

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

Untersuchung zur Korrelation von klinisch/ pathologischen Parametern mit dem
Sentinelstatus bei Melanompatienten sowie zur prognostischen Aussagekraft einer
Biomarker-Signatur bei Patienten mit malignem Melanom: eine Observationsstudie
an humanen Gewebeproben

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

Vorgelegt von

Maya Alexa Nolte
aus Frankfurt am Main

Mainz, 2025

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. P. Drees

Tag der Promotion: 11. Mai 2026

Nachnutzungslizenz:

Urheberrechtsschutz (InC-1.0)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung & Ziel der Arbeit.....	1
2	Literaturdiskussion	4
2.1	Das maligne Melanom (MM)	4
2.2	Epidemiologie	4
2.2.1	Weltweite Inzidenz und Mortalität	4
2.2.2	Inzidenz und Mortalität in Deutschland	5
2.2.3	Zeitliche Entwicklung der Inzidenzen und Mortalität.....	5
2.3	Risikofaktoren	6
2.4	Diagnostik.....	8
2.5	Immunoprint®	10
2.5.1	Methodik	10
2.5.2	Klinischer Nutzen.....	14
2.6	Stadieneinteilung/ Stratifizierung	15
2.6.1	TNM-Klassifikation der AJCC	15
2.6.2	7. Edition der AJCC	16
2.6.3	8. Edition der AJCC mit den aktuellen Neuerungen	19
2.6.4	Auswirkungen der Neuerungen auf die Therapie	24
2.6.5	Unterschiede im Überleben nach Stadien der 7. und 8. Edition	25
2.7	Therapie	28
2.7.1	Therapie des primären Melanoms	28
2.7.2	Therapie lokoregionaler Metastasen	29
2.7.3	Neoadjuvanter Therapieansatz.....	30
2.7.4	Therapie von Fernmetastasen.....	31
3	Material und Methoden.....	33
3.1	Ethikvotum und Konsultation des Datenschutzbeauftragten der Universitätsmedizin Mainz	33
3.2	Studiendesign und Patientenkollektiv der Gesamtkohorte	34
3.3	Datendokumentation und Prozess der Datenerhebung	35
3.3.1	Datendokumentation.....	35
3.3.2	Datenerhebung	36
3.3.3	Follow-up & Einverständniserklärung	38
3.3.4	Erhebung und Überprüfung der klinisch/ pathologische Tumordaten	40
3.4	Untersuchungen mit der 7-Biomarker-Signatur immunoprint®.....	41
3.4.1	Entstehung der Biomarkerkohorte	41
3.4.2	Immunhistochemische Untersuchung	42
3.4.3	Immunhistochemische Expressions-Analyse	46
3.4.4	Berechnung des Risikoscores der 7-Biomarker-Signatur.....	48
3.4.5	Patienten mit Zweitmelanom	49
3.5	Flow-Chart zur Entstehung der Gesamt- und Biomarkerkohorte	49
3.6	Statistische Verfahren	53

3.6.1	Primärer und sekundärer Endpunkt.....	53
4	Ergebnisse	56
4.1	Reklassifizierung nach AJCC`8	56
4.1.1	Gesamtkohorte	56
4.1.2	Biomarkerkohorte	58
4.2	Gesamtkohorte (n=393)	60
4.2.1	Kohortenbeschreibung.....	60
4.2.2	Kaplan-Meier-Analyse	63
4.2.3	Uni- und multivariate Cox-Analyse	71
4.2.4	Uni- und multivariate logistische Regression zur Vorhersage des SLN-Status 73	
4.3	Biomarkerkohorte	75
4.3.1	Kohortenbeschreibung.....	75
4.3.2	Kaplan-Meier-Analyse	83
4.3.3	Uni- und multivariate Cox-Analyse	95
4.3.4	Numerischer Risikoscore (Verteilung und Cut-off)	103
4.3.5	ROC-Analyse.....	104
4.3.6	Analytische Validität des Testverfahrens.....	113
5	Diskussion	115
5.1	Reklassifizierung nach der 8. Edition des AJCC	115
5.1.1	Verschiebungen im Stadium I.....	115
5.1.2	Verschiebungen im Stadium III.....	116
5.1.3	Fazit der Reklassifizierung.....	116
5.2	Repräsentativität der Gesamtkohorte im nationalen und internationalen Vergleich 118	
5.2.1	Vergleich der Patientendemografie	118
5.2.2	Vergleich der Tumormerkmale	118
5.2.3	Vergleich der Überlebenszeitanalysen	120
5.2.4	Fazit zur Repräsentativität.....	122
5.3	Prognostische Aussagekraft klinisch-pathologischer Parameter für Progress und Überleben.....	123
5.3.1	Dominanz der Tumordicke nach Breslow und des Wächterlymphknotenstatus 123	
5.3.2	Beitrag der Ulzeration	124
5.3.3	Die Rolle von Alter und Geschlecht.....	124
5.3.4	Prognostische Heterogenität entsprechend der AJCC 8. Edition.....	125
5.4	Prädiktoren für den Status des Wächterlymphknotens	127
5.5	Repräsentativität der Biomarkerkohorte im Vergleich zur Gesamtkohorte und zu publizierten immunoprint®-Kohorten.....	130
5.5.1	Interne Repräsentativität.....	130
5.5.2	Externe Repräsentativität	131
5.6	Prognostischer Mehrwert der 7-Biomarker-Signatur: Analysen in spezifischen Kohorten.....	134

5.6.1	Gesamte Biomarkerkohorte (Stadien I-IV, n=157)	134
5.6.2	Patienten der Stadien IA-IIA (n=104).....	137
5.6.3	Patienten der Stadien IB-IIA (n=81).....	140
5.6.4	Patienten im Stadium III (n=32)	143
5.7	Limitationen der Studie.....	145
5.8	Schlussfolgerung und Ausblick.....	147
5.8.1	Schlussfolgerung	147
5.8.2	Ausblick	147
6	Zusammenfassung.....	149
7	Literaturverzeichnis	151
8	Danksagung	162
9	Tabellarischer Lebenslauf	163

Abkürzungsverzeichnis

AJCC.....	American Joint Committee on Cancer
DMFS.....	<i>distant metastasis-free survival</i>
ED.....	<i>Erstdiagnose</i>
HR.....	<i>Hazard Ratio</i>
LK.....	<i>Lymphknoten</i>
MM.....	<i>malignes Melanom, Malignes Melanom</i>
MSS.....	<i>melanoma-specific survival</i>
n.s.....	<i>nicht spezifiziert</i>
OR.....	<i>Odds Ratio</i>
OS.....	<i>overall survival</i>
RFS.....	<i>recurrence-free survival</i>
SLN.....	<i>Sentinellymphknoten</i>
SLNB.....	<i>Sentinellymphknotenbiopsie</i>
unb.....	<i>unbekannt</i>

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: globale Inzidenzrate malignes Melanom 2022 beider Geschlechter (17).....	5
Abbildung 2: Altersstandardisierte Neuerkrankungs- und Sterberaten nach Geschlecht, ICD-10 C34, Deutschland 1999-2020/2021 (1).....	6
Abbildung 3: Immunhistochemische Beispiel-Färbung der Risikomarker für jeweils ein „High-Risk“- und ein „Low-Risk“-Melanom (8).....	13
Abbildung 4: Kaplan-Meier Kurven für overall survival für die verschiedenen Stadien nach AJCC 7 und 8 aus Barreiro-Capurro et al. (48).....	27
Abbildung 5: Beispiel der Färbung eines „High-Risk“-Melanoms	47
Abbildung 6: Beispiel der Färbung eines „Low-Risk“-Melanoms	47
Abbildung 7: Procedere zur Entstehung des Flow-Charts	50
Abbildung 8: Flow Chart der Gesamtkohorte.....	51
Abbildung 9: Flow-Chart der Biomarkerkohorte.....	52
Abbildung 10: pTNM-Stadienverteilung nach AJCC`7 &`8 (Gesamtkohorte)	56
Abbildung 11: Reklassifizierungsströme der pTNM-Stadien von AJCC`7 zu`8 (Gesamtkohorte)	57
Abbildung 12: pTNM-Stadienverteilung nach AJCC`7 &`8 (Biomarkerkohorte)	58
Abbildung 13: Reklassifizierungsströme der pTNM-Stadien von AJCC`7 zu`8 (Biomarkerkohorte).....	59
Abbildung 14: Melanomspezifische Überlebenszeitanalyse (Gesamtkohorte).....	63
Abbildung 15: Fernmetastasenfreie Überlebenszeitanalyse (Gesamtkohorte)	64
Abbildung 16: Rezidivfreie Überlebenszeitanalyse (Gesamtkohorte).....	65
Abbildung 17: Melanomspezifische Überlebenszeitanalyse stratifiziert nach SLN-Status (Gesamtkohorte).....	66
Abbildung 18: Fernmetastasenfreie Überlebenszeitanalyse stratifiziert nach SLN-Status (Gesamtkohorte).....	67
Abbildung 19: Rezidivfreie Überlebenszeitanalyse stratifiziert nach SLN-Status (Gesamtkohorte).....	68
Abbildung 20: Melanomspezifische Überlebenszeitanalyse stratifiziert nach pTNM-Stadium (Gesamtkohorte).....	69
Abbildung 21: Fernmetastasenfreie Überlebenszeitanalyse stratifiziert nach pTNM-Stadium (Gesamtkohorte).....	69
Abbildung 22: Rezidivfreie Überlebenszeitanalyse stratifiziert nach pTNM-Stadium (Gesamtkohorte).....	70
Abbildung 23: Box-Plot der pT-Stadienverteilung in High & Low Risk (Biomarkerkohorte)...	77
Abbildung 24: Balkendiagramm der pT-Stadienverteilung in High & Low Risk (Biomarkerkohorte).....	78
Abbildung 25: Box-Plot der pTNM-Stadienverteilung in High & Low Risk (Biomarkerkohorte)	79
Abbildung 26: Balkendiagramm der pTNM-Stadienverteilung in High & Low Risk (Biomarkerkohorte).....	80
Abbildung 27: Box-Plot der Melanomtypverteilung in High & Low Risk (Biomarkerkohorte).	81
Abbildung 28: Balkendiagramm der Melanomtypverteilung in High & Low Risk (Biomarkerkohorte).....	82
Abbildung 29: Melanomspezifische Überlebenszeitanalyse stratifiziert nach Risikogruppe (Biomarkerkohorte)	83
Abbildung 30: Fernmetastasenfreie Überlebenszeitanalyse stratifiziert nach Risikogruppe (Biomarkerkohorte).....	84
Abbildung 31: Rezidivfreie Überlebenszeitanalyse stratifiziert nach Risikogruppe (Biomarkerkohorte).....	84
Abbildung 32: Melanomspezifische Überlebenszeitanalyse stratifiziert nach Risikogruppe (Biomarkerkohorte, pTNM-Stadien IA-IIA).....	86
Abbildung 33: Fernmetastasenfreie Überlebenszeitanalyse stratifiziert nach Risikogruppe (Biomarkerkohorte, pTNM-Stadien IA-IIA).....	87

Abbildung 34: Rezidivfreie Überlebenszeitanalyse stratifiziert nach Risikogruppe (Biomarkerkohorte, pTNM-Stadien IA-IIA)	87
Abbildung 35: Melanomspezifische Überlebenszeitanalyse stratifiziert nach Risikogruppe (Biomarkerkohorte, pTNM-Stadien IB-IIA)	89
Abbildung 36: Fernmetastasenfreie Überlebenszeitanalyse stratifiziert nach Risikogruppe (Biomarkerkohorte, pTNM-Stadien IB-IIA)	90
Abbildung 37: Rezidivfreie Überlebenszeitanalyse stratifiziert nach Risikogruppe (Biomarkerkohorte, pTNM-Stadien IB-IIA)	90
Abbildung 38: Melanomspezifische Überlebenszeitanalyse stratifiziert nach Risikogruppe (Biomarkerkohorte, pTNM-Stadium III)	92
Abbildung 39: Fernmetastasenfreie Überlebenszeitanalyse stratifiziert nach Risikogruppe (Biomarkerkohorte, pTNM-Stadium III)	93
Abbildung 40: Rezidivfreie Überlebenszeitanalyse stratifiziert nach Risikogruppe (Biomarkerkohorte, pTNM-Stadium III)	93
Abbildung 41: Balkendiagramm des Numerischen Risikoscores (Biomarkerkohorte)	103
Abbildung 42: ROC-Analyse für MSS nach 5 Jahren (Biomarkerkohorte)	104
Abbildung 43: ROC-Analyse für MSS nach 10 Jahren (Biomarkerkohorte)	105
Abbildung 44: ROC-Analyse für RFS nach 5 Jahren (Biomarkerkohorte)	106
Abbildung 45: ROC-Analyse für RFS nach 10 Jahren (Biomarkerkohorte)	106
Abbildung 46; ROC-Analyse für MSS nach 5 Jahren (Biomarkerkohorte, pTNM-Stadium IA-IIA)	107
Abbildung 47: ROC-Analyse für MSS nach 10 Jahren (Biomarkerkohorte, pTNM-Stadium IA-IIA)	107
Abbildung 48: ROC-Analyse für RFS nach 5 Jahren (Biomarkerkohorte, pTNM-Stadium IA-IIA)	108
Abbildung 49: ROC-Analyse für RFS nach 10 Jahren (Biomarkerkohorte, pTNM-Stadium IA-IIA)	108
Abbildung 50: ROC-Analyse für MSS nach 5 Jahren (Biomarkerkohorte, pTNM-Stadium IB-IIA)	109
Abbildung 51: ROC-Analyse für MSS nach 10 Jahren (Biomarkerkohorte, pTNM-Stadium IB-IIA)	109
Abbildung 52: ROC-Analyse für RFS nach 5 Jahren (Biomarkerkohorte, pTNM-Stadium IB-IIA)	110
Abbildung 53: ROC-Analyse für RFS nach 10 Jahren (Biomarkerkohorte, pTNM-Stadium IB-IIA)	110
Abbildung 54: ROC-Analyse für MSS nach 5 Jahren (Biomarkerkohorte, pTNM-Stadium III)	111
Abbildung 55: ROC-Analyse für MSS nach 10 Jahren (Biomarkerkohorte, pTNM-Stadium III)	111
Abbildung 56: ROC-Analyse für RFS nach 5 Jahren (Biomarkerkohorte, pTNM-Stadium III)	112
Abbildung 57: ROC-Analyse für RFS nach 10 Jahren (Biomarkerkohorte, pTNM-Stadium III)	112

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: T-Kategorien der 7. Edition des AJCC	17
Tabelle 2: N-Kategorien der 7. Edition des AJCC	17
Tabelle 3: M-Kategorien der 7. Edition des AJCC	18
Tabelle 4: Stadien der 7. Edition des AJCC	19
Tabelle 5: T-Kategorien der 8. Edition des AJCC	20
Tabelle 6: N-Kategorien der 8. Edition des AJCC	21
Tabelle 7: M-Kategorien der 8. Edition des AJCC	22
Tabelle 8: Stadien der 7. Edition des AJCC	23
Tabelle 9: Definitionen der Endpunkte.....	55
Tabelle 10: Deskriptive Analyse (Gesamtkohorte).....	60
Tabelle 11: Cox-Regression für MSS, DMFS & RFS (Gesamtkohorte).....	71
Tabelle 12: Logistische Regression für MSS, DMFS & RFS (Gesamtkohorte)	73
Tabelle 13: Deskriptive Analyse (Biomarkerkohorte).....	75
Tabelle 14: Cox-Regression für MSS, DMFS & RFS (Biomarkerkohorte).....	95
Tabelle 15: Cox-Regression für MSS, DMFS & RFS (Biomarkerkohorte, pTNM-Stadium IA-IIA)	97
Tabelle 16: Cox-Regression für MSS, DMFS & RFS (Biomarkerkohorte, pTNM-Stadium IB-IIA)	99
Tabelle 17: Cox-Regression für MSS, DMFS & RFS (Biomarkerkohorte, pTNM-Stadium III)	101
Tabelle 18: Leistungskennzahlen der 7-Biomarker-Signatur immunoprint®	113

1 Einleitung & Ziel der Arbeit

Das maligne Melanom gewinnt seit den letzten Jahrzehnten stetig an Bedeutung. Es ist die Krebsart mit der am schnellsten ansteigenden Inzidenz und schon aktuell verantwortlich für die fünft- respektive vierthäufigsten bösartigen Tumorerkrankungen bei Männern und Frauen in Deutschland (1). Zurückzuführen ist dies unter anderem auf die zunehmende UV-Exposition der Haut, welche insbesondere in jungen Jahren der größte Risikofaktor für eine spätere Erkrankung ist (2). Verstärkt evoziert wird dies durch Verhaltensänderungen bei der Freizeitgestaltung sowie den Klimawandel.

Trotz einer 5-Jahres-Überlebensrate von circa 92% (2) ist das maligne Melanom aufgrund der hohen Fallzahlen medizinisch hochrelevant. Seine Aggressivität zeigt sich in Form einer frühen lymphogenen und hämatogenen Metastasierung, wodurch sich die Prognose für betroffene Patienten deutlich verschlechtert. Diese Tatsache macht insbesondere die individuelle Langzeitprognose mit dem Risiko des Progresses sowie den Heilungs- und Überlebenschancen für Erkrankte äußerst relevant. Zusätzlich beruhen auf dieser die Empfehlungen für die zu ergreifenden Therapie- und Nachsorgemaßnahmen, welche einen gravierenden Effekt auf den weiteren Verlauf der Krankheit haben können.

Aktuell basieren sowohl die Prognose als auch die Therapie auf der Tumorklassifikation des American Joint Committee on Cancer (AJCC). Die wichtigsten Staging-Kriterien sind hierbei die Tumordicke nach Breslow, der Nachweis einer Ulzeration, der Status des Sentinellymphknotens und das Vorhandensein von Fernmetastasen. Auch wenn diese Kriterien auf den neusten wissenschaftlichen Erkenntnissen beruhen, legen mehrere Studien nahe, dass die Aussagekraft, um präzise Vorhersagen treffen zu können, begrenzt ist, da die Tumorerkrankungen sich oft konträr der Erwartungen entwickeln (3).

Während maligne Melanome mit einer Tumordicke von weniger als 0,75 mm und ohne weitere Risikofaktoren meist einen harmlosen Verlauf erwarten lassen, versterben trotzdem immer wieder Patienten auch an geringinvasiven Melanomen. Des Weiteren stellt eine Tumordicke von mehr als 1 mm ein signifikant erhöhtes Risiko dar, weshalb man in diesen Fällen als zusätzliches diagnostisches Mittel den elektiven Eingriff einer Sentinellymphknoten-Biopsie durchführt (4). Der Status des Sentinellymphknotens hat aufgrund der aktuellen AJCC-Klassifikation sowohl für die Prognose als auch für die zu ergreifenden Therapiemaßnahmen deutliche Konsequenzen. So kann und wird

Patienten mit einem positiven Sentinel-Status eine adjuvante Therapie angeboten. Ebenso gibt es eine zugelassene Therapieoption für Patienten im AJCC Stadium IIB und IIC mit negativem Sentinelbefund, während es für Patienten mit einem tumorfreien Sentinellymphknoten in den frühen Stadien (IA-IIA) derzeit kein Angebot für eine weitere adjuvante Therapie gibt. Für diese Patienten ist eine standardisierte Nachsorge vorgesehen (5). Es erleiden jedoch trotzdem noch circa 13% der sentinelnegativen Patienten nach 5 Jahren einen Progress, während etwa die Hälfte der sentinelpositiven Patienten keine weitere Verschlechterung der Erkrankung erfährt (6).

So ist sogar trotz hoher Überlebensraten ein nicht kleiner Teil der Stadium-I-Melanome verantwortlich für die Mehrheit der durch Melanome verursachten Todesfälle (7).

Deshalb wird eine erhöhte Präzision in der Identifizierung derer Patienten, die einen Progress oder ein Rezidiv erleiden, angestrebt, um genauere Prognosen stellen zu können. Dies ist essenziell, um jene Patienten zu ermitteln, die von einer adjuvanten Therapie sowie einer engmaschigeren Nachsorge profitieren würden. Hierdurch könnte eine Übertherapie oder eine Unterversorgung vermieden werden.

Als neuen Ansatz hierfür hat die Firma Synvie GmbH die 7-Biomarker-Signatur immunoprint® weiterentwickelt. Aus ursprünglich 70 untersuchten Biomarker-Kandidaten wurde am Melanomgewebe immunhistochemisch eine Kombination von 7 Biomarker gefunden, die eine neue Risikobewertung zulässt (8).

Primäres Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der Zusammenhänge klinischer und pathologischer Parameter mit dem Sentinellymphknotenstatus sowie die Analyse von Ergebnissen der 7-Biomarker-Signatur in Bezug auf das rezidiv- und progressfreie Überleben und das melanomspezifische Überleben an einer bisher nicht untersuchten Melanomkohorte der Hautklinik der Universitätsmedizin Mainz.

Hierfür sollen retrospektiv und monozentrisch die Patienten der Hautklinik der Universitätsmedizin Mainz, die aufgrund einer Melanomerkrankung eine Sentinellymphknoten-Biopsie zwischen 2006 und 2015 erhalten haben, anhand der Tumordaten bei Erstdiagnose und der 5-Jahres-Follow-up-Daten untersucht werden. Soweit verfügbar sollen zusätzlich die Primärtumore pseudonymisiert einer immunhistochemischen Untersuchung durch die Firma Synvie GmbH unterzogen werden, um mit der Biomarker-Signatur einen Risikoscore zu ermitteln.

Das Bestreben ist, betroffenen Patienten im klinischen Alltag eine verbesserte Einschätzung der Prognose für den weiteren Verlauf ihrer Erkrankung zu geben und individuell geeignete Therapieoptionen zu ermöglichen.

2 Literaturdiskussion

2.1 Das maligne Melanom (MM)

Das Melanom ist ein bösartiger Tumor, der von Melanozyten ausgeht (9). In den meisten Fällen entsteht diese Tumorerkrankung an der Haut. In seltenen Fällen kann sie jedoch auch an Schleimhäuten, den Meningen und im Auge vorkommen (10). Wenn Melanin-produzierenden Zellen entarten, können sie sich sowohl lymphogen als auch hämatogen absiedeln. So bilden sich potenziell im Verlauf Metastasen, die folglich zum Versterben von Betroffenen führen können (11). Da Melanozyten nicht in einem Zellverband und ohne Interzellularbrücken proliferieren, können sie bereits in frühen Stadien vor allem in die dünnwandigen Lymphgefäße eindringen, weshalb das maligne Melanom als aggressiver Tumor gilt (12). Trotz Fortschritten in der Therapie, insbesondere durch die Einführung von Immuncheckpoint-Inhibitoren und zielgerichteten Therapien, stellt das metastasierte Melanom nach wie vor eine erhebliche therapeutische Herausforderung dar (13,14). Die frühzeitige Diagnose und präzise Stadieneinteilung sind daher von entscheidender Bedeutung für die Prognose und die Therapieplanung (5).

2.2 Epidemiologie

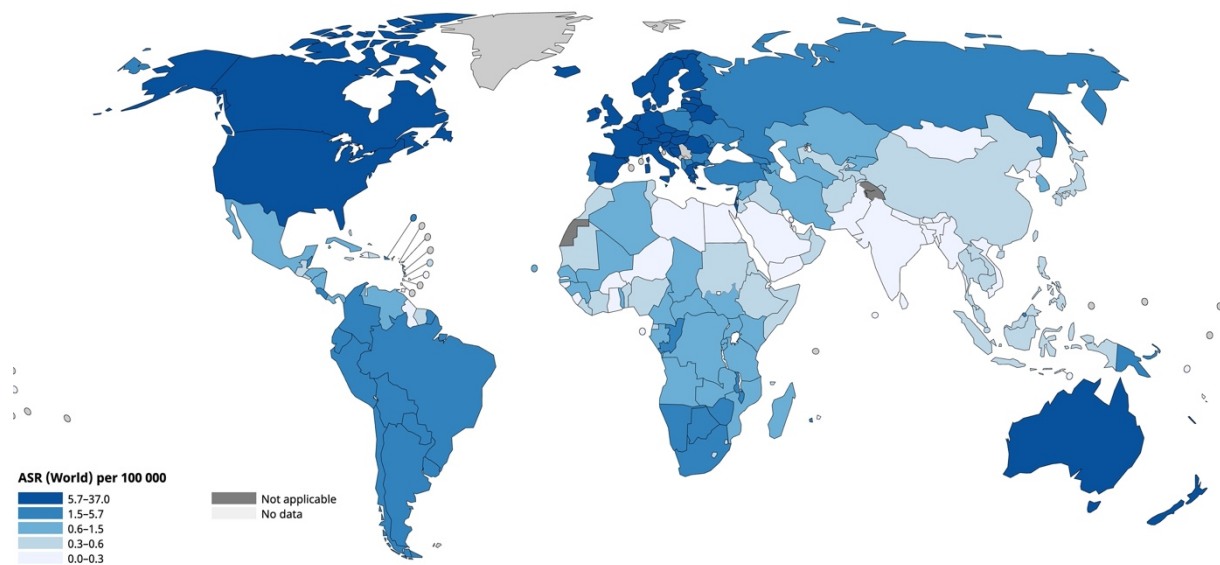
2.2.1 Weltweite Inzidenz und Mortalität

Hautkrebs gehört mit geschätzten 1.5 Millionen neuen Fällen im Jahr 2020 zu den meistdiagnostizierten Krebsarten weltweit. Für ungefähr ein Fünftel dieser Fälle ist das maligne Melanom verantwortlich (15). Es ist die tödlichste Form von Hautkrebs (16).

Weltweit werden im Jahr 2020 schätzungsweise 325.000 maligne Melanome neu diagnostiziert, während 57.000 Erkrankte versterben (15). Es gibt jedoch deutliche geographische Unterschiede bei der Inzidenz und Mortalität.

Von dieser Krankheit sind Bewohner des globalen Westens mit europäischen Wurzeln am häufigsten betroffen (17). Die höchsten Inzidenzraten gibt es in Australien und Neuseeland mit über 50 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohnern pro Jahr, gefolgt von Westeuropa, Nordamerika und Osteuropa (5,15). Generell sind hellhäutige Populationen stärker betroffen als dunkelhäutige Populationen (18). Die Mortalitätsraten sind in Ländern mit hoher Inzidenz tendenziell ebenfalls höher, wobei Fortschritte in der Therapie in den letzten Jahren zu einer Verbesserung der Überlebensraten geführt haben (19).

Age-Standardized Rate (World) per 100 000, Incidence, Both sexes, in 2022
Melanoma of skin



All rights reserved. The designations employed and the presentation of the material in this publication do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization / International Agency for Research on Cancer concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted and dashed lines on maps represent approximate borderlines for which there may not yet be full agreement.

Cancer TODAY | IARC
<https://gco.iarc.who.int/today>
Data version: Globocan 2022 - 08.02.2024
© All Rights Reserved 2024

International Agency
for Research on Cancer
World Health
Organization

Abbildung 1: globale Inzidenzrate malignes Melanom 2022 beider Geschlechter (17)

2.2.2 Inzidenz und Mortalität in Deutschland

In Deutschland ist das maligne Melanom im Jahr 2020 laut dem Robert-Koch-Institut die fünft- respektive vierthäufigste Krebsneuerkrankung bei Männern und Frauen in Deutschland. So erkrankten im Jahr 2020 etwa 23.560 Menschen neu an einem kutanen Melanom. Die altersstandardisierte Inzidenzrate lag bei knapp 20 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohnern pro Jahr. Die altersstandardisierte Mortalitätsrate betrug zwischen 1,4 Todesfällen bei Frauen und 2,5 Todesfällen bei Männern pro 100.000 Einwohnern pro Jahr (1).

2.2.3 Zeitliche Entwicklung der Inzidenzen und Mortalität

Historisch betrachtet ist das maligne Melanom eine seltenere Erkrankung. Über die letzten 70 Jahre hat die Inzidenz jedoch stetig zugenommen (18). Laut Volkenandt war es zeitweise sogar die Krebsart mit der am schnellsten ansteigenden Inzidenz (19). Dieser Anstieg wird auf verschiedene Faktoren zurückgeführt, darunter veränderte Freizeitgewohnheiten mit vermehrter Sonnenexposition, die Nutzung von Solarien und eine verbesserte Früherkennung (18).

In einigen Ländern mit hohen Inzidenzen wie zum Beispiel den USA und Australien hat sich die Inzidenzrate inzwischen jedoch stabilisiert oder sogar abgenommen.

Trotzdem nehmen die Inzidenzraten in Schweden und anderen europäischen Ländern weiterhin zu (20).

In Bezug auf Deutschland wurden konkrete Daten hierzu kontinuierlich seit 1970 lediglich im Saarland mit ca. einer Million Einwohner erhoben. So sind im Zeitraum von 1970 bis 2009 die Inzidenzraten damals jährlich um ca. 17% gestiegen (5). Seit 1999 hat in ganz Deutschland die Inzidenz ebenfalls deutlich zugenommen. Dabei ist um 2008 ein abrupter Anstieg zu beobachten, was vermutlich auf die Einführung des Hautkrebsscreenings im Juli 2008 zurückzuführen ist (1). Seit 2011 stagniert die Inzidenz auf diesem erhöhten Niveau. Die Sterberaten blieben über den beobachteten Zeitraum relativ konstant, was eine erfolgreiche Kompensation durch Früherkennung und neue Therapieoptionen vermuten lässt.

Altersstandardisierte Neuerkrankungs- und Sterberaten nach Geschlecht, ICD-10 C43, Deutschland 1999 – 2020/2021
je 100.000 (alter Europastandard)

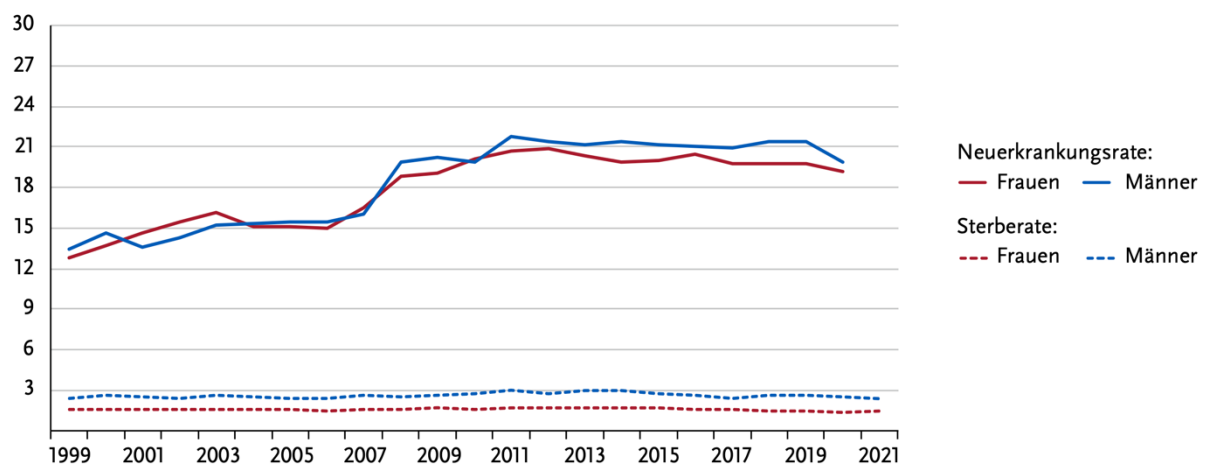


Abbildung 2: Altersstandardisierte Neuerkrankungs- und Sterberaten nach Geschlecht, ICD-10 C34, Deutschland 1999-2020/2021 (1)

Weiterhin ist laut Arnold et al. bei gleichbleibender Entwicklung der Inzidenzraten bis 2040 weltweit mit einem Anstieg von 50% bei den Neudiagnosen sowie 68% bei den Todesfällen zu rechnen (15).

2.3 Risikofaktoren

Die Entstehung des malignen Melanoms ist ein multifaktorieller Prozess, an dem sowohl genetische Faktoren als auch Umweltfaktoren beteiligt sind (21). Die Kenntnis dieser Risikofaktoren ist grundlegend für die Prävention, Früherkennung und somit auch die Prognose von Betroffenen.

Externe Risikofaktoren umfassen Umwelt- und Verhaltensfaktoren, die zur Entwicklung eines Melanoms beitragen können. Unter diesen stellt die Exposition mit ultravioletter Strahlung, primär durch Sonnenlicht, einen bedeutenden modifizierbaren Risikofaktor dar (22). UV-Strahlung hat das Potenzial, die DNA in Hautzellen zu schädigen. Diese Schädigung kann Gene beeinflussen, die das Wachstum von Melanozyten kontrollieren, und so potenziell durch Entartung zur Entstehung von Melanomen führen. Sowohl intermittierende als auch chronische Sonnenexposition erhöhen dabei das Melanom-Risiko. Insbesondere intermittierende Exposition während der Kindheit und Jugend ist stark mit Melanomen assoziiert (23). Vor allem Sonnenbrände erhöhen das Risiko, später im Leben ein Melanom zu entwickeln, signifikant (24).

Auch künstliche UV-Strahlungsquellen, wie z. B. Solarien, stellen ein erhebliches Risiko für die Entwicklung von Melanomen dar. Eine Meta-Analyse ergab, dass Personen unter 35 Jahren, die Solarien benutzten, ein um 75 % erhöhtes Melanom-Risiko aufwiesen. Die Intensität der UVA-Strahlung, die von Solarien emittiert wird, ist oft höher als die des natürlichen Sonnenlichts, was das Risiko weiter erhöht (25).

Neben der UV-Exposition spielen auch individuelle Merkmale eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Melanomen. Menschen mit heller Hautpigmentierung, hellen Haaren und Augenfarben haben weniger Melanin, um ihre Haut vor UV-Schäden zu schützen, was sie anfälliger für Melanome macht. Sommersprossen, kleine, konzentrierte Bereiche von Melanin, sind ebenfalls mit einem erhöhten Melanom-Risiko verbunden (26). Die Anzahl der Muttermale, insbesondere atypischer Nävi (Muttermale mit unregelmäßigen Formen, Farben oder Rändern), ist ein weiterer wichtiger Risikofaktor. Atypische Nävi können sich selbst in ein Melanom verwandeln oder auf eine erhöhte Anfälligkeit für die Entwicklung eines Melanoms an anderen Hautstellen hinweisen (27,28).

Eine familiäre Vorbelastung mit Melanomen, insbesondere bei Verwandten ersten Grades, erhöht ebenfalls das Erkrankungsrisiko. Dies deutet auf eine genetische Komponente bei der Melanomanfälligkeit hin. Mehrere Gene wurden mit einem erhöhten Melanomrisiko in Verbindung gebracht, darunter zum Beispiel CDKN2A und MC1R. CDKN2A ist ein Tumorsuppressorgen, weshalb Mutationen in diesem Gen mit einem erhöhten Melanom-Risiko verbunden sind, insbesondere in Familien mit einer Erkrankungshistorie (29). MC1R-Genvarianten sind mit roten Haaren, heller Haut und

erhöhter Empfindlichkeit gegenüber UV-Strahlung assoziiert. Das Melanocortin-1-Rezeptor-Gen spielt eine Rolle bei der Melaninproduktion, und bestimmte Varianten dieses Gens können die Pigmentierung der Haut beeinflussen und die Anfälligkeit für UV-Schäden erhöhen (27).

Personen mit bereits einem Melanom in ihrer Anamnese haben ein deutlich erhöhtes Risiko, ein weiteres primäres Melanom zu entwickeln. Studien haben gezeigt, dass etwa 1–8 % der Patienten mit einem Melanom in der Vorgeschichte mehrere primäre Melanome entwickeln (24). Auch andere Hautkrebserkrankungen in der Anamnese, wie Basalzellkarzinome oder Plattenepithelkarzinome, sind ebenfalls mit einem erhöhten Melanom-Risiko verbunden (30).

Auch bestimmte Lebensstilfaktoren können das Melanom-Risiko beeinflussen. Ein hoher Alkoholkonsum im Laufe des Lebens wurde als möglicher Risikofaktor identifiziert (27). Die Korrelation von Alkoholkonsum und Hautkrebs war stärker für Tumore, die den Rumpf befallen, als den Hals, Nacken oder andere Extremitäten (31). Menschen mit geschwächtem Immunsystem, z. B. nach einer Organtransplantation oder bei Erkrankungen wie HIV, haben ebenfalls ein erhöhtes Risiko (27).

Schließlich ist zu beachten, dass Melanome häufiger bei Männern als bei Frauen auftreten (1). Jedoch lässt sich bei Frauen unter 40 ein anderer Trend beobachten. Eine in der Literatur genannte Erklärung ist hierbei die Zunahme einer aus kosmetischen Gründen erhöhten Sonnenexposition (32).

Generell nimmt die Inzidenz von Melanomen mit dem Alter zu, wobei die höchsten Raten bei älteren Erwachsenen beobachtet werden. Das durchschnittliche Alter bei Erstdiagnose beträgt 66 Jahre (33).

Es ist wichtig zu betonen, dass das Zusammenspiel verschiedener Risikofaktoren die Wahrscheinlichkeit einer Melanom-Entwicklung beeinflusst. Personen mit mehreren Risikofaktoren, wie z. B. heller Haut, vielen atypischen Nävi und einer familiären Vorbelastung mit Melanomen, sollten besonders auf Sonnenschutz achten und regelmäßige Hautuntersuchungen durchführen lassen.

2.4 Diagnostik

Die frühe Erkennung eines malignen Melanoms ist von hoher Bedeutung. Im besten Fall können so insbesondere Entartungen an der Haut in einem Stadium erkannt

werden, bei dem die Basalmembran noch nicht durchdrungen wurde. In diesem Fall handelt es sich um ein In-situ-Melanom. Durch eine chirurgische Entfernung mit ausreichendem Sicherheitsabstand erfahren Betroffene keine Einschränkung in Bezug auf das Gesamtüberleben sowie auf das krebsspezifische Überleben (34).

Sobald ein Pigmenttumor neu auftritt, wächst, oder sich farblich verändert, sollte er deshalb dermatologisch untersucht werden. Die Ugly-Duckling-Regel, zu deutsch die hässliche Entlein-Regel, orientiert sich an ganzen Körperarealen wie z.B. dem Rücken. Fällt hierbei ein Pigmentfleck im Vergleich zu den umliegenden wegen seiner Form, Farbe oder Größe auf, sollte er genauer untersucht werden (35). Eine erste Einschätzung erfolgt meist nach der ABCD+E-Regel. Hierbei können eine Asymmetrie, eine unregelmäßige Begrenzung, eine uneinheitliche Pigmentierung (Colorit), ein Durchmesser von mehr als 6mm oder eine Evolution bzw. Entwicklung (manchmal jedoch auch definiert als Erhabenheit über das Hautniveau) erste Hinweise auf eine maligne Entartung sein (36). Die diagnostische Genauigkeit eines malignen Melanoms liegt mit bloßem Auge jedoch nur bei 60%. Durch die Verwendung eines Dermatoskops kann diese um 49% verbessert werden (37,38).

Bei Verdacht auf Malignität sollte das suspekte Hautareal vollständig und mit einem entsprechenden Sicherheitsabstand von ungefähr 2mm chirurgisch exzidiert und histopathologisch untersucht werden (39). Wird bei der histopathologischen Untersuchung die Diagnose eines malignen Melanoms gestellt, werden nach AJCC´2017 obligatorisch die maximale vertikale Tumordicke nach Breslow und das Vorhandensein einer Ulzeration bestimmt. Zuvor wurde nach AJCC´2009 zusätzlich die Anzahl der Mitosen pro Quadratmillimeter bestimmt. Eine Erhebung des Melanom-Subtyps anhand der WHO-Klassifikation sollte zusätzlich erfolgen (5). Zusätzlich werden der Clark-Level sowie sonstige Auffälligkeiten untersucht.

Bei histologisch bestätigter Diagnose eines malignen Melanoms ist eine körperliche Untersuchung vorzunehmen. Hierbei wird nach weiteren verdächtigen pigmentierten Läsionen, Satellitenfiliae, in-Transit-Metastasen, Lymphknotenmetastasen und Fernmetastasen gesucht. Patienten mit einem pT1a-Melanom haben lediglich ein niedriges Risiko, weshalb keine weiteren Untersuchungen vorgenommen werden müssen. In höheren T-Stadien, ab T1b bis pT4b, stehen Ultraschalluntersuchungen für lokoregionäre Lymphknoten-Metastasen als Optionen zur Beurteilung der Tumorausbreitung vor einer Sentinellymphknotenbiopsie zur Verfügung.

Um festzustellen, ob ein Primärtumor bereits Metastasen gebildet hat, sollte ab einer Tumordicke von 1,0 mm eine Sentinellymphknoten-Biopsie durchgeführt werden. Bei zusätzlichen Risikofaktoren wie einer Ulzeration, einer erhöhten Mitoserate oder einem jungen Lebensalter von weniger als 40 Jahren zum Zeitpunkt der Diagnose ist diese jedoch schon ab 0,75mm induziert (5).

Neben dem Wächterlymphknoten werden in Abhängigkeit vom klinischen Tumorstadium noch weitere Körperareale mit Hilfe von bildgebenden Verfahren auf Metastasen untersucht. Weitere Bildgebende Verfahren wie Magnetresonanztomographie (MRI), Positronenemissionstomographie-Scan (PET-CT) und Computertomographien (CT) des Hirns sollten jedoch nur bei Patienten mit hohem Risiko, ab pT3b, angewendet werden.

2.5 Immunoprint®

Immunoprint® ist eine immunhistochemische Biomarker-Signatur, die am Melanomgewebe durchgeführt wird und die speziell für die Risikostratifizierung von Patienten mit kutanem Melanom in frühen Stadien entwickelt wurde (8). Der Test nutzt eine Untersuchung von sieben Biomarkern (Bax, Bcl-X, β -Catenin, CD20, Cox-2, MTAP, PTEN), um Patienten in eine Hoch- oder Niedrigrisikogruppe bezüglich des Risikos für Krankheitsrezidive, Metastasierung und melanomspezifische Mortalität einzuteilen (8,40). Der Assays identifiziert sogenannte „versteckte Hochrisikopatienten“ innerhalb von Patientengruppen, die üblicherweise als risikoarm gelten, wie beispielsweise Patienten mit Melanomen im AJCC v8 Stadium I-IIA (8,40,41).

2.5.1 Methodik

Mit Hilfe der Biomarker-Signatur wird ein Risikoscore ermittelt, der auf der immunhistochemischen Expression von sieben spezifischen Biomarkern im Gewebe des primären Melanoms basiert (8). Diese Proteine spielen eine entscheidende Rolle in fundamentalen zellulären Prozessen wie Apoptose, Zellzykluskontrolle, Signaltransduktion und Entzündungsreaktionen.

Die Signatur enthält prognostisch ungünstige sowie prognostisch günstige Marker. Zum einen gibt es fünf Marker, deren erhöhte Expression mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist (8).

Bax ist als Mitglied der Bcl-2-Proteinfamilie ein zentraler Förderer der Apoptose. Obwohl eine hohe Expression pro-apoptotischer Proteine grundsätzlich als tumorhemmend angesehen werden könnte, deutet eine starke zytoplasmatische Anfärbung im Kontext dieser Signatur auf einen dysregulierten Apoptose-Signalweg und ein aggressiveres Tumorverhalten hin (8)

Das Protein Bcl-X gehört ebenfalls zur Bcl-2-Familie, wirkt jedoch anti-apoptotisch. Eine Überexpression von Bcl-X schützt Krebszellen vor Zelltodsignalen und wird mit einer Resistenz gegen Chemo- und Strahlentherapie in Verbindung gebracht (8).

Das Enzym COX-2 ist an der Synthese von Prostaglandinen beteiligt und spielt eine Schlüsselrolle bei Entzündungsprozessen. In verschiedenen Tumorarten, einschließlich des Melanoms, wird COX-2 mit erhöhter Invasivität, Angiogenese und einer schlechteren Prognose in Verbindung gebracht (8,42).

PTEN ist ein bekanntes Tumorsuppressorgen, das den PI3K/Akt-Signalweg negativ reguliert, welcher Zellwachstum, Proliferation und Überleben steuert (8,43). Ein Verlust der PTEN-Funktion ist in vielen Krebsarten ein Treiber der Progression (44). Jedoch wurde im Rahmen der immunoprint®-Signatur eine starke zytoplasmatische Expression von PTEN als Risikomarker identifiziert (8).

Das Vorhandensein von B-Lymphozyten, die das Oberflächenprotein CD20 exprimieren, wird als Risikofaktor gewertet. Die genaue Rolle von B-Zell-Infiltraten im Melanom ist noch unklar, aber es wird vermutet, dass sie an der Etablierung einer immunsuppressiven Tumormikroumgebung beteiligt sein könnten (8).

Neben den fünf Risikomarkern gibt es zwei weitere protektive Schutzmarker. Bei diesen beiden Markern ist nicht die Expression, sondern der Verlust der Expression mit einem höheren Risiko assoziiert. Ihr Vorhandensein ist daher prognostisch günstig (8).

Das Enzym MTAP ist am Polyamin- und Methionin-Stoffwechsel beteiligt (43). Das Gen für MTAP liegt auf dem Chromosom 9p21 in unmittelbarer Nähe zu wichtigen Tumorsuppressorgenen wie p15 und p16 (45). Ein Verlust der MTAP-Expression, oft durch Gendeletionen, die auch die benachbarten Gene betreffen, ist mit einer

Progression von melanozytären Tumoren assoziiert (43,45). Darüber hinaus beeinflusst MTAP die Aktivität von STAT1 und ist somit mit dem Ansprechen auf eine Interferontherapie verknüpft (8,43).

β -Catenin ist als zentraler Bestandteil des Wnt-Signalwegs an Zelladhäsion und Transkriptionsregulation beteiligt. Während in vielen anderen Krebsarten eine Aktivierung von β -Catenin die Tumorentstehung fördert, ist beim Melanom der Verlust der zytoplasmatischen Expression mit einer schlechteren Prognose verbunden (8).

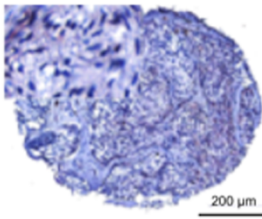
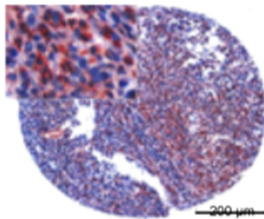
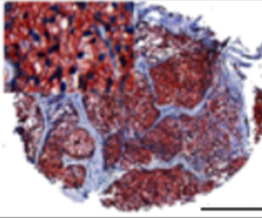
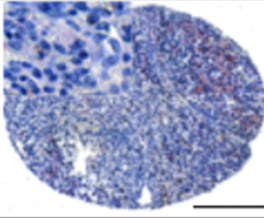
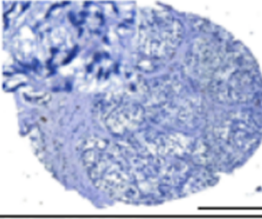
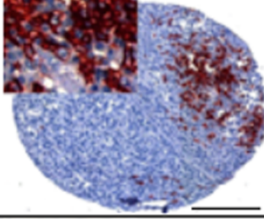
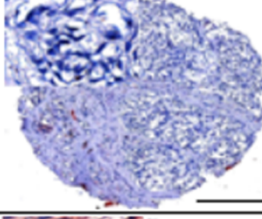
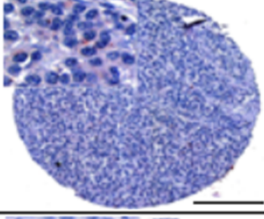
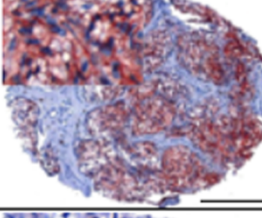
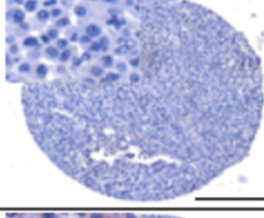
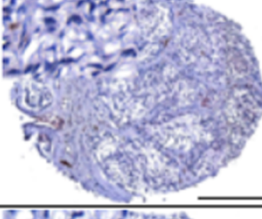
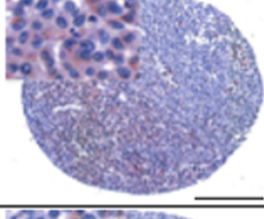
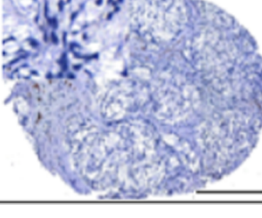
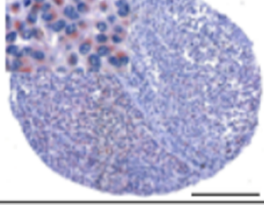
A: Protein (function)	B: Localization	C: Low-risk signature melanoma (no. 140)	D: High-risk signature melanoma (no. 137)
Bax: Bcl-2 family protein, proapoptotic	Cytoplasmic		
Loss of β-Catenin: Key downstream effector in Wnt signaling pathway, implicated in two major biological processes: embryonic development and tumorigenesis	Cytoplasmic		
Appearance of CD20 positive B- lymphocytes: Pan-B-cell marker, stem cell marker candidate	Cell membrane and cytoplasmic		
Bcl-X: Bcl-2 family protein, antiapoptotic	Cytoplasmic		
Loss of MTAP: Constitutive enzyme of the polyamine metabolism; modulator of interferon-dependent signaling	Cytoplasmic		
PTEN: Tumor suppressor implicated in a variety of human cancers; major negative regulator of the PI3K/Akt signaling pathway	Cytoplasmic		
Cox-2: Cyclooxygenase for bio-synthesis of prostaglandins under inflammatory conditions; overexpressed in a variety of tumors	Cytoplasmic		

Abbildung 3: Immunhistochemische Beispiel-Färbung der Risikomarker für jeweils ein „High-Risk“- und ein „Low-Risk“-Melanom (8)

Nach der Färbung von Gewebeschnitten mit dem Antikörperpanel, wird die Expression der 7 Marker anhand eines Bewertungssystems von 0 bis +3 bestimmt. Der Expressionswert jedes Markers wird mit einem Koeffizienten multipliziert, der aus der ursprünglichen Entdeckungsstudie zur 7-Marker-Signatur abgeleitet wurde. Die Produkte werden summiert, normalisiert und anhand eines Schwellenwerts in Hochrisiko- oder Niedrigrisikoklassifizierungen eingeteilt. Ein Grenzwert von 0,135 trennt die Gruppen. Die mit diesem Algorithmus errechneten Risikowerte unter 0,135 gelten als niedriges Risiko, während Werte über 0,135 eine hohe Risikokategorie darstellen.

2.5.2 Klinischer Nutzen

Der primäre klinische Nutzen des immunoprint®-Assays liegt in der verbesserten Risikostratifizierung von Patienten mit Melanomen in frühen Stadien, den AJCC Stadien I-IIA (40,46). Aktuelle Staging-Methoden wie Tumordicke und Ulzeration sind zwar etablierte prognostische Parameter, können aber das individuelle Risiko eines Patienten nur bedingt vorhersagen (8). Die immunoprint®-Signatur identifiziert eine Untergruppe von Patienten, die trotz eines frühen Tumorstadiums ein hohes Risiko für Rezidive und Metastasierung aufweisen (40). Diese Patienten könnten Kandidaten für eine intensiverte Nachsorge oder die Aufnahme in klinische Studien sein, die den Nutzen adjuvanter Therapien in dieser Patientengruppe untersuchen (46). Gleichzeitig erhöht der Test die Sicherheit bei der Einstufung von Patienten mit einem tatsächlich niedrigen Risiko. Dies kann dazu beitragen, diesen Patienten potenziell belastende und nebenwirkungsreiche Therapien zu ersparen, deren Nutzen in ihrem Fall fraglich wäre (46).

Die 7-Marker-Signatur immunoprint® ist ein vielversprechendes Instrument zur Verbesserung der Risikostratifizierung und der Behandlungsentscheidungen bei kutanem Melanom im Frühstadium. Eine analytische Validierung des Assays hat bereits seine Präzision und Reproduzierbarkeit bestätigen können, und bisher durchgeführte klinische Validierungsstudien haben den prognostischen Wert bekräftigt (40,46). Sie stellt eine Ergänzung zur herkömmlichen pathologischen Stadieneinteilung dar und hat das Potenzial, die klinische Entscheidungsfindung zu unterstützen und den Weg zu einer personalisierten Melanomtherapie zu ebnen (8,40).

2.6 Stadieneinteilung/ Stratifizierung

2.6.1 TNM-Klassifikation der AJCC

Die TNM-Klassifikation ist eine Einteilung bösartiger Tumorerkrankungen. Diese Einteilung in Stadien, auch genannt Staging, ist ein entscheidender Prozess, um das Ausmaß der Erkrankung zu verstehen, eine Aussage zur Prognose treffen zu können, Behandlungsentscheidungen zu leiten sowie die Kommunikation von medizinischem Fachpersonal zu erleichtern (47). Das Staging-System des American Joint Committee on Cancer (AJCC) ist dabei der international anerkannte Standard für die Beschreibung des klinisch-pathologischen Ausmaßes bei Krebserkrankungen. Dies gilt folglich auch für Patienten, die an einem malignen Melanom erkrankt sind (48). Zudem dient es als Grundlage für die Meldungen an Krebsregister und für das Design und die Analyse klinischer Studien (47).

Das AJCC-Staging-System verwendet dabei die TNM-Klassifikation, die drei Hauptaspekte des Tumors berücksichtigt:

„T“ steht hierbei für „Tumor“ und beschreibt die Eigenschaften des Primärtumors, wie z.B. seine Dicke und das Vorhandensein einer Ulzeration.

„N“ steht für „Nodes“, gemeint Lymphknoten, und gibt das Vorhandensein oder Fehlen von Metastasen in regionalen Lymphknoten und das Ausmaß der Lymphknotenbeteiligung an, einschließlich nicht-nodaler regionaler Metastasierung.

Zuletzt gibt die Kategorie „M“, welche für „Metastasen“ steht Auskunft über das Vorhandensein oder Fehlen von Fernmetastasen (47).

Die TNM-Kategorien werden kombiniert, um Gesamtstadiengruppen zu definieren, die typischerweise von Stadium 0, das ein Melanoma in situ beschreibt, bis Stadium IV, welches für Melanome mit Fernmetastasen steht, reichen und mit der Prognose korrelieren (48).

Seit 1977 publiziert das American Joint Committee on Cancer diese weltweit anerkannte Krebs-Klassifikation. Sie wurde bereits mehrfach aktualisiert, um dem zunehmenden Verständnis der Krankheit und ihrer Auswirkung auf das Überleben von Betroffenen Rechnung zu tragen. Aktuell wird die 8. Edition des Cancer Staging Manuals verwendet, die 2017 erschienen ist und einige wesentliche Änderungen zur Vorgängerversion beinhaltet (47,49)

2.6.2 7. Edition der AJCC

Die 7. Ausgabe des AJCC-Stagings für kutane Melanome wurde 2009 eingeführt und 2010 implementiert. Ebenso wie frühere Ausgaben verwendete sie die TNM-Klassifikation, um das Ausmaß der Erkrankung basierend auf dem Primärtumor (T), den regionalen Lymphknoten (N) und Fernmetastasen (M) zu kategorisieren (50).

Wichtige Aspekte der 7. Ausgabe in Bezug auf die T-Kategorie umfassten die Tumordicke nach Breslow in Millimetern, den mitotischen Index in Anzahl der Mitosen pro Quadratmillimeter sowie das Vorhandensein oder Fehlen einer Ulzeration des Primärtumors und wurden zur weiteren Subklassifizierung der T-Kategorien verwendet.

Tabelle 1: T-Kategorien der 7. Edition des AJCC

7. Edition des AJCC		
T Kategorie	Tumordicke (mm)	Ulzeration
TX	Stadium nicht bestimmbar	
T0	-	
Tis	Melanoma in Situ	
T1	≤1.0 mm	unb. oder n.s.
T1a	≤1.0 mm	ohne Ulzeration und Mitosen <1/mm ²
T1b	≤1.0 mm	mit Ulzeration oder Mitosen ≥1/mm ²
T2	1.01–2.00 mm	unb. oder n.s.
T2a	1.01–2.00 mm	ohne Ulzeration
T2b	1.01–2.00 mm	mit Ulzeration
T3	2.01–4.00 mm	unb. oder n.s.
T3a	2.01–4.00 mm	ohne Ulzeration
T3b	2.01–4.00 mm	mit Ulzeration
T4	>4.00 mm	unb. oder n.s.
T4a	>4.00 mm	ohne Ulzeration
T4b	>4.00 mm	mit Ulzeration

Für die N-Kategorie in der 7. Ausgabe wurden regionale Lymphknotenmetastasen bewertet. Diese wurden per Definition in "mikroskopisch" und "makroskopisch" unterschieden. Mikroskopisch bedeutet hierbei, dass Lymphknotenmetastasen durch eine Sentinellymphknotenbiopsie diagnostiziert wurden, während makroskopische Lymphknotenmetastasen klinisch nachgewiesen wurden (51).

Tabelle 2: N-Kategorien der 7. Edition des AJCC

7. Edition des AJCC		
N Kategorie	Anzahl der tumorbefallenen regionalen Lymphknoten und nodale Metastasierungslast	Vorhandensein von In-Transit-, Satelliten- und/oder Mikrosatellitenmetastasen
NX	regionale Knoten nicht beurteilt (z. B. SLNB nicht durchgeführt, regionale Knoten zuvor aus einem anderen Grund entfernt)	nein
N0	keine	nein
N1	1 LK	nein
N1a	1 LK mit Mikrometastase (durch SLNB entdeckt)	nein

N1b	1 LK mit Makrometastase (klinisch nachweisbar und pathologisch bestätigt)	nein
N2		
N2a	2–3 LK mit Mikrometastase (durch SLNB entdeckt)	nein
N2b	2–3 LK mit Makrometastase (klinisch nachweisbar und pathologisch bestätigt)	nein
N2c	keine	in-Transit/Satelliten-Metastase ohne metastasierten LK
N3	≥4 metastasierte LK oder verbackene LK oder In-Transit/Satelliten-Metastase mit metastasierten LK	

Die M-Kategorie in der 7. Ausgabe klassifizierte das Vorhandensein von Fernmetastasen an verschiedenen Stellen. Hierzu wird nach anatomischer Lokalisation in 3 Subgruppen unterteilt. Diese sind zum einen definiert als Fernmetastasen in Haut, Unterhaut oder Lymphknoten, zum anderen als Lungenmetastasen und zuletzt als alle anderen viszerale Metastasen. Weiterhin kann ein erhöhter Serum-Laktatdehydrogenase (LDH)-Spiegel zu einer Einordnung in eine höhere M-Subkategorie führen (50,52,53)

Tabelle 3: M-Kategorien der 7. Edition des AJCC

7. Edition des AJCC		
M Kategorie	Anatomische Lokalisation	LDH Level
M0	keine Fernmetastasen	
M1	Nachweis von Fernmetastasen	
M1a	Fernmetastasen in Haut, Unterhaut oder Lymphknoten	normal
M1b	Lungenmetastasen	normal
M1c	alle anderen viszerale Metastasen, Jede Fernmetastase	normal, erhöht

Aus der Kombination der TNM-Stadien ergaben sich nach der 7. Edition der AJCC die Stadien 0 bis 4.

Tabelle 4: Stadien der 7. Edition des AJCC

7. Edition des AJCC			
Pathologisch prognostische Stadien	T	N	M
0	Tis	N0	M0
IA	T1a	N0	M0
IB	T1b, T2a	N0	M0
IIA	T2b, T3a	N0	M0
IIB	T3b, T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
IIIA	T1–4a	N1a, N2a	M0
IIIB	T1–4b	N1a, N2a	M0
	T1–4a	N1b, N2b/c	M0
IIIC	T1–4b	N1b, N2b/c	M0
	Jedes T	N3	M0
IV	Jedes T	Jedes N	M1

2.6.3 8. Edition der AJCC mit den aktuellen Neuerungen

Die 8. Ausgabe des AJCC-Staging-Systems für kutane Melanome ersetzte die 7. Ausgabe und wurde ab 2018 implementiert (50). Diese Überarbeitung beinhaltete viele Änderungen, die zu wesentlichen Verschiebungen der Unterstadien und somit wichtigen klinischen Neubewertungen führt (48). Die Änderungen basieren auf Analysen einer großen internationalen Melanom-Datenbank mit dem Ziel das Staging, die Prognose, die Risikostratifizierung sowie die Auswahl von Patienten für klinische Studien zu verbessern (50,51).

In der T-Kategorie bleibt die Breslow-Dicke weiterhin ein entscheidendes Kriterium, die Grenzwerte wurden jedoch angepasst. T1a-Melanome sind nun definiert als Melanom unter 0,8 mm ohne Ulzeration. T1b-Melanome haben entweder eine Tumordicke von unter 0,8 mm mit Ulzeration oder reichen von 0,8 bis 1,0 mm mit oder ohne Ulzeration. Zudem wurde bei der Angabe eine Reduzierung der Dezimalstelle von zwei auf eine vorgenommen. Die Dicke soll also auf die nächsten 0,1 mm und nicht 0,01 mm gemessen werden. Ein formales Rundungsschema wurde eingeführt (54).

Die Mitoserate wird nicht mehr als Kriterium für die T-Kategorie verwendet (55–57). Sie sollte jedoch weiterhin dokumentiert werden, da sie ein wichtiger prognostischer Faktor bleibt (50).

Weiterhin wird die Kategorie T0 verwendet, wenn kein Hinweis auf einen Primärtumor vorliegt oder der Ort unbekannt ist, während die Kategorie Tis ein Melanoma in situ bezeichnet. TX findet Anwendung, wenn keine Tumordicke bestimmt werden kann (50).

Tabelle 5: T-Kategorien der 8. Edition des AJCC

8. Edition des AJCC		
T Kategorie	Tumordicke (mm)	Ulzeration
TX	primäre Tumordicke nicht bestimmbar	primäre Tumordicke nicht bestimmbar
T0	kein Anhalt für Primärtumor	kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Melanoma in situ	Melanoma in situ
T1	≤1.0 mm	unb. oder n.s.
T1a	<0.8 mm	ohne Ulzeration
	<0.8 mm	mit Ulzeration
T1b	0.8–1.0 mm	mit oder ohne Ulzeration
T2	>1.0–2.0 mm	unb. oder n.s.
T2a	>1.0–2.0 mm	ohne Ulzeration
T2b	>1.0–2.0 mm	mit Ulzeration
T3	>2.0–4.0 mm	unb. oder n.s.
T3a	>2.0–4.0 mm	ohne Ulzeration
T3b	>2.0–4.0 mm	mit Ulzeration
T4	>4.0 mm	unb. oder n.s.
T4a	>4.0 mm	ohne Ulzeration
T4b	>4.0 mm	mit Ulzeration

Die N-Kategorie in der 8. Ausgabe spiegelt die Anzahl und das Ausmaß der tumorbefallenen regionalen Lymphknoten und das Ausmaß der nicht-nodalen regionalen Metastasierung wider (50).

Lymphknotenmetastasen werden nun in Bezug auf ihre klinische Nachweisbarkeit neu definiert. Ehemals als "mikroskopisch" bezeichnete Lymphknotenmetastasen sind nun als "klinisch okkult" benannt und werden durch eine SLN-Biopsie diagnostiziert. Die zuvor als "makroskopisch" benannten Lymphknotenmetastasen werden jetzt als "klinisch nachgewiesen" definiert und werden durch klinische oder radiologische Untersuchung diagnostiziert (50).

Da Mikrosatelliten, Satelliten- und In-Transit-Metastasen mit ähnlichen Überlebensergebnissen assoziiert sind, wurden sie zu Staging-Zwecken zusammengefasst. Sie können nun bei Vorhandensein zur Einteilung in eine der neuen N-Kategorien mit dem Suffix „c“ führen (50,58) .

Die Erhöhung der Anzahl der N-Kategorie-Unterkategorien dient der Berücksichtigung von Faktoren, die mit der Prognose assoziiert sind (51).

Tabelle 6: N-Kategorien der 8. Edition des AJCC

8. Edition des AJCC		
N Kategorie	Anzahl der tumorbefallenen regionalen Lymphknoten und nodale Metastasierungslast	Vorhandensein von In-Transit-, Satelliten- und/oder Mikrosatellitenmetastasen
NX	regionale Lymphknoten nicht beurteilt (z. B. SLNB nicht durchgeführt, regionale Lymphknoten zuvor aus einem anderen Grund entfernt) Ausnahme: pathologische N-Kategorie ist für T1-Melanome nicht erforderlich, cN verwenden.	nein
N0	keine regionalen Metastasen nachgewiesen	nein
N1	1 tumorbefallener Lymphknoten oder In-Transit-, Satelliten- und/oder Mikrosatellitenmetastasen ohne tumorbefallene Lymphknoten	
N1a	1 klinisch okkult LK (d. h. durch SLNB entdeckt)	nein
N1b	1 klinisch nachgewiesener LK	nein
N1c	keine regionale Lymphknotenerkrankung	ja
N2	2 oder 3 tumorbefallene Lymphknoten oder In-Transit-, Satelliten- und/oder Mikrosatellitenmetastasen mit 1 tumorbefallenen Lymphknoten	
N2a	2 oder 3 klinisch okkulte LK (d. h. durch SLNB entdeckt)	nein
N2b	2 oder 3 LK, von denen mindestens 1 klinisch nachgewiesen wurde	nein
N2c	1 klinisch okkult oder klinisch nachgewiesener LK	ja
N3	≥4 tumorbefallene Lymphknoten oder In-Transit-, Satelliten- und/oder Mikrosatellitenmetastasen mit ≥2 tumorbefallenen Lymphknoten oder eine	

	beliebige Anzahl von verbackenen Lymphknoten ohne oder mit In-Transit-, Satelliten- und/oder Mikrosatellitenmetastasen	
N3a	≥4 klinisch okkulte LK (d. h. durch SLNB entdeckt)	nein
N3b	≥4 LK, von denen mindestens 1 klinisch nachgewiesen wurde, oder das Vorhandensein einer beliebigen Anzahl von verbackenen Lymphknoten	nein
N3c	≥2 klinisch okkulte oder klinisch nachgewiesene LK und/oder das Vorhandensein einer beliebigen Anzahl von verbackenen Lymphknoten	ja

Änderungen an der M-Kategorie in der 8. Ausgabe umfassen die Ergänzung einer weiteren Kategorie für Metastasen des Zentralnervensystems. Der LDH-Status wird als nicht erhöht oder erhöht berücksichtigt und nun für jede M1-Unterkategorie angegeben (50,59).

Tabelle 7: M-Kategorien der 8. Edition des AJCC

8. Edition des AJCC		
M Kategorie	Anatomische Lokalisation	LDH Level
M0	kein Nachweis von Fernmetastasen	-
M1	Nachweis von Fernmetastasen	
M1a	Fernmetastasen in Haut, Weichteile einschließlich Muskeln und/oder nicht-regionale Lymphknoten	nicht aufgezeichnet oder nicht spezifiziert
M1a(0)		nicht erhöht
M1a(1)		erhöht
M1b	Fernmetastasen in die Lunge mit oder ohne M1a-Lokalisationen der Erkrankung	nicht aufgezeichnet oder nicht spezifiziert
M1b(0)		Nicht erhöht
M1b(1)		erhöht
M1c	Fernmetastasen in nicht-ZNS-viszerale Organe mit oder ohne M1a- oder M1b-Lokalisationen der Erkrankung	nicht aufgezeichnet oder nicht spezifiziert
M1c(0)		nicht erhöht
M1c(1)		erhöht

M1d	Fernmetastasen ins ZNS mit oder ohne M1a-, M1b- oder M1c-Lokalisationen der Erkrankung	nicht aufgezeichnet oder nicht spezifiziert
M1d(0)		nicht erhöht
M1d(1)		erhöht

Die 8. Ausgabe brachte auch Änderungen in den Stadiengruppierungen mit sich:

Es wurde keine generelle Änderung der T-Unterkategorien vorgenommen, jedoch wurden die Definitionen der pathologischen Stadien IA und IB verfeinert. Das pathologische Stadium IA umfasst nun T1b N0 M0 Melanome, die früher dem pathologischen Stadium IB zugeordnet waren (51).

Die Stadium-III-Untergruppen in der 8. Ausgabe sind detaillierter und umfassen sowohl die T-Kategorie (Tumordicke und Ulzeration) als auch die N-Kategorie (Anzahl der tumorbefallenen Lymphknoten, klinischer Nachweis und nicht-nodale regionale Metastasierung), was zu vier Hauptuntergruppen führt. So hat Stadium III nun die Untergruppen IIIA, IIIB, IIIC und IIID (58). Dies steht im Gegensatz zur 7. Ausgabe, in der das Stadium III in erster Linie durch Lymphknotenfaktoren und Ulzeration bestimmt wurde (50).

Es gibt keine Stadium-Untergruppen für Patienten mit Fernmetastasen (Stadium IV) (51).

Tabelle 8: Stadien der 7. Edition des AJCC

8. Edition des AJCC			
Pathologisch prognostische Stadien	T	N	M
0	Tis	N0	M0
IA	T1a/b	N0	M0
IB	T2a	N0	M0
IIA	T2b, T3a	N0	M0
IIB	T3b, T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
IIIA	T1a/b, T2a	N1a, N2a	M0
IIIB	T0	N1b/c	M0
	T1a/b, T2a	N1b/c, N2b	M0
	T2b/T3a	N1a-N2b	M0
IIIC	T0	N2b/c, N3b/c	M0

	T1a-T3a	N2c, N3a/b/c	M0
	T3b/T4a	Jedes N $\geq$ N1	M0
	T4b	N1a-N2c	M0
IIID	T4b	N3a/b/c	M0
IV	Jedes T, Tis	Jedes N	M1

Insgesamt zielte die 8. Ausgabe des AJCC-Melanom-Staging-Systems darauf ab, einen genaueren und evidenzbasierten Rahmen für die Klassifizierung von Melanomen zu bieten, der die Fortschritte im Verständnis der Krankheit widerspiegelt und prognostische Faktoren effektiver einbezieht. Die von der 7. zur 8. Edition vorgenommenen Änderungen wurden hauptsächlich durch Analysen einer großen, zeitgemäßen internationalen Melanom-Datenbank vorangetrieben.

Die 8. Ausgabe des AJCC Cancer Staging Manual wurde 2017 veröffentlicht (50).

2.6.4 Auswirkungen der Neuerungen auf die Therapie

Die Überarbeitungen im AJCC-Staging-System der 8. Ausgabe haben mehrere Auswirkungen auf die Behandlung und Versorgung von Melanompatienten.

Die Neudefinition von T1a und T1b, insbesondere die Aufnahme dünnerer Melanome mit 0,8-1,0mm mit oder ohne Ulzeration in T1b, kann dazu führen, dass mehr Patienten mit dünneren Melanomen für eine SLNB empfohlen werden. Dies liegt daran, dass T1b-Melanome ein höheres Risiko für SLN-Metastasen haben als T1a mit einer Tumordicke von weniger als 0,8mm und nicht ulzeriert. Für Patienten im Stadium I sollten die Änderungen jedoch keine Auswirkungen auf die Behandlungsstrategien oder Nachsorgepläne haben, da innerhalb dieser Stadien keine signifikanten Überlebensunterschiede zwischen den beiden Ausgaben festgestellt wurden (47,51).

Die granulareren Stadium-III-Untergruppen in der 8. Ausgabe, die sowohl Primärtumormerkmale als auch den Lymphknotenbefall berücksichtigen, ermöglichen eine verfeinerte Risikostratifizierung. Dies ist besonders wichtig im Zusammenhang mit adjuvanten systemischen Therapien, da die Auswahl einer geeigneten personalisierten Behandlung auf dem klinischen Stadium basiert. Patienten, die in der 7. Ausgabe als Stadium IIIA/B/C klassifiziert wurden, könnten ein anderes Risikoprofil haben, wenn sie nach der 8. Ausgabe neu klassifiziert werden. Dies sollte bei der Interpretation der Ergebnisse klinischer Studien zur adjuvanten Therapie berücksichtigt werden. Die 8. Ausgabe zielt darauf ab, Patienten mit hohem

Rückfallrisiko besser zu identifizieren, die von diesen Behandlungen profitieren könnten (51)

Die überarbeiteten TNM-Kategorien und Stadieneinteilungen, insbesondere innerhalb von Stadium III und der M-Kategorie mit der Erweiterung um die Subkategorie M1d für ZNS-Metastasen, werden eine präzisere Stratifizierung von Patienten ermöglichen, die an klinischen Studien teilnehmen. Dies wird zu einer aussagekräftigeren Analyse der Behandlungsergebnisse innerhalb bestimmter Risikogruppen führen. Auch die Einbeziehung des LDH-Status als Deskriptor bei jedem M-Stadium ermöglicht eine bessere Berücksichtigung dieses prognostischen Faktors bei der Studienplanung und -analyse (47,50).

Für Betroffene wohl am relevantesten sind jedoch die aktualisierten Überlebensschätzungen für jedes Stadium und jede Untergruppe. Dessen ungeachtet muss der Verlust der strikten Linearität im Schweregrad über die Stadien der 8. Ausgabe hinweg den Patienten sorgfältig erklärt werden. So bedeutet nun ein fortgeschrittenes Stadium nicht immer eine schlechtere Prognose im Vergleich zu einem weniger fortgeschrittenen Stadium. Zum Beispiel können Patienten im Stadium IIIA der 8. Ausgabe eine bessere Prognose haben als Patienten im Stadium IB oder IIA (48).

Insgesamt lässt sich festhalten, dass die korrekte Bestimmung der Prognose der neuen Stadien äußerst wichtig für die Auswahl der Art der erforderlichen Nachsorge ist.

2.6.5 Unterschiede im Überleben nach Stadien der 7. und 8. Edition

Studien, die die 7. und 8. Ausgabe verglichen haben, zeigten mehrere Unterschiede im Gesamtüberleben (OS) und im melanomspezifischen Überleben (MSS) über die Stadien hinweg. Exemplarisch wird in Abbildung 4 das Ergebnis einer Kohortenanalyse dargestellt (47).

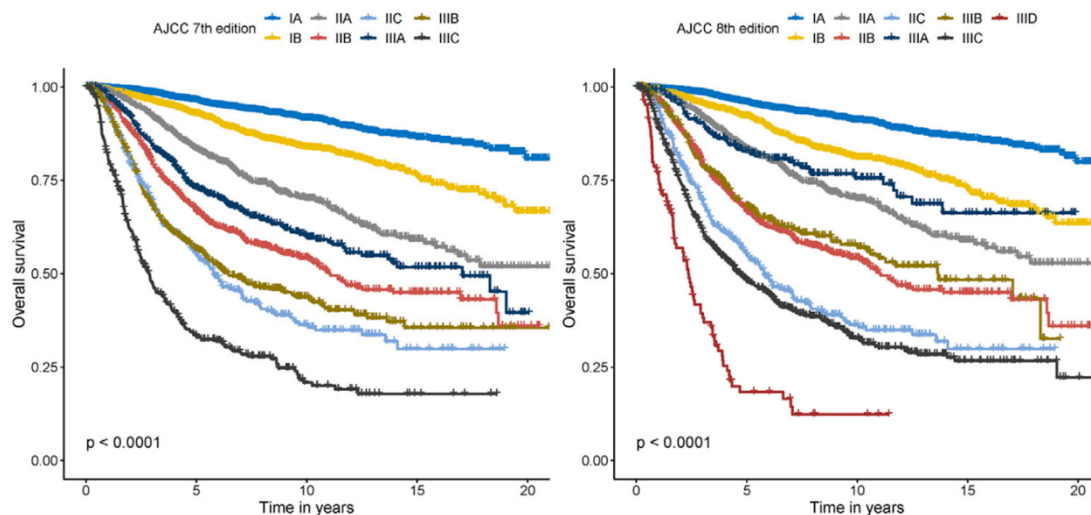
Die direkte OS-Analyse zeigte keine signifikanten Überlebensunterschiede für Patienten im Stadium I und II zwischen den beiden Ausgaben. Beim Vergleich des MSS nach T-Subkategorie zeigte die 8. Ausgabe jedoch im Allgemeinen günstigere Überlebensraten. Dies könnte auf nun potenziell vermehrt eingesetzte SLNBs auch

bei dünnen Melanomen zurückzuführen sein, was wiederum zu einer genaueren Stadieneinteilung führt (48).

Zudem zeigt die 8. Ausgabe eine bessere Prognose innerhalb der neuen Stadium-III-Patienten (IIIA, IIIB und IIIC) im Vergleich zur 7. Ausgabe. Dies wird auf die Neudefinition der N-Kategorie und die Einbeziehung der Tumordicke als Schlüsselfaktor in die Klassifizierung von Stadium III zurückgeführt, was zu einer Umstufung einiger Patienten, die eine schlechtere Prognose hatten, in höhere Stadium-III-Kategorien führte. Beispielsweise waren die 5-Jahres-MSS-Raten für Stadium IIIA und IIIB in der 8. Ausgabe deutlich höher als in der 7. Ausgabe. Stadium IIID in der 8. Ausgabe stellt jedoch eine Gruppe mit der schlechtesten Prognose innerhalb von Stadium III dar.

So zeigt wie bereits erwähnt die 7. Ausgabe eine relativ lineare Korrelation zwischen dem AJCC-Stadium und dem Überleben. Diese Linearität geht jedoch in der 8. Ausgabe verloren, mit mehr Überlappung zwischen den Überlebenskurven verschiedener Stadiengruppen. Dies bedeutet, dass ein fortgeschritteneres Stadium in der 8. Ausgabe nicht immer einer schlechteren Prognose entspricht als ein weniger fortgeschrittenes Stadium (48).

Eine Analyse der absoluten Todeszahlen nach Stadien zeigte einen starken Rückgang der Mortalität in den Stadien IIIA und IIIB in der 8. Ausgabe. Es gab auch einen leichten Anstieg der absoluten Todeszahlen in Stadium IA der 8. Ausgabe (50).



56

Abbildung 4: Kaplan-Meier Kurven für overall survival für die verschiedenen Stadien nach AJCC 7 und 8 aus Barreiro-Capurro et al. (48)

Eine kritische Neubewertung der in der 8. Edition des AJCC publizierten Überlebensdaten lieferte eine umfassende Analyse von Garbe et al. aus dem Jahr 2022. Dabei wurden zwei unabhängige Kohorten des Zentralregisters Malignes Melanom (CMMR) mit insgesamt mehr als 17.000 Patienten der Stadien I und II untersucht, um die Validität der AJCC-Prognosen im realen Versorgungsumfeld zu überprüfen. Dabei zeigten sich für das melanomspezifische Überleben durchweg ungünstigere Prognosen als im AJCC-Kollektiv (IMDDP) angegeben. Während das AJCC für das Stadium IB ein 10-Jahres-MSS von 94% ausweist, lagen die Raten in den deutschen Kohorten deutlich niedriger bei 89,7% bis 90,9%. Noch größer war die Diskrepanz in den Stadien IIA und IIC. Für das Stadium IIA ermittelte das AJCC eine 10-Jahres-Überlebensrate von 88%, während die CMMR-Daten lediglich Werte zwischen 80,7% und 83,1% zeigten. Im Stadium IIC lag das Überleben in der deutschen Kohorte mit 57,6% bis 64,7% deutlich unter den von der AJCC beobachteten 75% (60).

Weiterhin liefert die Studie wichtige Informationen zum rezidivfreien Überleben, welche im AJCC-Datensatz nicht berücksichtigt werden aber relevant für die Indikationsstellung adjuvanter Therapien sind. Es zeigte sich, dass die Rezidivraten in den Stadien IA bis IIA fast doppelt so hoch waren wie die Mortalitätsraten. So betrug das 10-Jahres-RFS im Stadium IB nur etwa 78,6% bis 80,3% und fiel im Stadium IIA auf 62% bis 64,1% ab (60).

Diese Ergebnisse legen nahe, dass die AJCC-Daten der 8.Edition das reale Risiko möglicherweise unterschätzen und die Prognose für Patienten in frühen Stadien im klinischen Alltag weniger gut ist als angenommen. Dies unterstreicht die dringende Notwendigkeit, insbesondere in den Stadien IB und IIA, präzisere Stratifizierungsinstrumente einzusetzen, um Patienten mit erhöhtem Rezidivrisiko zuverlässiger zu identifizieren und gegebenenfalls einer adjuvanten Therapie zuzuführen (60).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die 8. Ausgabe des AJCC-Melanom-Staging-Systems eine wichtige Weiterentwicklung darstellt, die neue Erkenntnisse über die Krankheit einbezieht und auf eine präzisere Risikostratifizierung abzielt. Während die Überlebensergebnisse für viele Patienten im Stadium III der 8. Ausgabe im Vergleich zur 7. Ausgabe besser erscheinen, unterstreicht der Verlust der strikten Stadium-Überlebens-Linearität die Komplexität der Melanomprognose und die Notwendigkeit einer sorgfältigen Interpretation des aktualisierten Staging-Systems (4,48,50,51).

2.7 Therapie

In den letzten Jahren hat sich der therapeutische Ansatz für das maligne Melanom durch neue Erkenntnisse in der molekularen Pathogenese und die Entwicklung innovativer Therapien grundlegend gewandelt. Basierend auf der S3-Leitlinie zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms des Leitlinienprogramms Onkologie unterscheiden sich die Therapieoptionen für Melanome je nach Krankheitsstadium, von lokalisiertem primärem Melanom bis hin zu lokoregionalen und Fernmetastasen (5).

2.7.1 Therapie des primären Melanoms

Die primäre Therapieoption für das lokalisierte Melanom ist die chirurgische Exzision des Primärtumors mit einem ausreichenden Sicherheitsabstand. Der Umfang des Exzisionsrandes hängt von der Breslow-Dicke und anderen histopathologischen Merkmalen des Tumors ab. Grob lässt sich sagen, dass bei einer Tumordicke von unter 2 mm ein Sicherheitsabstand von 1 cm ausreicht, während bei dickeren Tumoren ein Sicherheitsabstand von 2 cm gefordert wird, um eine R0-Resektion zu erreichen. Wenn mikroskopisch oder makroskopisch in den Rändern des Resektats noch Residualtumor nachgewiesen werden kann, wird dies als R1 bzw. R2-Resektion bezeichnet. In solchen Fällen ist eine Nachresektion der Standard, wenn dadurch eine

R0-Resektion mit einem ausreichend breiten tumorfreien Rand erreicht werden kann (61).

Eine Strahlentherapie des Primärtumors wird nur in speziellen Fällen angewandt. So kann zum Beispiel bei desmoplastischen Melanomen aufgrund des hohen Risikos eines Lokalrezidivs eine postoperative Strahlentherapie in Betracht gezogen. Auch in Fällen von R1- oder R2-resezierten Melanomen kann eine Strahlentherapie zur lokalen Tumorkontrolle durchgeführt werden. Weiterhin kann eine Strahlentherapie auch für Lentigo-maligna-Melanome in Betracht gezogen werden, insbesondere wenn eine Operation nicht möglich ist (62–65)

Die Sentinel-Lymphknotenbiopsie dient der Stadieneinteilung und der prognostischen Einschätzung und sollte ab einer Dicke des Primärtumors von 1,0 mm und ohne einen Hinweis auf lokoregionale oder Fernmetastasierung vorgenommen werden (5)

Bei Primärtumoren mit einer Tumordicke von 0.75 bis 1 mm in Kombination mit weiteren Risikofaktoren wie einer Ulzeration, einer erhöhten Mitoserate oder einem Alter des Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose von unter 40 Jahren ist die Sentinel-Lymphknotenbiopsie ebenfalls empfohlen (66–71).

2.7.2 Therapie lokoregionaler Metastasen

Patienten mit lokoregionaler Metastasierung, also einem Stadium III-Melanom, weisen große Unterschiede im 5-Jahres-Überleben auf. Deswegen sollten Therapieempfehlungen nach interdisziplinärer Absprache durch ein Tumorboard erfolgen (72).

Bei lokoregionalen Metastasen wie Lymphknotenmetastasen, ist die Lymphknotendisektion ein wesentlicher Bestandteil der Therapie. Die Rolle der kompletten Lymphknotendisektion nach einer positiven Sentinel-Lymphknotenbiopsie wird jedoch zunehmend kritisch diskutiert, sodass auch eine reine Beobachtung, möglichst in Verbindung mit einer adjuvanten Therapie, eine alternative Behandlungsoption darstellt. Bei Nachweis einer ausgedehnten lymphogenen Metastasierung ohne Vorhandensein von Fernmetastasen wird eine Lymphknotendisektion mit therapeutischem Ansatz empfohlen. Eine prophylaktische Lymphadenektomie wird hingegen nicht empfohlen (5,73).

Weiterhin kann eine adjuvante Therapie in Betracht gezogen werden, um das Rezidivrisiko zu verringern. Zu den Optionen der medikamentösen Therapie zählen Immun-Checkpoint-Inhibitoren wie Nivolumab und Pembrolizumab als Nachfolger der Interferontherapie mit Interferon-alpha. Bei Fällen mit einer BRAF-Mutation können entweder BRAF- oder MEK-Inhibitoren eingesetzt werden. Die Wahl der adjuvanten Therapie hängt dabei vom Stadium und den jeweiligen Risikofaktoren ab. Eine adjuvante Strahlentherapie des Lymphknotenfeldes kann bei Hochrisikopatienten nach Lymphadenektomie ebenfalls in Betracht gezogen werden (74,75).

Satelliten- und In-transit-Metastasen können potenziell mit lokalen Verfahren behandelt werden, wobei hohe Ansprechraten mit intratumoralen Injektionen von Interleukin 2 oder intratumoraler Elektrochemotherapie mit Bleomycin oder Cisplatin beobachtet wurden. Alternativ kann Talimogene Laherparepvec (T- VEC) eingesetzt werden. Bei vielen, schnell wiederkehrenden kutanen und subkutanen Metastasen an Extremitäten ist die isolierte Extremitäteninfusion eine weitere wirksame Behandlungsmöglichkeiten, wenn andere lokale Therapien nicht ausreichen (76–78).

2.7.3 Neoadjuvanter Therapieansatz

Neben der adjuvanten Therapie hat sich in jüngster Zeit der neoadjuvante Therapieansatz, also die systemische Behandlung vor der chirurgischen Resektion, bei resektablen Melanomen der Stadien III und IV als vielversprechend gezeigt. Dieser basiert auf der Hypothese, dass eine Immuntherapie vor der operativen Therapie, also während noch eine höhere Tumorantigenlast vorhanden ist, die Wirksamkeit der Behandlung verbessern könnte (79). Bei vielen anderen Tumoren wie Brust-, Rektal- und Speiseröhrenkrebs ist der neoadjuvante Ansatz bereits etabliert. Dieser Ansatz bietet weitere Vorteile wie die Reduktion der Tumorlast und somit der chirurgischen Morbidität, eine potenzielle Umwandlung von inoperablen in operable Tumore sowie eine pathologische und radiologische Bewertung des Behandlungsansprechens (80).

Die moderne neoadjuvante Strategie stützt sich dabei vor allem auf Immun- und zielgerichtete Therapien. Zu den bereits untersuchten Optionen gehören CTLA-4- und PD-1-Checkpoint-Inhibitoren, wie die Kombination von Ipilimumab und Nivolumab, BRAF- und MEK-Inhibitoren, wie Dabrafenib und Trametinib, sowie intraläsionale Therapien wie T-VEC (80). Verschiedene Phase-II-Studien konnten bereits zeigen, dass neoadjuvante Immun- und zielgerichtete Therapien sicher sind und die pathologische Ansprechraten sowie das rezidivfreie Überleben verbessern (80).

Kombinationstherapien, insbesondere die von Ipilimumab mit Nivolumab zeigten dabei hohe PCR-Raten von über 50% (79). Die pathologische Komplettremission (PCR) wird dabei als prognostischer Indikator gesehen, der potenziell einen Ausblick auf den Einfluss der Therapie auf das Langzeitüberleben liefern kann (80).

Trotz dieser vielversprechenden Ergebnisse der Frühphasenstudien, die unter anderem auch personalisierte Ansätze wie in der PRADO-Studie ermöglichen, gibt es aktuell weder in den USA noch in Europa Zulassungen für neoadjuvante-Melanom-Therapien (79,81). Es werden weitere Untersuchungen wie die NADINA-Studie benötigt, um eine fundierte Evidenz für einen Überlebensvorteil zu liefern und die optimale Behandlungsstrategie zu finden (82).

2.7.4 Therapie von Fernmetastasen

In einigen Fällen kann die chirurgische Entfernung von Fernmetastasen, also eine Metastasektomie, in Betracht gezogen werden. Dies gilt insbesondere für einen therapeutischen Ansatz bei isolierten Metastasen in Organen wie der Lunge oder der Leber mit dem Ziel das Überleben des Patienten zu verbessern. Eine palliative Operation von Metastasen kann jedoch auch zur Linderung von Symptomen durchgeführt werden (83–86).

Eine weitere Option zur Behandlung des Melanoms im Stadium IV ist eine systemische medikamentöse Therapie. Dazu gehört die zielgerichtete Therapie mit Signaltransduktionsinhibitoren. So haben bei Melanomen mit einer BRAF-V600-Mutation verschiedene BRAF-Inhibitoren (z. B. Vemurafenib, Dabrafenib, Encorafenib) in Kombination mit MEK-Inhibitoren (z. B. Trametinib, Cobimetinib, Binimetinib) ein verbessertes progressfreies und Gesamtüberleben gezeigt (87,88). Bei Melanomen mit c-KIT-Mutationen, welche eher bei Schleimhaut- und akral-lentiginösen Melanomen vorkommen, können c-KIT-Inhibitoren wie Dasatinib eingesetzt werden (89).

Bei der Behandlung des metastasierten Melanoms ohne Möglichkeit der Metastasenresektion spielt die Immuntherapie eine bedeutende Rolle. Checkpoint-Inhibitoren, die auf CTLA-4 (z. B. Ipilimumab) und PD-1 (z. B. Nivolumab, Pembrolizumab) abzielen, haben eine signifikante Wirkung gezeigt. Kombinationen von PD-1- und CTLA-4-Inhibitoren können ebenfalls angewendet werden und zeigen die aktuell besten Ergebnisse hinsichtlich des Langzeit-Überlebens (13,14,90–92).

Eine Monochemotherapie mit Dacarbazin kann angeboten werden, wenn andere überlegene Therapien wie BRAF/MEK-Inhibitoren oder Immuncheckpoint-Inhibitoren nicht geeignet sind. Polychemotherapien zeigen zwar teilweise höhere Ansprechraten als Monochemotherapie, haben aber trotzdem keine signifikante Verlängerung des medianen Gesamtüberlebens gezeigt. Biochemotherapie, bei denen eine Chemotherapie mit Immuntherapeutika wie Interferon und Interleukin-2 kombiniert wird, werden aufgrund ihrer hohen Toxizität mit Einfluss auf das Überleben nicht mehr eingesetzt (93).

Eine Strahlentherapie wird häufig palliativ zur Behandlung symptomatischer Metastasen an verschiedenen Stellen wie dem Gehirn, Knochen und Weichteilen eingesetzt. Bei Hirnmetastasen, welche die häufigste Todesursache bei metastasierten Melanomen sind, kann eine Ganzhirnbestrahlung oder stereotaktische Radiochirurgie eingesetzt, um die Lebensqualität zu verbessern. Die Strahlentherapie kann auch mit Ipilimumab bei Hirnmetastasen mit extrazerebraler Erkrankung kombiniert werden (94–97).

Zusätzlich werden die Nebenwirkungen von Therapien, wie z.B. Antiemetika bei Übelkeit durch eine Chemotherapie, behandelt. Zudem ist eine frühzeitige Integration einer Palliativversorgung für Patienten im Stadium IV empfohlen, um ihre Lebensqualität zu verbessern. Dazu gehören Symptommanagement, psychosoziale Unterstützung und die Berücksichtigung der Bedürfnisse von Patienten und ihren Familien in fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung (98).

Es ist wichtig zu beachten, dass Behandlungsentscheidungen individualisiert und von einem multidisziplinären Team getroffen werden sollten. Dabei müssen die spezifischen Merkmale des Melanoms, der allgemeine Gesundheitszustand des Patienten und dessen persönliche Präferenzen berücksichtigt werden. Darüber hinaus ist der Einfluss der Therapie auf die Lebensqualität ein wichtiger Aspekt, insbesondere in metastasierten Stadien (5).

3 Material und Methoden

3.1 Ethikvotum und Konsultation des Datenschutzbeauftragten der Universitätsmedizin Mainz

Für die Durchführung dieses Biomarker-Forschungsprojektes liegt ein positives Votum der Ethikkommission vom 19.02.2020 vor (Antragsnummer: 2018-13960-Klinische Forschung).

Das Ethikvotum basiert auf einem Antrag zur Durchführung einer Melanom-Kohortenstudie mit einer vergleichenden Untersuchung zweier Biomarker-Signaturen. Dieser ist von [REDACTED], Leiterin des dermatohistopathologischen Labors der Hautklinik der Universitätsmedizin Mainz, für eine Kooperation mit der Firma Synvie GmbH aus München sowie der Firma Neracare GmbH aus Frankfurt gestellt worden. Dazu ist ein Studienprotokoll mit dem Antragstitel „Untersuchung zur Korrelation von klinisch/ pathologischen Parametern mit dem Sentinelstatus bei Melanompatienten sowie vergleichende Untersuchung zur prognostischen Aussagekraft zweier Biomarker-Signaturen bei ausgewählten Patienten mit malignem Melanom: eine Observationsstudie an humanen Gewebeproben“ eingereicht worden.

Im Rahmen dieser Arbeit wird neben der Korrelation von klinisch/ pathologischen Parametern mit dem Sentinelstatus eine der Biomarker-Signaturen, die immunhistochemische 7-Biomarker-Signatur immunoprint® der Firma Synvie GmbH mit Sitz in München untersucht. Für dieses Forschungsprojekt liegt ein ebenfalls positiv begutachtetes Amendment vom 14.03.2022 vor. In diesem wurden die Endpunkte der Biomarkerstudie für die statistischen Analyse genauer benannt.

Für die Sammlung der aktuellen Vital- und Follow-up-Daten werden im Verlauf die jeweiligen Patienten postalisch kontaktiert. Die dafür erstellte Patienteninformation und die Einwilligungserklärung zur Teilnahme an diesem Projekt sind der Ethikkommission ebenfalls vorgelegt worden. Diese empfiehlt bezüglich der eingereichten Unterlagen zur Versendung an die Patienten eine Überprüfung und Abstimmung mit dem zuständigen betrieblichen Datenschutzbeauftragten der Universitätsmedizin Mainz.

Nach Konsultation des Datenschutzbeauftragten werden die Patienteninformation und Einwilligungserklärung mit erweiterten datenschutzrechtlichen Informationen gemäß der Europäischen Datenschutz-Grundverordnung (DS-GVO) ergänzt.

3.2 Studiendesign und Patientenkollektiv der Gesamtkohorte

Diese Untersuchung ist als retrospektive, monozentrische Studie an einer Patientenkohorte nach Melanomdiagnose und Wächterlymphknotenbiopsie konzipiert, die konsekutiv behandelte und dokumentierte Patienten analysiert. Aktualisierte Vitaldaten sowie Follow-up-Daten von in die Studie eingeschlossenen Patienten werden ab dem Zeitpunkt der Melanomdiagnose nach vorgegebenem Protokoll gesammelt und zum einen mit den klinisch-pathologischen Parametern des Primärtumors und zum anderen mit den Ergebnissen der prognostischen Biomarker-Signatur immunoprint® korreliert. Die Biomarker-Untersuchungen erfolgen am Gewebe der bereits exziierten und archivierten Primärmelanome, soweit diese noch verfügbar sind.

Es werden alle Patienten eingeschlossen, die mit einem malignen Melanom der Haut diagnostiziert worden sind und sich zwischen dem 1. Januar 2006 und dem 31. Dezember 2015 an der Hautklinik der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz zur Sentinellymphknotenbiopsie vorgestellt haben.

Der Zeitraum wird so gewählt, damit einerseits für das Follow-up ein Beobachtungszeitraum von mindestens 5 Jahren erreicht werden kann, der als Standard bei prognostischen Biomarker-Untersuchungen gilt. Zum anderen wird eine standardisierte Untersuchung und Analyse einer möglichst umfangreichen Anzahl von Gewebepräparaten angestrebt. Die Verfügbarkeit und Qualität von Gewebepräparaten hängt dabei maßgeblich von den jeweiligen Archivierungszeiträumen und dem Alter der Gewebeblöcke ab.

Während für von einem Gewebeblock angefertigte Schnitte wie z.B. H&E-Schnitte zur Diagnosestellung eine Aufbewahrungspflicht von 10 Jahren festgelegt ist, beträgt die empfohlene Aufbewahrungszeit für den Gewebeblock selbst lediglich 2 Jahre (99). Aufgrund des retrospektiven Studiendesigns ist der empfohlene Archivierungszeitraum von 2 Jahren jedoch bei allen Patienten bereits überschritten, was die Verfügbarkeit der Gewebeblöcke reduziert. Die in diesem Studienprojekt zu untersuchenden Gewebepräparate stammen zum einen aus dem internen Gewearchiv der Hautklinik der Universitätsmedizin Mainz sowie von externen Pathologien, denen die Gewebeproben von niedergelassenen sowie Klinik-Dermatologen zur Sicherung einer Melanomdiagnose zugesendet wurden. An der Hautklinik in Mainz werden die Gewebepräparate über die empfohlene

Mindestanforderung hinaus dauerhaft und in einigen externen Pathologien auch bis zu 10 Jahren aufbewahrt.

Weiterhin können die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung durch das Alter der Blöcke beeinflusst werden und die Aussagekraft bzw. die Qualität des Paraffinblocks abnehmen. Dementsprechend werden in dieser Studie keine Gewebe verwendet, die vor 2006 entnommen worden sind.

3.3 Datendokumentation und Prozess der Datenerhebung

3.3.1 Datendokumentation

Dokumentiert werden mithilfe vorab erstellter digitaler Tabellen (Microsoft Excel® 2024) die Stammdaten, der Pseudonymisierungsschlüssel, Tumordaten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose sowie Vital- und Follow-up-Daten. Hierbei werden die Stammdaten mit der zugeordneten Studien-ID in einer separaten Datei von der restlichen Datenerhebung ebenfalls mit entsprechender zugeordneten Studien-ID in pseudonymisierter Form dokumentiert. Folgende Daten werden erhoben:

Stammdaten

- Nachname
- Vorname
- Geburtsdatum
- Geschlecht
- Adresse
- Studien-ID

Tumordaten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose

- Gesicherte Diagnose Primärmelanom
- Diagnose-Datum
- Alter bei Diagnose
- Melanom-Subtyp
- Lokalisation
- Dicke
- Ulzeration

- Mitoseindex
- Clark-Level
- Histologie-Nummer des Exzidates des Primärmelanoms
- Primärexzision untersuchendes Institut
- Datum der SLNB
- Ergebnis der SLNB
- Ggf. Datum und Ergebnis einer Lymphknotendissektion
- Fernmetastase bei Erstdiagnose
- Primäre T-, N-, M-Klassifikation und Stadium nach AJCC 2009
- Aktualisierte primäre T-, N-, M-Klassifikation und Stadium nach AJCC 2017
- Ggf. weitere MM bei ED
- Ggf. vorherige MM

Follow-up-Daten

- Einwilligung zur Teilnahme am Forschungsprojekt und zur Datenverarbeitung
- Datum der letzten Nachsorge
- Dauer des Follow-up-Zeitraums
- Lokalrezidiv (Vorkommen, Diagnosedatum, Dauer von ED bis Event)
- Lymphknotenprogress (Vorkommen, Diagnosedatum, Dauer von ED bis Event)
- Fernmetastase (Vorkommen, Diagnosedatum, Dauer von ED bis Event)
- Neues Melanom (Vorkommen, Diagnosedatum, Dauer von ED bis Event)
- Informationen zum Versterben (Vorkommen, Datum, Dauer von ED bis Event, Ursache)

3.3.2 Datenerhebung

Der Erfassungszeitraum von 2006 bis 2015 wird ausgehend von einer an der Hautklinik der Universitätsmedizin Mainz durchgeführten Untersuchung an Melanompatienten mit einer SLNB aus dem Jahr 2016 gewählt. Die Arbeit mit dem Titel „Vergleichende Untersuchung der Aufarbeitung von Sentinel Lymphknoten bei malignem Melanom im Institut für Pathologie der Universitätsmedizin Mainz in den Jahren 2006 bis 2011“ von Dr. Stephan Rietz erlaubt einen ersten Einblick in die Gesamtzahl sowie die Zusammensetzung der Patienten, die eine SLNB an der

Uniklinik Mainz erhalten haben (100). In dieser Untersuchung wurden 384 Patienten für den Zeitraum 2006 bis 2011 gelistet.

Erste Daten zu diesem untersuchten Patientenkollektiv werden freundlicherweise von Dr. Rietz in Form einer digitalen Tabelle (Microsoft Excel® 2013) zur Verfügung gestellt. Damals waren für diese Untersuchung 264 Patienten auswertbar, 69 Patienten wurden aufgrund von nicht vollständigen Patientendaten bzw. fehlender detaillierter Informationen zum Sentinelstatus nach SLNB ausgeschlossen.

Da für die vorliegende Arbeit im Vergleich zu der von Dr. Rietz weniger detaillierte Sentinel-Informationen benötigt werden, wird nochmals überprüft, für wie viele Patienten die notwendigen Tumordaten, ein Ergebnis der Sentinelbiopsie sowie ein pTNM-Stadium vorliegen.

Für den anschließenden Zeitraum von 2012 bis 2015 generiert das Medizincontrolling erneut eine Fallliste der entsprechenden Patienten. Diese basiert auf den ICD-Codes für die Diagnose eines malignen Melanoms sowie den OPS-Codes für den Auftrag einer Wächterlymphknotenbiopsie. Beide Codes basieren auf Klassifikationen der WHO. Der ICD-Code (zu Deutsch und vereinfacht „Internationale Klassifikation der Krankheiten“) ist ein weltweit anerkanntes System zur einheitlichen Benennung medizinischer Diagnosen, während der OPS-Code („Operationen- und Prozedurenschlüssel“) die deutsche Modifikation der Internationalen Klassifikation der Prozeduren in der Medizin („ICPM“) ist (17,18).

So wurden für den Zeitraum von 2012 bis 2015 weitere 448 Fälle, jedoch nur 446 Patienten ermittelt. Zwei Patienten sind hier doppelt aufgeführt, da sie 2 Melanome hatten, für die jeweils eine Sentinellymphknotenbiopsie durchgeführt wurde. Hieraus ergibt sich für den Zeitraum 2006-2015 ein Kollektiv von 830 Patienten.

Jedem der 830 Patienten wurde eine Studien-Identifikationsnummer (Studien-ID) mit aufsteigenden Zahlen in Reihenfolge der vom Medizincontrolling generierten Listen zugeteilt. Diese sind fortlaufend nach dem Aufnahmedatum des Patienten an der Hautklinik der Universitätsmedizin Mainz sortiert.

3.3.3 Follow-up & Einverständniserklärung

3.3.3.1 *Vitalstatus in Zusammenarbeit mit dem Krebsregister Rheinland-Pfalz*

Zeitgleich zur Erhebung der Tumorparameter erfolgt die Recherche, um den Datensatz mit den Vitaldaten und den Follow-up-Informationen der Patienten zu vervollständigen. Zuvor erfolgt ein Abgleich des Vitalstatus mit dem Krebsregister Rheinland-Pfalz (RLP), sofern dieser dem Register bekannt ist. Damit soll vermieden werden, dass bereits verstorbene Patienten angeschrieben werden. Im Falle des Versterbens eines Patienten wird aus dem Register sowohl das Datum des Ablebens sowie die Todesursache (melanomspezifisch, melanomunspezifisch, unbekannt) mitgeteilt. Zu dem Zeitpunkt der Abfrage (Juli 2020) am Krebsregister RLP ist bereits das Versterben von 166 Patienten bekannt. Hierbei sind 49 Betroffene am malignen Melanom und 58 Erkrankte ausdrücklich nicht am malignen Melanom verstorben. Bei weiteren 59 Patienten war zwar das Versterben selbst bekannt, die genaue Todesursache jedoch nicht.

3.3.3.2 *Patienten-Serienbrief*

Mit Hilfe der Informationen des Krebsregisters RLP werden folglich Patienten mit positivem bzw. unbekanntem Vitalstatus mit einem Serienbrief im Januar 2021 kontaktiert. In diesem Schreiben werden die Patienten ausführlich über das geplante Forschungsprojekt und über die Verarbeitung von personenbezogenen Daten informiert. Es wird eine schriftliche Teilnahme-Einwilligung erbeten sowie ein Fragebogen bezüglich des aktuellen Melanom-bezogenen Gesundheitszustandes und der individuellen Ergebnisse aus Nachsorgeuntersuchungen beigelegt. Weiterhin wird auch das schriftliche Einverständnis zur Erlangung des betreffenden Gewebesblockes aus dem internen Gewebearchiv der Hautklinik der Universitätsmedizin Mainz oder von externen Pathologien, an denen die Untersuchungen zur Diagnosestellung des Melanoms gemacht worden sind, eingeholt. Ebenfalls wird das Einverständnis für die immunhistochemischen Biomarker-Untersuchungen sowie für den dafür notwendigen Datenaustausch pseudonymisierter Studiendaten in der Zusammenarbeit mit der Firma Synvie GmbH, München, eingeholt.

Für Rückfragen können sich die Patienten telefonisch oder schriftlich an die betreuende Oberärztin und Leiterin des dermatohistologischen Labors der Hautklinik der Universitätsmedizin Mainz, [REDACTED], wenden.

Es werden insgesamt 664 Patienten schriftlich kontaktiert.

Ein Erinnerungsschreiben an Patienten, die bis dahin noch nicht geantwortet haben, wird im Mai 2021 versendet.

3.3.3.3 Rücklauf

Von den insgesamt 664 kontaktierten Patienten sind 399 persönliche Rückmeldungen generiert worden. 388 Patienten haben ihr Einverständnis zur Teilnahme an diesem Studienprojekt erteilt. 11 Patienten lehnen eine Teilnahme ab. Bei weiteren 242 Patienten gab es keine Rückmeldung. Betreffende Daten werden aus der Datensammlung des Studienprojekts gelöscht.

Bei weiteren 23 Patienten wird das Versterben durch Rückmeldung von Angehörigen auf unser Schreiben bezüglich der Studienteilnahme sowie durch die interne Recherche festgestellt. Ein eindeutiges Follow-up kann bei 12 Patienten ermittelt werden. Die übrigen 11 Patienten müssen wegen Unklarheiten bezüglich des Follow-ups ausgeschlossen werden. Die Daten dieser ausgeschlossenen Patienten sowie aller Patienten, von denen keine Rückmeldung erhalten wurde, werden ebenfalls aus der Datensammlung des Studienprojektes gelöscht.

Die im Fragebogen von den Patienten gemachten Angaben bezüglich ihres Melanom-bezogenen Gesundheitszustandes sowie der Follow-up-Informationen, werden, soweit dies möglich ist, mit den Ergebnissen klinikinterner Nachsorgeuntersuchungen abgeglichen. Hierbei fällt auf, dass in einigen wenigen Fällen von Patienten ein Progress nicht angegeben wird oder generell leicht abweichende oder ungenaue Angaben gemacht werden. Dies wird versucht aufzuklären, indem die Patienten erneut telefonisch unter der von Ihnen für Rückfragen angegeben Telefonnummer kontaktiert werden. Bei weiterhin bestehenden Unklarheiten wird nach erteilter Erlaubnis des Patienten Rücksprache mit den behandelnden Fachärzten für Dermatologie gehalten. Trotz dessen konnte bei insgesamt 22 Fällen kein konsistentes Bild zum Follow-up ermittelt werden, weshalb diese Patienten aus der Kohorte exkludiert werden.

Generell wird das Follow-up als Zeitspanne zwischen dem Datum der Erstdiagnose und dem Datum der letzten dermatologischen Nachsorgeuntersuchung definiert. Ein Mindestdauer von 5 Jahren des Follow-ups hat sich bei Studien zur Untersuchung von prognostischen Biomarkern als Standard etabliert. In 27 Fällen werden jedoch auch Patienten mit einer dermatologisch verifizierten Nachsorge von mindestens 3, aber weniger als 5 Jahren ausgewertet. Eine Studie von Bleicher et al. aus dem Jahr 2020 konnte bei den Patienten mit malignem Melanom im Stadium II bereits nach 2 bis 3

Jahren nach Erstdiagnose einen Anstieg der Rezidivwahrscheinlichkeit beobachten (103,104). Patienten mit einem Follow up von weniger als 3 Jahren ohne Rezidiv oder Progress werden exkludiert. Mit einem kürzeren Follow-up-Zeitraum steigt die Wahrscheinlichkeit, dass ein Rezidiv oder Progress nicht erfasst wird.

Patienten mit stattgefundenem Event im Zeitraum von weniger als 3 Jahren können eingeschlossen werden, da hier der Endpunkt für eine Überlebensanalyse erreicht ist (n=17). Alle dieser 17 Patienten sind am malignen Melanom verstorben.

Insgesamt erliegen 57 der 393 untersuchten Patienten während des Beobachtungszeitraums dieser Studie dem malignen Melanom. Der Krankheitsverlauf bis zum Tod melanomspezifisch verstobener Patienten kann zu großen Teilen, bei 41 Patienten, mithilfe von digitalisierten internen Arztbriefen nachvollzogen werden. Bei 6 Patienten ist das Follow-up teilweise, aber nicht vollständig bis zu ihrem Versterben bekannt. Dabei kann jedoch bei 2 Patienten bereits ein Fortschreiten der Erkrankung festgestellt werden. Lediglich bei 10 Patienten sind keinerlei Informationen über den Krankheitsverlauf vor ihrem melanomspezifischen Versterben ermittelbar. Diese Patienten können prinzipiell für Analysen zum Melanomspezifischen Überleben herangezogen werden. Es besteht jedoch eine gewisse Unschärfe der Follow-up-Informationen hinsichtlich des melanomspezifischen Krankheitsverlaufes bzw. der Validität der dokumentierten Todesursache.

3.3.4 Erhebung und Überprüfung der klinisch/ pathologische Tumordaten

Seit dem Jahr 2006 werden an der Hautklinik parallel zu teilweise noch vorhandenen Papierakten sämtlich in der Klinik erhobene Daten elektronisch erfasst, die über das operative Controlling der Universitätsmedizin zugänglich sind.

Die klinisch/ pathologischen Tumordaten des zu untersuchenden Primärmelanoms zum Zeitpunkt der Erstdiagnose werden mithilfe der digitalisierten Akten über das klinikinterne SAP-Programm sowie dem Archiv der Dermatohistopathologie und der von Herrn Dr. Rietz bereites erhobene Daten zusammengestellt und überprüft. Hierbei werden Arztbriefe um den Zeitpunkt der Erstdiagnose, Histologieberichte über den Primärtumor sowie Pathologieberichte über die Sentinellymphknotenbiopsie konsultiert. Insgesamt müssen 34 Patienten wegen unzureichenden Daten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose ausgeschlossen. Hierbei kann bei 10 Patienten die

Diagnose eines primären malignen Melanoms nicht eindeutig bestätigt werden. Bei weiteren 17 Patienten erfolgt keine erfolgreiche Sentinellymphknotenbiopsie und bei 7 Patienten sind wichtige Daten nicht ermittelbar.

Insgesamt kann für 393 Patienten ein vollständiger Datensatz ermittelt werden.

3.4 Untersuchungen mit der 7-Biomarker-Signatur immunoprint®

3.4.1 Entstehung der Biomarkerkohorte

Während der internen Recherche bezüglich der Tumordaten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose wird unter anderem der histologische Befundbericht des Primärmelanoms der Patienten, bei denen eine SLNB durchgeführt werden soll, konsultiert. Hierbei wird neben den Tumordaten auch die Histologienummer des Gewebeblockes und das jeweilige untersuchungsdurchführende Institut dokumentiert.

Antwortbriefe der angeschriebenen Patienten werden bis Ende 2021 berücksichtigt und dokumentiert. Danach beginnen die Bemühungen, die Gewebeblöcke der Patienten zu sammeln, die für das Studienprojekt qualifiziert sind und die Patienten-Einwilligung erteilt ist. Gewebeblöcke der Patienten, die eine Melanomexzision an der Hautklinik der Universitätsmedizin Mainz haben durchführen lassen, werden soweit verfügbar aus dem hausinternen dermatohistopathologischen Archiv bereitgestellt. So kann bei 74 Patienten ein Gewebeblock für die Biomarker-Untersuchung zur Verfügung gestellt werden.

Bei Patienten mit auswärtig durchgeführter Primärexzision besteht keine direkte Verfügbarkeit der Gewebeblöcke. Hierzu werden, sortiert nach durchführendem pathologischem Institut, gesammelte Anfragen gestellt. Die Institute werden zuerst telefonisch und bei erfolgreich besprochener Kooperation daraufhin postalisch kontaktiert. Die Anfrage zur Übersendung der Gewebeblöcke wird ergänzt durch eine Synopse des Studienprojektes sowie Kopien des schriftlich erklärten Einverständnisses der lebenden betreffenden Patienten. Bezüglich der Gewebeblöcke bereits verstorbener Patienten wird auf eine Publikation des Verbands der Pathologen aus dem Jahr 2018 verwiesen, welche die Eigentumsverhältnisse von Gewebeblöcken nach Einbettung durch den Pathologen juristisch beleuchtet (105). So können mögliche Bedenken zur Herausgabe und weiterer Untersuchung von Gewebeblöcken ausgeräumt werden.

Leider sind aufgrund der empfohlenen Aufbewahrungspflicht von nur mindestens 2 Jahren bereits einige Präparate nicht mehr vorhanden. Insgesamt wurden uns von 20 externen Pathologien Gewebeblöcke von 140 Patienten zugesendet. Teilweise sind zwei oder mehrere Blöcke pro Patienten vorhanden.

Bei Eingang der Gewebeblöcke werden diese anhand der darauf vermerkten Histologienummer mit der auf dem vorliegenden Primärhistologie-Bericht kontrolliert. Hierbei sind 6 falsche Blöcke identifiziert worden. Einer davon wird nach Rücksprache mit der betreffenden Pathologie gegen den richtigen Gewebeblock ausgetauscht. Die anderen 5 Gewebeblöcke müssen für die Biomarker-Untersuchung ausgeschlossen werden.

Nach Dokumentation des Sendungs-Eingangs werden alle Gewebeblöcke zusammen mit einer ersten digitalen Tabelle über die bis zu diesem Zeitpunkt verfügbaren Tumordaten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose an Synvie zur immunhistochemischen Untersuchung übergeben.

Insgesamt werden Gewebeblöcke von 214 Patienten übersendet. 14 dieser Patienten werden jedoch nach Bereitstellung der Blöcke durch die pathologischen Institute ausgeschlossen. Gründe dafür sind unzureichende Informationen zu den klinisch/pathologischen Parametern bei der Datenrecherche zur Zusammenstellung der Gesamtkohorte (N=1), kein eindeutiges Primärmelanom (N=2), eine nicht erfolgreich durchgeführte SLNB (N=4), unzureichende Nachsorgeinformationen (N=4) sowie ein unzulängliches Follow-up (<2 Jahre) (N=3).

Diese 14 nicht auszuwertenden sowie die 5 falschen Gewebeblöcke werden trotzdem zu Verwahrung an Synvie übergeben. So befinden sich alle Gewebeblöcke am selben Ort und können im Anschluss schneller an die jeweils zur Verfügung stellende Pathologie dankend zurückgesendet werden.

3.4.2 Immunhistochemische Untersuchung

Die immunhistochemischen Untersuchungen werden in Kooperation mit der Firma Synvie, München, von geschulten und erfahrenen Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftlern nach einem manuellen Verfahren durchgeführt. Das Unternehmen hat nach der Entwicklung der Signatur an der Universität Regensburg (8) die

Lizenzrechte zur Weiterentwicklung und weiteren Verwertung der Signatur erworben. Im Synvie eigenen Labor werden die Messungen nach etablierten SOPs durchgeführt.

Nach Eingang der 214 Gewebelöcke sowie der ersten digitalen Datentabelle im Labor wird dort eine Eingangsliste erstellt. Jedem der Löcke wird eine Synvie-ID zugeordnet und die verfügbaren Patientendaten werden pseudonymisiert erfasst und gespeichert.

Zudem werden die Histologienummern auf den Gewebelöcken erneut kontrolliert. Obwohl die Präparate von verschiedenen Instituten erstellt worden sind, gibt es keine Dopplungen bei den beschrifteten Histologienummern. Deshalb werden im weiteren Verlauf die Löcke anhand ihrer Beschriftung mit individueller Histologienummer identifiziert.

Insgesamt liegen 195 Gewebelöcke von Patienten vor, zu denen es einen kompletten Datensatz für eine Auswertung gibt.

3.4.2.1 Zuschnitt der Gewebelöcke

Bei dieser Studie liegen die humanen Gewebeproben eingebettet in Paraffin in Form eines Blockes vor. Zur weiteren Untersuchung müssen als Erstes Schnitte dieser Löcke für die immunhistochemischen Färbungen angefertigt werden. Dazu werden die zu untersuchenden Paraffinlöcke mit der Gewebeseite nach unten auf eine Kühlplatte gelegt und für 10 bis 15 Minuten auf ca. -11° Celsius runtergekühlt. Danach werden vom Gewebelock mittels eines Mikrotoms vom Typ microTec, Cut4060 mit scharfer Klinge Gewebescheiben mit einer Dicke von 4µm geschnitten. Der Gewebeschnitt wird mit Hilfe einer Pinzette in ein auf 40° Celsius vorgewärmtes Wasserbad übertragen. Von dort wird er auf einem vorher mit 99,8-prozentigen Ethanol gereinigten Objektträger möglichst falten- und blasenfrei platziert. Zur Zuordnung der Schnitte ist die Synvie-ID mit einem Bleistift auf dem Objektträger vermerkt. Direkt im Anschluss werden die Objektträger, fixiert in einem Halter, horizontal in einem Trockenschrank für 30 Minuten bei 60° Celsius oder über Nacht bei 37° Celsius getrocknet. Bis zur weiteren Verwendung der angefertigten Schnitte werden diese in einem Objektträgerkasten gelagert und dies auch genau dokumentiert.

Im Laufe dieses Prozesses müssen drei Fälle für die weitere Analyse ausgeschlossen werden. Ursächlich dafür sind zum einen das Brechen eines Blockes bei dem Versuch

des Schneidens mittels Mikrotoms, zum anderen das wiederholte Abschwimmen von Gewebe von dem Objektträger sowie ein nicht ausreichendes Gewebe, um alle 8 notwendigen Gewebeschnitte durchzuführen.

3.4.2.2 Färbung der Gewebeschnitte

Die immunhistochemische Färbung der Gewebeschnitte erfolgt nach der LAB/ LSAB-Methode (Labelled-Strept-Avidin-Biotin). Es ist die momentan am meisten verbreitete Technik und basiert auf der starken Affinität von Biotin und in diesem Fall Streptavidin. Eine Farbentwicklung erfolgt durch das Chromogen (106).

Vor Beginn der eigentlichen Färbung müssen die Schnitte noch entparaffiniert und rehydriert werden. Dazu werden sie für 30 Minuten bei 70° Celsius, fixiert durch einen Objektträgerhalter, vertikal in einen Trockenschrank gestellt. Anschließend werden die Objektträger mit Xylol, einer absteigenden Ethanol-Reihe, einem Wasserstoffperoxid-Ethanol-Gemisch und destilliertem Wasser behandelt.

Es folgt eine Hitzevorbehandlung, um die Maskierung der Antigene zu lösen und die Bindungsstellen für Antikörper freier zu machen. Dazu werden die Schnitte in einem bereits für 30 Minuten vorgekochten Citratpuffer für weitere 40 Minuten dampfgegart. Anschließend kühlen die Schnitte erst für 10 Minuten bei offener Küvette und weitere 10 Minuten unter äußerer Kühlung der offenen Küvette in einem Bad aus ständig frischem Leitungswasser aus.

Nun werden die Objektträger kurz in destilliertes Wasser getaucht und danach in einer Küvette für 5 Minuten mit einem Phosphatpuffer gewaschen. Das Gewebe auf dem Objektträger wird zur Begrenzung des aufzutragenden Antikörpers nach außen mit einem Fettstift umkreist.

Zu Beginn der Färbung wird das Gewebe mit dem primären Antikörper inkubiert. Für die 7-Biomarker-Signatur immunoprint® wird zuerst eine Färbung mit dem S-100-Antikörper durchgeführt, um die Präsenz eines malignen Melanoms auf dem zu untersuchenden Gewebeblock nachzuweisen. Bei den Gewebeblocks von 7 Patienten ist das Ergebnis der S-100-Färbung negativ. Dies bedeutet, dass auf den für den Patienten zur Verfügung stehenden Gewebeblocks kein Tumorgewebe mehr vorhanden ist. Die Patienten werden folglich für die Biomarker-Kohorte ausgeschlossen.

Nach positiver S-100-Messung erfolgt die Färbung mit den 7 Biomarkern, aus denen der Risikoscores der Signatur immunoprint® berechnet wird. Dazu zählen die Proteine Bax, β -Catenin, CD20, Bcl-X, MTAP, PTEN und Cox-2. Der jeweilige Antikörper wird nun, verdünnt mit Diluent, für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Je nach verwendetem primärem Antikörper variiert die Konzentration der Antikörper-Diluent-Lösung. Im Anschluss wird die Antikörper-Lösung von dem Objektträger abgekippt und der Objektträger zweimal für jeweils 2 Minuten mit einem Phosphatpuffer gewaschen.

Es folgt die Inkubation mit dem sekundären biotinylierten Antikörper bei Raumtemperatur in der Inkubationsbox für 30 Minuten. Erneut wird die Antikörper-Lösung abgekippt und der Objektträger zweimal für jeweils 2 Minuten mit einem Phosphatpuffer gewaschen.

Eine weitere Inkubation erfolgt mit einem Streptavidin-gekoppeltem Enzymkomplex, der Meerrettichperoxidase, für 15 Minuten.

Nach einer weiteren Waschung mit einem Phosphatpuffer nach vorherigem Schema folgt die Inkubation mit einem Aminoethylcarbazol-Substrat. Dieses immunhistochemische Chromogen-Substrat oxidiert an positiven Stellen zu einem sichtbaren rot-braunen Endprodukt, um die Antikörperbindung sichtbar zu machen. Zum Stoppen der Reaktion wird der Objektträger nach Abkippen der Lösung in einem Halter in eine mit destilliertem Wasser gefüllte Küvette gestellt.

Es erfolgt eine Gegenfärbung mit saurer Hämalun-Lösung nach Mayer mit einer Inkubation von 8 Minuten unter dem Abzug. Dann wird der Objektträger in eine mit Wasser gefüllte Küvette für 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut, um eine bessere Übersicht im Kontrast zu nicht positiven Zellen und Gewebe darzustellen. Damit sich kein Kalk bildet, wird der Objektträger im Anschluss wieder in eine mit destilliertem Wasser gefüllte Küvette gestellt.

Zum Eindecken werden 2-3 Tropfen von dem Eindeckmedium Aquatex mit einer Pipette aufgetragen. Darauf wird ein Deckglas luftblasenfrei aufgetragen. Überschüssiges Deckmedium wird mit 70-prozentigen Ethanol-Tüchern entfernt. Zur Versiegelung wird auf den Objektträger mit einem Pinsel Roti-Seal aufgetragen und Färbedatum sowie laufende Nummer darauf dokumentiert.

Als Positivkontrollen werden folgende Gewebe genutzt: S100 Nerv, CD20 Tonsille, Bcl-X Mamma-Ca, Cox-2 Colon(-Ca), Bax Tonsille, β -Catenin Colon(-Ca), PTEN Mamma-Ca, MTAP Colon(-Ca).

Zur Negativkontrolle wird ein Schnitt nicht mit dem eigentlichen primären Antikörper inkubiert, sondern nur mit dem Diluent im Sinne einer Isotypkontrolle inkubiert. Hier dient die Negativkontrolle dazu, eine unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers in Form des Farbstoffs auszuschließen.

3.4.2.3 Digitalisierung der gefärbten Gewebeschnitte

Es folgt eine Digitalisierung des Gewebeschnittes mit dem Scanner Nano Zoomer XR der Firma Hamamatsu zur Archivierung und weiteren Auswertung.

3.4.3 Immunhistochemische Expressions-Analyse

Die Auswertung der gefärbten Gewebeschnitte erfolgt mit Hilfe eines Mikroskops sowie anhand digitalisierten Scans. Zuerst werden die mit S-100 gefärbten Schnitte untersucht, um sicherzustellen, dass auf allen verwendeten Gewebestücken ausreichend Gewebe eines malignen Melanoms vorhanden ist. In 185 Fällen kann das Vorhandensein von relevantem Gewebe nachgewiesen werden. Bei 7 Fällen ist das Ergebnis der S-100 Messung negativ. Betroffene Blöcke werden für weitere Untersuchungen ausgeschlossen.

Für die Bewertung der eigentlichen 7 Biomarker gibt es als Ergebnis 4 verschiedene Kategorien. Abhängig von der Intensität der Färbung kann die Bewertung entweder negativ (0), einfach (+), zweifach (++) oder dreifach (+++) positiv sein.

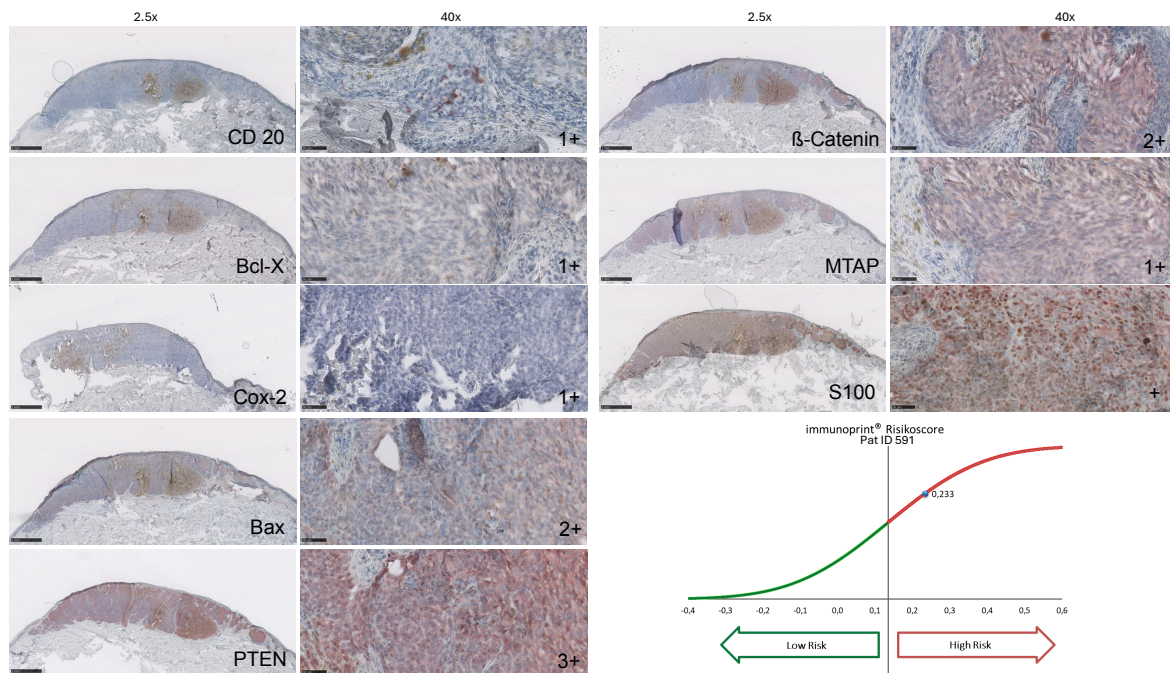


Abbildung 5: Beispiel der Färbung eines „High-Risk“-Melanoms

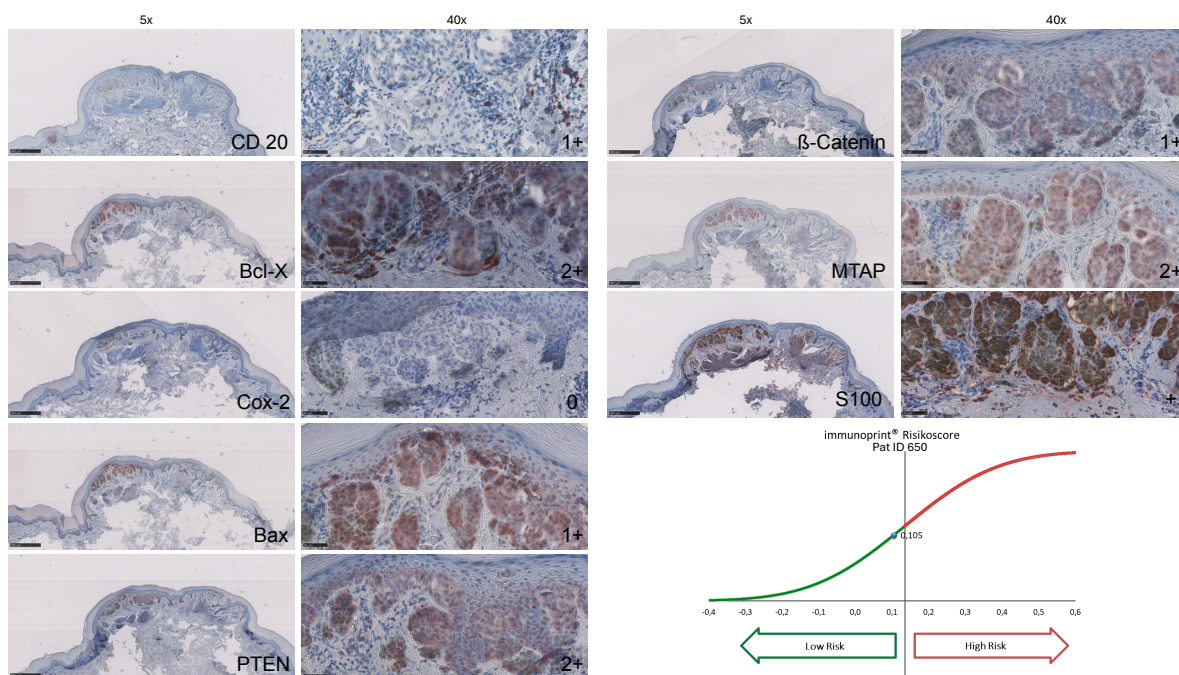


Abbildung 6: Beispiel der Färbung eines „Low-Risk“-Melanoms

Die Bewertung selbst wird verblindet und von bis zu 3 Personen unabhängig voneinander durchgeführt. Eine erste Bewertung erfolgte durch eine externe Dermatohistopathologin, während eine zweite Bewertung durch geschulte Wissenschaftlerinnen durchgeführt wird, die auch im Labor die Färbungen durchgeführt haben. Im Fall von Abweichungen bei der Bewertung wird im Anschluss ein gemeinsam vertretener Konsensus gefunden. Hierbei wird auch ein dritter

Bewerter, ein in der Bewertung geschulter weiterer Wissenschaftler bzw. Humanmediziner, konsultiert. Dazu werden auch die digitalisierten Scans aufgrund der höheren Auflösung herangezogen.

3.4.4 Berechnung des Risikoscores der 7-Biomarker-Signatur

Der Risikoscores der 7-Biomarker-Signatur immunoprint® berechnet sich aus einer linearen Funktion. Als Variablen werden die patientenindividuellen Ergebnisse der jeweiligen immunhistochemischen Färbung mit einem für jeden der 7 Biomarker spezifischen Koeffizienten multipliziert und durch die Anzahl der 7 Biomarker normalisiert. Basierend auf diesem Risiko-Wert werden die Patienten entweder der Gruppe mit niedrigem („Low-Risk“) oder hohem Risiko („High-Risk“) für einen Rückfall bzw. ein Versterben zugeteilt. Der Grenzwert liegt bei 0,135. Patienten mit einem Risiko-Wert von $< 0,135$ gehören hierbei zur Gruppe mit niedrigem Risiko, während Patienten mit einem Risiko-Wert $> 0,135$ zur Gruppe mit hohem Risiko zählen.

Von den 185 Fällen mit positiver S-100 Färbung kann bei 178 Patienten zunächst ein Ergebnis ermittelt werden. In 7 Fällen kann kein Ergebnis mit der Biomarker-Signatur bestimmt werden. Die Patienten werden aus der Biomarker-Kohorte ausgeschlossen.

3.4.5 Nachmessung der Tumordicke am Scan

Routinemäßig wird an der S-100 Färbung die vorhandene Resttumordicke des Melanoms im untersuchten Gewebestück bestimmt und diese mit den Angaben bei der Erstdiagnose verglichen, um sicherzustellen, dass ausreichend Resttumor vorhanden ist. Für die Untersuchungen an den Mainzer Patienten gab es zunächst keine Einschränkungen bei der Resttumordicke. Die Erfahrung von Synvie bei der Untersuchung weiterer Kohorten hat gezeigt, dass für ein zuverlässiges Biomarker-Signatur Messung eine Resttumordicke von ca. 40% notwendig ist. Ebenso zeigt die Erfahrung, dass je nach Einbettung des Melanomgewebes im Paraffinblock ungewöhnliche und unplausible Tumordicken von über 200% gemessen werden können.

Von den 178 Patienten, bei denen ein Biomarker-Signatur Ergebnis vorlag, waren bei 17 Melanomgeweben an der S-100 Färbung am Mikroskop Resttumordicken von

<40% (Bereich 15%-39%) gemessen worden. Diese wurden nochmals an den Scans der Gewebe nachgemessen, da die Scans eine höhere Auflösung erlauben. Im Rahmen einer Reevaluierung der Tumordicken an den Scans der Gewebe wurden lediglich bei 4 Melanomen Resttumordicken von 30-33% bestimmt. Diese wurden für eine finale Analyse der Biomarker-Kohorte ausgeschlossen. Der Grenzwert wurde für die Kohortenanalyse bei 35% Resttumordicke gesetzt.

Bei einem Melanom wurde sowohl im Mikroskop als auch im Scan des Gewebes eine Resttumordicke von >350% gemessen. Aufgrund dieses unplausiblen Wertes konnte nicht gesichert werden, welcher Teil des Melanoms im eingebetteten Gewebe in die Untersuchung einging. Das Melanomgewebe wurde für die Kohortenanalyse ausgeschlossen.

3.4.5 Patienten mit Zweitmelanom

Im Verlauf der Datensammlung, die parallel zu den Biomarkermessungen erfolgte, wurden 16 Patienten identifiziert, die vor oder zu dem Zeitpunkt der Erstdiagnose ein weiteres Melanom diagnostiziert bekommen haben. Bei diesen Patienten ist das Follow-up-Geschehen nicht eindeutig allein dem immunhistochemisch untersuchten Melanom zuzuordnen. Da bisher der Einfluss eines Zweitmelanoms auf das Ergebnis der Biomarker-Signatur nicht systematisch untersucht wurde, werden diese 16 Patienten für die finale Biomarker-Kohorte exkludiert.

3.5 Flow-Chart zur Entstehung der Gesamt- und Biomarkerkohorte

Anhand des oben beschriebenen Prozesses entstand eine Gesamtkohorte von 393 Patienten, zu denen die relevanten klinisch-pathologischen Tumordaten sowie die Vital- und Follow-up-Daten vorlagen.

Für die Ergebnisse der Biomarker-Signatur immunoprint® werden 157 Patienten als Biomarkerkohorte ausgewertet.

Ein- / Ausschlusskriterien

- Patienteneinverständnis (Teilnahme an Biomarker-Projekt und Zustimmung für Gewebeanalyse)
- Vitalstatus/ relevante Endpunkte bekannt (Outcome-Information zu MSS/ DMFS/ RFS) bei Follow-Up Zeitraum von mind. 5 Jahren
- Histologischer Befund inkl. Staging Information bekannt (Dermatohistopathologischer u. pathologischer Bericht, Arztbrief)
- (Re-)Staging nach AJCC v8 eindeutig möglich
- dokumentierter erfolgreicher SLNB für untersuchtes Primär-MM
- Repräsentativer Gewebekblock verfügbar (Biomarker-Kohorte)

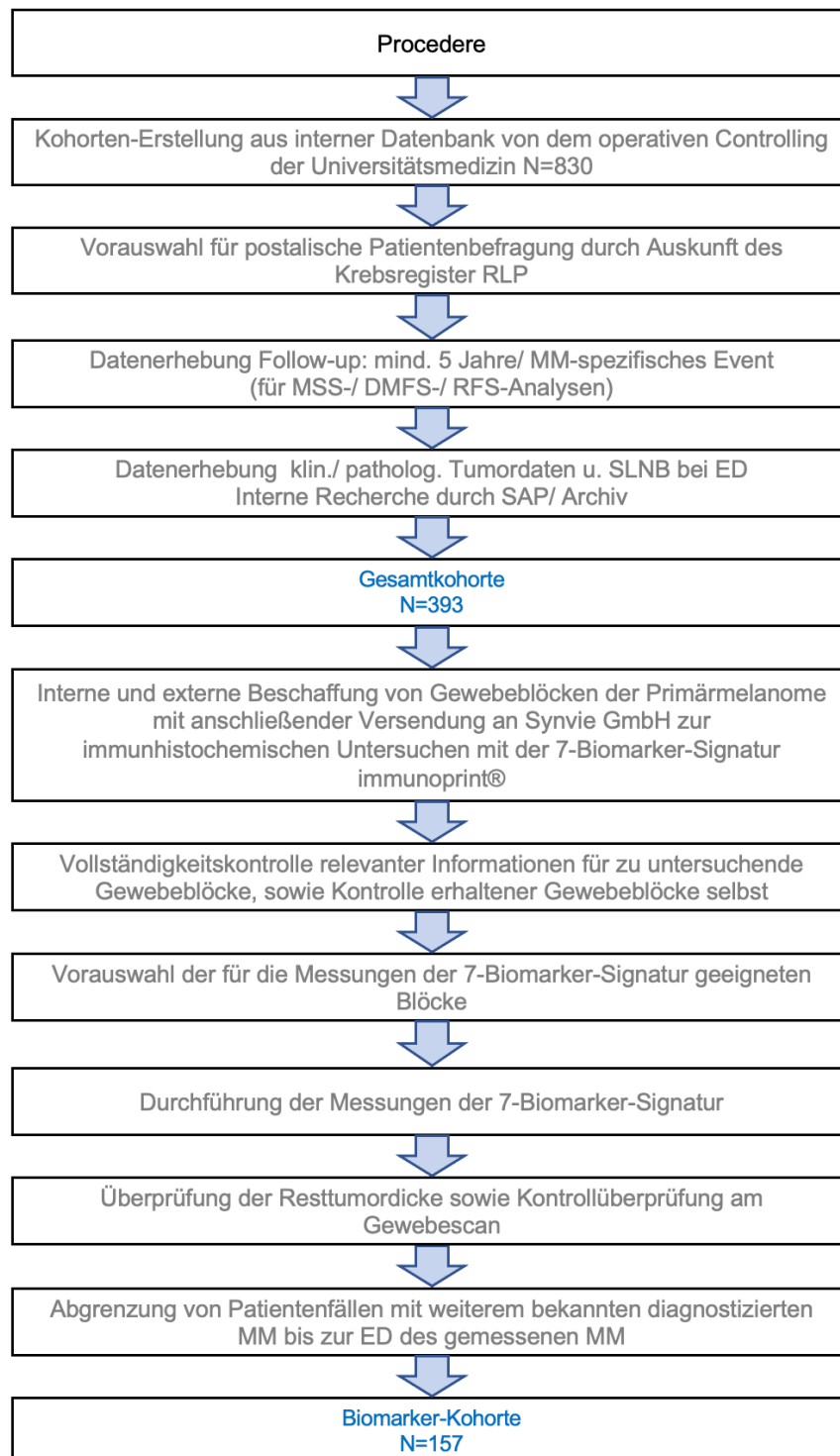


Abbildung 7: Procedere zur Entstehung des Flow-Charts

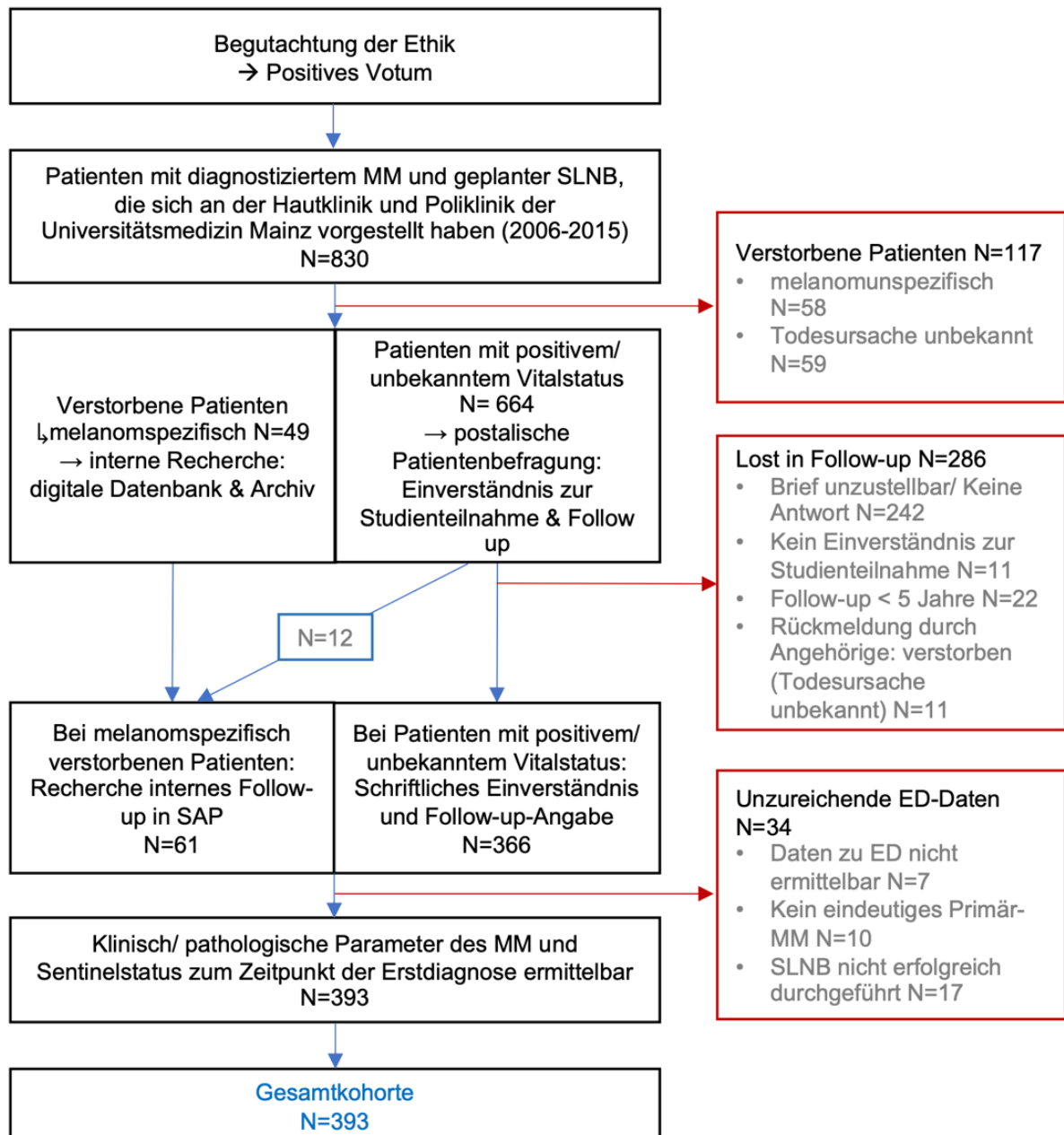


Abbildung 8: Flow Chart der Gesamtkohorte

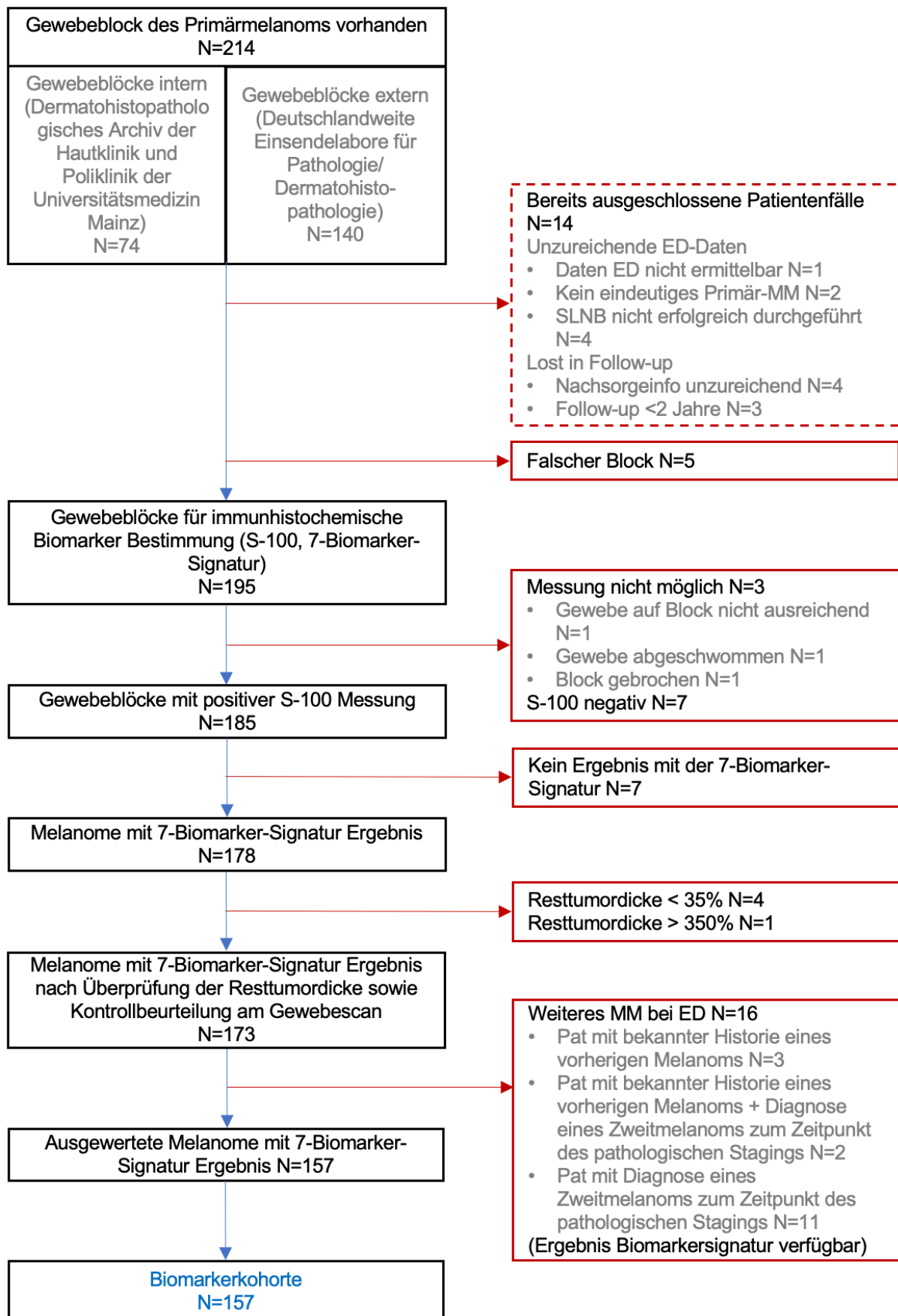


Abbildung 9: Flow-Chart der Biomarkerkohorte

3.6 Statistische Verfahren

Die statistische Auswertung zur Gesamtkohorte wurde unter Verwendung von SPSS Statistics (Version 29 von IBM) auf Basis einer Excel-Arbeitsdatei erstellt. Die statistische Auswertung zur Biomarkerkohorte wurde hingegen durch ein von Staburo erstelltes Analyse-Tool in R, einer Open-Source-Programmiersprache, von der Firma Synvie generiert und zur Verfügung gestellt.

Es werden deskriptive Analysen durchgeführt, um einen Überblick über die jeweiligen Kohorten zu bekommen.

Zudem werden Kaplan-Meier-Kurven erstellt zur Auswertung der Überlebenszeiten.

Cox-Analysen sollen den jeweiligen Einfluss der klinisch/ pathologischen Parameter auf die gewählten Endpunkte darstellen.

Eine logistische Regressionsanalyse soll den prognostischen Wert der etablierten klinisch/ pathologischen Parameter auf das Ergebnis einer Sentinellymphknotenbiopsie untersuchen.

ROC-Analysen sollen den Mehrwert des Risikoscores im Vergleich zu den etablierten klinisch/ pathologischen Parametern für die Endpunkte ermitteln.

Zudem werden die Sensitivität und die Spezifität sowie der negative und positive prädiktive Wert der Signatur untersucht.

3.6.1 Primärer und sekundärer Endpunkt

Als primärer Endpunkt der Studie wird das melanomspezifische Überleben untersucht. Das MSS (melanoma-specific survival) gilt als wichtiges Kriterium für Biomarker, um eine Patientengruppe für eine adjuvante Therapie zu selektieren und zu untersuchen. Das Ziel hierbei ist es, das Patientengut zu stratifizieren, um jene Patienten ausfindig zu machen, die ein hohes Progress-Risiko haben und von einer möglichen Therapie profitieren können. Die Häufigkeit von MSS-Events steht vor allem im Zusammenhang mit dem jeweiligen Tumor-Stadium und der Länge des untersuchten Zeitraums.

Oft wird auch das Gesamtüberleben ausgewertet, wenn die dazu benötigten Daten vorliegen oder generiert werden können wie z.B. im Rahmen von prospektiven Studien. Das OS (overall survival) beinhaltet im Gegensatz zum MSS nicht nur das melanomspezifische Versterben, sondern betrachtet das Versterben im Allgemeinen,

ohne die Todesursache zu berücksichtigen. In dieser Studie entspricht das OS dem MSS jedoch. Grund dafür ist das zumeist fehlende Follow-up von Patienten, die zwar verstorben sind, jedoch explizit nicht am malignen Melanom oder an unbekannter Ursache. Patienten, die einen Progress hatten und im Verlauf an dem malignen Melanom verstorben sind, wurden zu großen Teilen während des weiteren Krankheitsverlaufes bis zu Ihrem Versterben an der Universitätsmedizin Mainz betreut. Patienten, die mit einem malignen Melanom diagnostiziert wurden, jedoch in den ersten Jahren der Nachsorge keinen Progress hatten, wurden im Verlauf oft wieder von Hautärzten nachgesorgt oder haben sich generell für eine heimatnahe Nachsorge entschieden.

Als sekundäre Endpunkte wurden das fernmetastasenfreie Überleben und rezidivfreie Überleben gewählt.

Das DMFS (distant metastasis-free survival) betrachtet das Auftreten von Fernmetastasen im weiteren Krankheitsverlauf nach Erstdiagnose und primärem Staging. Wenn Patienten mit malignem Melanom erste Fernmetastasen diagnostiziert bekommen, bedeutet dies, dass die Krebszellen bereits in größeren Mengen im Körper zirkulieren. Die Lebenserwartung sowie die Überlebenschancen betroffener Patienten sinken hierbei deutlich. Um ein melanomspezifisches Versterben hinauszuzögern oder zu verhindern, ist der Einsatz von Therapiemöglichkeiten wichtig. Je früher betroffene Patienten diese Therapieoptionen aufgezeigt und ermöglicht bekommen, umso besser stehen die Chancen auf einen positiven Einfluss bezüglich der Prognose.

Bei dem RFS wird das Auftreten eines Rezidivs in jeglicher Form berücksichtigt. Dies beinhaltet das Auftreten von Lokalrezidiven, Lymphknotenmetastasen, Fernmetastasen sowie auch explizit das melanomspezifische Versterben. Hierfür wird als Synonym auch oft der Begriff DFS (disease-free survival) verwendet (107,108). In anderen Studien zum malignen Melanom wird das RFS teilweise auch ohne die Berücksichtigung des melanomspezifischen Versterbens definiert, was auch seinen Sinn hat.

Nicht zu verwechseln sind das in dieser Studie untersuchte recurrence-free survival und das relapse-free survival. Das relapse-free survival findet Anwendung in Untersuchungen von therapeutischen Interventionen. Es beschreibt die Zeitspanne zwischen einer therapeutischen Intervention und dem Auftreten eines Progresses. Diese Studie ist jedoch eine retrospektive Studie von Patientenfällen mit Erstdiagnose

eines malignen Melanoms zwischen 2005 und 2015. Zu diesem Zeitpunkt waren Therapieoptionen noch sehr begrenzt und oft nur in Form von einer Teilnahme an Studien verfügbar und wurden somit in dieser Untersuchung nicht berücksichtigt.

Tabelle 9: Definitionen der Endpunkte

Endpunkt	Definition
MSS	Zeitspanne zwischen Erstdiagnose des untersuchten MMs und dem melanomspezifischen Versterben des Patienten
DMFS	Zeitspanne zwischen Erstdiagnose des untersuchten MMs und dem Auftreten von Fernmetastasen
RFS	Zeitspanne zwischen Erstdiagnose des untersuchten MMs und dem Auftreten eines Progresses (Lokalrezidiv, Lymphknotenmetastase, Fernmetastase, melanomspezifisches Versterben des Patienten)

4 Ergebnisse

4.1 Reklassifizierung nach AJCC`8

Die vorliegende Studie schließt Patienten ein, deren Erstdiagnose zwischen 2006 und 2015 erfolgte. Zu diesem Zeitpunkt war die 7. Edition der AJCC-Klassifikation der geltende Standard für die Stadieneinteilung des malignen Melanoms. Um die Daten jedoch im Kontext der aktuellen wissenschaftlichen Erkenntnisse zu analysieren, wird die gesamte Kohorte von 393 Patienten sowie die Subgruppe der Biomarkerkohorte mit 157 Patienten gemäß den Kriterien der 8. AJCC-Edition neu eingestuft. Dadurch resultieren teils erhebliche Verschiebungen in der Stadienverteilung. Betroffen sind dabei die pTNM-Stadien IA und IB sowie die Stadien IIIA bis IIIC.

4.1.1 Gesamtkohorte

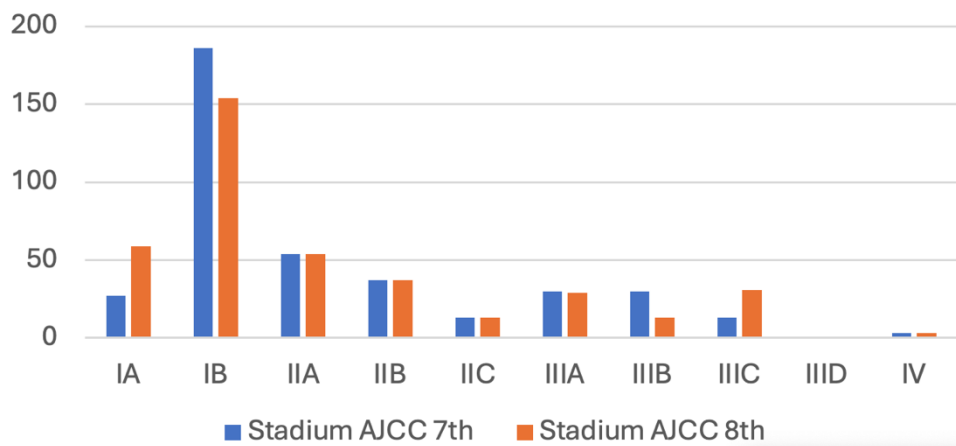


Abbildung 10: pTNM-Stadienverteilung nach AJCC`7 & `8 (Gesamtkohorte)

Das Balkendiagramm stellt die absolute Anzahl der Patienten in den jeweiligen Stadien vor und nach der Umstufung gegenüber. Die auffälligsten Veränderungen betreffen die frühen Stadien IA und IB sowie IIIB und IIIC.

So hat sich die Anzahl der Patienten im Stadium IA von 27 auf 59 mehr als verdoppelt. Folglich ist die Zahl der Patienten im Stadium IB von 186 auf 154 gesunken.

Die Stadien IIA, IIB und IIC bleiben von einer Reklassifizierung unberührt.

Ebenfalls ist eine deutliche Abnahme bei den Patienten in Stadium IIIB von 30 auf 13 Patienten zu beobachten, während im Stadium IIIA lediglich ein Patient wegfällt. Eine deutliche Zunahme ist im Stadium IIIC von 13 auf 31 Patienten zu beobachten.

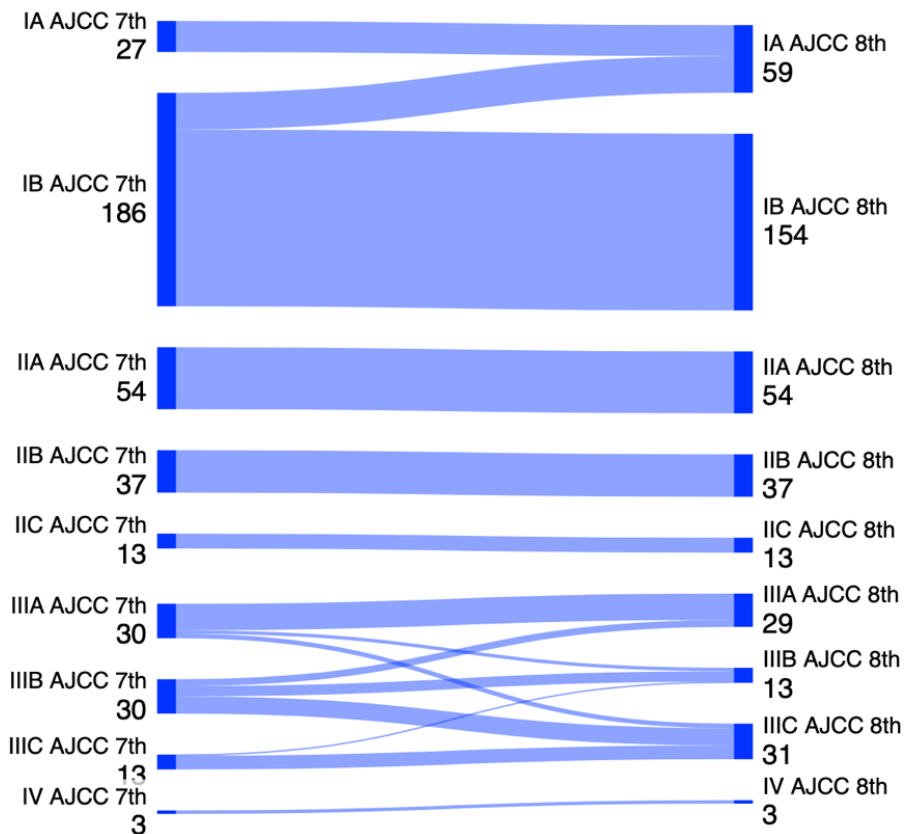


Abbildung 11: Reklassifizierungsströme der pTNM-Stadien von AJCC`7 zu`8 (Gesamtkohorte)

Das Sankey-Diagramm veranschaulicht diese Patientenverschiebungen im Detail.

Es zeigt, wie sich die große Gruppe des alten Stadiums IB von AJCC`7 auf die neuen Stadien IA und IB von AJCC`8 aufteilt.

Ebenso wird die komplexe Umstrukturierung innerhalb des Stadiums III sichtbar. So verlieren die alten Stadien IIIA und IIIC nur wenige Patienten, während das Stadium IIIB 6 Patienten an Stadium IIIA und sogar 15 Patienten an Stadium IIIC verliert. Somit wird das Stadium IIIB von 30 auf 13 Patienten trotz minimaler Zugewinne aus den Stadien IIIA und IIIC reduziert. Auch wenn die neuen Stadien IIIA und IIIB ebenfalls neue Patienten zugeordnet bekommen verringern sie sich trotzdem in ihrer Gesamtzahl, während die Gruppe der IIIC-Patienten von 13 auf 30 stark zunimmt. In der Kohorte gibt es keinen Wechsel zu dem in AJCC`8 neu eingeführten Stadium IIID. Ebenso bleiben Patienten der Stadien II und IV unberührt.

4.1.2 Biomarkerkohorte

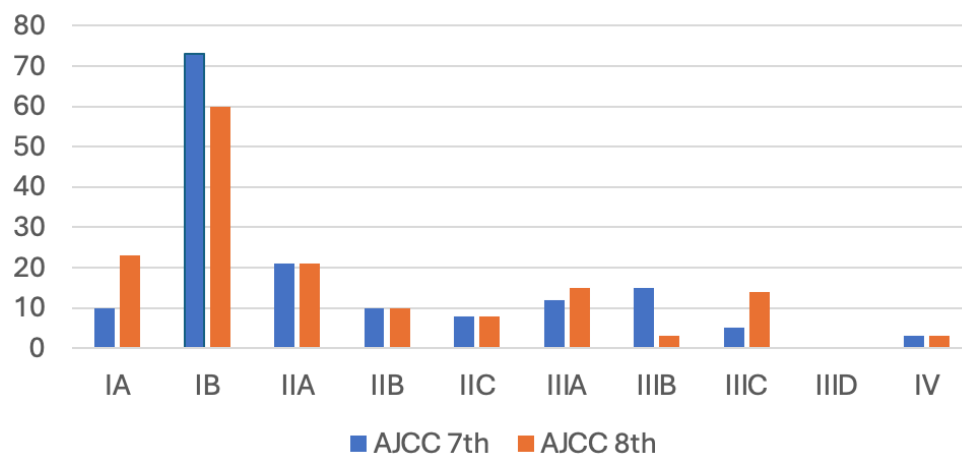


Abbildung 12: pTNM-Stadienverteilung nach AJCC`7 &`8 (Biomarkerkohorte)

Analog zur Gesamtkohorte wurde die Reklassifizierung von der 7. zur 8. AJCC-Edition ebenfalls für die Subgruppe der 157 Patienten analysiert. Mit dem Vergleich der Stadienzusammensetzung nach AJCC`8 von der Gesamtkohorte und der Biomarkerkohorte lässt sich überprüfen, ob die Biomarkerkohorte eine repräsentative Stichprobe der Gesamtkohorte darstellt.

Auch hier zeigt das Balkendiagramm die charakteristischen Verschiebungen. Die Anzahl der Patienten im Stadium IA steigt von 10 auf 23 an, während die des Stadiums IB von 73 auf 60 sinken. Auch hier nimmt das Stadium IIIC von 5 auf 14 stark zu während sich das Stadium IIIB von 15 auf 3 noch deutlicher verkleinert. Das neue Stadium IIIA steigt im Gegensatz zur Gesamtkohorte sogar leicht an von 12 auf 15 Patienten.

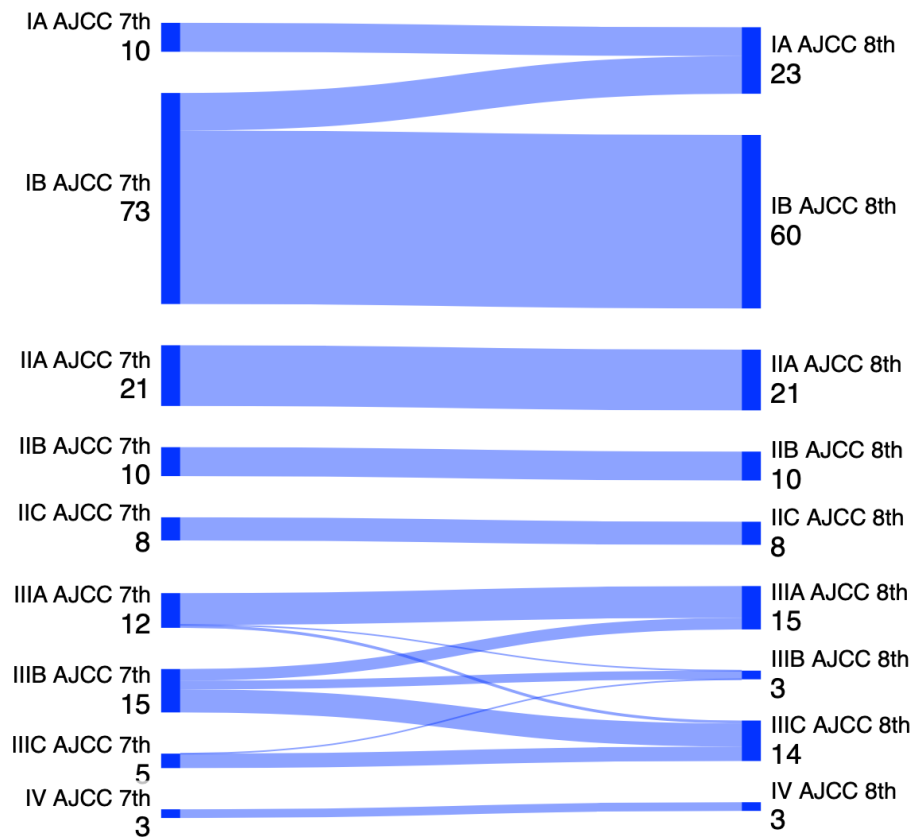


Abbildung 13: Reklassifizierungsströme der pTNM-Stadien von AJCC 7 zu 8 (Biomarkerkohorte)

Das Sankey-Diagramm verdeutlicht die zugrundeliegenden Patientenströme der Reklassifizierung für die Biomarkerkohorte. Es wird sichtbar, dass sich die Verschiebungen nicht nur in den frühen Stadien von IB zu IA, sondern auch innerhalb der komplexen Stadium-III-Gruppen analog zur Gesamtkohorte verhalten. Beispielsweise verteilen sich die 15 Patienten des alten Stadiums IIIB auf die neuen Stadien IIIA (4 Patienten), IIIB (3 Patienten) und IIIC (8 Patienten).

4.2 Gesamtkohorte (n=393)

4.2.1 Kohortenbeschreibung

Tabelle 10: Deskriptive Analyse (Gesamtkohorte)

Patienten- und klinisch/ pathologische Parameter der Gesamtkohorte, sowie stratifiziert nach positivem vs. negativem Sentinel-Status (alle, SLNB-, SLNB+)

Variable	Kategorie	Gesamtkohorte (n = 393)	SLNB- Patienten (n=320; 81,4%)	SLNB+ Patienten (n=73; 18,6%)	p-Wert
Follow-up Zeit (Monate)					0,002
	Mittelwert (SD)	89 (37,5)	92,0 (36,5)	75,7 (38,9)	
	Median (Min, Max)	85 (0-172)	88,0 (0-172)	78 (0-156)	
Geschlecht					0,120
	männlich	215 (54,7%)	169 (43,0%)	46 (11,7%)	
	weiblich	178 (45,3%)	151 (38,4%)	27 (6,9%)	
Alter bei ED (in Jahren)					0,192
	Mittelwert (SD)	57,5 (13,9)	57,1 (14,0)	59,4 (13,3)	
	Median (Min, Max)	59,0 (14-87)	58,0 (14-82)	59,0 (27-87)	
Tumordicke (in mm)					0,003
	Mittelwert (SD)	2,2 (2,0)	2,0 (1,8)	3,0 (2,6)	
	Median (Min, Max)	1,5 (0-15)	1,4 (0-15)	2,0 (1-15)	
Ulzeration					<0,001
	ja	94 (23,9%)	61 (15,5%)	33 (8,4%)	
	nein	299 (76,1%)	259 (65,9%)	40 (10,2%)	
Mitose-Index					0,071
	<1/mm ²	70 (17,8%)	59 (15,0%)	11 (2,8%)	
	>1/mm ²	179 (45,5%)	137 (34,9%)	42 (10,7%)	
	ohne Angabe	144 (36,6%)	124 (31,6%)	20 (5,1%)	
Clark-Level					0,095
	2	5 (1,3%)	4 (1,0%)	1 (0,3%)	
	3	72 (18,3%)	64 (16,3%)	8 (2,0%)	
	4	279 (71,0%)	221 (56,2%)	58 (14,8%)	
	5	11 (2,8%)	7 (1,8%)	4 (1,0%)	
	ohne Angabe	26 (6,6%)	24 (6,1%)	2 (0,5%)	
Subtyp					0,230
	ALM	17 (4,3%)	12 (3,1%)	5 (1,3%)	
	andere	36 (9,2%)	31 (7,9%)	5 (1,3%)	
	LMM	5 (1,3%)	4 (1,0%)	1 (0,3%)	
	NMM	91 (23,2%)	68 (17,3%)	23 (5,9%)	
	ohne Angabe	46 (11,7%)	36 (9,2%)	10 (2,5%)	
	SSM	198 (50,4%)	169 (43,0%)	29 (7,4%)	
Lokalisation					0,583
	Arm	64 (16,3%)	53 (13,5%)	11 (2,8%)	
	Bein	99 (25,2%)	81 (20,6%)	18 (4,6%)	
	Fuß	26 (6,6%)	18 (4,6%)	8 (2,0%)	
	Hand	2 (0,5%)	2 (0,5%)	0 (0,0%)	
	Kopf/Hals	18 (4,6%)	16 (4,1%)	2 (0,5%)	
	Rumpf	184 (46,8%)	150 (38,2%)	34 (8,7%)	
T Stadium					<0,001
	T1a	9 (7,6%)	9 (2,3%)	0 (0,0%)	
	T1b	59 (9,7%)	50 (12,7%)	9 (2,3%)	
	T2a	176 (44,8%)	154 (39,2%)	22 (5,6%)	
	T2b	24 (6,1%)	18 (4,6%)	6 (1,5%)	
	T3a	36 (9,2%)	37 (9,4%)	6 (1,5%)	
	T3b	36 (9,2%)	25 (6,4%)	11 (2,8%)	
	T4a	18 (4,6%)	13 (3,3%)	5 (1,3%)	
	T4b	28 (7,1%)	14 (3,6%)	14 (3,6%)	
pTNM (AJCC8)					<0,001
	IA	59 (15,0%)	59 (15,0%)	0 (0,0%)	
	IB	154 (39,2%)	154 (39,2%)	0 (0,0%)	
	IIA	54 (13,7%)	54 (13,7%)	0 (0,0%)	
	IIB	37 (9,4%)	37 (9,4%)	0 (0,0%)	
	IIC	13 (3,3%)	13 (3,3%)	0 (0,0%)	
	IIIA	29 (7,4%)	0 (0,0%)	29 (7,4%)	
	IIIB	13 (3,3%)	1 (0,3%)	12 (3,1%)	
	IIIC	31 (7,9%)	2 (0,5%)	29 (7,4%)	
	IV	3 (0,8%)	0 (0,0%)	3 (0,8%)	

Die Tabelle zur Beschreibung des Patientenkollektivs liefert eine umfassende deskriptive Analyse der Gesamtkohorte (n=393) und stratifiziert diese zusätzlich nach dem Status des Wächterlymphknotens. Von den 393 Patienten weisen hierbei 320 (81,4%) einen negativen (SLNB-) und 73 (18,6%) einen positiven (SLNB+) Befund auf.

Die mediane Nachbeobachtungszeit beträgt 85 Monate. Es zeigt sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen ($p=0,002$). Die SLNB-negativen Patienten haben eine mediane Follow-up-Zeit von 88,0 Monaten, während sie bei den SLNB-positiven Patienten bei 78,0 Monaten liegt.

Ebenso ist die Verteilung der Geschlechter in der SLNB-negativen Gruppe ähnlich, während in der SLNB-positiven Gruppe mit 63%¹ mehr Männer zu finden sind.

Das mediane Alter bei Erstdiagnose liegt in der Gesamtkohorte bei 59 Jahren, und mit 54,7% sind Männer leicht in der Überzahl. Der Median der Altersverteilung ist in beiden Subgruppen vergleichbar.

Beim Mitoseindex gibt es mit 36,6% eine hohe Anzahl von fehlenden Werten. Die verfügbaren Daten zeigen jedoch, dass 79 % der SLNB-positiven Patienten (42 von 53) einen Mitoseindex von $>1/\text{mm}^2$ haben, während es bei SLNB-negativen Patienten nur 70% sind (137 von 196). Dieser Unterschied ist jedoch statistisch nicht signifikant ($p=0,071$).

Der Clark-Level unterscheidet sich zwischen den Gruppen nicht signifikant ($p=0,095$). In beiden Kollektiven ist der Clark-Level 4 am häufigsten vertreten, gefolgt von Clark-Level 3.

Der häufigste Melanom-Subtyp ist in beiden Gruppen das superfiziell spreitende Melanom (SSM), gefolgt vom nodulären malignen Melanom (NMM). In der SLNB-positiven Gruppe ist der Anteil an NMM tendenziell höher und der Anteil an SSM niedriger als in der SLNB-negativen Gruppe. Die Gesamtverteilung der Subtypen zwischen den Gruppen ist jedoch nicht statistisch signifikant ($p=0,230$).

¹ Die im weiteren Verlauf angegebenen Prozentzahlen entstammen teilweise weiteren Berechnungen basierend auf den vorliegenden Tabellen. Hier beispielhaft für die Subgruppe der sentinelpositiven Patienten mit $63\% = 46(\text{Anzahl Männer}) / (46 + 27(\text{Anzahl Frauen}))$.

Statistisch signifikante Unterschiede finden sich bei der Tumordicke sowie der Ulzeration.

So ist die Tumordicke nach Breslow bei Patienten mit positivem SLN-Befund mit einem Median von 2,0 mm statistisch signifikant höher als bei Patienten mit negativem Befund mit einem Median 1,4 mm ($p=0,003$).

Noch prägnanter ist der Unterschied beim Vorhandensein einer Ulzeration. Während in der SLNB-negativen Gruppe nur etwa 19% der Tumore ulzeriert sind, trifft dies auf 45% der Tumore in der SLNB-positiven Gruppe zu ($p<0,001$).

Diese beiden Faktoren, also eine höhere Tumordicke und das Vorhandensein einer Ulzeration, erweisen sich somit in dieser Kohorte als die stärksten klinisch-pathologischen Prädiktoren für eine lymphogene Metastasierung in Form eines positiven Sentinellymphknotenbefundes.

Diese Unterschiede in den Primärtumoreigenschaften spiegeln sich direkt und erwartungsgemäß in der finalen Stadieneinteilung nach AJCC 8 wider ($p<0,001$). Per Definition führt ein positiver SLN-Befund zur Einteilung in ein höheres Stadium der pTNM-Kategorie III bzw. IV. Folglich befinden sich fast alle 320 SLNB-negativen Patienten in den Stadien I oder II, während alle 73 SLNB-positiven Patienten den Stadien III oder IV zugeordnet werden.

4.2.2 Kaplan-Meier-Analyse

Die Kaplan-Meier-Kurven visualisieren die Überlebenswahrscheinlichkeiten der gesamten Kohorte (n=393) über einen Zeitraum von bis zu 172 Monaten. Analysiert werden drei klinische Endpunkte, nämlich das melanomspezifische Überleben (MSS), das fernmetastasenfreie Überleben (DMFS) und das rezidivfreie Überleben (RFS).

4.2.2.1 MSS, DMFS, RFS

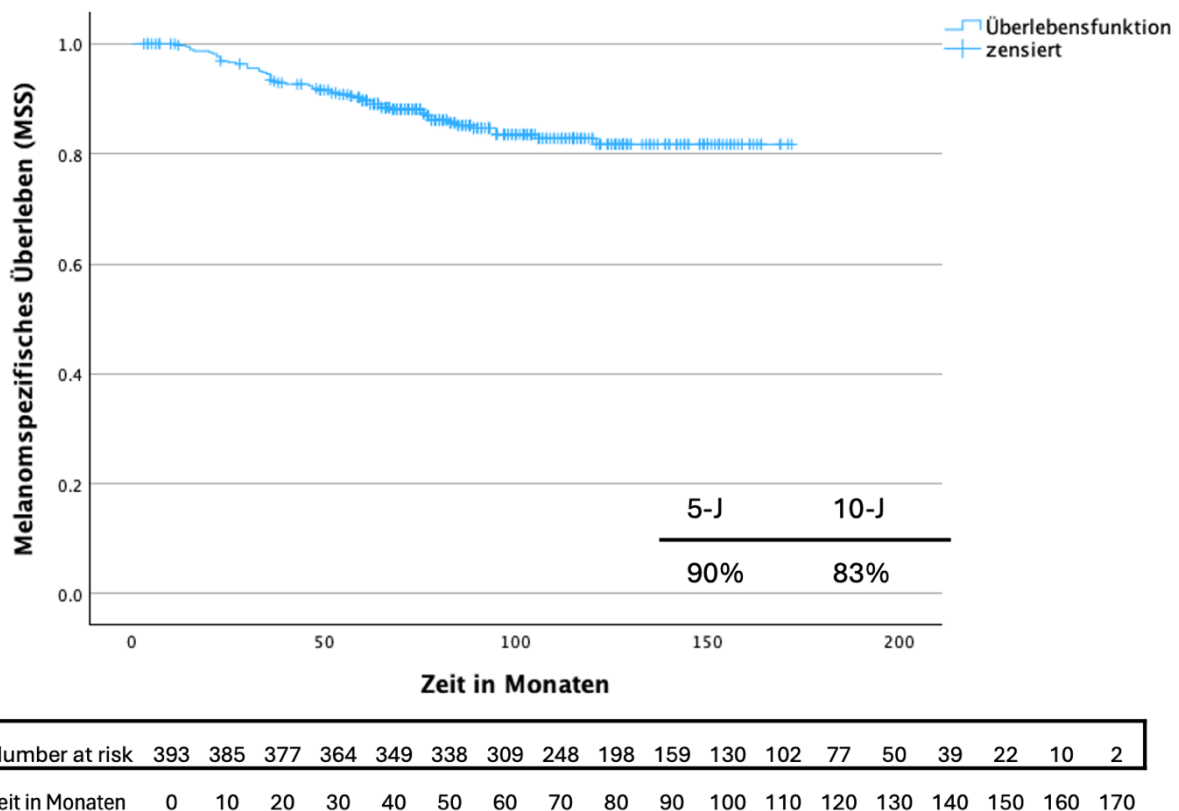
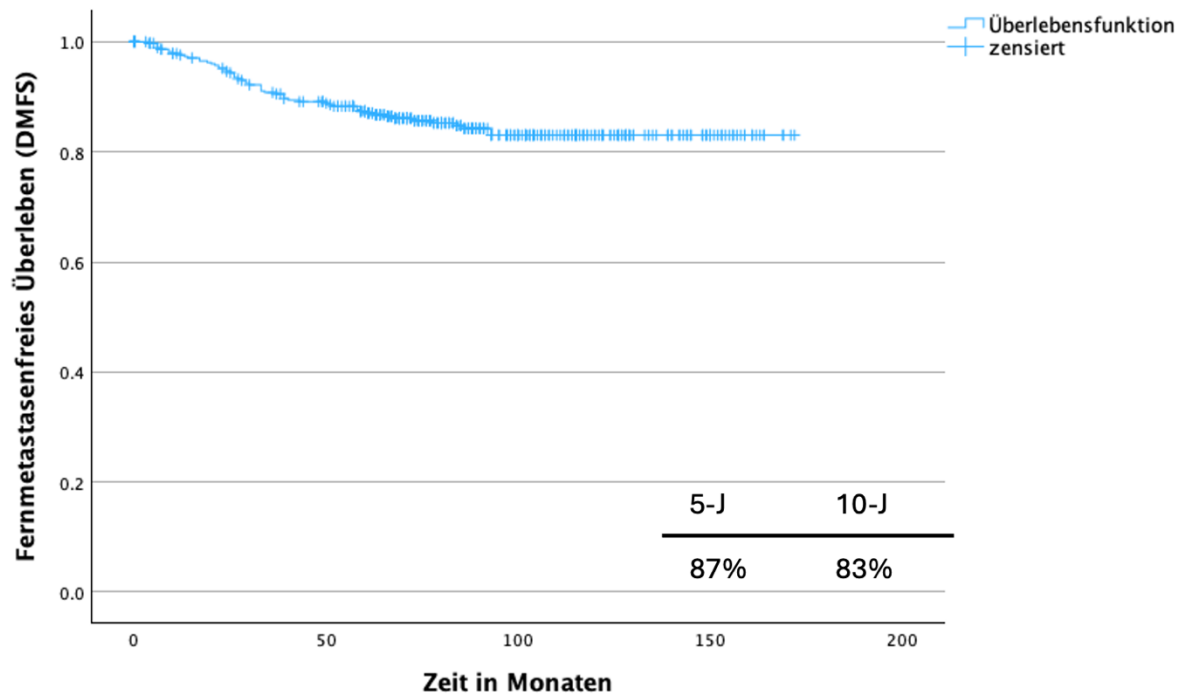


Abbildung 14: Melanomspezifische Überlebenszeitanalyse (Gesamtkohorte)

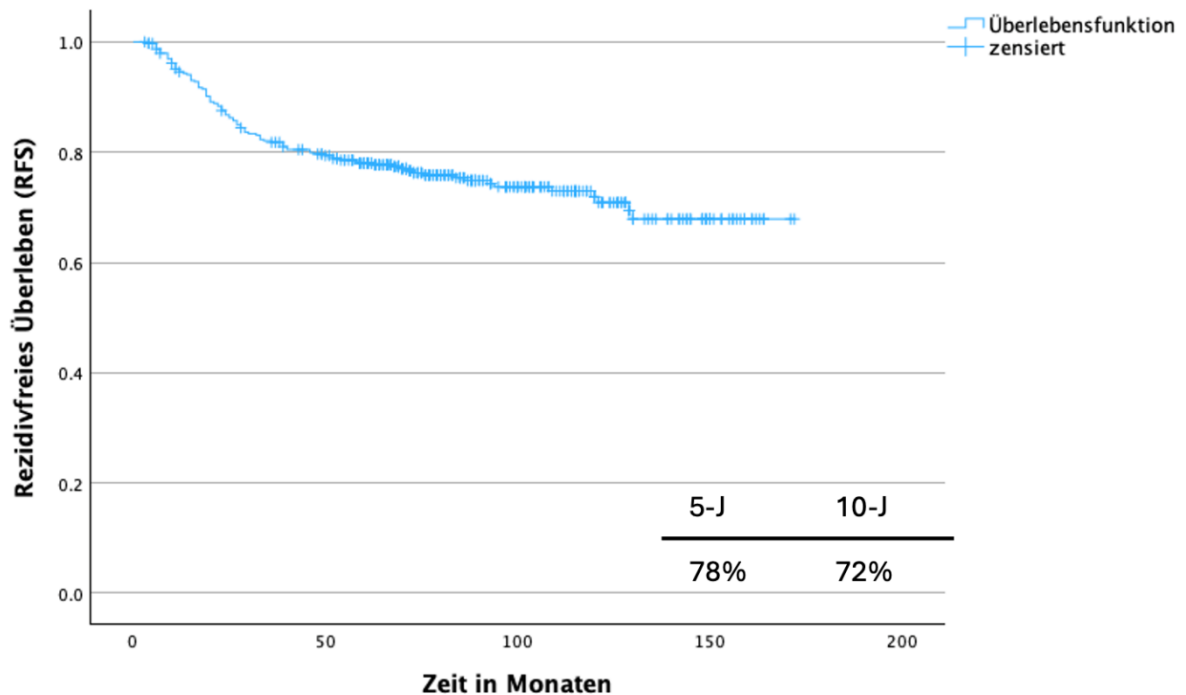
Die 5-Jahres-Überlebensrate für das melanomspezifische Überleben liegt bei 90%, die 10-Jahres-Rate bei 83%. Jedoch ist der Kurvenverlauf in den ersten Jahren relativ flach und fällt dann langsam und kontinuierlich ab, was den Verlauf einer Krebserkrankung mit verzögertem Metastasierungs- und Mortalitätsrisiko widerspiegelt.



Number at risk	393	365	355	335	321	312	285	227	182	145	120	96	71	48	39	22	10	2
Zeit in Monaten	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160	170

Abbildung 15: Fernmetastasenfreie Überlebenszeitanalyse (Gesamtkohorte)

Die Kurve für das fernmetastasenfreie Überleben (DMFS) ist ähnlich der des MSS. Die Rate der Patienten, die nach 5 Jahren noch keine Fernmetastasen entwickelt hat, beträgt 87 %, nach 10 Jahren 83 %. Die große Ähnlichkeit zur MSS-Kurve verdeutlicht, dass das Auftreten von Fernmetastasen mit der melanomspezifischen Mortalität korreliert.



Number at risk	393	371	342	318	303	293	266	212	168	135	115	92	68	42	35	18	8	2
Zeit in Monaten	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160	170

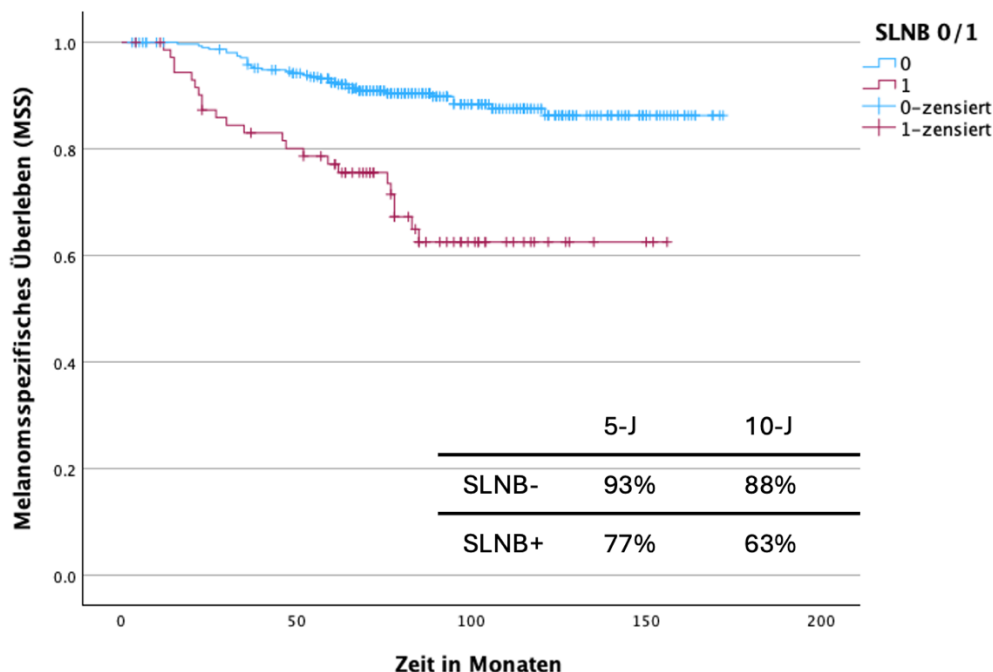
Abbildung 16: Rezidivfreie Überlebenszeitanalyse (Gesamtkohorte)

Die Kurve, die das rezidivfreie Überleben (RFS) darstellt, fällt am steilsten ab. Die 5-Jahres-Rate liegt hier bei 78%, die 10-Jahres-Rate bei 72%. Dieser stärkere Abfall ist zu erwarten, da der RFS-Endpunkt jegliche Form des Krankheitsrückfalls, nämlich auch Lokalrezidive und regionale Lymphknotenmetastasen erfasst, die bereits innerhalb der ersten 36 Monaten bzw. der ersten 5 Jahren auftreten. Der Kurvenverlauf zeigt, dass das höchste Rezidivrisiko innerhalb der ersten fünf Jahre nach Erstdiagnose besteht.

4.2.2.2 MSS, DMFS, RFS stratifiziert nach SLN-Status

Die Überlebenskurven werden hier getrennt für Patienten mit negativem (SLNB-) und positivem (SLNB+) Sentinelbefund für die Endpunkte MSS, DMFS und RFS analysiert und demonstrieren die prognostische Bedeutung des Wächterlymphknoten-Status.

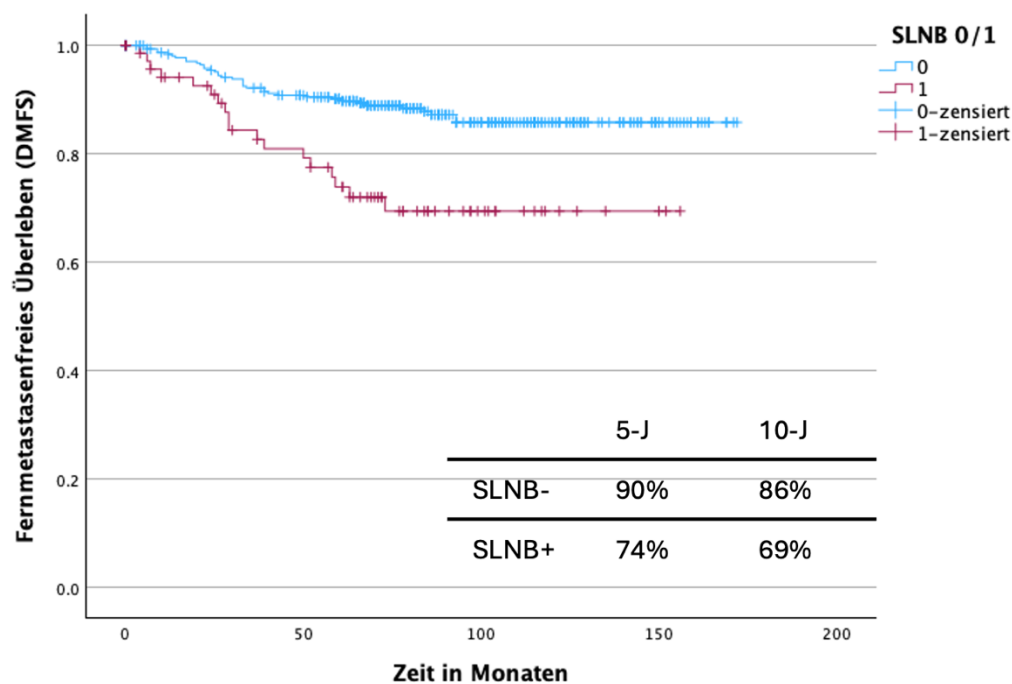
Bei allen drei Endpunkten ist eine klare und statistisch signifikante Trennung der beiden Kurven zu erkennen. Die Kurven der SLNB-positiven Patienten verlaufen durchgängig deutlich unterhalb derer der SLNB-negativen Patienten, was das deutlich erhöhte Risiko für Tod, Fernmetastasierung und jegliche Art von Rezidiv für diese Patientengruppe belegt.



Number at risk	393	385	377	364	349	338	309	248	198	159	130	102	77	50	39	22	10	2
SLNB-	320	313	311	305	292	283	258	207	168	136	113	91	70	46	36	20	10	2
SLNB+	73	72	66	59	57	55	51	41	30	23	17	11	7	4	3	2	0	0
Zeit in Monaten	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160	170

Abbildung 17: Melanomspezifische Überlebenszeitanalyse stratifiziert nach SLN-Status (Gesamtkohorte)

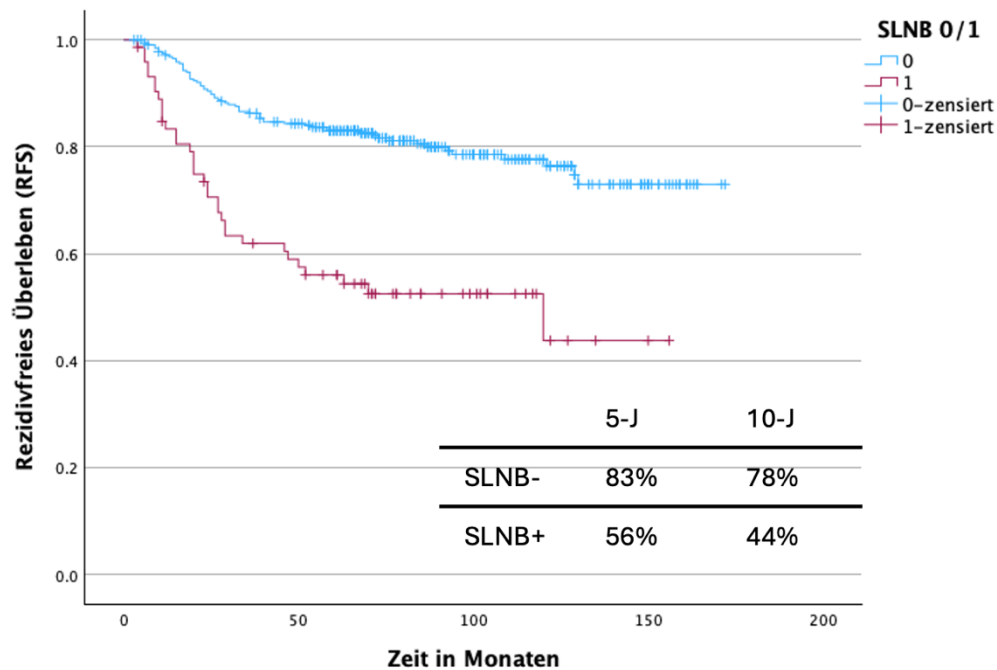
So beträgt beim melanomspezifischen Überleben die 10-Jahres-Rate für SLNB-negative Patienten 88%, für SLNB-positive Patienten jedoch nur 63%, was einen Unterschied von 25 Prozentpunkten ausmacht. Patienten mit positivem Sentinel-Status haben somit bereits nach 5 Jahren mit 77% ein deutlich schlechteres Überleben als sentinelnegative Patienten langfristig nach 10 Jahren.



Zeit in Monaten																		
Number at risk	393	365	355	335	321	312	285	227	182	145	120	96	71	48	39	22	10	2
SLNB-	320	303	296	285	274	266	244	195	158	126	106	86	65	44	36	20	10	2
SLNB+	73	62	59	50	47	46	41	32	24	19	14	10	6	4	3	2	0	0
Zeit in Monaten	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160	170

Abbildung 18: Fernmetastasenfreie Überlebenszeitanalyse stratifiziert nach SLN-Status (Gesamtkohorte)

Ähnlich verhält es sich beim fernmetastasenfreien Überleben (DMFS), wo die 10-Jahres-Raten bei 86% (SLNB-) gegenüber 69% (SLNB+) liegen. Weiterhin zu beobachten ist, dass sich beide Kurven nach ca. 8 Jahren stabilisieren und keine weiteren Ereignisse in Form von Fernmetastasen stattfinden.



Number at risk	393	371	342	318	303	293	266	212	168	135	115	92	68	42	35	18	8	2
SLNB-	320	307	289	274	261	254	230	185	148	118	101	82	63	39	33	17	8	2
SLNB+	73	64	53	44	42	39	36	27	20	17	14	10	5	3	2	2	0	0
Zeit in Monaten	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160	170

Abbildung 19: Rezidivfreie Überlebenszeitanalyse stratifiziert nach SLN-Status (Gesamtkohorte)

Der größte Unterschied in den 5- bzw. 10-Jahres-Überlebensraten ist beim rezidivfreien Überleben (RFS) zu erkennen. Während 78% der SLNB-negativen Patienten nach 10 Jahren rezidivfrei bleiben, sind es bei den SLNB-positiven Patienten nur 44%. Dies bedeutet, dass mehr als die Hälfte dieser Patienten innerhalb von 10 Jahren einen Krankheitsrückfall erleidet.

4.2.2.3 MSS, DMFS, RFS stratifiziert nach pTNM-Stadium (AJCC`8)

Die Überlebenskurven für MSS, DMFS und RFS werden hier für jede einzelne Stadiengruppe von IA bis IV dargestellt, was eine differenzierte Betrachtung des Risikos ermöglicht. Sie bestätigen die prognostische Aussagekraft der nun aktuell gültigen Stadieneinteilung nach der 8. Edition des AJCC innerhalb der untersuchten Kohorte.

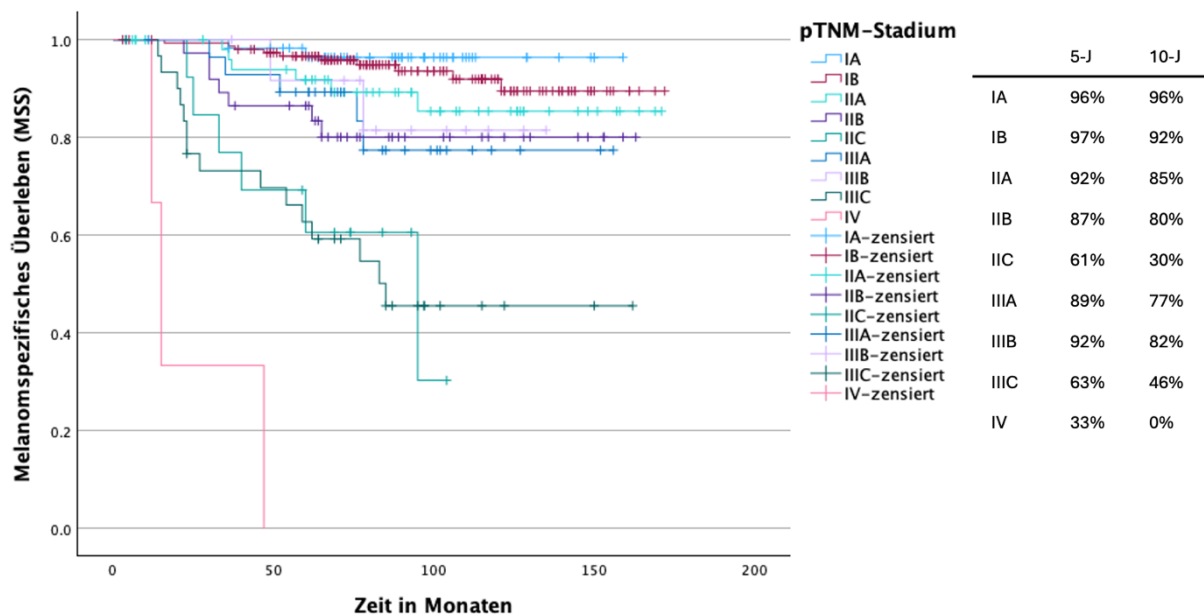


Abbildung 20: Melanomspezifische Überlebenszeitanalyse stratifiziert nach pTNM-Stadium (Gesamtkohorte)

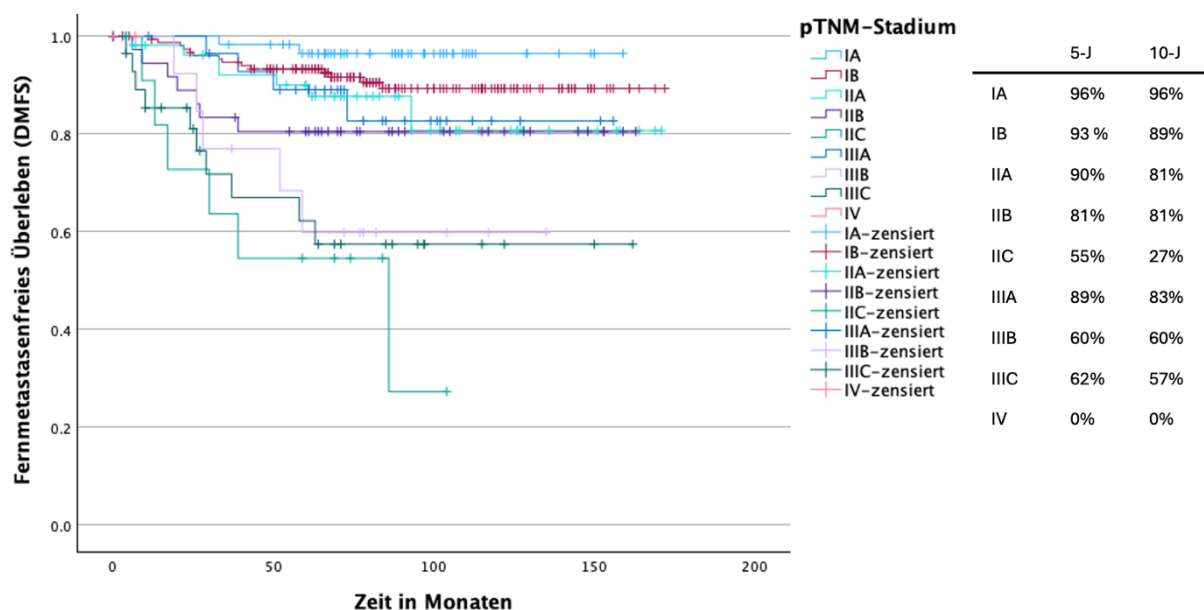


Abbildung 21: Fernmetastasenfreie Überlebenszeitanalyse stratifiziert nach pTNM-Stadium (Gesamtkohorte)

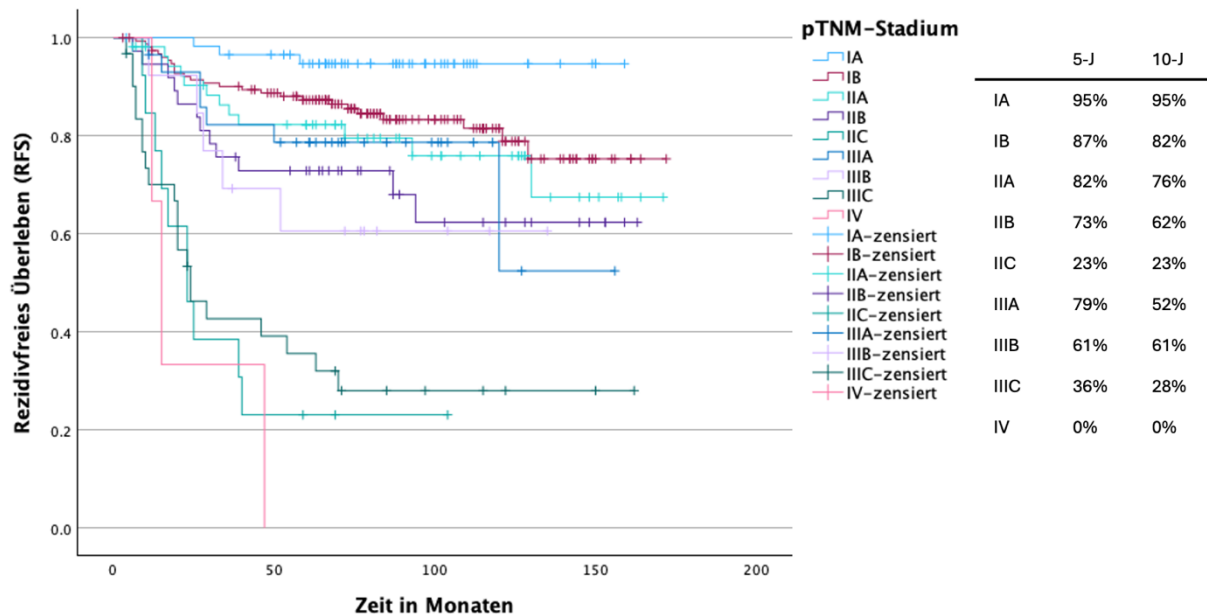


Abbildung 22: Rezidivfreie Überlebenszeitanalyse stratifiziert nach pTNM-Stadium (Gesamtkohorte)

Die Grafiken zeigen für alle drei Endpunkte eine klare und zu erwartende treppenartige Abstufung. Sie zeigt das mit höherem Stadium die Prognose zumeist ungünstiger wird. Die Kurven für die Niedrigrisikostadien (wie IA, IB) verlaufen im oberen Bereich der Grafik, während die Kurven für die Hochrisikostadien (insbesondere IIB und IIIC) deutlich schneller und tiefer abfallen.

Ein interessantes und für die 8. Edition charakteristisches Detail ist jedoch die nicht mehr streng lineare Abfolge der Prognosen. So ist deutlich zu erkennen, dass die Überlebenskurve für das Stadium IIIA über der der Stadien IIB und IIC liegt.

4.2.3 Uni- und multivariate Cox-Analyse

Die Tabelle präsentiert die Ergebnisse der Cox-Regressionsanalyse für die Gesamtkohorte, bestehend aus 393 Patienten. Diese Analyse zeigt den Einfluss klassischer klinisch-pathologischer Risikofaktoren auf die drei Endpunkte melanomspezifisches Überleben, fernmetastasenfreies Überleben und rezidivfreies Überleben. Es wird dabei der Einfluss der nach dem AJCC wichtigsten Variablen für das Überleben wie die Tumordicke nach Breslow, das Vorhandensein einer Ulzeration und der Wächterlymphknotenstatus untersucht, jedoch auch das Alter bei Erstdiagnose sowie das Geschlecht mit einbezogen.

Tabelle 11: Cox-Regression für MSS, DMFS & RFS (Gesamtkohorte)

Patienten/ Kohorte	Variable/ Prognostische Faktoren	Univariat		Multivariat	
		HR (95% CI)	p-Wert	HR (95% CI)	p-Wert
Gesamtkohorte (n=393) (Ereignisse: MSS: 56 DMFS: 56 RFS: 99)	MSS				
	Tumordicke (mm)	1,309 (1,231-1,393)	<0,001	1,227(1,152-1,306)	<0,001
	Ulzeration (0=nein)	0,314 (0,185-0,532)	<0,001	0,550 (0,358-0,845)	0,006
	Nodalstatus (0=Neg)	0,275 (0,161-0,469)	<0,001	0,450 (0,288-0,703)	<0,001
	Alter Diagnose (Jahre)	1,056 (1,032-1,081)	<0,001	1,037 (1,019-1,055)	<0,001
	Geschlecht (W)	0,499 (0,282-0,882)	0,017	1,115 (0,729-1,706)	0,617
	DMFS				
	Tumordicke (mm)	1,328 (1,239-1,423)	<0,001	1,284 (1,190-1,384)	<0,001
	Ulzeration (0=nein)	0,435 (0,252-0,752)	0,003	0,685 (0,390-1,201)	0,187
	Nodalstatus (0=Neg)	0,387 (0,221-0,679)	<0,001	0,529 (0,295-0,950)	0,033
	Alter Diagnose (Jahre)	1,030 (1,008-1,052)	0,007	1,017 (0,995-1,040)	0,122
	Geschlecht (W)	0,562 (0,323-0,977)	0,041	1,314 (0,746-2,314)	0,344
	RFS				
	Tumordicke (mm)	1,281 (1,215-1,350)	<0,001	1,215 (1,144-1,290)	<0,001
	Ulzeration (0=nein)	0,346 (0,232-0,516)	<0,001	0,592 (0,386-0,909)	0,016
	Nodalstatus (0=Neg)	0,332 (0,219-0,504)	<0,001	0,473 (0,304-0,738)	<0,001
	Alter Diagnose (Jahre)	1,040 (1,023-1,057)	<0,001	1,026 (1,009-1,043)	0,003
	Geschlecht (W)	0,554 (0,365-0,841)	0,006	1,466 (0,964-2,231)	0,074

Endpunkte: Melanom spezifisches Überleben MSS (Melanoma-Specific Survival), Fernmetastasen-freies Überleben DMFS (Distant-Metastasis-Free Survival), Rezidiv-freies Überleben RFS (Recurrence-Free Survival)

Es wird unterschieden zwischen der univariaten Analyse, die jeden Faktor isoliert betrachtet, und der multivariaten Analyse, die den unabhängigen Vorhersagewert jedes Faktors bei gleichzeitiger Berücksichtigung aller anderen Variablen ermittelt.

In der univariaten Analyse erweisen sich alle untersuchten Faktoren als signifikante Prädiktoren für den Krankheitsverlauf. So erhöht eine Zunahme der Tumordicke das Risiko für alle negativen Endpunkte signifikant. Ebenso sind das Vorhandensein einer Ulzeration und ein positiver Nodalstatus Risikofaktoren, die die Überlebenschancen erheblich verschlechtern. Auch ein höheres Alter bei der Diagnose ist durchweg mit einer schlechteren Prognose assoziiert. Interessanterweise zeigt sich das weibliche Geschlecht in dieser Einzelbetrachtung als ein signifikanter Schutzfaktor mit einem geringeren Risiko für Tod, Metastasierung und Rezidiv.

Die multivariate Analyse liefert ein präziseres Bild, indem sie die unabhängigen Prognosefaktoren herausfiltert. Für das melanomspezifische Überleben bleiben die vier Faktoren Tumordicke, Ulzeration, Nodalstatus und Alter bei Diagnose allesamt signifikante, unabhängige Prädiktoren für das Versterben am Melanom.

Zur Vorhersage des fernmetastasenfreien Überlebens stellen sich die Tumordicke und der Nodalstatus als die stärksten unabhängigen Risikofaktoren heraus.

Ein ähnliches Bild wie beim MSS zeigt sich für das rezidivfreie Überleben. Auch hier bleiben Tumordicke, Ulzeration, Nodalstatus und Alter bei Diagnose starke und voneinander unabhängige Risikofaktoren. Das weibliche Geschlecht verliert in allen multivariaten Modellen seine Signifikanz, was darauf hindeutet, dass sein scheinbar schützender Effekt durch andere Faktoren erklärt wird.

Zusammenfassend untermauert diese umfassende Analyse für die Gesamtkohorte die prognostische Gültigkeit der im AJCC-Staging-System verwendeten Kernkriterien. Tumordicke, Ulzeration und der Status der Wächterlymphknoten sind die robustesten und wichtigsten unabhängigen Faktoren zur Vorhersage des Krankheitsverlaufs bei Melanompatienten. Zusätzlich stellt auch das Alter des Patienten einen eigenständigen Risikofaktor dar.

4.2.4 Uni- und multivariate logistische Regression zur Vorhersage des SLN-Status

Die Tabelle zeigt die Ergebnisse einer logistischen Regression, welche klinisch-pathologischen Faktoren am besten den Status des Wächterlymphknotens (positiv vs. negativ) vorhersagen können. Das Ergebnis wird als Odds Ratio angegeben, welche die Wahrscheinlichkeit für einen positiven SLN-Status beschreibt.

Tabelle 12: Logistische Regression für MSS, DMFS & RFS (Gesamtkohorte)

		Univariat		Multivariat	
Variable/ Prognostische Faktoren		OR (95% CI)	p-Wert	OR (95% CI)	p-Wert
Alter bei Diagnose		1,013 (0,994-1,032)	0,192	0,994 (0,972-1,015)	0,564
Geschlecht		1,522 (0,902-2,569)	0,116	0,686 (0,376-1,253)	0,220
Typ	SMM (Referenz univariat)		0,243	0,417 (0,060-2,875)	0,375
	ALM (Referenz multivariat)	2,428 (0,796-7,406)	0,119		0,680
	andere	0,940 (0,338-2,616)	0,906	0,404 (0,048-3,421)	0,406
	LMM	1,457 (0,157-13,501)	0,740	1,651 (0,072-37,951)	0,754
	NMM	1,971 (1,065-3,647)	0,031	0,564 (0,079-4,037)	0,568
	o. A.	1,619 (0,725-3,616)	0,240	0,714 (0,098-5,227)	0,740
Lokalisation	Rumpf (Referenz univariat)		0,673	0,993 (0,436-2,259)	0,986
	Arm (Referenz multivariat)	0,916 (0,433-1,936)	0,818		0,795
	Bein	0,980 (0,521-1,844)	0,951	1,119 (0,490-2,933)	0,691
	Fuß	1,961 (0,787-4,882)	0,148	1,088 (0,211-5,613)	0,920
	Hand	0,000 (0,000-0,000)	0,999	0,000 (0,000-0,000)	0,999
	Kopf/ Hals	0,551 (0,121-2,512)	0,442	0,313 (0,053-1,858)	0,201
Tumordicke in mm		1,223 (1,091-1,372)	< 0,001	1,110 (0,955-1,292)	0,174
Ulzeration		3,503 (2,044-6,003)	< 0,001	2,878 (1,570-5,276)	< 0,001
Mitoseindex	o. A. (Referenz univariat)		0,074	0,587 (0,247-1,397)	0,228
	< 1/mm ² (Referenz multivariat)	1,156 (0,520-2,568)	0,722		0,192
	> 1/mm ²	1,901 (1,059-3,413)	0,032	1,029 (0,461-2,297)	0,944
Clark-Level	o. A. (Referenz univariat)		0,117	0,387 (0,024-6,319)	0,505
	2 (Referenz multivariat)	3,000 (0,218-41,351)	0,412		0,651
	3	1,500 (0,297-7,572)	0,624	0,621 (0,051-7,553)	0,708
	4	3,149 (0,723-13,713)	0,126	0,996 (0,090-10,993)	0,997
	5	6,857 (1,031-45,604)	0,046	1,081 (0,062-18,962)	0,957

In der univariaten Analyse, in der jeder Faktor einzeln geprüft wird, bestätigen sich die Erwartungen aus den Leitlinien. Die Tumordicke (OR=1,22), das Vorhandensein einer Ulzeration (OR=3,50), eine erhöhte Mitoserate (OR=1,90) und ein hoher Clark-Level (Level 5: OR=6,86) erhöhen jeweils für sich genommen signifikant die Wahrscheinlichkeit für einen positiven Lymphknotenbefund. Auch der histologische Subtyp des nodulären malignen Melanoms (NMM) ist mit einem erhöhten Risiko assoziiert.

Das Ergebnis der multivariaten Analyse ist jedoch besonders markant. Werden alle Faktoren in ein gemeinsames statistisches Modell aufgenommen, um ihren unabhängigen Beitrag zu bewerten, bleibt nur noch das Vorhandensein einer Ulzeration als einziger Faktor mit hoher Signifikanz als Prädiktor übrig (OR=2,88; $p<0,001$). Alle anderen Parameter, einschließlich der Tumordicke, verlieren in diesem kombinierten Modell ihre statistische Signifikanz.

4.3 Biomarkerkohorte

4.3.1 Kohortenbeschreibung

Tabelle 13: Deskriptive Analyse (Biomarkerkohorte)

Patienten- und klinisch/ pathologische Parameter der Biomarkerkohorte, sowie stratifiziert nach High- vs. Low-risk (alle, Low-risk, High-risk)

Variable	Kategorie	Biomarkerkohorte (n = 157)	Low-risk Patienten (n=50; 31,8%)	High-risk Patienten (n=107; 68,2%)	p-Wert
Follow-Up Zeit (Monate)	Mittelwert (SD)	83,5 (34,7%)	86 (29,2)	82,4 (37,1)	0,5106
	Median (Min, Max)	79 (4-170)	79,5 (15-170)	79 (4-164)	
Geschlecht	männlich	87 (55,4%)	27 (17,2%)	60 (38,2%)	0,8639
	weiblich	70 (44,6%)	23 (14,6%)	47 (29,9%)	
Alter bei ED (in Jahren)	Mittelwert (SD)	58,5 (15,0)	59,7 (13,2)	57,9 (15,8)	0,4763
	Median (Min, Max)	59 (17-87)	59,5 (25-82)	59 (17-87)	
Tumordicke (in mm)	Mittelwert (SD)	2,2 (1,7)	1,4 (0,62)	2,6 (1,9)	<0,0001
	Median (Min, Max)	1,5 (0,6-8,3)	1,1 (0,6-3,9)	1,8 (0,8-8,3)	
Ulzeration	ja	40 (25,5%)	4 (2,5%)	36 (22,9%)	n.c.
	nein	117 (74,5%)	46 (29,3%)	71 (45,2%)	
SLN-Status	positiv	35 (22,3%)	9 (5,7%)	26 (16,6%)	0,4178
	negativ	122 (77,7%)	41 (26,1%)	81 (51,6%)	
Clark-Level	2	3 (1,9%)	1 (0,6%)	2 (1,3%)	n.c.
	3	24 (15,2%)	12 (7,6%)	12 (7,6%)	
	4	116 (73,9%)	32 (20,4%)	84 (53,5%)	
	5	4 (2,5%)	0 (0%)	4 (2,5%)	
	ohne Angabe	10 (6,4%)	5 (3,2%)	5 (3,2%)	
Subtyp	ALM	13 (8,3%)	4 (2,5%)	6 (3,8%)	n.c.
	Andere	12 (7,7%)	5 (3,2%)	7 (4,5%)	
	LMM	3 (1,9%)	1 (0,6%)	2 (1,3%)	
	NMM	36 (22,9%)	3 (1,9%)	33 (21%)	
	ohne Angabe	7 (4,4%)	3 (1,9%)	4 (2,5%)	
	SSM	89 (56,7%)	34 (21,7%)	55 (35%)	
T Stadium	T1a	4 (2,5%)	4 (2,5%)	0 (0%)	n.c.
	T1b	25 (15,9%)	14 (8,9%)	11 (7%)	
	T2a	69 (44%)	26 (16,6%)	43 (27,4%)	
	T2b	7 (4,4%)	1 (0,6%)	6 (3,8%)	
	T3a	19 (12,1%)	3 (1,9%)	16 (10,2%)	
	T3b	14 (8,9%)	2 (1,3%)	12 (7,6%)	
	T4a	4 (2,5%)	0 (0%)	4 (2,5%)	
	T4b	15 (9,6%)	0 (0%)	15 (9,6%)	
pTNM (AJCC8)	IA	23 (14,6%)	14 (8,9%)	9 (5,7%)	n.c.
	IB	60 (38,2%)	24 (15,3%)	36 (22,9%)	
	IIA	21 (13,4%)	2 (1,3%)	19 (12,1%)	
	IIB	10 (6,3%)	1 (0,6%)	9 (5,7%)	
	IIC	8 (5,1%)	0 (0%)	8 (5,1%)	
	IIIA	15 (9,5%)	6 (3,8%)	9 (5,7%)	
	IIIB	3 (1,9%)	1 (0,6%)	2 (1,3%)	
	IIIC	14 (8,9%)	1 (0,6%)	13 (8,3%)	
	IV	3 (1,9%)	1 (0,6%)	2 (1,3%)	

p-Wert: Exakter Test nach Fisher für kategoriale Variablen; t-Test für kontinuierliche Variablen.

Im Fall von weniger als 5 Patienten pro Untergruppe wurde der Exakte Test nach Fisher für kategoriale Variablen nicht berechnet.

Die Tabelle beschreibt die Zusammensetzung der Biomarkerkohorte (n=157) und vergleicht die Patienten, die von der 7-Biomarker-Signatur als „Low-Risk“ (n=50) bzw. „High-Risk“ (n=107) eingestuft werden. Ziel dieser Analyse ist es zu verstehen, ob es Unterschiede hinsichtlich der klinisch-pathologischen Merkmale zwischen der „Low-Risk“- und „High-Risk“-Gruppe der immunhistochemischen Biomarker-Signatur immunoprint® gibt.

Demografische Faktoren wie Alter und Geschlecht sind zwischen den beiden Risikogruppen gleichmäßig verteilt und es gibt keinen signifikanten Unterschied.

Signifikante Unterschiede zeigen sich jedoch bei den etablierten tumorbiologischen Eigenschaften und pathologischen Risikofaktoren. Die Tumoren der „High-Risk“-Gruppe sind im Median signifikant dicker (1,8 mm) als die der „Low-Risk“-Gruppe (1,1 mm; $p < 0,0001$). Noch deutlicher ist der Zusammenhang mit der Ulzeration. So werden 36 der 40 ulzerierten Tumoren der Kohorte in die „High-Risk“-Gruppe eingeordnet, während nur 4 in der „Low-Risk“-Gruppe zu finden sind.

Diese Ergebnisse belegen, dass die Biomarker-Signatur mit bekannten histologischen Hochrisikomerkmale korreliert und diese erkennt. Ein interessanter Befund ist jedoch, dass der SLN-Status sich zwischen den Gruppen nicht signifikant unterscheidet ($p = 0,4178$). Zwar finden sich mehr SLN-positive Patienten in der „High-Risk“-Gruppe (26 vs. 9), aber der Unterschied ist statistisch nicht eindeutig.

Die Verteilung über die AJCC-Stadien bestätigt dieses Bild. Die „Low-Risk“-Gruppe besteht fast ausschließlich aus Patienten der Stadien IA und IB, während die „High-Risk“-Gruppe fast alle Patienten der Stadien II und III enthält. Die Signatur ist also in der Lage, die durch das Staging definierte Risikoverteilung auf molekularer Ebene zu bestätigen. Trotzdem fällt auf, dass auch eine hohe Patientenanzahl in den niedrigen Stadien wie z. B. IB ein „High-Risk“-Ergebnis aufweisen. So gehören nach der Biomarker-Signatur Immunoprint® 60%² der Patienten im Stadium IB und 91% im Stadium IIA zur „High-Risk“-Gruppe.

² Berechnung analog siehe Fußnote 1.

4.3.1.1 Deskriptive Analyse der pT-Stadien

Die Grafiken in diesem Abschnitt visualisieren die Verteilung des 7-Biomarker-Signatur-Risikoscores in Abhängigkeit vom pT-Stadium nach der 8. AJCC-Edition für die 157 Patienten der Biomarkerkohorte. Wie bereits beschrieben liegt der Cut-off zur Unterscheidung von „Low-Risk“ und „High-Risk“ bei 0,135.

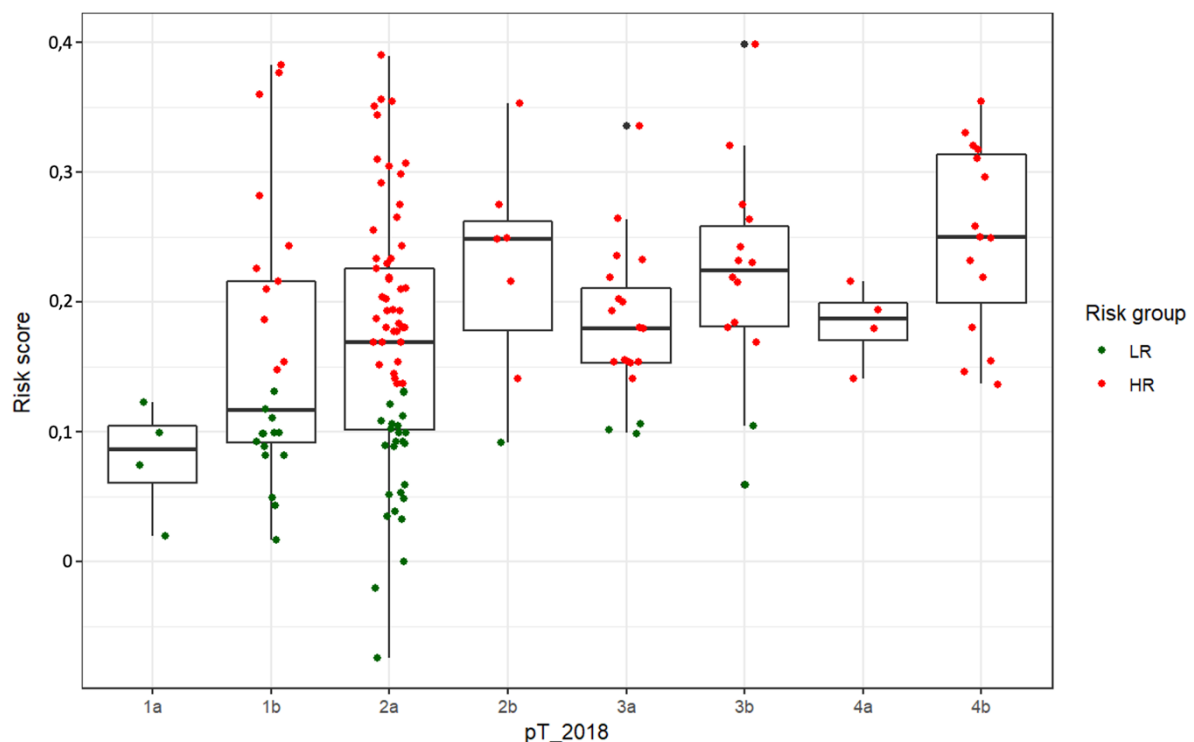


Abbildung 23: Box-Plot der pT-Stadienverteilung in High & Low Risk (Biomarkerkohorte)

Der obere Box-Plot stellt die Verteilung der numerischen Risikoscores für jedes pT-Stadium von pT1a bis pT4b dar. Es ist ein deutlicher Trend erkennbar. Mit steigendem pT-Stadium und damit dickerem Tumor steigt tendenziell der Median des Risikoscores an. Die Stadien pT1a und pT1b weisen überwiegend Patienten im „Low-Risk“-Bereich auf, während in den höheren Stadien ab T2a die „High-Risk“-Patienten dominieren und die Scores höher liegen. Auffällig ist zudem, dass innerhalb der pT2-pT4-Kategorien jeweils der Median der pTb-Gruppe oberhalb der der pTa-Gruppe liegt, was auf die Ulzeration zurückzuführen ist.

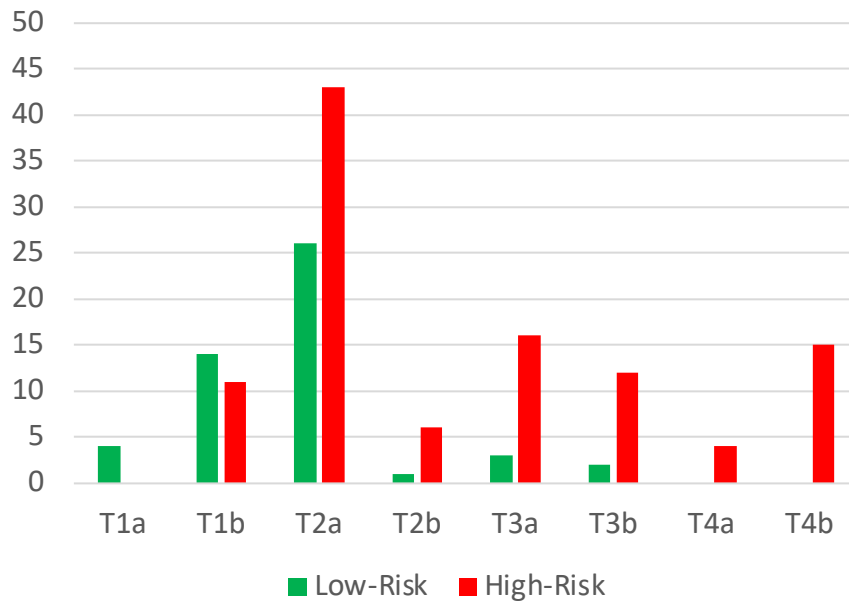


Abbildung 24: Balkendiagramm der pT-Stadienverteilung in High & Low Risk (Biomarkerkohorte)

Das untere Balkendiagramm quantifiziert diese Verteilung in absoluten Zahlen. So besteht die T1a-Gruppe allein aus „High-Risk“-Patienten. Im Stadium pT1b überwiegt die Anzahl der „Low-Risk“-Patienten die der „High-Risk“-Patienten. Ab Stadium T2a bis T3b kehrt sich dieses Verhältnis wieder um. In den Stadien T4a und T4b sind ausschließlich „High-Risk“-Patienten zu finden.

4.3.1.2 Deskriptive Analyse der pTNM-Stadien

Diese Abbildungen zeigen die Verteilung der Risikoscores und der Risikogruppen, „Low-Risk“ und „High-Risk“, in Relation zur finalen pTNM-Stadieneinteilung nach der 8. Edition des AJCC.

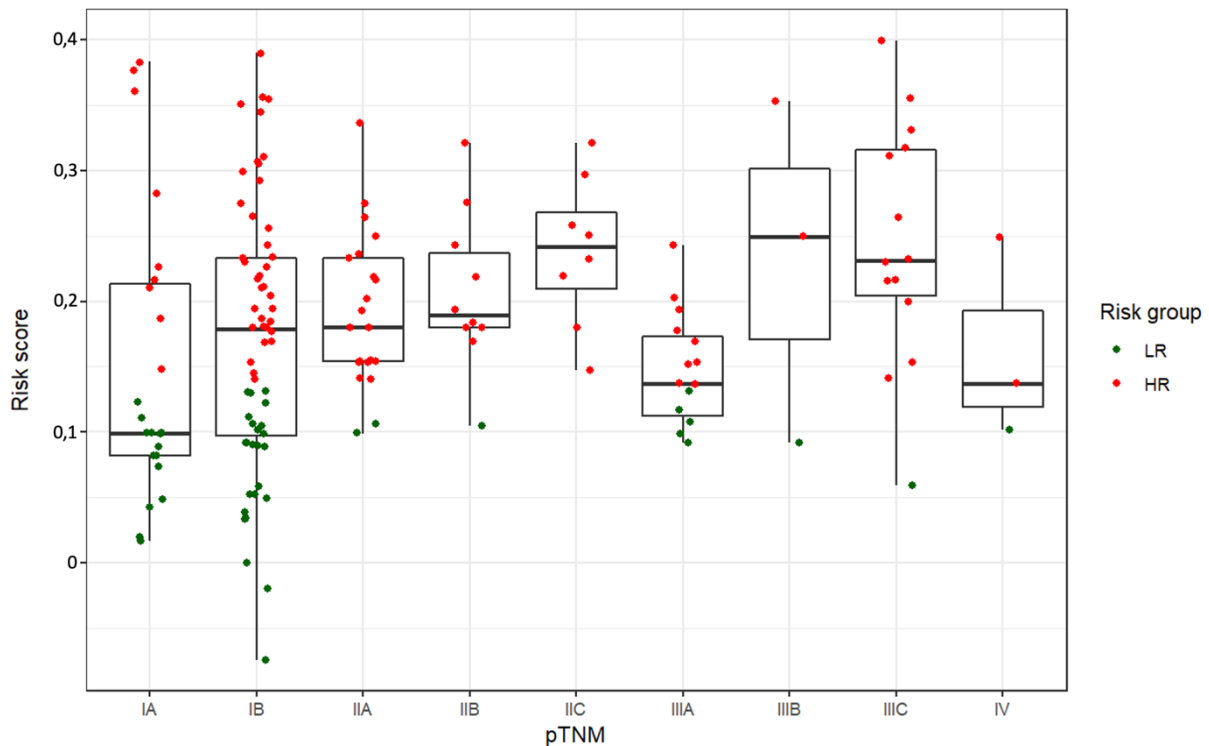


Abbildung 25: Box-Plot der pTNM-Stadienverteilung in High & Low Risk (Biomarkerkohorte)

Der Box-Plot veranschaulicht, wie der Median des Risikoscores ebenfalls in den höheren pTNM-Stadien zunimmt. Die Stadien IA und IB zeigen eine breite Streuung der Scores mit einem höheren Anteil an „Low-Risk“-Patienten. Ab Stadium IIA steigt der Median des Scores deutlich an. Die Stadien IIB, IIC und insbesondere IIIC bestehen fast ausschließlich aus Patienten mit hohen Risikoscores und „High-Risk“-Kategorie. Hervorzuheben ist der Verlauf in den Stadien III, wo ein Abfall des Medians in IIIA zu beobachten ist. Dieser Verlauf entspricht den Ergebnissen der Kaplan-Meier-Analysen für das pTNM-Stadium nach der 8. Edition des AJCC. Im Stadium IIIA, welches durch Mikrometastasen definiert ist bei einem pN-Stadium von N1a und N2a in Kombination mit geringer T-Kategorie, sind niedrigere Scores zu finden, wobei auch eine Unterscheidung in „Low-Risk“ und „High-Risk“ erfolgt.

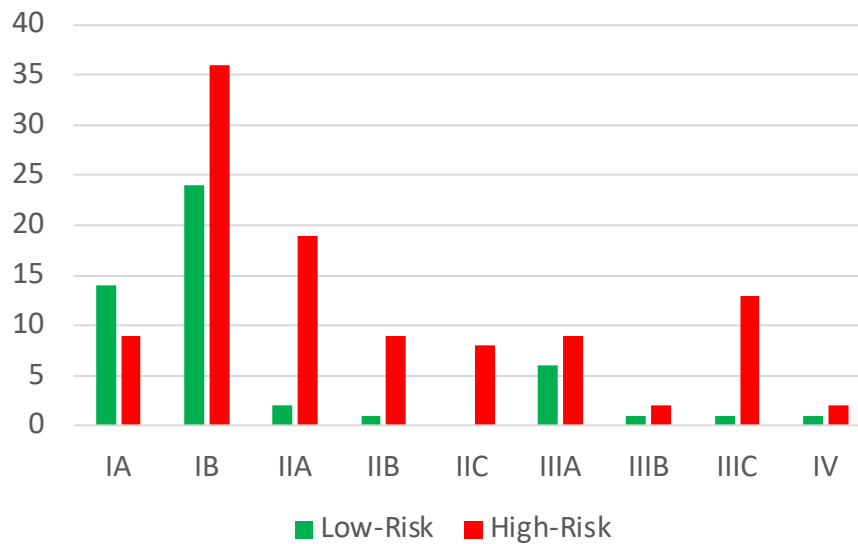


Abbildung 26: Balkendiagramm der pTNM-Stadienverteilung in High & Low Risk (Biomarkerkohorte)

Das Balkendiagramm zeigt die Zahl der Patienten in den jeweiligen pTNM-Stadien. Während in den Stadien IA und IB eine substantielle Anzahl von Patienten als „Low-Risk“ eingestuft wird, werden die Stadien IIA, IIB und IIC fast vollständig von „High-Risk“-Patienten dominiert. Lediglich bei den Patienten des Stadiums IIIA steigt die Anzahl an „Low-Risk“-Patienten wieder an.

4.3.1.3 Deskriptive Analyse der Melanomtypen

Die Grafiken analysieren die Verteilung des Risikoscores der 7-Biomarker-Signatur stratifiziert nach dem histologischen Subtyp des Melanoms.

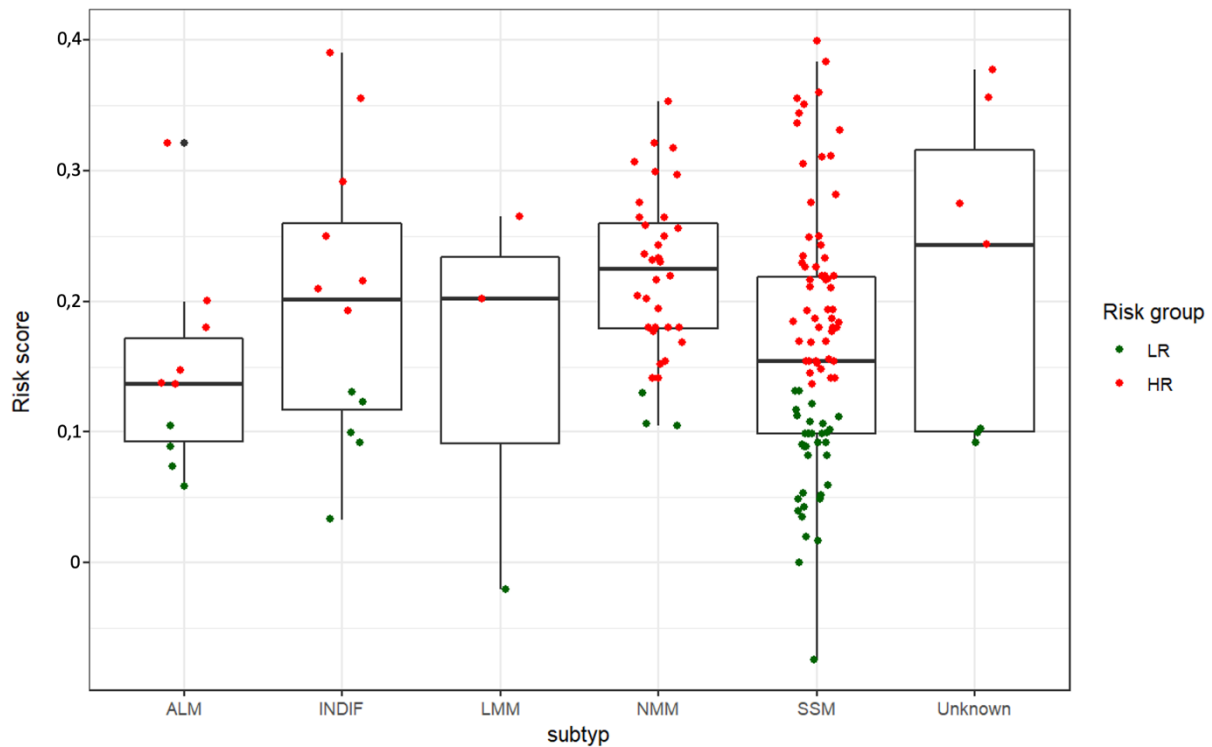


Abbildung 27: Box-Plot der Melanomtypverteilung in High & Low Risk (Biomarkerkohorte)

Der Box-Plot zeigt die Verteilung der Scores für die Subtypen Akral-lentiginöses Melanom (ALM), undifferenziert (INDIF), Lentigo-maligna-Melanom (LMM), Noduläres Melanom (NMM) und Superfiziell-spreitendes Melanom (SSM). Es ist erkennbar, dass die meisten Patienten in der Kohorte den Subtyp SSM haben, gefolgt vom nodulären Subtyp. Der Subtyp NMM zeigt dabei den höchsten Median im Risikoscore, da fast alle NMM-Patienten ein „High-Risk“-Signaturergebnis zeigen.

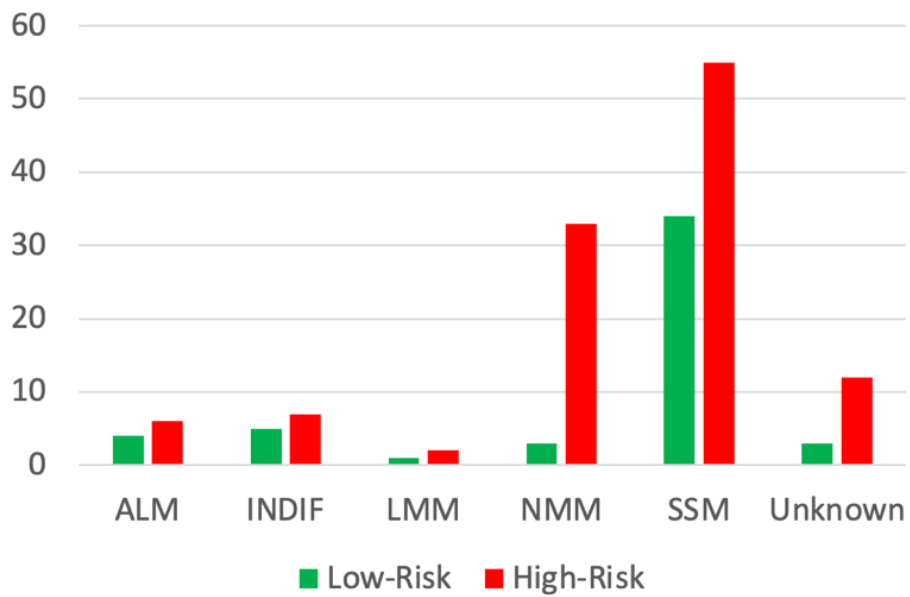


Abbildung 28: Balkendiagramm der Melanomtypverteilung in High & Low Risk (Biomarkerkohorte)

Das Balkendiagramm quantifiziert dies. Beim NMM (n=36) werden 33 Patienten als „High-Risk“ eingestuft, während nur 3 als „Low-Risk“ klassifiziert werden. Auch beim SSM, dem häufigsten Subtyp in der Kohorte (n=89), ist der Anteil der „High-Risk“-Patienten (n=55) deutlich höher als der der „Low-Risk“-Patienten (n=34).

4.3.2 Kaplan-Meier-Analyse

Die Kaplan-Meier-Analysen werden für die Biomarkerkohorte, aber auch für stadienspezifische Subgruppen, stratifiziert nach dem Ergebnis der 7-Biomarker-Signatur („Low-Risk“ vs. „High-Risk“), durchgeführt. Untersucht werden die gesamte Biomarkerkohorte über alle pTNM-Stadien I-IV. Ebenso betrachtet wird die Subgruppen IA-IIA, welche jene Patienten darstellt, für die es noch keine zugelassene adjuvante Therapie für das maligne Melanom gibt. Die Subgruppe IB-IIA analysiert die Patienten, für die Studien mit adjuvanten Therapien aktuell in Betrachtung gezogen werden. Die Subgruppe III wird untersucht, um eine potenzielle Identifizierung von Niedrigrisikopatienten insbesondere im Stadium IIIA zu prüfen. Diese Graphen stellen das zentrale Ergebnis der Biomarker-Validierung dar. Es soll die Fähigkeit der Signatur, Patienten in Gruppen mit unterschiedlicher Prognose zu trennen, überprüft werden.

4.3.2.1 Biomarkerkohorte n=157

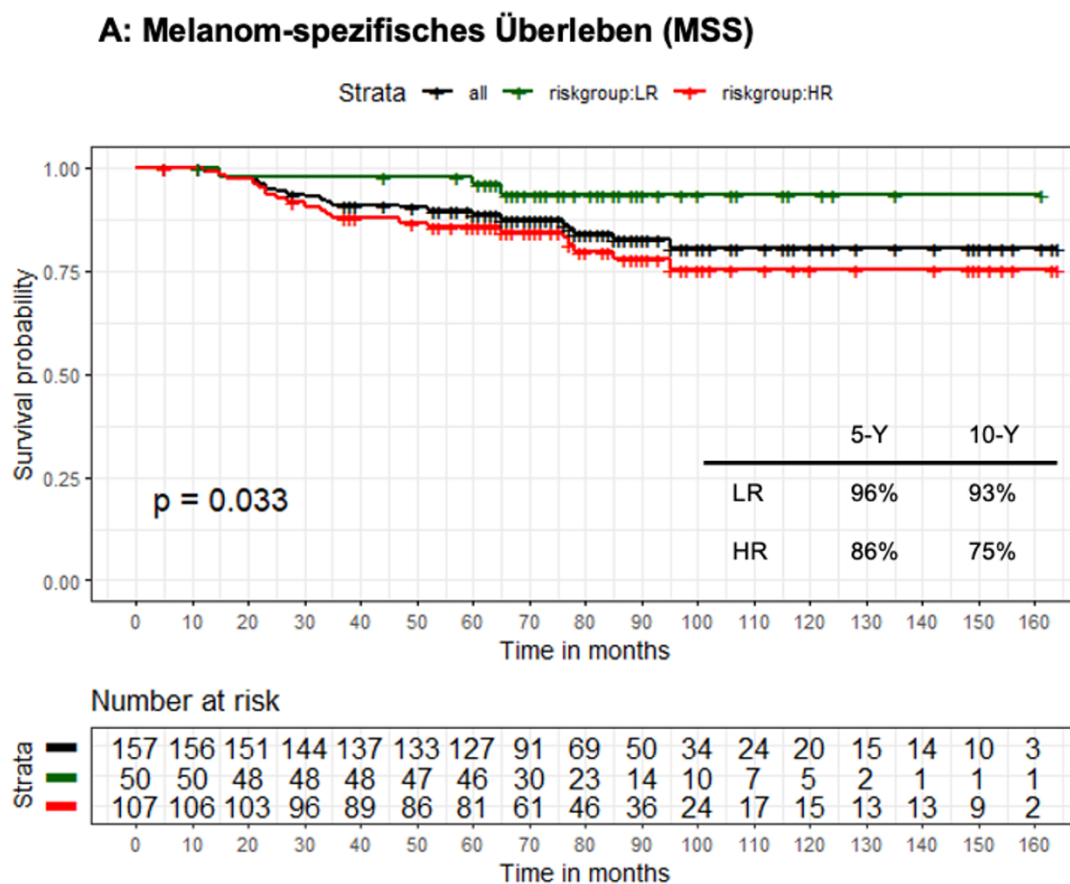


Abbildung 29: Melanomspezifische Überlebenszeitanalyse stratifiziert nach Risikogruppe (Biomarkerkohorte)

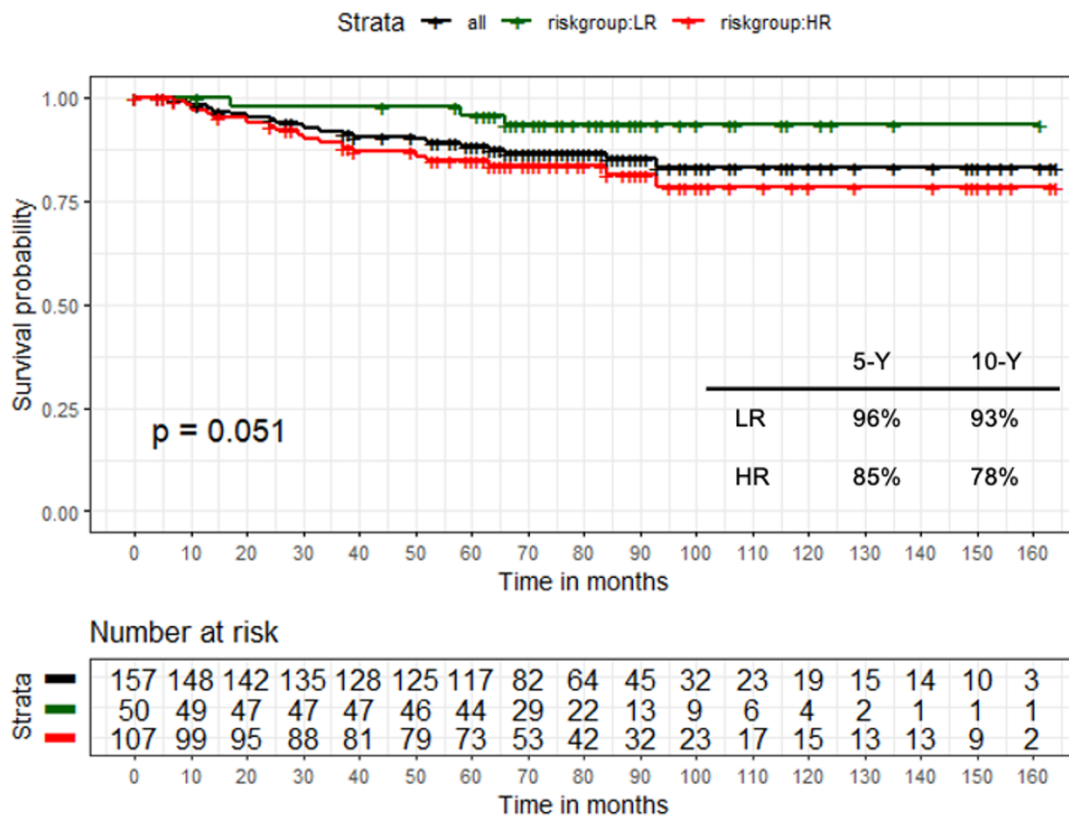
B: Fernmetastasen-freies Überleben (DMFS)

Abbildung 30: Fernmetastasenfreie Überlebenszeitanalyse stratifiziert nach Risikogruppe (Biomarkerkohorte)

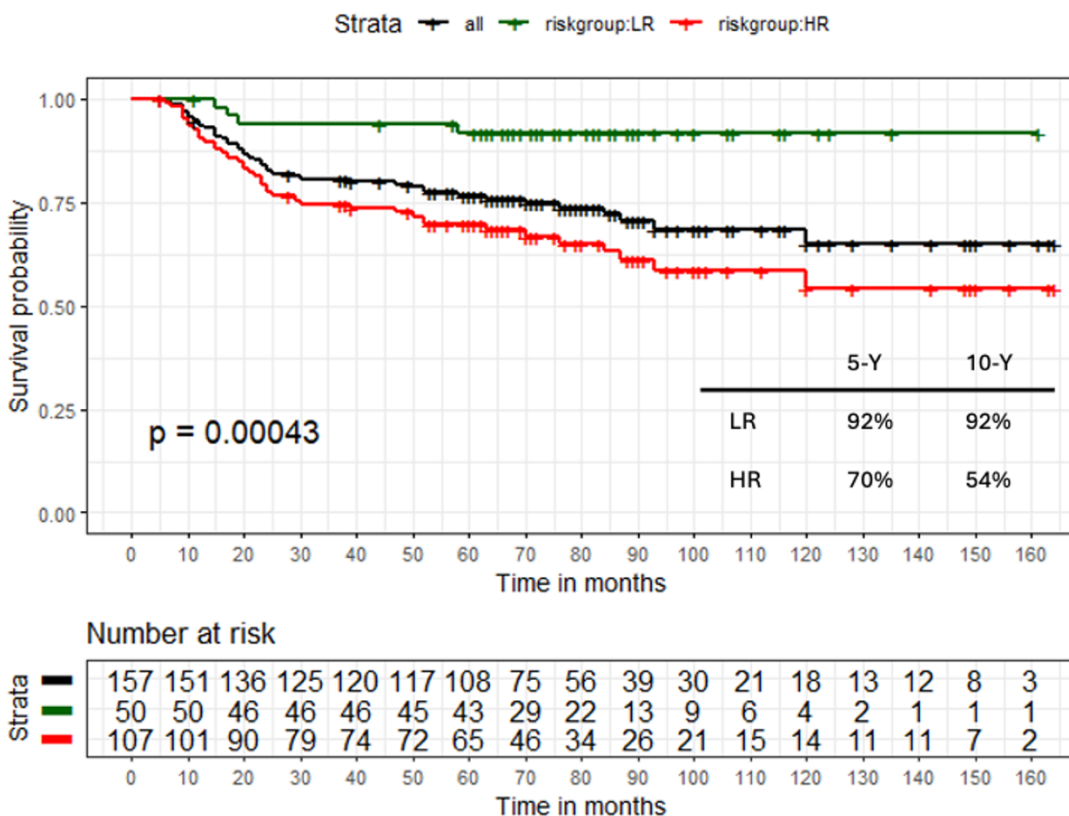
C: Rezidiv-freies Überleben (RFS)

Abbildung 31: Rezidivfreie Überlebenszeitanalyse stratifiziert nach Risikogruppe (Biomarkerkohorte)

Das auffälligste Ergebnis zeigt sich bei der Analyse des rezidivfreien Überlebens. Die beiden Kurven sind weit voneinander getrennt ($p=0,00043$). Während Patienten der „Low-Risk“-Gruppe eine 10-Jahres-Prognose ohne Rezidiv von 92 % aufweisen, liegt diese Rate in der „High-Risk“-Gruppe bei nur 54%.

Für die Endpunkte, das melanomspezifische und das fernmetastasenfreie Überleben, ist die Trennung der Kurven ebenfalls statistisch signifikant ($p=0,033$ für MSS) bzw. knapp signifikant ($p=0,051$ für DMFS). Die 10-Jahres-Überlebensraten für „Low-Risk“-Patienten sind mit 93% (MSS und DMFS) ebenfalls sehr hoch. Für die „High-Risk“-Patienten liegen sie deutlich darunter bei 75% (MSS) und 78% (DMFS).

4.3.2.2 pTNM-Stadien Ia-IIa der Biomarkerkohorte n=104

Diese Kaplan-Meier-Analysen untersuchen die prognostische Aussagekraft der 7-Biomarker-Signatur spezifisch innerhalb der klar definierten Niedrigrisiko-Subgruppe der Stadien IA bis IIA (n=104).

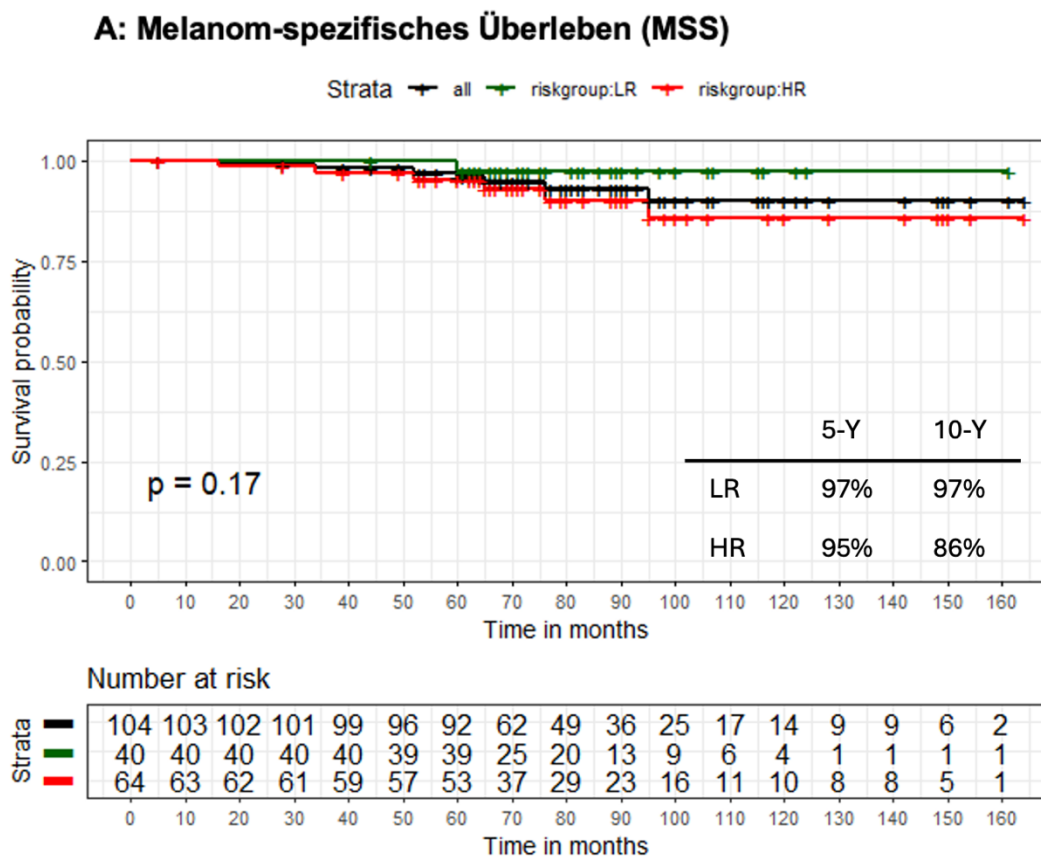


Abbildung 32: Melanomspezifische Überlebenszeitanalyse stratifiziert nach Risikogruppe (Biomarkerkohorte, pTNM-Stadien IA-IIA)

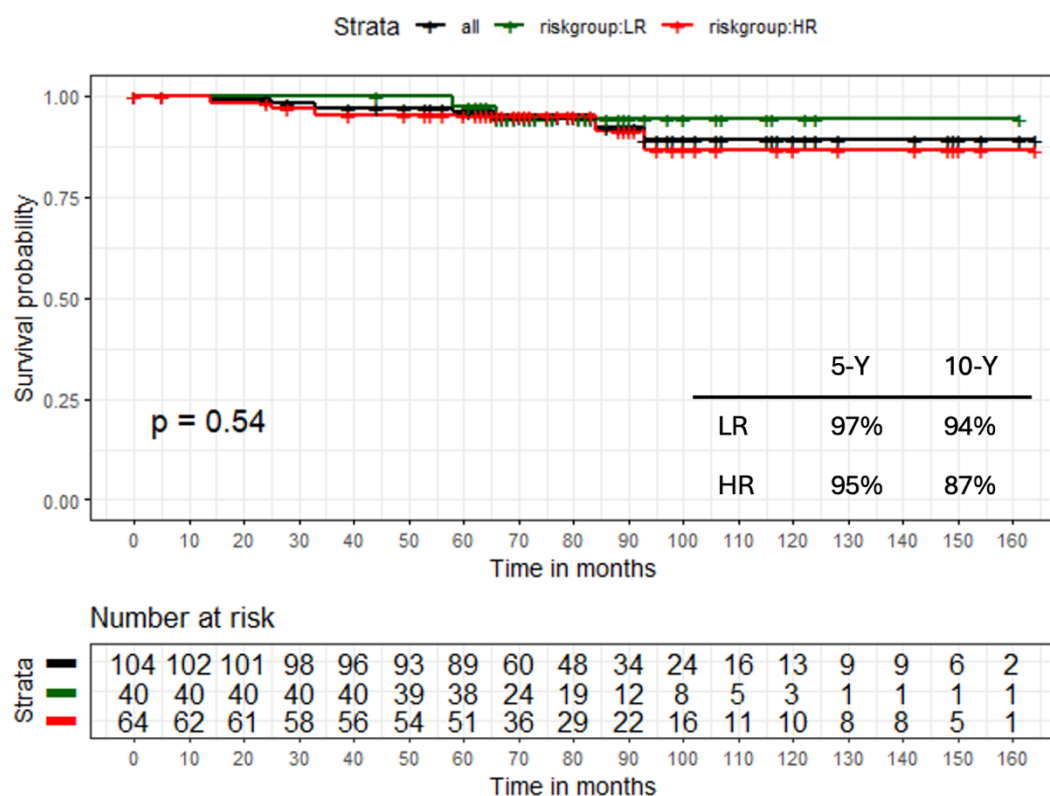
B: Fernmetastasen-freies Überleben (DMFS)

Abbildung 33: Fernmetastasenfreie Überlebenszeitanalyse stratifiziert nach Risikogruppe (Biomarkerkohorte, pTNM-Stadien IA-IIA)

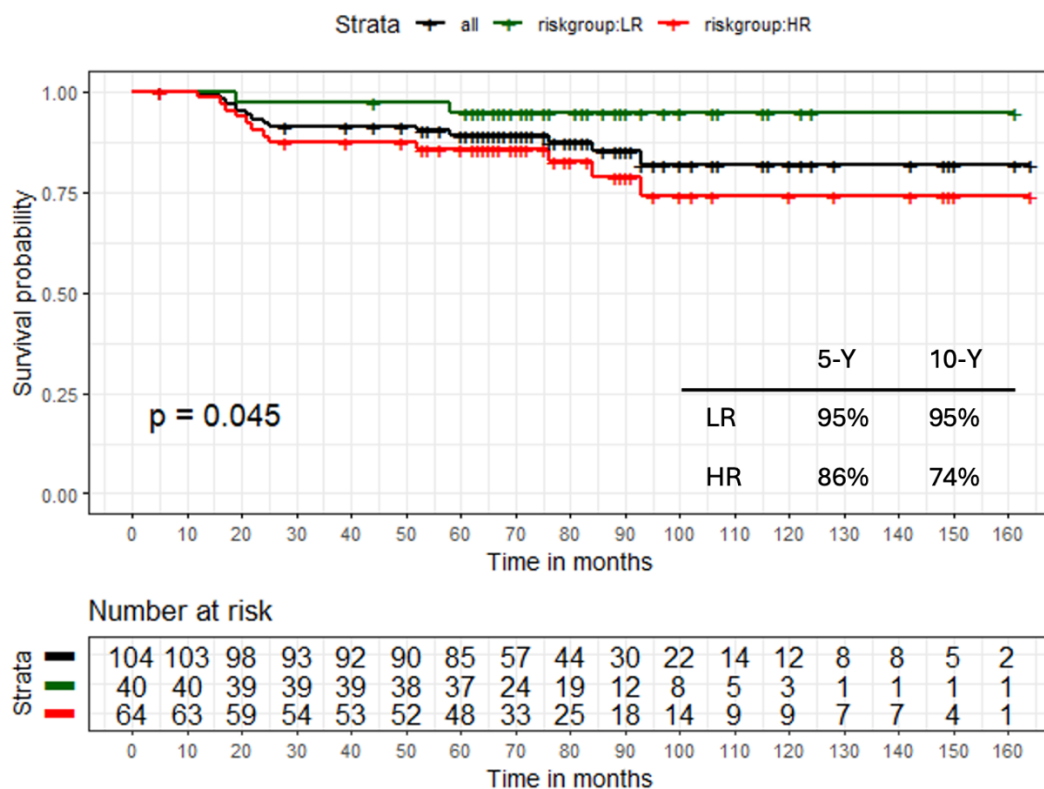
C: Rezidiv-freies Überleben (RFS)

Abbildung 34: Rezidivfreie Überlebenszeitanalyse stratifiziert nach Risikogruppe (Biomarkerkohorte, pTNM-Stadien IA-IIA)

Ein statistisch signifikanter Unterschied ($p=0,045$) wird jedoch auch hier wieder beim rezidivfreien Überleben (RFS) ermittelt. Die Kaplan-Meier-Kurve der als „High-Risk“ eingestuften Patienten fällt merklich steiler ab als die der „Low-Risk“-Gruppe. Dieses Ergebnis indiziert, dass die Signatur auch innerhalb einer Population, die anhand der etablierten AJCC-Kriterien als prognostisch günstig eingestuft wird, jene Patienten identifizieren kann, die ein signifikant erhöhtes Risiko für einen jeglichen Krankheitsrückfall wie ein Lokalrezidiv, eine Lymphknoten- oder Fernmetastase und das Versterben aufweisen.

Für die Endpunkte, das melanomspezifische Überleben (MSS) und das fernmetastasenfreie Überleben (DMFS), zeigt sich in dieser homogenen Kohorte erwartungsgemäß eine sehr gute Prognose. Die Überlebenskurven verlaufen für beide Risikogruppen nahezu identisch, was durch p-Werte von 0,17 (MSS) und 0,54 (DMFS) belegt wird.

4.3.2.3 *pTNM-Stadien Ib-IIa der Biomarkerkohorte n=81*

Bei der Betrachtung der Subgruppe von 81 Patienten der Stadien IB bis IIA wird auch hier die prognostische Aussagekraft der 7-Biomarker-Signatur für die Endpunkte melanomspezifisches Überleben (MSS), fernmetastasenfreies Überleben (DMFS) und rezidivfreies Überleben (RFS) visualisiert.

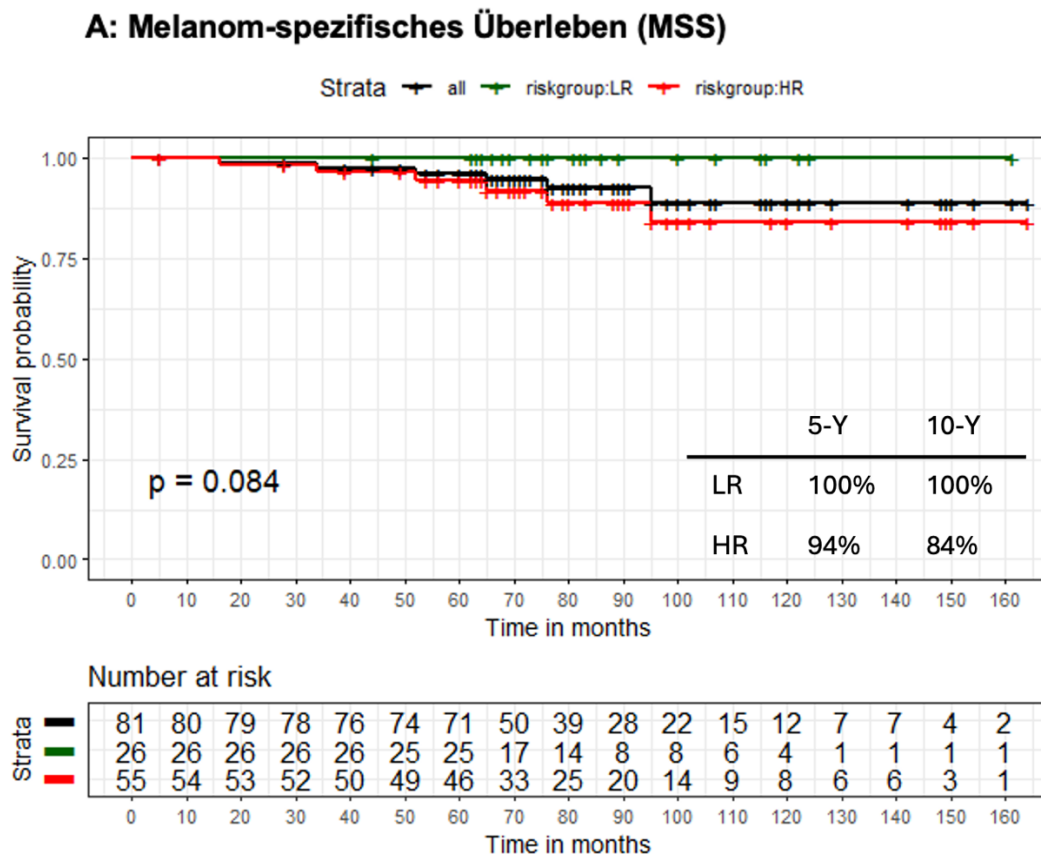


Abbildung 35: Melanomspezifische Überlebenszeitanalyse stratifiziert nach Risikogruppe (Biomarkerkohorte, pTNM-Stadien IB-IIA)

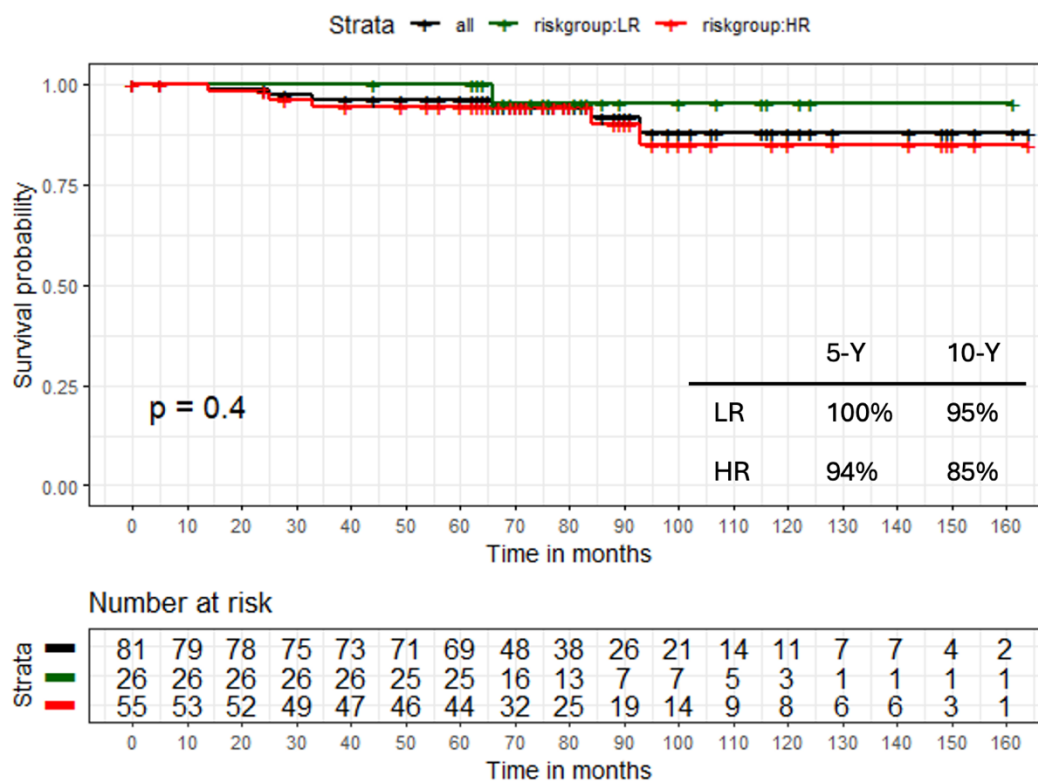
B: Fernmetastasen-freies Überleben (DMFS)

Abbildung 36: Fernmetastasenfreie Überlebenszeitanalyse stratifiziert nach Risikogruppe (Biomarkerkohorte, pTNM-Stadien IB-IIA)

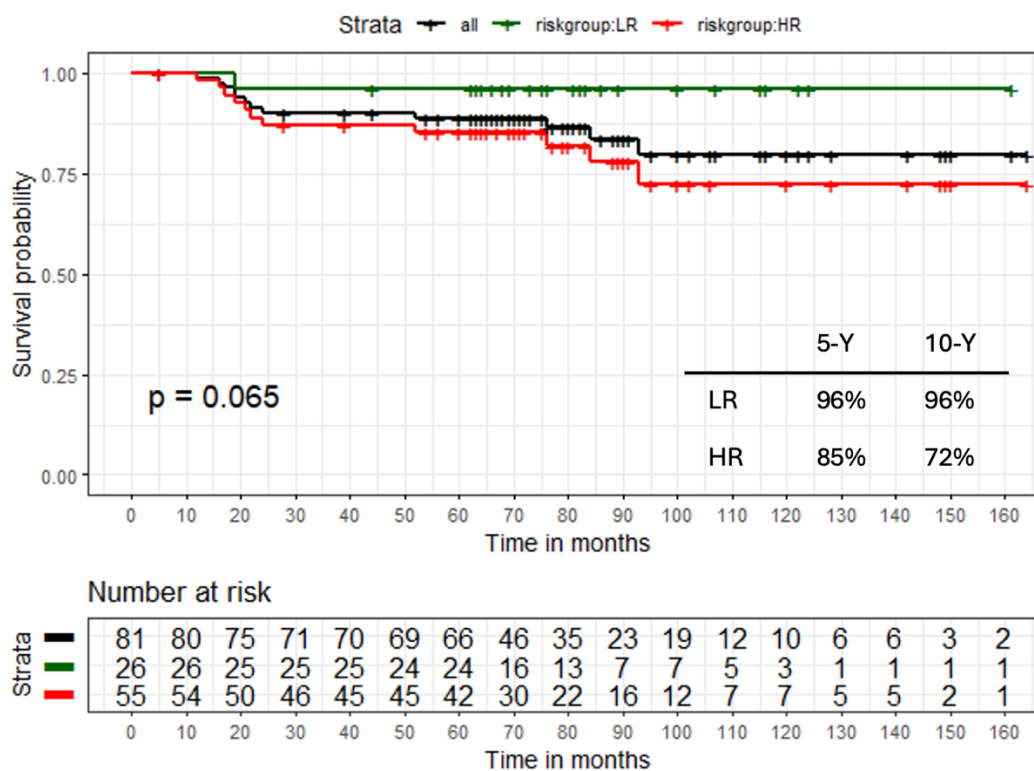
C: Rezidiv-freies Überleben (RFS)

Abbildung 37: Rezidivfreie Überlebenszeitanalyse stratifiziert nach Risikogruppe (Biomarkerkohorte, pTNM-Stadien IB-IIA)

Die Analyse des rezidivfreien Überlebens (RFS) zeigt die deutlichste Differenzierung zwischen den beiden Risikogruppen, wobei der p-Wert von 0,065 eine Tendenz zur statistischen Signifikanz aufweist. Die grüne Kurve der „Low-Risk“-Gruppe (n=26) verläuft auf einem sehr hohen Niveau. Sie zeigt lediglich einen einzigen, frühen Abfall, also ein Ereignis, vor der 20-Monats-Marke und stabilisiert sich danach für den restlichen Beobachtungszeitraum auf einer hohen Überlebenswahrscheinlichkeit. Im klaren Kontrast dazu steht die rote Kurve der „High-Risk“-Gruppe (n=55). Diese fällt durch mehrere, deutlich frühere und häufigere Ereignisse signifikant steiler ab. Insbesondere in den ersten 50 Monaten ist der Abfall am stärksten ausgeprägt. Die Kurve setzt ihren stufenweisen Abfall im weiteren Verlauf fort und stabilisiert sich jedoch langfristig. Dies visualisiert ein markant höheres und früher eintretendes Rezidivrisiko für die als „High-Risk“ eingestuftten Patienten.

Noch deutlicher, wenn auch aufgrund der geringen Ereigniszahl nicht statistisch signifikant, ist der Befund bei der Analyse des melanomspezifischen Überlebens ($p = 0,084$) und des fernmetastasenfreien Überlebens ($p = 0,4$). Die beiden Graphen verlaufen dabei nahezu identisch. In der „Low-Risk“-Gruppe tritt über den gesamten Beobachtungszeitraum kein einziges Ereignis auf. Die Überlebenswahrscheinlichkeit bleibt für MSS und DMFS durchgehend sehr hoch. Fast alle erfassten Ereignisse – also sowohl melanomspezifische Todesfälle als auch das Auftreten von Fernmetastasen – treten fast ausschließlich in der „High-Risk“-Gruppe auf. Das Risiko für ein melanomspezifisches Versterben ist in dieser Subgruppe vollständig auf die Patienten beschränkt, die von der Signatur als „High-Risk“ identifiziert werden.

4.3.2.4 pTNM-Stadien III der Biomarkerkohorte n=32

Die Analyse der Hochrisikokohorte von 32 Patienten im pTNM-Stadium III untersucht, ob die 7-Biomarker-Signatur auch innerhalb dieser bereits als ungünstig eingestuften Gruppe eine weitere prognostische Differenzierung ermöglicht.

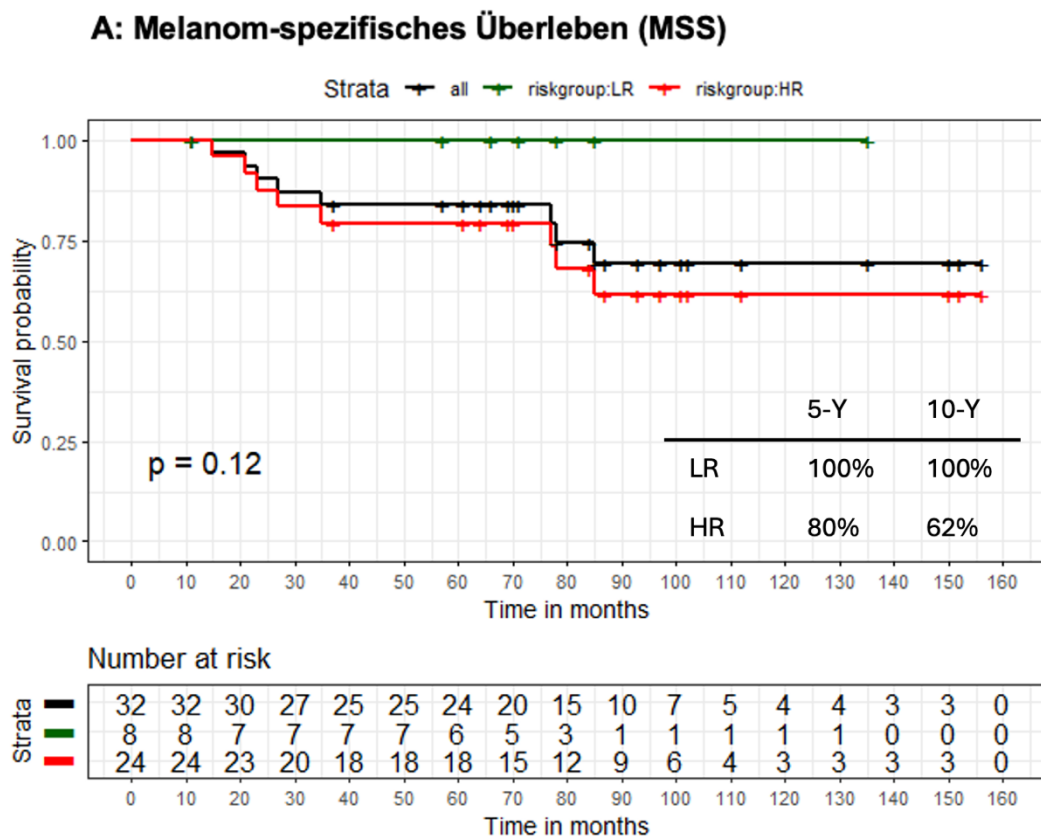


Abbildung 38: Melanomspezifische Überlebenszeitanalyse stratifiziert nach Risikogruppe (Biomarkerkohorte, pTNM-Stadium III)

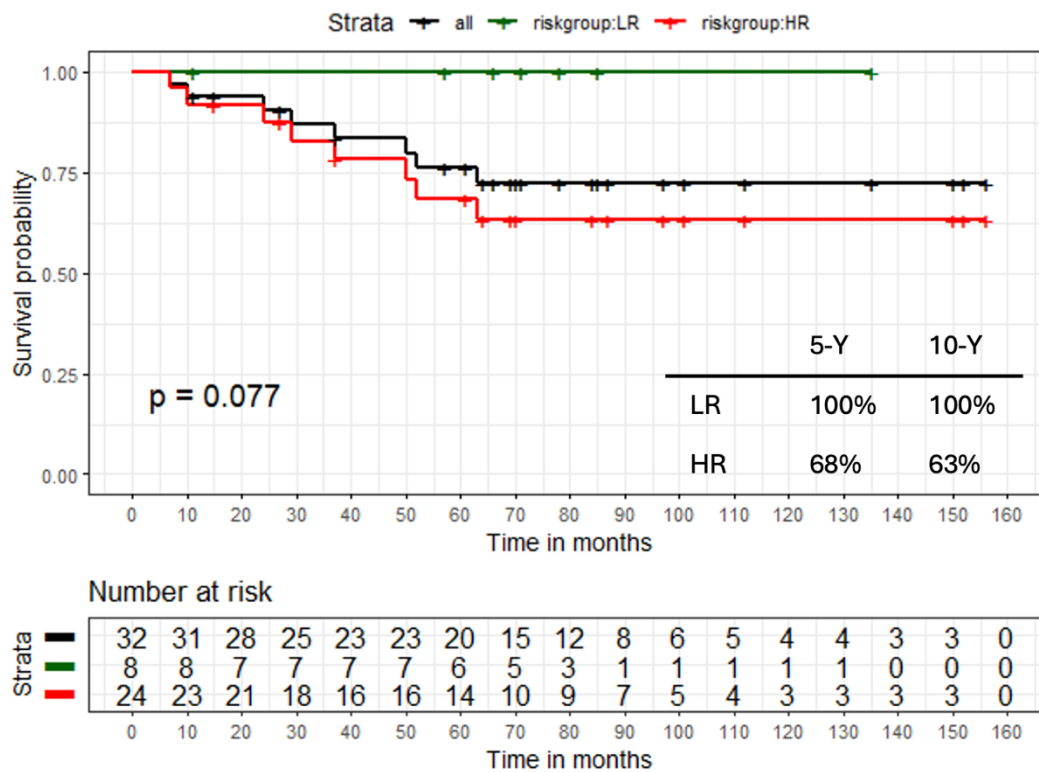
B: Fernmetastasen-freies Überleben (DMFS)

Abbildung 39: Fernmetastasenfreie Überlebenszeitanalyse stratifiziert nach Risikogruppe (Biomarkerkohorte, pTNM-Stadium III)

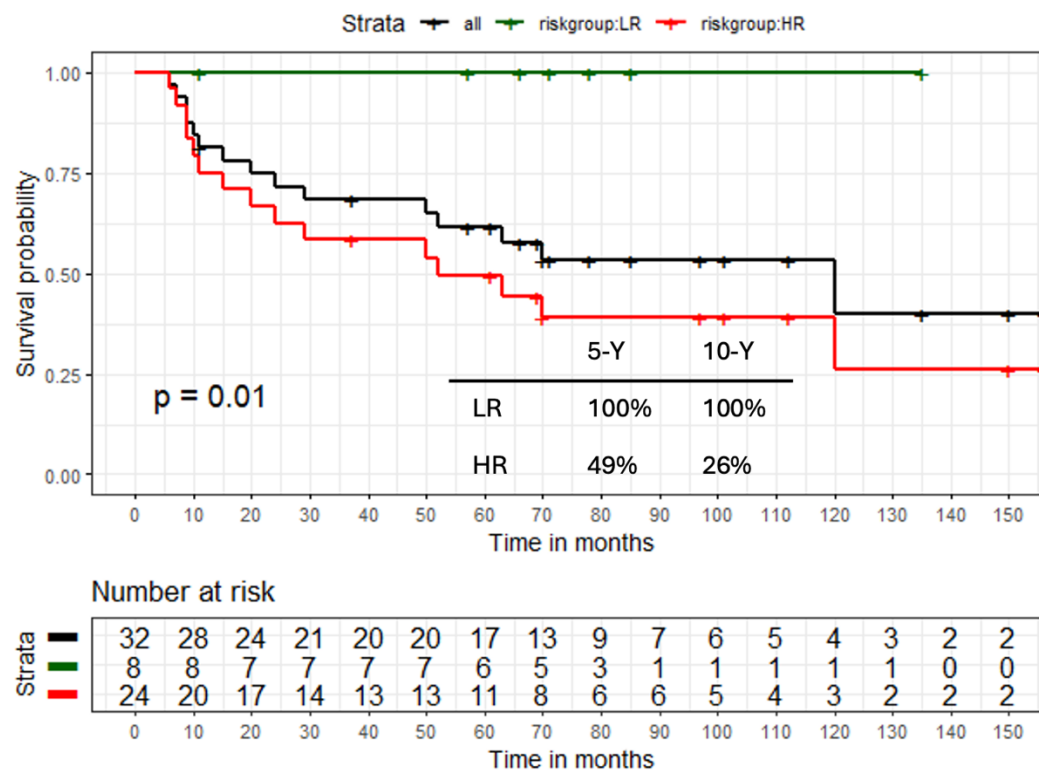
C: Rezidiv-freies Überleben (RFS)

Abbildung 40: Rezidivfreie Überlebenszeitanalyse stratifiziert nach Risikogruppe (Biomarkerkohorte, pTNM-Stadium III)

Das statistisch signifikanteste Ergebnis zeigt sich erneut beim rezidivfreien Überleben ($p = 0,01$). Hier ist eine deutliche und frühe Trennung der Überlebenskurven sichtbar. Die „Low-Risk“-Gruppe zeigt eine sehr gute Prognose ohne Ereignisse. Im Gegensatz fällt die rote Kurve der „High-Risk“-Gruppe bereits früh ab und zeigt über den gesamten Verlauf eine recht steile, stufenweise Abnahme der rezidivfreien Überlebenswahrscheinlichkeit.

Das fernmetastasenfreie Überleben verfehlt die statistische Signifikanz knapp ($p = 0,077$). Die „Low-Risk“-Gruppe erfährt kein Event und die Kurve verbleibt über den gesamten Zeitraum bei 100%. Sämtliche erfassten Fernmetastasen treten in der „High-Risk“-Gruppe auf, deren Kurve einen deutlichen, mehrstufigen Abfall zeigt.

Das melanomspezifische Überleben ($p = 0,12$) folgt einem ähnlichen Muster. Die „Low-Risk“-Gruppe zeigt auch hier keine Events. Die „High-Risk“-Gruppe weist dagegen frühere und häufigere Ereignisse auf und verläuft somit durchgehend unterhalb der „Low-Risk“-Kurve.

4.3.3 Uni- und multivariate Cox-Analyse

Die Tabelle zeigt die Ergebnisse der Cox-Regressionsanalyse, einer statistischen Methode zur Untersuchung des Einflusses verschiedener prognostischer Faktoren auf die Überlebenszeit. Diese Analyse wird für die Biomarkerkohorte sowie die zuvor eingeführten stadienspezifischen Subgruppen (pTNM IA-IIA, IB-IIA, III) durchgeführt, um den Einfluss und die relative Bedeutung der 7-Biomarker-Signatur im Vergleich zu etablierten klinisch-pathologischen Parametern zu ermitteln. Die Ergebnisse werden als Hazard Ratio dargestellt, wobei ein Wert größer als 1 ein erhöhtes Risiko für das Eintreten eines Ereignisses (Tod, Metastasierung, Rezidiv) anzeigt.

4.3.3.1 Biomarkerkohorte n=157

Tabelle 14: Cox-Regression für MSS, DMFS & RFS (Biomarkerkohorte)

Patienten/ Kohorte	Variable/ Prognostische Faktoren	Univariat		Multivariabel	
		HR (95% CI)	p-Wert	HR (95% CI)	p-Wert
Gesamtkohorte (n=157) (Ereignisse: MSS: 24 DMFS: 21 RFS: 43)	MSS				
	7-Marker Signatur	3,433 (1,024-11,512)	0,0458	1,965 (0,533-7,244)	0,3103
	Tumordicke (mm)	1,512 (1,284-1,781)	<0,0001	1,258 (1,017-1,556)	0,0347
	Ulzeration (1=Ja)	4,186 (1,872-9,360)	0,0005	1,681 (0,644-4,389)	0,2888
	Nodalstatus (1=Pos)	3,260 (1,460-7,283)	0,0039	1,911 (0,815-4,482)	0,1366
	Alter Diagnose (Jahre)	1,045 (1,011-1,080)	0,0093	1,029 (0,996-1,063)	0,0813
	Geschlecht (W)	0,831 (0,369-1,871)	0,6544	1,220 (0,524-2,844)	0,6444
	DMFS				
	7-Marker Signatur	3,169 (0,933-10,765)	0,0646	1,553 (0,408-5,911)	0,5183
	Tumordicke (mm)	1,634 (1,353-1,973)	<0,0001	1,415 (1,125-1,780)	0,0030
	Ulzeration (1=Ja)	4,561 (1,931-10,771)	0,0005	2,065 (0,771-5,534)	0,1492
	Nodalstatus (1=Pos)	2,590 (1,073-6,254)	0,0343	1,588 (0,647-3,902)	0,3130
	Alter Diagnose (Jahre)	1,033 (0,999-1,068)	0,0568	1,020 (0,985-1,057)	0,2644
	Geschlecht (W)	0,702 (0,291-1,695)	0,4317	1,192 (0,460-3,086)	0,7176
	RFS				
	7-Marker Signatur	5,234 (1,869-14,658)	0,0016	3,904 (1,311-11,623)	0,0144
	Tumordicke (mm)	1,605 (1,409-1,828)	<0,0001	1,282 (1,086-1,514)	0,0033
	Ulzeration (1=Ja)	4,180 (2,292-7,625)	<0,0001	1,277 (0,617-2,641)	0,5100
	Nodalstatus (1=Pos)	3,186 (1,737-5,844)	0,0002	1,939 (0,990-3,801)	0,0537
	Alter Diagnose (Jahre)	1,061 (1,033-1,090)	<0,0001	1,048 (1,020-1,076)	0,0006
	Geschlecht (W)	0,602 (0,321-1,128)	0,1132	0,655 (0,334-1,283)	0,2173

Endpunkte: Melanom spezifisches Überleben MSS (Melanoma-Specific Survival), Fernmetastasen-freies Überleben DMFS (Distant-Metastasis-Free Survival), Rezidiv-freies Überleben RFS (Recurrence-Free Survival)

In der univariaten Analyse, bei der jeder Faktor einzeln betrachtet wird, erweisen sich fast alle etablierten Parameter als signifikante Risikofaktoren. Eine höhere Tumordicke, das Vorhandensein einer Ulzeration, ein positiver Lymphknotenstatus und ein höheres Alter bei der Diagnose erhöhen signifikant das Risiko für alle Endpunkte (MSS, DMFS, RFS). Besonders hervorzuheben ist, dass auch die 7-Biomarker-Signatur in der univariaten Analyse ein starker und statistisch signifikanter Prädiktor für das melanomspezifische Überleben (HR=3,43; $p=0,0458$) und insbesondere für das rezidivfreie Überleben (HR=5,23; $p=0,0016$) ist.

In der hier durchgeführten multivariaten Analyse werden alle signifikanten Faktoren in einem gemeinsamen Modell analysiert, um herauszufinden, welche davon auch dann noch einen unabhängigen Vorhersagewert behalten, wenn der Einfluss der anderen Faktoren herausgerechnet wird. Die Ergebnisse zeigen hier, dass die Biomarker-Signatur ihre statistische Signifikanz für das melanomspezifische Überleben und das fernmetastasenfreie Überleben nicht behält. Hier bleibt als einzige die Tumordicke als signifikanter unabhängiger Prädiktor.

Für das rezidivfreie Überleben ergibt sich jedoch ein anderes Bild. Hier bleiben die 7-Biomarker-Signatur (HR=3,76; $p=0,0172$), die Tumordicke (HR=1,27; $p=0,0054$) und das Alter bei Diagnose (HR=1,05; $p=0,0008$) als starke, unabhängige prognostische Faktoren bestehen.

4.3.3.2 *pTNM-Stadien Ia-IIa der Biomarkerkohorte n=104*

Tabelle 15: Cox-Regression für MSS, DMFS & RFS (Biomarkerkohorte, pTNM-Stadium IA-IIA)

Patienten/ Kohorte	Variable/ Prognostische Faktoren	Univariat		Multivariabel	
		HR (95% CI)	p-Wert	HR (95% CI)	p-Wert
Stadium IA-IIA (n=104) (Ereignisse: MSS: 7 DMFS: 7 RFS: 14)	MSS				
	7-Marker-Signatur	3,946 (0,475-32,806)	0,2040	4,074 (0,472-35,140)	0,2013
	Tumordicke (mm)	1,356 (0,516-3,563)	0,5361	1,168 (0,363-3,762)	0,7944
	Ulzeration (1=Ja)	0,000 (0-Inf)	0,9986	---	---
	Alter Diagnose (Jahre)	1,050 (0,984-1,121)	0,1390	1,050 (0,985-1,119)	0,1371
	Geschlecht (W)	0,672 (0,150-3,010)	0,6029	0,900 (0,195-4,160)	0,8924
	DMFS				
	7-Marker-Signatur	1,667 (0,323-8,611)	0,5416	1,727 (0,311-9,602)	0,5322
	Tumordicke (mm)	1,183 (0,432-3,242)	0,7439	1,128 (0,349-3,646)	0,8408
	Ulzeration (1=Ja)	0,000 (0-Inf)	0,9987	---	---
	Alter Diagnose (Jahre)	1,047 (0,983-1,116)	0,1528	1,051 (0,987-1,119)	0,1232
	Geschlecht (W)	1,214 (0,270-5,445)	0,8004	1,591 (0,345-7,340)	0,5520
	RFS				
	7-Marker-Signatur	4,096 (0,917-18,307)	0,0649	4,899 (1,064-22,564)	0,0414
	Tumordicke (mm)	1,175 (0,568-2,427)	0,6638	0,964 (0,396-2,347)	0,9363
	Ulzeration (1=Ja)	0,000 (0-Inf)	0,9978	---	---
	Alter Diagnose (Jahre)	1,079 (1,023-1,139)	0,0052	1,082 (1,025-1,142)	0,0045
	Geschlecht (W)	0,678 (0,235-1,957)	0,4727	0,897 (0,308-2,615)	0,8426

Endpunkte: Melanom spezifisches Überleben MSS (Melanoma-Specific Survival), Fernmetastasen-freies Überleben DMFS (Distant-Metastasis-Free Survival), Rezidiv-freies Überleben RFS (Recurrence-Free Survival)

Auch hier untersucht die Cox-Regressionsanalyse für die Subgruppe der Stadien IA-IIA (n=104) den unabhängigen prognostischen Wert der 7-Biomarker-Signatur im Vergleich zu den etablierten klinisch/ pathologischen Faktoren. Für die Ulzeration liefert diese Analyse jedoch keine Ergebnisse, da in dieser Subkohorte zu wenige Fälle von Patienten mit ulzeriertem Melanom vorhanden sind und sie nur in einer Risikokategorie auftreten.

In der univariaten Analyse ist allein das Alter bei Diagnose für das RFS ein signifikanter Prädiktor (HR=1,079; p=0,0052), während die 7-Marker-Signatur eine tendenzielle Signifikanz aufweist (HR=4,096; p=0,0649).

Bemerkenswert ist, dass sich in der multivariaten Analyse sowohl das Alter (HR=1,082; p=0,0045) als auch die 7-Marker-Signatur (HR=4,899; p=0,0414) als starke,

voneinander unabhängige prognostische Faktoren für ein Rezidiv erweisen. Die Tumordicke, die bereits in der univariaten Analyse für alle Endpunkte nicht signifikant ist, liefert auch nach der multivariaten Berechnung in dieser Subgruppe keinen prognostischen Mehrwert.

Die Analyse ist durch die insgesamt sehr geringe Anzahl an Ereignissen in dieser Niedrigrisiko-Kohorte limitiert (14 RFS-, 7 MSS- und 7 DMFS-Events), was sich bei den Endpunkten MSS und DMFS bemerkbar macht. In der multivariaten Analyse wird weder beim MSS sowie beim DMFS eine statistische Signifikanz erreicht.

4.3.3.3 *pTNM-Stadien Ib-IIa der Biomarkerkohorte n=81*

Tabelle 16: Cox-Regression für MSS, DMFS & RFS (Biomarkerkohorte, pTNM-Stadium IB-IIA)

Patienten/ Kohorte	Variable/ Prognostische Faktoren	Univariat		Multivariabel	
		HR (95% CI)	p-Wert	HR (95% CI)	p-Wert
Stadium IB-IIA (n=81) (Events: MSS: 6 DMFS: 6 RFS: 12)	MSS			MSS (*)	
	7-Marker-Signatur	1,589 (0,684-3,689)	0,2812	2,245 (0,762-6,612)	0,1425
	Tumordicke (mm)	1,246 (0,411-3,772)	0,6975	1,514 (0,403-5,691)	0,5396
	Ulzeration (1=Ja)	0,000 (0-Inf)	0,9990	---	---
	Alter Diagnose (Jahre)	1,032 (0,969-1,099)	0,3298	1,039 (0,976-1,107)	0,2318
	Geschlecht (W)	0,472 (0,086-2,583)	0,3870	0,596 (0,102-3,491)	0,5660
	DMFS				
	7-Marker-Signatur	2,424 (0,282-20,803)	0,4196	2,748 (0,306-24,705)	0,3670
	Tumordicke (mm)	1,008 (0,306-3,324)	0,9893	0,927 (0,243-3,534)	0,9115
	Ulzeration (1=Ja)	0,000 (0-Inf)	0,9989	---	---
	Alter Diagnose (Jahre)	1,029 (0,968-1,095)	0,3569	1,032 (0,971-1,098)	0,3104
	Geschlecht (W)	0,975 (0,196-4,844)	0,9751	1,210 (0,232-6,316)	0,8215
	RFS				
	7-Marker-Signatur	5,535 (0,715-42,881)	0,1014	6,363 (0,811-49,894)	0,0782
	Tumordicke (mm)	0,993 (0,419-2,355)	0,9879	0,902 (0,332-2,449)	0,8401
	Ulzeration (1=Ja)	0,000 (0-Inf)	0,9981	---	---
	Alter Diagnose (Jahre)	1,063 (1,007-1,121)	0,0265	1,062 (1,006-1,121)	0,0294
	Geschlecht (W)	0,482 (0,145-1,601)	0,2333	0,681 (0,201-2,308)	0,5376

Endpunkte: Melanom spezifisches Überleben MSS (Melanoma-Specific Survival), Fernmetastasen-freies Überleben DMFS (Distant-Metastasis-Free Survival), Rezidiv-freies Überleben RFS (Recurrence-Free Survival).

(*) Aufgrund des Ausbleibens von Ereignissen in der Niedrigrisikogruppe wurde für die Analysen die numerische Risikoscore-Variable (kontinuierliche Variable) verwendet (anstelle der dichotomen Risikoscore-Variable). Da die geringe Skala des metrischen Risikoscores zu sehr hohen HR-Werten führt, wurde der Score linear transformiert (multipliziert mit 10). Die Interpretation der HR für den Risikoscore bezieht sich nun nicht mehr auf eine Erhöhung des Scores um 1, sondern um 0,1.

Analog zur vorherigen Analyse wird auch hier die Cox-Regression für die Subgruppe der Stadien IB-IIA (n=81) durchgeführt. Auch diese Analyse ist durch eine sehr niedrige Ereigniszahl mit 6 MSS-, 6 DMFS- und 12 RFS-Events in ihrer statistischen Aussagekraft stark limitiert.

Für das rezidivfreie Überleben (RFS) erweist sich in der univariaten Analyse ausschließlich das Alter bei Diagnose als signifikanter Risikofaktor (HR=1,063; p=0,0265). Die Biomarker-Signatur zeigt mit p=0,1014 nach dem p-Wert für das Alter den kleinsten Wert.

In der multivariaten Analyse behält das Alter seine Signifikanz (HR=1,062; $p=0,0294$). Die 7-Marker-Signatur zeigt mit einer Hazard Ratio von 6,363 einen starken Trend, verfehlt jedoch knapp die statistische Signifikanz ($p=0,0782$). Dieses Ergebnis ist am ehesten wieder auf die geringe Fallzahl und die damit einhergehende limitierte statistische Aussagekraft zurückzuführen. Die Tumordicke zeigte ebenfalls in dieser Subgruppe (IB-IIA) sowohl in der univariaten als auch multivariaten Analyse keine Signifikanz.

Für die Endpunkte MSS und DMFS kann kein Faktor als signifikanter Prädiktor identifiziert werden. Wie in der Fußnote der Tabelle vermerkt, muss für die MSS-Analyse auf den numerischen Risikoscore zurückgegriffen werden, da in der „Low-Risk“-Gruppe keine Ereignisse auftritt.

4.3.3.4 pTNM-Stadien III der Biomarkerkohorte n=32

Tabelle 17: Cox-Regression für MSS, DMFS & RFS (Biomarkerkohorte, pTNM-Stadium III)

Patienten/ Kohorte	Variable/ Prognostische Faktoren	Univariat		Multivariabel	
		HR (95% CI)	p-Wert	HR (95% CI)	p-Wert
Stadium III (n=32) (Events: MSS: 8 DMFS: 8 RFS: 15)	MSS (*)				
	7-Marker-Signatur	1,761 (0,867-3,578)	0,1174	8,561 (1,242-59,018)	0,0293
	Tumordicke (mm)	1,330 (0,980-1,807)	0,0675	0,944 (0,624-1,428)	0,7862
	Ulzeration (1=Ja)	1,567 (0,371-6,612)	0,5413	1,289 (0,148-11,239)	0,8180
	Alter Diagnose (Jahre)	1,016 (0,964-1,071)	0,5595	1,088 (0,999-1,185)	0,0536
	Geschlecht (W)	2,440 (0,610-9,771)	0,2075	37,333 (1,421-980,692)	0,0299
	DMFS (*)				
	7-Marker-Signatur	2,251 (1,127-4,495)	0,0215	4,663 (0,853-25,498)	0,0757
	Tumordicke (mm)	1,536 (1,119-2,107)	0,0078	1,317 (0,843-2,059)	0,2268
	Ulzeration (1=Ja)	2,116 (0,504-8,883)	0,3060	2,336 (0,271-20,116)	0,4398
	Alter Diagnose (Jahre)	0,986 (0,935-1,040)	0,6101	1,028 (0,943-1,121)	0,5340
	Geschlecht (W)	2,494 (0,623-9,992)	0,1967	12,751 (0,649-250,509)	0,0938
	RFS (*)				
	7-Marker-Signatur	1,819 (1,108-2,986)	0,0180	5,157 (1,441-18,456)	0,0117
	Tumordicke (mm)	1,416 (1,128-1,777)	0,0027	1,056 (0,768-1,453)	0,7369
	Ulzeration (1=Ja)	1,680 (0,592-4,772)	0,3298	0,385 (0,050-2,937)	0,3572
	Alter Diagnose (Jahre)	1,033 (0,991-1,077)	0,1258	1,084 (1,020-1,153)	0,0090
	Geschlecht (W)	1,195 (0,408-3,501)	0,7453	2,567 (0,413-15,948)	0,3119

Endpunkte: Melanom spezifisches Überleben MSS (Melanoma-Specific Survival), Fernmetastasen-freies Überleben DMFS (Distant-Metastasis-Free Survival), Rezidiv-freies Überleben RFS (Recurrence-Free Survival).
 (*) Aufgrund des Ausbleibens von Ereignissen in der Niedrigrisikogruppe wurde für die Analysen die numerische Risikoscore-Variable (kontinuierliche Variable) verwendet (anstelle der dichotomen Risikoscore-Variable). Da die geringe Skala des metrischen Risikoscores zu sehr hohen HR-Werten führt, wurde der Score linear transformiert (multipliziert mit 10). Die Interpretation der HR für den Risikoscore bezieht sich nun nicht mehr auf eine Erhöhung des Scores um 1, sondern um 0,1.

Auch für die Hochrisiko-Subgruppe der 32 Patienten im pTNM-Stadium III wird eine Cox-Analyse durchgeführt. Aufgrund der geringen Ereigniszahlen in dieser Kohorte (8 MSS-, 8 DMFS- und 15 RFS-Events) und dem Ausbleiben von Ereignissen in der „Low-Risk“-Gruppe wird erneut für diese Analyse, wie in der Fußnote vermerkt, die numerische Risikoscore-Variable anstelle der kategorialen Einteilung verwendet.

Die robustesten Ergebnisse zeigt die Analyse für das rezidivfreie Überleben. In der univariaten Analyse erweisen sich sowohl die 7-Marker-Signatur (HR=1,819; p=0,0180) als auch die Tumordicke (HR=1,416; p=0,0027) als statistisch signifikante Prädiktoren.

Im multivariaten Modell bleiben die 7-Marker-Signatur (HR=5,157; $p=0,0117$) und das Alter bei Diagnose (HR=1,084; $p=0,0090$) als starke, voneinander unabhängige prognostische Faktoren bestehen. Die Tumordicke verliert in diesem kombinierten Modell ihre Signifikanz ($p=0,7369$).

Für das melanomspezifische Überleben, bei dem univariat kein Faktor Signifikanz erreicht, treten im multivariaten Modell die 7-Marker-Signatur (HR=8,561; $p=0,0293$) und das Geschlecht (HR=37,333; $p=0,0299$) als signifikante, unabhängige Prädiktoren hervor. Das weite Konfidenzintervall für das Geschlecht deutet jedoch auf eine hohe Instabilität dieser Schätzung hin, bedingt durch die niedrige Ereigniszahl von 8.

Bei der Analyse des fernmetastasenfreien Überlebens sind die 7-Marker-Signatur ($p=0,0215$) und die Tumordicke ($p=0,0078$) univariat signifikant. Im multivariaten Modell verlieren beide Faktoren ihre statistische Signifikanz, wobei die Signatur einen starken Trend aufweist ($p=0,0757$). Dieses Ergebnis ist ebenfalls auf die geringe statistische Aussagekraft bei nur 8 DMFS-Ereignissen zurückzuführen.

4.3.4 Numerischer Risikoscore (Verteilung und Cut-off)

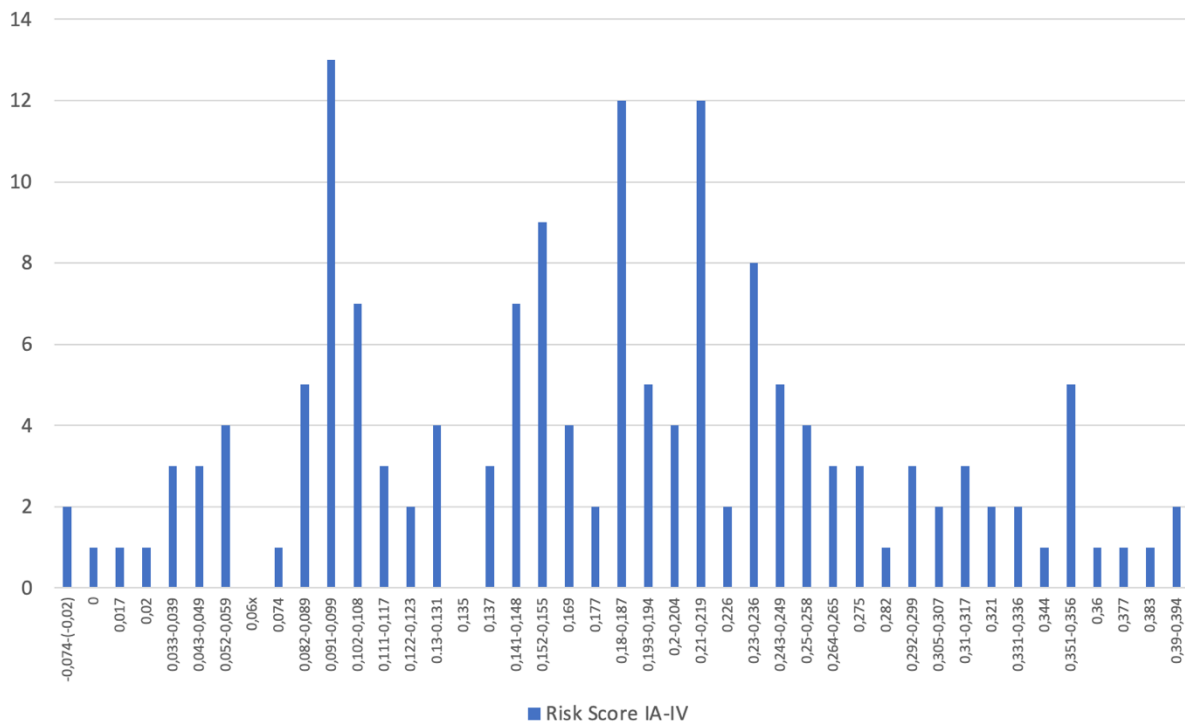


Abbildung 41: Balkendiagramm des Numerischen Risikoscores (Biomarkerkohorte)

Die Abbildung stellt die Verteilung der numerischen Risikoscores der 7-Biomarker-Signatur in Form eines Histogramms für die 157 Patienten der Biomarkerkohorte dar. Auf der X-Achse ist der berechnete Risikoscore in Inkrementen abgetragen, auf der Y-Achse die absolute Anzahl der Patienten in jedem Score-Bereich.

Die Verteilung ist breit und multimodal, sie zeigt keine Normalverteilung. Es sind mehrere Häufungspunkte erkennbar, insbesondere im Bereich von 0,08 bis 0,10, um 0,16 und um 0,21. Der etablierte Cut-Off-Wert von 0,135, der „Low-Risk“ von „High-Risk“ trennt, liegt in einem Bereich, in dem die Häufigkeit der Patienten gering ist, was eine Trennung der Population unterstützt.

4.3.5 ROC-Analyse

Die Abbildungen zeigen die "Receiver Operating Characteristic"-Kurven (ROC-Kurven) für die gesamte Biomarkerkohorte sowie die bereits eingeführten stadienspezifischen Subgruppen (pTNM IA-IIA, IB-IIA, III). Diese Kurven analysieren unter Verwendung von Sensitivität und Spezifität die diagnostische Güte des Prognosemodells mit dem Risikoscores im Vergleich zu einem Referenzmodell, dass nur die etablierten klinisch-pathologische Faktoren einschließt. Berechnet werden die Kurven für das MSS und RFS nach 5 und 10 Jahren. Die "Area Under the Curve" (AUC) dient als Maß für die Vorhersagekraft. Der Differenzwert der beiden jeweils dargestellten AUCs ist als Beitrag zu werten, den der Risikoscore zusätzlich prognostisch liefert.

4.3.5.1 Biomarkerkohorte n=157

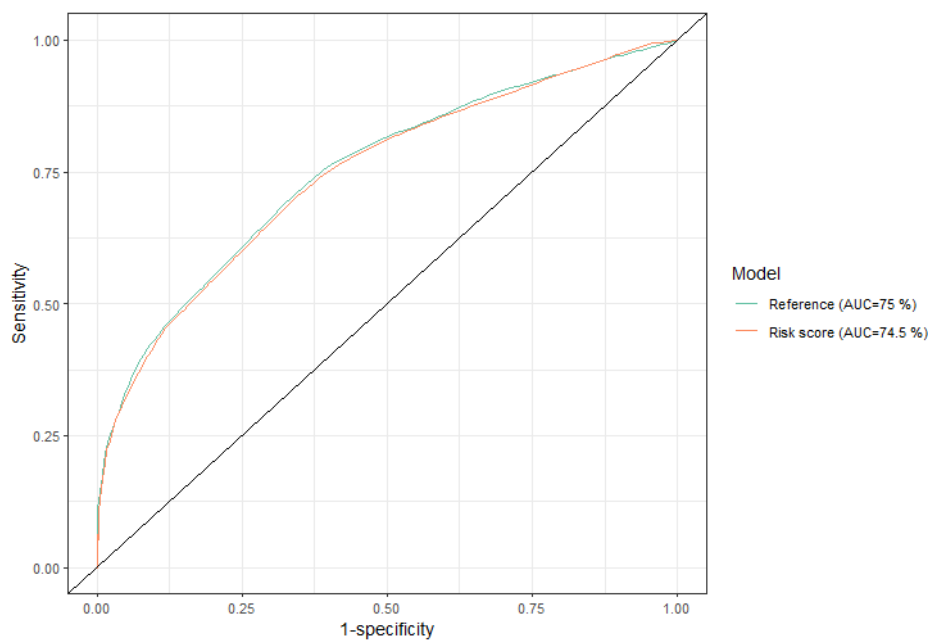


Abbildung 42: ROC-Analyse für MSS nach 5 Jahren (Biomarkerkohorte)

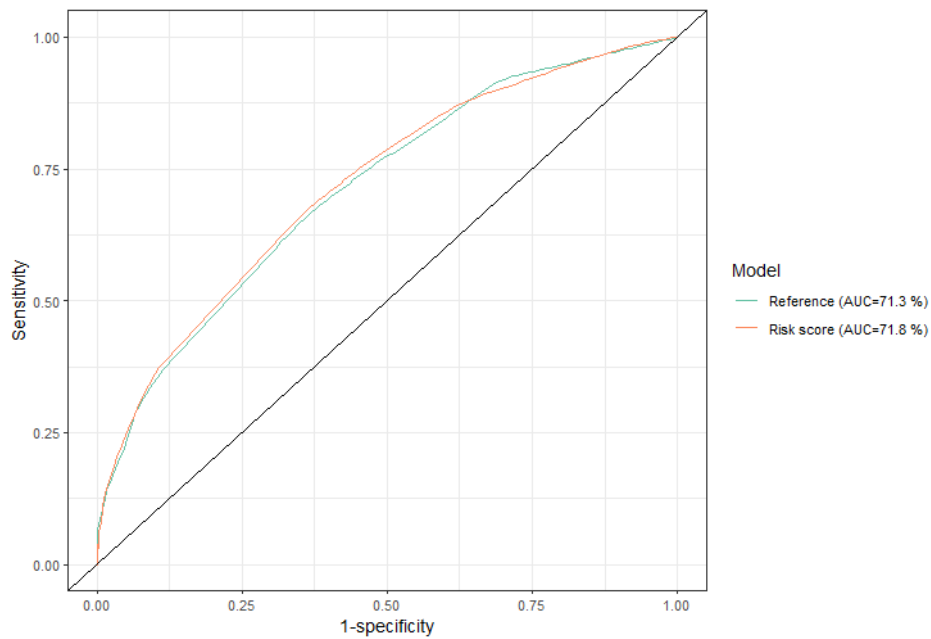


Abbildung 43: ROC-Analyse für MSS nach 10 Jahren (Biomarkerkohorte)

Für das melanomspezifische Überleben (MSS) nach 5 Jahren zeigt das Risikoscore-Modell eine AUC von 74,5% und liegt damit auf dem Niveau des Referenzmodells (AUC=75%). Nach 10 Jahren (MSS) liegt das Risikoscore-Modell bei 71,8%, während das Referenz-Modell bei 71,3% liegt.

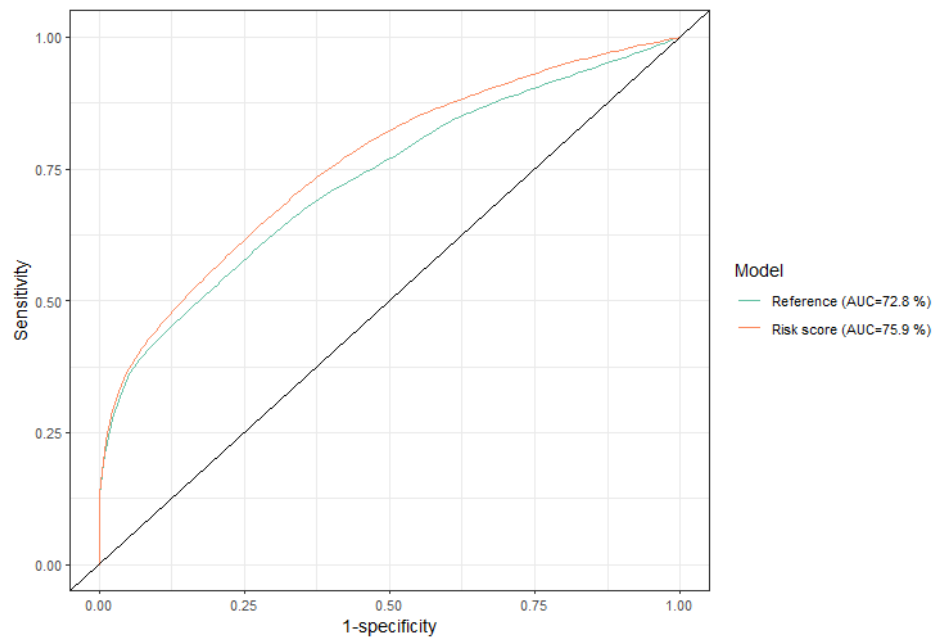


Abbildung 44: ROC-Analyse für RFS nach 5 Jahren (Biomarkerkohorte)

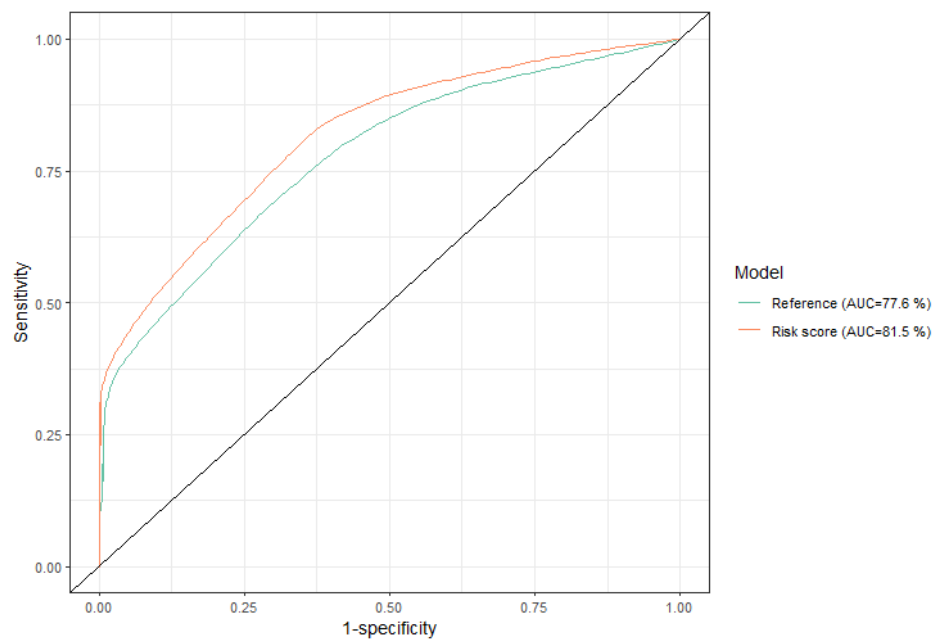


Abbildung 45: ROC-Analyse für RFS nach 10 Jahren (Biomarkerkohorte)

Für das rezidivfreie Überleben (RFS) nach 5 und 10 Jahren zeigt sich eine leichte Überlegenheit des Risikoscore-Modells bei einer AUC von 75,9% im Vergleich zu 72,8% bzw. 81,5% zu 77,6%.

4.3.5.2 pTNM-Stadien Ia-IIa der Biomarkerkohorte n=104

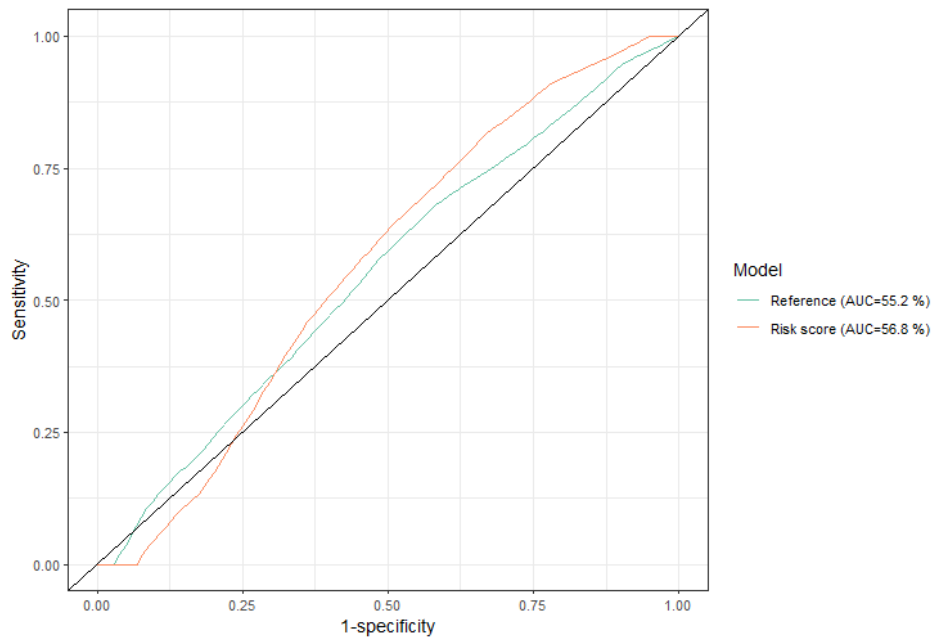


Abbildung 46: ROC-Analyse für MSS nach 5 Jahren (Biomarkerkohorte, pTNM-Stadium IA-IIA)

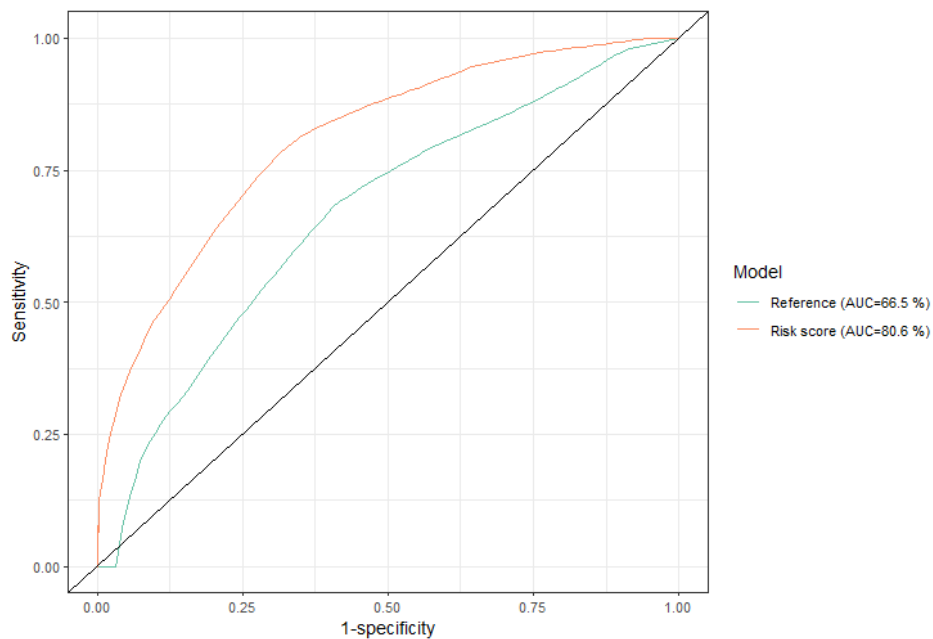


Abbildung 47: ROC-Analyse für MSS nach 10 Jahren (Biomarkerkohorte, pTNM-Stadium IA-IIA)

Die Grafiken für das MSS nach 5 und 10 Jahren in der Subgruppe mit den Stadien IA-IIA zeigen eine AUC für das Risikoscore-Modell von 55,2% bzw. 66,5%, was die AUC des Referenzmodells mit 56,8% bzw. 80,6% deutlich übertrifft.

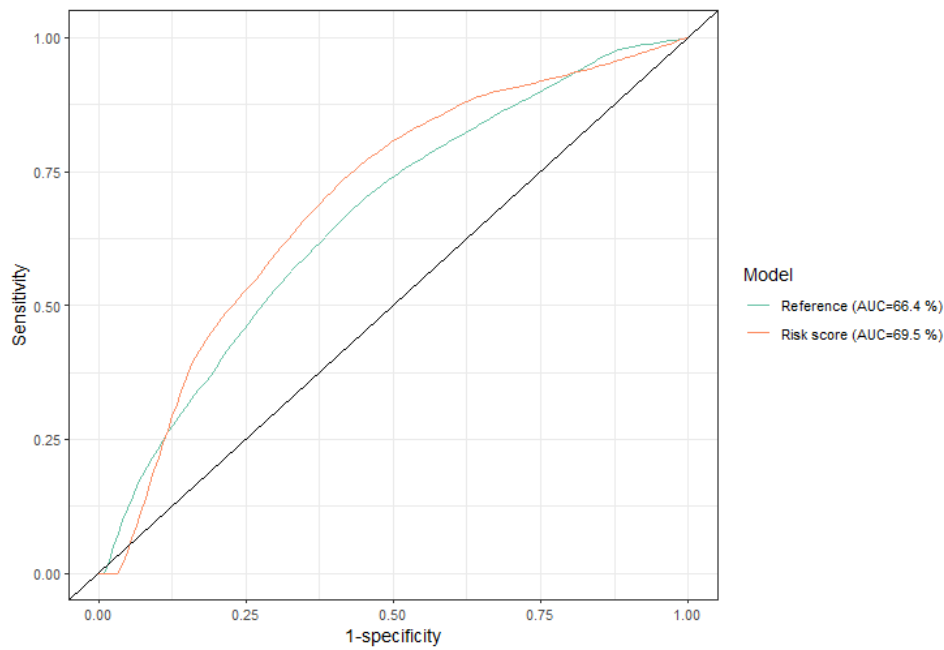


Abbildung 48: ROC-Analyse für RFS nach 5 Jahren (Biomarkerkohorte, pTNM-Stadium IA-IIA)

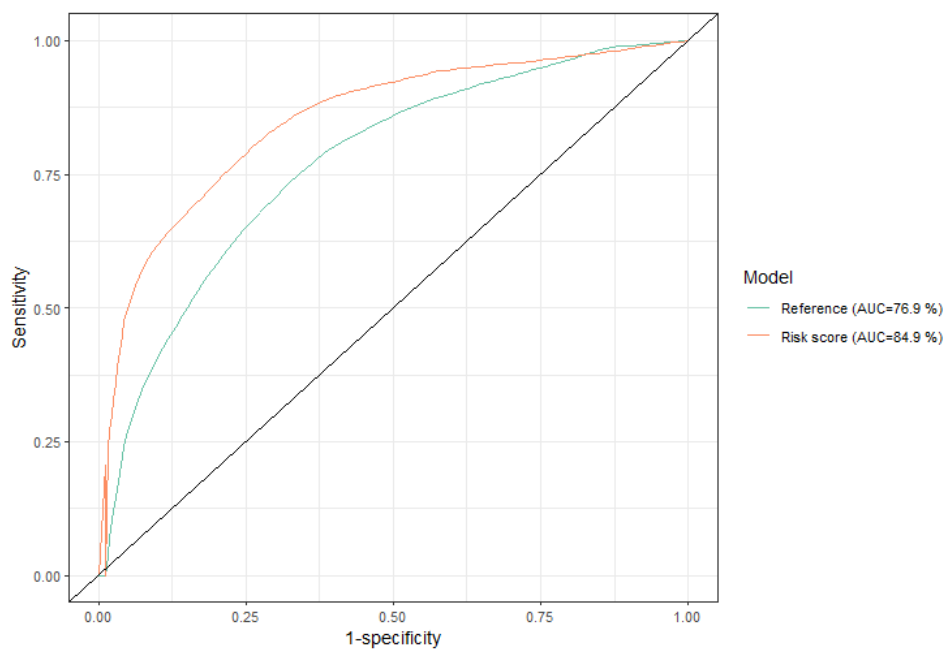


Abbildung 49: ROC-Analyse für RFS nach 10 Jahren (Biomarkerkohorte, pTNM-Stadium IA-IIA)

Dieser Effekt ist noch ausgeprägter beim RFS-Endpunkt. Für das RFS nach 5 Jahren erreicht das Risikoscore-Modell eine AUC von 69,5% im Vergleich zur Referenz mit 66,4%. Für das RFS nach 10 Jahren liegt die AUC des Risikoscore-Modells bei 84,9%, die der Referenz bei 76,9%.

4.3.5.3 pTNM-Stadien Ib-IIa der Biomarkerkohorte n=81

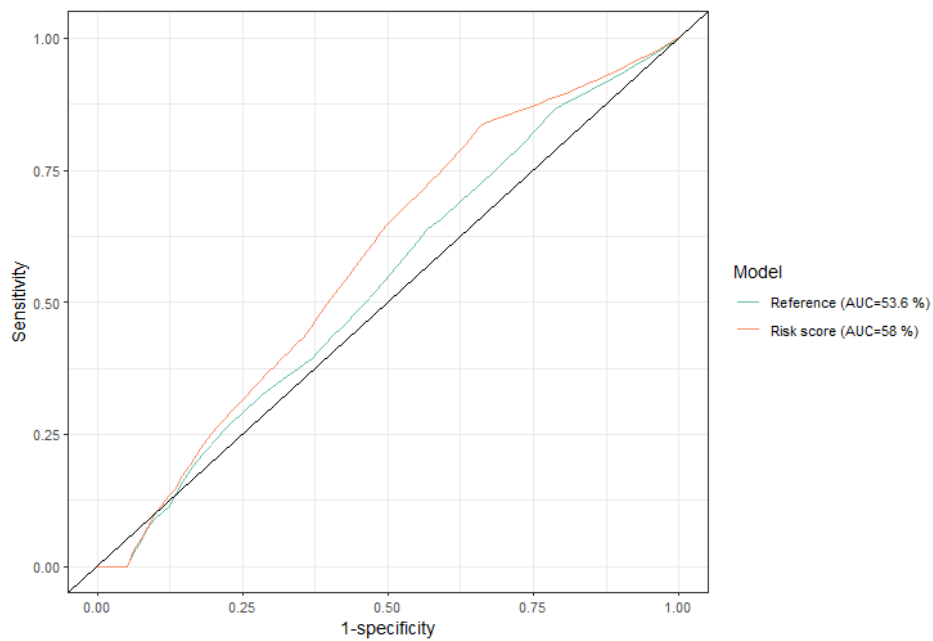


Abbildung 50: ROC-Analyse für MSS nach 5 Jahren (Biomarkerkohorte, pTNM-Stadium IB-IIA)

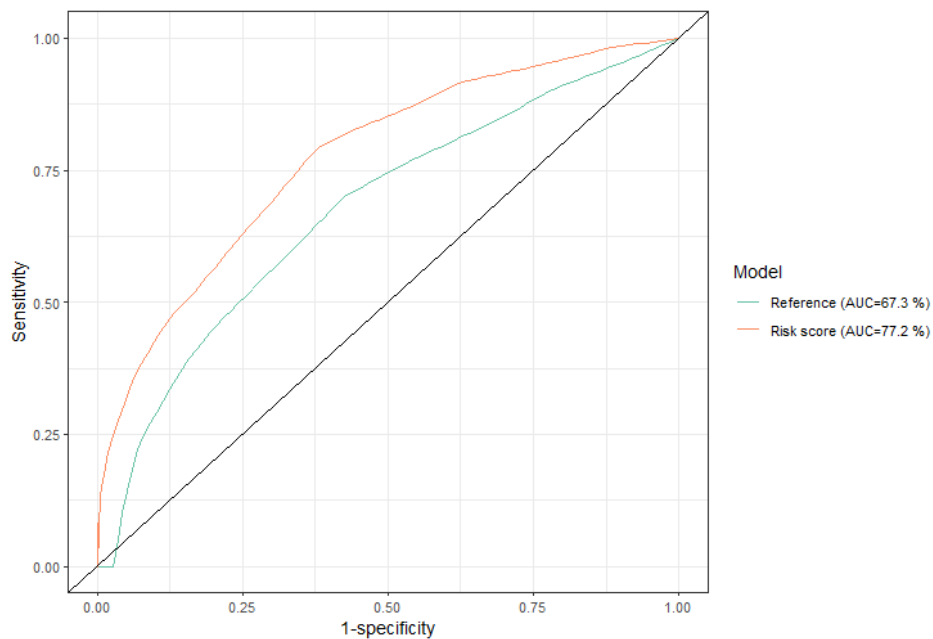


Abbildung 51: ROC-Analyse für MSS nach 10 Jahren (Biomarkerkohorte, pTNM-Stadium IB-IIA)

Für das melanomspezifische Überleben (MSS) zeigt das Risikoscores-Modell eine durchgängige Überlegenheit. Nach 5 Jahren übertrifft die AUC des Risikoscores mit 58,0% die des Referenzmodells mit 53,6%. Deutlicher wird dieser Vorteil bei der Langzeitprognose nach 10 Jahren, wo das Risikoscores-Modell eine AUC von 77,2% erreicht, während das Referenzmodell bei 67,3% liegt.

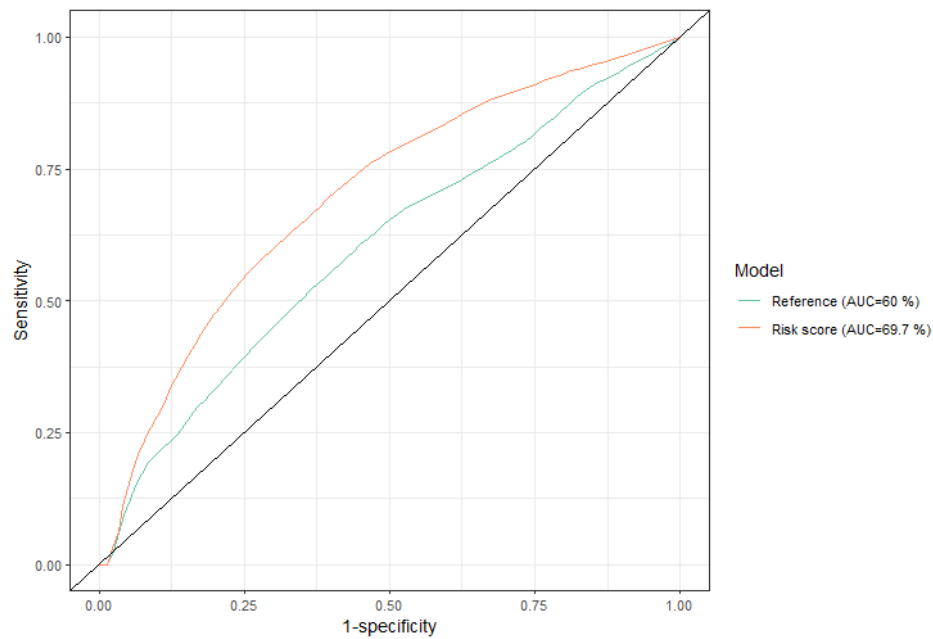


Abbildung 52: ROC-Analyse für RFS nach 5 Jahren (Biomarkerkohorte, pTNM-Stadium IB-IIA)

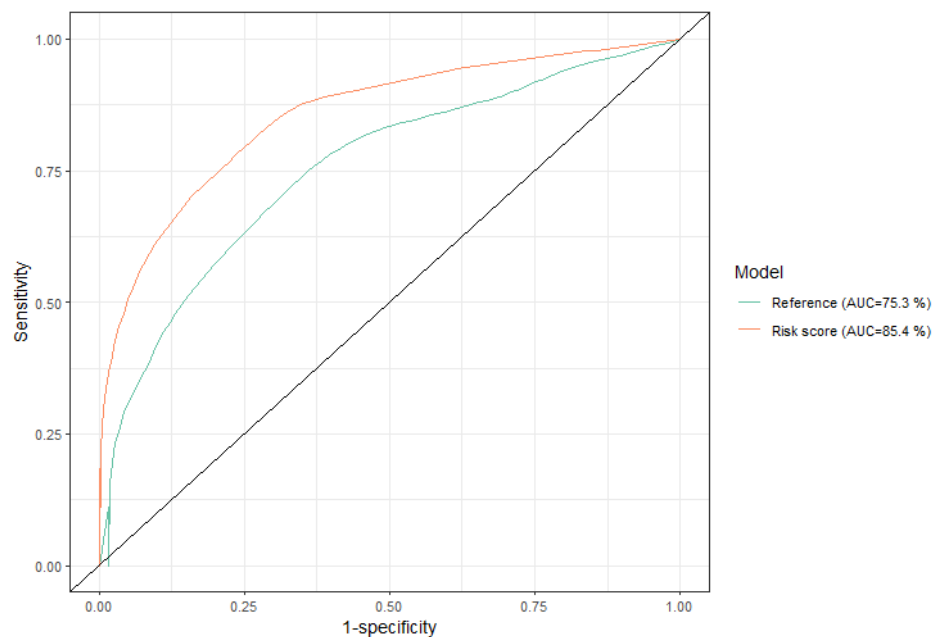


Abbildung 53: ROC-Analyse für RFS nach 10 Jahren (Biomarkerkohorte, pTNM-Stadium IB-IIA)

Noch ausgeprägter ist die verbesserte Vorhersagekraft für das rezidivfreie Überleben (RFS). Für den 5-Jahres-Endpunkt erzielt das Risikoscores-Modell eine AUC von 69,7%, was eine deutliche Steigerung gegenüber den 60,0% des Referenzmodells darstellt. Die größte prognostische Überlegenheit zeigt sich beim 10-Jahres-RFS: Hier erreicht das Risikoscores-Modell eine AUC von 85,4%, die deutlich über der des Referenzmodells mit 75,3% liegt.

4.3.5.4 pTNM-Stadien 3 der Biomarkerkohorte n=32

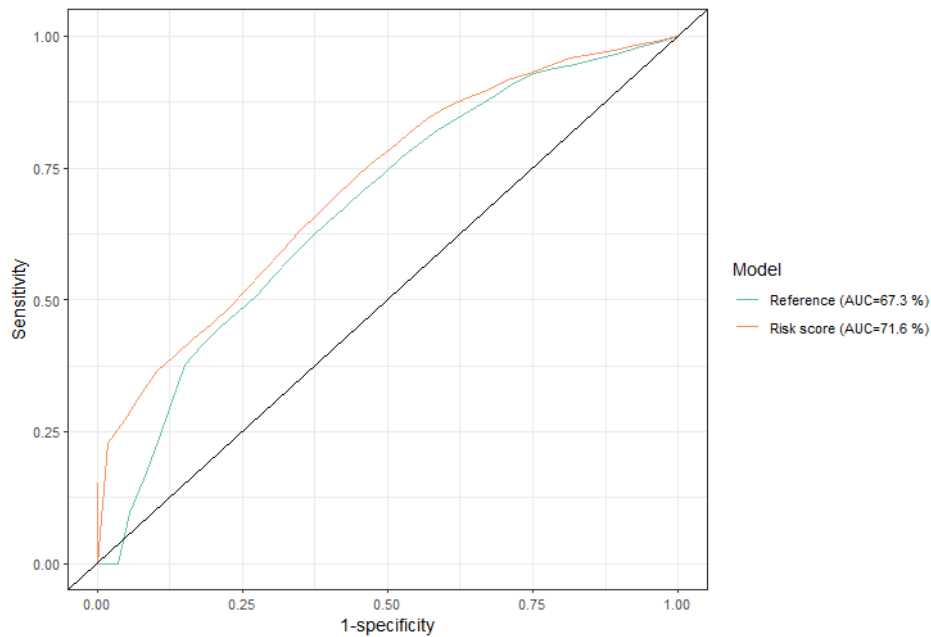


Abbildung 54: ROC-Analyse für MSS nach 5 Jahren (Biomarkerkohorte, pTNM-Stadium III)

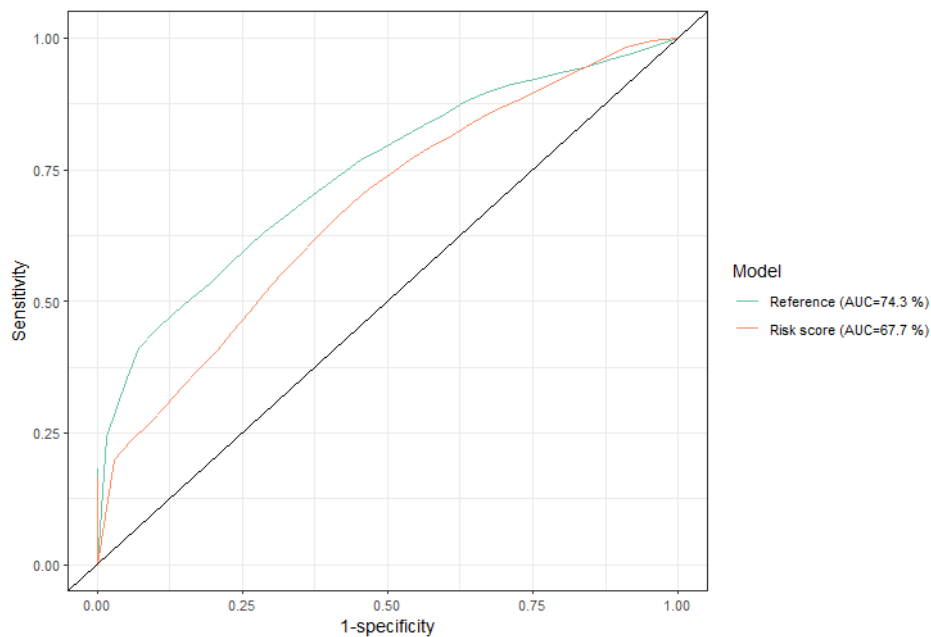


Abbildung 55: ROC-Analyse für MSS nach 10 Jahren (Biomarkerkohorte, pTNM-Stadium III)

Für das melanomspezifische Überleben (MSS) zeigt der Risikoscores eine leicht verbesserte Vorhersagekraft. Nach 5 Jahren erzielt er eine AUC von 71,6% und übertrifft damit das Referenzmodell, welches eine AUC von 67,3% aufweist. Dieser prognostische Vorteil kehrt sich bei der 10-Jahres-Analyse um. Hier erreicht der Risikoscores eine AUC von 74,3% gegenüber 67,7% dem Referenzmodell.

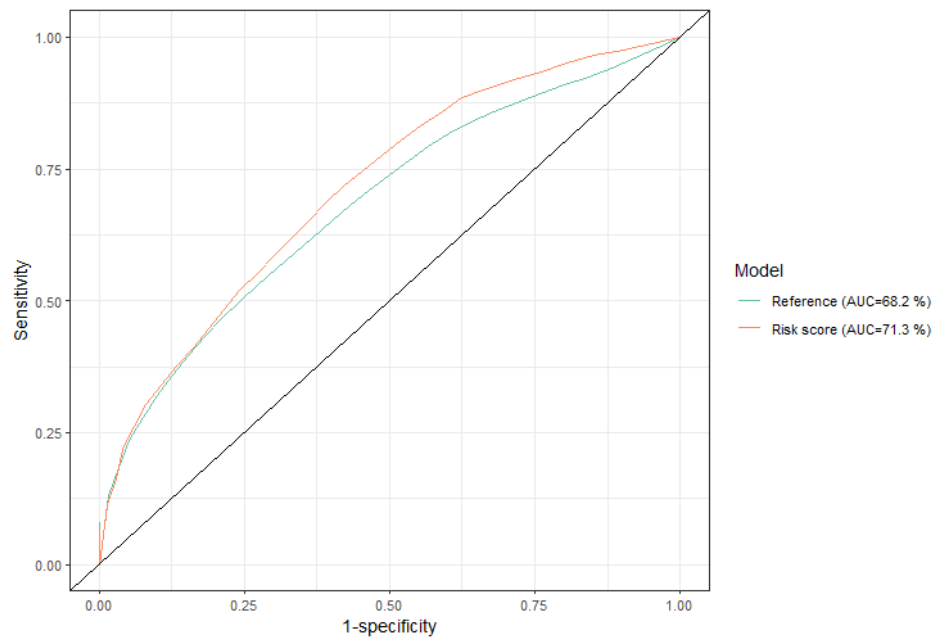


Abbildung 56: ROC-Analyse für RFS nach 5 Jahren (Biomarkerkohorte, pTNM-Stadium III)

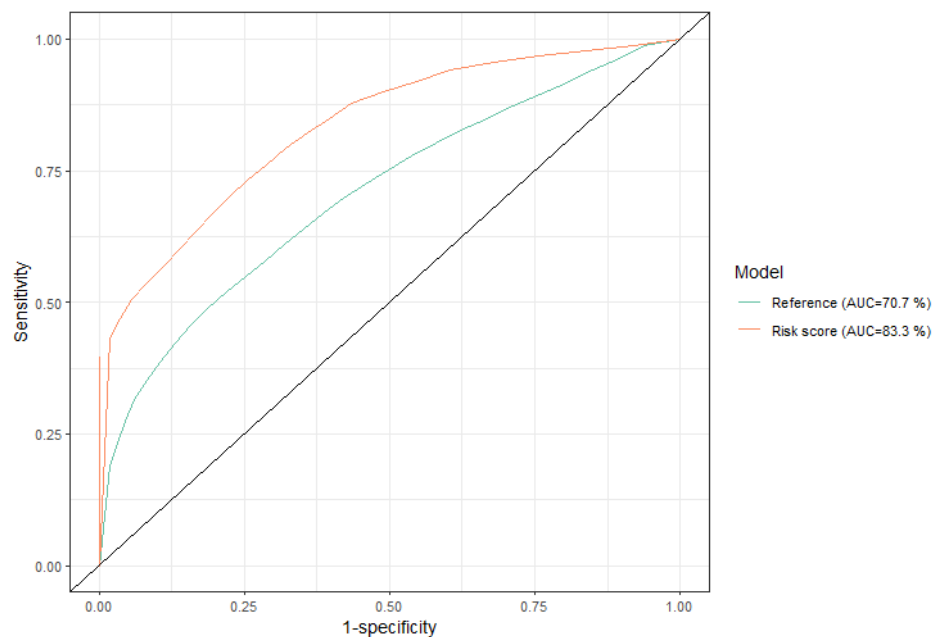


Abbildung 57: ROC-Analyse für RFS nach 10 Jahren (Biomarkerkohorte, pTNM-Stadium III)

Ähnliche Ergebnisse finden sich für das rezidivfreie Überleben (RFS) im Stadium III. Nach 5 Jahren liegt die AUC des Risikoscore-Modells mit 71,3% leicht über der des Referenzmodells mit 68,2%. Die deutlichste Überlegenheit der Biomarker-Signatur zeigt sich jedoch in der Langzeitvorhersage nach 10 Jahren. Hier erreicht das Risikoscore-Modell eine AUC von 83,3%, was eine signifikante Verbesserung im Vergleich zur AUC von 70,7% des Referenzmodells darstellt.

4.3.6 Analytische Validität des Testverfahrens

Tabelle 18: Leistungskennzahlen der 7-Biomarker-Signatur immunoprint®

Patienten		MSS	DMFS	RFS
Biomarkerkohorte Stadien IA-IV (n=157)	Sensitivität % (95% CI)	87,5 (67,6-97,3)	85,7 (63,7-97,0)	90,7 (77,9-97,4)
	Spezifität % (95% CI)	35,3 (27,3-44,1)	34,6 (26,6-43,2)	40,4 (31,3-50,0)
	PPV % (95% CI)	19,6 (16,7-22,9)	16,8 (14,1-20,0)	36,5 (32,4-40,7)
	NPV % (95% CI)	94,0 (84,1-97,9)	94,0 (84,3-97,9)	92,0 (81,5-96,8)
Stadien IA-IIA (n=104)	Sensitivität % (95% CI)	85,7 (42,1-99,6)	71,4 (29,0-96,3)	85,7 (57,2-98,2)
	Spezifität % (95% CI)	40,2 (30,4-50,7)	39,2 (29,4-49,6)	42,2 (31,9-53,1)
	PPV % (95% CI)	9,4 (6,8-12,7)	7,8 (4,9-12,2)	18,8 (14,9-23,3)
	NPV % (95% CI)	97,5 (86,2-99,6)	95,0 (85,2-98,4)	95,0 (83,7-98,6)
Stadien IB-IIA (n=81)	Sensitivität % (95% CI)	100,0 (54,1-100)	83,3 (35,9-99,6)	91,7 (61,5-99,8)
	Spezifität % (95% CI)	34,7 (24,0-46,5)	33,3 (22,9-45,2)	36,2 (25,0-48,7)
	PPV % (95% CI)	10,9 (9,4-12,6)	9,1 (6,3-12,9)	20,0 (16,4-24,2)
	NPV % (95% CI)	100,0 (86,8-100)	96,2 (80,2-99,4)	96,2 (78,9-99,4)
Stadium III (n=32)	Sensitivität % (95% CI)	100,0 (63,1-100)	100,0 (63,1-100)	100,0 (78,2-100)
	Spezifität % (95% CI)	33,3 (15,6-55,3)	33,3 (15,6-55,3)	47,1 (23,0-72,2)
	PPV % (95% CI)	33,3 (27,4-39,9)	33,3 (27,4-39,9)	62,5 (51,6-72,3)
	NPV % (95% CI)	100,0 (63,1-100)	100,0 (63,1-100)	100,0 (63,1-100)

Melanom spezifisches Überleben MSS (Melanoma-Specific Survival), Fernmetastasen-freies Überleben DMFS (Distant-Metastasis-Free Survival), Rezidiv-freies Überleben RFS (Recurrence-Free Survival), Positiv prädiktiver Wert PPV (positive predictive value), Negativ prädiktiver wert NPV(negative predictive value)

Die Tabelle analysiert die 7-Biomarker-Signatur als diagnostischen Test, um ihre Leistungsfähigkeit bei der Vorhersage zukünftiger Krankheitsereignisse zu bewerten. Hierfür werden Kennzahlen wie Sensitivität, Spezifität sowie der positive und negative prädiktive Wert (PPV und NPV) für verschiedene Patientengruppen berechnet.

Die Signatur zeigt in der Analyse der Gesamtkohorte sowie den Subgruppen einen sehr hohen negativen prädiktiven Wert. Der NPV gibt an, mit welcher

Wahrscheinlichkeit ein Patient bei einem negativen Testergebnis, also einem „Low-Risk“-Ergebnis, tatsächlich gesund bleibt. Für das rezidivfreie Überleben liegt der NPV in der gesamten Biomarkerkohorte bei 92,0%. In der klinisch relevanten Gruppe der Patienten ohne zugelassene adjuvante Therapie (Stadien IA-IIA) beträgt er 95,0% und erreicht in den Subgruppe der Stadien IB-IIA 96,2%. Ein „Low-Risk“-Ergebnis könnte ein zukünftiges Rezidiv mit sehr hoher Sicherheit ausschließen.

Die Sensitivität, also die Fähigkeit, Patienten, die tatsächlich ein Ereignis erleiden, korrekt als „High-Risk“ zu identifizieren, ist ebenfalls durchgehend hoch. Für das RFS in der Gesamtkohorte (n=157) beträgt sie 90,7% und in der Stadium-III-Kohorte 100,0%.

Im Gegensatz dazu ist die Spezifität, also die Fähigkeit, gesunde Patienten korrekt als „Low-Risk“ zu identifizieren, in dieser Kohorte eher niedrig. Das bedeutet, dass der Test relativ viele Patienten als „High-Risk“ einstuft, die im Verlauf dennoch kein Rezidiv erleiden (sogenannte "falsch-positive" Ergebnisse). Dies führt konsequenterweise auch zu einem eher niedrigen positiven prädiktiven Wert. Der PPV gibt hierbei an, wie wahrscheinlich ein Rezidiv bei einem „High-Risk“-Ergebnis ist. Für die Gesamtkohorte liegt dieser Wert für den RFS-Endpunkt bei 36,5 %.

5 Diskussion

5.1 Reklassifizierung nach der 8. Edition des AJCC

Die Einführung der 8. Edition des AJCC Cancer Staging Manuals im Jahr 2018 markiert einen Paradigmenwechsel in der Klassifikation des kutanen Melanoms (51). Diese Überarbeitung, basierend auf einer umfangreichen Analyse von über 46.000 Patienten aus der International Melanoma Database and Discovery Platform (IMDDP), zielte darauf ab, die prognostische Genauigkeit durch eine verfeinerte Definition der T-Kategorie und eine detailliertere Stratifizierung des Stadiums III zu erhöhen (47,51,109). Die in dieser Arbeit durchgeführte Reklassifizierung der Patientenkohorte aus den Jahren 2006 bis 2015 ermöglichte es, die Mechanismen und Konsequenzen dieser evidenzbasierten Änderungen bei einem realen klinischen Kollektiv nachzuvollziehen sowie alle Kohortenanalysen nach der aktuell gültigen AJCC Edition durchzuführen.

5.1.1 Verschiebungen im Stadium I

Die größten Verschiebungen in dieser Kohorte fanden, konsistent mit internationalen Daten, in den Stadien IA und IB statt (48). Der treibende Mechanismus hierfür ist die grundlegende Neudefinition der T1-Kategorie in der 8. Edition. Während in der 7. Edition eine erhöhte Mitoserate ein entscheidendes Kriterium war, um ein nicht-ulzeriertes Melanom von T1a nach T1b hochzustufen, wurde dieser Parameter als primäres Staging-Kriterium eliminiert (51,58). Stattdessen wurde eine neue Tumordickengrenze bei 0,8 mm eingeführt.

Daraus ergaben sich folgende zwei Konsequenzen, die die beobachtete Migration erklären. Einerseits kann es zu einer Herabstufung kommen. Wenn also ein Patient mit einem bis 0,8 mm dicken, nicht-ulzerierten Melanom, aufgrund von einer Mitoserate von mindestens einer Mitose pro Quadratmillimeter nach der 7. Edition als T1b klassifiziert wurde, wird dieser nun nach der 8. Edition als T1a eingestuft.

Umgekehrt kann es auch zu einer Heraufstufung kommen. So wurde ein Patient mit einem 0,8 bis 1 mm dicken, nicht-ulzerierten Melanom ohne Mitosen, der nach der 7. Edition als T1a galt, nun aufgrund der Überschreitung der 0,8-mm-Grenze als T1b klassifiziert.

Die klinische Hauptfolge dieser Änderung betrifft die Indikationsstellung zur Sentinellymphknotenbiopsie, die für T1b-Melanome empfohlen wird (51). Durch die

Reklassifizierung wurde die Gruppe der Patienten, für die eine SLNB in Betracht gezogen werden sollte, präziser definiert. In dieser Kohorte führte die Reklassifizierung, wie auch in anderen Studien berichtet, zu einer Netto-Migration von Patienten aus dem Stadium IB in das Stadium IA, was zu einer prognostisch homogenen Zusammensetzung beider Gruppen führt.

5.1.2 Verschiebungen im Stadium III

Die zweite wesentliche Umstrukturierung fand innerhalb des Stadiums III statt, was die deutliche Abnahme der Patientenzahl im Stadium IIIB und die Zunahme im Stadium IIIC in dieser Analyse erklärte. Der fundamentale Unterschied zur 7. Edition ist, dass die T-Kategorie des Primärtumors, definiert durch Tumordicke und Ulzeration, nun ein integraler Bestandteil der Stadium-III-Subklassifikation ist (4). In der 7. Edition wurde die Einteilung in IIIA, IIIB und IIIC primär durch die Anzahl und die Art des Nachweises, also mikroskopisch oder makroskopisch, der befallenen Lymphknoten sowie die Ulzeration des Primärtumors bestimmt (51). Die Tumordicke spielte hierbei keine Rolle (48).

Die 8. Edition kombiniert nun die T- und N-Kategorie in einer Matrix, was zu einer präziseren Risikostratifizierung führt (51). Beispielsweise würde ein Patient mit einem dicken, ulzerierten Primärtumor (T4b) und nur einer mikroskopischen Lymphknotenmetastase (N1a) nicht mehr wie früher in ein prognostisch relativ günstiges Stadium IIIB eingestuft, sondern wird nun korrekt einem Hochrisiko-Stadium (in diesem Fall IIIC) zugeordnet. Dies erklärt die beobachtete Migration aus den mittleren (IIIB) in die höheren (IIIC) Stadium-III-Gruppen.

5.1.3 Fazit der Reklassifizierung

Die klinisch relevanteste Konsequenz dieser Umstrukturierung ist der Verlust der prognostischen Linearität, der durch die Kaplan-Meier-Analysen bestätigt wird (48). Patienten im neuen Stadium IIIA weisen größtenteils eine bessere Prognose auf als Patienten in den Stadien IIIB und IIIC. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Stadium-IIIA-Gruppe nun homogener ist und fast ausschließlich aus Patienten mit dünnen Primärtumoren und minimaler, klinisch okkulten Lymphknotenlast besteht (48). Dieses Erkenntnis hat tiefgreifende Auswirkungen auf die Patientenberatung, die Interpretation von Studienergebnissen und vor allem auf die Indikationsstellung für adjuvante Therapien. Ein Patient im Stadium IIIA hat heute möglicherweise ein geringeres Rezidivrisiko als ein Patient im Stadium IIIB, was die Therapieentscheidung

grundlegend beeinflusst (110). Die in dieser Kohorte nachvollzogenen Verschiebungen und prognostischen Muster bestätigen somit die Anwendbarkeit und die Konsequenzen der 8. AJCC-Edition in einem weiteren deutschen, universitären Zentrum (111).

5.2 Repräsentativität der Gesamtkohorte im nationalen und internationalen Vergleich

Die Validität und Generalisierbarkeit der Ergebnisse einer monozentrischen, retrospektiven Studie hängen entscheidend davon ab, inwieweit das untersuchte Patientenkollektiv die allgemeine Population von Melanompatienten widerspiegelt. Um die Repräsentativität der hier untersuchten Mainzer Gesamtkohorte (n=393) zu beurteilen, wurden die demografischen und klinisch-pathologischen Charakteristika mit denen aus entsprechenden nationalen und internationalen Studien verglichen, die ebenfalls Patienten mit kutanem Melanom und einer Sentinellymphknotenbiopsie untersuchten.

5.2.1 Vergleich der Patientendemografie

Die Mainzer Kohorte wies ein medianes Alter von 59,0 Jahren zum Zeitpunkt der Erstdiagnose auf. Dies liegt im Bereich anderer großer SLNB-Kohorten aus deutschen Zentren. So verzeichnet die Tübinger Kohorte mit 1475 Patienten von Luttermann aus dem Jahr 2021 einen Median von 63 Jahren, während die Münchener SLNB-Kohorte von Schönemeier aus dem Jahr 2017 einen Median von 56 Jahren für n=163 Patienten berichtete (112,113). Im internationalen Vergleich weist diese Kohorte einen Mittelwert des Alters von 57,5 Jahren auf, was ziemlich genau den Beobachtungen von Chang et al. aus dem Jahr 2018 (57,1 Jahre) und Teixeira et al. aus dem Jahr 2013 (59,3 Jahren) entspricht (114,115).

Hinsichtlich der Geschlechterverteilung zeigt die Mainzer Kohorte eine leicht männliche Dominanz von 54,7%. Dies steht in guter Übereinstimmung mit der Tübinger SLNB-Kohorte von Luttermann, in der 54,4% der Patienten männlich waren, und der Münchener Kohorte von Schönemeier mit 54,0% männlichen Patienten (112,113). International werden diese Werte von Chang mit 59% bestätigt, während es in der Kohorte von Teixeira et al. mehr Frauen (61,5%) gab.

5.2.2 Vergleich der Tumormerkmale

Die mediane Tumordicke nach Breslow, der wichtigste prognostische Faktor, ist in SLNB-Kohorten erwartungsgemäß höher als im allgemeinen Patientenkollektiv, da die SLNB in der Regel bei Melanomen $\geq 1,0$ mm oder dünneren Melanomen mit Risikofaktoren durchgeführt wird. Die Mainzer Kohorte wies hierbei eine mediane Tumordicke von 1,5 mm auf. Dies liegt nahe an den Werten anderer SLNB-Kohorten. Die Münchner Kohorte von Schönemeier hatte einen Median von 1,6 mm, und die

Tübinger Kohorte von Luttermann einen Median von 1,8 mm (112,113). Der Mittelwert in der Mainzer Kohorte beträgt 2,2 mm und liegt damit zwischen den von Chang et al. errechneten 2,0 mm sowie den beobachteten 3,08 mm von Teixeira et al. (114,115). Die Tumordicken der Mainzer Kohorte zeigten somit eine sehr gute Übereinstimmung mit den beiden anderen nationalen Vergleichskohorten. Die in der Mainzer Kohorte beobachteten Werte (1,5 mm) sind konsistent mit der mittleren Dicke der Melanome, bei denen eine SLNB indiziert ist.

Hinsichtlich der Ulzeration, einem weiteren signifikanten prognostischen Faktor, zeigte die Mainzer Kohorte eine Rate von 23,9%. Dieser Wert liegt leicht unter dem der Tübinger SLNB-Kohorte von Luttermann mit 30,4% (112). Ebenfalls höhere Werte verzeichneten Chang et al. mit 29% und Teixeira et al. sogar mit 46,7% (114,115).

Die Rate der Sentinel-Lymphknoten-Metastasierung ist ein Schlüsselmerkmal von SLNB-Kohorten. Die Mainzer Kohorte zeigte eine positive SLNB-Rate von 18,6%. Dieser Wert liegt deutlich über der positiven SLNB-Rate der Tübinger Kohorte von Luttermann mit 11,3% und der Münchner Kohorte von Schönemeier mit 6,1% (112,113). Andererseits liegt er unter der Rate einer zweiten Münchner SLNB-Kohorte mit 283 Patienten von Landthaler aus den Jahren 2021 von 25,1% (116). Die beobachtete Variation der positiven SLNB-Raten zwischen den Zentren von 6,2% bis 25,1% deutet vor allem auf Unterschiede in den Einschlusskriterien hin. Weitere Ursachen könnten Abweichungen in den histopathologischen Aufarbeitungsmethoden oder den untersuchten Zeiträumen sein. Im internationalen Vergleich liegt die Mainzer Kohorte zwischen den von Chang et al. beobachteten 16,9% und den von Teixeira et al. erhobenen 21,7% (114,115). Hodges et al. berichten in ihrer Analyse, in der 23 Arbeiten (1998-2014) eingeschlossen wurden, eine positive SLNB-Rate von 17% (117). Die Mainzer Rate von 18,6% liegt damit im höheren, jedoch plausiblen Bereich des Spektrums, was auf eine Kohorte mit tendenziell höherem Risiko hindeutet.

Bezüglich der histologischen Subtypen dominierte in der Mainzer Kohorte das superfiziell spreitende Melanom (SSM) mit 50,4%, gefolgt vom nodulären malignen Melanom (NMM) mit 23,2%. Diese Verteilung ist nahezu identisch mit der Tübinger SLNB-Kohorte von Luttermann, in der SSM 49,3% und NMM 28,0% der Fälle ausmachten (112). Dagegen lagen bei Teixeira et al. das SSM, NMM und ALM jeweils um die 20%, während der größte Teil mit 41,2% als unbekannt oder als spitzoid, desmoplastisch, nävoid oder amelanotisch zusammengefasst war.

5.2.3 Vergleich der Überlebenszeitanalysen

Die Analyse der Endpunkte MSS, DMFS und RFS erfolgte mittels Kaplan-Meier-Kurven über einen langen Nachbeobachtungszeitraum, der im Median 85 Monate und maximal 172 Monate betrug. Voraussetzung für die Aufnahme in die Studie war eine Nachbeobachtungszeit von mindestens fünf, in Ausnahmefällen von drei Jahren.

Einen vergleichbaren Nachbeobachtungszeitraum hat beispielsweise die Untersuchung von Barreiro-Capurro et al. mit ca. 82 Monaten. Generell werden in der Literatur die MSS-Raten häufig für 5 Jahre und 10 Jahre angegeben, was die Bedeutung dieser Langzeit-Follow-up-Perioden als Standard hervorhob. Die Beobachtung, dass die MSS-Kurven nur langsam und kontinuierlich abfallen, unterstreicht die Relevanz des langen Nachbeobachtungszeitraums, da das Mortalitätsrisiko beim Melanom auch nach dem 5-Jahres-Zeitraum bestehen bleibt. Studien, die die AJCC-Klassifikationen untermauern, stützen sich ebenfalls auf Follow-up-Zeiträume von bis zu 10 oder 20 Jahren, da Melanom-bedingte Ereignisse oft mehr als 5 Jahre nach der Erstdiagnose auftreten (58).

Die große Ähnlichkeit der DMFS- und MSS-Kurven, insbesondere die identische 10-Jahres-Rate von 83%, verdeutlicht, dass das Auftreten von Fernmetastasen die entscheidende Ursache ist, die zur melanomspezifischen Mortalität führt. Das RFS wies mit einer 5-Jahres-Rate von 78% den stärksten Abfall im Vergleich zum MSS (90%) und DMFS (87%) auf. Dies ist methodisch zu erwarten, da der RFS-Endpunkt jegliche Form des Krankheitsrückfalls erfasst, einschließlich Lokalrezidiven und regionalen Lymphknotenmetastasen. Diese Ereignisse treten typischerweise früher auf als Fernmetastasen oder der melanomspezifische Tod. Die Tatsache, dass der stärkste Abfall der RFS-Kurve in den ersten fünf Jahren liegt, bestätigte die Relevanz des RFS-Endpunktes für die Analysen von Patienten mit hohem Frührezidivrisiko sowie des Mindest-Follow-up-Zeitraums von 5 Jahren, um gerade diese Rezidive zu erfassen bzw. nicht zu verpassen.

Die Literatur stützt die Verwendung des RFS als wichtigen Endpunkt. Obwohl RFS-Daten nicht für die ursprüngliche AJCC IMDDP-Kohorte berichtet wurden bzw. verfügbar waren, gilt das RFS als akzeptierter primärer Endpunkt für adjuvante Studien beim Melanom durch Zulassungsbehörden, um die Wirksamkeit eines Medikamentes im Vergleich zu Placebos zu belegen. Die Notwendigkeit, das RFS zu untersuchen,

wird durch Studien untermauert, die zeigen, dass in Melanom-Kohorten oft fast doppelt so viele Rezidive wie melanomspezifische Todesfälle auftreten (60).

Die rezidivfreie Überlebenszeitanalyse nach TNM-Stadien zeigte die zu erwartende treppenartige Abstufung des Risikos. Eine vergleichbare Analyse von Fujisawa et al., die 5-Jahres-RFS-Raten nach der 8. Edition des AJCC darstellt, belegte die prognostische Trennschärfe dieser Kohorte mit größtenteils ähnlichen Werten. Insbesondere in den Hochrisikogruppen IIB und IIIC gibt es sehr hohe Überschneidungen zwischen den beiden Kohorten. Die Werte der Mainzer Kohorte lagen im Stadium IIB bei 73 % und im Stadium IIIC bei 36 %, während die japanische Kohorte sehr ähnliche Raten von 72,5 % bzw. 34,1 % aufwies (110).

Auch Garbe et al. beschreiben in einer deutschen Kohorte den stufenweisen Abfall der Überlebenswahrscheinlichkeit mit steigendem Stadium. Bei den Stadien IA und IB ähnelten sich die Mainzer Kohorte und die Garbe-Kohorten (explorative und konfirmatorische Kohorte) in Bezug auf das 5-Jahres-RFS stark mit Werten von 95 % gegenüber 94,5 % und 93,3% im Stadium IA und 87% gegenüber 87,9% und 87,6% im Stadium IB (60). Für die Stadien IIA und IIB wies die Kohorte dieser Doktorarbeit mit 82% bzw. 73% etwas günstigere RFS-Raten auf als die von Garbe et al. ermittelten Werte von 73,1% und 75,6% für Stadium IIA und 61,9 % bzw. 65,0% für Stadium IIB (60).

Besonders auffällig ist in der hier untersuchten Kohorte das Stadium IIC. Die 5 Jahres-RFS-Rate lag lediglich bei 23%, was im Vergleich zu anderen Untersuchungen niedrig ist (Fujisawa et al: 55,7%, Garbe et al: 43,7% und 57,1%) (60,110). Dies deutete darauf hin, dass die wenigen Patienten in der Stadium-IIC-Gruppe dieser Kohorte ein sehr ungünstiges Progressrisiko aufwiesen, das weit unter dem Kohorten liegt. Die Literatur bestätigt generell die Wichtigkeit der Stadien IIB und IIC als Hochrisikogruppen, deren RFS-Risiko dem der Stadien größer gleich IIB ähneln kann.

Weiterhin auffällig ist der Befund aus den RFS-Kurven, wobei die Überlebenskurve für Stadium IIIA (5-Jahres-RFS: 79%) über der von IIB und IIC liegen. Dies ist ein Phänomen, das seit der 8. Edition auftritt. Es resultiert aus der Neudefinition der Stadien in der AJCC 8. Edition, wodurch die Linearität des Schweregrads verloren geht. Das Stadium IIIA ist nun auf Melanome mit günstigen Primärtumormerkmalen (dünn, nicht ulzeriert) und minimaler, okkulter Lymphknotenbeteiligung (N1a, N2a) beschränkt. Im Gegensatz dazu umfassen die Stadien IIB und IIC Patienten mit

hochaggressiven Primärtumoren (dick und ulzeriert), deren ungünstige T-Kategorie oft prognostisch schwerer wiegt als der minimale Nodalbefall der IIIA-Gruppe. Aufgrund dieser Restrukturierung stellt IIIA die prognostisch günstigste Untergruppe im Stadium III dar und das Überleben der betroffenen Patienten ist besser als in den Hochrisiko-Stadien IIB und IIC.

5.2.4 Fazit zur Repräsentativität

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die an der Universitätsmedizin Mainz untersuchte Gesamtkohorte eine hohe Übereinstimmung mit den demografischen und klinisch-pathologischen Tumormerkmalen sowie Überlebenszeiten anderer nationaler und internationaler SLNB-Kohorten aufweist. Dies stützt die Annahme, dass die Beobachtungen in dieser Dissertation repräsentativ sind.

5.3 Prognostische Aussagekraft klinisch-pathologischer Parameter für Progress und Überleben

Die präzise und individualisierte Prognoseeinschätzung ist die Grundlage des modernen Melanom-Managements. Die in der Gesamtkohorte durchgeführten Cox-Regressionsanalysen und Kaplan-Meier-Analysen validierten die etablierten Risikoparameter und ermöglichten einen detaillierten Vergleich der prognostischen Aussagekraft der klassischen klinisch-pathologischen Faktoren mit den Ergebnissen ähnlicher internationaler Studien.

5.3.1 Dominanz der Tumordicke nach Breslow und des Wächterlymphknotenstatus

Die multivariaten Cox-Regressionsanalysen der Gesamtkohorte bestätigten die Tumordicke nach Breslow und den Status des Wächterlymphknotens als die signifikantesten unabhängigen Prädiktoren für alle untersuchten Endpunkte (MSS, DMFS und RFS). Die Ergebnisse der Doktorarbeit untermauerten somit die fundamentale Rolle dieser Faktoren, die seit Langem die Basis des AJCC-Staging-Systems bilden (51).

So steigerte eine erhöhte Tumordicke das Risiko für MSS (HR=1,227; $p<0,001$), DMFS (HR=1,284; $p<0,001$) und RFS (HR=1,215; $p<0,001$) jeweils signifikant. Die Breslow-Dicke wurde bereits 1970 als wichtiger Prognoseindikator identifiziert und ist einer der etabliertesten Prognosefaktoren (118). Bis heute bleibt sie das entscheidende Kriterium in der T-Kategorie der 8. AJCC-Edition (119). Auch Teixeira et al. zeigten, dass die Breslow-Dicke für das MSS in einer multivariaten Analyse hochsignifikant ist (HR=1,216; $p<0,001$) (115). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Tejera-Vaquerizo et al. (120).

Der positive SLN-Status war in der Kohorte ein starker, unabhängiger Prädiktor für die drei Endpunkte MSS (HR=0,450; $p<0,001$), DMFS (HR=0,529; $p<0,033$) und RFS (HR=0,473; $p<0,001$). Die Kaplan-Meier-Analysen verdeutlichten diese Dominanz mit einer 10-Jahres-MSS-Rate für SLNB-positive Patienten von 63% gegenüber 88% für SLNB-negative Patienten, was eine Differenz von 25 Prozentpunkten ausmacht. Noch ausgeprägter ist der Unterschied beim rezidivfreien Überleben mit einem 10-Jahres-Delta von 34 Prozentpunkten (SLNB- 78%; SLNB+ 44%). Das 5-Jahres-RFS betrug in dieser Kohorte 56% und lag damit sehr nahe an dem von Hodges et al. berichteten 59%(117). Ein positiver Sentinelstatus erhöhte also das Risiko für ein Rezidiv in der Kohorte signifikant.

Ähnlich fanden Lobaziewicz et al. in ihrer multivariaten Cox-Analyse, dass der Sentinelstatus ein prognostisch unabhängiger Faktor für das rezidivfreie Überleben (DFS) ist und ein fast 6-fach erhöhtes Risiko für die Sentinel-positive Gruppe darstellt (HR=5,677; $p=0,006$) (121). Diese Beobachtungen wurden ebenfalls von Teixeira et al. und Tejera-Vaquerizo et al. unterstützt (115,120).

5.3.2 Beitrag der Ulzeration

Das Vorhandensein einer Ulzeration bestätigte sich in der multivariaten Analyse der Gesamtkohorte als starker, unabhängiger Risikofaktor für das MSS (HR=0,550; $p=0,006$) und RFS (HR=0,592; $p=0,016$).

Dieses Ergebnis stimmt mit internationalen Studien überein, die der Ulzeration eine eigene prognostische Bedeutung zusprechen. Sie gehört zu den etabliertesten Prognosefaktoren, die in klinischen Prognose-Tools verwendet werden (58). Eine multivariate Analyse von De Vries et al. unterstrich die Ulzeration des Primärmelanoms als einen der stärksten prognostischen Faktoren. Für das krankheitsfreie Überleben (DFS) ergab sich für die Ulzeration eine Hazard Ratio von 2,2, für die SLN-Positivität eine Hazard Ratio von 2,3 ($p < 0,001$) (122). In der Untersuchung von Teixeira et al. erreichte die Ulzeration jedoch keine statistische Signifikanz (115).

5.3.3 Die Rolle von Alter und Geschlecht

Ein höheres Alter bei Diagnose war in der multivariaten Cox-Analyse der Kohorte ein unabhängiger prognostischer Faktor für MSS (HR=1,037; $p<0,001$) und RFS (HR=1,026; $p=0,003$).

Das Alter wird in der Literatur als wichtiger, etablierter Prognosefaktor anerkannt. Lobaziewicz et al. fanden ebenfalls, dass das Patientenalter (HR=1,044; $P=0,038$) ein prognostisch unabhängiger Faktor für das rezidivfreie Überleben war (121).

Interessanterweise berichteten Balch et al. von einer homogenen Patientengruppe in Bezug die klinisch/ pathologischen Merkmale sowie das Überleben in der Altersspanne von 20 bis 70 Lebensjahren. Patienten unter 20 Jahren hatten dabei trotz eher aggressiveren Tumormerkmalen und einer höheren Inzidenz von Lymphknotenmetastasen das beste Überleben im Vergleich zu allen anderen Altersgruppen. Das schlechteste Überleben wurde dagegen bei der Altersgruppe von über 70 Jährigen beobachtet, die die aggressivsten Tumorcharakteristika aufwiesen und öfter im Kopf-Hals-Bereich auftraten (123).

Die univariaten Analysen dieser Doktorarbeit zeigten, dass Frauen eine signifikant bessere Prognose für alle Endpunkte hatten (MSS: HR=0,499; p=0,017; DMFS: HR=0,562; p=0,041; RFS: HR=0,554; p=0,006). Dieser Vorteil verlor jedoch in allen multivariaten Modellen seine Signifikanz, was darauf hindeutete, dass das Geschlecht selbst kein unabhängiger biologischer Schutzfaktor ist, sondern mit günstigeren Tumorcharakteristika korreliert.

In der Literatur gibt es keinen eindeutigen Konsens über das Geschlecht als eindeutige unabhängige Variable. Es scheint jedoch mehr Untersuchungen zu geben, in denen sich das Geschlecht als relevanter Faktor herausgestellt hat. So wurde beispielsweise bereits 1967 auf Unterschiede in der Aggressivität bei Melanoma zwischen den Geschlechtern hingewiesen (124). Diese Beobachtung wurde seitdem häufig repliziert (122,125,126). In Ihrer großen, populationsbasierten Studie (n=11.744) wiesen Josse et al. einen unabhängigen Einfluss des Geschlechts auf die Melanomerkrankung in allen Progressionsstufen nach. Dies spiegelte sich hauptsächlich in einem reduzierten Risiko für viszerale Metastasen bei Frauen wider, was zu einer signifikant höheren Überlebensrate bei Frauen im Vergleich zu Männern führte (127).

5.3.4 Prognostische Heterogenität entsprechend der AJCC 8. Edition

Die Kaplan-Meier-Analysen der Gesamtkohorte, reklassifiziert nach der AJCC 8. Edition, bestätigten die prognostische Aussagekraft der neuen Stadieneinteilung.

Die Analysen zeigten, dass die Überlebenskurve für das Stadium IIIA über der der Stadien IIB und IIC liegt. Diese nicht streng lineare Abfolge der Prognosen ist bei der Einführung der 8. Ausgabe der AJCC beschrieben und resultiert aus der Neudefinition der T- und N-Kategorien (48,51)

Trotz der Validierung der AJCC-Kriterien blieb eine prognostische Heterogenität. Patienten, die nach klinisch/ pathologischen Kriterien mit einem Niedrigrisiko eingestuft wurden, wie zum Beispiel die Sentinel-negativen Patienten im Stadium IA-IIA, erlitten teilweise dennoch ein Rezidiv. Dies unterstrich die Notwendigkeit, traditionelle Parameter zu ergänzen. Neue Ansätze, wie computergestützte histopathologische Analysen, versuchen, diese Heterogenität zu adressieren. So identifizierten Rosenbaum et al. bei Stadium IB Melanomen horizontale Tumorbreite, digitale Tumorfächenberechnung und Tumorkonformation als prognostische Variablen, die das rezidivfreie Überleben (RFS) zusätzlich zur Breslow-Dicke vorhersagen können (128). Ebenso ist die Integration von Biomarkern zur Risikostratifizierung ein

vielversprechender Ansatz, um die bestehende Stadieneinteilung zu verfeinern und die Prognose für Melanompatienten zu personalisieren.

5.4 Prädiktoren für den Status des Wächterlymphknotens

Die Sentinellymphknotenbiopsie ist derzeit ein entscheidender Schritt zur Identifizierung von Patienten mit okkulten, regionären Mikrometastasen. Wie bereits zuvor gezeigt, war der Sentinel-Status auch hier neben der Tumordicke der wichtigste prognostische Faktor zur Vorhersage des weiteren Krankheitsverlaufs. Zwar gibt es eine Empfehlung für die Indikationsstellung in der S3-Leitlinie des Melanoms, jedoch wurde betont, dass diese nicht studienfundiert sei (5). So wird Patienten, die ein Melanom mit einer Tumordicke von weniger als einem Millimeter haben, nur bei zusätzlichen Risikofaktoren für einen positiven Sentinelstatus eine Sentinellymphknotenbiopsie angeboten. In der Leitlinie wurden als zu berücksichtigende Risikofaktoren spezifisch eine vorhandene Ulzeration, eine erhöhte Mitoserate und ein jüngeres Lebensalter von unter 40 Jahren genannt. Was Risikofaktoren für einen positiven Sentinelstatus sind und wie diese bewertet werden bleibt jedoch eine anhaltende Diskussion. Denn auch wenn nur ein geringer Anteil der Patienten mit dünnen Melanomen ein positives Ergebnis bei der Sentinellymphknotenbiopsie aufweist, profitieren diese trotzdem dank der darauffolgenden Hochstufung des pTNM-Stadiums derzeit von einer Therapie. Auch in höheren Stadien ist die SLNB ein wichtiges Werkzeug, um Patienten eventuell den invasiveren Eingriff der radikalen Lymphknotendissektion entweder zu ersparen oder aber auch zu ermöglichen.

Die SLNB kann neben ihrem hauptsächlich diagnostischen Wert auch bei positivem Befund mit anschließender komplettierender Lymphknotendissektion einen therapeutischen Wert haben und zu einer verringerten Rezidivrate in der regionären Lymphnotenstation führen (71,129). Deswegen ist die Identifikation von Prädiktoren, die eine hohe Wahrscheinlichkeit für einen positiven SLN-Befund anzeigen, von hoher klinischer Bedeutung für die Patientenberatung und die Therapieplanung.

Da sowohl für alle sentinel-negativen (n=320) als auch sentinel-positiven Patienten (n=73) der Gesamtkohorte klinisch pathologische Daten vorlagen, wurde auch der prognostische Wert verschiedener klinischer/ pathologischer Parameter für die Vorhersage eines positiven Sentinel bei einer Sentinellymphknotenbiopsie untersucht. Um dies zu untersuchen, wurde eine logistische Regressionsanalyse bei der Gesamtkohorte durchgeführt.

In der univariaten Analyse bestätigten sich zunächst die Erwartungen gemäß der aktuellen S3-Leitlinie. Das Vorhandensein einer Ulzeration (OR=3,503; $p<0,001$) und eine erhöhte Mitoserate (OR=1,901; $p=0,032$) waren jeweils für sich genommen signifikante Prädiktoren für einen positiven SLN-Status. Während das Patientenalter (OR=1,013; $p=0,192$) in dieser Analyse keine statistische Signifikanz erreichte, zeigten weiterhin eine höhere Breslow-Dicke (OR=1,223; $p<0,001$), der Subtyp des nodulären malignen Melanoms (OR=1,971; $p=0,031$) sowie das Clark-Level 5 (OR=6,857; $p<0,046$) einen prognostischen Mehrwert.

Jokic et al. bestätigten mit ihren Untersuchungen diese Ergebnisse. So fanden sie ebenfalls eine Ulzeration (OR=8.97; $p=0,001$), eine erhöhte Mitoserate (OR=7.93; $p=0,001$), eine höhere Breslow-Dicke (OR=2,62; $p=0,003$) und ein erhöhtes Clark-Level (OR:2,21; $p=0,048$) als signifikante prognostische Faktoren im univariaten Modell (130). Chang et al. kamen ebenfalls zu sehr ähnlichen Ergebnissen (114). Dies zeigte, dass die genannten Parameter mit einer fortschreitenden und biologisch aggressiveren Erkrankung assoziiert sind, die das Risiko einer lymphatischen Disseminierung erhöht.

Ein anderes Ergebnis zeigte sich jedoch bei der durchgeführten multivariaten Analyse. Nachdem alle Faktoren in ein gemeinsames statistisches Modell aufgenommen wurden, um ihren voneinander unabhängigen Vorhersagewert zu ermitteln, blieb einzig und allein das Vorhandensein einer Ulzeration als signifikanter, unabhängiger Prädiktor für einen positiven Sentinelbefund übrig (OR=2,878; $p<0,001$). Alle anderen Parameter, einschließlich der Tumordicke nach Breslow, verloren in diesem kombinierten Modell ihre statistische Signifikanz. Dieses Ergebnis hebt die biologische und klinische Bedeutung der Ulzeration hervor. Die statistische Erklärung für den Signifikanzverlust der Tumordicke in diesem Modell liegt wahrscheinlich in der starken Kolinearität beider Variablen. Dickere Melanome neigen weitaus häufiger zu einer Ulzeration. Es ist daher plausibel, dass in dieser Kohorte die biologische Aggressivität, die zur lymphogenen Metastasierung führt, so stark durch die Ulzeration repräsentiert wird, dass die Tumordicke keinen signifikanten zusätzlichen Mehrwert bei der Vorhersage liefert, sobald die Ulzeration im Modell berücksichtigt wird.

Teixiera et al. beschrieben jedoch, dass bei ihrer multivariaten Analyse neben der Ulzeration die Tumordicke und eine sehr hohe Mitoserate mit mehr als 6 Mitosen pro Quadratmillimeter signifikante Prädiktoren für einen positiven Sentinelstatus waren.

Speziell bei dünnen Melanomen mit einer Tumordicke von unter einem Millimeter zeigten sich die Tumordicke nach Breslow von mehr als 0,75 Millimetern, ein Clark-Level von 4 oder mehr sowie die Ulzeration als signifikant (131).

Es gilt jedoch auch zu beachten, dass selbst bei Patienten, die ein negatives Sentinellymphknotenbiopsie-Ergebnis hatten, ungefähr 13 Prozent ein Rezidiv erleiden, welches durchschnittlich 21 Monate nach dem Eingriff auftrat (117). Weiterhin berichteten Hodges et al. daraufhin von einem 5-Jahres-Gesamüberleben von ungefähr 52%. Dagegen lag das Gesamtüberleben eines gesamten Patientenkollektivs, das initial als sentinelnegativ diagnostiziert wurde, in der Untersuchung von Teixiera et al. nach 5 Jahren deutlich höher bei 88,2% (115). Dieser Unterschied verdeutlicht erneut den dringenden Bedarf nach besseren Stratifizierungsmöglichkeiten innerhalb des prognostisch günstigeren sentinelnegativen Patientenkollektivs neben den klassischen klinisch/ pathologischen Parametern, um versteckten Hochrisikopatienten trotzdem Therapien anbieten und so potenziell ihre Prognose verbessern zu können.

5.5 Repräsentativität der Biomarkerkohorte im Vergleich zur Gesamtkohorte und zu publizierten immunoprint®-Kohorten

Die Generalisierbarkeit der Ergebnisse einer Biomarker-Studie hängt maßgeblich davon ab, ob die untersuchte Subgruppe, für die das Biomarker-Ergebnis vorliegt, die ursprüngliche Gesamtkohorte sowie andere relevante Studienpopulationen repräsentiert. Daher wurde die Biomarkerkohorte (n=157) sowohl einem internen Vergleich mit der eigenen Gesamtkohorte als auch einem externen Vergleich mit publizierten Kohorten, in denen die 7-Biomarker-Signatur immunoprint® untersucht wurde, unterzogen.

5.5.1 Interne Repräsentativität

Die Zusammenstellung der Biomarkerkohorte erfolgte auf Basis definierter Kriterien, wie der Verfügbarkeit eines für die immunhistochemische Untersuchung mit immunoprint® geeigneten Gewebeblocks und der erfolgreich durchgeführten Biomarker-Färbung. Der Vergleich der klinisch-pathologischen Charakteristika zwischen der Biomarkerkohorte und der Gesamtkohorte zeigte eine hohe Übereinstimmung. Zentrale prognostische Parameter wie das mediane Alter (59 vs. 59 Jahre), der Anteil männlicher Patienten (55,4 % vs. 54,7 %) und die mediane Breslow-Dicke (1,5 mm vs. 1,5 mm) waren nahezu identisch.

Eine subtile, jedoch für die Studienziele relevante Abweichung zeigte sich in der Verteilung klassischer Risikofaktoren. In der Biomarkerkohorte fand sich eine geringfügig höhere Prävalenz von Tumoren mit Ulzeration (25,5 % vs. 23,9 %) sowie ein merklich höherer Anteil an Patienten mit positivem Sentinel-Lymphknotenstatus (22,3 % vs. 18,6 %). Diese beiden Merkmale sind anerkannte Indikatoren für ein aggressiveres Tumorverhalten. Die leichte Anreicherung von Patienten mit Hochrisikomerkmale in der Biomarkerkohorte galt es bei der Bewertung der Signatur-Ergebnisse zu berücksichtigen. Es schaffte zudem eine Voraussetzung, um die prognostische Trennschärfe der Signatur auch in dem klinisch herausfordernden Segment der Patienten mit höherem Risiko zu testen und ihre potenzielle Überlegenheit gegenüber etablierten Faktoren zu überprüfen.

Ebenfalls sehr ähnlich war die Verteilung der Patienten über die AJCC-Stadien der 8. Edition in beiden Kohorten. Diese hohe Kongruenz belegt, dass durch den Selektionsprozess, der primär auf der Verfügbarkeit von archiviertem Tumormaterial basierte, keine starke Verzerrung in die Biomarkerkohorte eingebracht wurde. Sie

kann somit als repräsentative Stichprobe der Gesamtkohorte angesehen werden, was die interne Validität der nachfolgenden Biomarker-Analysen sicherstellt.

5.5.2 Externe Repräsentativität

Ein wichtiger Vergleich ist der mit anderen Kohorten, in denen die 7-Biomarker-Signatur immunoprint® ebenfalls untersucht wurde. Zum aktuellen Zeitpunkt können hierfür drei Kohorten herangezogen werden, zu denen es Publikationen mit entsprechenden Informationen gibt. Diese stammen von Meyer et al. aus den Jahren 2012 sowie 2023 und von Reschke et al. aus dem Jahr 2021 (8,40,41). So können Daten zur „High-Risk“- und „Low-Risk“-Verteilung sowie einige Patientencharakteristika und klinisch/ pathologische Parameter der Primärmelanome verglichen werden.

5.5.2.1 Biomarker-Untersuchung von Patienten der Stadien I-IV (n=225) von Meyer et al. aus dem Jahr 2012(8)

Eine erste mögliche Vergleichsreferenz ist die Validierungskohorte aus Regensburg, die in der Erstbeschreibung der immunoprint®-Signatur von Meyer et al. 2012 publiziert wurde (8). Zu beachten ist jedoch, dass die Biomarker an einem Tissue Micro Array (TMA) gefärbt wurden und nicht an einem Gesamtschnitt des Melanoms wie in der hier analysierten Mainzer Kohorte.

Das Verhältnis von „Low- Risk“ zu „High-Risk“-Ergebnissen der Untersuchungen mit der 7-Biomarker-Sigantur betrug in dieser Dissertation zur Mainzer Biomarkerkohorte (n=157) 31,8% zu 68,2%. Meyer et al. beobachteten bei ihrer Analyse Werte sehr ähnlicher Größenordnung mit 33% zu 67%.

Die Werte für die mittlere Tumordicke lagen mit 1,08 mm für die „Low-Risk“- und 2,55 mm für die „High-Risk“-Gruppe jedoch etwas niedriger aber in einem ähnlichen Bereich wie die Mainzer Werte („Low-Risk“=1,4 mm; „High-Risk“=2,6 mm). Der Anteil der sentinelpositiven Patienten ist mit 22,3% in der Mainzer Kohorte auch deutlich höher als in der Validierungskohorte von Meyer et al. mit 5%.

Während in dieser Biomarker-Kohorte das mittlere Alter der „Low-Risk“-Patienten leicht höher lag, war dieser Effekt genau umgekehrt bei Meyer et al zu beobachten. Bei der „High-Risk“-Gruppe wurden zudem für beide Kohorten sehr ähnliche Beobachtungen von einem leichten Männer-Überhang mit 56,1% in der Mainzer Kohorte sowie 55,1% in der Validierungskohorte von Meyer et al. gemacht.

5.5.2.2 Biomarker-Untersuchung von Patienten der Stadien I-IIA (n=439) von Meyer et al. aus dem Jahr 2023 (41)

Eine zweite Vergleichsmöglichkeit ist die prospektive Kohorte von Meyer et al. aus dem Jahr 2023 (41). Dabei wurden insgesamt 439 Patienten der Stadien IA-IIA untersucht. Weiterhin wurden einige Subgruppenanalysen für Patienten der Stadien IB-IIA (n=116) gemacht, die für einen Vergleich entsprechende Subgruppe der Mainzer Biomarkerkohorte herangezogen werden kann. Zu beachten ist, dass in dieser Arbeit die cTNM- und nicht die pTNM-Stadien berichtet wurden.

Die „Low-Risk“- zu „High-Risk“-Verteilung stellt sich in dieser Kohorte mit 75% zu 25% etwas abweichend dar. Der hohe Anteil an Niedrigrisikopatienten ist plausibel, da 73,6% der Patienten mit cTNM-Stadium IA klassifiziert wurden, während bei der Mainzer Kohorte nur 14,6% der Patienten dem pTNM-Stadium IA angehören. Dies spiegelt sich auch in einer deutlich geringeren mittleren Tumordicke von 0,7 mm im Vergleich zur Mainzer Kohorte mit 2,2 mm wider.

Ohne die Betrachtung der großen Gruppe von IA Patienten in der Vergleichskohorte, können für die Subgruppe der IB bis IIA Patienten vergleichbarere Werte im „Low-Risk“ und „High-Risk“-Verhältnis mit 42,2% zu 57,8% zur Mainzer Kohorte (31,8% vs. 68,2%) ermittelt werden. Deshalb ist diese Kohorte als Referenz für die Subgruppenanalyse der Mainzer Patienten der Stadien IB bis IIA interessant.

5.5.2.3 Biomarker-Untersuchung von Patienten der Stadien IB-III (n=88) von Reschke et al. aus dem Jahr 2021 (40)

Für einen dritten Vergleich kann die Leipziger Kohorte von Reschke et al. aus dem Jahr 2021 herangezogen werden (40). Sie analysierte 88 Patienten der Stadien IB bis III.

Die Leipziger Kohorte zeichnet sich im Vergleich zu den anderen Kohorten durch aggressivere Tumorcharakteristika aus. Dies spiegelt sich unter anderem in einer höheren mittleren Tumordicke mit 2,6 mm bei der „Low-Risk“- und 3,9 mm bei der „High-Risk“-Gruppe wider (Mittelwert: 2,1 mm vs. 3,0 mm). Auch die Ulzerationsrate der gesamten Kohorte liegt mit 46,6% deutlich über der in der Mainzer Biomarker-Kohorte beobachteten 25,5%. Obwohl diese Kohorte ein höheres klinisch-pathologisches Risiko aufwies, lag jedoch der mit immunoprint® ermittelte „High-Risk“-Anteil bei 54,5% und somit unter dem der Mainzer Kohorte mit 68,2%. Die Gründe für den höheren Anteil an molekular als „High-Risk“ definierten Patienten dieser Kohorte sind dabei vermutlich multifaktoriell. So ist es denkbar, dass die Kohorte, obwohl

klinisch-pathologisch vergleichbar, versteckte Merkmale aufwies, die mit einer aggressiveren Tumorbilogie assoziiert sind, welche von den klassischen histopathologischen Parametern nicht vollständig erfasst wurden, aber auf molekularer Ebene detektierbar waren. Ebenso konnten leichte Variationen in präanalytischen Faktoren (z.B. unterschiedliche Fixierungszeiten des Gewebes, Alter der Paraffinblöcke über den langen Studienzeitraum) über verschiedene Zentren hinweg nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

Eine kürzlich durchgeführte analytische Validierungsstudie bestätigte jedoch eine hohe technische Reproduzierbarkeit des immunoprint®-Assays (46).

5.5.2.4 *Fazit*

Die Mainzer Biomarkerkohorte war klinisch-pathologisch repräsentativ, schien dabei aber im Vergleich mit den anderen Kohorten, an denen die 7-Biomarker-Signatur untersucht wurde, ein leicht höheres molekulares Risikoprofil aufzuweisen. Die aufgezeigten Gemeinsamkeiten und Unterschiede waren für die Interpretation der nachfolgenden Überlebensanalysen sehr relevant. Um diese Zentrumseffekte zu reduzieren, wären kombinierte Analysen der verschiedenen Zentrums-Kohorten ein interessanter nächster Schritt. Dazu wäre die Kohorte aus Leipzig geeignet, da dort ebenfalls alle Patienten einer Sentinellymphknotenbiopsie unterzogen wurden.

5.6 Prognostischer Mehrwert der 7-Biomarker-Signatur: Analysen in spezifischen Kohorten

Nachdem die Repräsentativität der Biomarkerkohorte diskutiert wurde, widmen sich die folgenden Analysen einer zentralen Fragestellung dieser Arbeit. Es wurde die prognostische Qualität der 7-Biomarker-Signatur immunoprint® in der Mainzer Kohorte überprüft. Besonders interessant ist dabei der unabhängige prognostischen Mehrwert zur Risikostratifizierung von Melanompatienten, der über die etablierten klinisch-pathologischen Parameter hinausgeht.

Kaplan-Meier-Analysen untersuchten dabei die Fähigkeit eine Patientengruppe durch die Signatur klar und klinisch bedeutsam in eine „Low-Risk“- und „High-Risk“-Gruppe zu trennen.

Die Cox-Analysen bewerteten im univariaten Modell eine prognostische Relevanz. In einer multivariaten Analyse wurde das Vorliegen eines unabhängigen Beitrags zu den etablierten prognostischen Faktoren für die jeweiligen Endpunkte MSS, DMFS und RFS überprüft.

Anhand von ROC-Analysen können das Biomarker-Modell und das Referenzmodell verglichen werden und ein Beitrag der Biomarker-Signatur zur prognostischen Leistung anhand der berechneten AUCs quantifiziert werden.

Die Betrachtung der Sensitivität und des NPV widmete sich der Frage, wie sicher die Einstufung als „Low-Risk“ Patient wirklich war, während die Spezifität und der PPV eine Aussage dazu trafen, ob „High-Risk“-Patienten wirklich einen Progress erlitten.

5.6.1 Gesamte Biomarkerkohorte (Stadien I-IV, n=157)

5.6.1.1 *Stratifizierung und prognostischer Wert*

Die Kaplan-Meier-Analysen für die gesamte Biomarkerkohorte demonstrierten deutlich die Fähigkeit der Signatur, Patienten in Gruppen mit signifikant unterschiedlicher Prognose zu trennen. Die stärkste und statistisch robusteste Differenzierung zeigte sich für das rezidivfreie Überleben (RFS), wo die Überlebenskurven der „Low-Risk“ und „High-Risk“ Gruppen weit auseinanderliefen ($p=0,00043$). Während Patienten der „Low-Risk“-Gruppe eine sehr gute 10-Jahres-Überlebensrate von 92% aufwiesen, lag diese Rate in der „High-Risk“-Gruppe bei lediglich 54%. Diese deutliche Separation bestätigte die grundlegende Validität der Signatur und ist konsistent mit den Ergebnissen aus der Erstvalidierung von Meyer et al. sowie den Ergebnissen von Reschke et al. an einer vergleichbaren Kohorte, die die Stadien IB-IIIC einschloss

(8,40). Auch stehen die hier gewonnen Ergebnisse in Übereinstimmung mit den Untersuchungen von Meyer et al. aus dem Jahr 2023 und Amaral et al. ebenfalls aus dem Jahr 2023 und zeigen signifikante Ergebnisse für das RFS (41,132).

Für das melanomspezifische (MSS, $p=0,033$) und das fernmetastasenfreie Überleben (DMFS, $p=0,051$) wurde in der Mainzer Kohorte ebenfalls eine signifikante bzw. tendenziell signifikante Trennung der Kurven beobachtet, was die Fähigkeit der Signatur unterstreicht, auch bei diesen klinischen Endpunkten Patientengruppen zu stratifizieren.

5.6.1.2 Prognostischer Mehrwert im Vergleich zu den etablierten histopathologischen Risikofaktoren
Bei der entscheidenden Frage nach dem unabhängigen prognostischen Wert mittels multivariater Cox-Analyse erwies sich die 7-Biomarker-Signatur für das RFS als starker, unabhängiger prognostischer Faktor ($HR=3,904$; $p=0,0144$), dessen Vorhersagekraft neben der Tumordicke und dem Alter bei Diagnose signifikant bestehen blieb. Der p-Wert für den Nodalstatus blieb mit $p=0,0537$ knapp unter dem Signifikanzniveau. Insgesamt gingen 43 RFS-Ereignisse in die Berechnung ein.

Für die Endpunkte MSS und DMFS verlor die Signatur in dieser Kohorte jedoch ihre statistische Signifikanz im multivariaten Modell. Hier blieb die Tumordicke nach Breslow jeweils allein ein unabhängiger Prädiktor. Dies bestätigte die etablierte Tumordicke als Faktor zur Vorhersage von Fernmetastasierung und Tod.

Da für uni- und multivariate Cox-Analysen die Ereignisrate sowie die Zahl der untersuchten Variablen eine Rolle spielt und für die Endpunkt MSS sowie DMFS nur 24 bzw. 21 Ereignisse in die Berechnung eingingen, ist davon auszugehen, dass die niedrige Zahl der Ereignisse einen entscheidenden Einfluss auf das Ergebnis hatte.

Bei den ROC-Analysen für das MSS lag der inkrementelle Nutzen der Signatur im Vergleich zum Referenzmodell nach 5 Jahren bei -0,5 Prozentpunkten und nach 10 Jahren bei 0,5 Prozentpunkten bei einem AUC-Wert von über 70%. Rechnerisch lieferte immunoprint® in der Gesamtkohorte keinen nennenswerten Mehrwert, der nicht schon bereits durch die klinisch/ pathologischen Faktoren erfasst wurde. Beim RFS lag der Mehrwert nach 5 Jahren bei 3,1 Prozentpunkten und nach 10 Jahren bei 3,9 Prozentpunkten und kam damit sogar auf einen AUC-Wert von 81,5%. Dies zeigte, dass die prognostischen Faktoren bereits eine gute Vorhersage lieferten, die Signatur diese jedoch noch verbessern konnte und somit einen Mehrwert darstellte.

Die ROC-Analysen weiterer Subgruppen wie den Stadium IA bis IIA bzw. IB-IIA (siehe Kapitel 5.6.2 und 5.6.3.) zeigen höhere AUC-Differenzen zwischen dem Risikoscore-Modell und dem Referenzmodell. Dies deutet darauf hin, dass der Mehrwert der Biomarker-Signatur bei den niedrigeren Stadien am ausgeprägtesten ist.

5.6.1.3 Diagnostische Güte des Tests

Die klinische Nützlichkeit eines prognostischen Tests wird maßgeblich durch seine Leistungskennzahlen bestimmt. In dieser Analyse zeigte die Signatur insbesondere für das RFS eine hohe Sensitivität von 90,7%, während sie für das MSS und DMFS bei 87,5% und 85,7% lagen. Die Spezifität war eher moderat mit dem höchsten Wert von 40,4% beim RFS. Dies führte konsequenterweise zu einem moderaten positiven prädiktiven Wert von maximal 36,5 % beim RFS. Dieser Wert bedeutete, dass etwa jeder dritte als „High-Risk“ klassifizierte Patient tatsächlich ein Rezidiv erlitt. Dieses Ergebnis steht nicht im Widerspruch, sondern im Einklang mit den publizierten Daten anderer großer Kohorten. So berichteten Meyer et al. in der Regensburger Kohorte aus dem Jahr 2023 einen PPV von 17,3 % für das MSS (41). Die Leipziger Kohorte fand hingegen einen deutlich höheren PPV von 33,3 % für das MSS (40).

Eine über alle Studien hinweg konsistente Stärke der immunoprint®-Signatur lag in ihrem hohen negativen prädiktiven Wert. In dieser Kohorte betrug der NPV für das RFS 92,0 %. Dieser Wert lag unter den NPVs von 97,0 % (für DFS) bei Meyer et al. und 97,5 % (für RFS) bei Reschke et al. (40,41). Die klinische Implikation dieses Befundes ist, dass ein „Low-Risk“-Ergebnis ein zukünftiges Krankheitsrezidiv mit sehr hoher Sicherheit ausschließt. Für das klinische Management bedeutet dies, dass Patienten mit einem „Low-Risk“-Ergebnis weiterhin einer Standard-Nachsorge zugeführt werden könnten, was potenziell zur Deeskalation von Überwachungsmaßnahmen und zur Vermeidung von Übertherapie im Rahmen der Nachsorge beitragen kann. Die Signatur ist somit nicht nur ein Werkzeug, um ein Rezidiv mit Sicherheit vorherzusagen, sondern auch ein Instrument, um Patienten zu identifizieren, die mit hoher Wahrscheinlichkeit kein Rezidiv erleiden werden.

5.6.2 Patienten der Stadien IA-IIA (n=104)

Die klinische Betreuung von Melanompatienten in den AJCC-Stadien IA bis IIA ist von einer inhärenten Unsicherheit geprägt. Obwohl die überwiegende Mehrheit dieser Patienten eine gute Prognose hat, erleidet ein zwar prozentual kleiner, aber in absoluten Zahlen relevanter Anteil einen Krankheitsrezidiv, der mit erheblicher Morbidität und Mortalität verbunden ist (133). Dies schafft ein klinisches Dilemma. Einerseits kann es zu einer unnötig intensiven Überwachung aller Patienten der Niedrigrisiko-Mehrheit führen. Andererseits werden Hochrisikopatienten potenziell zu spät identifiziert. Da für diese Patientengruppe aktuell keine adjuvante Systemtherapie zugelassen ist, ist die Notwendigkeit für präzisere prognostische Werkzeuge, die über die klassische Histopathologie hinausgehen, hoch.

5.6.2.1 *Stratifizierung und prognostischer Wert*

Die Analyse in dieser Niedrigrisiko-Kohorte (IA-IIA, n=104) zeigte die Fähigkeit der 7-Biomarker-Signatur, eine prognostische Differenzierung vorzunehmen. Für das rezidivfreie Überleben (RFS) zeigte sich eine statistisch signifikante Trennung der Kaplan-Meier-Kurven ($p=0,045$). Die visuelle Analyse der Kurven ist dabei aufschlussreich. Die Kurve der „Low-Risk“-Gruppe verlief nach einem initialen, minimalen Abfall als stabiles Plateau auf einem hohen Niveau mit einer 10-Jahres-RFS-Rate von 95%. Im Gegensatz dazu zeigte die Kurve der „High-Risk“-Gruppe einen stetigen Abfall, insbesondere innerhalb der ersten 5 Jahre, was zu einer 10-Jahres-RFS-Rate von nur 74% führt. Meyer et al. beobachteten in ihrer Untersuchungen von 2023 ähnliche Werte mit einem 5-Jahres Überleben beim DFS von 97,2% bei „Low-Risk“-Patienten und 84,4% bei „High-Risk“-Patienten. Beim MSS lagen die Werte für die „Low-Risk“-Gruppe bei 99,4% und die der „High-Risk“-Gruppe etwas niedriger mit 88,9% im Vergleich zur Mainzer Kohorte mit 95% (41). Dies quantifizierte ein verstecktes Risiko innerhalb dieser als prognostisch günstig eingestuften Gruppe. Dabei identifizierte die Signatur eine Subpopulation, deren Rezidivrisiko um mehr als das Fünffache erhöht war³. Für die härteren Endpunkte MSS und DMFS wurde in dieser Studie aufgrund der erwartungsgemäß geringen Patientenzahl sowie Ereigniszahl keine signifikante Trennung erreicht ($p=0,17$ bzw.

³ „Low-Risk“-Gruppe: 10-Jahres-RFS=95% beutetet ein Rezidiv-Risiko von 5%; „High-Risk“-Gruppe: 10-Jahres RFS=74% bedeutet ein Rezidiv-Risiko von 26%, also 5x höher

p=0,54). In einer Kohorte mit einer 10-Jahres-MSS-Rate von über 90 % wäre eine sehr hohe Fallzahl erforderlich, um statistische Signifikanz für diesen Endpunkt zu erzielen. Der Endpunkt RFS ist in dieser Population jedoch klinisch relevant, da dies die Nachsorgestrategie und das weitere klinische Vorgehen unmittelbar beeinflusst.

5.6.2.2 Prognostischer Mehrwert im Vergleich zu den etablierten histopathologischen Risikofaktoren

Der Mehrwert einer molekularen Testung wurde in dieser spezifischen klinischen Situation durch die multivariate Cox-Analyse gezeigt. Nach Adjustierung für alle etablierten Parameter erwiesen sich die 7-Biomarker-Signatur (HR=4,90; p=0,0414) und das Patientenalter als die einzigen unabhängigen Prädiktoren für ein Krankheitsrezidiv. Bemerkenswerterweise verlor die Tumordicke nach Breslow, der dominante Faktor in den Untersuchungen zur Gesamtkohorte, in dieser Subgruppe vollständig ihre unabhängige prognostische Aussagekraft. Dies lässt vermuten, dass bei dünnen Melanomen, die in den Stadien IA-IIA dominieren, die geringen absoluten Dickenunterschiede die zugrundeliegende biologische Aggressivität nur noch unzureichend widerspiegeln. Die molekulare Signatur hingegen schien hier eine trennschärfere Prognose für das wahre Metastasierungspotenzial und somit neue und ergänzende, prognostische Informationen zu liefern, genau in dem Bereich, in dem die etablierten Kriterien nicht mehr ausreichend differenzieren (134).

Die AUC wies für das MSS nach 5-Jahren sowohl für das Referenzmodell als auch für das Signaturmodell niedrige Werte von 55,2% bis 56,8% aus. Dies ist zu erwarten, da in dieser Patientengruppe ein melanomspezifisches Versterben nach so kurzer Zeit eher unwahrscheinlich ist. Nach 10 Jahren sah dies jedoch schon etwas anders aus. Während das Referenzmodell eine mäßige AUC von 66,5% zeigt, konnte die Signatur diesen Wert um 14,1 Prozentpunkte auf 80,6% erhöhen, was einen deutlichen Mehrwert der Signatur zeigte. Dieser Effekt bestätigte sich ebenfalls für die AUC des RFS mit einem Wert von 84,9% für die Signatur, die hier einen Mehrwert von 8 Prozentpunkten im Vergleich zum Referenzmodell zeigte.

5.6.2.3 Diagnostische Güte des Tests

Ein klinischer Nutzen der Signatur in dieser Niedrigrisiko-Gruppe zeigte die Spezifität im Bereich von 40% für alle drei Endpunkte. Der PPV war mit dem höchsten Wert von 18,8% beim RFS eher als moderat zu betrachten. Der negativ prädiktive Wert war jedoch auch hier wieder hoch mit 95,0 % für das RFS. Er könnte es erlauben, einer Mehrheit der Patienten in diesen frühen Stadien mit einem „Low-Risk“-Ergebnis eine fundierte und beruhigende Prognose zu geben und somit die Angst betroffener

Patienten zu reduzieren. Der Test identifizierte eine Risikogruppe, in der die Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs im Vergleich zur Basisrate der Gesamtkohorte deutlich erhöht war. Diese stratifizierte „High-Risk“-Population stellt eine interessante Zielgruppe für eine intensiverte bildgebende Überwachung oder für die Rekrutierung in klinische Studien dar, die den Nutzen adjuvanter Therapien in dieser intermediären Risikogruppe zukünftig untersuchen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die 7-Biomarker-Signatur immunoprint® ein valides Werkzeug ist, um die heterogene Prognose innerhalb der AJCC-Stadien IA-IIA weiter zu stratifizieren. Sie identifizierte als unabhängiger prognostischer Faktor eine Subgruppe von Patienten mit erhöhtem Rezidivrisiko und bot durch ihren hohen NPV eine verstärkte Sicherheit bei der Identifikation von Patienten mit guter Prognose.

5.6.3 Patienten der Stadien IB-IIA (n=81)

Patienten mit Melanomen der Stadien IB und IIA repräsentieren innerhalb der zuvor analysierten Gruppe der Stadien IA-IIA eine intermediäre Risikogruppe, die für das klinische Management eine besondere Herausforderung darstellt. Während ihr Rezidivrisiko signifikant höher ist als das von Stadium IA-Patienten, ist es nicht so hoch wie das von Stadium III-Patienten, für die adjuvante Therapien fest etabliert sind. Nach der Zulassung von adjuvanten Therapien im Stadium IIB und IIC, steht diese Population nun im Fokus der Diskussion für einen adjuvanten Therapieansatz. Allerdings ist gerade hier ein prognostischer Marker höchst relevant, um innerhalb dieser heterogenen Gruppe eine zuverlässige Risikostratifizierung zu ermöglichen

5.6.3.1 Stratifizierung und prognostischer Wert

Die Kaplan-Meier-Analysen in der Subgruppe von 81 Patienten der Stadien IB-IIA lieferten ein interessantes Ergebnis. Insbesondere für die Endpunkte des melanomspezifischen aber auch für des rezidivfreien und fernmetastasenfreien Überlebens zeigte sich eine sehr gute Separation der Risikogruppen. In der als „Low-Risk“ eingestuften Gruppe (n=26) trat beim MSS über den gesamten Beobachtungszeitraum von über 10 Jahren kein einziges Ereignis auf. Alle melanomspezifischen Todesfälle und alle Fernmetastasen ereigneten sich ausschließlich in der „High-Risk“ Gruppe (n=55). Auch für das rezidivfreie Überleben (RFS) war ein starker Trend zur Trennung der Kurven zu beobachten ($p=0,065$), wobei die „Low-Risk“-Gruppe mit einer 10-Jahres-RFS-Rate von 96% eine exzellente Prognose aufwies, verglichen mit 72% in der „High-Risk“-Gruppe. Auch hier zeigten Meyer et al. vergleichbare Werte mit einem 5-Jahres Überleben beim DFS von 95,7% bei „Low-Risk“-Patienten und 78,7% bei „High-Risk“-Patienten. Ähnliche Werte zeigte auch die Analyse von Amaral et al. mit 100% im Vergleich zu 79% bei dem 5-Jahres-RFS der „Low-“ und „High-Risk“-Gruppen (132). Beim MSS waren die Werte für die „Low-Risk“-Gruppe bei 100% und die der „High-Risk“-Gruppe niedriger mit 86,2% im Vergleich zur Mainzer Kohorte mit 94% (41). Die höheren Werte der Mainzer Kohorte beim 5-Jahres-MSS lagen vermutlich jeweils darin begründet, dass es für einige Patienten, die bekannterweise am Melanom verstarben, keine ausreichenden Informationen von Nachsorgeuntersuchungen bis zu ihrem Tod gab. Die geringen absoluten Ereigniszahlen mit jeweils 6 Events führten trotz der guten Stratifizierung für MSS und DMFS zu keiner statistischen Signifikanz.

5.6.3.2 Prognostischer Mehrwert im Vergleich zu den etablierten histopathologischen Risikofaktoren

In der multivariaten Cox-Analyse für das RFS behielt das Alter seine Signifikanz als unabhängiger Prädiktor. Die 7-Biomarker-Signatur zeigte mit einer Hazard Ratio von 6,36 einen sehr starken, aber statistisch nicht signifikanten Trend ($p=0,0782$). Dieses Ergebnis ist vermutlich auf eine Limitation durch die geringe Fall- und Ereigniszahl zurückzuführen. Eine Hazard Ratio dieser Größenordnung deutet auf einen starken klinischen Effekt hin, der in einer größeren Kohorte wahrscheinlich statistische Signifikanz erreichen würde. So konnten Amaral et al. für Patienten der Stadien IB und IIA ($n=382$) in einer multivariaten Analyse die 7-Biomarker-Signatur neben der Breslow Dicke und dem Alter als signifikante unabhängige prognostische Faktoren ermitteln (132).

Bei den ROC-Analysen zeigte sich ein ähnliches Bild wie bei den Patienten der Stadien IA bis IIA. So war auch hier AUC für das 5-Jahres-MSS wie erwartet eher gering, wobei die Signatur hier einen Mehrwert von 4,4 Prozentpunkten zeigte. Beim 10-Jahres-MSS sowie bei den Werten für das RFS lag der jeweilige Mehrwert um bemerkenswerte 10 Prozentpunkten. Beim 10-Jahres-MSS erreichte die AUC damit 77,2% und bei dem 10-Jahres-RFS sogar einen besonders hohen Wert mit 85,4%. Dies zeigte einen konstanten Mehrwert der Signatur als Ergänzung zu den klassischen klinisch/pathologischen Parametern.

5.6.3.3 Diagnostische Güte des Tests

Die klinische Anwendung der Signatur in dieser Patientengruppe offenbarte eine duale Nützlichkeit, die sich aus der Analyse der Leistungskennzahlen ergibt.

Die klinische Stärke der Signatur lag hier in ihrem sehr guten NPV von 100 % für MSS und 96,2 % für RFS. Noch höhere Werte von jeweils 100% wiesen Reschke et al. in der Subgruppenanalyse ihrer Studie aus 2021 nach (40). Auch die Analysen von Amaral et al. zeigten für das RFS einen hohen NPV von 99% sowie eine Sensitivität von 98% (132). Ein „Low-Risk“-Ergebnis könnte erlauben, jene Patienten mit hoher Sicherheit als jemanden mit exzellenter Prognose einzustufen. Dies könnte eine fundierte Grundlage dafür sein, auf eine intensivisierte Nachsorge zu verzichten oder den Patienten im Kontext einer Studie einem Beobachtungsarm zuzuordnen und ihm so die potenziellen Toxizitäten einer adjuvanten Therapie zu ersparen, also als ein Rule-out-Werkzeug fungieren.

Der positive prädiktive Wert war in der Kohorte für das RFS mit 20,0% moderat und für das MSS und DMFS um die 10% eher gering. Auch hier konnten höhere Werte von

Reschke et al. mit 21,1% für das MSS und 47,4% für das RFS gezeigt werden (40). Etwas höhere Werte wurden von Amaral et al. mit einem PPV von 26% für das RFS berichtet (132). Das bedeutet, dass nicht jeder Patient mit einem „High-Risk“ Ergebnis der Signatur zwangsläufig ein Rezidiv erleidet. Die klinische Bedeutung des PPV liegt jedoch nicht nur in einer reinen Vorhersage eines tatsächlich stattfindenden Events, sondern auch in der Erhöhung des individuellen Risikos. Die Rezidivrate in der „Low-Risk“-Gruppe lag bei nur ca. 4 % (1 von 26 Patienten). Ein „High-Risk“-Ergebnis restratifiziert dagegen einen Patienten von diesem niedrigen Risiko in eine Gruppe mit einem deutlich höheren Rezidivrisiko von 20 % (11 von 55 Patienten), was einer Verfünffachung des Risikos entspricht. Diese potenzielle „High-Risk“-Population ist deswegen die eigentliche Zielgruppe für klinische Studien zu adjuvanten Therapien. Die Behandlung dieser selektierten Gruppe verbessert das Nutzen-Risiko-Verhältnis einer potenziell nebenwirkungsreichen Therapie, da die "Number Needed to Treat" zur Verhinderung eines Rezidivs durch die Untersuchung mit der Signatur sinkt. Sie kann also als "Rule-in"-Werkzeug angewendet werden, indem sie die Patienten identifiziert, bei denen der potenzielle Nutzen einer Therapieeskalation am größten ist.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die 7-Biomarker-Signatur innerhalb der Stadien IB-IIA eine außerordentlich präzise und klinisch relevante Risikostratifizierung ermöglichte und eine duale Nützlichkeit lieferte. Sie könnte durch die Anreicherung von Risikoereignissen in der „High-Risk“-Gruppe die rationale Grundlage für eine Therapieeskalation im Rahmen von klinischen Studien schaffen.

5.6.4 Patienten im Stadium III (n=32)

Patienten im Stadium III des kutanen Melanoms gelten per Definition als Hochrisikopopulation, für die eine adjuvante Systemtherapie zugelassen ist. Sie steht betroffenen Patienten zur Verfügung und stellt den Behandlungsstandard dar. Dennoch ist die Prognose innerhalb dieser Gruppe außerordentlich heterogen, mit 5-Jahres-Überlebensraten, die von über 90 % im Stadium IIIA bis unter 35 % im Stadium IIID reichen (51). Gerade bei den dünnen pT1-2a Melanomen im Stadium IIIA werden zusätzlich pathologische Parameter wie die Größe der Sentinelmetastase zur weiteren Risikobewertung herangezogen. Auch die 7-Biomarker-Signatur könnte hier eine präzise, individuelle Risikobewertung über das rein pathologische Staging hinaus ermöglichen.

5.6.4.1 Stratifizierung und prognostischer Wert

Die Kaplan-Meier-Analysen in der Stadium-III-Kohorte (n=32) zeigten eine sehr deutliche und signifikante Aufteilung der Patienten in eine „High-Risk“- und eine „Low-Risk“-Gruppe. Für das rezidivfreie Überleben (RFS) zeigte die Trennung der Kurven einen p-Wert von $p=0,01$ mit einem interessanten Ergebnis. In der als „Low-Risk“ eingestufte Gruppe (n=8) wurden keine RFS-Ereignisse beobachtet (5- und 10-Jahres-RFS-Rate von 100%). Im scharfen Kontrast dazu stand die „High-Risk“ Gruppe (n=24), in der die RFS-Rate nach 10 Jahren auf 26% abfiel.

Ebenfalls deutlich, wenn auch aufgrund der geringen Fallzahl ohne formale statistische Signifikanz, war das Bild für die Endpunkte MSS ($p=0,12$) und DMFS ($p=0,077$). Auch hier trat in der „Low-Risk“-Gruppe kein einziges Ereignis auf. Alle melanomspezifischen Todesfälle und Fernmetastasen waren ausschließlich in der „High-Risk“-Gruppe zu finden. Dieses Ergebnis ist von klinischer Relevanz. Es legt nahe, dass die Signatur in der Lage ist, auch innerhalb einer Hochrisikopopulation eine Subgruppe von Patienten zu identifizieren, deren Prognose unerwartet gut ist.

In der LR-Gruppe waren 6 IIIA Patienten (75%) zu finden. Zwei weitere waren jeweils mit einem Patienten in Stadium IIIB sowie IIIC vertreten. Dies könnte darauf hindeuten, dass gerade im Stadium IIIA eine Stratifizierung auch ohne genauere Angaben zur Sentinelmetastasengröße mit Hilfe der 7-Biomarker-Signatur möglich ist.

5.6.4.2 Prognostischer Mehrwert im Vergleich zu den etablierten histopathologischen Risikofaktoren

Die multivariate Cox-Analyse bestätigte eine unabhängige prognostische Aussagekraft der Signatur in dieser Hochrisikokohorte. Sowohl für das RFS (HR=5,16; $p=0,0117$) als auch für das MSS (HR=8,56; $p=0,0293$) erwies sich die 7-Biomarker-

Signatur als signifikanter, unabhängiger Prädiktor, während etablierte Parameter wie die Tumordicke ihre Signifikanz verloren. Dass trotz einer kleiner Kohortengröße diese p-Werte berechnet werden konnten, lässt sich vermutlich mit der hohen Zahl an Ereignissen (15 RFS-, 8 MSS-Ereignisse) dieser Gruppe erklären. Es unterstreicht, dass die immunhistochemische Untersuchung der 7-Biomarker eine zusätzliche, von der Anatomie unabhängige Information über die Tumorbilogie liefern kann.

Die ROC-Analysen zeigten für das 5-Jahres-MSS einen Mehrwert von 4,3 Prozentpunkten, während die AUC des 10-Jahres MSS für die Signatur überraschenderweise 6,6 Prozentpunkte unter der des Referenzmodells lag. Dieser umgekehrte Effekt ist vermutlich auch hier auf die geringen Patienten- und Ereigniszahlen zurückzuführen. Während der Mehrwert im 5-Jahres-Überleben für das RFS moderate 3,1 Prozentpunkte betrug, zeigte die Signatur nach 10 Jahren ein Mehrwert von 12,6 Prozentpunkten und erreichte eine AUC von 83,3%.

5.6.4.3 Diagnostische Güte des Tests

Die klinische Bedeutung wurde durch die Leistungskennzahlen bestätigt. Der negative prädiktive Wert betrug für alle drei Endpunkte (MSS, DMFS, RFS) 100%. Die gleichen Werte wurden auch von Reschke et al. ermittelt (40). Ein „Low-Risk“-Ergebnis schloss in dieser Kohorte ein späteres Krankheitsereignis vollständig aus, was potenziell neue Perspektiven für das Management von Stadium-III-Patienten liefert. Insbesondere für Patienten mit einem „Low-Risk“-Profil im Stadium IIIA könnte zukünftig eine Deeskalation der adjuvanten Therapie oder sogar eine aktive Überwachungsstrategie eine valide Option darstellen. Dieser Ansatz müsste jedoch im Rahmen von Studien überprüft werden. Gleichzeitig bestätigt der Test mit einem PPV von 62,5% für das RFS eine Hochrisikogruppe, für die der Einsatz der bereits bestehenden adjuvanten Therapien eine Bestätigung findet. Reschke et al. fanden in ihrer Kohorte mit 19 Patienten im Stadium III einen noch höheren PPV-Wert mit 86,7% (40).

Zusammenfassend zeigt diese Analyse, dass die 7-Biomarker-Signatur immunoprint® auch in der als Hochrisiko definierten Stadium-III-Population ein ergänzendes Stratifizierungs-Werkzeug darstellen könnte.

5.7 Limitationen der Studie

Trotz der sorgfältigen Planung und Durchführung weist diese Arbeit studiendesign-immanente Limitationen auf, die bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden müssen.

Eine Limitation stellte das retrospektive Design dar. Die Datenerhebung erfolgte rückblickend über einen langen Zeitraum (2006-2015), was mit dem Risiko fehlender oder unvollständiger Daten verbunden ist. Dies zeigte sich beispielsweise an der hohen Anzahl von Fällen, bei denen der Mitoseindex nicht dokumentiert war. Der Mitoseindex ist jedoch ein Parameter, dessen prognostische Relevanz bekannt ist, aber auch in der 8. AJCC-Edition an Bedeutung für das Staging verloren hat. Obwohl viele Anstrengungen unternommen wurden, die Daten durch interne Recherche und postalische Nachbefragung zu komplettieren, kann ein gewisser Informationsverlust nicht ausgeschlossen werden.

Zweitens können die Ergebnisse eines einzelnen Zentrums durch lokale Patienten- und Behandlungscharakteristika beeinflusst sein, was die Generalisierbarkeit potenziell einschränkt.

Drittens muss eine potenzielle Selektionsverzerrung bei der Erstellung der Biomarkerkohorte diskutiert werden. Die Aufnahme in diese Subgruppe war von der Verfügbarkeit von archiviertem Primärtumorgewebe abhängig. Obwohl der interne Vergleich zeigte, dass die Biomarkerkohorte klinisch-pathologisch recht repräsentativ für die Gesamtkohorte war, ist es theoretisch möglich, dass systematische Unterschiede zwischen Patienten mit und ohne verfügbares Gewebe zum Beispiel durch unterschiedliche Archivierungszeiträume externer Pathologien bestanden.

Viertens ist die statistische Aussagekraft insbesondere für die Subgruppenanalysen durch die teilweise geringen Fall- und Ereigniszahlen limitiert. Dies wurde vor allem in den Analysen der Stadien IB bis IIA, aber auch der Stadium-III-Kohorte deutlich. Dies liegt nicht unbedingt an dem Fehlen eines Effekts, sondern kann eine direkte Folge der limitierten statistischen Power sein. Für prognostische Biomarkeranalysen werden in der Literatur Eventzahlen zwischen 69 und 100 als Minimum diskutiert (135,136). Die hier gezeigten Ergebnisse (mit einer RFS-Eventzahl von 43 bei der Biomarkerkohorte) reihen sich in bisher bekannten und vielversprechenden

Untersuchungen ein, müssten aber in kombinierten Analysen mit Ergebnissen anderen Kohorten oder weiter in größeren, multizentrischen Kohorten validiert werden.

5.8 Schlussfolgerung und Ausblick

5.8.1 Schlussfolgerung

Diese Arbeit validierte die prognostische Aussagekraft etablierter klinisch-pathologischer Parameter in einer repräsentativen, deutschen universitären Kohorte und demonstrierte die klinischen Konsequenzen der Reklassifizierung nach der 8. Edition des AJCC. Gleichzeitig wurden die Limitationen dieser rein morphologischen Risikobewertung deutlich, die den Bedarf an zusätzlichen molekularen Werkzeugen zur präziseren Stratifizierung unterstreichen.

Als zentrales Ergebnis dieser Dissertation wurde die 7-Biomarker-Signatur immunoprint® als valider und unabhängiger prognostischer Faktor für das kutane Melanom bestätigt. Eine Stärke der Signatur bei der Vorhersage des rezidivfreien Überlebens konnte in dieser Kohorte durch Kaplan-Meier- sowie einer multivariaten Cox-Analyse bestätigt werden.

Die Signatur kann als Rule-in-Werkzeug angewendet werden, indem sie durch einen moderaten, aber klinisch relevanten positiven prädiktiven Wert Subgruppen anzeigt, die ein signifikant erhöhtes Rezidivrisiko aufweisen. Diese versteckten Hochrisikopatienten in den frühen Stadien, stellen eine Zielpopulation für die Evaluation neuer adjuvanter Therapieansätze dar. Die 7-Biomarker-Signatur könnte dabei eine Ergänzung zur etablierten AJCC-Klassifikation sein und somit die personalisierte Risikostratifizierung und das klinische Management von Melanompatienten maßgeblich verbessern.

Eine klinisch wertvolle Eigenschaft zeigte sich in einem hohen negativen prädiktiven Wert, der über alle untersuchten Stadien bzw. Subgruppen hinweg konsistent ist. Dies macht die Signatur interessant als Rule-out-Instrument, da diese mit hoher Sicherheit Patienten mit einer guten Prognose bzw. ohne einen Rückfall identifiziert. Diese Fähigkeit kann auch von besonderer klinischer Relevanz in der Hochrisikogruppe des Stadiums III sein, wo ein „Low-Risk“-Ergebnis eine fundierte Grundlage für eine potenzielle Deeskalation der Therapie oder Nachsorge im Rahmen klinischer Studien bieten könnte.

5.8.2 Ausblick

Ein wichtiger nächster Schritt ist eine weitere multizentrische Validierung bzw. eine kombinierte Analyse monozentrischer Daten einschließlich der Ergebnisse der hier

untersuchten Kohorte, um signifikante Ergebnisse auch bei den Endpunkten MSS bzw. DMFS zu generieren bzw. zu bestätigen.

Ebenso sollten weitere prospektive Validierungen der immunoprint®-Biomarker-Signatur in den frühen Stadien IB bis IIA sowie I bis IIA erfolgen. Nur eine prospektive Studie, die auch als adjuvante Therapiestudie angelegt sein könnte, kann die hier gezeigten Ergebnisse unter realen klinischen Bedingungen bestätigen, potenzielle Verzerrungen durch eine Analyse einzelner Stadien eliminieren und eine definitive Evidenz für eine mögliche Implementierung in klinische Praxis liefern.

Auch der Einsatz im Stadium IIIA könnte zusammen mit bisher untersuchten Parametern wie die Metastasengröße im Sentinellymphknoten eine verbesserte Risikostratifizierung ermöglichen.

Aufgrund des Bedarfes an neuen Instrumenten zur Risikostratifizierung wurden auch neue Nomogramme für den Einsatz bei Sentinel-negativen bzw. -positiven Patienten entwickelt (137–139). Ein kombinierter Einsatz dieser an großen Kohorten entwickelten Nomogramme mit der immunoprint®-Biomarker-Signatur könnte eine Stratifizierung weiter präzisieren.

Für eine Implementierung in die klinische Routine sollte der Nutzen des Tests auch ökonomisch bewertet werden. Zukünftige Studien sollten die Kosteneffektivität der immunoprint®-Testung untersuchen, indem sie die Kosten des Tests gegen die potenziellen Vorteile eines verbesserten Patienten-Outcomes durch eine risikoadaptierte Therapie bei „High-Risk“-Patienten aufwiegen. Ebenso sollten auch Einsparungen durch eine deeskalierte Nachsorge bei „Low-Risk“-Patienten systematisch analysiert werden.

Die Fortführung der Forschung in diesen Bereichen hat das Potenzial, die personalisierte Medizin für Patienten mit malignem Melanom voranzubringen und die Behandlung noch präziser auf das individuelle Risiko zuzuschneiden.

6 Zusammenfassung

Das maligne Melanom ist eine Tumorerkrankung mit stetig steigender Inzidenz, die durch frühe Metastasierung teilweise eine hohe Mortalität aufweist. Die Prognose und Therapieentscheidung basieren auf der aktuellen TNM-Klassifikation des AJCC, die jedoch in ihrer Vorhersagegenauigkeit weiterhin Limitationen aufweist. Insbesondere bei Patienten in frühen Tumorstadien sowie mit sentinel-negativem Befund, von denen dennoch ca. 13 % einen Progress erleiden, besteht ein Bedarf an präziseren Risikostratifizierungsmethoden, um eine Über- oder Untertherapie zu vermeiden (117). Diese Arbeit untersucht etablierte klinisch-pathologische Parameter und evaluiert den prognostischen Mehrwert der immunhistochemischen 7-Biomarker-Signatur immunoprint® zur verbesserten Risikobewertung.

In dieser retrospektiven, monozentrischen Observationsstudie wurde eine Gesamtkohorte von 393 Patienten analysiert, die zwischen 2006 und 2015 an der Hautklinik der Universitätsmedizin Mainz nach einer pathologisch bestätigten Melanomdiagnose eine Sentinellymphknoten-Biopsie erhielten. Die Tumordaten bei Erstdiagnose sowie die Follow-up-Daten wurden erhoben und die Patienten nach der 8. Edition des AJCC Staging Manuals reklassifiziert.

Aus dieser Gesamtkohorte wurde eine Biomarkerkohorte von 157 Patienten gebildet, bei denen am Primärtumorgewebe mittels der immunhistochemischen 7-Biomarker-Signatur immunoprint® ein Risikoscores bestimmt werden konnte, der das Patientenkollektiv dieser Biomarkerkohorte in High- und „Low-Risk“-Gruppen stratifizierte. Die untersuchten Endpunkte waren das melanomspezifische Überleben, das fernmetastasenfreie Überleben und das rezidivfreie Überleben. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kaplan-Meier-Analysen, univariater und multivariater Cox-Regressions-Analysen sowie ROC-Analysen. Eine logistische Regressionsanalyse wurde zur Untersuchung der klinisch/ pathologischen Parameter für die Vorhersage eines positiven Sentinel durchgeführt.

In der Gesamtkohorte bestätigten sich Tumordicke, Ulzeration und der SLN-Status als starke, unabhängige Prädiktoren für das Überleben. Die logistische Regressionsanalyse zur Vorhersage eines positiven SLN-Status zeigte in der multivariaten Analyse allein die Ulzeration als signifikanten, unabhängigen Faktor.

In der Biomarkerkohorte konnte die 7-Biomarker-Signatur immunoprint® die Patienten signifikant in zwei prognostisch unterschiedliche Gruppen („High- und „Low-Risk“)

stratifizieren. Dieser Effekt war insbesondere für das RFS ($p=0,00043$) erkennbar. So betrug die 10-Jahres-RFS-Rate für „Low-Risk“-Patienten 92%, für „High-Risk“-Patienten jedoch nur 54%. In der multivariaten Analyse erwies sich die Signatur neben der Tumordicke und dem Alter als starker, unabhängiger Prädiktor für das RFS ($HR=3,904$; $p=0,0144$).

In klinisch relevanten Subgruppen der Biomarkerkohorte wurden folgende Ergebnisse beobachtet.

Bei Patienten der Stadien IA bis IIA ($n=104$), die gemäß AJCC als „Low-Risk“ eingestuft werden und für die derzeit keine adjuvante Therapieoption besteht, identifizierte die Signatur als einziger Faktor neben dem Alter signifikant Individuen mit erhöhtem Rezidivrisiko ($HR=4,90$; $p=0,0414$). Die 5-Jahres- bzw. 10-Jahres RFS-Rate betrugen jeweils 95% für „Low-Risk“- und 86% bzw. 74% für „High-Risk“-Patienten.

Die Analyse der Patientengruppe mit den Stadien IB-IIA ($n=81$), die derzeit als Schwellengruppe für adjuvante Studien diskutiert wird, zeigte ähnliche 5-Jahres bzw. 10-Jahres-RFS-Raten von jeweils 96% für die „Low-Risk“-Gruppe und 85% bzw. 72% für die „High-Risk“-Gruppe. Weiterhin traten alle MSS- und DMFS-Ereignisse ausschließlich in der „High-Risk“-Gruppe auf.

Auch in der Hochrisikogruppe des Stadiums III ($n=32$) konnte die Signatur eine Subgruppe mit exzellenter Prognose identifizieren (100% 5-Jahres- bzw. 10-Jahres-RFS in der „Low-Risk“-Gruppe vs. 49% nach 5 Jahren und 26% nach 10 Jahren in der „High-Risk“-Gruppe, $p=0,01$). Die Signatur zeigte zudem über alle Analysen hinweg einen hohen negativen prädiktiven Wert (NPV), der für das RFS in der Stadium-III-Kohorte 100% erreichte.

Die vorliegende Arbeit validiert die etablierten klinisch-pathologischen Prognosefaktoren beim malignen Melanom. Darüber hinaus wird gezeigt, dass die 7-Biomarker-Signatur immunoprint® in der untersuchten Kohorte einen signifikanten, unabhängigen prognostischen Mehrwert liefert, insbesondere bei der Vorhersage des rezidivfreien Überlebens.

Die 7-Biomarker-Signatur stellt somit ein interessantes und vielversprechendes Werkzeug für eine personalisierte Risikostratifizierung und die künftige Therapieplanung beim malignen Melanom dar.

7 Literaturverzeichnis

1. Robert Koch-Institut. Krebs in Deutschland für 2019/2020. 2023 [cited 2024 Feb 17];14. Available from: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/krebs_in_deutschland_2023.pdf?__blob=publicationFile
2. Garbe C. Risikofaktoren für die Entwicklung maligner Melanome und Identifikation von Risikopersonen im deutschsprachigen Raum. *Der Hautarzt* [Internet]. 1995;46(5):309–14. Available from: <https://doi.org/10.1007/s001050050257>
3. Sondak VK, Messina JL. Prediction is Difficult, Especially About the Future: Clinical Prognostic Tools in Melanoma. *Ann Surg Oncol* [Internet]. 2016;23(9):2730–2. Available from: <https://doi.org/10.1245/s10434-016-5213-4>
4. Gershenwald JE, Scolyer RA. Melanoma Staging: American Joint Committee on Cancer (AJCC) 8th Edition and Beyond. *Ann Surg Oncol* [Internet]. 2018;25(8):2105–10. Available from: <https://doi.org/10.1245/s10434-018-6513-7>
5. Leitlinienprogramm Onkologie. S3-Leitlinie zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms. 2020.
6. Faries MB, Han D, Reintgen M, Kerivan L, Reintgen D, Caracò C. Lymph node metastasis in melanoma: a debate on the significance of nodal metastases, conditional survival analysis and clinical trials. *Clin Exp Metastasis*. 2018 Aug 1;35(5–6):431–42.
7. Landow SM, Gjelsvik A, Weinstock MA. Mortality burden and prognosis of thin melanomas overall and by subcategory of thickness, SEER registry data, 1992–2013. *J Am Acad Dermatol*. 2017 Feb 1;76(2):258–63.
8. Meyer S, Fuchs TJ, Bosserhoff AK, Hofstädter F, Pauer A, Roth V, et al. A Seven-Marker Signature and Clinical Outcome in Malignant Melanoma: A Large-Scale Tissue-Microarray Study with Two Independent Patient Cohorts. *PLoS One* [Internet]. 2012 Jun 7;7(6):e38222. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038222>
9. Centeno PP, Pavet V, Marais R. The journey from melanocytes to melanoma. *Nature Reviews Cancer* 2023 23:6 [Internet]. 2023 Apr 24 [cited 2025 Mar 5];23(6):372–90. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41568-023-00565-7>
10. Heistein JB, Acharya U, Mukkamalla SKR. Malignant Melanoma. *StatPearls* [Internet]. 2024 Feb 17 [cited 2025 Mar 5]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470409/>
11. Leiter U, Meier F, Schitteck B, Garbe C. The natural course of cutaneous melanoma. *J Surg Oncol* [Internet]. 2004 Jul 1 [cited 2025 Mar 5];86(4):172–8. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jso.20079>
12. Cerroni L, Garbe C, Metze D, Kutzner H, Kerl H. *Histopathologie der Haut*. Springer Berlin Heidelberg; 2015.
13. Robert C, Schachter J, Long G V., Arance A, Grob JJ, Mortier L, et al. Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 2015 Jun 25 [cited 2025 Mar 6];372(26):2521–32. Available from: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa1503093>
14. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Cowey CL, Lao CD, et al. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 2015 Jul 2 [cited 2025 Mar 6];373(1):23–34. Available from: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa1504030>

15. Arnold M, Singh D, Laversanne M, Vignat J, Vaccarella S, Meheus F, et al. Global Burden of Cutaneous Melanoma in 2020 and Projections to 2040. *JAMA Dermatol* [Internet]. 2022 May 1 [cited 2024 Mar 2];158(5):495–503. Available from: <https://jamanetwork.com/journals/jamadermatology/fullarticle/2790344>
16. Lopes J, Rodrigues CMP, Gaspar MM, Reis CP. Melanoma management: from epidemiology to treatment and latest advances. *Cancers (Basel)*. 2022;14(19):4652.
17. Ferlay J, Ervik M, Lam F, Laversanne M, Colombet M, Mery L, et al. Cancer Today. 2024. Global distribution of age-standardized incidence rates (World) for melanoma of the skin in 2022, both sexes. Available from: <https://gco.iarc.who.int/today>
18. Leiter U, Eigentler T, Garbe C. Epidemiology of skin cancer. *Adv Exp Med Biol* [Internet]. 2014 [cited 2024 Mar 8];810:120–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25207363/>
19. Volkenandt M. Maligne Melanome in Dermatologie und Venerologie [Internet]. Springer; 2005. 1313–1324 p. Available from: <https://www.springer.com/de/book/9783540266242>
20. Saginala K, Barsouk A, Aluru JS, Rawla P, Barsouk A. Epidemiology of Melanoma. Vol. 9, Medical sciences (Basel, Switzerland). NLM (Medline); 2021.
21. Bataille V, Tsao H, Raimondi S, Gandini S. Clinical Genetics and Risk Assessment of Melanoma. In: *Cutaneous Melanoma*. Springer; 2020. p. 471–99.
22. Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Picconi O, Boyle P, et al. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. *Eur J Cancer*. 2005 Jan 1;41(1):45–60.
23. Elwood JM, Jopson J. Melanoma and sun exposure: An overview of published studies. *Int J Cancer* [Internet]. 1997;73(2):198–203. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/%28SICI%291097-0215%2819971009%2973%3A2%3C198%3A%3AAID-IJC6%3E3.0.CO%3B2-R>
24. Rastrelli M, Tropea S, Rossi CR, Alaibac M. Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification. *In Vivo (Brooklyn)*. 2014;28(6):1005–11.
25. Green A, Autier P, Boniol M, Boyle P, Doré JF, Gandini S, et al. The association of use of sunbeds with cutaneous malignant melanoma and other skin cancers: A systematic review. *Int J Cancer* [Internet]. 2007 Mar 1 [cited 2025 Mar 6];120(5):1116–22. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ijc.22453>
26. Titus-Ernstoff L, Perry AE, Spencer SK, Gibson JJ, Cole BF, Ernstoff MS. Pigmentary characteristics and moles in relation to melanoma risk. *Int J Cancer* [Internet]. 2005 Aug 10 [cited 2025 Mar 6];116(1):144–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15761869/>
27. Wunderlich K, Suppa M, Gandini S, Lipski J, White JM, Del Marmol V. Risk Factors and Innovations in Risk Assessment for Melanoma, Basal Cell Carcinoma, and Squamous Cell Carcinoma. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2024 Mar 1 [cited 2025 Mar 6];16(5):1016. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10931186/>
28. Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Abeni D, Boyle P, et al. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi. *Eur J Cancer*. 2005 Jan 1;41(1):28–44.
29. Hill VK, Gartner JJ, Samuels Y, Goldstein AM. The genetics of melanoma: Recent advances. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2013 Aug;14:257–79.

30. Marghoob AA, Slade J, Salopek TG, Kopf AW, Bart RS, Rigel DS. Basal cell and squamous cell carcinomas are important risk factors for cutaneous malignant melanoma. Screening implications. *Cancer*. 1995;75(2 S):707–14.
31. Rivera A, Nan H, Li T, Qureshi A, Cho E. Alcohol Intake and Risk of Incident Melanoma: A Pooled Analysis of Three Prospective Studies in the United States. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* [Internet]. 2016 Dec 1 [cited 2025 Mar 6];25(12):1550–8. Available from: <https://dx.doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-16-0303>
32. Bradford PT, Anderson WF, Purdue MP, Goldstein AM, Tucker MA. Rising Melanoma Incidence Rates of the Trunk among Younger Women in the United States. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* [Internet]. 2010 Sep 1 [cited 2025 Mar 6];19(9):2401–6. Available from: <https://dx.doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-10-0503>
33. American Cancer Society. What Is Melanoma Skin Cancer? About Melanoma Skin Cancer [Internet]. Atlanta; 2025 [cited 2025 Mar 6]. Available from: <https://www.cancer.org/cancer/types/melanoma-skin-cancer/about/key-statistics.html>
34. Bublak R. In-situ-Melanom: Weite Exzision ist nicht schlechter als Mohs-Chirurgie. *hautnah dermatologie* 2019 35:2 [Internet]. 2019 Mar 29 [cited 2024 Feb 18];35(2):20–20. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s15012-019-3023-7>
35. Gaudy-Marqueste C, Wazaefi Y, Bruneu Y, Triller R, Thomas L, Pellacani G, et al. Ugly Duckling Sign as a Major Factor of Efficiency in Melanoma Detection. *JAMA Dermatol* [Internet]. 2017 Apr 1;153(4):279–84. Available from: <https://doi.org/10.1001/jamadermatol.2016.5500>
36. Weyers W. Screening for malignant melanoma—a critical assessment in historical perspective. *Dermatol Pract Concept* [Internet]. 2018 Apr 30 [cited 2024 Feb 18];8(2):89. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34200680/>
37. Kittler H, Pehamberger H, Wolff K, Binder M. Diagnostic accuracy of dermoscopy. *Lancet Oncology* [Internet]. 2002 Mar 1 [cited 2024 Feb 18];3(3):159–65. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11902502/>
38. Vestergaard ME, Macaskill P, Holt PE, Menzies SW. Dermoscopy compared with naked eye examination for the diagnosis of primary melanoma: a meta-analysis of studies performed in a clinical setting. *Br J Dermatol* [Internet]. 2008 Sep [cited 2024 Feb 18];159(3):669–76. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18616769/>
39. Tran KT, Wright NA, Cockerell CJ. Biopsy of the pigmented lesion—When and how. *J Am Acad Dermatol* [Internet]. 2008 Nov 1 [cited 2024 Feb 18];59(5):852–71. Available from: <http://www.jaad.org/article/S0190962208006579/fulltext>
40. Reschke R, Gussek P, Ziemer M. Identifying High-Risk Tumors within AJCC Stage IB–III Melanomas Using a Seven-Marker Immunohistochemical Signature. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2021 Jun 2 [cited 2025 Aug 29];13(12). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34200680/>
41. Meyer S, Buser L, Haferkamp S, Berneburg M, Maisch T, Klinkhammer-Schalke M, et al. Identification of high-risk patients with a seven-biomarker prognostic signature for adjuvant treatment trial recruitment in American Joint Committee on Cancer v8 stage I–IIA cutaneous melanoma. *Eur J Cancer*. 2023 Mar 1;182:77–86.
42. Huang R, Yu J, Zhang B, Li X, Liu H, Wang Y. Emerging COX-2 inhibitors-based nanotherapeutics for cancer diagnosis and treatment. *Biomaterials* [Internet]. 2025 Apr 1 [cited 2025 Aug 29];315. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39549439/>
43. Gantner S. Etablierung eines Melanom Tissue Microarrays: Bio-marker in Korrelation mit klinischen Verlaufsdaten. Fakultät für Mediziner Universität Regensburg; 2014.

44. Wu H, Goel V, Haluska FG. PTEN signaling pathways in melanoma. *Oncogene* [Internet]. 2003 May 19 [cited 2025 Aug 29];22(20):3113–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12789288/>
45. Behrmann I, Wallner S, Komyod W, Heinrich PC, Schuierer M, Buettner R, et al. Characterization of methylthioadenosin phosphorylase (MTAP) expression in malignant melanoma. *Am J Pathol* [Internet]. 2003 Aug 1 [cited 2025 Aug 29];163(2):683–90. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12875987/>
46. Ziemer M, Weidenthaler-Barth B, Gussek P, Pfeiffer M, Kleemann J, Bankov K, et al. Analytical Validation of an Immunohistochemical 7-Biomarker Prognostic Assay (immunoprint®) for Early-Stage Cutaneous Melanoma in Archival Tissue of Patients with AJCC v8 T2–T3 Disease. *Diagnostics*. 2023 Oct 1;13(19).
47. Gershenwald JE, Scolyer RA, Hess KR, Sondak VK, Long G V., Ross MI, et al. Melanoma staging: Evidence-based changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2017 Nov [cited 2024 Feb 24];67(6):472–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29028110/>
48. Barreiro-Capurro A, Andrés-Lencina JJ, Podlipnik S, Carrera C, Requena C, Manrique-Silva E, et al. Differences in cutaneous melanoma survival between the 7th and 8th edition of the American Joint Committee on Cancer (AJCC). A multicentric population-based study. *Eur J Cancer*. 2021 Mar 1;145:29–37.
49. Nading MA, Balch CM, Sober AJ. Implications of the 2009 American Joint Committee on Cancer Melanoma Staging and Classification on dermatologists and their patients. *Semin Cutan Med Surg* [Internet]. 2010 Sep [cited 2025 Mar 9];29(3):142–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21051007/>
50. Gershenwald JE, Scolyer RA, Hess KR, Thompson JF, Long G V., Ross MI, et al. Melanoma of the skin. In: *AJCC cancer staging manual*. Springer Switzerland; 2017. p. 563–85.
51. Keung EZ, Gershenwald JE. The eighth edition American Joint Committee on Cancer (AJCC) melanoma staging system: implications for melanoma treatment and care. *Expert Rev Anticancer Ther* [Internet]. 2018 Aug 3 [cited 2024 Feb 24];18(8):775–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29923435/>
52. Margolin K, Ernstoff MS, Hamid O, Lawrence D, McDermott D, Puzanov I, et al. Ipilimumab in patients with melanoma and brain metastases: an open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol* [Internet]. 2012 May [cited 2025 Mar 9];13(5):459–65. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22456429/>
53. Goldberg SB, Gettinger SN, Mahajan A, Chiang AC, Herbst RS, Sznol M, et al. Pembrolizumab for patients with melanoma or non-small-cell lung cancer and untreated brain metastases: early analysis of a non-randomised, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol* [Internet]. 2016 Jul 1 [cited 2025 Mar 9];17(7):976–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27267608/>
54. Ge L, Vilain RE, Lo S, Aivazian K, Scolyer RA, Thompson JF. Breslow Thickness Measurements of Melanomas Around American Joint Committee on Cancer Staging Cut-Off Points: Imprecision and Terminal Digit Bias Have Important Implications for Staging and Patient Management. *Ann Surg Oncol* [Internet]. 2016 Aug 1 [cited 2025 Mar 9];23(8):2658–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27075324/>
55. Nagarajan P, Curry JL, Ning J, Piao J, Torres-Cabala CA, Aung PP, et al. Tumor Thickness and Mitotic Rate Robustly Predict Melanoma-Specific Survival in Patients with Primary Vulvar Melanoma: A Retrospective Review of 100 Cases. *Clin Cancer Res*

- [Internet]. 2017 Apr 15 [cited 2025 Mar 9];23(8):2093–104. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27864417/>
56. Busam KJ. The prognostic importance of tumor mitotic rate for patients with primary cutaneous melanoma. *Ann Surg Oncol* [Internet]. 2004 [cited 2025 Mar 9];11(4):360–1. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15070594/>
57. Nagore E, Oliver V, Botella-Estrada R, Moreno-Picot S, Insa A, Fortea JM. Prognostic factors in localized invasive cutaneous melanoma: high value of mitotic rate, vascular invasion and microscopic satellitosis. *Melanoma Res* [Internet]. 2005 Jun [cited 2025 Mar 9];15(3):169–77. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15917698/>
58. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, et al. Final Version of 2009 AJCC Melanoma Staging and Classification. *Journal of Clinical Oncology* [Internet]. 2009 Dec 20 [cited 2025 Mar 9];27(36):6199. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2793035/>
59. Brierley J.D., Gospodarowicz M.K., Wittekind C. TNM Classification of Malignant Tumours, 8th edition. Union for International Cancer Control [Internet]. 2017 [cited 2025 Mar 9];1–272. Available from: <https://download.e-bookshelf.de/download/0008/3525/21/L-G-0008352521-0035588965.pdf>
60. Garbe C, Keim U, Amaral T, Berking C, Eigentler TK, Lukas Flatz ;, et al. Prognosis of Patients With Primary Melanoma Stage I and II According to American Joint Committee on Cancer Version 8 Validated in Two Independent Cohorts: Implications for Adjuvant Treatment [Internet]. *J Clin Oncol*. 2022 [cited 2025 Dec 14]. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9649277/>
61. Sladden MJ, Balch C, Barzilai DA, Berg D, Freiman A, Handiside T, et al. Surgical excision margins for primary cutaneous melanoma. *Cochrane Database Syst Rev* [Internet]. 2009 Oct 7 [cited 2025 Mar 10];(4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19821334/>
62. Rule WG, Allred JB, Pockaj BA, Markovic SN, DiCaudo DJ, Erickson LA, et al. Results of NCCTG N0275 (Alliance) - a phase II trial evaluating resection followed by adjuvant radiation therapy for patients with desmoplastic melanoma. *Cancer Med* [Internet]. 2016 Aug 1 [cited 2025 Mar 10];5(8):1890–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27368067/>
63. Wasif N, Gray RJ, Pockaj BA. Desmoplastic melanoma - the step-child in the melanoma family? *J Surg Oncol* [Internet]. 2011 Feb [cited 2025 Mar 10];103(2):158–62. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21259250/>
64. Vongtama R, Safa A, Gallardo D, Calcaterra T, Juillard G. Efficacy of radiation therapy in the local control of desmoplastic malignant melanoma. *Head Neck* [Internet]. 2003 Jun 1 [cited 2025 Mar 10];25(6):423–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12784232/>
65. Foote MC, Burmeister B, Burmeister E, Bayley G, Smithers BM. Desmoplastic melanoma: the role of radiotherapy in improving local control. *ANZ J Surg* [Internet]. 2008 Apr [cited 2025 Mar 10];78(4):273–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18366400/>
66. Kunte C, Geimer T, Baumert J, Konz B, Volkenandt M, Flaig M, et al. Prognostic factors associated with sentinel lymph node positivity and effect of sentinel status on survival: an analysis of 1049 patients with cutaneous melanoma. *Melanoma Res* [Internet]. 2010 Aug [cited 2025 Mar 10];20(4):330–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20526218/>

67. Mays MP, Martin RCG, Burton A, Ginter B, Edwards MJ, Reintgen DS, et al. Should all patients with melanoma between 1 and 2 mm Breslow thickness undergo sentinel lymph node biopsy? *Cancer* [Internet]. 2010 Mar 15 [cited 2025 Mar 10];116(6):1535–44. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cncr.24895>
68. McMasters KM, Wong SL, Edwards MJ, Ross MI, Chao C, Noyes RD, et al. Factors that predict the presence of sentinel lymph node metastasis in patients with melanoma. *Surgery* [Internet]. 2001 [cited 2025 Mar 10];130(2):151–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11490343/>
69. Morton DL, Cochran AJ, Thompson JF, Elashoff R, Essner R, Glass EC, et al. Sentinel node biopsy for early-stage melanoma: accuracy and morbidity in MSLT-I, an international multicenter trial. *Ann Surg* [Internet]. 2005 Sep [cited 2025 Mar 10];242(3):302–13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16135917/>
70. Testori A, De Salvo GL, Montesco MC, Trifirò G, Mocellin S, Landi G, et al. Clinical considerations on sentinel node biopsy in melanoma from an Italian multicentric study on 1,313 patients (SOLISM-IMI). *Ann Surg Oncol* [Internet]. 2009 Jul [cited 2025 Mar 10];16(7):2018–27. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19132446/>
71. Valsecchi ME, Silberman D, De Rosa N, Wong SL, Lyman GH. Lymphatic mapping and sentinel lymph node biopsy in patients with melanoma: a meta-analysis. *J Clin Oncol* [Internet]. 2011 Apr 10 [cited 2025 Mar 10];29(11):1479–87. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21383281/>
72. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Ding S, Byrd DR, et al. Multivariate analysis of prognostic factors among 2,313 patients with stage III melanoma: comparison of nodal micrometastases versus macrometastases. *J Clin Oncol* [Internet]. 2010 May 10 [cited 2025 Mar 10];28(14):2452–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20368546/>
73. Cancer Council Australia. Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of melanoma [Internet]. 2021 [cited 2025 Mar 10]. Available from: <https://app.magicapp.org/#/guideline/Lkk3pL>
74. Weber J, Mandala M, Del Vecchio M, Gogas HJ, Arance AM, Cowey CL, et al. Adjuvant Nivolumab versus Ipilimumab in Resected Stage III or IV Melanoma. *N Engl J Med* [Internet]. 2017 Nov 9 [cited 2025 Mar 10];377(19):1824–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28891423/>
75. Eggermont AMM, Blank CU, Mandala M, Long GV., Atkinson V, Dalle S, et al. Adjuvant Pembrolizumab versus Placebo in Resected Stage III Melanoma. *N Engl J Med* [Internet]. 2018 May 10 [cited 2025 Mar 10];378(19):1789–801. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29658430/>
76. Spratt DE, Spratt EAG, Wu S, De Rosa A, Lee NY, Lacouture ME, et al. Efficacy of skin-directed therapy for cutaneous metastases from advanced cancer: a meta-analysis. *J Clin Oncol* [Internet]. 2014 Oct 1 [cited 2025 Mar 10];32(28):3144–55. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25154827/>
77. Mali B, Jarm T, Snoj M, Sersa G, Miklavcic D. Antitumor effectiveness of electrochemotherapy: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Surg Oncol* [Internet]. 2013 Jan [cited 2025 Mar 10];39(1):4–16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22980492/>
78. Byrne CM, Thompson JF, Johnston H, Hersey P, Quinn MJ, Hughes TM, et al. Treatment of metastatic melanoma using electroporation therapy with bleomycin (electrochemotherapy). *Melanoma Res* [Internet]. 2005 Feb [cited 2025 Mar 10];15(1):45–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15714120/>

79. Ferrari M, Facchini BA, Ascierto PA, Sparano F. Melanoma neoadjuvant treatment: review and update of recent trials. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2025;25(4):383–92.
80. Boulva K, Apte S, Yu A, Tran A, Shorr R, Song X, et al. Contemporary neoadjuvant therapies for high-risk melanoma: A systematic review. Vol. 13, *Cancers*. MDPI; 2021.
81. Reijers ILM, Menzies AM, van Akkooi ACJ, Versluis JM, van den Heuvel NMJ, Saw RPM, et al. Personalized response-directed surgery and adjuvant therapy after neoadjuvant ipilimumab and nivolumab in high-risk stage III melanoma: the PRADO trial. *Nat Med*. 2022 Jun 1;28(6):1178–88.
82. Blank CU, Lucas MW, Scolyer RA, van de Wiel BA, Menzies AM, Lopez-Yurda M, et al. Neoadjuvant Nivolumab and Ipilimumab in Resectable Stage III Melanoma. *New England Journal of Medicine*. 2024 Nov 7;391(18):1696–708.
83. Caralt M, Martí J, Cortés J, Fondevila C, Bilbao I, Fuster J, et al. Outcome of patients following hepatic resection for metastatic cutaneous and ocular melanoma. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* [Internet]. 2011 Mar [cited 2025 Mar 10];18(2):268–75. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21057964/>
84. Frenkel S, Nir I, Hendler K, Lotem M, Eid A, Jurim O, et al. Long-term survival of uveal melanoma patients after surgery for liver metastases. *Br J Ophthalmol* [Internet]. 2009 Aug [cited 2025 Mar 10];93(8):1042–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19429579/>
85. Mariani P, Piperno-Neumann S, Servois V, Berry MG, Dorval T, Plancher C, et al. Surgical management of liver metastases from uveal melanoma: 16 years' experience at the Institut Curie. *Eur J Surg Oncol* [Internet]. 2009 Nov [cited 2025 Mar 10];35(11):1192–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19329272/>
86. Pawlik TM, Zorzi D, Abdalla EK, Clary BM, Gershenwald JE, Ross MI, et al. Hepatic resection for metastatic melanoma: distinct patterns of recurrence and prognosis for ocular versus cutaneous disease. *Ann Surg Oncol* [Internet]. 2006 May [cited 2025 Mar 10];13(5):712–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16538410/>
87. Robert C, Karaszewska B, Schachter J, Rutkowski P, Mackiewicz A, Stroiakovski D, et al. Improved overall survival in melanoma with combined dabrafenib and trametinib. *N Engl J Med* [Internet]. 2015 Jan 1 [cited 2025 Mar 10];372(1):30–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25399551/>
88. Larkin J, Ascierto PA, Dréno B, Atkinson V, Liskay G, Maio M, et al. Combined vemurafenib and cobimetinib in BRAF-mutated melanoma. *N Engl J Med* [Internet]. 2014 Nov 13 [cited 2025 Mar 10];371(20):1867–76. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25265494/>
89. Long GV, Stroyakovskiy D, Gogas H, Levchenko E, De Braud F, Larkin J, et al. Dabrafenib and trametinib versus dabrafenib and placebo for Val600 BRAF-mutant melanoma: a multicentre, double-blind, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet* [Internet]. 2015 Aug 1 [cited 2025 Mar 10];386(9992):444–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26037941/>
90. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* [Internet]. 2010 Aug 19 [cited 2025 Mar 10];363(8):711–23. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20525992/>
91. Robert C, Thomas L, Bondarenko I, O'Day S, Weber J, Garbe C, et al. Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N Engl J Med* [Internet]. 2011 Jun 30 [cited 2025 Mar 10];364(26):2517–26. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21639810/>

92. Robert C, Long G V., Brady B, Dutriaux C, Maio M, Mortier L, et al. Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *N Engl J Med* [Internet]. 2015 Jan 22 [cited 2025 Mar 10];372(4):320–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25399552/>
93. Hamm C, Verma S, Petrella T, Bak K, Charette M. Biochemotherapy for the treatment of metastatic malignant melanoma: a systematic review. *Cancer Treat Rev* [Internet]. 2008 Apr [cited 2025 Mar 10];34(2):145–56. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18077098/>
94. Mornex F, Thomas L, Mohr P, Hauschild A, Delaunay MM, Lesimple T, et al. A prospective randomized multicentre phase III trial of fotemustine plus whole brain irradiation versus fotemustine alone in cerebral metastases of malignant melanoma. *Melanoma Res* [Internet]. 2003 Feb [cited 2025 Mar 10];13(1):97–103. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12569292/>
95. Fife KM, Colman MH, Stevens GN, Firth IC, Moon D, Shannon KF, et al. Determinants of outcome in melanoma patients with cerebral metastases. *J Clin Oncol* [Internet]. 2004 [cited 2025 Mar 10];22(7):1293–300. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15051777/>
96. Raizer JJ, Hwu WJ, Panageas KS, Wilton A, Baldwin DE, Bailey E, et al. Brain and leptomeningeal metastases from cutaneous melanoma: survival outcomes based on clinical features. *Neuro Oncol* [Internet]. 2008 Apr [cited 2025 Mar 10];10(2):199–207. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18287337/>
97. Wroński M, Arbit E. Surgical treatment of brain metastases from melanoma: a retrospective study of 91 patients. *J Neurosurg* [Internet]. 2000 [cited 2025 Mar 10];93(1):9–18. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10883899/>
98. Cashin RP, Lui P, Machado M, Hemels MEH, Corey-Lisle PK, Einarson TR. Advanced cutaneous malignant melanoma: a systematic review of economic and quality-of-life studies. *Value Health* [Internet]. 2008 [cited 2025 Mar 10];11(2):259–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18380638/>
99. Renzelmann C. Dokumentation, Archivierung und Aufbewahrung - Aufbewahrungsfristen unter anderem nach Berufs- bzw. Vertragsarztrecht. In: Mitglieder-Handbuch. Bundesverband Deutscher Pathologen e.V.; 2018.
100. Rietz S. Vergleichende Untersuchung der Aufarbeitung von Sentinel Lymphknoten bei malignem Melanom im Institut für Pathologie der Universitätsmedizin Mainz in den Jahren 2006 bis 2011. Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz; 2016.
101. Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte. BfArM. 2024 [cited 2024 Feb 25]. Operationen- und Prozedurenschlüssel (OPS). Available from: https://www.bfarm.de/DE/Kodiersysteme/Klassifikationen/OPS-ICHI/OPS/_node.html
102. Jakob R. ICD-11—Adapting ICD to the 21st century. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* [Internet]. 2018 Jul 1 [cited 2024 Feb 25];61(7):771–7. Available from: <https://gesund.bund.de/was-sind-icd-und-ops-codes>
103. Bredgaard R, Lock-Andersen J. Recurrence of cutaneous malignant melanoma after more than 20 years. *J Plast Surg Hand Surg*. 2011 Apr;45(2):113–6.
104. Bleicher J, Swords DS, Mali ME, McGuire L, Pahlkötter MK, Asare EA, et al. Recurrence patterns in patients with Stage II melanoma: The evolving role of routine imaging for surveillance. *J Surg Oncol*. 2020 Dec 1;122(8):1770–7.
105. Wilms D. Wem gehören Paraffinblöcke? *Patho*. 2018;(2).

106. Lang Gudrun. Histotechnik : Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik. Springer; 2006. 282 ff.
107. Bishal Gyawali CB. Disease-Free Survival As a Clinical Trial Endpoint: Does It Matter, and to Whom? ASCO Daily News [Internet]. 2021 Nov 10 [cited 2025 Sep 18]; Available from: <https://dailynews.ascopubs.org/doi/10.1200/ADN.21.200751/abs/>
108. National Cancer Institute. Definition of disease-free survival - NCI Dictionary of Cancer Terms - NCI [Internet]. [cited 2025 Sep 18]. Available from: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/disease-free-survival>
109. Isaksson K, Katsarelis D, Mikiver R, Carneiro A, Ny L, Olofsson Bagge R. A Population-Based Comparison of the AJCC 7th and AJCC 8th Editions for Patients Diagnosed with Stage III Cutaneous Malignant Melanoma in Sweden. *Ann Surg Oncol*. 2019 Sep 15;26(9):2839–45.
110. Fujisawa Y, Yoshikawa S, Minagawa A, Takenouchi T, Yokota K, Uchi H, et al. Classification of 3097 patients from the Japanese melanoma study database using the American joint committee on cancer eighth edition cancer staging system. *J Dermatol Sci*. 2019 May 1;94(2):284–9.
111. Kanaki T, Knispel S, Chorti E, Placke J M, Albrecht M, Martaki A, et al. Auswirkungen der überarbeiteten AJCC-Klassifikation (8. Edition) auf das Essener Melanomkollektiv. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*. 2018 Sep;16(S6):61–2.
112. Luttermann F. Untersuchung prognostischer Einflussfaktoren zum Überleben von 1475 Melanompatienten zum Zeitpunkt der Wächterlymphknotenentnahme. Medizinische Fakultät der Eberhard Karls Universität zu Tübingen; 2021.
113. Schönemeier JKG. “Real-Life“-Untersuchungen zur Wertigkeit der Sentinel-Lymphknoten-Biopsie bei Patienten mit malignem Melanom. Technische Universität München, Fakultät für Medizin; 2017.
114. Chang JM, Kosiorek HE, Dueck AC, Leong SPL, Vetto JT, White RL, et al. Stratifying SLN incidence in intermediate thickness melanoma patients. *Am J Surg*. 2018 Apr 1;215(4):699–706.
115. Teixeira V, Vieira R, Coutinho I, Cabral R, Serra D, Julião MJ, et al. Prediction of Sentinel Node Status and Clinical Outcome in a Melanoma Centre. *J Skin Cancer*. 2013;2013:1–7.
116. Landthaler FMJ. Ergebnisse der Entfernung des Schildwächter-Lymphknotens bei Melanom-Patienten der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Umweltmedizin II des Städtischen Klinikums München. Städtisches Klinikum München, Klinik für Dermatologie, Allergologie und Umweltmedizin II; 2021.
117. Hodges M, Jones E, Jones T, Pearlman N, Gajdos C, Kounalakis N, et al. Analysis of Melanoma Recurrence Following a Negative Sentinel Lymph Node Biopsy. *Melanoma Manag*. 2015 Aug;2(3):285–94.
118. Breslow A, Washington G. Thickness, Cross-Sectional Areas and Depth of Invasion in the Prognosis of Cutaneous Melanoma. *Ann Surg*. 1970 Nov;172.
119. Scolyer RA, Rawson R V., Gershenwald JE, Ferguson PM, Prieto VG. Melanoma pathology reporting and staging. *Modern Pathology*. 2020 Jan 1;33:15–24.
120. Tejera-Vaquerizo A, Martín-Cuevas P, Gallego E, Herrera-Acosta E, Traves V, Herrera-Ceballos E, et al. Predictors of sentinel lymph node status in cutaneous melanoma: A classification and regression tree analysis. *Actas Dermosifiliogr*. 2015 Apr 1;106(3):208–18.

121. Łobaziewicz W, Szloch J, Wajda J, Legkiy O, Marczyk E, Wysocki W. Analysis of disease free survival in cutaneous melanoma patients with sentinel lymph node biopsy. *Polish Journal of Surgery*. 2020 Mar 3;92(3):1–7.
122. de Vries M, Speijers M, Bastiaannet E, Plukker Jt, Brouwers A, van Ginkel R, et al. Long-term follow-up reveals that ulceration and sentinel lymph node status are the strongest predictors for survival in patients with primary cutaneous melanoma. *J Surg Oncol* [Internet]. 2011;37(8). Available from: <https://hal.science/hal-00715500v1>
123. Balch CM, Soong SJ, Gershenwald JE, Thompson JF, Coit DG, Atkins MB, et al. Age as a Prognostic Factor in Patients with Localized Melanoma and Regional Metastases. *Ann Surg Oncol* [Internet]. 2013 [cited 2025 Oct 3];20(12):3961. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4121330/>
124. Clark WH, From L, Bernardino EA. The Histogenesis and Biologic Behavior of Primary Human Malignant Melanomas of the Skin. 1969;
125. Lasithiotakis K, Leiter U, Meier F, Eigentler T, Metzler G, Moehrle M, et al. Age and gender are significant independent predictors of survival in primary cutaneous melanoma. *Cancer* [Internet]. 2008 Apr 15 [cited 2025 Oct 3];112(8):1795–804. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cncr.23359>
126. Downing A, Newton-Bishop JA, Forman D. Recent trends in cutaneous malignant melanoma in the Yorkshire region of England; incidence, mortality and survival in relation to stage of disease, 1993–2003. *Br J Cancer* [Internet]. 2006 Jul 3 [cited 2025 Oct 3];95(1):91. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2360483/>
127. Joosse A, De Vries E, Eckel R, Nijsten T, Eggermont AMM, Hö lz el D, et al. Gender Differences in Melanoma Survival: Female Patients Have a Decreased Risk of Metastasis. *The Society for Investigative Dermatology* [Internet]. 2011 [cited 2025 Oct 3];131:719–26. Available from: www.jidonline.org
128. Rosenbaum BE, Schafer CN, Han SW, Osman I, Zhong H, Brinster N. Computer-assisted measurement of primary tumor area is prognostic of recurrence-free survival in stage IB melanoma patients. *Modern Pathology*. 2017 Oct 1;30(10):1402–10.
129. Morton DL, Thompson JF, Cochran AJ, Mozzillo N, Elashoff R, Essner R, et al. Sentinel-Node Biopsy or Nodal Observation in Melanoma. *N Engl J Med* [Internet]. 2006;13:1307–24. Available from: www.nejm.org
130. Matic M, Jokic S, Markovic I, Bukumiric Z, Jokic V, Rakovic M, et al. Predictors of sentinel lymph node status of cutaneous mela-noma in Serbian patients. *JBUON*. 2018;23(2):468–74.
131. Han D, Zager JS, Shyr Y, Chen H, Berry LD, Iyengar S, et al. Clinicopathologic predictors of sentinel lymph node metastasis in thin melanoma. *J Clin Oncol* [Internet]. 2013 Dec 10 [cited 2025 Oct 5];31(35):4387–93. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24190111/>
132. Amaral T, Forchhammer S, Chatziioannou E, Johansson I, Nagore E, Manrique-Silva E, et al. Clinical validation of a prognostic 7-marker IHC assay (7-IHC) in 382 patients (pts) with stage IB/IIA cutaneous melanoma (CM; MELARISK-001). *Journal of Clinical Oncology*. 2024 Jun 1;42(16_suppl):9572–9572.
133. Thomas DC, Han G, Leong SP, Kashani-Sabet M, Vetto J, Pockaj B, et al. Recurrence of Melanoma After a Negative Sentinel Node Biopsy: Predictors and Impact of Recurrence Site on Survival. *Ann Surg Oncol*. 2019 Jul 15;26(7):2254–62.
134. Hessler M, Jalilian E, Xu Q, Reddy S, Horton L, Elkin K, et al. Melanoma biomarkers and their potential application for in vivo diagnostic imaging modalities. Vol. 21, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2020. p. 1–27.

135. Kattan MW, Hess KR, Amin MB, Lu Y, Moons KGM, Gershenwald JE, et al. American Joint Committee on Cancer acceptance criteria for inclusion of risk models for individualized prognosis in the practice of precision medicine. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2016 Sep 19;66(5):370–4. Available from: <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.3322/caac.21339>
136. Palazón-Bru A, Folgado-De La Rosa DM, Cortés-Castell E, López-Cascales MT, Gil-Guillén VF. Sample size calculation to externally validate scoring systems based on logistic regression models. *PLoS One*. 2017 May 1;12(5).
137. Verver D, van Klaveren D, Franke V, van Akkooi ACJ, Rutkowski P, Keilholz U, et al. Development and validation of a nomogram to predict recurrence and melanoma-specific mortality in patients with negative sentinel lymph nodes. *British Journal of Surgery*. 2019 Feb 1;106(3):217–25.
138. Verver D, Rekkas A, Garbe C, van Klaveren D, van Akkooi ACJ, Rutkowski P, et al. The EORTC-DeCOG nomogram adequately predicts outcomes of patients with sentinel node–positive melanoma without the need for completion lymph node dissection. *Eur J Cancer*. 2020 Jul 1;134:9–18.
139. Thompson JF, J van Akkooi AC, Lo SN, M Saw RP, R Varey AH, Scolyer RA, et al. Development and validation of a novel model to predict recurrence-free survival and melanoma-specific survival after sentinel lymph node biopsy in patients with melanoma: an international, retrospective, multicentre analysis. *Lancet Oncol* [Internet]. 2024;25:509–26. Available from: www.thelancet.com/oncology

8 Danksagung

9 Tabellarischer Lebenslauf