden Ausbreitung von Tumoren (59-60).

2.2. Psoriasis

2.2.1. Definition

Die Psoriasis ist eine akute oder chronisch rezidivierende polygenetische Autoimmunerkrankung, die sich vorwiegend als entzündliche Hautkrankheit manifestiert, jedoch kann diese auch andere Organe, wie die Augen (Uveitis), die Gelenke und Weichteile (Arthritis) sowie das Gefäßsystem betreffen. Die typischen Prädilektionsstellen für die scharf begrenzten erythemosquamösen Plaques mit silbrig-weißer Schuppung sind meist die Streckseiten der Extremitäten, der Sakralbereich aber auch der behaarte Kopf (61).

Die Arthritis Psoriatica (Psoriasis-Arthritis, PsA) bezeichnet man das Auftreten einer Rheumafaktor-negativen Arthritis der peripheren Gelenke und/oder einer Spondylitis bei Patienten mit einer Psoriasis cutanea (PsC). Diese zeigt sich als Befall der kleinen peripheren Gelenke, z.B. Daktylitis (asymmetrische Oligoarthritis, HLA-B38,19,5 positiv), als Spondylarthritis mit Sakroiliitis (HLA-B27 positiv), als Monoarthritis, als mutilierende Arthritis oder auch als symmetrische Polyarthritis (62).

2.2.2. Epidemiologie und Pathophysiologie

Die Prävalenz der Psoriasis in Europa und in den USA liegt bei ca. 2-3%, wobei diese in Asien mit 0,1% deutlich geringer ist (63,64,65). Die Psoriasis kann jedes Alter betreffen und ihre Prävalenz wird bei beiden Geschlechtern als gleich groß betrachtet. Das durchschnittliche Alter bei Beginn der Erkrankung liegt bei 33 Jahre alt (66). Die Psoriasis kann früher bei Frauen auftreten, mit einem bimodalen Beginn im Alter von 16–22 Jahren und 55–60 Jahren. Diese Verteilung könnte mit zwei verschiedenen Subtypen anhand von genetischen und immunologischen Charakteristika assoziiert sein: „early-onset“ vor (75% der Fälle) und „late-onset“ nach dem 40 Lebensjahr (67). Die Prävalenz der Psoriasisarthritis variiert von 1,3 bis 34,7% abhängig von der Ethnizität und der geographischen Lage (68-70) und das Alter bei Beginn der Manifestation liegt durchschnittlich bei 42 Jahren.

Die Pathogenese der Psoriasis ist multifaktoriell und neben polygenetischen Prädispositionsfaktoren und einer T-Zell vermittelten Autoimmunogenese spielen Triggerfaktoren der Umwelt eine essenzielle Rolle. Solche exogenen und endogenen Trigger, wie zum Beispiel, Infekte der Atemwege durch β -hämolyisierende Streptokokken,

Einnahme von Medikamenten, wie beta-Blocker, Lithium, exzessiver Alkoholkonsum, physischer und psychischer Stress oder mechanische Irritationen können die erste Manifestation oder eine Exazerbation der Erkrankung auslösen (71).

Die Psoriasis wird durch eine chronisch verlaufende Inflammation gekennzeichnet, die zu einer unkontrollierten Keratinozytenproliferation und einer gestörten Differenzierung führt. Die Entstehung der psoriatischen Plaques ist jedoch nicht nur auf Entzündungsreaktionen in der Epidermisschicht beschränkt, sondern wird diese durch die Interaktion von Keratinozyten mit vielen verschiedenen Zelltypen (angeborene und adaptive Immunzellen, Gefäßsystem) geprägt (72). Störungen in der angeborenen und adaptiven kutanen Immunantwort sind für die Entstehung und Chronifizierung der inflammatorischen Prozesse bei der Psoriasis verantwortlich. Eine Aktivierung des angeborenen Immunsystems, die durch endogene Gefahrensignale und Zytokine angetrieben wird, geht bei einigen Patienten charakteristischerweise mit einer autoinflammatorischen Perpetuierung und bei anderen mit T-Zell-gesteuerten Autoimmunreaktionen einher (73).

Dendritische Zellen spielen eine wesentliche Rolle in den initialen Stadien der Krankheitsentstehung. Ihre Aktivierung bei der Psoriasis ist nicht vollständig geklärt. Einer der vorgeschlagenen Mechanismen beinhaltet die Erkennung von antimikrobiellen Peptiden (AMPs), die von Keratinozyten als Reaktion auf eine Irritation ausgeschieden werden und charakteristischerweise in der psoriatischen Haut überexprimiert werden (74). Zu den am besten untersuchten Psoriasis-assoziierten AMPs gehören LL37, β -Defensine und S100-Proteine. An DNA gebundenes LL37 stimuliert den Toll-like-Rezeptor (TLR) 9 in plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDCs) (75). Die Aktivierung von pDC ist der Schlüssel zum Beginn der Entwicklung der Psoriasis-Plaques und ist durch die Produktion von Typ-I-IFN (IFN- α und IFN- β) gekennzeichnet. Die IFN-Signalgebung vom Typ I fördert die phänotypische Reifung myeloider dendritischer Zellen (mDC) und wurde mit der Differenzierung und Funktion von Th1 und Th17 in Verbindung gebracht, einschließlich der Produktion von IFN- γ bzw. Interleukin (IL)-17. Aktivierte mDCs wandern in drainierende Lymphknoten und sezernieren Tumornekrosefaktor (TNF)- α , IL-23 und IL-12, wobei die beiden letzteren die Differenzierung und Proliferation von Th17- bzw. Th1-Zelluntergruppen modulieren (76). Darüber hinaus reagieren S100-Monozyten, die wichtige entzündungsfördernde Zellen in Psoriasis-Hautläsionen sind, auf die LL37-RNA-Aktivierung, indem sie große Mengen an TNF- α , IL-12 und IL-23 sezernieren (77).

2.2.3 Klassifikation

Wie bereits diskutiert, unterteilt sich die Psoriasis abhängig von dem Manifestationsalter und der Assoziation zu Histokompatibilitätsantigenen in Typ I (Frühtyp) und Typ II (Spättyp). Typ I manifestiert sich vor dem 40. Lebensjahr und weist eine familiäre Häufung auf. Eine Assoziation mit der Genregion Psoriasis Susceptibility (PSOR)-1, -2 und 4 wurde beschrieben. PSOR1 beinhaltet das HLA-Cw6-Gen, welches das mögliche Auto-Antigen ADAMTS-like-protein-5 an CD-8-Zellen präsentiert. Abhängig von dem Hautbefall, Lokalisation oder extrakutaner Manifestation lassen sich diverse Verlaufsformen unterscheiden.

❖ Psoriasis Plaque-Typ
<ul style="list-style-type: none"> • Psoriasis stationärer Plaque-Typ • Psoriasis schubaktiver Plaque-Typ
❖ Psoriasis guttata
❖ Psoriasis inversa
<ul style="list-style-type: none"> • Psoriasis palmaris et plantaris • Psoriasis intertriginosa • Erythrodermia psoriatica
❖ Psoriasis pustulosa
<ul style="list-style-type: none"> ❖ Psoriasis pustulosa (generalisierter Typ) <ul style="list-style-type: none"> • Psoriasis pustulosa generalisata • Impetigo herpetiformis • Erythema anulare centrifugum ähnliche-Psoriasis ❖ Psoriasis pustulosa (lokalisierter Typ) <ul style="list-style-type: none"> • Psoriasis pustulosa palmaris et plantaris (Typ Königsbeck-Barber) • Psoriasis pustulosa palmaris et plantaris (pustulöses Bakterid Typ Andrews) • Akrodermatitis continua suppurativa (akraler Typ oder Typ Hallopeau)
❖ Psoriasis arthropathica
❖ Sonderformen:
<ul style="list-style-type: none"> • Psoriasis seborrhoischer Typ • Psoriasis capitis • Psoriasis der Nägel (Nagelpsoriasis)

Tabelle 2: Klinische Varianten der Psoriasis nach Altmeyer.

Im Jahr 2006 publizierten Taylor et al. die CASPAR-Kriterien für die Klassifikation der Psoriasis Arthritis (78). Für die Diagnosestellung einer Psoriasis-Arthritis ist das Vorhandensein von Schmerzen und Schwellungen in Gelenken oder von entzündlichen Veränderungen an Gelenken, Wirbelsäule, Sehnen oder Sehnenansätzen. Darüber hinaus müssen zusätzlich mindestens drei der folgenden Kriterien erfüllt sein: Psoriasis der Haut, Psoriasis in der Familie (bei einem oder mehreren Verwandten ersten oder zweiten Grades), psoriatische Nagelveränderungen, negativer Rheumafaktor, Daktylitis akut oder in der Vergangenheit, typische gelenknahe osteoproliferative Veränderungen in der Bildgebung an Händen oder Füßen. Bei mindestens drei Punkten liegt eine PsA vor. Eine gegenwärtig vorhandene Psoriasis zählt für zwei Punkte.

Entzündliche Veränderungen im Bereich von Gelenken, Wirbelsäule oder Sehnen bzw. Sehnenansätzen sowie Schmerz, Schwellung und/oder Steifigkeit in einem oder mehreren Gelenken.
Zusätzlich müssen mindestens drei der fünf folgenden Kategorien vorliegen:
1. Psoriasis der Haut <ul style="list-style-type: none"> • Gegenwärtig vorhandene Psoriasis (2 Punkte) • Psoriasis in der eigenen Vorgeschichte • Haut-Psoriasis in der Familie (≥1 Verwandten ersten oder zweiten Grades)
2. Aktuelle psoriatische Nagelveränderungen <ul style="list-style-type: none"> • Onycholysis, • Pitting und • Hyperkeratose)
3. Kein Nachweis eines Rheumafaktors im Serum
4. Daktylitis <ul style="list-style-type: none"> • Schwellung des gesamten Fingers ("Wurstfinger") • in der Vergangenheit diagnostizierten Daktylitis (von einem Rheumatologen diagnostiziert)
5. Radiologischer Nachweis von typischen gelenknahen osteoproliferativen Veränderungen (Knochenneubildungen) im Bereich von Händen oder Füßen.

Tabelle 3: Klassifikation der Psoriasis Arthritis nach den CASPAR-Kriterien.

2.2.4. Therapie

Die Psoriasis wird abhängig vom Schweregrad und von der Einschränkung der Lebensqualität therapiert. Die moderne Psoriasis­therapie umfasst drei Säulen: die topische Therapie, die Phototherapie sowie die Systemtherapie.

2.2.4.1. Topische Therapie

Die topische Therapie wird hauptsächlich bei der leichten oder ergänzend bei der mittelschweren Form der Psoriasis angewendet. Die lokale Behandlung zielt einerseits auf die Keratinolyse und wirkt andererseits entzündungshemmend, wodurch es zu einem langsameren Austausch der Keratinozyten kommt.

Das Dithranol gilt als eins der ältesten Antipsoriatika und eine graduelle Steigerung der Konzentration ist aufgrund potenziell starker Reizung der behandelten Areale erforderlich. Neben der lokalen Reizung im Sinne einer Entzündungsinduktion und Immunmodulation wird Dithranol für seinen keratolytischen Effekt ausgenutzt (72).

Die Glukokortikoide können bei kleinflächigem Befall als Monotherapie oder bei großflächiger Psoriasis in Kombination mit Vit-D3-Analoga (z.B. Calcipotriol) oder einer systemischen Therapie eingesetzt werden. In der Epidermis binden sie an den Kortikosteroidrezeptor, wodurch die Produktion von Immunmodulatoren, wie IL-1, IL-2, IL-6 oder Interferon α gehemmt wird. Zu den möglichen Nebenwirkungen zählt die Hautatrophie sowie ein „Rebound-Phänomen“, welches zu einem starken Rezidiv führen kann (73).

Die Vit-D3-Analoga zeigen eine antiproliferative, immunmodulierende sowie entzündungshemmende Wirkung. Tacalcitol und Calcipotriol stehen für eine Monotherapie zur Verfügung, wobei eine höhere Effektivität durch eine Kombinationstherapie mit Steroiden wie Betamethason erreicht werden kann (74). Retinoide wie Tazaroten stellen eine weitere Therapiemöglichkeit dar, jedoch wird die Kombination mit einem Steroid oder Phototherapie aufgrund häufiger Hautirritationen favorisiert. Weiterhin sind sie teratogen und somit in der Schwangerschaft kontraindiziert (75).

2.2.4.2. Phototherapie

Es ist essenziell vor dem Therapiebeginn, die minimale Erythemdosis (MED) sowie die minimal phototoxische Dosis bei PUVA (Psoralen+UVA mit einer Emission bei 320 und 400nm) zu bestimmen. Bei einer selektiven ultravioletten Phototherapie (SUP) werden Schmalspektrum UVB Strahlen mit einer Emission bei 305 und 325 nm zur Behandlung von

psoriatischen Haut eingesetzt. Alternativ steht auch die PUVA oder RePUVA (Retinoid+PUVA) zur Verfügung. Zur Durchführung können folgende Medikamente 8-Methoxypsoralen (8-MOP), Trimethylpsoralen und 5-Methoxypsoralen (5-MOP) verwendet werden. Die Applikation der Medikamente kann oral, lokal oder durch Bad vor der Lichtexposition erfolgen. Die UVA und UVB Strahlentherapie geht mit einem erhöhten Risiko zur Entstehung von Plattenepithelkarzinomen, aktinischen Keratosen sowie zur frühzeitigen Hautalterung einher (76).

2.2.4.3. Systemtherapie

Eine Systemtherapie soll in Erwägung gezogen werden, wenn alle externe Therapiemodalitäten ausgeschöpft sind und die Kriterien für eine mittelschwere oder schwere Psoriasis erfüllt sind. Die Wirkung liegt in der Induktion der Apoptose und in der Hemmung der Freisetzung proinflammatorischer Zytokine.

Fumarsäureester war eine der ersten zugelassenen für Psoriasis Systemtherapien in Deutschland. Die Wirkung beruht sich auf den antiproliferativen sowie auf den selektiven, immunmodulatorischen Effekt auf Lymphozyten. Mögliche begleitende Nebenwirkungen sind Flush-Symptomatik, Übelkeit sowie eine Leukopenie (77).

Vitamin A-Derivate, wie Acitretin stellen eine weitere Therapiemöglichkeit für die Psoriasis dar. Diese zielen mit einer Inhibition der Interleukin-6 vermittelten TH17-Zellproliferation auf die Modulation von Faktoren, die das Wachstum und die Differenzierung der epidermalen Keratinozyten kontrollieren, sowie auf die Modulation und regulatorische T-Zelldifferenzierung (78). Eine höhere Effektivität zeigt sich bei dem Einsatz bei der pustulösen Psoriasis oder bei Erythrodermie. Acitretin kann in Kombination mit einer Phototherapie eingesetzt werden. Die am häufigsten auftretenden Nebenwirkungen sind die mögliche Teratogenität, Cheilitis, Bindehautentzündungen, allgemeine gastrointestinale Beschwerden sowie Hepatitis (79).

Ciclosporin A stammt aus dem Bereich der Transplantationsmedizin und gilt als selektives Immunsuppressivum ohne myelotoxische Wirkung (80). Durch die Aktivierung einer Enzymkaskade hemmt es vorwiegend calcineurin-abhängige Signaltransduktionswege und verhindert wiederum die Zytokinbildung von zum Beispiel IL-8, TNF- α und IFN- γ . Die Nephrotoxizität und potenzielle Kanzerogenität sind bekannte Nebenwirkungen und somit gelten relevante Nierenfunktionsstörungen, Malignität, schwere Infektionskrankheiten als absolute Kontraindikationen (81).

Methotrexat (MTX) wird vorwiegend bei der Psoriasis arthropathica eingesetzt. Es handelt sich um einen Folsäureantagonisten, welcher zur Hemmung der Lymphozytenproliferation und der Granulozytenchemotaxis führen kann. MTX kann in Kombination mit Fumaraten oder Etanercept verwendet werden (82). Aufgrund der dosis- bzw. therapiedauerabhängigen Lebertoxizität als unerwünschte Nebenwirkungen empfehlen sich regelmäßige Kontrollen der Blut-Leber- und Nierenwerte. Darüber hinaus kann Haarausfall, Übelkeit, Erbrechen, Müdigkeit, Fieber, Leberfibrose, Leberzirrhose auftreten. Als absolute Kontraindikationen werden die Leberzirrhose, Niereninsuffizienz, Stillzeit sowie vordiagnostizierte Tuberkulose angesehen (83)

Apremilast ist eine therapeutische Option für die Spondylitis, Psoriasisarthritis bzw. Psoriasis arthropathica sowie Psoriasis vulgaris. Es ist ein orales Thalidomid-Analogon, der durch Hemmung der Phosphodiesterase-4 zu einer Erhöhung des intrazellulären cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat) und wiederum zu einer verminderten Freisetzung von proinflammatorischem TNF- α , IFN γ und IL-12 und zur Erhöhung von IL-10 führt [84,85].

Der Begriff Biologika bezieht sich auf komplexe Moleküle, einschließlich monoklonaler Antikörper und Fusionsproteine. Biologika unterscheiden sich von den oben beschriebenen systemischen Therapien dadurch, dass sie auf spezifische Signalwege abzielen und subkutan oder intravenös in unterschiedlichen wöchentlichen Zeitplänen verabreicht werden. Biologika zielen vornehmlich auf Wege ab, die für die Entwicklung und Chronifizierung der Plaque-Psoriasis entscheidend sind, wie die IL-23/Th17 Achse und die TNF- α - (Tumor Nekrose Faktor) Signalübertragung (86).

Unter den TNF- α -Hemmern ist Etanercept das erste zugelassene Arzneimittel für die Behandlung von Psoriasis und Psoriasis arthritis. Es handelt sich um ein rekombinantes menschliches Fusionsprotein, wobei der Rezeptorteil für den TNF- α -Liganden mit dem Fc-Teil eines humanen IgG1-Antikörpers fusioniert wird. Infliximab ist ein chimärer (Maus-Mensch) monoklonaler IgG1-Antikörper und Adalimumab ist ein vollständig humaner monoklonaler IgG1-Antikörper (87).

Ustekinumab ist ein humaner monoklonaler Antikörper, der an die p40 Untereinheiten der Interleukin-12 (IL-12) und -23 (IL23) bindet und somit werden die Signalwege zu natürlichen Killerzellen (NK) und der T-Lymphozyten verhindert. IL-23 fördert die Differenzierung von Th1-Lymphozyten (T-Helferzellen) und die Proliferation von Th17-Zellen und IL12 stimuliert die natürlichen Killerzellen und vermittelt die Differenzierung von CD4+ T-Zellen zum Phänotyp Th1 (86). Drei humane monoklonale Antikörper, die auf IL-17 abzielen, sind zugelassen. Secukinumab und Ixekizumab blockieren IL-17A; wohingegen Brodalumab gegen den IL-17-Rezeptor A gerichtet ist. Guselkumab, Tildrakizumab und Risankizumab

sind drei vollständig humane monoklonale Antikörper mit p19-Spezifität (Untereinheit von IL-23) (86).

2.2.5. Marker für Psoriasis

Die Einteilung der Psoriasis in die leichte und mittelschwere bis schwere Form basiert auf anerkannten Indexen wie der Psoriasis Area and Severity Index (PASI), der Body Surface Area-Test (BSA) und der Dermatology Life Quality Index (DLQI). Wenn alle drei Messverfahren einen Wert von 10 oder niedriger aufweisen, handelt es sich um eine leichte Psoriasis, während eine mittelschwere bis schwere Form vorliegt, wenn diese Werte gleich oder höher als 10 gemessen werden (88).

Der PASI wird zur Messung des Schweregrades und zur Erfassung der betroffenen Hautfläche. Die Körperfläche wird in vier Bereichen aufgeteilt: Kopf, Stamm, obere und untere Extremitäten. Eine Skala von 0-6 wird zur Berechnung der Fläche (F) verwendet (0=keine Beteiligung, 1=<10%, 2=10 bis 30%, 3=30-50%, 4=50-70%, 5=70-90%, 6=90-100%). Zusätzlich werden die Effloreszenzen anhand des Erythems (E), der Infiltrationstiefe(I) und der Schuppung(S) beurteilt. Die Summe der Punkte für die Ausprägung der Effloreszenz wird mit den befallenen Körperoberflächen in Prozenten multipliziert. Die vier einzelnen Körperregionen werden anschließend mit einem der Körperregion zugehörigen Flächenfaktor gewichtet. Für jede Körperregion ergibt sich ein Flächenfaktor in Bezug auf die Gesamtoberfläche: für den Kopfbereich 0,10, für die Arme 0,20, für den Stamm 0,30 und für die Beine 0,40. Der PASI kann Werte von 0 bis 72 annehmen. Der PASI wird wie folgt berechnet:

$$\text{PASI} = 0,1 \times (E + I + D) \times F \text{ (für den Kopf)} + 0,2 (E + I + D) \times F \text{ (für die Arme)} + 0,3 (E + I + D) \times F \text{ (für den Stamm)} + 0,4 \times (E + I + D) \times F \text{ (für die Beine)} \text{ (88).}$$

Bei dem DLQI handelt es sich um den Einfluss der Psoriasis auf die Lebensqualität der Patienten und derer Erfassung mittels zehn standardisierter Fragen. Die zehn Fragen beziehen sich auf diverse Bereiche des Alltages wie Kleidung, Selbstwertgefühl, Arbeit und Schule, Hautzustand, Beziehungen und Freizeitaktivitäten. Jede Frage bezieht sich auf die letzten 7 Tage und jede Antwort wird mit Punkten von 0-3 bewertet. Wenn man diese addiert, ergibt sich ein Score, der entsprechend interpretiert werden kann: 0-1 kein Einfluss, 2-5 leichter Einfluss, 6-10 mäßiger Einfluss, 11-20 sehr großer Einfluss, 21-30 extremer Einfluss (89).

Die Psoriasis ist eine polygenetische Hauterkrankung mit immunologischer Ätiologie. Das Immunsystem interagiert mit Killerzellen und es entsteht ein komplexes Zellnetzwerk, in dem dendritische Zellen, T-Lymphozyten, Neutrophile und Mastzellen, die die Freisetzung weiterer Moleküle, wie IL-23, IL-17, IL-12, IL-22, IL-23, IL-6, IL-10, IFN, TNF, TGF- β 1 auslösen und somit die komplexe Pathologie der Psoriasis induzieren (90). Neulich wurden neue Biomarker und wichtige Faktoren für die Entwicklung der Krankheit identifiziert, wie das Hautmikrobiom und das serotonerge System der Haut (91,92). Beispielsweise wurde kürzlich berichtet, dass die Variationen des Mikrobioms mit dem Spiegel der Rezeptoren für inflammatorische Zytokine assoziiert sind, insbesondere in Bezug auf den IL-2-Rezeptor. Weiterhin gibt es zahlreiche genetisch empfindliche Biomarker, die mit dem Risiko von PsA in Verbindung gebracht werden. Die stärkste Assoziation besteht mit dem Vorhandensein des HLA-C*06-Gens und HLA-B27 (93). Es wurde darüber hinaus gezeigt, dass Killerzellen aus psoriatischer Haut eine hohe Expression von mRNA aufweisen, die für SERPINB kodiert [100]. SERPINB wird durch den TEAD4 Transkriptionsfaktor reguliert und beeinflusst die Sekretion von Chemokinen in Psoriasis, wodurch die normale Kommunikation zwischen Killerzellen und T-Zellen verhindert wird (94,95). In den letzten Jahren wurde die Psoriasis als eine systemische Krankheit erkannt, die mit dem metabolischen Syndrom oder seinen Komponenten wie Adipositas, Insulinresistenz, Bluthochdruck und Dyslipidämie assoziiert ist. Viele bioaktive Substanzen scheinen mit dem metabolischen Syndrom in Verbindung zu stehen. Gerkowicz et al. recherchieren die mögliche Rolle von Adiponectin, Leptin, Ghrelin, Resistin, inflammatorischen Zytokinen, Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1 (Serinproteinase-Inhibitor), Harnsäure, C-reaktivem Protein und Lipidanomalien bei Psoriasis und beim metabolischen Syndrom als metabolische Biomarker (96).

2.3. Afamin

Das Glykoprotein Afamin ist ein Mitglied der Albumin-Genfamilie neben Albumin, Alpha-Fetoprotein und Vitamin-D-Bindungsprotein, das hauptsächlich in der Leber exprimiert wird und in den Blutkreislauf ausgeschieden wird, wo es in relativ hohen Konzentrationen zirkuliert (97,98,99). Afamin hat ein Molekulargewicht von 87 kDa. Zirkulierendes Plasma-Afamin ist hauptsächlich hepatischen Ursprungs, wobei Gehirn, Niere, Hoden und Ovarien wurden als weitere Afamin-exprimierende Organe identifiziert. Hohe Konzentrationen von Afamin wurden im Plasma und in anderen Körperflüssigkeiten wie Follikel-, Zerebrospinal- und Samenflüssigkeit beschrieben. Afamin als Vitamin E bindendes Protein scheint, eine wichtige Rolle bei der Neuroprotektion, der Fertilität, der Bioverfügbarkeit von Vitamin E, einschließlich seines Transports über die Blut-Hirn-Schranke sowie im Knochenstoffwechsel/Umbau zu spielen (100-102).

Afamin wurde als onkologischer Biomarker in verschiedenen Tumorentitäten untersucht. Studien zeigten, dass Lysate von Ovarialkarzinom-Zelllinien Afamin enthalten und eine niedrige Afamin-Konzentration im Serum als neuer Marker für die spezifische Diagnose von Ovarialkarzinom identifiziert wurde (103). In Cholangiokarzinomen wurde ein hoher postoperativer α 1 β Glykoprotein/Afamin Quotient im Serum festgestellt, welcher mit schlechteren Ergebnissen und einer Infiltration der Resektionsränder verbunden war. Die Ratio war ebenso signifikant höher in Patienten mit Cholangiokarzinom im Vergleich zu der gesunden Kontrollgruppe (104). Weiterhin wurde eine Herunterregulierung des Afamin-Spiegels im Serum in Patienten mit Schilddrüsenkarzinom und Lungenmetastasen dokumentiert (105). Wang et al. konnten keine signifikanten Veränderungen vom Afamin bei Patientinnen mit Mammakarzinom detektieren und Afamin wurde als nicht signifikanter, prognostischer Faktor bezeichnet, wobei die Autoren die kleine Studienkohorte kritisch diskutieren (106).

Des Weiteren wurde es festgestellt, dass die Afamin-Plasmakonzentrationen sowohl mit der Prävalenz als auch mit der Inzidenz des metabolischen Syndroms assoziiert waren. Die Afamin-Plasmakonzentrationen korrelieren signifikant mit der Anzahl der Parameter, die für die Entwicklung des metabolischen Syndroms relevant sind (107). Eine Analyse in 20.000 Probanden zeigte, dass Afamin unabhängig von wichtigen metabolischen Risikofaktoren oder Parametern, stark mit der Prävalenz und Inzidenz von Typ-2-Diabetes assoziiert ist. Daher könnte es ein vielversprechender neuer Marker zur Identifizierung von Personen mit hohem Risiko für die Entwicklung von Typ-2-Diabetes sein (108). Darüber hinaus könnte das Glykoprotein als neuer Biomarker für die frühzeitige Erkennung eines pathologischen Glukosestoffwechsels während der Schwangerschaft dienen (109). In einer weiteren Studie war der Afamin-Spiegel erhöht in der Peritonealflüssigkeit von Frauen mit Endometriose im

Vergleich zu der gesunden Kontrollgruppe und korrelierte mit dem Vitamin-E-Spiegel (110). Weiterhin kann der Anstieg vom Afamin auf oxidativen Stress und Entzündung hinweisen und bietet einen Indikator für eine beeinträchtigte Glukosetoleranz bei Patienten mit polyzystischen Ovarien, unabhängig von dem Vorliegen von Adipositas (111). Die Ergebnisse einer anderen Studie deuten darauf hin, dass genetische Variationen von Afamin mit männlicher Infertilität in Männern mit Oligoasthenoteratozoospermia assoziiert sind (112).

Im Rahmen von Proteomanalysen wurde Afamin im Serum von Melanompatienten detektiert und daraufhin erfolgte eine genauere Exploration zur Bestimmung seiner Rolle als möglicher prognostischer Marker. Aus diesem Anlass untersuchten wir Afamin in Patienten mit malignem Melanom und dessen potenzielle Veränderungen nach Immuntherapie oder Progression der Erkrankung. Aufgrund der bekannten Assoziation der Psoriasis mit dem metabolischen Syndrom, wurde Afamin weiterhin als potenzieller Biomarker während systemischer immunmodulierender Therapie, in Patienten mit Psoriasis und Psoriasis Arthritis als zusätzliche Kontrollkohorte, untersucht.

2.4. Pigment-Epithelium Derived Factor-PEDF

Der Pigmentepithel abgeleitete Faktor (PEDF) ist ein 50 kDa großes Glykoprotein, welches zur Serin-Protease-Inhibitoren gehört und wurde initial aus humanen retinalen Pigmentepithelzellen gewonnen, als Faktor mit starker neuronaler Differenzierungsaktivität für humane Retinoblastomzellen (113). Dieser Wachstumsfaktor spielt multimodale Rollen bei diabetischen Retino- und Nephropathien, diversen Tumorentitäten sowie Körpergewichtsveränderungen.

Die antiangiogene Wirkung von PEDF wurde bereits in der Literatur in Bezug auf die potentielle Hemmung des Tumorwachstums für das maligne Melanom beschrieben (113). Des Weiteren hatte die antitumorale Therapie mit PEDF einen signifikanten Effekt auf die Metastasen bei einem orthotopen Model für Osteosarkome dank der Reduktion von Proliferation und Migration von Endothelzellen (114). Andererseits wurde PEDF als fördernder Faktor für die peritoneale Dissemination von Ovarialkarzinomen diskutiert, u.a. durch Induktion von CD206+ Interleukin-10 (IL-10) produzierenden Makrophagen. Eine hohe PEDF-Genexpression ist mit einer schlechten Prognose für Patientinnen mit Ovarialkarzinom verbunden (115). Weiterhin wurde dieser basiert auf die Induktion von Differenzierung und Apoptose in Tumorzellen, als potenzieller, multifunktionaler, antitumoraler Faktor bezeichnet (116). PEDF verringert das Metastasierungspotenzial von nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom durch Regulierung der Thrombospondin 1 -Freisetzung in tumoralen Exosomen und die Autoren der Studie diskutieren somit einen neuen Mechanismus der Lungenkrebsprogression auf (117). Eine niedrige Expression in Plattenepithelkarzinomen, Verrucae sowie Psoriasis der Haut wurde im Vergleich zur gesunden Haut beschrieben, wodurch die Rolle von PEDF in der Keratinozytendifferenzierung unterzeichnet wird (118).

Weitere Studien postulieren, dass die topische Anwendung von antiangiogenen Peptiden auf der Basis von Pigmentepithel-abgeleiteten Faktoren die Psoriasis verbessern kann (119). Eine andere Arbeitsgruppe beweist, dass die Assoziation zwischen PEDF und TNF- α bei Psoriasis-Patienten eine negative Korrelation zeigte, obwohl sie statistisch nicht signifikant war. Diese Daten deuten darauf hin, dass PEDF als entzündungshemmendes System bei Patienten mit Psoriasis erhöht sein kann (120).

PEDF hat sich seit der Entdeckung seiner modulierenden Aktivitäten im lipolytischen Weg durch Bindung an Fett-Triglycerid-Lipase (ATGL) zu einem entscheidenden metabolischen Regulationsprotein entwickelt. Obwohl PEDF bei der Aufrechterhaltung der Homöostase der hepatischen Lipidakkumulation eine strategische Position besitzt, wurde eine ungünstige Rolle im Zusammenhang mit Insulinresistenz aufgedeckt (121). Während einer akuten Stimulation der beta-adrenergen Rezeptoren wird die Serum-PEDF-Konzentration jedoch

verringert (122). Darüber hinaus spiegeln die hormonelle Regulierung und die anti-angiogene Aktivität von PEDF seine essenzielle Rolle in der Physiologie und Pathophysiologie des Reproduktionssystems wider (123).

3. Materialien und Methoden

3.1. Patientenkollektiv

Vier Patientenkohorten wurden anhand der gewonnenen Blutproben gebildet und zur quantitativen Bestimmung von Afamin und PEDF untersucht. Die erste Gruppe bestand aus Patienten mit malignem Melanom im Stadium III (Gruppe 1, n=27). Die EDTA und Serum-Blutproben dieser Patienten wurden im Jahr 2004-2006, vor, während (3-6, 6-9 Monate) und nach (12-18 Monate) der Therapie mit Interferon a (INF-a) entnommen. Die Proben wurden zwischen 2004-2006 entnommen, bei -80°Celsius gelagert und erst im Jahr 2016-18 nach Detektion von Afamin im Serum von Melanompatienten im Rahmen von Proteomanalysen verwendet. Die Progression während der Therapie, der LDH-Wert, sowie das zeitliche Intervall wurden dokumentiert. Komorbiditäten wurden ebenso anamnestisch erhoben.

Als Kontrollgruppe wurden Patienten mit malignem Melanom in diversen Stadien (I-IV) mit und ohne Immuntherapie rekrutiert und deren Serumproben wurden zu einem Zeitpunkt analysiert (Gruppe 2, n=18). Neben der Bestimmung von Afamin und PEDF im Serum wurde der S-100 Melanom-Marker, der LDH-Wert sowie die Tumordicke und aktuelle oder gehabte Immuntherapie in Betracht gezogen. Die Nebendiagnosen wurden dokumentiert.

Des Weiteren wurde das Serum von Patienten mit Psoriasis mit und ohne begleitende Arthritis, zu zwei Zeitpunkten, vor und neun Monate nach einer immunmodulierenden Therapie untersucht (Gruppe 3, n=18). Für diese Kohorte wurden die Psoriasisform und die begleitende Gelenkbeteiligung sowie Komorbiditäten, wie Adipositas und Diabetes mellitus, in der Anamnese dokumentiert. Der PASI-Index wurde für alle Patienten vor Beginn als auch nach der Therapie berechnet.

Zuletzt wurden das Afamin und PEDF im Serum und EDTA gesunder Probanden gemessen (Gruppe 4, n=43). Alle Probanden hatten das Mindestalter von 18 Jahren. Eine Einverständniserklärung der Einzelpersonen lag vor.

3.2. Afamin-Bestimmung mittels ELISA

Um die quantitative Afamin-Konzentration in den verschiedenen Patientenseren zu ermitteln, wurde die Enzyme-linked immunosorbent assay-Technik (ELISA) verwendet. Es wurden

kommerzielle ELISA-Kits RD194428100R HUMAN Afamin ELISA der Firma BioVendor Research and Diagnostic Products (Modrice, Czech Republic) verwendet. Die Nachweisgrenze für Afamin betrug 0,022 µg/ml. Der gesamte Inhalt des Kits ist in der folgenden Tabelle aufgelistet.

Kitkomponente	Zustand	Menge
antikörperbeschichtete Mikrotitrierplatte	Direkt verwendbar	1Stck/96 wells
Antihuman Afamin AB-HRP-Konjugat	Direkt verwendbar	13ml
Substratlösung	Direkt verwendbar	13ml
Stopplösung	Direkt verwendbar	13ml
Masterstandard	Gefriergetrocknet	2 Ampullen
Washlösung	konzentriert	100ml
Verdünnungspuffer	Direkt verwendbar	50ml

Tabelle 4: Übersicht der ELISA-Kit-Reagenzien nach Herstellerangaben (BioVendor Research and Diagnostic Products).

Für diese Arbeit wurde ein so genannter Sandwich-ELISA verwendet. Dabei wird das Molekül, in diesem Fall Afamin, von einem Primärantikörper gebunden. Ein Sekundärantikörper bindet anschließend ebenfalls an Afamin. An diesen bindet in einem weiteren Schritt Streptavidin-Meerrettichperoxidase (HRP), dass eine Farbreaktion in einem noch zugefügten Reagenz katalysiert. Dabei hängt das Ausmaß der Veränderung des Farbes mit der initial gebundenen Afamin-Menge zusammen. Quantifiziert wird der Farbumschlag über eine Lichtabsorptionsmessung bei definierter Wellenlänge im Vergleich zu einer mitgeführten Standardreihe mit bekannter Afamin-Menge.

Die Herstellerstandards wurden kitspezifisch mit dem Verdünnungspuffer vermengt. Die hergestellten Lösungen wurden über 30 Minuten gelegentlich geschwenkt. Die homogene Lösung stellte den Masterstandard und damit das Ausgangsprodukt für die Standardverdünnungsreihe dar. Die Verdünnung erfolgte nach den in der folgenden Tabelle aufgeführten Herstellerangaben.

Volumen von Standard	Verdünnungspuffer	Konzentration
Stock	-	1,6µg/ml
400µl of 1,6µg/ml	240µg/ml	1,0µg/ml
400µl of 1,0µg/ml	240µg/ml	0,63µg/ml
400µl of 0,63µg/ml	240µg/ml	0,39µg/ml

400µl of 0,39µg/ml	240µg/ml	0,24µg/ml
400µl of 0,24µg/ml	240µg/ml	0,15µg/ml

Tabelle 5: Herstellung der Standardverdünnungsreihe (BioVendor Research and Diagnostic Products)

Die Platten wurden, wie in der folgenden Tabelle abgebildet, belegt.

	Strip 1+2	Strip 3+4	Strip 5+6	Strip 7+8	Strip 9+10	Strip 11+12
A	Standard 1,6	Probe 1	Probe 9	Probe 17	Probe 25	Probe 33
B	Standard 1,0	Probe 2	Probe 10	Probe 18	Probe 26	Probe 34
C	Standard 0,63	Probe 3	Probe 11	Probe 19	Probe 27	Probe 35
D	Standard 0,39	Probe 4	Probe 12	Probe 20	Probe 28	Probe 36
E	Standard 0,24	Probe 5	Probe 13	Probe 21	Probe 29	Probe 37
F	Standard 0,15	Probe 6	Probe 14	Probe 22	Probe 30	Probe 38
G	Blank	Probe 7	Probe 15	Probe 23	Probe 31	Probe 39
	Blank	Probe 8	Probe 16	Probe 24	Probe 32	Probe 40

Tabelle 6: Beispiel einer Elisa Platte für Afamin nach den Herstellerangaben.

Die Washlösung wurde zehnfach in destilliertem Wasser (100:900ml) verdünnt. Die Proben wurden 100x mit Verdünnungspuffer verdünnt. Dazu wurden 5 µl der Serum- oder EDTA-Proben abpipettiert und mit 495 µl des Verdünnungspuffers mittels Vortexgerät vermengt. Gefrorenen Blutproben wurden zuvor einige Minuten bei Zimmertemperatur auf Eis gelegt. Von den entstandenen Lösungen wurden je 100 µl der Standardreihe, der Pufferlösung (Blank, zur Kalibrierung) sowie der verdünnten Proben jeweils zweifach in die Wells eingebracht. Die Platte wurde mit einer Klebefolie verschlossen und über Nacht mit 300 rpm auf dem Mikrotiterschüttler inkubiert. Die Platte wurde drei Mal mit Washlösung gespült und anschließend auf einem Papiertuch kräftig ausgeklopft. Daraufhin wurden 100 µl des Anti-Afamin-HRP (Horseradish peroxidase)-Konjugat in alle Vertiefungen eingebracht, klebend abgedeckt und erneut über eine Stunde bei 300 rpm auf dem Mikrotitrierschüttler inkubiert. Im Anschluss wurde die Platte wieder drei Mal manuell mit Washlösung gewaschen. Im nächsten Schritt wurden 100µl von der Substratlösung in jedes Well pipettiert. Die Platte wurde mit Alufolie bedeckt und musste ruhig über 10-15 Minuten im Dunkeln stehen. Hierbei färbten sich die bisher farblosen Lösungen bläulich. Die Reaktion wurde mit 100µl von der Stopplösung gestoppt. Dabei wurde ein Farbumschlag von blau zu gelb deutlich. Die Farbintensität stand in Zusammenhang mit der enthaltenen Afamin Menge. Der Farbumschlag wurde innerhalb von 5 Minuten als Absorption mittels ELISA-Plate Reader (Synergy 2; BioTek sowie Hidex Sense) bei 450 nm gemessen. Die computergestützte Auswertung der Proben) konnte Hinweise auf Pipettierfehler geben. Die Konzentrationen wurden nach logistischer Regressionsanalyse von 4 Parametern (4PL) in µg/ml kalkuliert.

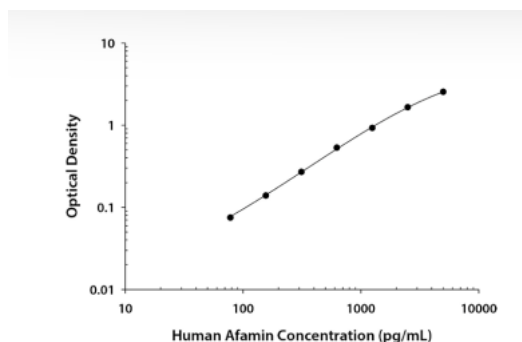


Abbildung 1: Beispiel einer idealen linearen Standardkurve.

3.3. Bestimmung der PEDF- Konzentration mittels ELISA

Die quantitative Bestimmung von PEDF in den untersuchten Proben erfolgte mit ähnlicher Technik, wie bereits für das Afamin beschrieben. Bei dem hier verwendeten ELISA handelt es sich um einen DuoSet-ELISA Human Serpin F1/PEDF (R&D Systems, DY1177-05). Der Inhalt des Kits wird in der Tabelle 8 aufgelistet.

Kitkomponente	Menge
Human Serpin F1 Capture Antikörper	1 Ampulle
Human Serpin F1 Detection Antikörper	1 Ampulle
Human Serpin F1 Standard	2 Ampullen
Streptavidin-HRP-Konjugat	1 Ampulle

Tabelle 7: Übersicht der ELISA Kit Reagenzien für PEDF nach Hersteller (DuoSet ELISA, R&D).

Das Streptavidin-HRP wurde nach Angaben des Herstellers mit dem Verdünnungspuffer verdünnt. Der human Serpin F1 Capture Antikörper wurde in einer Konzentration 0,8µg/ml in PBS und der Detektionsantikörper in einer Konzentration von 300ng/ml in Verdünnungspuffer verdünnt. Die human Serpin F1 Standardlösung enthält 90ng/ml rekombinantes humanes Serpin F1 nach Rekonstruktion mit 0,5 ml Verdünnungspuffer Eine Verdünnungsreihe von 5000 pg/ml bis 78,1 pg/ml wurde in sieben Schritten empfohlen.

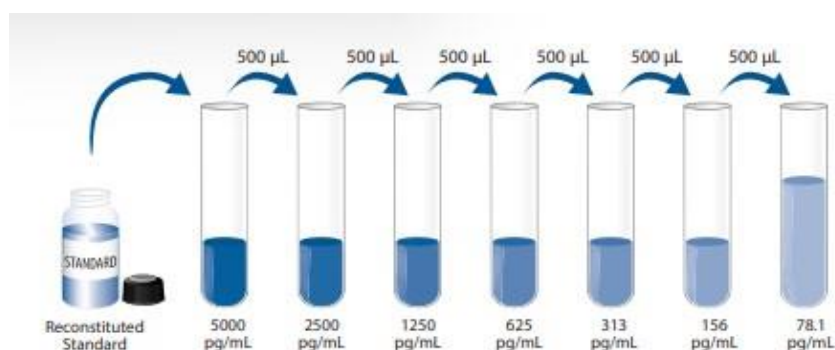


Abbildung 2: Verdünnung der Human Serpin F1 Standardlösung nach Herstellerangaben (Human Serpin F1, Duo Set Elisa, R&D).

Folgende Reagenzien mussten zusätzlich hergestellt werden:

Komponente/Reagenzien	Zusammensetzung
96 well Platte	Nunc Maxisorp Nr. 442404
Phosphate Buffered Saline (PBS)	
Waschlösung	0,5ml Tween 20 in 1L PBS
TMB Substratlösung	1ml 1mg/ml TMB stock in DMSO, 9ml 0,05 Phosphatete citrate Buffer, pH 5,0 Frisch:2µl 30% H2O2
Stopplösung	1M H3PO4 61,656 ml 85% ortho Phosphorsäure H3PO4(Molare Masse 98g/ml, Dichte 1,87g/cm ³) 938,34 ml ddH2O
Verdünnungspuffer A	1g Bovine Serum Albumin (BSA) 0,25ml Tween 20 100ml PBS, pH7,2
Verdünnungspuffer B	10 ml Verdünnungspuffer A 40ml PBS, pH7,2

Tabelle 8: Liste der hergestellten Reagenzien außer den enthaltenen Kit-Komponenten.

Das empfohlene Protokoll wurde nach entsprechenden Testungen angepasst. Gefrorenen Blutproben wurden zuvor einige Minuten bei Zimmertemperatur auf Eis gelegt. Die Proben wurden 1:40.000 verdünnt. 100µl von dem verdünnten capture Antikörper wurden in jedes

Well eingebracht. Anschließend wurde die Platte mit einer Klebefolie bedeckt und bei Raumtemperatur und 300rpm auf dem Mikrotitrierschüttler gerüttelt. Am nächsten Tag wurde die Platte mit 200µl von dem Waschpuffer in jedem Well manuell dreifach gewaschen und auf einem Papiertuch ausgeklopft. Folgend wurden 200µl Verdünnungspuffer in jedes Well hinzugefügt und die Platten wurden erneut bei Raumtemperatur über mindestens eine Stunde inkubiert. Der Waschprozess wurde, wie oben beschrieben, wiederholt.

Die Platten wurden, wie in der folgenden Tabelle abgebildet, belegt.

	Strip 1+2	Strip 3+4	Strip 5+6	Strip 7+8	Strip 9+10	Strip 11+12
A	Standard 5000	Probe 1	Probe 9	Probe 17	Probe 25	Probe 33
B	Standard 2500	Probe 2	Probe 10	Probe 18	Probe 26	Probe 34
C	Standard 1250	Probe 3	Probe 11	Probe 19	Probe 27	Probe 35
D	Standard 625	Probe 4	Probe 12	Probe 20	Probe 28	Probe 36
E	Standard 313	Probe 5	Probe 13	Probe 21	Probe 29	Probe 37
F	Standard 156	Probe 6	Probe 14	Probe 22	Probe 30	Probe 38
G	Standard 78,1	Probe 7	Probe 15	Probe 23	Probe 31	Probe 39
	Blank	Probe 8	Probe 16	Probe 24	Probe 32	Probe 40

Tabelle 9: Beispiel einer Elisa Platte für PEDF nach den Herstellerangaben.

Von den hergestellten verdünnten Lösungen wurden je 100 µl der Standardreihe, der Verdünnungspuffer (Blank) sowie der verdünnten Proben jeweils zweifach in die Wells pipettiert. Die Platte wurde verschlossen und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei bindet das PEDF aus Standard und Probe an den Primärantikörper. Nach der Waschung wurden 100µl des Sekundärantikörpers pro Well eingebracht. Dabei bindet auch der Sekundärantikörper an das PEDF. Nach zweistündiger Inkubation wurde die Platte erneut gewaschen. Darüber hinaus wurden es 100µl des hergestellten Streptavidin-Horseradish peroxidase (HRP) Konjugaten pipettiert und die Platte wurde mit Alufolie bedeckt und ruhig im Dunkeln über 20 Minuten bei Raumtemperatur gestellt. Dabei bindet Streptavidin-HRP an den Sekundärantikörper. Anschließend wurde es erneut fünffach gewaschen und 100µl der Tetramethylbenzidin Substratlösung pro Well pipettiert. Die initial farblose Lösung wurde durch das Streptavidin-HRP zu einer Farbveränderung katalysiert. Nach 20 Minuten wurde die Reaktion mit 100µl der Stopplösung gestoppt. Die Absorption mittels ELISA-microplate reader (Synergy 2; BioTek und Hidex Sense) bei 450 nm gemessen. Die Konzentrationen wurden in pg/ml kalkuliert und wurden nach logistischer Regressionsanalyse von 4 Parametern (4PL) in µg/ml umgerechnet.

3.4. Statistische Auswertung

Die erworbenen Daten wurden mit dem Statistikprogramm GraphPad Prism 9.5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) analysiert. Die statistische Analyse der Daten wurde unter Verwendung des two-way ANOVA-Tests und des Tukey-Tests für Mehrfachvergleiche durchgeführt. Weiterhin wurde der ungepaarter t-Test mit Welch Korrektur für den Vergleich einzelner Gruppen verwendet. Um den linearen Zusammenhang beziehungsweise die Stärke der Korrelation zwischen zwei Gruppen zu bestimmen, wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson angewandt. Ein Wert von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant definiert und Signifikanzniveaus wurden als * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$ und **** $p < 0,001$ angegeben.

4. Ergebnisse

4.1. Deskription der Patientenkohorten

4.1.1. Gruppe 1-Malignes Melanom unter INF-Therapie

Die Probanden (n=27) in dieser Gruppe, wie bereits unter dem Patientenkollektiv analysiert, sind Patienten mit malignem Melanom im Stadium III vor dem Therapiebeginn mit INF sowie 0-3, 6-9 und 12-18 Monate nach Therapiebeginn. Die Blutproben dieser Gruppe wurden bei 80°Celsius gelagert und circa zehn Jahre später für die Bestimmung von Afamin und PEDF im Serum und EDTA im Rahmen unseres Projektes verwendet. Das Durchschnittsalter betrug 46,7 Jahre ($\pm 11,5$, SD) und die mittlere Melanom-Tumordicke 2,19mm ($\pm 1,9$, SD). Bei 6 Patienten handelte es sich um einen unbekanntes Primarius. 12 Monate nach der Therapie konnte eine Progression der Erkrankung im Rahmen der Nachsorge bei 15 Patienten festgestellt werden. Der LDH-Wert lag vor dem Therapiebeginn bei 184,7 IU/L ($\pm 43,26$, SD) und nach Therapiebeginn bei 268,7 ($\pm 82,9$, SD). Arterielle Hypertonie war bei 59,2%, Adipositas bei 66,6%, Hypercholesterinämie bei 37% und Diabetes mellitus Typ 2 bei 29,6% der Patienten bekannt.

4.1.2. Gruppe 2- Malignes Melanom I-IV

Als Kontrollkohorte erfolgte die Untersuchung der Blutproben von Patienten mit malignem Melanom in den Stadien I-IV mit oder ohne Systemtherapie (n=18; Stadium I: n=6, Stadium II: n=4, Stadium III: n=4, Stadium IV: n=4). Das Durchschnittsalter war 65,3 ($\pm 17,57$, SD). Die gemessenen Werte für LDH und S-100 lagen bei 282,4 IU/L ($\pm 168,4$, SD) und 0,126 $\mu\text{g/l}$ ($\pm 0,143$, SD). Ein Patient im Stadium II sowie drei Patienten im Stadium III erhielten Interferon-Therapie, wobei im Stadium IV drei Patienten mit Ipilimumab und einer im Rahmen der MUTANOME Studie behandelt wurden. Weiterhin bei einem Patienten im Stadium I wurde anamnestisch ein Leiomyosarkoma und bei einem weiteren Probanden im Stadium III eine chronisch lymphatische Leukämie diagnostiziert. 55,5% hatte eine bekannte arterielle Hypertonie, 44,4% Adipositas, 38,8% Diabetes mellitus Typ II und 33,3% Hypercholesterinämie.

4.1.3. Gruppe 3-Psoriasis

Die Gruppe 3 diente ebenso als eine weitere Kontrollgruppe. Beide Proteine, Afamin und PEDF, wurden in Patienten mit Psoriasis vulgaris mit oder ohne Gelenkbeteiligung, vor dem Beginn einer Immuntherapie sowie nach 9 Monaten untersucht (n=18). Das Alter betrug 63,8 Jahre ($\pm 14,82$, SD). Vier Patienten erhielten Secukinumab (Cosentyx), acht Adalimumab (Humira), vier Apremilast (Otezla) und zwei Ustekinumab (Stelara). Bei fünf Probanden wurde eine Psoriasis Arthritis diagnostiziert, einer hatte eine isolierte Nagelbeteiligung und zwei zeigten eine Psoriasis pustulosa. Der PASI -Index wurde ebenso vor Therapiebeginn sowie nach 9 Monaten kalkuliert und eine Reduktion von 14,14 ($\pm 7,9$, SD) auf 6,28 ($\pm 8,4$, SD) konnte erreicht werden. Als Nebendiagnosen war eine arterielle Hypertonie bei 72,2%, Adipositas bei 66,6% und Diabetes mellitus Typ 2 sowie Hypercholesterinämie bei 38,8% der Patienten bekannt.

4.1.4. Gruppe 4-gesunde Patienten

Dabei handelte es sich um eine gesunde Kontrollkohorte, wobei die zwei Proteinmarker sowohl in Serum- (n=20) als auch in EDTA-Blutproben gesunder Patienten analysiert wurden (n=23). Das Alter betrug 32,4 ($\pm 3,7$, SD) und weitere Komorbiditäten lagen nicht vor.

4.2. Afamin und PEDF

4.2.1. Deskriptive Statistik

In dieser Arbeit erfolgte die quantitative Bestimmung von Afamin und PEDF bei Patienten mit malignem Melanom unter Immuntherapie (Gruppe 1) sowie als Kontrollgruppen, bei Patienten mit malignem Melanom in unterschiedlichen Stadien (Gruppe 2), bei Psoriasispatienten unter Immuntherapie (Gruppe 3) und bei gesunden Probanden (Gruppe 4). Bei den Probanden in der Gruppe 1 erfolgte eine Messung vor Therapiebeginn sowie mindestens drei Messungen im Verlauf der INF-Therapie. Darüber hinaus wurden die Proteinmarker in Gruppe 3 vor Einleitung einer Therapie sowie neun Monate später gemessen. Die Gruppe 1 sowie die Gruppe 4 mit gesunden Probanden wurden sowohl in Serum als auch in EDTA-Blutproben untersucht, um potenzielle signifikante Unterschiede zu identifizieren. Die Ergebnisse werden pro Gruppe in der folgenden Tabelle dargestellt.

	Gruppe 1- vor	Gruppe 1- nach	Gruppe 2	Gruppe 3- vor	Gruppe 3- nach	Gruppe 4
Serum-Afamin µg/ml	95,98 (±24,9 SD)	93,15 (±26,9 SD)	44,82 (±34,3 SD)	48,28 (±20,8 SD)	19,59 (±6,4 SD)	45,56 (±27,9 SD)
Serum-PEDF µg/ml	42,26 (±18,4 SD)	44,37 (±25,9 SD)	38,35 (±14,7 SD)	29,46 (±16,4 SD)	34,84 (±20,3 SD)	13,77 (±2,7 SD)

Tabelle 10: Afamin und PEDF im Serum in den Gruppen 1-4.

	Gruppe 1-vor	Gruppe 1-nach	Gruppe 4
EDTA-Afamin µg/ml	83,42 (±24 SD)	71,4 (±28,8 SD)	59,14 (±24,3 SD)
EDTA-PEDF µg/ml	44,76 (±25,8 SD)	42,7 (±18,8 SD)	15,43 (±3,2 SD)

Tabelle 11: Afamin und PEDF in EDTA in den Gruppen 1-4.

4.2.2. Gruppe 1

Bei der Analyse der Afamin- und PEDF-Werte in der Gruppe 1 in Melanompatienten im Verlauf der INF-Therapie konnten keine signifikanten Unterschiede für PEDF vor gegenüber im Verlauf der Therapie, wenn die Messungen von allen Visiten nach Therapiebeginn mitkalkuliert wurden ($p > 0,05$). Darüber hinaus weist die Art der getesteten Blutproben keinen Effekt auf die PEDF-Ergebnisse in dieser Gruppe auf. Bei Afamin konnte eine abfallende Tendenz ohne statistische Signifikanz in EDTA vor und nach Therapie festgestellt werden. Weiterhin wurde ein statistisch signifikanter Unterschied für Afamin nach Therapiebeginn zwischen den Serum- und EDTA-Proben detektiert ($p = 0,0012$) (Abb. 3).

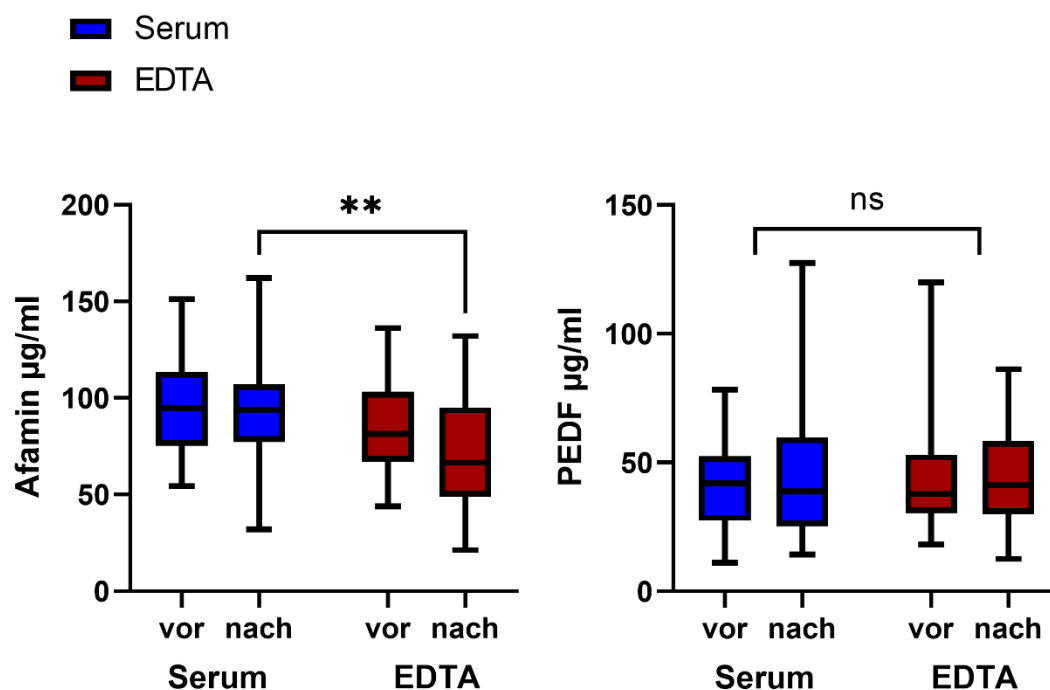


Abbildung 3: Darstellung der Werte für Afamin und PEDF im Serum und EDTA vor Therapiebeginn sowie nach Therapiebeginn über die gesamte Beobachtungszeit (nach 3, 6-9 und 12 Monaten), in Patienten mit malignem Melanom unter INF-Therapie (Gruppe 1). Die statistische Analyse wurde mit der zweifaktoriellen Varianzanalyse (two-way-ANOVA) und Mehrfachvergleichen nach Tukey durchgeführt. Das Signifikanzniveau ist mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ angegeben.

Um potenzielle Veränderungen in der Markerexpression während der INF-Therapie in Melanompatienten zu ermitteln, wurden nur die Ausgangswerte nach 12 Monaten mit den Messungen vor Therapiebeginn verglichen, wobei die Werte nach 3, 6-9 Monaten ausgeschlossen wurden. Dadurch ergab sich ein statistisch signifikanter Unterschied der Afaminkonzentration zwischen Serum und EDTA-Proben ($p = 0,002$, $p = 0,004$). Innerhalb der untersuchten Gruppen zeigten sich keine weiteren Veränderungen im Therapieverlauf für die zwei Proteinmarker, Afamin und PEDF (Abb. 4).

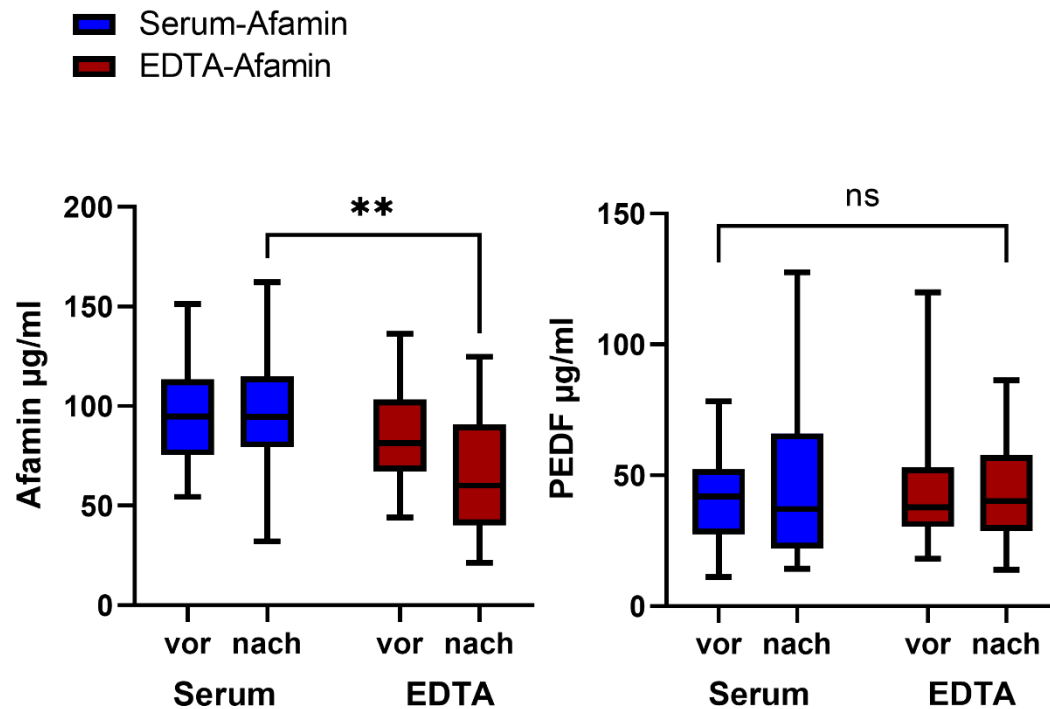


Abbildung 4: Darstellung der Werte für Afamin und PEDF im Serum und EDTA vor Therapiebeginn sowie 12 Monate nach Therapie (Visite 3) mit INF. Die statistische Analyse wurde mit der zweifaktoriellen Varianzanalyse (two-way-ANOVA) und Mehrfachvergleichen nach Tukey durchgeführt. Das Signifikanzniveau ist mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ angegeben.

In der Abbildung 5 werden die Afamin- und PEDF- Werte nach Therapie pro Visite dargestellt, um zusätzliche Differenzen pro Zeitfenster zu identifizieren. Ein signifikanter Unterschied in der Afamin-Expression zwischen Serum und EDTA wird nur bei der Visite nach 12 Monaten deutlich ($p=0,041$). Des Weiteren stieg der durchschnittliche PEDF-Gehalt, sowohl im Serum als auch in EDTA, nach drei Monaten (Visite 2) an, jedoch konnte keine statistische Signifikanz gezeigt werden.

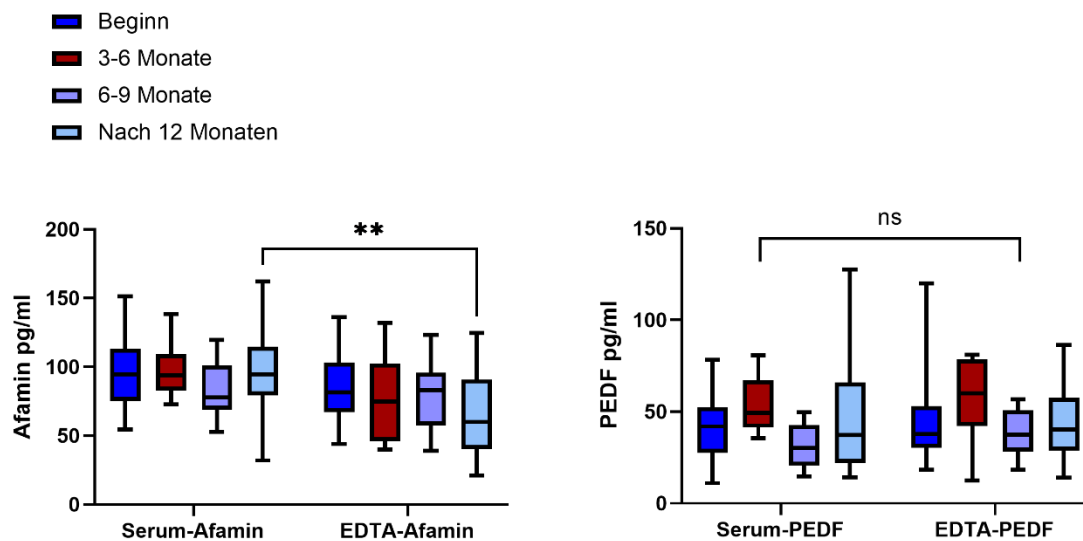


Abbildung 5: Afamin und PEDF im Serum und EDTA vor als auch nach Therapiebeginn, pro Visite, im Verlauf der Beobachtungszeit. Die statistische Analyse wurde mit der zweifaktoriellen Varianzanalyse (two-way-ANOVA) und Mehrfachvergleichen nach Tukey durchgeführt. Das Signifikanzniveau ist mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ angegeben.

Um die detektierten Veränderungen zu interpretieren, erfolgte die weitere Aufteilung der Gruppe 1 je nach Progression vor und nach Therapie. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Afaminkonzentration im Serum während der Therapie in Patienten ohne Progression ($p < 0,0001$). In der Abbildung 6 wurde eine eklatante Differenz in der Afaminexpression im Serum vor Therapie zwischen Patienten ohne und mit Progression detektiert ($p < 0,0001$). Darüber hinaus war der Afamin-Wert im Serum vor Therapiebeginn in Patienten ohne Progression der Erkrankung signifikant niedriger im Vergleich zu den entsprechenden EDTA-Werten vor Therapie sowohl in Patienten ohne als auch mit Progression der Erkrankung ($p = 0,0018$, $p < 0,0005$). Die Afaminkonzentration erwies sich signifikant höher im Serum nach Therapie in Patienten ohne Progression im Gegensatz zu der entsprechenden Expression in EDTA nach Therapie in Patienten mit Progression ($p < 0,0001$). In Patienten mit Progression wurde ein signifikant höherer Afamin-Wert nach Therapie im Serum im Vergleich zu EDTA festgestellt ($p = 0,0105$).

In der Abbildung 5 wird ein signifikanter Anstieg der PEDF-Expression im Serum in Patienten ohne Progression im Therapieverlauf dargestellt ($p = 0,02$). Des Weiteren wurde eine statistisch signifikante Differenz der PEDF-Konzentration nach Therapie mit einem höheren Wert im Serum von Patienten ohne Progression gegenüber der Gruppe mit Progression beobachtet ($p = 0,02$). Es zeigten sich keine deutlichen Differenzen für PEDF unter den EDTA-Blutproben je nach Progression.

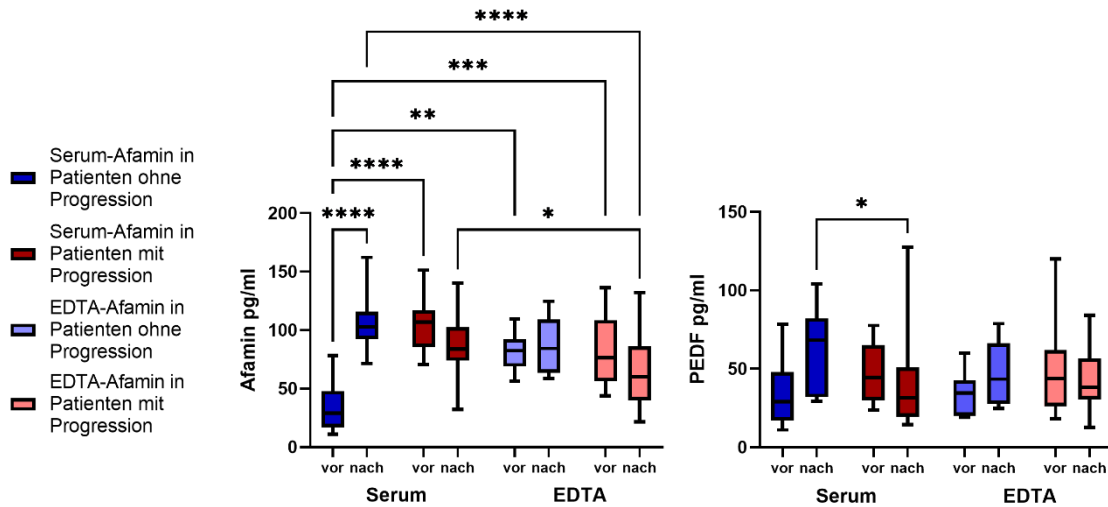


Abbildung 6: Afamin und PEDF im Serum und EDTA in der Gruppe 1 vor und nach Therapie mit INF je nach Progression im Verlauf der Beobachtungszeit. Die statistische Analyse wurde mit der zweifaktoriellen Varianzanalyse (two-way-ANOVA) und Mehrfachvergleichen nach Tukey durchgeführt. Das Signifikanzniveau ist mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ angegeben

Die Grafik 7 zeigt die Relation des Afamin- und PEDF-Gehalts zum LDH in Form eines Streudiagramms. Eine signifikante Korrelation mit dem LDH konnte weder im Serum noch in EDTA gezeigt werden ($p > 0,05$). Die Relation wird in der Abbildung durch die Regressionsgrade, blau für Serum und rot für EDTA, hervorgehoben. Der Korrelationskoeffizient nach Pearson lag bei -0,1026 für Serum-PEDF, -0,1058 für EDTA-PEDF, -0,1655 für Serum-Afamin und -0,05844 für EDTA-Afamin.

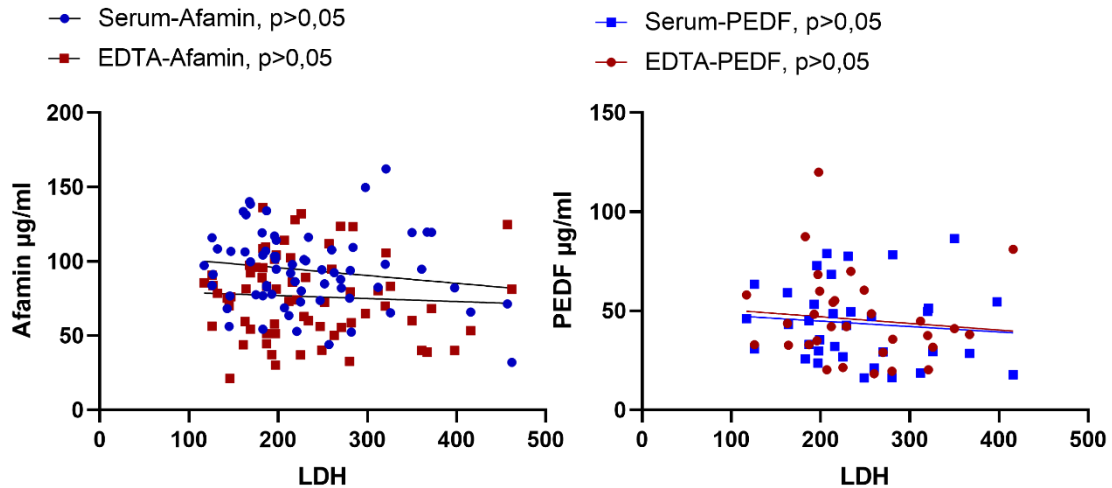


Abbildung 7: Korrelation von LDH mit Afamin sowie mit PEDF im Serum und EDTA in der Gruppe 1. Die statistische Analyse wurde mit dem zweiseitigem p-Wert und dem Korrelationskoeffizient nach Pearson durchgeführt.

Zusammengefasst, zeigte sich eine abfallende Tendenz für Afamin in der Gruppe 1 in EDTA sowie signifikante Unterschiede zwischen Serum- und EDTA-Blutproben, insbesondere unter den Werten nach Therapiebeginn. Ein eklatanter Anstieg wurde im Serum während der Beobachtungszeit in Patienten ohne Progression detektiert, wobei der niedrige Afaminwert vor Therapiebeginn in dieser Gruppe zu signifikanten Unterschieden gegenüber der Gruppe mit Progression sowie zwischen den getesteten Blutprobenarten geführt hat.

Des Weiteren wiesen die Ergebnisse ebenfalls auf eine abfallende Tendenz für PEDF in Serum ohne signifikante Differenzen zwischen Serum und EDTA auf. Darüber hinaus wurde eine signifikante Erhöhung der PEDF-Konzentration im Serum von Patienten mit progressiver Erkrankung nach Therapie bewiesen.

4.2.3. Gruppe 2

Die Gruppe 2 fasst Patienten mit malignem Melanom in unterschiedlichen Stadien um. Diese Kohorte dient als Vergleichsgruppe und die Messungen erfolgten aufgrund der Voruntersuchung in der Gruppe 1 im Serum. Ziel der komparativen Untersuchung lag in dem Vergleich der Patienten unter INF-Therapie mit einer Stichprobe von Patienten, die ebenfalls mit malignem Melanom diagnostiziert wurden, aber sich in unterschiedlichen Stadien befanden und je nach Stadium keine bzw. unterschiedliche Therapien erhielten. In der Abbildung 8 werden die Afamin- und PEDF-Konzentrationen pro Stadium dargestellt und die Unterschiede unter den Gruppen analysiert. Keine signifikanten Differenzen konnten zwischen Stadium I-IV detektiert werden.

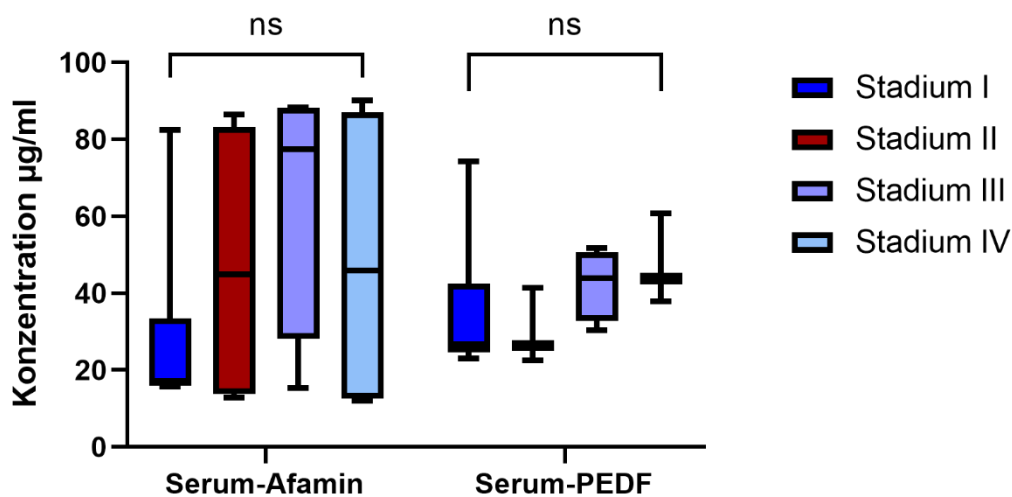


Abbildung 8: Afamin und PEDF im Serum in Patienten mit malignem Melanom in Stadium I-IV (Gruppe 2). Die statistische Analyse wurde mit der zweifaktoriellen Varianzanalyse (two-way-ANOVA) und Mehrfachvergleichen nach Tukey durchgeführt.

In dem Streudiagramm der Abbildung 9 wird der Zusammenhang von der Afamin- und PEDF-Konzentration in der Gruppe 2 und LDH sowie S-100 dargestellt. Eine signifikante positive Korrelation konnte zwischen PEDF und LDH bewiesen werden ($p=0,02$). Der Korrelationskoeffizient nach Pearson lag bei 0,5692 für PEDF und 0,1678 für Afamin. Die Hypothese, dass eine signifikante Korrelation zwischen S-100 und den untersuchten Markern vorlag, konnte nicht bestätigt werden ($p>0,05$). Der Korrelationskoeffizient nach Pearson war 0,09353 für Afamin und 0,3107 für PEDF. Die Relation wird durch die Regressionsgeraden sichtbar.

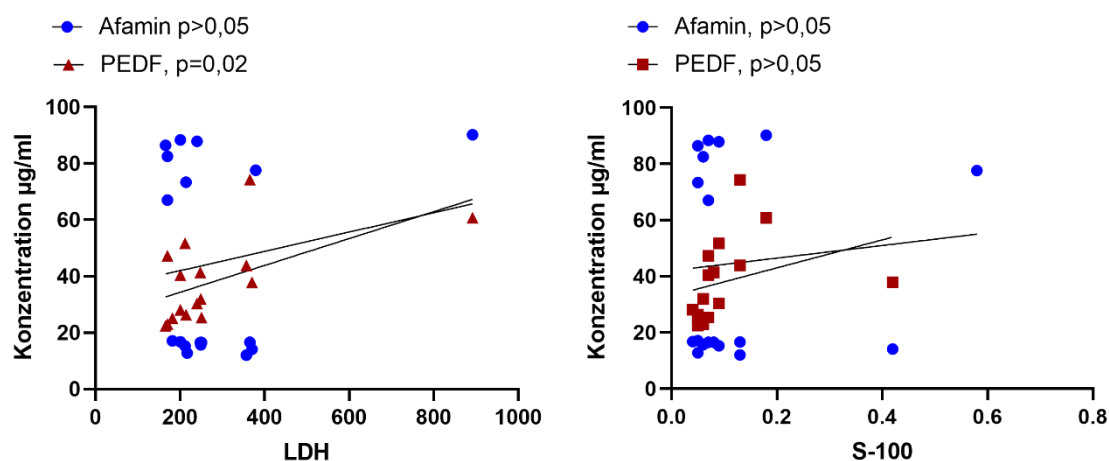


Abbildung 9: Korrelation von LDH und S-100 mit Afamin und PEDF im Serum und EDTA in Patienten mit malignem Melanom in unterschiedlichen Stadien (Gruppe 2). Die statistische Analyse wurde mit dem zweiseitigem p-Wert und dem Korrelationskoeffizient nach Pearson durchgeführt.

Die Patienten in Gruppe 2 wurden je nach Progression in weiteren Gruppen aufgeteilt und mit den entsprechenden Kohorten in der Gruppe 1 verglichen. In der Abbildung 10 wird die Analyse der Patienten in Gruppe 1 vor und nach Therapie sowie in der Gruppe 2, je nach Progression analysiert. Es handelte sich um quantitative Messungen von Afamin und PEDF im Serum. Die statistische Auswertung ergab einen signifikant niedrigeren Afamin-Wert in der Gruppe 2 ohne Progression im Vergleich zu den Konzentrationen nach Therapie in Patienten ohne ($p<0,0001$) als auch mit Progression ($p<0,0001$) sowie zu dem Afamin-Gehalt vor Therapie in Patienten mit Progression der Gruppe 1 ($p<0,0001$). Jedoch konnte keine signifikante Differenz zu dem Afamin vor Therapie in Patienten ohne Progression der Kohorte 1 nachgewiesen werden. Die Probanden mit bekannter Progression der Gruppe 2

zeigten einen signifikant niedrigeren Wert, verglichen mit Patienten der Gruppe 1 vor (p=0,0004) und nach Therapie mit Progression (p=0,0176) sowie nach Therapie ohne Progression (p=0,0005). Innerhalb der Gruppe 2 konnte ein deutlich höherer Durchschnittswert in Patienten mit Progression im Vergleich zu Patienten ohne Progression dokumentiert werden, jedoch ohne statistische Signifikanz.

Die Ergebnisse bezüglich der PEDF-Konzentration innerhalb der Gruppe 1 wurden bereits bei der Abbildung 5 diskutiert. In Patienten ohne Progression wurde ein statistisch signifikant niedriger PEDF-Gehalt in der Gruppe 2 im Vergleich zu den Werten der Gruppe 1 nach Therapie bei Patienten ohne Progression. Keine Signifikanz wurde in der Gruppe 2 in Bezug auf die Werte der Untergruppe mit progressiver Erkrankung.

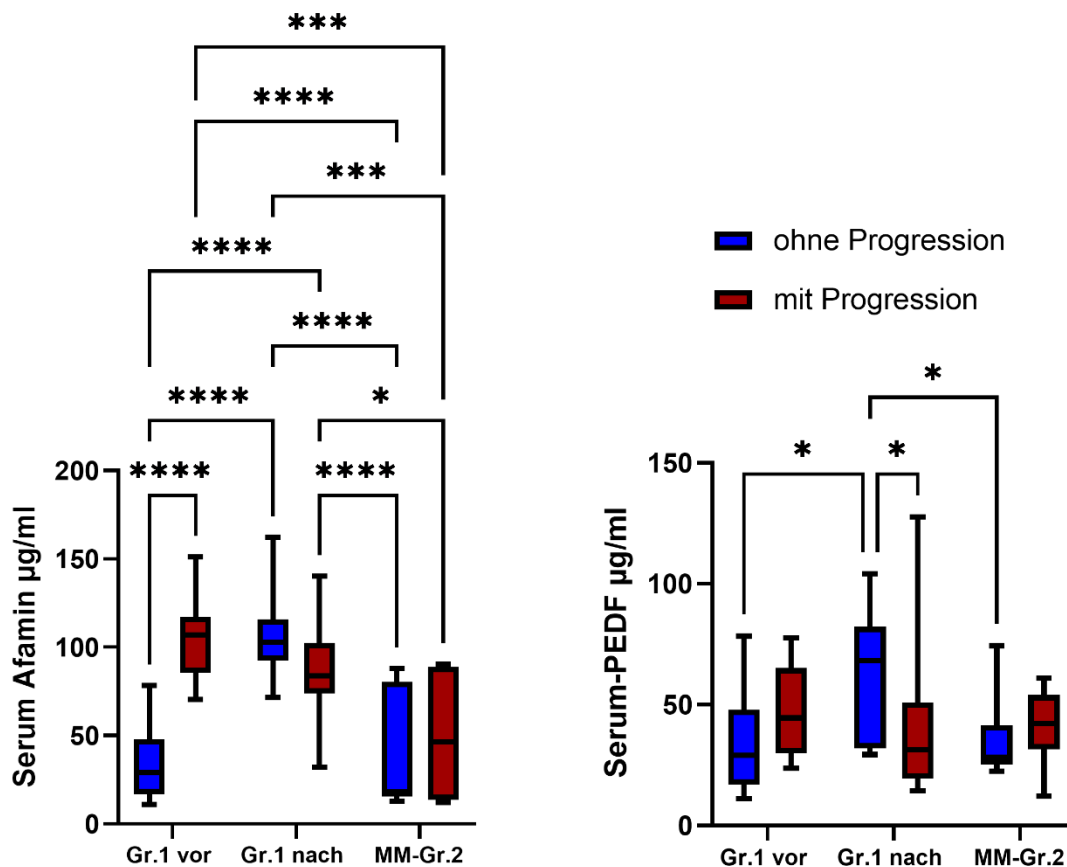


Abbildung 10: Vergleich der Afamin und PEDF-Konzentration im Serum in der Gruppe 1 vor und nach Therapie mit IFN sowie in der Gruppe 2. Die statistische Analyse wurde mit der zweifaktoriellen Varianzanalyse (two-way-ANOVA) und Mehrfachvergleichen nach Tukey durchgeführt. Das Signifikanzniveau ist mit * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p < 0,0001 angegeben.

In dem nächsten Diagramm (Abb.11) werden die Konzentrationen beider Proteinmarker in der Gruppe 2 mit den entsprechenden Werten in der Gruppe 1 vor und nach Therapie für die gesamte Beobachtungszeit sowie nur mit den Ausgangswerten dieser Kohorte, 12 Monate nach Therapiebeginn verglichen. Der Afamin-Gehalt in der Gruppe 2 zeigte einen signifikant niedrigeren Wert verglichen mit den Messungen sowohl vor als auch nach Therapie in der Gruppe 1 ($p < 0,0001$). Das Signifikanzniveau bleibt unverändert, wenn die Konzentrationen der Gruppe 1, nur 12 Monate nach Therapiebeginn in Betracht gezogen werden ($p < 0,0001$).

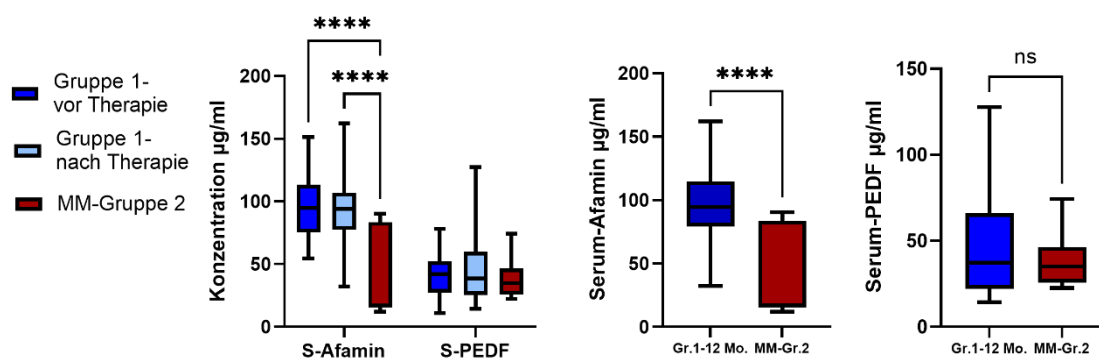


Abbildung 11: Vergleich der Afamin- und PEDF-Konzentration im Serum der Gruppe 1 vor und nach Therapie mit der Gruppe 2 (links) sowie der Werte der Gruppe 1 12 Monate nach Therapiebeginn mit der Gruppe 2 (mittig und rechts). Die statistische Analyse wurde mit der zweifaktoriellen Varianzanalyse (two-way-ANOVA) und Mehrfachvergleichen nach Tukey durchgeführt (links) sowie mit dem ungepaarten t-Test mit Welch-Korrektur (mittig, rechts). Das Signifikanzniveau ist mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ angegeben.

In Zusammenschau für die Gruppe 2, zeigen sich für Afamin im Serum keine signifikanten Unterschiede unter den Melanomstadien I-IV. Der Vergleich dieser Kohorte bestätigt die Ergebnisse aus der Gruppe 1 und weist ebenfalls auf eine niedrigere Afaminkonzentration in Patienten ohne Progression sowie einen Anstieg des Afamingehalts in Patienten mit Progression. Jedoch zeigt sich eine signifikant geringere Konzentration in Gruppe 2 verglichen mit der Gruppe 1 nach Therapie in Patienten mit Progression.

PEDF in der Gruppe 2 zeigt einen vergleichbaren Gehalt verglichen mit der Gruppe 1 vor Therapie sowohl für die Patienten mit als auch ohne Progression. Jedoch wurden Unterschiede mit der Gruppe 1 nach Therapie, insbesondere bei Patienten ohne Progression entdeckt, die durch den potenziellen Effekt der Immuntherapie erklärt werden könnten.

4.2.4. Gruppe 3

Diese Gruppe dient ebenfalls als Kontrollkohorte, indem Patienten mit einer immunologisch basierten Erkrankung, wie die Psoriasis vulgaris mit oder ohne begleitenden Gelenkbefall untersucht und mit der ersten Kohorte verglichen werden. Die quantitative Bestimmung von Afamin und PEDF erfolgte im Serum vor der Einleitung einer Immuntherapie sowie 9 Monate später.

Eine statistisch signifikante Reduktion der Konzentration ergab sich nur für Afamin in der Psoriasis Gruppe im Therapieverlauf ($p < 0,0001$), obwohl ein leichter Anstieg des PEDF-Werts nach Therapie in der folgenden Abbildung graphisch dargestellt wird (Abb.12).

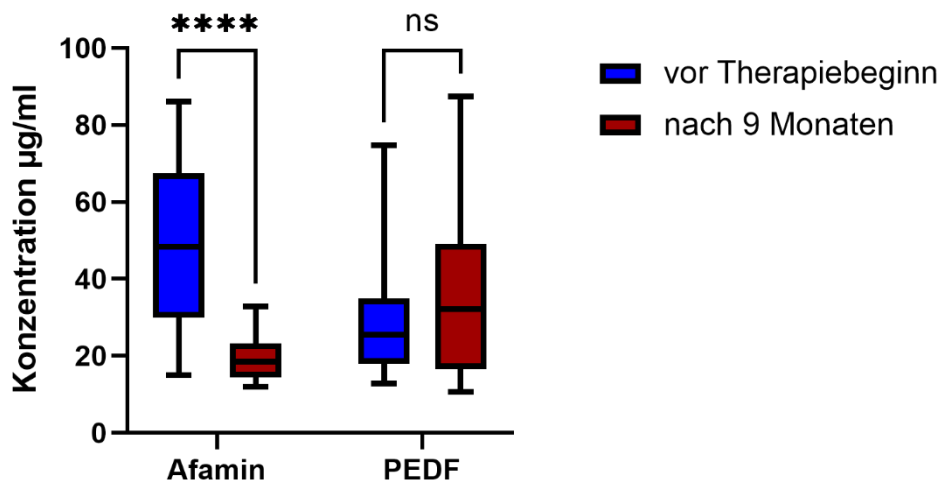


Abbildung 12: Vergleich der Afamin- und PEDF-Konzentration im Serum vor und neun Monate nach Immuntherapie in Patienten mit Psoriasis (Gruppe 3). Die statistische Analyse wurde mit der zweifaktoriellen Varianzanalyse (two-way-ANOVA) und Mehrfachvergleichen nach Tukey durchgeführt. Das Signifikanzniveau ist mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ angegeben.

Neben der Bestimmung der zwei Proteinmarker wurde der PASI-Index vor und nach Therapie mitkalkuliert, um den klinischen Zustand zu unterschiedlichen Zeitpunkten objektiv zu evaluieren und die festgestellten Veränderungen der Afamin- und PEDF-Konzentration adäquat interpretieren zu können. In dem Diagramm der Abbildung 13 zeigt sich die Reduktion des PASI-Index von 14,14 ($\pm 14,4$ SD) auf 6,28 ($\pm 8,4$ SD), wobei ein signifikanter Abfall für Afamin, von 48,29 $\mu\text{g/ml}$ ($\pm 20,8$ SD) auf 19,6 $\mu\text{g/ml}$ ($\pm 6,4$ SD) und eine ansteigende Tendenz für PEDF, von 29,47 ($\pm 16,4$ SD) auf 34,85 ($\pm 20,3$ SD) im Verlauf der eingeleiteten Therapie visualisiert werden können.

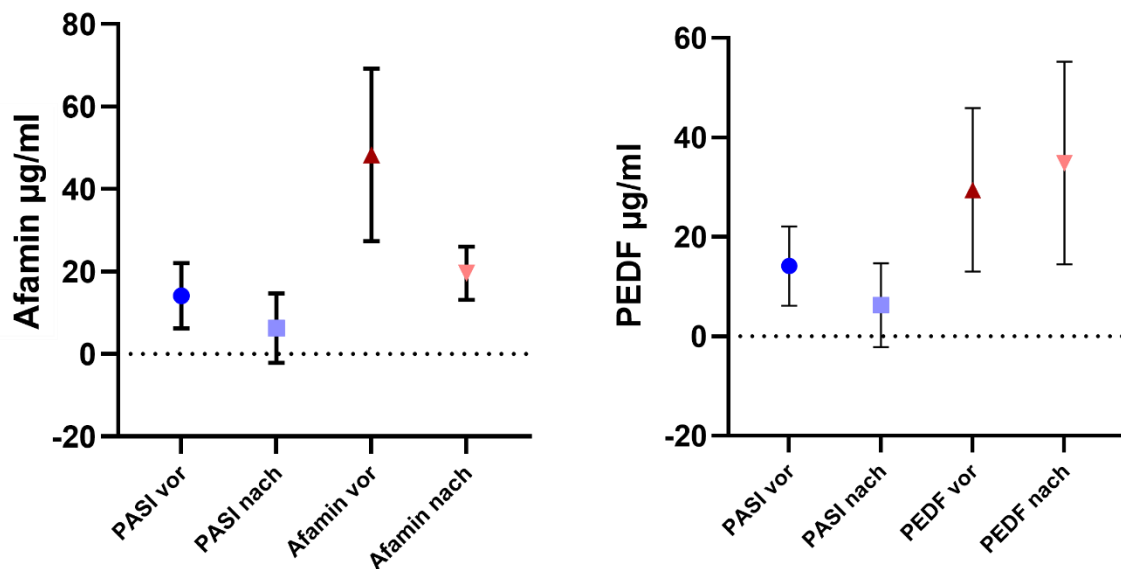


Abbildung 13: Mittelwerte der Konzentration von Afamin und PEDF im Serum sowie des PASI-Index mit Standardabweichung in Patienten mit Psoriasis vor und neun Monate nach Therapie (Gruppe 3).

Die Probanden der Gruppe 3 wurden je nach Gelenkbeteiligung in zwei weiteren Gruppen aufgeteilt und verglichen, um die potenzielle Rolle der untersuchten Marker zu verdeutlichen. In der statistischen Analyse der gesamten Kohorte, wie in der Abbildung 11 graphisch dargestellt, wurde die signifikante Reduktion im Verlauf der Therapie nachgewiesen. In der Abbildung 14 wird die signifikante Reduktion der Afaminkonzentration während der Beobachtungszeit in beiden Psoriasis-Gruppen ohne ($p=0,0005$) und mit Gelenkbeteiligung ($p=0,008$) präsentiert. Ein deutlicher, jedoch nicht signifikanter Unterschied wurde für die Afamin-Werte vor Therapiebeginn zwischen den Patienten ohne ($45,59 (\pm 21 \text{ SD})$) und mit Psoriasis Arthritis ($57,68 (\pm 20 \text{ SD})$) dokumentiert. Wie bereits für die gesamte Psoriasis-Kohorte präsentiert, wurden keine signifikanten Veränderungen innerhalb und zwischen den Gruppen für PEDF festgestellt.

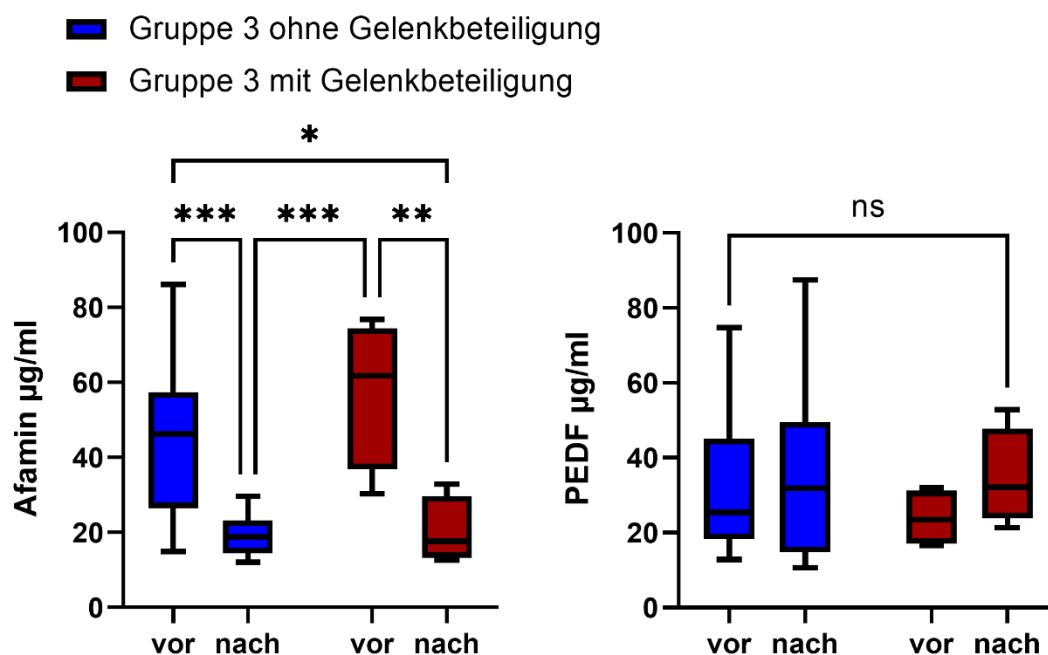


Abbildung 14: Vergleich der Afamin- und PEDF-Konzentration vor und nach Therapiebeginn in Psoriasispatienten je nach Gelenkbeteiligung. Die statistische Analyse wurde mit der zweifaktoriellen Varianzanalyse (two-way-ANOVA) und Mehrfachvergleichen nach Tukey durchgeführt. Das Signifikanzniveau ist mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ angegeben.

Die Abbildung 15 präsentiert signifikante Unterschiede in der Afamin- und PEDF-Expression in den Gruppen 1-3 nach Aufteilung der Kohorten je nach Vorliegen eines metabolischen Syndroms. Für das Vorliegen eines metabolischen Syndroms war das Vorhandensein von Adipositas und von mindestens zwei weiteren der folgenden Faktoren vorausgesetzt: arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus Typ 2, anamnestisch bekannte Hypercholesterinämie. Da die Kriterien für das metabolische Syndrom für die Probanden der Gruppe 4 nicht erfüllt wurden, wurde die vierte Kohorte bei dieser komparativen Auswertung nicht miteinbezogen. Die Grafik stellt nicht alle kalkulierte signifikante Differenzen, sondern nur relevante zwischen den Gruppen und in Bezug auf das metabolische Syndrom Ergebnisse, dar.

In Bezug auf den Afamin-Gehalt in der Gruppe 1 vor Therapiebeginn ergab sich ein signifikant höherer Wert, 84,072 ($\pm 21,4$ SD) gegenüber 115,48 ($\pm 17,1$), für die Patienten, bei denen das metabolische Syndrom eine bekannte Komorbidität war ($p=0,005$). Ein deutlicher Anstieg zeigte sich ebenfalls für die Werte nach Therapie in der Gruppe 1, jedoch ohne statistische Signifikanz. Darüber hinaus wurde ein statistisch signifikanter Unterschied für die Melanompatienten der Gruppe 2, 25,2 ($\pm 22,3$ SD) gegenüber 75,66 ($\pm 26,3$ SD), für die Untergruppe ohne beziehungsweise mit metabolischem Syndrom dokumentiert ($p<0,0001$). Des Weiteren ergab sich eine signifikante Differenz in der Gruppe 3 vor Therapiebeginn mit einem höheren Wert, in Patienten mit multiplen Risikofaktoren für das metabolische Syndrom, 30,33 ($\pm 12,7$ SD) im Gegensatz zu 62,6 ($\pm 13,48$ SD) ($p=0,04$). Weitere signifikante Unterschiede unter den untersuchten Afamin-Untergruppen werden graphisch in der Abbildung 15 dargestellt.

PEDF zeigte eine signifikant höhere Expression in der Gruppe 1 vor Therapie in Patienten mit (57,74 (± 16 SD)) gegenüber ohne (33,36 ($\pm 22,3$ SD)) metabolisches Syndrom ($p=0,01$). Des Weiteren wurde ein statistisch signifikant höherer PEDF-Titer für die Gruppe 1 mit metabolischem Syndrom sowohl vor als auch nach Therapie im Vergleich zu der Gruppe 3 ohne metabolisches Syndrom vor ($p<0,0001$, $p=0,0001$) und nach Therapie ($p=0,0002$, $p<0,0001$) detektiert. In der Psoriasis-Gruppe 3 konnten innerhalb beider Untergruppen vor ($p=0,01$) und nach Therapie ($p=0,02$) signifikante Unterschiede zwischen Probanden ohne und mit metabolischem Syndrom nachgewiesen werden. Weitere relevante signifikante Unterschiede unter den Untergruppen werden in der folgenden Grafik dargestellt.

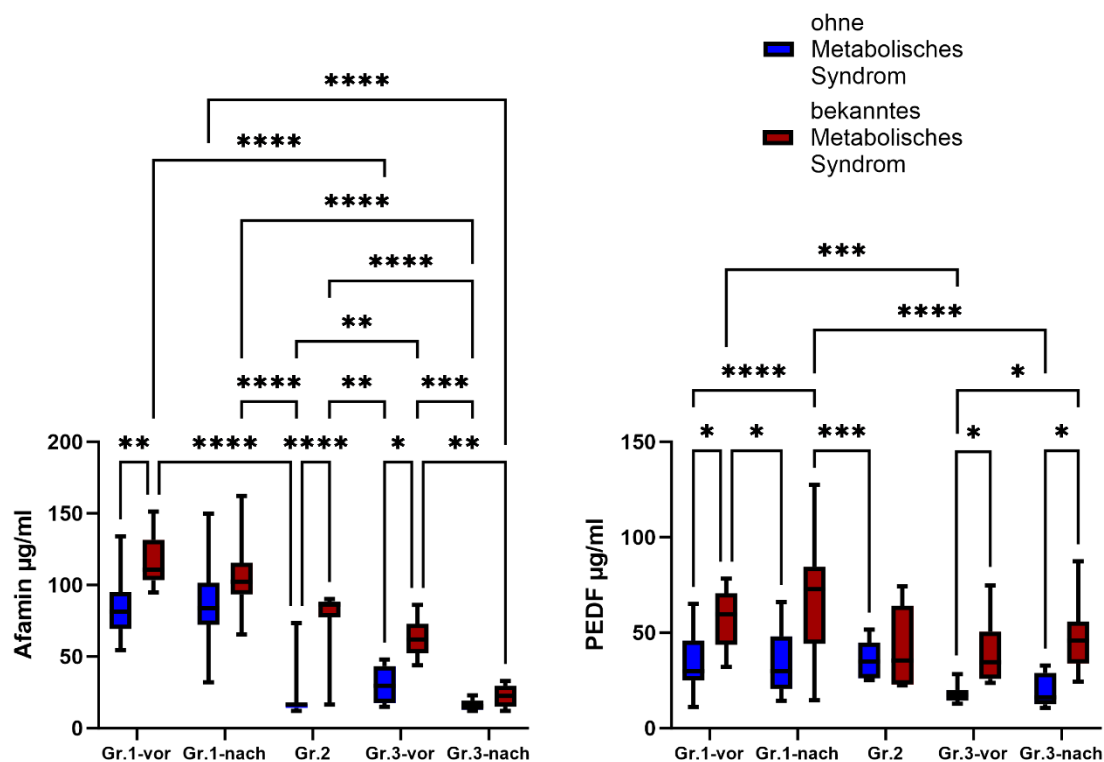


Abbildung 15: Darstellung der Afamin- und PEDF-Konzentration in den Gruppen 1-3 je nach Vorliegen eines metabolischen Syndroms. Die Werte der Gruppe 1 und 3 werden separat vor und nach Therapie präsentiert. In der Grafik werden nur relevante Signifikanzen abgebildet. Die statistische Analyse wurde mit der zweifaktoriellen Varianzanalyse (two-way-ANOVA) und Mehrfachvergleichen nach Tukey durchgeführt. Das Signifikanzniveau ist mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ angegeben.

Insgesamt zeigt sich für Afamin eine signifikante Reduktion der Konzentration im Verlauf der Therapie unabhängig von der Gelenkbeteiligung. Der Afamingehalt ist jedoch deutlich geringer für Patienten ohne metabolisches Syndrom für alle Gruppen 1-3. Allerdings zeigt die Gruppe 3 nach Therapie einen eklatanten Abfall im Vergleich zur Gruppe 1 und 2.

PEDF weist keine signifikanten Unterschiede vor und nach Therapie und in Bezug auf eine Gelenkbeteiligung auf. Eine signifikante Reduktion der PEDF-Konzentration wird in Patienten ohne metabolisches Syndrom auch hier für alle Gruppen 1-3 beobachtet.

4.2.5. Gruppe 4

Diese Kohorte dient als zusätzliche Kontrolle durch die Bestimmung der Afamin- und PEDF-Konzentration in gesunden Probanden sowohl im Serum als auch in EDTA. Die graphische Darstellung der Abbildung 16 beschreibt den Vergleich der Afamin- und PEDF-Expression in gesunden Probanden, wobei eine signifikante Differenz zwischen Serum und EDTA nur für Afamin nachgewiesen wurde ($p=0,03$).

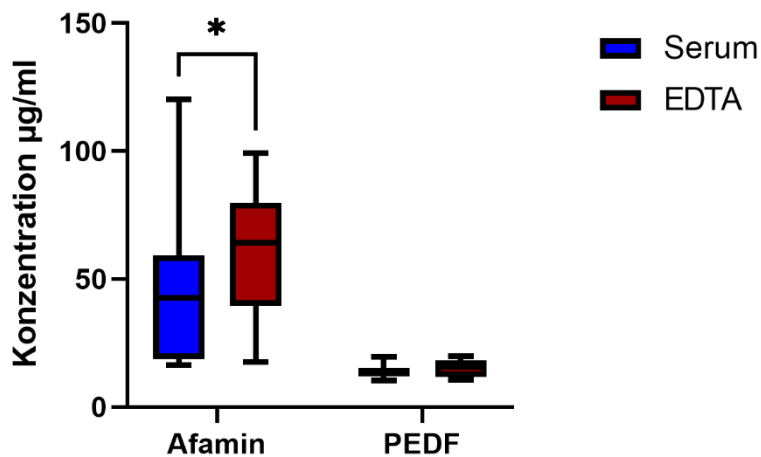


Abbildung 16: Vergleich der Afamin- und PEDF-Konzentrationen im Serum und EDTA in gesunden Probanden (Gruppe 4). Die statistische Analyse wurde mit der zweifaktoriellen Varianzanalyse (two-way-ANOVA) und Mehrfachvergleichen nach Tukey durchgeführt. Das Signifikanzniveau ist mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ angegeben.

Des Weiteren wurde die Gruppe 4 mit der Gruppe 1 vor und nach Therapiebeginn über die gesamte Beobachtungszeit verglichen (Abb.17). Der Afamin-Gehalt im Serum der Gruppe 4 (Healthy Donors) wies einen signifikant niedrigen Wert gegenüber den Werten der Gruppe 1 im Serum sowie EDTA, vor ($p < 0,0001$) als auch nach dem Therapiebeginn auf (Serum: $p < 0,0001$, EDTA: $p = 0,006$). Die Afaminkonzentration in EDTA der Gruppe 4 war ebenfalls signifikant niedriger nach der komparativen statistischen Analyse mit den Werten der Gruppe 1 vor Therapiebeginn im Serum ($p < 0,0001$) sowie in EDTA ($p = 0,02$) und nach der Therapie im Serum ($p < 0,0001$).

Die PEDF-Expression in der Gruppe 4 war signifikant niedriger in gesunden Probanden sowohl im Serum als auch EDTA gegenüber der Gruppe 1 sowohl vor und nach der Therapie ($p < 0,0001$).

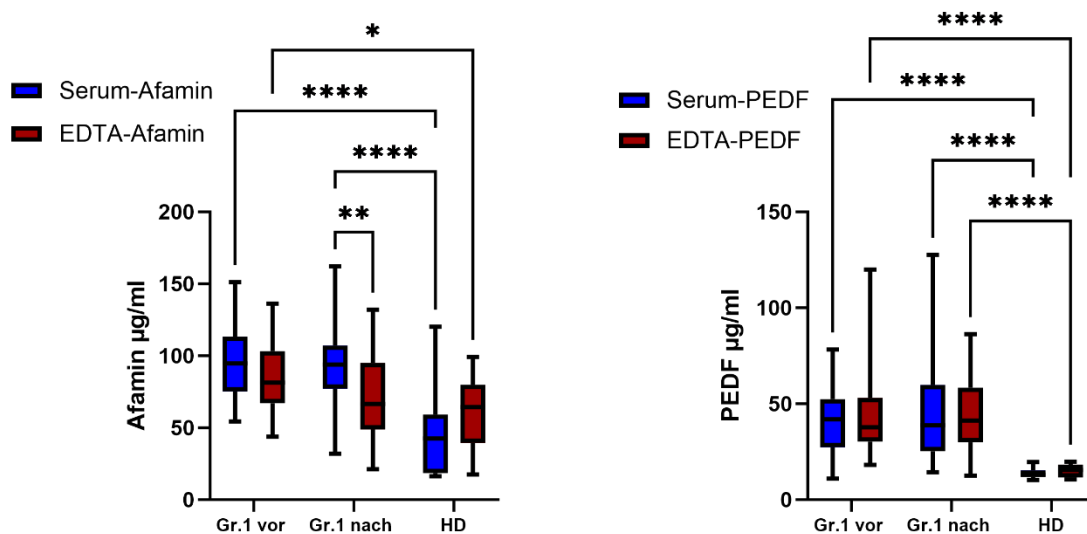


Abbildung 17: Vergleich der Afamin- und PEDF-Konzentration in der Gruppe 1 vor und nach Therapie mit der Gruppe 4 (Healthy Donors). Die statistische Analyse wurde mit der zweifaktoriellen Varianzanalyse (two-way-ANOVA) und Mehrfachvergleichen nach Tukey durchgeführt. Das Signifikanzniveau ist mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ angegeben.

Darüber hinaus erfolgte der Vergleich der Gruppe 4 mit den Ausgangswerten der Gruppe 1, 12 Monate nach Therapiebeginn. Sowohl das Serum- als auch das EDTA-Afamin der gesunden Probanden waren signifikant niedriger im Kontrast zu der entsprechenden Konzentration im Serum der Gruppe 1 nach einem Jahr ($p < 0,0001$). Das PEDF zeigte ebenfalls eine statistisch signifikant geringere Sekretion im Serum und EDTA in gesunden Probanden der Gruppe 4 im Gegensatz zu den entsprechenden Werten der Gruppe 1 im Serum 12 Monate nach Therapie mit Interferon ($p < 0,0001$) (Abb. 18).

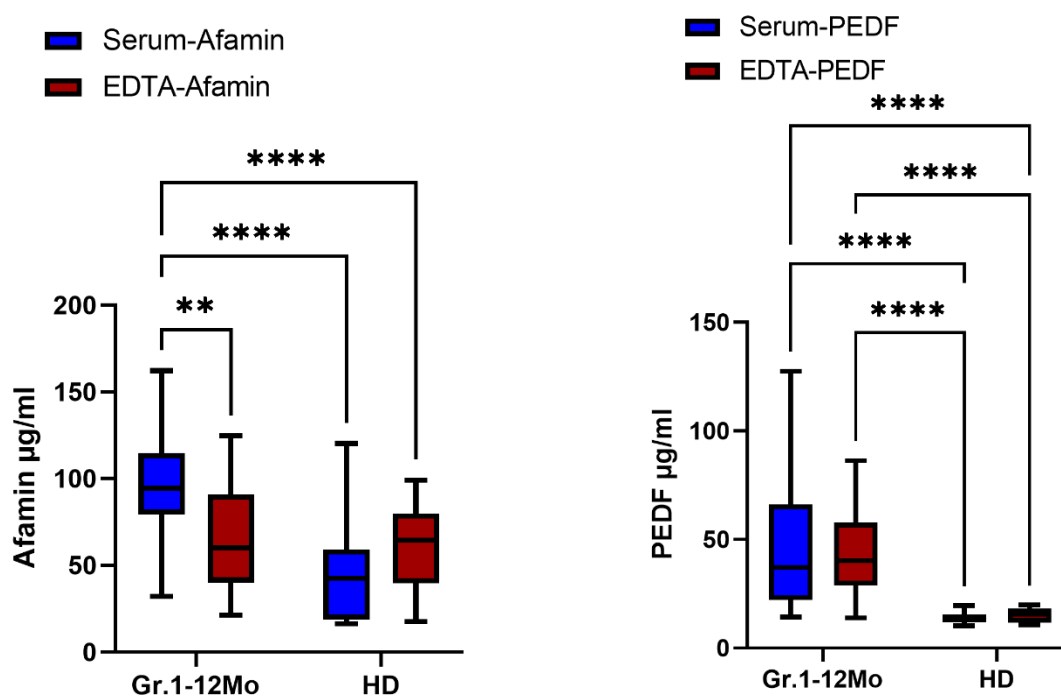


Abbildung 18: Vergleich der Afamin- und PEDF-Konzentration im Serum und EDTA in der Gruppe 1 nach 12 Monaten Therapie sowie in der Gruppe 4. Die statistische Analyse wurde mit der zweifaktoriellen Varianzanalyse (two-way-ANOVA) und Mehrfachvergleichen nach Tukey durchgeführt. Das Signifikanzniveau ist mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ angegeben.

Das Serum-Afamin der gesunden Probanden weist einen signifikanten Unterschied nur gegenüber den Werten in der Gruppe 3 nach Therapie auf ($p < 0,0001$), wobei das Serum-PEDF zeigt eine statistisch signifikante Differenz sowohl im Vergleich zu den Konzentrationen der Gruppe 3 vor ($p = 0,02$) als auch nach Therapie ($p = 0,0015$) (Abb.19).

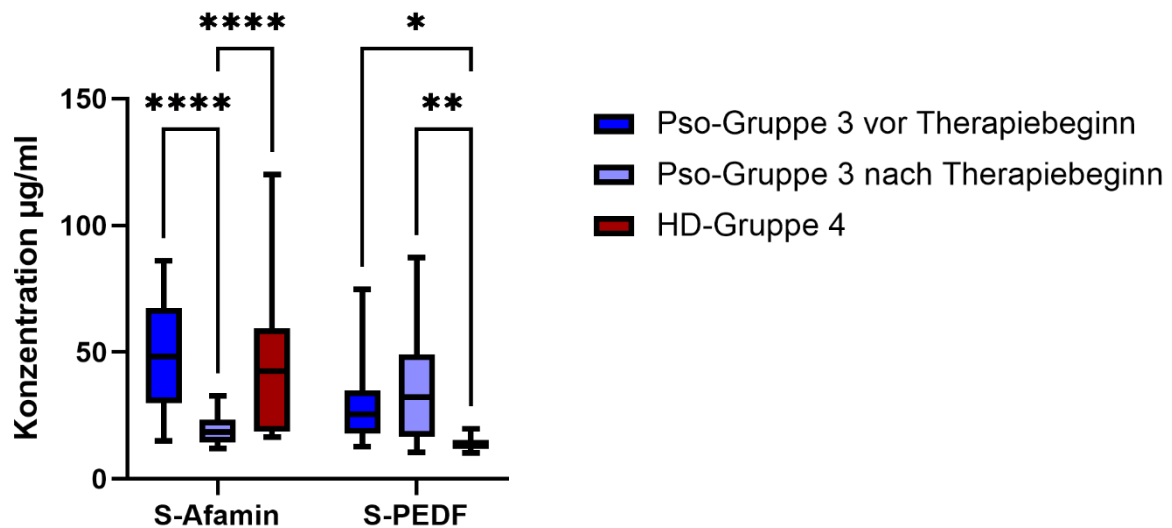


Abbildung 19: Vergleich der Afamin- und PEDF-Konzentration im Serum in der Gruppe 3 bei Psoriasispatienten vor und 9 Monate nach Therapiebeginn mit der Gruppe 4 bei gesunden Probanden. Die statistische Analyse wurde mit der zweifaktoriellen Varianzanalyse (two-way-ANOVA) und Mehrfachvergleichen nach Tukey durchgeführt. Das Signifikanzniveau ist mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ angegeben.

In der Abbildung 20 wird die Afamin- und PEDF-Expression im Serum und deren Signifikanzen in den vier untersuchten Gruppen 1-4 zusammengefasst. Die Ergebnisse sind bereits in den einzelnen Gruppen präsentiert und analysiert.

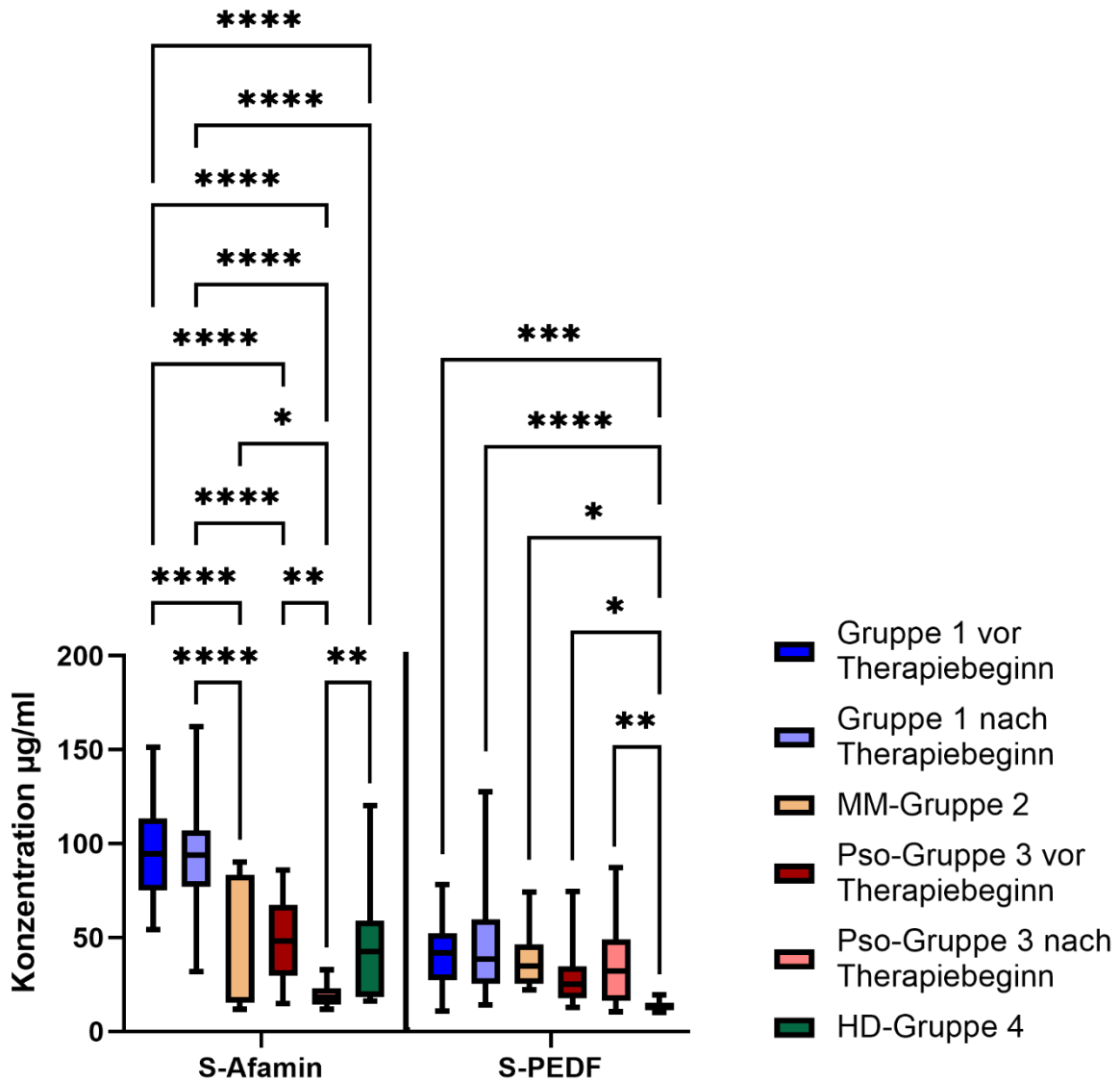


Abbildung 20: Vergleich der Afamin- und PEDF-Konzentration im Serum in den vier untersuchten Gruppen. In den Gruppen 1 und 3 werden zusätzlich die Werte vor und nach Therapie dargestellt. Die statistische Analyse wurde mit der zweifaktoriellen Varianzanalyse (two-way-ANOVA) und Mehrfachvergleichen nach Tukey durchgeführt. Das Signifikanzniveau ist mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ angegeben.

Zusammengefasst zeigt die Gruppe 4 für Afamin deutlich höhere Konzentrationen in EDTA im Vergleich zu Serumproben. Die Afaminexpression in gesunden Probanden blieb

signifikant geringer im Vergleich zur Gruppe 1-3, ausgenommen der Untergruppe 3 nach Therapie. In ähnlicher Weise ist der PEDF-Gehalt in der Gruppe 4 signifikant niedriger im Vergleich zur Gruppe 1-3 und keine Unterschiede manifestierten sich bezüglich der Blutprobenart.

5. Diskussion

5.1. Afamin und PEDF in onkologischen Patienten

Das maligne Melanom ist eine komplexe Entität, die durch die Diversität ihrer biologischen Charakteristika und des klinischen Verhaltens gekennzeichnet ist. Multiple klinische Merkmale, histopathologische Befunde und genetische Faktoren sind bereits für die Vorhersage des Ansprechens auf diverse Therapien sowie des Überlebens identifiziert. Melanome sind für die Mehrheit der durch Hautkrebs verursachten Todesfälle verantwortlich. Sowohl genetische Faktoren als auch die Exposition gegenüber ultravioletter Strahlung spielen eine Rolle bei der Entstehung von Melanomen. In fortgeschrittenen Stadien diagnostizierte Melanome weisen eine hohe Metastasierungsrate auf, jedoch stellen Melanome, die früh diagnostiziert und behandelt werden, ein geringes Risiko für Mortalität dar. Insbesondere die Identifizierung von Patienten mit erhöhtem Metastasierungsrisiko, die von frühen adjuvanten Therapien profitieren könnten, ist von entscheidender Bedeutung. Die Genauigkeit klassischer klinischer und histologischer Variablen, einschließlich der Breslow-Dicke, des Vorhandenseins von Ulzerationen und des Lymphknotenstatus, ist in manchen Fällen nicht adäquat, um solche Personen zu identifizieren. Daher besteht ein Bedarf an der Entwicklung zusätzlicher prognostischer Melanom-Biomarker, die die frühzeitige Stratifizierung und Erkennung von Melanompatienten verbessern und Untergruppen mit hohem Risiko zuverlässig identifizieren können, mit dem Ziel, wirksame personalisierte Therapien bereitzustellen. In dieser Arbeit wird die Afamin- und PEDF-Expression als potenzielle Biomarker in Patienten mit malignem Melanom sowie der Effekt einer Immuntherapie mit Interferon untersucht. Darüber hinaus wird der Effekt diverser Faktoren, wie die Art der Blutprobe, die Progression der Erkrankung oder das Vorliegen eines metabolischen Syndroms auf den Afamin und PEDF-Gehalt recherchiert und die Ergebnisse werden mit anderen Patientenkohorten, sowohl mit Melanompatienten in unterschiedlichen Stadien als auch mit gesunden Probanden, beziehungsweise mit Patienten mit immunologisch basierten Erkrankungen, wie die Psoriasis, verglichen.

5.1.1. Afamin

Afamin wurde 1994 von Lichtenstein et al. entdeckt, als viertes Mitglied der Albumin-Genfamilie (97). Trotz intensiver Forschung in den letzten 20 Jahren ist unser Wissen über die physiologischen oder pathophysiologischen Funktionen von Afamin immer noch sehr begrenzt. Die meisten veröffentlichten Arbeiten konzentrierten sich bisher auf die molekulare und biochemische Charakterisierung von Afamin und auf Studien über Proteomik und epidemiologische Ansätze zur Abklärung pathophysiologischer Funktionen. Afamin ist ein Vitamin E-bindendes Glykoprotein, das hauptsächlich in der Leber exprimiert und in den Blutkreislauf ausgeschieden wird. Neben dem reichlichen Vorkommen von Afamin im humanen Plasma wurden hohe Konzentrationen von Afamin in anderen menschlichen Körperflüssigkeiten wie z. B. in zerebrospinalen, ovariellen Follikel- und Samenflüssigkeiten beschrieben (100, 110, 124). Als weitere Afamin-exprimierende Organe wurden das Gehirn, die Niere, die Hoden und die Eierstöcke detektiert. Jedoch bleibt es strittig, ob das in diesen Organen exprimierte Afamin zum zirkulierenden Plasma-Afamin beiträgt und welche physiologische Rolle Afamin in diesen Organen spielt.

Zirkulierende Afaminkonzentrationen wurden bei verschiedenen malignen Tumoren untersucht, darunter der Ovarien, der Harnblase, des gastrointestinalen Traktes, des Uterus, der Brust sowie der Schilddrüse (103,105,106, 125,126). Melmer et al untersuchten die Afaminkonzentration im Plasma von Patientinnen mit Ovarialkarzinom vor Therapie, in Tumorlysaten sowie 6 Monate nach Chemotherapie. Das prätherapeutische Afamin korrelierte signifikant mit den FIGO-Stadien und war niedriger bei Vorhandensein von Metastasen und schlecht differenziertem Ovarialkarzinom als in Patienten, die auf die Therapie ansprachen. Der Mittelwert für das Afamin im Plasma vor Therapie war 40.5 mg/L. Afamin \geq 48,0 mg/l war im Vergleich zu Afamin $<$ 48,0 mg/l, mit einem niedrigeren Risiko für Rezidive assoziiert. Posttherapeutisches Afamin \geq 48 mg/l korrelierte positiv mit dem Gesamtüberleben sowie dem progressionsfreien Überleben und war bei Non-Respondern niedriger als bei Respondern. Somit stieg Afamin posttherapeutisch nur bei Respondern auf die Werte gesunder Kontrollen an. Afamin in Tumorlysaten war bei schlecht differenziertem OC niedriger. Höhere Afaminkonzentrationen in Tumorlysaten waren mit einem erhöhten Gesamtüberleben assoziiert (127). Ein Vergleich bezüglich der Art der Blutprobe wurde bisher nicht durchgeführt.

Unsere Ergebnisse sprechen für eine höhere Expression für Afamin sowohl im Serum als auch in EDTA in Melanompatienten verglichen zu gesunden Probanden. Diese eklatante Differenz könnte auch auf den Effekt der durchgeführten INF-Therapie zurückgeführt werden. Außerdem zeigt sich ein signifikanter Anstieg der Afaminkonzentration nur bei Patienten ohne Progression, wobei eine deutliche Senkung bei Patienten mit Progression

beobachtet wurde. Diese Ergebnisse unterstützen einerseits die Hypothese für den potenziellen Effekt von Immunmodulatoren auf die Afaminexpression und andererseits die Theorie für eine mögliche protektive Wirkung von Afamin gegenüber der Entstehung von Malignitäten.

Aktas et al. analysierten die Expression drei Serummarker, Mesothelin, L1CAM (L1 cell adhesion molecule) und Afamin. Die Gruppe bestimmte die Konzentration der Proteinmarker in 154 Patientinnen mit Ovaralkarzinom vor der Therapie und in 84 nach platinbasierter Chemotherapie mittels ELISA. Afamin zeigte zu allen untersuchten Zeitpunkten keine Korrelation mit Parametern, wie das FIGO-Stadium, Alter, Progress, CA125-Spiegel oder histologische Differenzierung (128). Afamin und Apolipoprotein A-IV wurden ebenfalls von Diepling et al als potenzielle prognostische Biomarker recherchiert. Die Afamin-Konzentrationen sanken von einem Medianwert von 70,7 mg/l bei gesunden Probanden auf 65,2 mg/l bei Patientinnen mit benignen gynäkologischen Erkrankungen auf 56,0 mg/l bei Patienten mit Ovarialkarzinom. Die relativ geringe Sensitivität weist jedoch deutlich darauf hin, dass Afamin und ApoA-IV allein als diagnostische Marker für Ovarialkarzinom nicht ausreichend geeignet sind. Afamin trägt jedoch unabhängige diagnostische Informationen zu CA125 bei und könnte dadurch potenziell als zusätzlicher Marker für CA125 dienen (103). Jackson et al. quantifizierte CRP, Afamin und CA-125 in 303 Proben, von gesunden Probanden und Patientinnen mit Ovarialkarzinom, sowie in 121 Proben von 9 Patientinnen bis zum Auftreten eines Rezidivs. Die Referenzwerte waren <10 mg/L, 64-83 g/L und <35 units/mL für CRP, Afamin und CA-125. Im Vergleich zu der gesunden Kontrollgruppe wurden signifikant niedrigere Afamin-Konzentrationen nur bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom dokumentiert, sowohl bei Erstdiagnose als auch bei fortgeschrittener Erkrankung beziehungsweise Rezidiv oder während der Therapie (129). Eine signifikante Differenz der Afamin-Konzentration vor und nach Therapie hing bei unseren Untersuchungen entscheidend von der Progression der Erkrankung ab. Eine signifikant niedrigere Afaminkonzentration wurde vor Therapie in der Untergruppe ohne Progression im Vergleich zu Probanden mit Progression detektiert. Dennoch stieg die Afaminexpression in dieser Gruppe signifikant während der Therapie an. Im Gegenteil sind die Werte nach Therapie in Patienten mit Progression niedriger. Patienten mit Progression weisen einen höheren Afamin-Gehalt vor Therapie auf und andererseits einen niedrigeren Ausgangswert nach Therapie, der durch den potenziellen Effekt der INF-Therapie auf die Afaminkonzentration sowie durch das Fortschreiten der Erkrankung erklärt werden könnte. Diese Interpretation wird weiterhin durch den signifikanten Unterschied zwischen den Melanompatienten der Gruppe 2 in unterschiedlichen Stadien und der Afaminkonzentration nach INF-Therapie in der Gruppe 1 sowohl im Serum als auch in EDTA unterstützt.

In einer weiteren Studie wurde das Afamin in 106 Patienten mit Mammakarzinom quantitativ bestimmt und nach einer Beobachtungszeit von 69,0 ($\pm 27,2$) Monaten nachkontrolliert. Es gab keine signifikante Korrelation zwischen Afamin und anderen klinisch-pathologischen Parametern. Bei der multivariaten Analyse hatte Afamin keinen aussagekräftigen prognostischen Wert und war nicht signifikant bezogen auf die Fünf-Jahres-Gesamtüberlebensrate (106). Eine weitere Arbeitsgruppe recherchierte neue Biomarker für die Früherkennung von Mammakarzinom mittels Serum protein profiling per SELDI-TOF MS (surface enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry) in 68 Frauen mit Mammakarzinom bis drei Jahre vor der Erstdiagnose sowie in einer Kontrollkohorte. Afamin war signifikant erhöht im Vergleich zu der gesunden Kontrollgruppe (130). Des Weiteren wurde die Rolle von Afamin in dem Therapieansprechen und der Entwicklung von Resistenzen nach neoadjuvanter Chemotherapie in einer anderen Studie erforscht. Das Afamin ermöglichte eine genauere Unterscheidung zwischen Respondern und Non-Respondern mit einer Sensitivität von 83,3 % und einer Spezifität von 100 %. Sie postulierten, dass dieses Protein eine wichtige biologische Funktion beim Mammakarzinom besitzt. Dadurch könnte das Afamin zur effektiven, frühzeitigen Diagnose und Behandlung von Patientinnen mit Brustkrebs und insbesondere zur Vorhersage des Ansprechens auf neoadjuvanter Chemotherapie (NAC) beitragen. Die qualitative Analyse bestätigte, dass drei Proteine (AFM, SERPINA1, APOD) mit der NAC-Resistenz korrelierten, da sie in den Seren von Non-Respondern identifiziert und quantifiziert wurden. Die Zunahme der Apolipoprotein D-Expression und die Abnahme der Afamin- und SERPINE 1 (Serpineproteinase-Inhibitor) - Expression ist somit eine Signatur, die signifikant mit der Therapieresistenz zusammenhängt. (131).

In unserer Arbeit könnten die niedrigere Expression in Patienten ohne Progression vor der Therapie sowie der signifikant höhere Anstieg der Afaminkonzentration in dieser Untergruppe nach Therapieende im Vergleich zu dem höheren initialen Wert vor und die Senkung des Afamingehalts im Therapieverlauf in der Untergruppe mit Progression Hinweise zum Ansprechen oder zum Metastasierungspotenzial bei dem malignen Melanom liefern.

Choi et al, diskutieren den prognostischen Wert von Proteinmarkern für die Progression von kolorektalem Adenom zu Karzinom. Weiterhin zeigen sie, dass Afamin, unter anderen Proteinmarkern, in Patienten mit kolorektalem Karzinom im Vergleich zum Adenom herunterreguliert ist (125). Chen et al analysierten Urinproben von 156 Patienten mit Leistenhernie, Harnblasenkrebs oder Harnwegsinfektion/Hämaturie mittels Multiplex-Quantifikation und bestimmten die Konzentrationen von 63 Proteinen. 17 Proteine, darunter auch Afamin, wurden in Patienten mit Harnblasenkrebs überexprimiert. Ein Panel aus sechs Peptiden (Afamin, Adiponektin, Complement C4 gamma chain, Apolipoprotein A-II precursor, Ceruloplasmin, Prothrombin) mit einem positiven prädiktiven Wert von 76,3% und einem

negativen prädiktiven Wert von 77,5% wurde generiert, um Patienten mit Blasenkrebs von anderen benignen Erkrankungen der Harnblase zu identifizieren (126). Unsere Daten zeigten signifikante Unterschiede zwischen der Melanom-Gruppe 2 und der Melanom Gruppe 1 nicht nur nach INF-Therapie, sondern auch vor Therapie. Dieses Ergebnis könnte durch die Diversität der Gruppe 2 im Vergleich zur Gruppe 1, die Patienten im Stadium III befasste. Des Weiteren wurden die Blutproben der Gruppe 1 bei -80 über 10 Jahre gelagert, bevor sie für die vorliegende Studie verwendet wurden. Insbesondere Proben, die mehrfach aufgrund von technischen Fehlern und multiplen Experimenten gemessen werden mussten, zeigten Zeichen erhöhter Viskosität und Inhomogenität, wodurch es zu praktischen Schwierigkeiten bei der Durchführung der Versuche kam. Jedoch wurde eine verminderte Afamin-Expression in gesunden Probanden der Gruppe 4 im Vergleich zu beiden Melanom-Gruppen nachgewiesen. Ein weiterer Faktor, der in Betracht gezogen werden muss, ist das jüngere Alter und die fehlenden Komorbiditäten, wie z.B. das Vorliegen von Kriterien für das metabolische Syndrom, in der Gruppe 4, wodurch die niedrigere Afamin-Sekretion bei den gesunden Probanden erklärt werden könnte. In der Literatur variiert die berichtete Afaminkonzentration bei gesunden Probanden von 58,7-70,7µg/ml, wobei ein Wert von 45,56µg/ml im Serum und 59,14µg/ml im EDTA in unserer Studie gemessen wurde (103,125,129,130).

Die Studie von Shen et al. zeigte die Abnahme von Afamin im Serum von 25 Patienten mit papillärem Schilddrüsenkarzinom und non-¹³¹I aviden Lungenmetastasen im Vergleich zu Patienten mit ¹³¹I aviden Lungenmetastasen. Die Schilddrüse ist ein einzigartiges endokrines Organ, das Wasserstoffperoxid für die Bildung von Schilddrüsenhormonen benötigt. Die H₂O₂-Produktion in der Schilddrüse wird durch die duale Oxidase 2 (DUOX2) reguliert. Schilddrüsenzellen enthalten Antioxidantien, um sie vor H₂O₂-vermittelten oxidativen Schäden zu schützen, und Veränderungen in diesem Gleichgewicht können zu einer Funktionsstörung der Schilddrüsenzellen führen. Afamin hat eine Bindungsaffinität sowohl für α-Tocopherol als auch für γ-Tocopherol, zwei der wichtigsten Formen von Vitamin E. Es wurde gezeigt, dass Vitamin E eine entscheidende Rolle beim Schutz vor oxidativen Schäden und Krankheiten spielt. Dieser Mechanismus könnte ebenfalls für das maligne Melanom und bei weiteren Malignomen als potenzieller Pathomechanismus zur Abklärung der Veränderungen der Afamin-Konzentration in Betracht gezogen werden. Weiterhin wird die niedrige Konzentration von Afamin in Patientinnen mit Ovarialkarzinom und papillärem Thyroidkarzinom sowie die hohe Inzidenz von dem Schilddrüsenkarzinom in Frauen diskutiert. Angesichts der wesentlich höheren Inzidenzraten und der proliferativen Wirkung von Östrogen auf die Schilddrüsenzelle wird dadurch eine hormonelle Ätiologie für die Entstehung vom Schilddrüsenkrebs vermutet (132). Darüber hinaus etablierten Shen et al Afamin-Überexpressions-Modelle und berichteten, dass Afamin beim papillären

Schilddrüsenkarzinom den Glykostoffwechsel durch Stimulation von Schlüsselenzymen hochregulieren könnte (105). Für die weitere Analyse unserer Ergebnisse wurde das Vorliegen eines metabolischen Syndroms und dessen Effekt, insbesondere bei Psoriatikern, untersucht. Bei eklatanten Unterschieden in der Gruppe 3, wurden die Melanom-Gruppen 1 und 2 ebenfalls in entsprechenden Untergruppen aufgeteilt, um den Effekt des metabolischen Syndroms auf die Afaminkonzentration zu ermitteln. Dadurch konnten signifikante Differenzen zwischen der Gruppe 2 und 1 hervorgehoben werden, die bisher nicht klar dargestellt werden konnten. Dies betont die Signifikanz multivarianter Parameter und Komorbiditäten in der Exploration von Afamin als möglicher Biomarker sowohl in malignen als auch in benignen oder inflammatorischen Entitäten.

5.1.2. PEDF

Pigment Epithel-Derived Factor; kodiert von SERPINF1 und auch bekannt als EPC1 und Caspin, ist ein Serpin mit mehreren biologischen Wirkungen. Die Ära der PEDF-Forschung begann um 1990 mit der Entdeckung, dass PEDF ein Differenzierungsfaktor für Retinoblastomzellen ist. Das PEDF-Protein wurde aus Medien isoliert, die durch kultivierte retinale Pigmentepithelzellen konditioniert wurden, wo der Name herkommt (133). Anschließend wurde berichtet, dass die Expression von SERPINF1 in ruhenden jungen Fibroblasten erhöht ist und speziell mit einem G0-Wachstumsstopp assoziiert ist. Die PEDF-Expressionsniveaus sind in seneszenten Fibroblasten vernachlässigbar. Darüber hinaus sinkt der PEDF-Spiegel im Alter und seine Expression wird als Marker für junge Zellen verwendet. Etwa ein Jahrzehnt nach seiner Entdeckung wurde festgestellt, dass PEDF ein potenter Inhibitor der Angiogenese ist. Dieser Befund in Kombination mit altersbedingten Veränderungen in der Mikroumgebung des Gewebes, die das Tumorwachstum begünstigen, veranlassten die Untersuchung der Rolle von PEDF in den Wirkungsmechanismen und der Regulation von Malignitäten sowie seiner möglichen Anwendungen in der Krebstherapie. Dies hat zur Identifizierung von PEDF als einem Hauptantagonisten angiogenetischer Faktoren, wie dem vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor VEGF. Seine antitumoralen und antimetastatischen Eigenschaften trugen zu seiner potenziellen Verwendung als diagnostischer und prognostischer Marker bei diversen malignen Entitäten bei (134).

Der Verlust des vom Pigmentepithel abgeleiteten Faktors (PEDF, SERPINF1) in malignen Zellen ist mit einer schlechten Prognose und Metastasierung verbunden, aber der Beitrag des stromalen PEDF zur Entwicklung maligner Entitäten ist noch nicht adäquat abgeklärt. Nwani et al. untersuchten die Rolle von aus Fibroblasten stammendem PEDF bei der

Melanomprogression. Sie zeigten, dass normale dermale Fibroblasten, die hohe PEDF-Spiegel exprimieren, das Melanomwachstum und die Angiogenese *in vivo* herunterregulieren, während PEDF-depletierte Fibroblasten tumorfördernde Wirkungen ausübten. Schließlich zeigte das Expressionsprofil von PEDF-depletierten Fibroblasten die Induktion von Interleukin-8, SERPINB2, Hyaluronansynthase-2 und anderen Genen, die mit Tumorpromotion und Metastasierung assoziiert sind (135). In der vorliegenden Studie konnten keine gravierenden Unterschiede unter den Melanomgruppen 1 und 2 in Bezug auf die PEDF-Expression festgestellt werden. Nach Analyse der Daten je nach Progression zeigte sich eine Reduktion der PEDF-Expression im Verlauf der Therapie mit INF in der Gruppe 1 nur in Patienten mit progressiver Erkrankung, wodurch die Rolle des Proteins als relevanter Marker begründet werden könnte. Andererseits konnte eine signifikante Erhöhung der PEDF-Sekretion in Patienten ohne Progression nach Ende der Therapie gegenüber den Werten vor Therapie. Diese Ergebnisse sind vereinbar mit den angegebenen Daten in der Literatur. Des Weiteren wurde keine signifikante Differenz der Proteinkonzentration von Stadium I bis IV in der Gruppe 2 dokumentiert, wobei eine minimale, nicht signifikante Erhöhung in den Patienten der Gruppe 2 mit bekannter Progression erkennbar war. Dies wäre durch die kleine Anzahl von Patienten in der analysierten Untergruppe mit Progression sowie als potenzieller Effekt der erhaltenen medikamentösen Therapie zu erklären. Die Inhibition der Angiogenese und Metastasierung durch das PEDF bei dem malignen Melanom wurde weiterhin von Abe et al. diskutiert (136). Sie postulieren, dass Melanozyten und wenig aggressive Melanomzellen hohe Konzentrationen von PEDF sezernieren, während seine Expression in hochaggressiven Melanomen sinkt. PEDF soll effizient eine Reihe funktioneller Eigenschaften aufheben, die für die Metastasierungsfähigkeit von Melanomzellen entscheidend sind, wie Neovaskularisation, Proliferation, Migration, Invasivität und Extravasation. Zhang et al. konnten nachweisen, dass PEDF in menschlichen Melanozyten exprimiert wurde. Die Expression des PEDF-Proteins verringerte sich in der Reihenfolge gesunde Haut, pigmentierter Nävus und menschliches malignes Melanom. Sowohl die Expression von PEDF-mRNA als auch -Protein war in der malignen Melanom-Zelllinie A375 viel geringer oder fehlte fast ganz als die in menschlichen Melanozyten (137). In einer anderen Studie identifizieren die Autoren die Hypoxie als relevanten negativen Regulator von PEDF in Melanozyten und schwach aggressiven Melanomzellen. Sie zeigten, dass hypoxische Bedingungen während des primären Melanomwachstums den antiangiogenen und antimetastatischen PEDF durch einen posttranslationalen Mechanismus herunterregulieren, der den Abbau durch Autophagie beinhaltet und daher könnte die Hypoxie zum Erwerb eines hochgradig metastatischen Potenzials beitragen, das für aggressive Melanomzellen charakteristisch ist (138).

Des Weiteren werden ähnliche Mechanismen in diversen anderen Malignitäten recherchiert. Die Ergebnisse von Miao et al., wie bereits für das maligne Melanom diskutiert, deuten darauf hin, dass PEDF durch die Regulierung der Autophagie das Fortschreiten des nicht-kleinzelligen Lungenkrebses (NSCLC) vermitteln kann. Die Autoren untersuchten den Zusammenhang zwischen dem PEDF/Adenosin-5'-Monophosphat-aktivierte Proteinkinase (AMPK)/Unc-51-like autophagie-activating Kinase 1 (ULK1)-Weg und der Autophagie bei NSCLC. Die Ergebnisse zeigten, dass PEDF die Proliferation und Überlebensfähigkeit von NSCLC-Zellen signifikant hemmte und die Freisetzung von LDH und die interzelluläre Adhäsion erhöhte. Darüber hinaus unterdrückte PEDF die Expression und Aktivierung von LC-3 (microtubule-associated protein light chain 3-I), ein Autophagie-Marker und reduzierte die Anzahl und Verteilung von Autophagosomen. Die PEDF-induzierte Hemmung der Autophagie zeigte einen direkten Zusammenhang mit der reduzierten Proliferation und Zellüberlebensfähigkeit von NSCLC-Zellen (139). Ansari et al. Zeigten, dass die PEDF-Spiegel sowohl im Gewebe als auch im Serum beim humanen Pankreaskarzinom erniedrigt sind. Die Abnahme ist mit einer erhöhten Tumorangiogenese, Fibrose, Entzündung, Autophagie, dem Auftreten von Lebermetastasen und einer schlechteren Prognose verbunden. In Mausmodellen reicht der Verlust von PEDF aus, um ein invasives Karzinom zu induzieren, und dieser Phänotyp ist mit großen Läsionen verbunden, die durch schlechte Differenzierung gekennzeichnet sind. Andererseits hat der lentivirale Gentransfer von PEDF zu einer verringerten Mikrogefäßdichte geführt und das Tumorstadium gehemmt (140). Patienten mit neu diagnostiziertem Prostatakarzinom (PCa) oder benigner Prostatahyperplasie (BPH) ohne andere Komorbiditäten und gesunde Personen wurden in Bezug auf die quantitative Bestimmung von VEGF und PEDF verglichen. Die Spiegel von VEGF und PEDF wurden durch ELISA im Serum und durch Immunhistochemie in Biopsien gemessen. Die Ergebnisse zeigten, dass die Serumspiegel von VEGF, PEDF und t-PSA zwischen PCa und BPH ähnlich waren, sich aber von gesunden Personen unterschieden. Die Mittelwerte von PEDF in ng/ml waren signifikant niedriger bei BPH ($122,15 \pm 58,84$), AdGS6-7 ($98,93 \pm 38,02$), AdGS8-10 ($121,58 \pm 84,13$) (Adenokarzinoma-Gleason Score) und PCa ($107,99 \pm 59,79$) nach Vergleich mit der gesunden Gruppe ($233,6 \pm 9,25$), obwohl sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Prostataerkrankungen ergeben hat. Diese vorläufigen Ergebnisse legen nahe, dass die VEGF- und PEDF-Spiegel allein oder in Kombination mit t-PSA nicht zwischen bösartigen und gutartigen Prostataerkrankungen unterscheiden konnten. Es wurde jedoch ein signifikanter Unterschied im VEGF/PEDF-Verhältnis im Serum zwischen den Gruppen beobachtet, was darauf hindeutet, dass es als Index für Diagnose und Prognose individuell verwendet werden kann (141).

Signifikant niedrigere PEDF-Konzentrationen im Serum wurden in gesunden Probanden im Vergleich zu Patienten mit malignem Melanom der Gruppe 1 und 2 in der vorliegenden

Studie gemessen. Das dargestellte Ergebnis ist nicht mit der in der Literatur berichteten Reduktion der PEDF-Werten in malignen Entitäten vereinbar. Dieser paradoxe Kontrast lässt sich durch die Komorbiditäten der untersuchten Melanomgruppen, insbesondere das Vorliegen eines metabolischen Syndroms erklären. Das jüngere Alter sowie die Abwesenheit einer Medikation und relevanter Nebendiagnosen oder Faktoren, die die Sekretion von PEDF beeinflussen könnten, in der gesunden Kohorte unserer Studie werden als weitere ätiologische Abklärung unserer Ergebnisse betrachtet. Zuletzt kann diese Diskrepanz zur Literatur durch die Heterogenität der Gruppe II, den Effekt aktueller Therapie oder Medikation insbesondere für Patienten der Gruppe 2 im fortgeschrittenen Stadium und durch die kleine Anzahl von Patienten in den untersuchten Melanomkohorten begründet werden. Andererseits könnte sich dieses Ergebnis den Daten und der vorgeschlagenen Theorie der Studie von Abe et al. anschließen, dass Melanozyten und wenig aggressive Melanomzellen hohe Konzentrationen von PEDF sezernieren, während seine Expression in hochaggressiven Melanomen sinkt. Keine signifikanten Unterschiede konnten in der Gruppe 2 unter den unterschiedlichen Stadien dokumentiert werden. Wir verwendeten die Gruppe 2 als Vergleichskohorte, um die Expression der untersuchten Proteine stichprobenartig in allen Stadien zu bestimmen und die Ergebnisse mit unserer Hauptkohorte 1 zu vergleichen. Jedoch sind größere Kohorten pro Stadium, insbesondere im Stadium IV, notwendig, um die suggerierte Hypothese zu validieren. Differenzen zwischen EDTA und Serum Proben konnten für keine der untersuchten Gruppen detektiert werden. Zwischen den unterschiedlichen Gruppen konnte ebenfalls kein wesentlicher Unterschied bezüglich der PEDF-Expression festgestellt werden. Jedoch kamen diese zum Vorschein, wenn die Patienten je nach Erfüllung der Kriterien für das metabolische Syndrom analysiert wurden. Somit konnte man signifikante Unterschiede für die Melanomgruppe 1 sowohl vor als auch nach Therapie zwischen Patienten ohne und mit metabolischem Syndrom. Die PEDF-Konzentration war signifikant höher für die Patienten mit metabolischem Syndrom. In der Gruppe 2 waren auch prominente Differenzen zwischen den Untergruppen zu erkennen, indem ein deutlicher Anstieg jedoch ohne statistische Signifikanz für die Patienten mit metabolischem Syndrom kalkuliert wurde. Die Resultate stimmen mit den Daten in der Literatur überein, die für höhere Signifikanzen in Patienten mit Diabetes mellitus, Insulinresistenz, Adipositas sowie mit metabolischem Syndrom berichten. Diese Korrelation und die entsprechenden Literaturreferenzen werden ausführlich bei der Diskussion der Ergebnisse in der Psoriasisgruppe kommentiert.

5.2. Afamin und PEDF in entzündlichen und immunologischen Krankheiten

Die Diagnosestellung der Psoriasis vulgaris kann in den meisten Fällen bei fortgeschrittenem Befund klinisch gestellt werden. Jedoch atypische Lokalisationen oder die Diversität der morphologischen Subtypen können mit anderen Hauterkrankungen, wie das Ekzem, Lupus erythematodes oder mit dem kutanen T-Zell-Lymphom verwechselt werden. Dies könnte zu einer verspäteten Diagnose und Therapie der vorliegenden Erkrankung sowie zur Verschlechterung der Prognose und der Lebensqualität der betroffenen Patienten führen. Bislang fehlen für die Psoriasis solche prognostischen und diagnostischen Indikatoren, die den klinischen Verlauf evaluieren und zur akkuraten Diagnosestellung beitragen könnten. Die Identifikation von Biomarkern für die Psoriasis als objektive Instrumente für die Bewertung des Ansprechens auf neuen entzündungshemmenden Medikamenten sowie für die Beurteilung derer Toxizität könnte potenziell auch bei anderen entzündlichen Erkrankungen nützlich sein. Sowohl Afamin als auch PEDF stehen in Zusammenhang und spielen unterschiedliche Rollen bei Adipositas, metabolischem Syndrom, Insulin-Resistenz, oxidativem Stress und Inflammation und könnten durch Abklärung dieser Korrelationen und Pathomechanismen als prädiagnostische oder prognostische Biomarker dienen.

Die chronische Plaque-Psoriasis ist eine immunvermittelte entzündliche Hauterkrankung, die stark mit den klinischen Merkmalen des metabolischen Syndroms assoziiert ist, darunter fallen abdominale Adipositas, Bluthochdruck, atherogene Dyslipidämie, Typ-2-Diabetes, Insulinresistenz und nichtalkoholische Steatosis hepatis. Insbesondere liegt die Prävalenz von MetS bei Patienten mit Psoriasis zwischen 20 % und 50 %, wobei das Risiko bei Psoriasis-Patienten mindestens doppelt so hoch ist wie bei Kontrollpersonen ohne Psoriasis. MetS ist auch häufiger bei Patienten mit schwerer Psoriasis als bei Patienten mit einem milden Hautbefall. Es wird diskutiert, dass Psoriasis und das metabolische Syndrom mehrere metabolische Risikofaktoren, genetische Hintergründe und pathogene Wege gemeinsam haben. Die Assoziation zwischen Psoriasis und metabolischem Syndrom hat wichtige klinische Implikationen. Systemische konventionelle Behandlungen sollten bei Psoriasis-Patienten mit metabolischem Syndrom mit Vorsicht angewendet werden, da sie die gleichzeitig bestehenden Stoffwechselstörungen negativ beeinflussen könnten, insbesondere im Falle einer chronischen Anwendung. Biologika scheinen im Vergleich zu konventionellen Behandlungen ein verbessertes Sicherheitsprofil zu haben und werden daher in der Regel auch besser vertragen. Insgesamt sollten Dermatologen bei der Diagnosestellung einer Psoriasis der Früherkennung gleichzeitig bestehender Stoffwechselstörungen große Aufmerksamkeit widmen (142). Ziel der komparativen Analyse zwischen der onkologischen Kohorte und Patienten mit Psoriasis war die Veränderungen der Konzentration beider

Proteine unter dem Einfluss einer Immuntherapie zu dokumentieren und diese zwischen den getesteten Gruppen zu vergleichen.

5.2.1. Afamin

Conklin et al untersuchten neue pharmakodynamische Biomarker für die therapeutische Wirksamkeit und Sicherheit der Glukokortikoidbehandlung für die juvenile Dermatomyositis (JDM) und die anti-neutrophiler zytoplasmatischer Antikörper (ANCA)-assoziierte Vaskulitis (AAV). Serielle Serumproben von Patienten mit AAV (n = 30) und JDM (n = 12) wurden während der aktiven Phase der Erkrankung und nach der Behandlung mit Glukokortikoiden analysiert. Für AAV wurden 8 von 11 Wirksamkeits-Biomarkern der entzündungshemmenden Reaktion auf Glukokortikoide validiert. CD23, von Makrophagen abgeleitetes Zytokin, Interleukin-22-Bindungsprotein, Matrix-Metalloproteinase-12, T-Lymphozyten-Oberflächenantigen Ly9, Fibrinogen-Gamma -Kette, Angiopoietin-2 waren erniedrigt und Protein C erhöht. Weiterhin waren 5 von 7 Sicherheits-Biomarkern, Afamin, Matrix-Metalloproteinase-3, Insulin-Wachstumsfaktor-bindendes Protein-5, Angiotensinogen, Leptin erhöht. Für JDM wurden 10 von 11 Wirksamkeits-Biomarkern (alle Proteine außer der Fibrinogen-Gammakette) und 6 von 7 Sicherheits-Biomarkern (alle Proteine für AAV-Proteine plus Wachstumshormon-bindendes Protein) als signifikant validiert (143). Unsere Ergebnisse sprechen jedoch für eine Senkung des Afamin-Spiegels im Verlauf der Therapie mit diversen immunmodulierenden Therapien bei Patienten mit Psoriasis und Psoriasis Arthritis. Auch nach Untersuchung der Psoriasis-Untergruppen je nach Vorliegen eines metabolischen Syndroms oder einer Psoriasis Arthritis blieb die Reduktion der Afaminkonzentration nach Immuntherapie bestehen.

Die Studie von Rosenling et al untersuchte das Proteom der Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) in einem Rattenmodell für experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE), um proteomische Veränderungen zu identifizieren, die für die Pathologie der Multiplen Sklerose relevant sind, da sich diese bestimmten gemeinsamen Merkmale wie motorische Dysfunktion, axonaler Abbau und Infiltration von T-Zellen teilen. EAE wurde in männlichen Lewis-Ratten durch Injektion von basischem Myelinprotein (MBP) zusammen mit komplettem Freund'schem Adjuvans (CFA) induziert. Einer entzündlichen Kontrollgruppe wurde nur CFA injiziert, und eine unbehandelte Gruppe diente als gesunde Kontrolle. Liquor wurde am Tag 10 und 14 nach der Immunisierung gesammelt und analysiert. Die Gruppe stellte fest, dass 44 Proteine bei EAE-Tieren im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen signifikant erhöht waren. Lysozym C1, Fetuin B, T-Kininogen, Serumparaaxonase/Arylesterase 1,

Glutathionperoxidase 3, Komplement C3 und Afamin gehörten zu den Proteinen, die in diesem Ratten-EAE-Modell signifikant erhöht waren. Zwei Proteine, Afamin und Komplement C3, wurden in einem unabhängigen Probensatz mit quantitativer Massenspektrometrie zur Überwachung ausgewählter Reaktionen validiert. Die Molekulargewichte der identifizierten, unterschiedlich häufig vorkommenden Proteine zeigten einen erhöhten Transport durch die Blut-Hirn-Schranke (BBB) in der aktiven Phase der Erkrankung, durch eine Zunahme der BBB-Permeabilität (144). In der vorliegenden Arbeit präsentierte sich die Afamin-Konzentration leicht erhöht, jedoch nicht signifikant, in Patienten mit Psoriasis vor Therapiebeginn im Vergleich zu gesunden Probanden. Die Afamin-Expression sinkt signifikant nach 9 Monaten Therapie und der Ausgangswert ist ebenfalls signifikant erniedrigt im Gegensatz zu der Gruppe 4.

Eine andere Studie versucht, den Status von Entzündungsmarkern und Adipokinen bei adipösen Kindern und ihre Korrelationen mit Serumkonzentrationen von Afamin, zu identifizieren. Es wird postuliert, dass dieses Protein eine mögliche Rolle bei der Entwicklung von Adipositas spielt. Insgesamt wurden achtzig Kinder für die Studie rekrutiert, 40 ohne und 40 mit Adipositas. Größe, Gewicht, BMI und BMI Z-Score wurden kalkuliert. Die Serumkonzentration von hochempfindlichem C-reaktivem Protein (hsCRP), Adiponektin und Afamin wurde gemessen und mit den anthropometrischen Messungen korreliert. Der Serumspiegel von Afamin und CRP waren bei übergewichtigen Kindern im Vergleich zu Kontrollen signifikant erhöht. Es gab eine hochsignifikante positive Korrelation zwischen Afamin und BMI Z-Score und eine negative Korrelation zwischen Afamin und Adiponektin wurde aufgezeichnet, während eine nicht signifikante Assoziation zwischen Afamin und hsCRP festgestellt wurde. Die Autoren diskutieren, dass weitere Studien erforderlich sind, um die Wirkung von Afamin und seine Assoziation mit anderen Entzündungsmarkern ermitteln, wodurch die Rollen dieses Markers insbesondere während neuer Therapien identifiziert werden könnten (145). Das Fettgewebe spielt eine wesentliche Rolle zur Entstehung von subklinischer Inflammation und letztere ist an der Entstehung des Typ-2-Diabetes beteiligt. Eine andere Studie spekuliert, dass die Plasmaspiegel von Afamin mit einem erhöhten Risiko für Typ-2-Diabetes assoziiert waren und untersuchten die Wirkung von Afamin auf die Sekretion von Biomarkern der Inflammation in humanen Adipozyten in vitro, wie diverse Chemokine, Wachstumsfaktoren und Mitglieder der TNF-Rezeptor-Superfamilie. Der genaue Mechanismus und der Effekt der erhöhten Sekretion dieser Proteine auf die positive Assoziation zwischen Afaminspiegeln und Typ-2-Diabetes-Risiko in vivo bleibt jedoch unklar und erfordert weitere in vivo Studien (146). Seeber et al. berichten, dass erhöhte Afamin-Konzentrationen mit dem Vorliegen eines metabolischen Syndroms bei jungen Frauen mit polyzystischen Ovarien assoziiert sind und sie können möglicherweise als unabhängiger Prädiktor für die Entwicklung eines metabolischen Syndroms bei gefährdeten

Frauen dienen, insbesondere bei Insulinresistenz (147). Kronenberg et al führten eine Metaanalyse mit alters- und geschlechtsadjustierten Baseline- und Follow-up-Untersuchungen in populationsbasierten Bruneck (n = 826), Salzburg Atherosclerosis Prevention Program in Subjects at High Individual Risk (SAPHIR; n = 1499) und Kooperative Gesundheitsforschung in der Region Augsburg (KORA) F4-Studien (n=3060) durch. Die mittleren Afaminkonzentrationen betragen $62,5 \pm 15,3$, $66,2 \pm 14,3$ und $70,6 \pm 17,2$ mg/l in Bruneck, SAPHIR beziehungsweise KORA F4. Die Afamin-Konzentrationen zu Studienbeginn korrelierten hochsignifikant mit allen einzelnen Komponenten des metabolischen Syndroms zu Studienbeginn und bei der Nachbeobachtung. Der dokumentierte Effekt war am ausgeprägtesten bei erhöhtem Taillenumfang und für erhöhte Nüchtern glukosekonzentrationen (101). Eine andere Gruppe postuliert, dass ein erhöhter Afamin-Spiegel stark mit den Komponenten des metabolischen Syndroms, einschließlich viszeraler Fettleibigkeit, assoziiert ist. Viszerales Fettgewebe wird als ein aktives, endokrines Organ betrachtet, das biologisch aktive Proteine, Adipokine, absondert. Diese Studie zeigte, dass die Serum-Afamin-Konzentration positiv mit den Spiegeln entzündungsfördernder Adipokine bei Adipositas korreliert (148).

Unsere Daten weisen ebenfalls darauf hin, dass die Afaminkonzentration vor Therapiebeginn in Psoriatikern mit metabolischem Syndrom signifikant höher im Vergleich zu Patienten mit Psoriasis ohne metabolisches Syndrom ist. Allerdings zeigen die Werte nach Therapie eine insgesamt niedrige Afamin-Expression und eine Reduktion nach Therapie unabhängig von dem metabolischen Syndrom. Diese Senkung des Proteinspiegels war jedoch nur in der Untergruppe mit metabolischem Syndrom signifikant. Dies könnte einerseits auf die initial höhere Werte und andererseits auf den höheren Schweregrad des klinischen Befundes und daher auf das rapide Ansprechen auf die angewandte Biologikatherapie zurückgeführt werden. Die Beurteilung der Kohorten anhand des metabolischen Syndroms zeigten auch unter den Melanompatienten signifikante Unterschiede, die bislang nicht definiert werden konnten. Dies war vorwiegend in der Gruppe 2 zu beobachten, indem Patienten mit metabolischem Syndrom deutlich höhere Afamin-Sekretion im Serum aufwiesen. Darüber hinaus werden deutlich erhöhte, jedoch statistisch nicht signifikante Afamin-Werte vor Therapie in Patienten mit Psoriasis Arthritis im Vergleich zu Probanden nur mit Hautbeziehungsweise mit Nagelbefall. Dieser Befund kann ebenso durch den stärkeren Hautbefall und die höhere Aktivität der Erkrankung in Patienten mit begleitender Arthritis erklärt werden und geht mit den dokumentierten Berichten der Literatur über die Zusammenhänge der Afaminkonzentration mit inflammatorischen Prozessen einher.

5.2.2. PEDF

Es wurde gezeigt, dass zirkulierende PEDF waren im Serum von Psoriasis-Patienten signifikant erhöht ($5,69 \pm 3,85 \mu\text{g/ml}$) im Vergleich zu normalen Kontrollen ($3,67 \pm 2,14 \mu\text{g/ml}$). Bei Psoriasis-Patienten gab es einen leicht positiven Zusammenhang zwischen den PEDF-Werten und dem PASI (120). Wir konnten in unserer Studie keine signifikante Korrelation zwischen dem PASI-Wert sowie die PEDF-Konzentrationen bei Beginn oder neun Monate nach Therapie ($p=0,63$, $p=0,5$). Nakajima et al. Berichteten, dass die mittleren PEDF-Werte bei Patienten mit leichter Psoriasis ($\text{PASI} \leq 10$), Patienten mit mittelschwerer bis schwerer Psoriasis ($10 \leq \text{PASI} \leq 20$) und schwerer Psoriasis ($20 \leq \text{PASI}$) betragen $4,98 \mu\text{g/ml}$, $7,90 \mu\text{g/ml}$ und $5,804 \mu\text{g/ml}$. Des Weiteren zeigten PEDF-Spiegel und BMI sowohl bei Kontrollpersonen als auch bei Psoriasis-Patienten eine Tendenz zu einer positiven Assoziation. Die mittleren PEDF-Werte von normalgewichtigen Psoriasis-Patienten und adipösen Patienten betragen $6,36 \pm 4,55$ bzw. $4,83 \pm 1,96 \mu\text{g/ml}$ (120). Unsere Ergebnisse sprachen ebenfalls für erhöhte PEDF-Spiegel sowohl vor als auch nach Therapie mit signifikanter Differenz im Vergleich zur Gruppe 4 und den gesunden Probanden. Signifikante Unterschiede zwischen den Werten vor und nach Therapie konnten in Bezug auf die PEDF-Expression trotz der deutlichen Besserung des PASI-Index nach neun Monaten nicht detektiert werden.

Yan et al. untersuchten die Expression von VEGF und PEDF in Keratinozyten und Fibroblasten aus normaler und psoriatischer Haut, um ihre potenziellen Rollen und Wechselwirkungen bei der Entwicklung von Psoriasis zu bewerten. Sowohl in Keratinozyten als auch in Fibroblasten gab es jedoch keinen wesentlichen Unterschied des PEDF-Spiegels zwischen den Zellen des gleichen Typs aus normalen, nicht-läsionalen und periläsionalen Psoriasis-Schnitten. Nur in Läsionszellen gab es einen leichten Anstieg von PEDF (149). Medvedva et al. stellen die größten bisher verfügbaren Plasmaproteomik-Biomarker-Datenbank und die entsprechenden Analysen aus placebokontrollierten klinischen Phase-III-Studien mit dem Phosphodiesterase-Typ-4-Hemmer Apremilast bei Psoriasis (PSOR), Psoriasis-Arthritis (PsA) und ankylosierender Spondylitis (AS) in 526 Patienten vor. Unter Verwendung von ungefähr 150 Plasma-Analyten, die über drei Zeitpunkte verfolgt wurden, identifizierten sie IL-17A und KLK-7 (Kallikrein-related peptidase-7) als Biomarker für die Schwere der Erkrankung und die pharmakodynamische Wirkung von Apremilast bei Psoriasis-Patienten. Die kombinierte Abnahmerate von KLK-7, PEDF, MDC (macrophage-derived chemokine) und ANGPTL4 (angiopoietin-like 4) bis Woche 16 stellte Biomarker für die Responder-Untergruppe dar und gab Einblicke in therapeutische Mechanismen. Bei Patienten mit ankylosierender Spondylitis wurden IL-6 und LRG-1 als Biomarker mit Übereinstimmung zum Schweregrad der Erkrankung identifiziert. Zusammengefasst

erweiterten diese Erkenntnisse die mechanistische Wissensbasis von Apremilast und lieferten translationale Grundlagen, um zukünftige Recherchen einschließlich der Differenzierung, Kombination und Umnutzung von Verbindungen zu beschleunigen (150). Wir analysierten unsere Patienten und trennten diese in Untergruppen je nach Vorliegen einer begleitenden Psoriasis Arthritis. Dennoch kam es nicht zur Darstellung signifikanter Veränderungen zwischen den Untergruppen mit und ohne assoziierte Arthritis. Erhöhte Werte ohne statistische Signifikanz konnten in der Untergruppe mit Arthritis präsentiert werden. Dieses Ergebnis spricht für eine Relation zwischen der PEDF-Konzentration und dem Schweregrad der grundlegenden entzündlichen Erkrankung und dies könnte auch für weitere inflammatorische Erkrankungen gelten.

Abe et al. untersuchten die Expression von PEDF in der Haut durch immunhistochemische Färbung, Immunoblot und RT-PCR. Um potenzielle PEDF-Peptide zu identifizieren, hat die Gruppe Peptide, die aus der proteolytischen Fragmentierung von PEDF stammen, auf ihre antiproliferative Wirkung gescreent. Anti-Psoriasis-Funktionen dieser Peptide wurden unter Verwendung eines Maus-Transplantatmodells von Psoriasis analysiert. Die spezifischen niedermolekularen Peptide (MW < 850 Da) durchdrangen die Haut und zeigten in vitro eine signifikante antiangiogene Aktivität. Die topische Anwendung dieser Peptide in einem schweren kombinierten immundefizienten Mausmodell der Psoriasis-Erkrankung führte zu einer verringerten Angiogenese und der epidermalen Dicke (119). Bedauerlicherweise ist sowohl die therapeutische Applikation als auch die prognostische Wirkung von PEDF in der Literatur nicht ausreichend recherchiert und nur eine limitierte Anzahl von relevanten Studien stehen uns zur Verfügung. Weitere Studien mit größeren Kohorten sind notwendig, um die Stellung von PEDF als strategischer, prognostischer Marker in der Psoriasis und PsA sowie sein Einsatz zur prätherapeutischen Unterscheidung von Respondern zu präzisieren.

Der PEDF hemmt die Schädigung von Endothelzellen. Außerdem sind die Serumspiegel von PEDF beim metabolischen Syndrom erhöht. Diese Beobachtungen legen nahe, dass PEDF als Gegensystem gegen vaskuläre Zellschädigung beim metabolischen Syndrom erhöht sein könnte. Über die Regulation von PEDF bei Patienten mit Diabetes ist jedoch wenig bekannt. Um die Funktion des PEDF im Serum zu klären, Nakamura et al. untersuchten die Korrelation zwischen den 1-Jahres-Änderungen der PEDF-Spiegel und denen der anthropometrischen und metabolischen Variablen bei 86 Typ-2-Diabetikern. Regressionsanalysen zeigten, dass Taillenumfang, Triglyceride, Kreatinin und TNF-alpha unabhängig voneinander mit PEDF assoziiert waren. Weiterhin waren die prozentualen Änderungen der PEDF-Serumspiegel während der Beobachtungszeit positiv mit denen des BMI korreliert. Darüber hinaus waren die PEDF-mRNA-Spiegel in kultivierten Adipozyten erhöht und korrelierten zu den BMI-Werten von Personen, von denen die Adipozyten stammten. Diese Ergebnisse zeigten, dass die PEDF-Konzentration bei japanischen

Patienten mit Typ-2-Diabetes positiv mit metabolischen Komponenten und TNF-alpha assoziiert war. Weiterhin deuten die Daten dieser Arbeitsgruppe darauf hin, dass PEDF aus Fettgewebe erzeugt werden kann und eine gewisse Rolle bei der viszeralen Adipositas bei Patienten mit Typ-2-Diabetes spielt (151). Darüber hinaus wurden die Serum-PEDF-Konzentration und klinische Merkmale bei schwangeren Frauen mit GDM (Gestationsdiabetes mellitus) (n = 120) und ohne GDM (Kontrollgruppe, n = 120) untersucht. Die PEDF-Spiegel waren bei Probanden mit GDM ($5.02 \pm 2.12 \mu\text{g/ml}$) im Vergleich zu der Kontrollgruppe ($3.34 \pm 1.23 \mu\text{g/ml}$) erhöht. Univariate Korrelationen zeigten, dass die PEDF-Expression positiv mit den Nüchtern-Glukose- bzw. Nüchtern-Insulinspiegeln und negativ mit Adiponektin korrelierten. Die PEDF-Konzentration zeigte keinen Zusammenhang mit Alter, Schwangerschaftswoche, BMI vor der Schwangerschaft und Blutfettwerten (152). Ogata et al. bestimmten den PEDF-Spiegel im Plasma in Bezug auf das Stadium der diabetischen Retinopathie. Der Plasma-PEDF-Spiegel bei Diabetikern ($6,68 \pm 0,54 \mu\text{g/ml}$) war signifikant höher als der bei Kontrollen ($4,38 \pm 0,59 \mu\text{g/ml}$) und der Spiegel war besonders hoch bei Patienten mit proliferativer diabetischer Retinopathie ($7,78 \pm 0,98 \mu\text{g/ml}$; n = 45). Das Geschlecht, Blut-Harnstoff-Stickstoff und Triglyceride waren signifikante und unabhängige Variablen der Plasma-PEDF-Spiegel bei Diabetikern (153). Die quantitative Bestimmung von PEDF in unserer Kontrollkohorte bei gesunden Probanden führte zu deutlich höheren Niveaus sowohl im Serum ($13,77 \pm 2,7 \mu\text{g/ml}$) als auch in EDTA ($15,43 \pm 3,2$) als die berichteten Konzentrationen in der Literatur. Der Grund für diese Abweichung könnte die Homogenität unserer Kontrollkohorte sein, die nicht aus Probanden der allgemeinen Bevölkerung sondern aus jüngeren Menschen ohne Komorbiditäten bestand. Die Untersuchung in größeren Kontrollkohorten mit gesunden Probanden in unterschiedlichen Altersklassen würde zur genauen Identifizierung der Normwerte. Ein signifikanter Anstieg bei Patienten mit Psoriasis lässt sich, wie in den vorgestellten Studien diskutiert, im Vergleich zu unserer Gruppe 4 darstellen. Ähnliche PEDF-Konzentrationen bei gesunden Probanden, wie in unserer Arbeit, wurden in der Studie von Szentimrei et al., die Veränderungen von PEDF im Serum nach Nierentransplantation bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz bestimmten. Vor der Transplantation hatten die Patienten einen signifikant höheren PEDF-Spiegel als die Kontrollgruppe ($23,88 \pm 4,2 \mu\text{g/ml}$ gegenüber $14,68 \pm 3,7 \mu\text{g/ml}$). 1 Monat nach der Transplantation sank ihr PEDF-Spiegel signifikant und erreichte das Niveau der gesunden Kontrollgruppe ($14,9 \pm 3,6 \mu\text{g/ml}$), und dieses niedrige Niveau wurde während der 6-monatigen Nachbeobachtungszeit beibehalten ($13,9 \pm 2,8 \mu\text{g/ml}$). Weder in der TX- noch in der Kontrollgruppe konnten wir Geschlechtsunterschiede zwischen Frauen und Männern feststellen. Weiterhin ergab sich eine signifikante positive Korrelation zwischen PEDF und Gesamtcholesterin, Low-Density-Lipoprotein (LDL)-Cholesterin, Triglycerid, oxidiertes LDL (oxLDL) und kleiner HDL-Subfraktion; während negative Korrelationen zwischen PEDF und

mittlerer LDL-Größe und großer HDL-Subfraktion während des gesamten Nachbeobachtungszeitraums ebenso dokumentiert wurden (154).

Die Rolle des Geschlechtes sowie die Veränderungen bei Diabetes mellitus werden kontrovers in der Studie von Choi et al. diskutiert. Sie untersuchten die zirkulierenden CTRP-3- und PEDF-Konzentrationen bei 345 Probanden mit unterschiedlichem Glukosetoleranzstatus: Diabetes mellitus, Prädiabetes und gesunde. Darüber hinaus bewerteten sie die Beteiligung von CTRP-3 und PEDF an kardiometabolischen Risikofaktoren, einschließlich Insulinresistenz, hochempfindlichem C-reaktivem Protein (hsCRP), geschätzter glomerulärer Filtrationsrate (eGFR) und Pulswellengeschwindigkeit des Brachialknöchels (baPWV). Es gab keinen signifikanten Unterschied in den PEDF-Konzentrationen zwischen den Probandengruppen. Patienten mit metabolischem Syndrom zeigten signifikant höhere Werte von PEDF (10,4 und 8,5) im Vergleich zu Probanden ohne metabolisches Syndrom. Im Gegensatz dazu waren die Plasma-PEDF-Konzentrationen bei Frauen niedriger als bei Männern (8,4 und 10,5 µg/ml) (155). Eine weitere Arbeit zielte darauf ab, RBP4 (retinol-binding protein-4), PEDF und Clusterin in Serum und in humaner Zerebrospinalflüssigkeit (CSF) bei 268 neurologischen Patienten zu quantifizieren. Der PEDF war im Serum nachweisbar ($30,2 \pm 11,7$ µg/ml) und die Konzentrationen waren etwa 25-mal höher als im Liquor. Die PEDF-Serumspiegel korrelierten positiv mit den CSF-Spiegeln, die bei übergewichtigen/adipösen Patienten und bei Typ-2-Diabetikern erhöht waren, jedoch korrelierten diese nicht mit dem Geschlecht oder Alter (156). Die Variation des PEDF anhand der anthropomorphischen Parameter und der Insulinresistenz in jüngeren Erwachsenen und Kindern wurde von Sunderland et al. analysiert. Die PEDF-Konzentration war bei den adipösen gegenüber den normalgewichtigen Teilnehmern 60 % höher, jedoch ohne geschlechtsspezifische Unterschiede. Der PEDF korrelierte in beiden Gruppen positiv mit der Körpermasse, dem Body-Mass-Index, der Fett- und Magermasse, dem Nüchterninsulin und der Homöostase-Modell-Bewertung der Insulinresistenz. Mehrere Regressionsmodelle zeigten, dass die Fett- und Magermasse signifikante Prädiktoren für die detektierten, zirkulierenden PEDF-Spiegel waren, unabhängig von Alter, Geschlecht und Body-Mass-Index-Kategorie (157). Wir analysierten die Psoriasispatienten sowie die Melanomgruppen anhand der Kriterien, die die Diagnosestellung eines metabolischen Syndroms erfüllen und teilten die entsprechenden Kohorten in Untergruppen, um eventuell relevante Unterschiede hervorzuheben. Dadurch konnten neue signifikante Unterschiede für die Psoriasisgruppe 3 sowohl vor als auch nach Therapie zwischen Patienten ohne und mit metabolischem Syndrom dargestellt werden, die bei der allgemeinen Analyse nicht erkennbar waren. Höhere Konzentrationen zeigten sich in Patienten mit metabolischem Syndrom für beide Untergruppen, vor und nach Therapie.

Unsere Ergebnisse sprechen für deutliche Zusammenhänge zwischen der Afamin und PEDF-Expression sowohl in Patienten mit malignem Melanom als auch mit Psoriasis. Weitere Studien mit größeren Kohorten für beide Erkrankungen sind notwendig, um die Rolle dieser Proteine als onkologische oder inflammatorische Marker zu identifizieren. Des Weiteren muss der Effekt nicht nur der Interferon-Therapie, sondern diverser, anderer, medikamentöser Therapien untersucht werden, um die Wertstellung dieser Biomarker zur prognostischen Unterscheidung von Respondern und non-Respondern zu definieren. Die gewisse Vorauswahl an Probanden für die Zusammenstellung der gesunden Kohorte gilt ebenfalls als eine Limitation unserer Studie. Darüber hinaus könnten die langjährige Lagerung bei -80°Celsius und die mehrfache Nutzung der Proben der Kohorte 1 die Bestimmung der entsprechenden Konzentrationen von Afamin und PEDF beeinflusst haben. Darauf könnten die hohen Konzentrationen für beide Proteine und insbesondere für Afamin in dieser Gruppe zurückgeführt werden. Dieses Resultat erfordert weitere Untersuchungen, um die Veränderungen der Proteine bei Melanompatienten zu verifizieren, da die Daten in der Literatur für eine Reduktion beider Proteine für die Mehrheit der untersuchten malignen Entitäten sprechen. Diese konnte während der Therapie auch für unsere Studienkohorte dargestellt werden. Insgesamt steht eine limitierte Anzahl von Publikationen zur Verfügung, obwohl signifikante Ergebnisse in den präsentierten Studien berichtet werden. Des Weiteren wäre es essenziell, die Rolle von PEDF als prognostischer Faktor in der Früherkennung von Diabetes mellitus, Adipositas oder metabolischem Syndrom intensiv zu recherchieren, denn diese Komorbiditäten einen großen Teil der Allgemeinbevölkerung betreffen und dies könnte zukünftig zu der Reduktion und Verhinderung von kardiometabolischen Ereignissen beitragen.

6. Zusammenfassung

Afamin, als Vitamin-E-bindendes Protein, wurde in der Literatur als signifikanter, diagnostischer und prognostischer Faktor bei diversen malignen Entitäten, indem eine signifikant erniedrigte Afaminexpression in Patienten mit Malignomen beobachtet wurde. PEDF gilt als ein pluripotenter Wachstumsfaktor und übt multimodale Effekte bei diabetischen Retino- und Nephropathien, dem metabolischen Syndrom sowie bei Körpergewichtsveränderungen aus. Seine Rolle in der Onkologie ist bisher nicht ausreichend exploriert und seine antiangiogenen, antitumorigenen und antimetastatischen Eigenschaften sprechen für eine protektive Wirkung, wobei der detaillierte Wirkmechanismus unklar bleibt.

Die vorliegende Arbeit stellt neue Erkenntnisse in Bezug auf die Expression und die potenzielle Rolle von zwei Proteinmarker, Afamin und PEDF, beim malignen Melanom im Vergleich zu gesunden Probanden sowie entzündlichen und immunologischen Erkrankungen, wie die Psoriasis und Psoriasis Arthritis dar. Für die quantitative Bestimmung der Afamin- und PEDF-Konzentration wurden standardisierte Enzyme-linked immunosorbent (ELISA)-Verfahren sowohl im Serum- als auch in EDTA-Blutproben verwendet, um weiterhin die Relevanz der Blutprobenart zu untersuchen. Die Daten der Gruppe 1 bei Melanompatienten wurden vor, 3-6, 6-9 und 12-18 Monate nach Therapiebeginn mit Interferon analysiert, um den Effekt einer Immuntherapie auf den Afamin- und PEDF-Gehalt zu ermitteln. Die Ergebnisse wurden mit Melanompatienten in unterschiedlichen Stadien (Gruppe 2) sowie mit Patienten mit bekannter Psoriasis oder Psoriasis Arthritis (Gruppe 3) vor und neun Monate nach immunmodulierender Therapie und mit gesunden Probanden (Gruppe 4) verglichen.

Während der Therapie mit Interferon kam es zur Darstellung von Unterschieden vorwiegend nach Analyse der Melanompatienten nach Progression der Erkrankung, jedoch wies diese Gruppe eine erhöhte Sekretion der untersuchten Proteine im Vergleich zu den gesunden Probanden. Dadurch zeigte sich im Therapieverlauf ein signifikanter Anstieg und eine deutliche Reduktion der Afamin- und PEDF-Expression bei Patienten ohne beziehungsweise mit Progression. Der Proteingehalt der Gruppe 2 bei Melanompatienten in unterschiedlichen Stadien war erniedrigt im Vergleich zu der Interferon-Gruppe und relevante Differenzen je nach Progression konnten nicht nachgewiesen werden. Dies könnte auf die kleine Größe der entsprechenden Untergruppen zurückgeführt werden. Differenzen konnten nach Aufteilung der Gruppen je nach Vorliegen eines metabolischen Syndroms dargestellt werden. Darüber hinaus sank der Afamin-Spiegel im Serum signifikant bei Patienten mit Psoriasis oder Psoriasis Arthritis im Verlauf einer immunmodulierenden Therapie, wobei keine signifikanten Veränderungen für den PEDF anhand der Gelenkbeteiligung detektiert werden konnten. Dennoch wurden signifikant erhöhte Konzentrationen für Afamin und PEDF in dieser Gruppe

bei Patienten mit metabolischem Syndrom dokumentiert gegenüber gesunden Probanden. Insbesondere für Afamin wiesen Psoriatiker sowie gesunde Probanden eine deutlich erniedrigte Expression im Vergleich zu beiden Melanomgruppen auf.

Die paradoxe, erhöhte Expression der untersuchten Proteine und insbesondere von Afamin in der Gruppe 1, im Vergleich zu der Reduktion der Konzentrationen in malignen Entitäten in der Literatur, kann auf die langjährige Lagerung und die mehrmalige Verwendung der Blutproben in dieser Kohorte zurückgeführt werden. Die Erklärung unterstützen die entsprechenden Werte in der Melanomgruppe 2, die einen niedrigeren Afamin-Gehalt vorweisen. Weitere Untersuchungen mit größeren und homogenen Patientenkohorten in allen Melanom-Stadien sind erforderlich, um die Rolle von Afamin und PEDF als diagnostische sowie prognostische Biomarker zu untersuchen. Der Effekt diverser Therapiemodalitäten sollte ebenfalls recherchiert werden, um ihren Einsatz zur Vorhersage des Therapieansprechens zu analysieren. Die Psoriasis erhöht das Risiko für das metabolische Syndrom und kardiovaskuläre Erkrankungen. Die Abklärung der Beteiligung und der Rolle beider Proteine in der Entstehung dieser Entitäten erfordert Nachforschungen in multiplen, entzündlichen und immunologischen Erkrankungen, um deren Funktion und Pathomechanismus detailliert zu entschlüsseln sowie diese als Marker zur Risikofrüherkennung zu etablieren.

7. Literaturverzeichnis

1. McGovern VJ, Mihm MC, Jr., Bailly C, Booth JC, Clark WH, Jr., Cochran AJ, Hardy EG, Hicks JD, Levene A, Lewis MG, Little JH, Milton GW. 1973. The classification of malignant melanoma and its histologic reporting. *Cancer*, 32 (6):1446-1457
2. Clark WH, Jr., From L, Bernardino EA, Mihm MC (1969a) The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res.* Mar;29(3):705-27. PMID: 5773814
3. Clark WH Jr, Mihm MC Jr. (1969b) Lentigo maligna and lentigo-maligna melanoma. *Am J Pathol.* 1969 Apr;55(1):39-67. PMID: 5776171
4. Piliang, Melissa Peck (June 2011). Acral Lentiginous Melanoma. *Clinics in Laboratory Medicine.* 31 (2): 281–288. doi:10.1016/j.cll.2011.03.005
5. Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, Patel HN, Busam KJ, Kutzner H, Cho KH, Aiba S, Bröcker EB, LeBoit PE, Pinkel D, Bastian BC (2005). Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med.* Nov 17;353(20):2135-47. PMID: 16291983
6. Whiteman DC, Pavan WJ, Bastian BC (2011). The melanomas: a synthesis of epidemiological, clinical, histopathological, genetic, and biological aspects, supporting distinct subtypes, causal pathways, and cells of origin. *Pigment Cell Melanoma Res.* Oct;24(5):879-97. Epub 2011 Aug 16. PMID:21707960
7. Garbe C, Peris K, Hauschild A, Saiag P, Middleton M, Spatz A, Grob JJ, Malvehy J, Newton-Bishop J, Stratigos A, Pehamberger H, Eggermont A. 2010. Diagnosis and treatment of melanoma: European consensus-based interdisciplinary guideline. *Eur J Cancer*, 46 (2):270-283.
8. Reintgen DS, Cox C, Slingluff CL, Jr., Seigler HF. 1992. Recurrent malignant melanoma: the identification of prognostic factors to predict survival. *Ann Plast Surg*, 28 (1):45-49.
9. Markowitz JS, Cosimi LA, Carey RW, Kang S, Padyk C, Sober AJ, Cosimi AB. 1991. Prognosis after initial recurrence of cutaneous melanoma. *Arch Surg*, 126 (6):703-707; discussion 707-708.
10. Gershenwald JE, Scolyer RA, Hess KR, Sondak VK, Long GV, Ross MI, Lazar AJ, Faries MB, Kirkwood JM, McArthur GA, Haydu LE, Eggermont AMM, Flaherty KT, Balch CM, Thompson JF., for members of the American Joint Committee on Cancer Melanoma Expert Panel and the International Melanoma Database and Discovery Platform. Melanoma staging:

Evidence-based changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin.* 2017 Nov;67(6):472-492.

11. Amin, M.B., Edge, S., Greene, F., Byrd, D.R., Brookland, R.K., Washington, M.K., Gershenwald, J.E., Compton, C.C., Hess, K.R., Sullivan, D.C., Jessup, J.M., Brierley, J.D., Gaspar, L.E., Schilsky, R.L., Balch, C.M., Winchester, D.P., Asare, E.A., Madera, L.R. (Eds.). 2017. *AJCC Cancer Staging Manual*. 8th ed. Springer International Publishing.

12. S3 Leitlinie Melanom Version 3.3 (2020). *Malignes Melanom: S3-Leitlinie zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms*. Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, Deutschen Krebsgesellschaft e.V. und Deutschen Krebshilfe e.V.

13. Leiter U, Buettner PG, Eigentler TK, Garbe C. 2004. Prognostic factors of thin cutaneous melanoma: an analysis of the central malignant melanoma registry of the german dermatological society. *J Clin Oncol*, 22 (18):3660-3667.

14. Balch, Charles M, Jeffrey E Gershenwald, Seng-Jaw Soong, John F Thompson, Michael B Atkins, David R Byrd, Antonio C Buzaid, et al. 2009. "Final Version of 2009 AJCC Melanoma Staging and Classification." *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 27 (36): 6199–6206.

15. Robert Koch-Institut: Krebs in Deutschland für 2015/2016, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg.); 12. Ausgabe, Berlin 2020

16. Saginala, K.; Barsouk, A.; Aluru, J.S.; Rawla, P.; Barsouk, A. Epidemiology of Melanoma. *Med. Sci.* 2021, 9, 63.

17. Sterry W, P. R. (2000). *Checkliste Dermatologie* (ed. Sterry W, P. R.) 137-139 Thieme, Stuttgart

18. Marks R (2002). The changing incidence and mortality of melanoma in Australia. *Recent Results Cancer Res* 160: 113–121 PMID: 12079205

19. Garbe C, Schadendorf D, Stolz W, Volkenandt M, Reinhold U, Kortmann R-D, Kettelhack C, Frerich B, Keilholz U, Dummer R, Sebastian G, Tilgen W, Schuler G, Mackensen A, Kaufmann R and Hauschild A (2008). *Kurzleitlinie - Malignes Melanom der Haut (ICD10 C43)*. JDDG Volume 6. Blackwell Verlag, Berlin

20. Garbe C (2006). *Management des Melanoms*. Springer Medizin Verlag Heidelberg ISBN-10: 3540289879

21. Davies H, Bignell GR, Cox C et al. (June 2002). "Mutations of the BRAF gene in human cancer". *Nature* 417 (6892): 949–54.

22. Garbe, C, P Buttner, J Weiss, H P Soyer, U Stocker, S Kruger, M Roser, J Weckbecker, R Panizzon, and F Bahmer. 1994. "Risk Factors for Developing Cutaneous Melanoma and Criteria for Identifying Persons at Risk: Multicenter Case-Control Study of the Central Malignant Melanoma Registry of the German Dermatological Society." *The Journal of Investigative Dermatology* 102 (5): 695–99.
23. Kaatsch, P., et al., Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes - Krebs in Deutschland 2007/2008. 8., Auflage ed. 2012: Robert Koch-Institut. 136.
24. Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* 2021, 71, 209–249.
25. 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; MSLT Group (2006). Sentinel-Node Biopsy or Nodal Observation in Melanoma. *N Engl J Med.* Sep 28;355(13):1307-17. PMID: 17005948
26. Morton, D L, L Wanek, J A Nizze, R M Elashoff, and J H Wong. 1991. "Improved LongTerm Survival after Lymphadenectomy of Melanoma Metastatic to Regional Nodes. Analysis of Prognostic Factors in 1134 Patients from the John Wayne Cancer Clinic." *Annals of Surgery* 214 (4): 491–501.
27. Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF. 2018. "S3-Leitlinie Zur Diagnostik , Therapie Und Nachsorge Des Melanoms," 1–275.
28. Kirkwood JM, Strawderman MH, Ernstoff MS, Smith TJ, Borden EC, Blum RHA. Interferon alpha-2b adjuvant therapy of high risk resected cutaneous melanoma: the Eastern Cooperative Oncology Group Trial EST 1684. *J Clin Oncol.* 1996; 14(1):7-17.
29. Hausschild A, Dummer R, Garbe C, Kaufmann R, Schadendorf D, Soyer HP, et al. Adjuvant interferon-alpha therapy of malignant melanoma. Position of the Dermatologic Oncology Working Group. *Hautarzt.* 1998;49(3):167-9.
30. 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. 2010. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med,* 363 (8):711-723.
31. Redman, Jason M, Geoffrey T Gibney, and Michael B Atkins. 2016. "Advances in Immunotherapy for Melanoma." *BMC Medicine* 14 (February): 20

32. Schachter, Jacob, Antoni Ribas, Georgina V Long, Ana Arance, Jean-Jacques Grob, Laurent Mortier, Adil Daud, et al. 2017. "Pembrolizumab versus Ipilimumab for Advanced Melanoma: Final Overall Survival Results of a Multicentre, Randomised, Open-Label Phase 3 Study (KEYNOTE-006)." *Lancet* (London, England) 390 (10105): 1853–62.
33. Weber, Jeffrey, Mario Mandala, Michele Del Vecchio, Helen J Gogas, Ana M Arance, C Lance Cowey, Stephane Dalle, et al. 2017. "Adjuvant Nivolumab versus Ipilimumab in Resected Stage III or IV Melanoma." *The New England Journal of Medicine* 377 (19): 1824–35.
34. Lito P, Rosen N, Solit DB. Tumor adaptation and resistance to RAF inhibitors. *Nat Med* 2013;19:1401–9.
35. Schadendorf D, Fisher DE, Garbe C, Gershenwald JE, et al. Melanoma. *Nature Reviews Disease Primers* 2015:1–20.
36. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, Dummer R, Garbe C, Testori A, Maio M, Hogg D, Lorigan P, Lebbe C, Jouary T, Schadendorf D, Ribas A, O'Day SJ, Sosman JA, Kirkwood JM, Eggermont AM, Dreno B, Nolop K, Li J, Nelson B, Hou J, Lee RJ, Flaherty KT, McArthur AG, Study Group (2011). Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N.Engl.J.Med.* 364: 2507-16. PMID: 21639808
37. Menzies AM, Long GV, Murali R (2012). Dabrafenib and its potential for the treatment of metastatic melanoma. *Drug Des Devel Ther.* 6:391-405. PMID: 23251089
38. Hauschild A, Grob JJ, Demidov LV, Jouary T, Gutzmer R, Millward M, Rutkowski P, Blank CU, Miller WH, Jr., Kaempgen E, Martin-Algarra S, Karaszewska B, Mauch C, Chiarion-Sileni V, Martin AM, Swann S, Haney P, Mirakhur B, Guckert ME, Goodman V, Chapman PB. 2012. Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet*, 380 (9839):358- 365.
39. Flaherty KT, Robert C, Hersey P, Nathan P, Garbe C, Milhem M, Demidov LV, Hassel JC, Rutkowski P, Mohr P, Dummer R, Trefzer U, Larkin JM, Utikal J, Dreno B, Nyakas M, Middleton MR, Becker JC, Casey M, Sherman LJ, Wu FS, Ouellet D, Martin AM, Patel K, Schadendorf D, Group MS. 2012. Improved survival with MEK inhibition in BRAF-mutated melanoma. *N Engl J Med*, 367 (2):107-114
40. Curtin, John A, Klaus Busam, Daniel Pinkel, and Boris C Bastian. 2006. "Somatic Activation of KIT in Distinct Subtypes of Melanoma." *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 24 (26): 4340–46.

41. Hodi, F Stephen, Christopher L Corless, Anita Giobbie-Hurder, Jonathan A Fletcher, Meijun Zhu, Adrian Marino-Enriquez, Philip Friedlander, et al. 2013. "Imatinib for Melanomas Harboring Mutationally Activated or Amplified KIT Arising on Mucosal, Acral, and Chronically Sun-Damaged Skin." *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 31 (26): 3182–90.
42. Kunz M (2014). Oncogene in melanoma: An update. *Eur J Cell Biol.* Jan-Feb;93(1-2):1-10. PMID: 24468268
43. Weide, Benjamin, Thomas Kurt Eigentler, Annette Pflugfelder, Ulrike Leiter, Friedegund Meier, Jürgen Bauer, Diethard Schmidt, Peter Radny, Claudia Pfohler, and Claus Garbe. 2011. "Survival after Intratumoral Interleukin-2 Treatment of 72 Melanoma Patients and Response upon the First Chemotherapy during FollowUp." *Cancer Immunology, Immunotherapy : CII* 60 (4): 487–93.
44. Sersa, G, B Stabuc, M Cemazar, D Miklavcic, and Z Rudolf. 2000. "Electrochemotherapy with Cisplatin: Clinical Experience in Malignant Melanoma Patients." *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 6 (3): 863–67.
45. Andtbacka, Robert H I, Howard L Kaufman, Frances Collichio, Thomas Amatruda, Neil Senzer, Jason Chesney, Keith A Delman, et al. 2015. "Talimogene Laherparepvec Improves Durable Response Rate in Patients With Advanced Melanoma." *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 33 (25): 2780–88.
46. Vereecken, Pierre, Frank Cornelis, Nicolas Van Baren, Valerie Vandersleyen, and Jean-Francois Baurain. 2012. "A Synopsis of Serum Biomarkers in Cutaneous Melanoma Patients." *Dermatology Research and Practice* 2012: 260643.
47. Callender, Glenda G, and Kelly M McMasters. 2011. "What Does Ulceration of a Melanoma Mean for Prognosis?" *Advances in Surgery* 45: 225–36.
48. Kashani-Sabet, M, R W Sagebiel, C M Ferreira, M Nosrati, and J R 3rd Miller. 2001. "Vascular Involvement in the Prognosis of Primary Cutaneous Melanoma." *Archives of Dermatology* 137 (9): 1169–73.
49. Weinstein, David, Jennifer Leininger, Carl Hamby, and Bijan Safai. 2014. "Diagnostic and Prognostic Biomarkers in Melanoma." *The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology* 7 (6): 13–24.
50. Ordonez NG, Ji XL, Hickey RC: Comparison of HMB-45 monoclonal antibody and S100 protein in the immunohistochemical diagnosis of melanoma. *Am J Clin Pathol.* 1988;90:385- 390.

51. Jing, Xin, Claire W Michael, and Constantine G A Theoharis. 2013. "The Use of Immunocytochemical Study in the Cytologic Diagnosis of Melanoma: Evaluation of Three Antibodies." *Diagnostic Cytopathology* 41 (2): 126–30.
52. Tarhini, Ahmad A, Joseph Stuckert, Sandra Lee, Cindy Sander, and John M Kirkwood. 2009. "Prognostic Significance of Serum S100B Protein in High-Risk Surgically Resected Melanoma Patients Participating in Intergroup Trial ECOG 1694." *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 27 (1): 38–44.
53. Zhang, Jiao, Yan-Hong Yao, Bao-Guo Li, Qing Yang, Peng-Yu Zhang, and Hai-Tao Wang. 2015. "Prognostic Value of Pretreatment Serum Lactate Dehydrogenase Level in Patients with Solid Tumors: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Scientific Reports* 5 (April): 9800.
54. Deichmann, M, B Kahle, K Moser, J Wacker, and K Wust. 2004. "Diagnosing Melanoma Patients Entering American Joint Committee on Cancer Stage IV, CReactive Protein in Serum Is Superior to Lactate Dehydrogenase." *British Journal of Cancer* 91 (4): 699–702.
55. Bosserhoff, A K, H Kuster, and R Hein. 2004. "Elevated MIA Levels in the Serum of Pregnant Women and of Children." *Clinical and Experimental Dermatology* 29 (6): 628–29.
56. Cao, M Gonzalez, J M Auge, R Molina, R Marti, C Carrera, T Castel, R Vilella, et al. 2007. "Melanoma Inhibiting Activity Protein (MIA), Beta-2 Microglobulin and Lactate Dehydrogenase (LDH) in Metastatic Melanoma." *Anticancer Research* 27 (1B): 595–99.
57. Pantel K, Brakenhoff RH, Brandt B. 2008. Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. *Nat Rev Cancer*, 8 (5):329-340.
58. Pachmann K, Camara O, Kavallaris A, Schneider U, Schunemann S, Hoffken K. 2005a. Quantification of the response of circulating epithelial cells to neoadjuvant treatment for breast cancer: a new tool for therapy monitoring. *Breast Cancer Res*, 7 (6):R975- 979.
59. E. Racila, D. Euhus, A. J. Weiss, C. Rao, J. McConnell: Detection and characterization of carcinoma cells in the blood. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Band 95, Nr. 8, 14. April 1998
60. Isaiah J. Fidler: The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. In: *Nature Reviews Cancer*. Band 3, Nr. 6, Juni 2003

61. Danielsen K, Olsen AO, Wilsgaard T, Furberg AS. Is the prevalence of psoriasis increasing? A 30-year follow-up of a population-based cohort. *Br J Dermatol.* 2013;168:1303–10.
62. Wilson FC et al. Incidence and clinical predictors of psoriatic arthritis in patients with psoriasis: a population-based study, *Arthritis Rheum.* 2009 Feb 15;61(2):233-9
63. Mrowietz U, Reich K (2009) Psoriasis – New Insights Into Pathogenesis and Treatment. *Dtsch Aerzteblatt Online*
64. Augustin M, Reich K, Glaeske G, Schaefer I, Radtke M (2010) Co-morbidity and age-related prevalence of psoriasis: Analysis of health insurance data in Germany. *Acta Derm Venereol.* 90(2): 147–51
65. Lebwohl MG, Bachelez H, Barker J, Girolomoni G, Kavanaugh A, Langley RG, Paul CF, Puig L, Reich K, van de Kerkhof PCM (2014) Patient perspectives in the management of psoriasis: results from the population-based Multinational Assessment of Psoriasis and Psoriatic Arthritis Survey. *J Am Acad Dermatol.* 70(5): 871-81.e1-30.
66. Griffiths CEM, Armstrong AW, Gudjonsson JE, Barker JNWN. Psoriasis. *Lancet.* 2021 Apr 3;397(10281):1301-1315.
67. Griffiths CEM, Barker JN. Pathogenesis and clinical features of psoriasis. *Lancet* 2007; 370: 263–7
68. Mease P.J., Gladman D.D., Papp K.A., Khraishi M.M., Thaci D., Behrens F., Northington R., Fuiman J., Bananis E., Boggs R., and Alvarez D., Prevalence of rheumatologist-diagnosed psoriatic arthritis in patients with psoriasis in European/North American dermatology clinics. *J Am Acad Dermatol,* 2013. 69(5): 729-35.
69. Radtke M.A., Reich K., Blome C., Rustenbach S., and Augustin M., Prevalence and clinical features of psoriatic arthritis and joint complaints in 2009 patients with psoriasis: results of a German national survey. *J Eur Acad Dermatol Venereol,* 2009. 23(6): 683-91.
70. Michalek I.M., Loring B., John S.M., Global report on psoriasis, WHO, Geneva, 2016, ISBN: 9789241565189
71. Dika E, Bardazzi F, Balestri R, Maibach HI, Environmental factors and psoriasis. *Curr Probl Dermatol.* 2007. 35: 118–35.
72. Mrowietz U, JESSAT H, SCHWARZ A, SCHWARZ T. Anthralin (dithranol) in vitro inhibits human monocytes to secrete IL-6, IL-8 and TNF-alpha, but not IL-1. *Br J Dermatol.* 1997;136(4):542–7.

73. Sulzberger MB, Witten VH. The Effect of Topically Applied Compound F in Selected Dermatoses. *Journal of Investigative Dermatology*. 1952;19(2):101–2.
74. van de Kerkhof PCM, Vissers WHPM. The Topical Treatment of Psoriasis. *Skin Pharmacol Physiol*. 2003;16(2):69–83
75. Lebwohl M. Strategies to optimize efficacy, duration of remission, and safety in the treatment of plaque psoriasis by using tazarotene in combination with a corticosteroid. *J Am Acad Dermatol*. 2000;43(2):S43-S46.
76. Archier E, Devaux S, Castela E, Gallini A, Aubin F, Le Maitre M, Aractingi S, Bachelez H, Cribier B, Joly P, Jullien D, Misery L, Paul C, Ortonne J-P, Richard M-A. Efficacy of psoralen UV-A therapy vs. narrowband UV-B therapy in chronic plaque psoriasis: a systematic literature review. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2012;26 Suppl 311–21.
77. Gerdes S, Shakery K, Mrowietz U. Dimethylfumarate inhibits nuclear binding of nuclear factor kappaB but not of nuclear factor of activated T cells and CCAAT/enhancer binding protein beta in activated human T cells. *Br J Dermatol*. 2007;156(5):838–42.
78. Elias KM, Laurence A, Davidson TS, Stephens G, Kanno Y, Shevach EM, O'Shea JJ. Retinoic acid inhibits Th17 polarization and enhances FoxP3 expression through a Stat-3/Stat-5 independent signaling pathway. *Blood*. 2008;111(3):1013–20.
79. Rim JH, Park JY, Choe YB, Youn JI. The efficacy of calcipotriol + acitretin combination therapy for psoriasis: Comparison with acitretin monotherapy. In: *American Journal of Clinical Dermatology* 2003; 4(7): 507-510
80. Wong RL, Winslow CM, Kevin D. C. The mechanisms of action of cyclosporin A in the treatment of psoriasis. *Immunology Today*. 1993;14(2):69–74.
81. Ellis CN, Fradin MS, Messana JM, Brown MD, Siegel MT, Hartley AH, Rocher LL, Wheeler S, Hamilton TA, Parish TG. Cyclosporine for plaque-type psoriasis. Results of a multidose, double-blind trial. *N Engl J Med*. 1991;324(5):277–84.
82. Zachariae C, Mork N-J, Reunala T, Lorentzen H, Falk E, Karvonen S-L, Johannesson A, Clareus B, Skov L, Mork G, Walker S, Qvitzau S. The combination of etanercept and methotrexate increases the effectiveness of treatment in active psoriasis despite inadequate effect of methotrexate therapy. *Acta Derm Venereol*. 2008;88(5):495–501.
83. Hausteil UF, Rytter M. Methotrexate in psoriasis: 26 years' experience with low-dose long-term treatment. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2000 Sep;14(5):382-8.

84. Carrascosa JM, Del-Alcazar E. Apremilast for psoriasis treatment. *G Ital Dermatol Venereol.* 2020 Aug;155(4):421-433. doi: 10.23736/S0392-0488.20.06684-5. Epub 2020 Jun 15.
85. Schafer P.H., Parton A., Gandhi A.K., Capone L., Adams M., Wu L., Bartlett J.B., Loveland M.A., Gilhar A., Cheung Y.F., et al. Apremilast, a camp phosphodiesterase-4 inhibitor, demonstrates anti-inflammatory activity in vitro and in a model of psoriasis. *Br. J. Pharmacol.* 2010;159:842–855.
86. Rendon A, Schäkel K. Psoriasis Pathogenesis and Treatment. *Int J Mol Sci.* 2019 Mar 23;20(6):1475.
87. Lucka T.C., Pathirana D., Sammain A., Bachmann F., Rosumeck S., Erdmann R., Schmitt J., Orawa H., Rzany B., Nast A. Efficacy of systemic therapies for moderate-to-severe psoriasis: A systematic review and meta-analysis of long-term treatment. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 2012;26:1331–1344.
88. Langley RG, Ellis CN. Evaluating psoriasis with Psoriasis Area and Severity Index, Psoriasis Global Assessment, and Lattice System Physician's Global Assessment. *J Am Acad Dermatol.* 2004;51(4):563–9.
89. . Finlay AY, Khan GK. Dermatology Life Quality Index (DLQI)-a simple practical measure for routine clinical use. *Clin Exp Dermatol.* 1994;19(3):210–6.
90. Georgescu S-R, Tampa M, Caruntu C, Sarbu M-I, Mitran C-I, Mitran M-I, et al. Advances in understanding the immunological pathways in psoriasis. *International Journal of Molecular Sciences.* 2019;20(3):1-17
91. Martins AM, Ascenso A, Ribeiro HM, Marto J. The brain–skin connection and the pathogenesis of psoriasis: A review with a focus on the serotonergic system. *Cell.* 2020;9(4):1-23
92. Zhang X, Shi L, Sun T, Guo K, Geng S. Dysbiosis of gut microbiota and its correlation with dysregulation of cytokines in psoriasis patients. *BMC Microbiology.* 2021;21(1):1-10
93. Choudhary S, Anand R, Pradhan D, Bastia B, Kumar SN, Singh H, et al. Transcriptomic landscaping of core genes and pathways of mild and severe psoriasis vulgaris. *International Journal of Molecular Medicine.* 2021;47(1):219-231
94. Wang Z, Zheng H, Zhou H, Huang N, Wei X, Liu X, et al. Systematic screening and identification of novel psoriasis-specific genes from the transcriptome of psoriasis-like keratinocytes. *Molecular Medicine Reports.* 2019;19(3):1529-1542

95. Ren C, Liu Q, Ma Y, Wang A, Yang Y, Wang D. TEAD4 transcriptional regulates SERPINB3/4 and affect crosstalk between keratinocytes and T cells in psoriasis. *Immunobiology*. 2020;225(5):1-8
96. Gerkowicz A, Pietrzak A, Szepietowski JC, Radej S, Chodorowska G. Biochemical markers of psoriasis as a metabolic disease. *Folia Histochem Cytobiol*. 2012 Jul 5;50(2):155-70.
97. Lichenstein HS, Lyons DE, Wurfel MM, Johnson DA, McGinley MD, Leidli JC, et al. Afamin Is a New Member of the Albumin, Alpha-Fetoprotein, and Vitamin D-Binding Protein Gene Family. *J Biol Chem* (1994) 269(27):18149–54.
98. Bélanger L, Roy S, Allard D. New Albumin Gene 3' Adjacent to the A1-Fetoprotein Locus. *J Biol Chem* (1994) 269(8):5481–4
99. Jerkovic L, Voegelé AF, Chwatal S, Kronenberg F, Radcliffe CM, Wormald MR, et al. Afamin is a Novel Human Vitamin E-Binding Glycoprotein Characterization and In Vitro Expression. *J Proteome Res* (2005) 4(3):889–99
100. Heiser M, Hutter-Paier B, Jerkovic L, Pfragner R, Windisch M, Becker-Andre M, et al. Vitamin E Binding Protein Afamin Protects Neuronal Cells In Vitro. *J Neural Transm Suppl* (2002) 62:337–45.
101. Kratzer I, Bernhart E, Wintersperger A, Hammer A, Waltl S, Malle E, et al. Afamin is Synthesized by Cerebrovascular Endothelial Cells and Mediates Alpha-Tocopherol Transport Across an In Vitro Model of the Blood-Brain Barrier. *J Neurochem* (2009) 108(3):707–18.
102. Kim BJ, Lee YS, Lee SY, Park SY, Dieplinger H, Ryu SH, et al. Afamin Secreted From Nonresorbing Osteoclasts Acts as a Chemokine for Preosteoblasts via the Akt-Signaling Pathway. *Bone* (2012) 51(3):431–40.
103. Dieplinger H, Ankerst DP, Burges A, Lenhard M, Lingenhel A, Fineder L, Buchner H, Stieber P. Afamin and apolipoprotein A-IV: novel protein markers for ovarian cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009 Apr;18(4):1127-33.
104. Tolek A, Wongkham C, Prongvitaya S, et al. Serum $\alpha 1\beta$ -glycoprotein and afamin ratio as potential diagnostic and prognostic markers in cholangiocarcinoma. *Experimental Biology and Medicine*. 2012;237(10):1142-1149.
105. Song HJ, Xue YL, Qiu ZL, Luo QY. Comparative serum proteomic analysis identified afamin as a downregulated protein in papillary thyroid carcinoma patients with non-131I-avid lung metastases. *Nucl Med Commun*. 2013 Dec;34(12):1196-203.

106. Wang WK, Tsai CH, Liu YW, Lai CC, Huang CC, Sheen-Chen SM. Afamin expression in breast cancer. *Asian J Surg.* 2020 Jul;43(7):750-754.
107. Kronenberg F, Kollerits B, Kiechl S, Lamina C, Kedenko L, Meisinger C, Willeit J, Huth C, Wietzorrek G, Altmann ME, Thorand B, Melmer A, Dähnhardt D, Santer P, Rathmann W, Paulweber B, Koenig W, Peters A, Adham IM, Dieplinger H. Plasma concentrations of afamin are associated with the prevalence and development of metabolic syndrome. *Circ Cardiovasc Genet.* 2014 Dec;7(6):822-9.
108. Kollerits B, Lamina C, Huth C, Marques-Vidal P, Kiechl S, Seppälä I, Cooper J, Hunt SC, Meisinger C, Herder C, Kedenko L, Willeit J, Thorand B, Dähnhardt D, Stöckl D, Willeit K, Roden M, Rathmann W, Paulweber B, Peters A, Kähönen M, Lehtimäki T, Raitakari OT, Humphries SE, Vollenweider P, Dieplinger H, Kronenberg F. Plasma Concentrations of Afamin Are Associated With Prevalent and Incident Type 2 Diabetes: A Pooled Analysis in More Than 20,000 Individuals. *Diabetes Care.* 2017 Oct;40(10):1386-1393.
109. Köninger A, Mathan A, Mach P, Frank M, Schmidt B, Schleussner E, Kimmig R, Gellhaus A, Dieplinger H. Is Afamin a novel biomarker for gestational diabetes mellitus? A pilot study. *Reprod Biol Endocrinol.* 2018 Mar 27;16(1):30.#
110. Seeber BE, Czech T, Buchner H, Barnhart KT, Seger C, Daxenbichler G, Wildt L, Dieplinger H. The vitamin E-binding protein afamin is altered significantly in the peritoneal fluid of women with endometriosis. *Fertil Steril.* 2010 Dec;94(7):2923-6.
111. Köninger A, Edimiris P, Koch L, Eneke A, Lamina C, Kasimir-Bauer S, Kimmig R, Dieplinger H. Serum concentrations of afamin are elevated in patients with polycystic ovary syndrome. *Endocr Connect.* 2014 Sep;3(3):120-6.
112. Nuñez-Calonge R, Cortes S, Caballero Peregrín P, Gutierrez Gonzalez LM, Kireev R. Seminal Plasma and Serum Afamin Levels Are Associated with Infertility in Men with Oligoasthenoteratozoospermia. *Reprod Sci.* 2021 May;28(5):1498-1506.
113. Tombran-Tink J, Chader GG, Johnson LV. PEDF: a pigment epithelium-derived factor with potent neuronal differentiative activity. *Exp Eye Res.* 1991 Sep;53(3):411-4.
114. Chandolu V, Dass CR. Cell and molecular biology underpinning the effects of PEDF on cancers in general and osteosarcoma in particular. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012:740295.
115. Ueno S, Sudo T, Saya H, Sugihara E. Pigment epithelium-derived factor promotes peritoneal dissemination of ovarian cancer through induction of immunosuppressive macrophages. *Commun Biol.* 2022 Sep 2;5(1):904.

116. Fernandez-Garcia, N.I., Volpert, O.V. & Jimenez, B. Pigment epithelium-derived factor as a multifunctional antitumor factor. *J Mol Med* 85, 15–22 (2007).
117. Huang WT, Chong IW, Chen HL, Li CY, Hsieh CC, Kuo HF, Chang CY, Chen YH, Liu YP, Lu CY, Liu YR, Liu PL. Pigment epithelium-derived factor inhibits lung cancer migration and invasion by upregulating exosomal thrombospondin 1. *Cancer Lett.* 2019 Feb 1;442:287-298.
118. Elbalschy AEM, El-Refaie AM, Akl EM. Expression of pigment epithelium-derived factor in psoriasis, verrucae, squamous cell carcinoma and normal skin: An immunohistochemical study. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2020 Jul-Aug;86(4):469.
119. Abe R, Yamagishi S, Fujita Y, Hoshina D, Sasaki M, Nakamura K, Matsui T, Shimizu T, Bucala R, Shimizu H. Topical application of anti-angiogenic peptides based on pigment epithelium-derived factor can improve psoriasis. *J Dermatol Sci.* 2010 Mar;57(3):183-91.
120. Nakajima H, Nakajima K, Tarutani M, Sano S. The role of pigment epithelium-derived factor as an adipokine in psoriasis. *Arch Dermatol Res.* 2012 Jan;304(1):81-4.
121. Huang KT, Lin CC, Tsai MC, Chen KD, Chiu KW. Pigment epithelium-derived factor in lipid metabolic disorders. *Biomed J.* 2018 Apr;41(2):102-108.
122. Bell C. Pigment epithelium-derived factor: a not so sympathetic regulator of insulin resistance? *Exerc Sport Sci Rev.* 2011 Oct;39(4):187-90.
123. Chuderland D, Ben-Ami I, Bar-Joseph H, Shalgi R. Role of pigment epithelium-derived factor in the reproductive system. *Reproduction.* 2014 Oct;148(4):R53-61.
124. Dieplinger H, Dieplinger B. Afamin--A pleiotropic glycoprotein involved in various disease states. *Clin Chim Acta.* 2015 Jun 15;446:105-10.
125. Choi JW, Liu H, Shin DH, Yu GI, Hwang JS, Kim ES, Yun JW. Proteomic and cytokine plasma biomarkers for predicting progression from colorectal adenoma to carcinoma in human patients. *Proteomics.* 2013 Aug;13(15):2361-74.
126. Chen YT, Chen HW, Domanski D, Smith DS, Liang KH, Wu CC, Chen CL, Chung T, Chen MC, Chang YS, Parker CE, Borchers CH, Yu JS. Multiplexed quantification of 63 proteins in human urine by multiple reaction monitoring-based mass spectrometry for discovery of potential bladder cancer biomarkers. *J Proteomics.* 2012 Jun 27;75(12):3529-45.
127. Melmer A, Fineder L, Lamina C, Kollerits B, Dieplinger B, Braicu I, Sehouli J, Cadron I, Vergote I, Mahner S, Zeimet AG, Castillo-Tong DC, Ebenbichler CF, Zeillinger R, Dieplinger H. Plasma concentrations of the vitamin E-binding protein afamin are associated

with overall and progression-free survival and platinum sensitivity in serous ovarian cancer--a study by the OVCAD consortium. *Gynecol Oncol.* 2013 Jan;128(1):38-43.

128. Aktas B, Kasimir-Bauer S, Wimberger P, Kimmig R, Heubner M. Utility of mesothelin, L1CAM and Afamin as biomarkers in primary ovarian cancer. *Anticancer Res.* 2013 Jan;33(1):329-36.

129. Jackson D, Craven RA, Hutson RC, Graze I, Lueth P, Tonge RP, Hartley JL, Nickson JA, Rayner SJ, Johnston C, Dieplinger B, Hubalek M, Wilkinson N, Perren TJ, Kehoe S, Hall GD, Daxenbichler G, Dieplinger H, Selby PJ, Banks RE. Proteomic profiling identifies afamin as a potential biomarker for ovarian cancer. *Clin Cancer Res.* 2007 Dec 15;13(24):7370-9.

130. Opstal-van Winden AW, Krop EJ, Kåredal MH, Gast MC, Lindh CH, Jeppsson MC, Jönsson BA, Grobbee DE, Peeters PH, Beijnen JH, van Gils CH, Vermeulen RC. Searching for early breast cancer biomarkers by serum protein profiling of pre-diagnostic serum; a nested case-control study. *BMC Cancer.* 2011 Aug 26;11:381.

131. Chantada-Vázquez MdP, Conde-Amboage M, Graña-López L, Vázquez-Estévez S, Bravo SB, Núñez C. Circulating Proteins Associated with Response and Resistance to Neoadjuvant Chemotherapy in HER2-Positive Breast Cancer. *Cancers.* 2022; 14(4):1087.

132. Shen CT, Wei WJ, Qiu ZL, Song HJ, Luo QY. Afamin promotes glucose metabolism in papillary thyroid carcinoma. *Mol Cell Endocrinol.* 2016 Oct 15;434:108-15.

133. Steele FR, Chader GJ, Johnson LV, Tombran-Tink J. Pigment epithelium-derived factor: neurotrophic activity and identification as a member of the serine protease inhibitor gene family. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1993;90:1526–1530.

134. Becerra SP, Notario V. The effects of PEDF on cancer biology: mechanisms of action and therapeutic potential. *Nat Rev Cancer.* 2013 Apr;13(4):258-71.

135. Nwani NG, Deguiz ML, Jimenez B, Vinokour E, Dubrovskiy O, Ugolkov A, Mazar AP, Volpert OV. Melanoma Cells Block PEDF Production in Fibroblasts to Induce the Tumor-Promoting Phenotype of Cancer-Associated Fibroblasts. *Cancer Res.* 2016 Apr 15;76(8):2265-76.

136. Abe R, Fujita Y, Yamagishi S. Angiogenesis and metastasis inhibitors for the treatment of malignant melanoma. *Mini Rev Med Chem.* 2007 Jun;7(6):649-61.

137. Zhang CF, Xiang LH, Shen J, Zhang Y, Li J, Zheng ZZ. Expression of pigment epithelium-derived factor in human melanocytes and malignant melanoma cells and tissues: Is loss of pigment epithelium-derived factor associated with melanoma? *Dermatoendocrinol.* 2009 Mar;1(2):108-13.

138. Fernández-Barral A, Orgaz JL, Gomez V, del Peso L, Calzada MJ, Jiménez B. Hypoxia negatively regulates antimetastatic PEDF in melanoma cells by a hypoxia inducible factor-independent, autophagy dependent mechanism. *PLoS One*. 2012;7(3):e32989.
139. Miao H, Hui H, Li H, Lin Y, Li D, Luo M, Jiang B, Zhang Y. PEDF inhibits non-small cell lung cancer proliferation by suppressing autophagy through downregulation of AMPK-ULK1 signaling. *Oncol Rep*. 2022 Dec;48(6):219.
140. Ansari D, Althini C, Ohlsson H, Bauden M, Andersson R. The Role of PEDF in Pancreatic Cancer. *Anticancer Res*. 2019 Jul;39(7):3311-3315.
141. Rivera-Pérez J, Monter-Vera MDR, Barrientos-Alvarado C, Toscano-Garibay JD, Cuesta-Mejías T, Flores-Estrada J. Evaluation of VEGF and PEDF in prostate cancer: A preliminary study in serum and biopsies. *Oncol Lett*. 2018 Jan;15(1):1072-1078.
142. Gisondi P, Fostini AC, Fossà I, Girolomoni G, Targher G. Psoriasis and the metabolic syndrome. *Clin Dermatol*. 2018 Jan-Feb;36(1):21-28.
143. Conklin LS, Merkel PA, Pachman LM, Parikh H, Tawalbeh S, Damsker JM, Cuthbertson DD, Morgan GA, Monach PA, Hathout Y, Nagaraju K, van den Anker J, McAlear CA, Hoffman EP. Serum biomarkers of glucocorticoid response and safety in anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis and juvenile dermatomyositis. *Steroids*. 2018 Dec;140:159-166.
144. Rosenling T, Stoop MP, Attali A, van Aken H, Suidgeest E, Christin C, Stingl C, Suits F, Horvatovich P, Hintzen RQ, Tuinstra T, Bischoff R, Luider TM. Profiling and identification of cerebrospinal fluid proteins in a rat EAE model of multiple sclerosis. *J Proteome Res*. 2012 Apr 6;11(4):2048-60.
145. Ahmed, Hanaa H.; Abdel Hameed, Enas R.; Shehata, Manal A.; El Wakeel, Maged A.; Elsayy, Dina H.; Elshafie, Amal I. Relation between afamin level and some inflammatory markers in obese children. *Medical Research Journal*. 2015 June; 14(1):1-6.
146. Fischer, T; Niersmann, C; Röhrig, K; Roden, M; Herder, C; Carstensen-Kirberg, M. Afamin-induzierte Sekretion von inflammatorischen Proteinen aus humanen Adipozyten. *Diabetologie und Stoffwechsel* 2019; 14(S01): 41 – 41
147. Seeber B, Morandell E, Lunger F, Wildt L, Dieplinger H. Afamin serum concentrations are associated with insulin resistance and metabolic syndrome in polycystic ovary syndrome. *Reprod Biol Endocrinol*. 2014 Sep 10;12:88.
148. Ildiko Seres, Hajnalka Lorincz, Viktoria E. Varga, Anita Szentpeteri, Sandor Somodi, Mariann Harangi, Peter Fulop, Gyorgy Paragh. Serum afamin concentration positively

correlates with the levels of pro-inflammatory adipokines in obesity. *Atherosclerosis*. 2017 Aug;263:200.

149. Yan BX, Zheng YX, Li W, Chen JQ, Zhou J, Cai SQ, Zheng M, Man XY. Comparative expression of PEDF and VEGF in human epidermal keratinocytes and dermal fibroblasts: from normal skin to psoriasis. *Discov Med*. 2018 Feb;25(136):47-56.

150. Medvedeva IV, Stokes ME, Eisinger D, LaBrie ST, Ai J, Trotter MWB, Schafer P, Yang R. Large-scale Analyses of Disease Biomarkers and Apremilast Pharmacodynamic Effects. *Sci Rep*. 2020 Jan 17;10(1):605.

151. Nakamura K, Yamagishi S, Adachi H, Kurita-Nakamura Y, Matsui T, Inoue H. Serum levels of pigment epithelium-derived factor (PEDF) are positively associated with visceral adiposity in Japanese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*. 2009 Jan;25(1):52-6.

152. Li TH, Qiu CJ, Yu XJ, Liu DD, Zhou PF, Wu L. Increased serum pigment epithelium-derived factor in women with gestational diabetes is associated with type 2 diabetes. *Int J Endocrinol*. 2015;2015:346938.

153. Ogata N, Matsuoka M, Matsuyama K, Shima C, Tajika A, Nishiyama T, Wada M, Jo N, Higuchi A, Minamino K, Matsunaga H, Takeda T, Matsumura M. Plasma concentration of pigment epithelium-derived factor in patients with diabetic retinopathy. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007 Mar;92(3):1176-9.

154. Szentimrei R, Lőrincz H, Szentpéteri A, E Varga V, Harangi M, Seres I, P Szabó R, Nemes B, Paragh G. Changes in serum pigment epithelium-derived factor levels after kidney transplantation in patients with end-stage renal disease. *Ren Fail*. 2022 Dec;44(1):1649-1659.

155. Choi KM, Hwang SY, Hong HC, Yang SJ, Choi HY, Yoo HJ, Lee KW, Nam MS, Park YS, Woo JT, Kim YS, Choi DS, Youn BS, Baik SH. C1q/TNF-related protein-3 (CTRP-3) and pigment epithelium-derived factor (PEDF) concentrations in patients with type 2 diabetes and metabolic syndrome. *Diabetes*. 2012 Nov;61(11):2932-6.

156. Höpfinger A, Berghoff M, Karrasch T, Schmid A, Schäffler A. Systematic Quantification of Neurotrophic Adipokines RBP4, PEDF, and Clusterin in Human Cerebrospinal Fluid and Serum. *J Clin Endocrinol Metab*. 2021 Apr 23;106(5):e2239-e2250.

157. Sunderland KL, Tryggstad JB, Wang JJ, Teague AM, Pratt LV, Zhang SX, Thompson DM, Short KR. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) varies with body composition and insulin resistance in healthy young people. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012 Nov;97(11):E2114-8.

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die durch ihre fachliche und persönliche Unterstützung zum Gelingen dieser Promotionsarbeit beigetragen haben.

An erster Stelle gilt mein Dank [REDACTED] für ihre wissenschaftliche und methodische Unterstützung während der gesamten Bearbeitungsphase meiner Dissertation. Des Weiteren hat sie alle Materialien zur Verfügung gestellt und die Rahmenbedingungen für diese Arbeit geliefert.

Weiterhin möchte ich mich bei [REDACTED] bedanken, die durch die Planung und persönliche Betreuung diese Arbeit erst möglich gemacht hat.

Besonders möchte ich auch meinem Ehemann [REDACTED] für die Geduld, die Tipps, die konstruktive Kritik und die grenzlose Unterstützung bedanken.

Zuletzt danke ich herzlich meinen Eltern und meinen Töchtern für die unermüdliche Stärkung und Motivierung.

9. Tabellarischer Lebenslauf

Curriculum vita

Theodora Tsimpaki

Fachärztin für Haut- und Geschlechtskrankheiten

Zusatzbezeichnung Phlebologie



Persönliche Daten

Geburtsdatum:

[Redacted]

Geburtsort:

Athen, Griechenland

Staatsangehörigkeit:

[Redacted]

Familienstand:

[Redacted]

Telefonnummer:

[Redacted]

Email-Adresse:

[Redacted]

Ausbildung

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

Berufserfahrung:

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted text block]

Fortbildungen und Kongresse

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

Wissenschaftliche Projekte:

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

Lehrerfahrung:

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]