Zelluläre und molekulare Biomarker

immunologisch vermittelter Krankheitsbilder

am Beispiel

von Tumor und Autoimmunität

Dissertation

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

im Promotionsfach Pharmazie

am Fachbereich Chemie, Pharmazie,

Geographie und Geowissenschaften

der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

Franziska Kirsten Krebs

geb. in Kaltenkirchen, Deutschland

Mainz, Mai 2020

Dekan: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Dirk Schneider

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Andrea Tüttenberg
2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Irene Krämer

Tag der mündlichen Prüfung:

Meiner Familie und meinen Freunden

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS ..... **VI**

ABBILDUNGSVERZEICHNIS ..... **X**

TABELLENVERZEICHNIS ..... **XII**

1. EINLEITUNG **1**

1.1. DIE ANGEBORENE UND ERWORBENE IMMUNANTWORT **1**

1.1.1. Dendritische Zellen *1*

1.1.2. T-Lymphozyten *2*

1.1.3. Regulatorische T-Zellen *4*

1.1.4. Myeloide Suppressorzellen *5*

1.2. DAS MALIGNE MELANOM **7**

1.2.1. Risikofaktoren, Pathogenese & Klassifikation *7*

1.2.2. Medikamentöse Therapien im Tumorstadium IV *9*

1.2.2.1. Signaltransduktions-Inhibitoren – BRAF- und MEK-Inhibitoren 9

1.2.2.2. Checkpoint-Inhibitoren 11

1.2.3. Tumorentstehung und Toleranz *12*

1.3. DIE PSORIASIS **14**

1.3.1. Das Krankheitsbild der Psoriasis *14*

1.3.2. Systemische und topische Therapie der Psoriasis *16*

1.4. ZIELSETZUNG **18**

2. MATERIAL UND METHODEN **20**

2.1. MATERIALIEN **20**

2.1.1. Verbrauchsmaterialien *20*

2.1.2. Chemikalien, Sets, Medien & Puffer *21*

2.1.3. Arzneimittel & Zytokine *23*

2.1.4. Antikörper & MikroBeads *23*

2.1.5. PCR-Sets & Primer *26*

2.1.6. Geräte *26*

2.1.7. Programme *27*

2.2. METHODEN **28**

2.2.1. Studiendesign und -durchführung *28*

2.2.1.1. Studie zum malignen Melanom 28

2.2.1.2. Studie zur Psoriasis 29

2.2.2. Methoden der Zellkultur *30*

2.2.2.1. Isolation des Plasmas und der peripheren mononuklearen Zellen 30

2.2.2.2. Die Bestimmung der Zellzahl 31

2.2.2.3. Das Einfrieren und Auftauen humaner Zellen 31

2.2.2.4. Magnetische Isolierung spezifischer Zellpopulationen 32

2.2.2.5. CFSE-Markierung der $CD4^+$ T-Zellen 33

2.2.2.6. Der syngene Suppressionsassay 33

2.2.2.7. Die Kultivierung und Behandlung dendritischer Zellen 34

2.2.2.8. Bestimmung der metabolischen Aktivität der Zellen 35

2.2.3. Methoden der Durchflusszytometrie *36*

2.2.3.1. Färbung der intrazellulären, intranukleären und Oberflächenmoleküle 37

2.2.3.2. Quantitative Bestimmung der Zytokine anhand des Cytometric Bead Arrays (CBA) 39

2.2.3.3. Bestimmung der Apoptose 40

2.2.3.4. Bestimmung der Caspase-1 Aktivität 41

2.2.4. Quantitative Analyse der Plasmamoleküle 42
2.2.4.1. Analyse des Plasmaproteoms 42
2.2.4.2. Validierung potenzieller Biomarker via ELISA 43
2.2.5. Die quantitative Bestimmung der mRNA 44
2.2.5.1. Isolation und Quantifizierung der mRNA 44
2.2.5.2. Reverse Transkription (RT) der mRNA zu cDNA 44
2.2.5.3. Quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion (real-time qPCR) 45
2.2.6. Statistische Auswertung 46

3. ERGEBNISSE 47

3.1. IMMUNOMONITORING VON MELANOMPATIENTEN UNTER CHECKPOINT-INHIBITOR THERAPIE 47
3.1.1. Statistische Auswertung der Patientencharakteristika 47
3.1.2. Untersuchungen zu zellulären Biomarkern im peripheren Blut ex vivo 52
3.1.2.1. Erhöhtes Lymphozyten-Monozyten-Verhältnis indiziert ein Therapieansprechen 52
3.1.2.2. Erhöhte $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zell-Prozentsätze in Therapieansprechen 54
3.1.2.3. Verstärkte $CD8^+$ und $CD8^+GZMB^+$ T-Zellproliferation indiziert ein Therapieansprechern 56
3.1.2.4. Erhöhte IFN-γ^+ $CD4^+$, $CD8^+$ und $CD8^+GZMB^+$ T-Zell-Prozentsätze in Therapieansprechern 58
3.1.2.5. Niedrige Prozentsätze der ko-inhibitorischen Checkpoint Moleküle CTLA-4 und PD-1 auf T-Zellen in Therapieansprechern 60
3.1.2.6. Anstieg des Prozentsatzes aktivierter $CD69^+CD8^+$ und $HLA\text{-}DR^+CD4^+$ T-Zellen nach Therapiebeginn in Therapieansprechern 65
3.1.2.7. Abnahme der regulatorischen T-Zellen (Treg) nach Therapiebeginn in Therapieansprechern 69
3.1.2.8. Geringe Prozentsätze CTLA-4^+ Treg indizieren ein Therapieansprechen unter Ipilimumab 71
3.1.2.9. Erhöhte $CD4^+$, $CD8^+$ und $CD8^+GZMB^+$-T-Zell-Treg-Verhältnisse nach Therapiebeginn indizieren ein Therapieansprechen 74
3.1.2.10. Niedrige Prozentsätze polymorphonukleärer myeloider Suppressorzellen (PMN-MDSC) in Therapieansprechern 76
3.1.2.11. Abnahme des Prozentsatzes der Arginase 1^+ E- und M-MDSC nach Therapiebeginn indiziert ein Therapieansprechen 80
3.1.2.12. MDSC supprimieren die Proliferation, die IFN-γ Produktion und die Aktivierung $CD4^+$ T-Zellen 82
3.1.2.13. Tabellarische Zusammenfassung des zellulären Immunomonitoring 86
3.1.3. Untersuchungen zu molekularen Biomarkern im peripheren Blut ex vivo 87
3.1.3.1. S100, LDH sowie Thrombozyten im Normbereich indizieren ein Therapieansprechen 87
3.1.3.2. Analyse molekularer Biomarker im peripheren Blut von Patienten unter Ipilimumab Monotherapie 92

***3.2.* UNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUSS VON BRAF UND MEK-INHIBITOREN AUF DENDRITISCHE ZELLEN (DC) *IN VITRO* 95**
3.2.1. BRAF-Inhibitoren induzieren die Expression von CD80 und CD86 auf reifen DC stärker als der MEK-Inhibitor Trametinib 95
3.2.2. Einfluss der BRAF-Inhibitoren Vemurafenib und Dabrafenib auf die Viabilität, Apoptose und Nekrose dendritischer Zellen 97
3.2.3. Die BRAF-Inhibitoren Vemurafenib und Dabrafenib erhöhen initial die metabolische Aktivität unreifer DC 99
3.2.4. Vemurafenib induziert die Produktion von IL-1β, IL-12p70 und TNF-α in reifen DC 100
3.2.5. BRAF-Inhibitoren induzieren eine Caspase-1 Aktivität im Inflammasom 103
***3.3.* IMMUNOMONITORING IN DER AUTOIMMUNITÄT – PSORIASIS *EX VIVO* 105**
3.3.1. Die systemische Therapie erhöht den Prozentsatz $HLA\text{-}DR^+$ und aktivierter $GARP^+$ regulatorischer T-Zellen 106
3.3.2. Die M- und E-MDSC Prozensätze korrelieren positiv mit dem Psoriasis Area Severity Index (PASI) 109

4. DISKUSSION 112
4.1. CHECKPOINT-INHIBITOREN – EIN STARKES IMMUNSYSTEM FÜR EIN STARKES THERAPIEANSPRECHEN 112
4.2. BRAF- VS. MEK-INHIBITOREN – BRAF-INHIBITOREN UNTERSTÜTZEN DIE ANTI-TUMOR IMMUNANTWORT DENDRITISCHER ZELLEN 123
4.3. REGULATORISCHE IMMUNZELLEN IN DER PSORIASIS – FUNKTIONELLE QUALITÄT VOR QUANTITÄT 130
5. ZUSAMMENFASSUNG 140
6. LITERATURVERZEICHNIS 141
7. ANHANG 159
8. PUBLIKATIONEN & KONFERENZEN 161
9. DANKSAGUNG 163
10. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG 164
11. TABELLARISCHER LEBENSLAUF 165

Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Amino-Actinomycin
A	Zeitpunkt A (vor Therapiebeginn)
A.	Ansprechen
ADCC	Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxität
ADCP	Antikörper-abhängige zelluläre Phagozytose
AKT	AKT Serin/Threonin Kinase
AMP	(1) Antimikrobielle Proteine (Psoriasis), (2) Amphiregulin (Th2 Effektorzytokin)
APC	Antigenpräsentierende Zellen (engl. antigen presenting cells)
ASR	Alters-standardisiertes relatives Gesamtüberleben
ATP	Adenosintriphosphat
B	Zeitpunkt B (1 bis 3 Wochen nach Therapiebeginn)
BRAF	B-Raf Protoonkogen (v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B)
BSA	Körperoberfläche (engl.. body surface area)
CD	Unterscheidungsgruppen (engl. cluster of differentiation)
CDK4	Cyclin-abhängige Kinase 4 (engl. cyclin dependent kinase 4)
CDKN2A	Cyclin-abhäniger Kinaseinhibitor-2A
CI	Konfidenzintervall (engl. confidence interval)
CFSE	Carboxyfluoresceindiacetat Succinimidylester
CNS	Konservierte nicht-kodierende DNA Sequenz (engl. conserved non-coding sequence)
CTLA-4	Zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Protein 4 (engl. cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4)
Ctrl	Kontrolle (engl. control)
CUP	Krebs mit unbekanntem Primärtumor (engl. cancer of unknown primary)
CXCL	CXC-Motiv-Chemokin
CsA	Cyclosporin A
DAB	Dabrafenib
DC	Dendritische Zelle (engl. dendritic cell)
DIA	Unabhängigen Datenerfassung
DLQI	Dermatologischer-Lebensqualitäts-Index
DMF	Dimethylfumarat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECT	Elektrochemotherapie
ELISA	Enzymatisches Immunadsorptionsverfahren (engl. enzyme-linked immunosorbent assay)
E-MDSC	Frühe MDSC (engl. early MDSC)
ERK	Extrazellulär Signal-regulierte Kinase (engl. extracellular signal-regulated kinase)
FASP	Filter Aided Sample Preparation
FDR	Falscherkennungsrate (engl. false discovery rate)
FFM	Studienkohorte der Melanompatienten aus Frankfurt
Flica	Fluoreszenz-markierte Inhibitoren der Caspase
Foxp3	Forkhead protein 3

GARP	Glycoprotein-A repetitions predominant
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor
GS	Gesunde freiwillige Blutspender
HDL	Lipoprotein hoher Dichte (engl. high density lipoprotein)
HLA-DR	Humanes Leukozytenantigen – DR Isotyp
HPLC-ESI(MS)	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Elektrospray-Ionisation (Massenspektrometrie) (engl. high pressure liquid chromatography electrospray ionisation (mass spectroscopy))
ICD	Immunologisch-induzierter Zelltod (engl. immunogenic cell death)
IFN-γ	Interferon-γ
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IMS-TOF	Ionen-Mobilitäts-Spektrometer mit Time-of-flight (TOF) Massenspektrometrie
iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxid (NO)-Synthase
Ipi	Ipilimumab
IRAE	Immun-bedingte unerwünschte Ereignisse (engl. Immune-related adverse events)
K. A.	Kein Ansprechen
KIT	Protoonkogen, Rezeptor Tyrosinkinase
LAP	Latenz-assoziiertes Protein (TGF-β) bzw. low abundant proteins (HPLC);
LDH	Lactatdehydrogenase
LDL	Lipoprotein niederer Dichte (engl. low density lipoprotein)
LIN	Gruppe einer Abstammungslinie (engl. lineage)
MACS	Magnetisch aktivierte Zellsortierung (engl. Magnetic activated cell sorting)
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MDSC	Myeloide Suppressorzellen (engl. myeloid-derived suppressor cells)
MAP	Mitogen-aktivierte Kinase
MEF	Monoethylfumarat
MEK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität (engl. Mean fluorescence intensity)
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
M-MDSC	Mononukleäre/monozytäre MDSC
mRNA	Boten-RNA (engl. messenger RNA)
mTOR	Kinase (engl. mechanistic target of Rapamycin)
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MTX	Methotrexat
MZ	Mainz
NF1	Neurofibromin 1
NFAT	Nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen (engl. nuclear factor of activated T-cells)
Nivo	Nivolumab
NLR	Nukleotid-bindende Oligomerisations-Domäne (NOD)-ähnliche Rezeptoren
NLRP3	engl. NLR family pyrin domain containing 3
NPV	Negativ prädiktiver Wert
NRAS	N-Ras Protoonkogen (engl. neuroblastoma RAS viral oncogene homolog)
n. s.	Nicht significant (Statistik)
ORR	Objektive Ansprechrate (engl. objective response rate)

OS	Gesamtüberleben (engl. overall survival)
P	Wahrscheinlichkeit (Statistik)
P2RX7	Purinerger Rezeptor P2X 7 (engl. purinergic receptor P2X 7)
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Muster (engl. pathogen-associated molecular patterns)
PASI	Psoriasis Area and Severity Index
PBMC	Mononukleäre Zelle des peripheren Blutes (engl. peripheral blood mononuclear cell)
PD-1/2	Programmiertes Zelltodprotein 1 (engl. programmed cell death protein 1)
PD-L1	Programmiertes Zelltodprotein – Ligand ½
pDC	Plasmazytoide dendritische Zellen
PEDF	Pigment-Epithel-Faktor (engl. pigment epithelium-derived factor)
PEG	Polyethylenglykol
Pembro	Pembrolizumab
PFS	Progressionsfreies Überleben (engl. progression-free survival)
PGE2	Prostaglandin E2
PGIA	Proteoglykan-induzierter Arthritis
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PMN-MDSC	Polymorphonukleare myeloide Suppressorzellen
PPV	Positiv prädiktiver Wert
PRR	Mustererkennungsrezeptoren (engl. pattern recognition receptors)
PS	Phosphatidylserin
RAF	Protoonkogen, Serin/Threonin Kinase (engl. rapidly accelerated fibrosarcoma)
RAS	Protoonkogen, Proteinfamilie (engl. rat sarcoma)
PLGS	ProteinLynx Global SERVER™ (Waters Proteomik Analyseplattform)
PsA	Psoriasis arthritis
PTEN	Phosphatase und Tensin Homolog
rDC	Reife dendritische Zellen (DC) (engl. mDC, mature dendritic cell)
RNA	Ribonukleinsäure
RORγt	Transkriptionsfaktor (engl. RAR-related orphan receptor γ)
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rs	Spearman Korrelationskoeffizient
RT	Raumtemperatur (15 – 25 °C)
RT-qPCR	Reverse Transkriptase quantitative Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion
S100	S100 Protein
Smad3	Protein der SMAD Familie (engl. Mothers against decapentaplegic homolog 3)
ST	Systemische Therapie
STAT	Transkritptionsfaktor (engl. signal transducers and activators of transcription)
TACE	Transarteriale Chemoembolisation
Tc	Zytotoxische T-Zelle
TCR	T-Zellrezeptor
TGF-β	Transformierender Wachstumsfaktor β (engl. transforming growth factor beta)
TEC	Thymusepithelzellen (c, kortikale; m, medulläre)
TERT	Telomerase Reverse Transkriptase (Genmutation)
Th17	T Helferzelle 17

TLR	Toll-like Rezeptor
TME	Tumormikromilieu (engl. tumor microenvironment)
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
TP53	Tumorprotein P53
TRA	Trametinib
Treg	Regulatorische T-Zelle
TT	Topische Therapie
UAW	Unerwünschte Arzneimittelwirkungen (engl. ADR, adverse drug reaction)
uDC	Unreife dendritische Zelle (DC) (engl. iDC, immature dendritic cell)
$UDMS^{E}$	Ultra-Defintions Massenspektrometrie (mit erhöhter Energie) (engl. ultra-definition mass spectrometry (by elevated energy))
UE	Unerwünschte Ereignisse (engl. AE, adverse events)
UniProt	Universelle Protein Datenbank
UPLC	Ultra-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. ultra-performance liquid chromatography)
ÜR	Überlebensrate (z. B. 1-Jahres Überlebensrate)
VEM	Vemurafenib
VLDL	Lipoprotein sehr niederer Dichte (engl. very low density lipoprotein)
well	Näpfchen/ Vertiefung in einer Mikrotiterplatte (engl.)
ZNS	Zentrales Nervensystem

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Die T-Zell-Differenzierung. 3
Abbildung 2 Die Entwicklung myeloider Suppressorzellen (MDSC). 6
Abbildung 3 Haut mit superfiziell spreitendem Melanom (SSM). 8
Abbildung 4 Der MAPK/ERK- und PI3K/AKT-Signalweg. 10
Abbildung 5 Psoriasis-Plaque. 14
Abbildung 6 Die Pathogenese der Psoriasis. 16
Abbildung 7 Überlebenszeitanalyse anhand des Therapieerfolgs und der Checkpoint-Inhibitor Therapie. 51
Abbildung 8 Immunomonitoring der Lymphozyten und Monozyten im peripheren Blut. 53
Abbildung 9 Immunomonitoring der $CD4^+$, $CD8^+$ und $CD8^+$Granzym B^+ T-Zellen im peripheren Blut. 55
Abbildung 10 Immunomonitoring der Proliferation der $CD4^+$, $CD8^+$ und $CD8^+$Granzym B^+ T Zellen im peripheren Blut. 57
Abbildung 11 Immunomonitoring der Interferon-γ (IFN-γ) produzierenden $CD4^+$, $CD8^+$ und $CD8^+$Granzym B^+ T Zellen im peripheren Blut. 59
Abbildung 12 Immunomonitoring des ko-inhibitorischen Checkpoint Moleküls CTLA-4 (zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Proteins 4) auf $CD4^+$, $CD8^+$ und $CD8^+$Granzym B^+ T-Zellen im peripheren Blut. 62
Abbildung 13 Immunomonitoring des ko-inhibitorischen Checkpoint Moleküls PD-1 (Programmiertes Zelltodprotein 1) auf $CD4^+$, $CD8^+$ und $CD8^+$Granzym B^+ T-Zellen im peripheren Blut. 64
Abbildung 14 Immunomonitoring der Aktivierungsmarker CD69, CD25 und HLA-DR auf $CD4^+$, $CD8^+$ und $CD8^+$Granzym B^+ T Zellen im peripheren Blut. 67
Abbildung 15 Überlebenszeitanalyse anhand der Aktivierungsmarker CD25 und HLA-DR auf CD4+ T-Zellen im peripheren Blut. 68
Abbildung 16 Immunomonitoring der regulatorischen T Zellen (Treg) im peripheren Blut. 70
Abbildung 17 Immunomonitoring aktivierter $GARP^+$ und suppressiver CTLA-4^+ und HLA-DR^+ regulatorischer T Zellen (Treg). 73
Abbildung 18 Immunomonitoring des T Zell-Treg-Verhältnisses. 75
Abbildung 19 Eingrenzung der myeloiden Suppressorzellen (MDSC). 77
Abbildung 20 Immunomonitoring myeloider Suppressorzellen (MDSC) im peripheren Blut. 79
Abbildung 21 Immunomonitoring Arginase 1^+ myeloider Suppressorzellen (MDSC) im peripheren Blut. 82
Abbildung 22 Effekt myeloider Suppressorzellen (MDSC) auf die Proliferation syngener $CD4^+$ T Zellen. 84
Abbildung 23 Immunomonitoring der löslichen Biomarker des malignen Melanoms, S100 und LDH, sowie der Thrombozyten-Konzentration im peripheren Blut. 89
Abbildung 24 Immunomonitoring der Proteine Afamin und PEDF im Plasma. 94
Abbildung 25 Effekt der BRAF-Inhibitoren Vemurafenib und Dabrafenib und des MEK-Inhibitors Trametinib auf die Ausreifung dendritischer Zellen *in vitro*. 97
Abbildung 26 Effekt der BRAF-Inhibitoren Vemurafenib und Dabrafenib auf die Viabilität dendritischer Zellen in vitro. 98

Abbildung 27 Effekt der BRAF-Inhibitoren Vemurafenib und Dabrafenib auf die metabolische Aktivität unreifer dendritischer Zellen *in vitro*..... 100
Abbildung 28 Effekt der BRAF- und MEK-Inhibitoren auf die TNF-α, IL-12p70, IL-1β und IL-18 Zytokinproduktion in dendritischen Zellen *in vitro*. 101
Abbildung 29 Effekt der BRAF-Inhibitoren Vemurafenib und Dabrafenib auf die Caspase-1 Aktivität in dendritischen Zellen *in vitro.* 104
Abbildung 30 Prozentsatz und Phänotyp der regulatorischen T Zellen (Treg) im peripheren Blut von Psoriasis-Patienten in Abhängigkeit vom Schweregrad der Psoriasis und der Therapie… 107
Abbildung 31 Die Prozentsätze der myeloiden Suppressorzellen (MDSC) im peripheren Blut von Psoriasis-Patienten in Abhängigkeit vom Schweregrad der Erkrankung und der Therapie..... 110
Abbildung 32 Korrelationsmatrix zur Zusammensetzung der Serumproteine in Patienten des Trainingssets. 159
Abbildung 33 Korrelationsmatrix zur Reproduzierbarkeit der Zusammensetzung der Serumproteine des Trainingssets..... 160

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Klinische Einteilung der Stadien des malignen Melanoms gemäß AJCC 2016 / UICC 2016 (32). 9
Tabelle 2 Verbrauchsmaterialien und sonstige Materialien. 20
Tabelle 3 Chemikalien. 21
Tabelle 4 Sets. 21
Tabelle 5 Kommerziell erworbene Medien & Puffersets. 22
Tabelle 6 Selbst angesetzte Puffer. 22
Tabelle 7 ELISA Stammlösungen und Puffer 22
Tabelle 8 Experimentell verwendete Arzneimittel. 23
Tabelle 9 Zytokine. 23
Tabelle 10 Primäre Antikörper zur Durchflusszytometrie oder Zellstimulation. 23
Tabelle 11 Sekundäre Fluorophor-markierte Antikörper zur Durchflusszytometrie. 24
Tabelle 12 Direktkonjugierte Fluorophor-markierte Antikörper zur Durchflusszytometrie. 24
Tabelle 13 Vitalitäts- & Proliferationsfarbstoffe. 25
Tabelle 14 Humane MACS MikroBeads zur magnetischen Zellisolierung. 26
Tabelle 15 Primer zur RT-qPCR. 26
Tabelle 16 Sets zur RT-qPCR. 26
Tabelle 17 Verwendete Geräte. 26
Tabelle 18 Programme zum Betrieb der Geräte und zur Auswertung. 27
Tabelle 19 Laserkonfiguration des verwendeten BD LSR II (92). 37
Tabelle 20 Grundcharakteristika der Patienten. 48
Tabelle 21 Therapien der Patienten. 49
Tabelle 22 Ansprechmuster der Checkpoint-Inhibitor Therapie. 50
Tabelle 23 Immunologisch-bedingte unerwünschte Ereignisse (IRAE). 50
Tabelle 24 Tabellarische Zusammenfassung des zellulären Immunomonitoring – Patienten vor Therapiebeginn vs. gesunde Spender. 86
Tabelle 25 Tabellarische Zusammenfassung des zellulären Immunomonitoring – Patienten vor Therapiebeginn vs. nach Therapiebeginn. 87
Tabelle 26 Unterschiede ausgewählter Proteine im Plasma der Therapieansprecher (A.) und Nicht-Ansprecher (N. A.) der Mainzer und Frankfurter Studienkohorten anhand der p-Werte. .. 93
Tabelle 27 Patientencharakteristika der Psoriasis Studie. 105

1. Einleitung

1.1. Die angeborene und erworbene Immunantwort

Das Immunsystem gleicht einer körpereigenen Polizeieinheit. Entdeckt ein Wachmann wie die dendritische Zelle (DC) einen Eindringling, aktiviert die DC durch Überträgerstoffe das Wachpersonal vor Ort, das angeborene Immunsystem: Das Komplementsystem markiert Eindringlinge, damit diese von Makrophagen gefressen werden (Phagozytose). Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) töten körperfremde Zellen und rekrutieren über Boten, die Interleukine, Wachpersonal.

Gleichzeitig wirbt die DC mit Bildern des Eindringlings neue Polizisten, die T-Lymphozyten, an. So gerüstet, durchkämmt die neue Polizeieinheit, die erworbene Immunantwort, den Organismus. Der Einsatz wird durch die Behörde für internes Fehlverhalten, den regulatorischen T-Zellen (Treg) und myeloiden Suppressorzellen (MDSC), überwacht. In malignen und Autoimmun-Erkrankungen ist das Gleichgewicht aus Wachpersonal, Polizei und der regulierenden Behörde gestört.

1.1.1. Dendritische Zellen

DC werden als Bindeglied zwischen der angeborenen und erworbenen (adaptiven) Immunantwort bezeichnet (1). Als Wächterzelle des angeborenen Immunsystems erkennen DC nicht körpereigene, „fremde“ Strukturen. Durch die Freisetzung von Überträgerstoffen (Metoren wie Zytokine, Chemokine) regulieren DC Zellen des angeborenen Immunsystems und aktivieren als professionelle Antigen-präsentierende Zellen (APC) das erworbene Immunsystem, die T-Zellen. DC-Vorläuferzellen werden im Knochenmark (primäres lymphatisches Organ) aus Knochenmarksstammzellen gebildet und wandern über das Blutsystem in nicht-lymphoide Gewebe ein, aus denen sie über Lymphgefäße in Lymphknoten (sekundäres lymphatisches Organ) weitergetragen werden. Auf dieser Wanderung nehmen unreife DC (uDC) kontinuierlich Feststoffe (Phagozytose) und extrazelluläre Flüssigkeit auf (Makropinozytose). Über Mustererkennungsrezeptoren (PRR, engl. pattern recognition receptors) erkennen DC körperfremde Strukturen, sogenannte Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMP). Bei PAMP handelt sich zumeist um entwicklungsgeschichtlich alte Strukturen wie z. B. Lipopolysaccharide der Zellwand gram-negativer Bakterien und unmethylierte CpG-Dinukleotide der Bakterien-DNS (Desoxyribonukleinsäure), die in Säugetieren gemeinhin methyliert ist, oder auch um Strukturen abgestorbener Tumorzellen (2). PAMP binden an extrazelluläre (TLR-3 (Toll-like-Rezeptor-3), TLR7-8) und nach Phagozytose an intrazelluläre PRR (TLR2, TLR4-6, NLR (Nukleotid-bindende Oligomerisations-Domäne (NOD)-ähnliche Rezeptoren) wie NLRP3). Nach Spaltung der nicht körpereigenen Proteine in Peptidfragmente (Antigene) werden diese an

Haupthistokompatibilitätskomplexe (MHC Klasse II) gebunden und zusammen mit ko-stimulatorischen Molekülen CD80 bzw. CD86 (Unterscheidungsgruppen, engl. cluster of differentiation) auf der Oberfläche der reifen DC (rDC) exprimiert. Reife DC aktivieren durch Bindung des MHC:Antigen-Komplex, CD80/86 und Zytokine naive T-Zellen und leiten die Immunreaktion des adaptiven Immunsystems ein.
Folglich nehmen DC eine zentrale Rolle in der Immuntoleranz sowie Aktivierung des Immunsystems ein und sind u. a. entscheidend für die Pathogenese immunologisch vermittelter Krankheitsbilder wie z. B. Psoriasis (Bsp. für Autoimmunität) und malignes Melanom (Bsp. für Tumorerkrankungen (2).

1.1.2. T-Lymphozyten

Wie DC entwickeln sich T-Vorläuferzellen aus Knochenmarksstammzellen (Lymphopoiese) und wandern über die Blutbahn zu einem primären lymphatischen Organ, dem Thymus. In der Rinde (Kortex) des Thymus entwickelt sich auf doppelt negativen (DN) Thymozyten ($CD4^-CD8^-$) der T-Zellrezeptor (TCR)-CD3-Komplex. Der CD3-Rezeptor ist ein Transmembranprotein aus vier Polypeptidketten (ε, δ, γ, ε) und leitet bei Aktivierung des TCR-Rezeptors durch Phosphorylierung und Bindung des ZAP70 Moleküls das Signal in den Zellkern weiter.
Entscheidend für die spätere Funktion, die Antigen-Erkennung, ist die Diversität des TCR. Die Diversität entsteht zum einen durch somatische Rekombination der Keimbahn-DNS der β-Kette (VDJC, β-Selektion) des TCR-Rezeptors in DN Thymozyten und zum anderen DNS der α-Kette (VDJ) in doppelt positiven (DP) Thymozyten. Durch einen zusätzlich ungenauen Zusammenbau an den Spleiß-Stellen können 4,5 x 10^9 unterschiedliche TCR zusammengesetzt werden. Auf noch ungeklärte Weise werden DP Thymozyten zu $CD4^+$ bzw. $CD8^+$ einfach positiven Thymozyten, die jeweils an MHC Klasse II bzw. Klasse I binden. Im Kortex werden $CD4^+$ bzw. $CD8^+$ Thymozyten, die nicht an ihre entsprechenden MHC-KlasseI/II:Antigen-Komplexe auf kortikalen Thymusepithelzellen (cTECs) binden durch Apoptose aussortiert (Positivselektion & MHC-Restriktion). Schließlich wandern SP Thymozyten für 4-5 Tage in die Medulla des Thymus und binden medulläre TECs (mTECs) und DC, die MHC-Komplexe mit körpereigenen Antigenen präsentieren. 95 % der SP Thymozyten binden diesen Komplex mit körpereigenen Antigenen zu stark und werden daher wegen der Gefahr autoreaktiver T-Zellaktivierung durch Apoptose aussortiert (Negativselektion). Die übrigen 5 % der naiven T-Zellen (Th0-Zelle, T-Helferzelle Typ 0) wandern über Blutgefäße und Lymphbahnen bis sie schließlich z. B. in einem Lymphknoten einen MHC:Peptid-Komplex auf einer mDC erkennen (3).
Zur Aktivierung der T-Zelle sind drei Signale nötig: (i) die Bindung des MHC:Peptid-Komplexes an den TCR, (ii) die Bindung der Ko-Stimulatoren CD80/CD86 der APC an den Ko-Stimulator

(Checkpoint Molekül) CD28 der T-Zelle sowie (iii) die Stimulation durch Zytokine. Die Bindung des Ko-Stimulators CD28 verstärkt das Signal. Ein Ausbleiben der Bindung kann dagegen zur Toleranzinduktion führen. Durch das dritte Signal, die Zytokine, differenzieren $CD4^+$ T-Zellen via Interleukin-12 (IL-12), Interferon-γ (IFN-γ) und IL-27 zu Th1-Effektorzellen bzw. via IL-4 und IL-6 zu Th2-Effektorzellen aus (4). Es folgt die Zellteilung (Proliferation) der aktivierten T-Zellen durch klonale Expansion. Die Zytokin-vermittelte Differenzierung reguliert den JAK-STAT-Signalweg und damit die Effektormechanismen der aktivierten T-Zellen (Abb. 1).

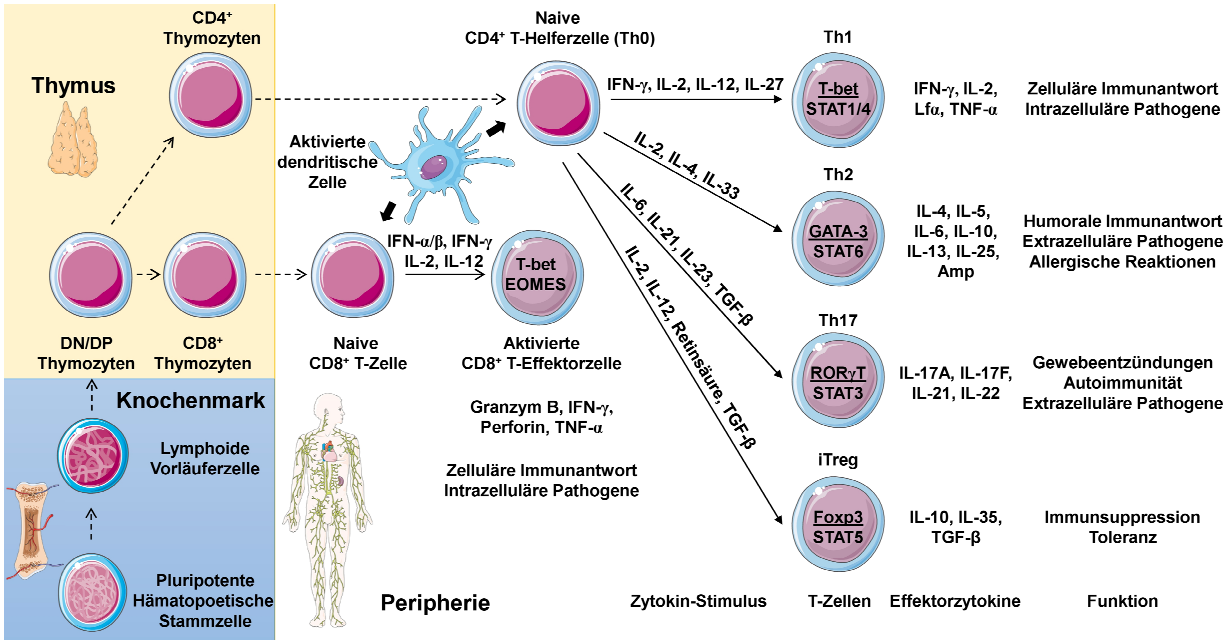


Abbildung 1 Die T-Zell-Differenzierung.
Naive T-Zellen differenzieren durch Antigen-präsentierende reife dendritische Zellen und den jeweiligen Zytokin-Stimuli zu T-Helferzellen, welche sich in ihren Transkriptionsfaktoren, Effektorzytokinen und der Funktion unterscheiden (5–7). Die Haupt-Transkriptionsfaktoren sind unterstrichen. Im Thymus entwickeln sich neben den abgebildeten αβ T-Zellen auch γδ T-Zellen. Erstellt mit LES LABORATOIRES SERVIER, https://smart.servier.com. Amp, Amphiregulin; DN/DP, doppelt negativ/positiv; IFN, Interferon; IL, Interleukin; Lfα, Lymphotoxin α; STAT, engl. Signal Transducers and Activators of Transcription; TNF, Tumornekrosefaktor; TGF, Transformierender Wachstumsfaktor.

Aktivierte Th1-Effektorzellen stimulieren via IL-2, IFN-γ und Tumornekrosefaktor-α/β (TNF-α/β) die zellulär-vermittelte Immunantwort in Form von zytotoxischen $CD8^+$ T-Effektorzellen und Makrophagen, die via GZMB/Perforin-Signalweg die Apoptose in z. B. Tumorzellen induzieren bzw. diese phagozytieren (8). Aktivierte Th2-Effektorzellen leiten dagegen via IL-4, IL-6, IL-10 und IL-13 eine humorale Immunantwort in Form einer Antikörper-Ausschüttung durch Plasmazellen ein. Eine Th2 Immunantwort wird vor allem durch extrazelluläre Bakterien, Parasiten und Würmer (Helminthen) hervorgerufen. In Autoimmunerkrankungen wie der Psoriasis differenzieren $CD4^+$ T-Zellen unter TGF-β, IL-6, IL-21 und IL-23 zu Th17-Effektorzellen

aus (9). Aufgrund ihrer regulierenden Eigenschaften werden Th17-Zellen mit regulatorischen T-Zellen verglichen.

Zusammengefasst, sind T-Zellen ein zentrales Werkzeug der adaptiven Immunantwort. Eine Fehlregulation kann zu einem immunologischen Ungleichgewicht und somit entweder zu Hyperreaktivität im Sinne von Autoimmunität führen oder zur Toleranzinduktion.

1.1.3. Regulatorische T-Zellen

Treg sind $CD4^+$ T-Zellen mit immunsuppressiven Eigenschaften, die die T-Zellantwort regulieren und dadurch Toleranz vermitteln, um vor Autoimmunität zu schützen.

Circa 2 – 5 % der $CD4^+$ T-Zellen im peripheren Blut sind Treg (10,11) . Abhängig vom Entstehungsort werden natürliche (Thymus-) Treg (nTreg/tTreg), die im Thymus von TECs aus $CD4^+CD25^+$ T-Zellen mit hoher Avidität des TCR zu MHC:Peptid-Komplexen gebildet werden, sowie induzierte (periphere) Treg (iTreg/pTreg) unterschieden. pTreg differenzieren aus $CD4^+$ T-Zellen bei APC:TCR-Kontakt und IL-2/TGF-β (transformierender Wachstumsfaktor β) Stimulation in der Peripherie. Über die Bindung von IL-2 an CD25 (IL2Rα) wird der Transkriptionsfaktor STAT5 aktiviert und fördert die Expression des Treg Transkriptionsfaktors Foxp3, welcher an den suppressiven Eigenschaften der Treg beteiligt ist (12). Treg exprimieren Foxp3 konstitutiv. Obgleich Foxp3 im murinen System ein spezifischer Treg-Transkriptionsfaktor ist, wird Foxp3 im humanen System auch in aktivierten T-Effektorzellen transient hochreguliert. Da die Foxp3 Expression im humanen System nicht Treg-spezifisch ist, wurden humane Treg in der vorliegenden Dissertation durchflusszytometrisch anhand der Markerkombination $CD4^+CD25^+CD127^{low}Foxp3^+$ charakterisiert (11,13).

Treg vermitteln unter anderem Zellkontakt-abhängig suppressive Effekte durch das Checkpoint Molekül CTLA-4 (zytotoxische T-Lymphozyten-assoziiertes Protein 4). $CTLA\text{-}4^+$ Treg binden kompetitiv an die Ko-Stimulatoren CD80/CD86 auf APC und hemmen dadurch die T-Zellaktivierung. Zudem wurden starke suppressive Eigenschaften für HLA-DR (Humanes Leukozyten Antigen-DR Isotyp)$^+$ Treg nachgewiesen (14). Treg binden weiterhin mit hoher Affinität über CD25 (IL-2Rα) kompetitiv das Zytokin IL-2, welches normalerweise die T-Zellproliferation unterstützt und so nicht mehr zur Verfügung steht (15).

Die immunsuppressiven Zytokine TGF-β1, IL-10 und IL-35 setzen die Aktivität der DC und T-Effektorzellen herab, indem die Produktion proinflammtorischer Zytokine wie z. B. TNF-α und IFN-γ in T-Zellen gehemmt wird (16). So modulieren Treg durch IL-10 die Differenzierung der DC durch Inhibition des T-Zell-stimulierenden Zytokins IL-12 (17). Dadurch wird die Expression ko-stimulierender Checkpoint Moleküle (wie CD80, CD86) sowie des MHC:Peptid-Komplexes auf DC gesenkt. Die Kapazität der APC T-Zellen zu aktivieren nimmt ab.

Das Zytokin TGF-β1 hemmt die Expression proinflammatorischer Zytokine in T-Zellen, die T-Zellproliferation, die zytotoxische Kapazität $CD8^+$ T-Effektorzellen und induziert $Foxp3^+$ Treg (18). Treg produzieren TGF-β1 in einer inaktiven, latenten Form, in welcher das TGF-β-Peptid an ein Latenz-assoziiertes Peptid (LAP) gebunden ist. Aktivierte Treg exprimieren nicht nur latentes TGF-β1, sondern auch dessen Rezeptor, GARP (Glykoprotein-A repetitions predominant) (19). GARP-gebundenes latentes TGF-β1 (mLTGF-β) wird in Vesikeln zur Zellmembran transportiert und auf der Zelloberfläche exprimiert. Das inaktive mLTGF-β wird durch z. B. Matrix-Metalloproteasen (MPP) proteolytisch in LAP und das aktive TGF-β1 gespalten (20).

Maligne Erkrankungen nutzen die suppressiven Mechanismen mit Hilfe des Tumormikromilieus (TME, engl. tumor microenvironment) aus, indem $Foxp3^-$ T-Zellen zu $Foxp3^+$ Treg (iTreg) konvertiert werden, um die Tumor-Antigen-spezifische T-Zellproliferation zu unterdrücken. Im Kontrast dazu liegt in Autoimmunerkrankungen wie die Psoriasis ein Mangel funktioneller Treg vor.

1.1.4. Myeloide Suppressorzellen

MDSC sind eine heterogene myeloide Zellpopulation mit immunsuppressiven Eigenschaften und hoher phänotypischer Plastizität, die in der Myelopoiesis unter pathophysiologischen Bedingungen aus unreifen myeloiden Zellen (IMC) entstehen. (21).

Die Entwicklung myeloider Zellen wie z. B. Monozyten, DC und Neutrophilen beginnt im Knochenmark. Dort entstehen aus Hämatopoetischen Vorläuferzellen (HPC, engl. haematopoietic progenitor cell) zunächst myeloide Vorläuferzellen (CMP, engl. common myeloid progenitor) und schließlich Granulozyten-Monozyten-Vorläuferzellen (GMP, engl. granulocyte-monocyte progenitor), welche allgemein als unreife myeloide (IMC) bezeichnet werden (22). Unter physiologischen Bedingungen differenzieren IMC mittels der Wachstumsfaktoren GM-CSF und G-CSF über Monozyten-DC-Vorläuferzellen (MDP) zu Monozyten. Unter GM-CSF und M-CSF differenzieren IMC über Myeloblasten (MB) zu Neutrophilen Vorläuferzellen. Monozyten und Neutrophile Vorläuferzellen gehen in die Blutbahn über und differenzieren im Gewebe über GMC-SF, M-CSF bzw. G-CSF zu DC und Makrophagen bzw. zu Neutrophilen aus.

Eine Infektion, ein Trauma, eine Autoimmunerkrankung oder ein Tumor führen zu einem Abfall/Ab der myeloiden Zellen im peripheren Blut. Während der daraus resultierenden verstärkten „Notfall"-Myelopoiesis gehen vermehrt IMC in die Blutbahn über. Die oben genannten Erkrankungen fördern die Bildung eines chronisch-entzündlichen Milieus, in dem über Wachstumsfaktoren wie G-CSF, M-CSF und insbesondere GM-CSF und VEGF sowie inflammatorische Zytokine wie Il-6, IL-10, IL-1β und PGE2 und Chemokine wie CCL-2 und CCL-

5 anhaltend, schwache Aktivierungssignale an die umliegenden Immunzellen abgegeben werden. Im Kontrast dazu erfolgt die klassische Aktivierung myeloider Zellen über starke, kurzweilige Aktivierungssignale. Unter pathologischen Bedingungen differenzieren MDP bzw. MB unter den oben genannten Faktoren zu M-MDSC und E-MDSC bzw. PMN-MDSC aus (Abb. 2). Die Namensgebung der MDSC orientierte sich an ihrer Morphologie und ihrer Funktion. So werden mononukleäre (M), den Monozyten ähnelnde M-MDSC und polymorphonukleäre (PMN), den Neutrophilen Granulozyten ähnelnde PMN-MDSC unterschieden (22)(23). Eine besonders heterogene Population mit einem unreifen, den IMC ähnelnden Phänotyp und koloniebildende Eigenschaften bilden die frühen (engl. early (E)) E-MDSC (24) (25).

Da MDSC morphologische und phänotypische Merkmale der namensgebenden Zellen besitzen, sind die Oberflächenmoleküle zur Identifizierung der MDSC-Subpopulationen Gegenstand wissenschaftlicher Diskussion (24). In Anlehnung an Mandruzzato et al. wurden hier drei große MDSC-Subpopulationen durchflusszytometrisch identifiziert (26): $CD15^{-}CD14^{+}CD33^{high}HLA\text{-}DR^{low}$ M-MDSC, $CD15^{+}CD33^{+}$ PMN-MDSC und $HLA\text{-}DR^{low}CD11b^{+}CD33^{+}$ E-MDSC.

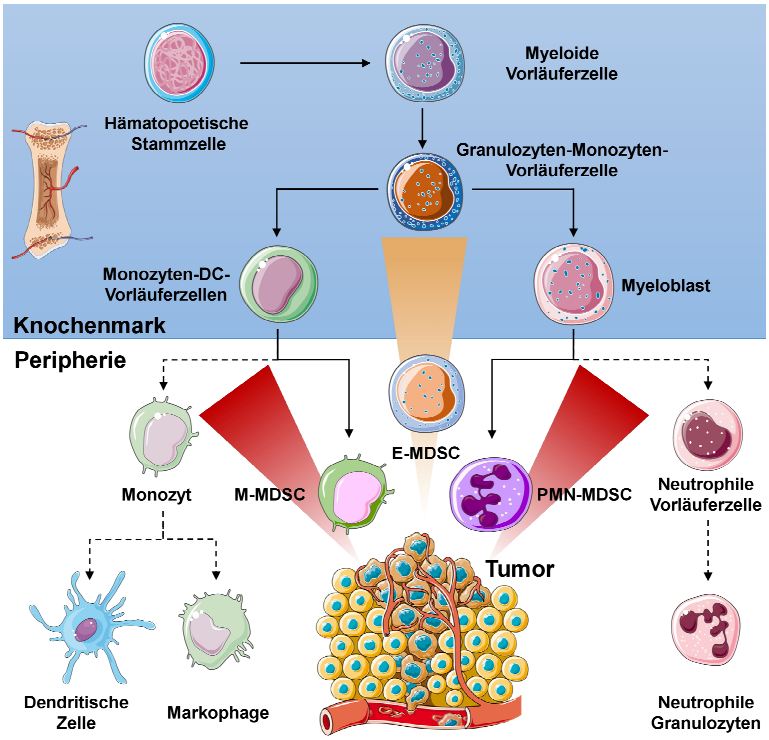


Abbildung 2 Die Entwicklung myeloider Suppressorzellen (MDSC).

Unter physiologischen Bedingungen entwickeln sich unreife myeloide Zellen in der Peripherie entsprechend der gestrichelten Pfeile zu reifen DC, Makrophagen oder Neutrophilen Granunolzyten. Das chronisch entzündliche Milieu eines Tumors verstärkt die Bildung unreifer myeloide Zellen (oranges Dreieck), induziert die Entstehung der MDSC (durchgezogene Pfeile in der Peripherie) und hemmt die physiologische Myelopoiesis (rote Dreiecke). Die Abbildung basiert auf Groth et al. (2019). Erstellt mit LES LABORATOIRES SERVIER, https://smart.servier.com. E-MDSC, engl. early (frühe) MDSC; M-MDSC, mononukleäre MDSC; MDSC, Myeloide Suppressorzellen; PMN-MDSC, polymorphonukleäre MDSC.

MDSC besitzen vielfältige immunsuppressive Mechanismen. So reduzieren sie NO-vermittelt die Zelladhäsion und Extravasation der T-Zellen ins Gewebe, rekrutieren über IL-10 und IFN-γ bzw. TNF-α immunsuppressive M2 Makrophagen und Treg und induzieren durch die Expression ko-inhibitorischer Checkpoint Moleküle wie CTLA-4 und PD-L1 die T-Zell-Anergie und Apoptose. Die T-Zell-Anergie und Apoptose wird durch reaktive Sauerstoff (ROS)- und Stickstoffspezies (NOS) durch Nitrierung des TCR gefördert. MDSC senken die Expression des TCR auf T-Zellen durch ROS, via Nitrierung durch NOS und über die Reduktion von L-Arginin und Cystin z. B. durch das Arginase 1 (27).

MDSC wurden zum ersten Mal im TME beschrieben, in dem sie die adaptive Immunantwort hemmen und dadurch die Tumorprogression und Metastasierung unterstützen (28). Seitdem wurde ihre Rolle in physiologischen und pathologischen Umgebungen untersucht (21). In Patienten mit z. B. Adipositas erhöhen MDSC die Insulin-Sensitivität, induzieren via IL-10 einen M2-Phänotyp in Makrophagen und hemmen die T-Zellproliferation mittels iNOS (Stickstoffmonoxid-Synthase) (29). Während einer Schwangerschaft fördern MDSC die Immunhämostase (Toleranz) zwischen Mutter und Kind und schützen das Neugeborene vor Entzündungen (29).

1.2. Das maligne Melanom

1.2.1. Risikofaktoren, Pathogenese & Klassifikation

Das maligne Melanom (schwarzer Hautkrebs) ist die aggressivste und tödlichste Form des Hautkrebses. Die Prävalenz des malignen Melanoms ist unter anderem abhängig vom Geschlecht und Alter. So sinkt die Inzidenzrate in Frauen ab dem 40. Lebensjahr; Männer erkranken ab dem 75. Lebensjahr dagegen dreimal häufiger als Frauen (30). Patienten mit einer erhöhten Zahl an Muttermalen (melanozytäre Naevi), mit vorherigen Melanom-Erkrankungen bzw. einer familiären Prädisposition, starken Sonnenbränden, einer genetischen Mutation (Mutation p16-Gen, CDK4), einem hellen Hauttyp (Typ 1 & 2) mit geringer Pigmentierung oder blondem, rotem Haar besitzen ein höheres Risiko (31). Neben genetischen Risikofaktoren gibt es auch Umweltfaktoren wie z. B. das UV-Licht, welches aufgrund der Sonneneinstrahlung regional unterschiedlich ist. Der Effekt des UV-Lichts wird im Alltag (wie z. B. durch Sonnenstudios, Sonnenbaden am Strand/Skiurlaub) zumeist unterschätzt und steht neben den Vorsorgeuntersuchungen daher im Mittelpunkt der Präventionsmaßnahmen, welche z. B. in der Verwendung von Sonnencreme, dem Tragen langer, körperbedeckender Kleidung und der Meidung der Sonne bestehen können (32).

Eine wiederholt erhöhte UV-Einstrahlung führt nicht nur zu Sonnenbränden, sondern kann durch genotoxische Effekte in Melanozyten somatische Mutationen hervorrufen, die eine

unkontrollierte Proliferation und so die Bildung eines Melanoms auslösen (33). Durch die Stimulation mit UV-Licht exprimieren Keratinozyten das Melanozyten-stimulierende Hormon (MSH). MSH bindet an den Melanokortin-Rezeptor 1 (MC1R) auf Melanozyten und stimuliert deren Proliferation sowie die Bildung von Melanin (34).

Das Melanom besitzt mit 13,5 Mutationen pro Mega-Basenpaaren eine hohe Tumormutationslast (35). Die Hauptmutationen betreffen Zellteilungs-regulierende Gene wie in 50 – 70 % bzw. 15 – 30 % der Melanome das B-RAF- (BRAF, v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B) bzw. N-RAS-Protoonkogen (NRAS, neuroblastoma RAS viral oncogene homolog) sowie 10 – 15 % das Tumor-Suppressorgen (Anti-onkogen) Neurofibromin 1 (NF1) (36,37). Weitere Mutationen betreffen Zellmetabolimus-regulierende Gene wie z. B. das Anti-onkogen PTEN (Phosphatase und Tensin Homolog) und das Proto-onkogen KIT (Rezeptor Tyrosinkinase). Mutationen in TP53 (Tumorprotein p53) verhindern die Apoptose der Zellen und führen zur unkontrollierten Zellteilung (CDKN2A, Cyclin-abhäniger Kinaseinhibitor-2A alias p16). TERT-Genmutationen (Telomerase Reverse Transkriptase) erhöhen die Telomeraseaktivität, wodurch die Anzahl der natürlichen Zellteilungen überschritten werden kann (Hayflick Grenze) (38). Die Mutationen führen zu einer Hochregulationen des MAPK- sowie des (PI3K)/AKT-Signalweges (39). Daher werden die Mutationen als Zielstrukturen der molekular-gerichteten Therapien der RAS-/BRAF-/MEK-/mTOR-/PI3K- und AKT-Inhibitoren im Stadium IV genutzt.

Die Tumorklassifikation erfolgt anhand der TNM-Klassifikation der S3-Leitlinien und basiert auf Empfehlungen des AJCC (American Joint Commitee on Cancer) (32,40,41) (Abb. 3). Die Behandlung des Melanoms orientiert sich an der Tumordicke (T), dem Lymphknotenbefall (Nodi (N), regionäre Lymphknotenmetastasen) und den Metastasen (M, Fernmetastasen) (Tab. 1). Die T-Klassifikation des Primärtumors bezieht neben dem wichtigsten Faktor, der Tumordicke nach



Abbildung 3 Haut mit superfiziell spreitendem Melanom (SSM).

Anhand der ABCDE-Regel wird ein Pigmentmal entsprechend seiner unregelmäßigen Form (Asymmetrie), Begrenzung und Farbe (Colour), seinem Durchmesser von mehr als 5 mm und seiner Erhabenheit als Melanom-verdächtig eingestuft. Mit freundlicher Genehmigung von Andrea Tüttenberg.

Breslow (-Dicke), auch die Ulzeration und Mitoserate des Tumors ein. Die Anzahl der metastatisch befallenen Lymphknoten sowie das Vorliegen von Intransit-, Satelliten- und/oder Mikrosatelliten-Metastasen bestimmt die N-Klassifikation. Die M-Klassifikation wird anhand des Vorliegens, der Lokalisation der Fernmetastase und des LDH-Wertes bestimmt. Anhand der TNM-Klassifikation wird das Melanom in klinische Stadien zur Behandlung unterteilt (32).

Tabelle 1 Klinische Einteilung der Stadien des malignen Melanoms gemäß AJCC 2016 / UICC 2016 (32)**.**

Stadium	Tumordicke des Primärtumors (pT)-Klassifikation	Regionäre Lymphknotenmetastasen (N)-Klassifikation	Fernmetastasen (M)-Klassifikation
I	In-situ-Tumor (Tis) bis 1,0 – 2,0 mm Tumor ohne Ulzerationen (T2a)	Keine regionären Lymphknotenmetastasen (N0)	Keine (M0)
II	1,0 – 2,0 mm Tumor mit Ulzeration (T2b) bis > 4,0 mm Tumor mit Ulzeration (T4b)	Keine regionären Lymphknotenmetastasen (N0)	Keine (M0)
III	Jede Tumordicke ± Ulzeration (Jedes T, Tis)	Ein metastatisch befallener Lymphknoten oder Intransit-, Satelliten- , ± Mikro-satelliten-Metastasen ohne einen metastatisch befallenen Lymphknoten (≥ N1)	Keine (M0)
IV	Jedes T	Jedes N	Fernmetastasen (M1)

1.2.2. Medikamentöse Therapien im Tumorstadium IV

Die operative Entfernung des Tumors, der befallenen Lymphknoten und Metastasen ist das Mittel der ersten Wahl (32). Konventionelle Chemotherapeutika (Dacarbazin, Bleomycin, Cisplatin) und die Strahlentherapie zeigten im malignen Melanom eine geringere Effektivität als in anderen Tumoren. Seit 2011 sind zur Behandlung des fortgeschrittenen, nicht resektierbaren Melanoms (Stadium IV) neue systemische Therapien wie Tyrosinkinase- und Checkpoint-Inhibitoren auf dem Markt (42,43).

1.2.2.1. Signaltransduktions-Inhibitoren – BRAF- und MEK-Inhibitoren

Melanomzellen mit Mutationen im MAPK/ERK- und PI3K/Akt-Signalweg proliferieren verstärkt (Abb. 4). Die Tyrosin-Kinasen des MAPK-Signalweges sind in 90 % der Melanome mutiert.
Signaltransduktions-Inhibitoren wie z. B. BRAF- (Vemurafenib, Dabrafenib) und MEK-Inhibitoren (Cobimetinib, Trametinib) hemmen die Tyrosinkinasen BRAF und MEK (Mitogen-aktivierte Proteinkinase) im MAPK-Signalweg. 80 – 90 % der BRAF-Mutationen sind Punktmutationen an Codon 600, die zu einem Austausch der Aminosäure Valin durch Glutaminsäure führen

(BRAF^{V600E} Mutation). Seltener wird Valin gegen Lysin (5 – 12 %, V600K) bzw. Aspartamsäure (≤ 5 %, V600D) oder Arginin (≤ 5 %, V600R) ausgetauscht (38,44). Dabrafenib hemmt die Serin-Threonin-(RAF)-Kinasen (wie z. B. B-RAF, C-RAF), während Vemurafenib selektiv mutierte BRAF-Kinasen, insbesondere BRAF^{V600} Mutationen, hemmt. BRAF^{V600}-mutierte Melanomzelllinien proliferieren 50 % schwächer unter 0,016 – 1,131 µM Vemurafenib (IC_{50}, mittlere inhibitorische Konzentration), wohingegen in Wildtyp-Melanomzelllinien eine 12-fach höhere IC_{50} von 12,06 – 14,32 µM Vemurafenib verzeichnet wird. Die Europäische Arzneimittelagentur (EMA) ließ Vemurafenib (Zelboraf®) 2012 zur Monotherapie und 2015 zur Kombinationstherapie mit Cobimetinib (Cotellic®) beim nicht resektierbaren, metastasierten BRAF^{V600}-mutierten Melanom zu (42)(45). Dabrafenib (Tafinlar®) wurde 2013 als Monotherapie und Dabrafenib/Trametinib Kombinationstherapie zugelassen, welche als adjuvante Therapie nach Entfernung eines Melanoms im Stadium III gegeben wird.

Die MEK-Inhibitoren Trametinib und Cobimetinib werden oral eingenommen und hemmen reversibel, selektiv und allosterisch die MEK 1 und 2. Der MEK-Inhibitor Trametinib (Mekinist®) wurde 2014 zur Mono- und Trametinib/Dabrafenib Kombinationstherapie beim nicht resektierbarem, metastasiertem BRAF^{V600}-mutiertem Melanom zugelassen (46).

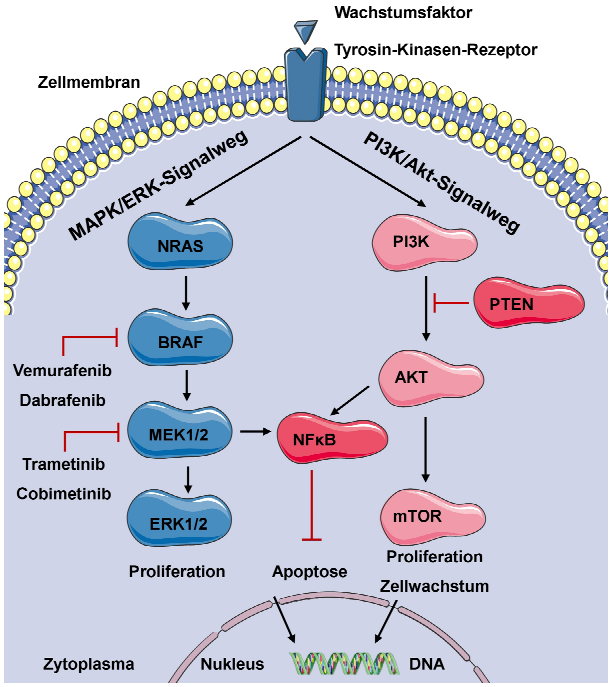


Abbildung 4 Der MAPK/ERK- und PI3K/AKT-Signalweg.

In Melanomen sind die Schlüsselproteine der Signalwege mutiert, wodurch die Proliferation und das Zellwachstum induziert wird. Erstellt mit LES LABORATOIRES SERVIER, https://smart.servier.com. AKT, Proteinkinase B; BRAF, B-RAF Protookogen; ERK1/2, Extrazellulär Signal-regulierte Kinasen; MEK1/2, Mitogen-aktivierte Proteinkinase 1/2; mTOR, engl. mammalian Target of Rapamycin; NFκB, engl. nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells; NRAS, NRAS Protoonkogen; PI3K, Phosphoinositid-3-Kinase; PTEN, Phosphatase and Tensin homolog.

Da Patienten in der Regel nach 6 Monaten eine Resistenz gegen die Monotherapie der Kinase-Inhibitoren entwickeln (47–49), während sie unter den Kombinationstherapien 12 Monate Progressions-freie überleben und zu 70 % ansprechen (50), empfehlen die Leitlinien die Verordnung der Kombinationstherapien.

1.2.2.2. Checkpoint-Inhibitoren

APC aktivieren T-Zellen in drei Schritten, indem sie einen MHC:TCR-Komplex und einen Checkpoint Molekül:Ligand-Komplexes bilden und T-Zellen durch Zytokine stimulieren (4). Ko-stimulierende Checkpoint Molekül:Ligand-Komplexe (APC:T-Zelle z. B. CD80/86:CD28, CD40:CD40L, OX40L:OX40) aktivieren T-Zellen zur Proliferation und Differenzierung; ko-inhibitorische Checkpoint Molekül:Ligand-Komplex (CD80/86:CTLA-4, PD-L1/L2:PD-1) deaktivieren T-Zellen, regulieren die Homöostase und verhindern dadurch eine überschießende Immunantwort (51). T-Zellen regulieren ko-inhibitorische Checkpoint Moleküle als negative Rückkopplung einer T-Zellaktivierung hoch. Dagegen unterdrücken Checkpoint Molekül-exprimierende Tumorzellen die Proliferation der T-Effektorzellen.

Checkpoint-Inhibitoren sind monoklonale Antikörper und werden als Infusion verabreicht. In der vorliegenden Dissertation wurden die gegen PD-1 (anti-programmiertes Zelltodprotein 1) gerichteten Checkpoint-Inhibitoren Nivolumab und Pembrolizumab sowie der gegen CTLA-4 gerichtete Checkpoint-Inhibitor Ipilimumab untersucht. Die Checkpoint-Inhibitoren blocken die ko-inhibitorischen Checkpoint Moleküle auf Tumorzellen und T-Zellen. Dadurch binden verstärkt ko-stimulierende Checkpoint Moleküle der APC an Ligand-Komplexe der T-Zellen und aktivieren die T-Effektorzellen zu einer langanhaltenden Proliferation. Zudem könnten anti-CTLA-4 Checkpoint-Inhibitoren via Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxität (ADCC) oder Phagozytose (ADCP) durch Makrophagen CTLA-4^{+} immunsuppressive Treg depletieren (52)(53).

Mit Hilfe von rekombinanter DNA-Technologie bildet eine aus den Eierstöcken des Chinesischen Zwerghamsters (CHO-Zellen, chinese hamster ovary cells) gezüchtete Zelllinie den vollständig humanen monoklonalen anti-CTLA-4 Antikörper Ipilimumab (Isotyp Immunglobulin G1κ, IgG1κ) (43). Nivolumab ist ein humaner monoklonaler anti-PD-1 Antikörper vom IgG4-Typ (54). 2011 bzw. 2015 ließ die EMA Ipilimumab (Yervoy®) und Nivolumab (Opdivo®) als Monotherapie sowie als Ipilimumab/Nivolumab Kombinationstherapie zur Behandlung des fortgeschrittenen nicht resektierbaren oder metastasierten Melanoms zu.

Der Checkpoint-Inhibitor Pembrolizumab ist ein humanisierter anti-PD-1 Antikörper (Isotyp IgG4κ), der zur Stabilisierung in der Fc-Region des Antikörpers verändert wurde (55). Pembrolizumab (Keytruda®) wurde 2015 als Monotherapie eingeführt, um fortgeschrittene nicht resektierbare oder metastasierte Melanome kurativ sowie Stadium III Melanome mit Beteiligung

des Lymphknotens nach vollständiger Entfernung adjuvant zu behandeln (55).
Laut den Leitlinien von 2018 ist im Stadium IV des malignen Melanoms eine Monotherapie mit anti-PD-1 bzw. eine Kombinationstherapie aus anti-PD-1/-CTLA-4 Checkpoint-Inhibitoren zu verabreichen (32). 70 % der Patienten sprachen auf die Kinase-Inhibitor Monotherapie an, während nur 19 % (ORR, objective response rate), dafür aber langanhaltend auf die Checkpoint-Inhibitor Monotherapie ansprachen (56). In der CheckMate 067 Studie sprachen 58 % der Patienten auf die Ipilimumab/Nivolumab Kombinationstherapie (57). 2017 und 2018 ließ die EMA die ersten anti-PD-L1-Checkpoint-Inhibitoren Atezolizumab (Tecentriq®), Avelumab (Bavencio®) und Durvalumab (Imfinzi®), welche den Checkpoint-Ligand PD-L1 auf APC und Tumorzellen blocken, zu (58).

1.2.3. Tumorentstehung und Toleranz

Laut Thomas und Burnet überwacht das Immunsystem den Körper und löst bei der Entdeckung von Tumor-Neoantigenen eine effektive Immunantwort aus, die Tumorzellen eliminiert, ohne dass diese jemals diagnostiziert werden (Konzept der Immunüberwachung, 1950) (59). Das aktuelle Konzept der Tumor-Immuneditierung beschreibt die Veränderung des Tumors und die daraus resultierende Tumortoleranz des Immunsystems in drei Phasen: (i) die Eliminierung (engl. elimination), (ii) das Gleichgewicht (engl. equilibrium) und (iii) das Entkommen (engl. escape) (60).
Die erste Phase beinhaltet das Konzept der Immunüberwachung. Zytotoxische $CD8^+$ T-Zellen werden durch Tumor-Neoantigen-präsentierende DC aktiviert, binden nach Eindringen in das TME an Neoantigen-präsentierende Tumorzellen und lysieren diese gemeinsam mit NK-Zellen durch Perforine und Granzyme.
Die zweite Phase beschreibt das Gleichgewicht zwischen der Immunantwort und der Immuntoleranz. Durch den immunologischen Selektionsdruck überleben Tumorzellen, die aufgrund epi-/genetischer Instabilität eine geringe TCR-Bindungskapazität der Neoantigene (Antigenität), eine geringere Immunogenität und mangelhafte Antigen-prozessierende Eigenschaften aufweisen (61). So kann beta2-Mikroglobulin (B2M), ein Bestandteil des MHC-I in Tumorzellen mutiert sein. Zytotoxische $CD8^+$ T-Zellen können an den MHC-I auf B2M-mutierte Tumorzellen nicht binden und diese lysieren (62,63). Mutationen der Janus Kinasen (JAK) 1 und 2 in Tumorzellen hemmen den IFN-γ Signalweg und damit Neoantigenpräsentation (63). Patienten mit primären und sekundären Resistenzen unter Checkpoint-Inhibitor Therapie wiesen Mutationen im IFN-Signalweg (Genkopie-, Genfunktionsverlust) auf (64). Eine aktivierende STAT-1 Mutation in Tumorzellen aktiviert den IFN-γ Signalweg anhaltend und reguliert ko-inhibitorische Moleküle wie z. B. PD-L1 und IDO auf Tumorzellen hoch, um die Proliferation

$CD8^+$ T-Effektorzellen zu hemmen (65).

Kippt das Gleichgewicht (Equilibrium) zu Gunsten der Tumortoleranz, wird die Tumorzelle vom Immunsystem geduldet. Damit beginnt die dritte Phase der Tumor-Immuneditierung, das unkontrollierte Tumorwachstum.

Mutationen in Tumorzell-intrinsischen Signalwegen sind eine „angeborene" Tumorstrategie zur Umgehung des Immunsystems, die zum Ausschluss der Immunzellen aus dem TME führt (engl. innate evasion). Die Aktivierung des WNT/β-Catenin-Signalweges senkt durch β-Catenin die CCL4-Expression und rekrutiert dadurch weniger Batf3 ($CD103^+$) DC in das TME (66). Dadurch werden weniger T-Zellen im Tumor-drainierenden Lymphknoten aktiviert, was wiederum die Einwanderung von T-Effektorzellen in den Tumor senkt. Funktionsverlustmutation des PTEN Gens haben vielfältige Effekt: Der PTEN-Funktionsverlust hemmt die Autophagie-Gene LC3I und LC3II und senkt dadurch die Fähigkeit der Tumorzellen Antigene zu präsentieren und APC zu aktivieren, wodurch weniger Tumorantigen-spezifische T-Zellen gebildet und in das TME rekrutiert werden (67). Ein PTEN-Verlust verstärkt via CCL2 die VEGF Expression, wodurch die Angiogenese unterstützt und der Fas-Ligand auf Tumorendothelzellen hochreguliert wird. Die Bindung des Fas-Liganden an T-Zellen leitet die Apoptose ein. Zudem aktiviert ein PTEN-Funktionsverlust den Zellteilung-induzierenden PI3K/Akt-Signalweg. Durch einen PTEN-Funktionsverlust und Mutationen im MAPK/ERK-Signalweg durch NRAS/KRAS-, MEK-Mutationen, BRAF Gen-Vervielfältigung, BRAF Spleißvarianten erwerben Tumorzellen so Resistenzen gegen BRAF-/MEK-Inhibitoren (68–70).

Extrinsische Mechanismen der Tumortoleranz begünstigen durch Rekrutierung und Induktion immunsuppressiver Immunzellen (MDSC, Treg, TAM) die Expression immunsuppressiver Faktoren (IL-10, TGF-β, Galectin-1) durch Tumor- und Immunzellen. Die Hypoxie im TME unterstützt die Bildung von Th17/Treg-Zellen, senkt die NK-Zell Zytotoxizität und rekrutiert MDSC, Treg und TAM. Diese produzieren durch den Hypoxie-induzierten Faktor 1α (HIF-1α) das Enzym Arginase 1. Arginase 1 baut die essentielle Aminosäure Arginin ab, reguliert so den TCR auf T-Zellen herab und trägt dadurch zur Inaktivierung der T-Zellen bei.

Zusätzlich erschwert ein geringer Nährstoffgehalt und pH-Wert die Funktion der Immunzellen. Durch die starke Proliferation besitzen Tumorzellen einen hohen Grundumsatz. Um diesen zu decken, stellen Tumorzellen dem Metabolismus von der oxidativen Phosphorylierung auf die Glykolyse (Warburg-Effekt) um (71). Eine mangelhafte Durchblutung des Tumors führt zur anaeroben Glykolyse. Durch die Spaltung von Pyruvat durch das Enzym Laktatdehydrogenase (LDH) zu Laktat steigt die Laktat-Konzentration im TME an und senkt den pH-Wert.

In Patienten mit einer primären Resistenz gegenüber Checkpoint-Inhibitor Therapien konnten $CD8^+$ T-Effektorzellen nicht in das TME eindringen (72). Sekundäre, erworbene Resistenzen

werden auf Tumorzell-intrinsische adaptive Umgehungsstrategien zurückgeführt (73). Durch Kombinationstherapien soll die Entstehung von Toleranzmechanismen durch die Blockade verschiedener, alternativer Signalwege verhindert bzw. herausgezögert werden.

1.3. Die Psoriasis

1.3.1. Das Krankheitsbild der Psoriasis

Im Gegensatz zum malignen Melanom, welches die Immunantwort unterdrückt, liegt in der Autoimmunerkrankung Psoriasis eine Überregulation der Immunantwort vor. Die Psoriasis (Schuppenflechte) ist eine chronisch wiederkehrende entzündliche Autoimmunerkrankung der Haut, die schubweise verläuft (74). Als Systemerkrankung ist die Psoriasis mit einer Vielzahl von Begleiterkrankungen wie z. B. den Herz-Kreislauf- und psychiatrischen Erkrankungen sowie Gelenkbeteiligungen (Psoriasis arthritis, PsA) assoziiert. In Deutschland litten 2005 2 – 2,5 % der Bevölkerung an Psoriasis (75).

Die Psoriasis wird entsprechend ihres Krankheitsbeginns (Typ I, II) und ihres klinischen Erscheinungsbildes klassifiziert. Eine Manifestation vor dem 40. Lebensjahr (Typ I) wird durch eine genetische Prädisposition begünstigt und betrifft Gene, welche unter anderem die Antigenpräsentation (HLA-Cw6, PSORS1 Gene) und Mechanismen der Entzündung kodieren. Eine Manifestation nach dem 40. Lebensjahr wird als Typ II bezeichnet. Im Gegensatz zum Typ II weißt der Typ I eine schwerere, häufig wiederkehrende Verlaufsform auf (76). Entsprechend dem Erscheinungsbild sollen beispielhaft die Psoriasis vulgaris, pustulosa, arthritis sowie Nagelpsoriasis beschrieben werden. Die Psoriasis vulgaris (allg. Psoriasis, Plaque-Psoriasis) ist mit 90 % die häufigste Form der Psoriasis (Abb. 5). Sie zeichnet sich durch scharf abgegrenzte, rötliche, erhabene, juckende Hautstellen mit weißen, silbrigen Schuppen (Plaque) aus, die eine unregelmäßige Form und Größe besitzen werden. Die Psoriasis vulgaris befällt primär den Kopf, den Rumpf und die Extremitätenstreckseiten (wie z. B. Ellenbogen und Knie) (77).



Abbildung 5 Psoriasis-Plaque.

Mit freundlicher Genehmigung von Joanna Wegner.

Die Psoriasis pustulosa ist eine seltene Form der Psoriasis (Prävalenz: 1 – 9 Patienten in 1 Million) und zeichnet sich durch trübe mit Eiter gefüllte, nicht infektiöse Bläschen (Pusteln) aus (77). Die Pusteln können einzeln oder ineinanderfließend am Körper verstreut sowie an den Händen und Füßen (Typ Zumbusch) oder lokal begrenzt (Typ Königsbeck-Barber) auftreten.
Die Psoriasis arthritis (PsA) ist eine psoriatrische Entzündung der Gelenke und/oder Wirbel. 2012 wurde für die PsA in Deutschland eine Prävalenz von 2,1 – 2,5 (pro 1000) ermittelt (78). PsA tritt in bis zu 40 % der Psoriasis-Patienten auf. 80 % der PsA-Patienten und mehr als 50 % der Psoriasis-Patienten weisen zudem einen Befall der Nägel auf (77). In nur 5 – 10 % der Fälle tritt die Nagelpsoriasis als alleinstehendes Symptom auf. Entzündungen des Nagelbettes zeichnen sich durch gelbliche, leicht durchsichtige Flecken (Ölflecken), Nagelablösung (Onycholyse), bräunliche Streifen (Splitterblutungen) und subunguale Hyperkeratose aus. Veränderungen der Nagelmatrix treten als Stecknadel große Löcher (Tüpfelnägel), weiße Verfärbungen (Leukonychie), Entzündungen des Nagelmöndchens (Lunulaerythem) und deformierte Nägel (Onychodystrophie) auf.
Die Pathogenese der Psoriasis ist abhängig von der Form der Psoriasis (79,80) (Abb. 6). Im Folgenden werden die Hauptmechanismen der Psoriasis vulgaris beschrieben (77). Die psoriatrische Haut weist eine Vergrößerung der Epidermis (Stachelzellschicht) und eine Einwanderung von Immunzellen (wie z. B. DC, Makrophagen, T-Zellen, Natürliche Killerzellen) auf. DC werden durch Autoantigene wie z. B. LL37 und antimikrobielle Proteine (AMP) wie z. B. β-Defensine und S100 Proteine aktiviert. Beschädigte hornbildende Zellen der Epidermis, die Keratinozyten, setzen AMP und proinflammatorischer Zytokine (IL-1, IL-6, IFN-γ, TNF-α) und Chemokine frei und unterstützen die Bildung des entzündlichen Milieus der Psoriasis. Dies begünstigt die Differenzierung der Treg zu Th17/Treg Zellen. Yang et al. zeigten, dass IL-6 allein bzw. in Kombination mit IL-1, IL-21 oder IL-23 die STAT3 Phosphorylierung (pSTAT3), die Transkription von RORγt und die Th17 Differenzierung induzierten (121). Der Transkriptionsfaktor STAT3 blockt den Treg Transkriptionsfaktor Foxp3, wodurch d Treg und/oder die suppressive Kapazität gesenkt werden kann (122,123). Komplexe aus LL37 und DNA (Desoxyribonukleinsäure) bzw. RNA (Ribonukleinsäure) induzieren über die Toll-like Rezeptoren (TLR)-9 und -7 in plasmazytoiden DC (pDC) die IFN Typ 1 Bildung und die Ausreifung unreifer DC.
Reife DC modulieren durch TNF-α, IL-12 und IL-23 die Differenzierung der Th1- und Th17-Zellen und fördern dadurch die Hyperproliferation der T-Zellen. T-Zellen aktivieren Keratinozyten durch proinflammatorischen Zytokine wie z. B. IL-17, IL-21, IL-22 und IFN-γ zur Proliferation.

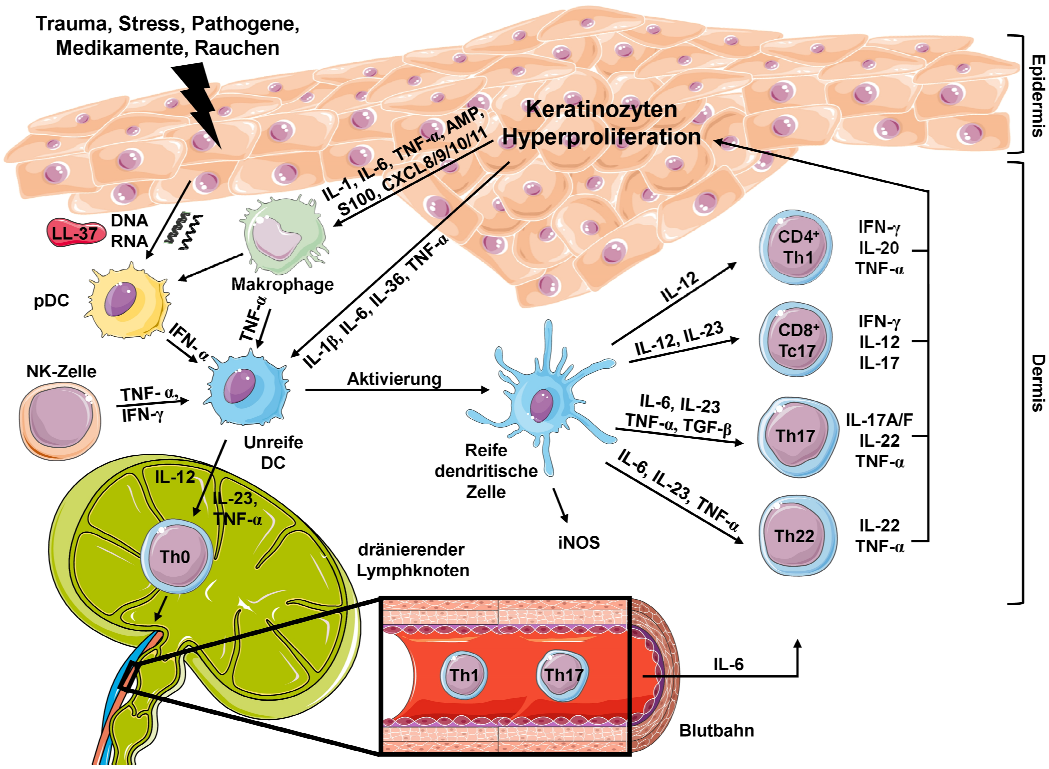


Abbildung 6 Die Pathogenese der Psoriasis.
Triggerfaktoren wie z. B. ein Trauma aktivieren dendritische Zellen, führen zur Einwanderung von Immunzellen in die Epidermis und Dervis und erhalten die Keratinozyten-Hyperproliferation über die Zytokine IL-17/IL-23 aufrecht. Erstellt mit LES LABORATOIRES SERVIER, https://smart.servier.com. AMP, anti-mikrobielle Proteine; CXCL, CXC-Motiv-Chemokin; DNA, Desoxyribonukleinsäure; IFN, Interferon; iNOS, induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase; NK-Zelle, Natürliche Killerzelle; pDC, plasmazytoide DC; Tc, zytotoxische T-Zelle; TNF, Tumornekrosefaktor.

Die Psoriasis kann durch Umweltfaktoren wie z. B. Stress, ein schwaches Immunsystem (AIDS, acquired immune deficiency syndrome), hormonelle Veränderungen (wie z. B. Wechseljahre, Menstruation), Medikamente (wie z. B. β-Blocker) sowie Reizungen der Haut durch Verletzungen ausgelöst werden (81). Der Schweregrad der Psoriasis wird klinisch durch den Psoriasis Area and Severity Index (PASI) mit einer Punktzahl 0 bis 72 ermittelt (82). Der PASI berechnet sich aus der betroffenen Körperfläche (BSA, engl. body surface area) des Rumpfes, der Arme, der Beine und des Kopfes und der Symptomstärke der Rötung, Dicke sowie Schuppung der Plaque. Studien werten eine Reduktion des PASI um 75 % als Therapieansprechen.

1.3.2. Systemische und topische Therapie der Psoriasis

Die Therapie der Psoriasis richtet sich nach dem Schweregrad der Erkrankung (PASI), der Lebensqualität der Patienten (DLQI, Dermatologischer-Lebensqualitäts-Index) und den Begleiterkrankungen (wie z. B. PsA oder chronisch entzündliche Darmerkrankungen) (82). Leichte und mittelschwere Formen der Psoriasis werden topisch mit Dithranol, Glukokortikoiden,

Vitamin-D3-Derivaten und Phototherapie behandelt. Schuppen können durch Salben mit einem hohen Anteil an Harnstoff und Salicylsäure entfernt werden.

Mittelschwere bis schwere Erkrankungen werden mit einer Photo- und systemischen Therapie behandelt. In der systemischen Therapie der Psoriasis werden kleine Moleküle als Immunsuppressiva und Biologika eingesetzt. In der vorliegenden Dissertation wurden Patienten mit den Biologika-Primärtherapien Secukinumab und Adalimumab sowie den Sekundärtherapien Ustekinumab und Etanercept behandelt. Biologika werden im Unterschied zu Immunsuppressiva nicht oral, sondern subkutan angewendet und blocken ein spezifisches Zielprotein (z. B. ein Zytokin). Secukinumab (Cosentyx®) und Ustekinumab (Stelara®) sind humane monoklonale Antikörper vom IgG1κ-Typ, die an das Zytokin IL-17A (Secukinumab) bzw. an die p40 Untereinheit der Zytokine IL-12 und IL-23 (Ustekinumab) binden (74). So wird der in der Psoriasis pathologisch aktivierte IL-23/Th17/IL-17-Signalweg gehemmt (77).

Der humane monoklonale Antikörper Adalimumab (Humira®) und das Rezeptorfusionsprotein Etanercept (Enbrel®) binden das proinflammatorische Zytokin TNF-α. Etanercept ist ein dimeres Fusionsproteins aus der extrazellulären Ligandenbindungsdomäme p75 des humanen Tumornekrosefaktor-2 (TNFR2/p75) und der Fc-Domäne eines humanen IgG1 Antikörpers (74). Die vorgestellten Biologika werden sowohl in der Psoriasis vulgaris als auch in der Psoriasis arthritis eingesetzt.

Die untersuchten Patienten erhielten die Immunsuppressiva-Primärtherapien Methotrexat (MTX), Cyclosporin A (CsA), Fumarat (Dimethylfumarat (DMF), Monoethylfumarat (MEF)) oder die Sekundärtherapie Apremilast. Die Wirkmechanismen der Medikamente sollen im Folgenden kurz vorgestellt werden.

Das Folsäure-Analogon MTX blockt durch die Hemmung der Dihydrofolat-Reduktase die Thymidin- und Purin-Biosynthese. MTX unterbindet dadurch die DNA-Synthese und führt zur Apoptose der hyperproliferierenden T-Zellen. Der Calcineurin-Inhibitor CsA erschwert durch die Reduktion des Zytokins IL-2 die T-Zellaktivierung (77). Für DMF (Fumaderm®) und seinen Metabolit MEF werden zwei Wirkmechanismen diskutiert. Zum einen wird durch Wechselwirkungen mit intrazellulärem Glutathion die Translokation des Transkriptionsfaktors NFκB in den Zellkern verhindert, wodurch die Transkription proinflammatorischer AMPs und Zytokine gesenkt wird. Zum anderen zeigt DMF einen Phänotyp-modulierenden Effekt: Proinflammatorische Th1- und Th17-Zellen entwickeln einen antiinflammatorischen Th2-Phänotyp (83). Der Phosphodiesterase-4 (PDE-4)-Hemmer Apremilast (Otezla®) erhöht intrazellulär das zyklische Adenosinmonophosphat (cAMP). cAMP behindert die Entwicklung des proinflammatorischen Milieus der Psoriasis, indem es die Expression der Zytokine IL-17, IL-23 und TNF-α senkt und die Produktion des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 fördert.

In Studien werden unter anderem neue mAbs (αIL-17/IL23), der Adenosin-A3-Rezeptor-Inhibitor Piclidenoson®, der Neurokinin-1 Rezeptor-Antagonist Serlopitant® sowie RORγT-Inhibitoren untersucht (77).

1.4. Zielsetzung

Dem malignen Melanom und der Autoimmunerkrankung Psoriasis ist ein chronisches, entzündliches Milieu gemein. Das Gleichgewicht zwischen aktivierenden und regulierenden Immunzellen, die Immun-Homöostase, ist im Tumor hinsichtlich der regulierenden Immunzellen beeinflusst, bei der Psoriasis zu Gunsten der aktivierenden Immunzellen.

Tumorzellen hemmen die Differenzierung, Proliferation und Funktion der T-Effektorzellen durch immunsuppressive Immunzellen wie z. B. Treg, MDSC und TAM und antiinflammatorischer Zytokine. Infolgedessen proliferieren Tumorzellen unkontrolliert.

Im Gegensatz dazu steht in der Psoriasis eine überschießende autoimmun-vermittelte Immunantwort in Form einer T-Zellhyperproliferation den funktionell beeinträchtigten regulatorischen Treg und Th17/Treg gegenüber.

Das Therapieziel ist bei beiden Erkrankungen die Herstellung der Immun-Homöostase. Dazu hemmen BRAF-/MEK-Inhibitoren im malignen Melanom die mutierten Signalwege, welche zur unkontrollierten Tumorzellproliferation führen. Checkpoint-Inhibitoren unterstützen die adaptive Immunantwort der T-Zellen und depletieren immunsuppressive Treg. Bei der Psoriasis-Therapie hemmt die T-Zellhyperproliferation durch Transkription und Produktion proinflammatorischer Zytokine.

Therapien verursachen unerwünschte Ereignisse (UE, engl. AE) und Arzneimittelwirkungen (UAW, engl. ADR). So hemmen z. B. MEK-Inhibitoren nicht nur die Proliferation der Tumorzellen, sondern auch die der schnell proliferierenden gesunden Zellen. Die Untersuchung der Effekte der BRAF-/MEK- und Checkpoint-Inhibitoren ist von besonderem Interesse, da schwere, immunologisch-bedingte unerwünschte Ereignisse (IRAE) Therapieabbrüche erforderlich machen. Zudem ist ein Therapieversagen mit reduzierter Lebensqualität und Gesamtüberleben verbunden und verursacht unnötige Kosten. Eine potentielle Verstärkung der UAW bei Kombinationstherapien aus BRAF-/MEK- und Checkpoint-Inhibitoren ist umso wichtiger geworden, da die aktuellen Leitlinien zur Therapie des malignen Melanoms diese Kombinationstherapien empfehlen (32).

Ein starkes, funktionierendes Immunsystem sowie ein Tumor mit starker T-Zellinfiltration begünstigen ein Ansprechen auf eine Checkpoint-Inhibitor Therapie (84). Derzeit gibt es für die Checkpoint-Inhibitor Therapie jedoch keine prädiktiven bzw. prognostischen Biomarker (85). Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollte daher untersucht werden, welche Effekte die

genannten Therapien im malignen Melanom sowie in der Psoriasis auf verschiedene Immunzellen zeigen. Die Fragestellungen wurden anhand von drei Themenfeldern untersucht:

(I) Zur Untersuchung von prädiktiven zellulären Biomarkern im peripheren Blut von Melanompatienten unter Checkpoint-Inhibitor Therapie wurden vor sowie 1 bis 3 Wochen nach Therapiebeginn der Prozentsatz und die funktionelle Kapazität der Immunzellen durchflusszytometrisch ermittelt und verglichen. Molekulare Biomarker im peripheren Blut wurden routinemäßig in der klinischen Chemie bestimmt, im Plasma via nanoUPLC (engl. nanoflow ultra-performance liquid chromatography) und UDMS^{E} (engl. Ultra-definition tandem mass spectrometry (E)) identifiziert und via ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) validiert.

(II) Um die Effekte von BRAF-/MEK-Inhibitoren auf Tumorantigen-präsentierende Zellen, wie beispielsweise dendritischer Zellen (DC) zu untersuchen, wurde der Phänotyp und die Funktion *in vitro* behandelter DC durchflusszytometrisch, kolorimetrisch und via RT-qPCR gemessen.

(III) Bei der Behandlung von Patienten mit Psoriasis wird ein Therapieansprechen unter anderem durch eine Reduktion des PASI bestimmt. Um den Zusammenhang des PASI unter topischer und systemischer Therapie mit dem Prozentsatz und der funktionellen Kapazität der regulatorischen Immunzellen zu untersuchen, wurden MDSC und Treg im peripheren Blut von Psoriasis-Patienten durchflusszytometrisch gemessen.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2 Verbrauchsmaterialien und sonstige Materialien.

Produktname	Katalognummer	Hersteller
96-well Mikrotiter-Rundbodenplatten	650101	ThermoFisher Scientific (Greiner Bio-One™), Waltham (MA, USA)
Ampliseal Verschlussfolie für qPCR	676040	ThermoFisher Scientific (Greiner Bio-One™), Waltham (MA, USA)
CELLSTAR® Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	227261, 188261	Greiner Bio-One, Kremsmünster (AU)
Combi-Stopper Verschlusskonen, rot	4495101	Braun, Melsungen (DE)
Costar® 6-well Kulturplatte (zellkulturbehandelt, steril)	3506	Corning, Corning (NY, USA)
Corning® 96-well durchsichtige Flachbodenplatte Polystyrene (PS) mit Deckel (zellkulturbehandelt, steril)	3598	Corning, Corning (NY, USA)
Corning® 100 mm Kulturschale (zellkulturbehandelt)	430167	Corning, Corning (NY, USA)
Falcon® 5 mL Rundboden Polystyren Röhrchen	352008	Corning, Corning (NY, USA)
MACS LS Zellseparations-Säule	130-042-401	Miltenyi, Bergisch Gladbach (DE)
MACS MultiStand	130-042-303	Miltenyi, Bergisch Gladbach (DE)
Nunc™ Kryoröhrchen	377267	ThermoFisher Scientific (Thermo Scientific™), Waltham (MA, USA)
Nunc MaxiSorp™ Flachbodenplatte	44-2404-21	ThermFisher Scientific (Invitrogen™), Waltham (MA, USA)
Omnifix® Einmalspritzen, Luer 20 ml, exzentrisch	4616200V	Braun, Melsungen (DE)
Parafilm M 10cm/75m	291-1212	vwr, Lutterworth (UK)
Polyesterfolie, nicht steril	391-1250	vwr, Lutterworth (UK)
QuadroMACS Zellseparator	130-090-976	Miltenyi, Bergisch Gladbach (DE)
Reagiergefäß 0,5 ml SafeSeal	72.704.400	Sarstedt, Nümbrecht (DE)
Reagiergefäß 1,5 ml SafeSeal	72.706	Sarstedt, Nümbrecht (DE)
S-Monovette® 7,5 ml, Lithium-Heparin	01.1604	Sarstedt, Nümbrecht (DE)
Sapphire Mikroplatten 96-well	652260	ThermoFisher Scientific (Greiner Bio-One™), Waltham (MA, USA)
Zählkammern, Neubauer, Improved, hell-linig, BLAUBRAND®	717810	Brand, Wertheim (DE)
Zellkulturflasche 75 cm^2 (Filterschraubkappe)	90076	TPP, Trasadingen (CH)

2.1.2. Chemikalien, Sets, Medien & Puffer

Tabelle 3 Chemikalien.

Produktname	Katalognummer	Hersteller
3,3‘,5,5‘-Tetramethylbenzidine (TMB)	T2885	Merck (Sigma-Aldrich), Darmstadt (DE)
Albumin, Bovines Serum, Fraktion V, RIA und ELISA Grad (BSA)	126593	Merck (Sigma-Aldrich), Darmstadt (DE)
Ampuwa® Plastipur®	1088813	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg (DE)
BIOCOLL Dichte 1,077 g/ml, isotonisch	L 6113	Merck (Biochrom), Darmstadt (DE)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	D2650	Merck (Sigma-Aldrich), Darmstadt (DE)
di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat (Na_2HPO_4 x 2 H_2O)	T877.2	Carl Roth, Karlsruhe (DE)
EDTA Lösung pH 8,0 (0,5 M)	A3145	AppliChem GmbH, Darmstadt (DE)
Ethanol 70 % vergällt	T913.1	Carl Roth, Karlsruhe (DE)
Ethanol 100 %, unvergällt	P075.3	Carl Roth, Karlsruhe (DE)
Fötales Kälberserum (FBS)	10270106	ThermoFisher Scientific (Gibco™), Waltham (MA, USA)
ROTI® Cell Glutamin-Lösung	9183.1	Carl Roth, Karlsruhe (DE)
Human-Albumin 20 % Behring (HSA), salzarm Infusionslösung (200 g/l)	00504775 (PZN)	CSL Behring GmbH, Marburg (DE)
Isopropylalkohol DAB	7474907 (PZN)	Hedinger, Stuttgart (DE)
Natriumchlorid (NaCl) ≥ 99,5 %, p. a., ACS, ISO	3957.2	Carl Roth, Karlsruhe (DE)
Natriumdihydrogenphsphat ≥ Dihydrat (NaH_2PO_4 x 2 H_2O) 99 %, p. a.	T879.1	Carl Roth, Karlsruhe (DE)
85 % ortho-Phosphorsäure (H_3PO_4)	6366.1	Carl Roth, Karlsruhe (DE)
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	P1585-1MG	Merck (Sigma-Aldrich), Darmstadt (DE)
Privigen® 100 mg/ml	01711559 (PZN)	CSL Behring GmbH, Marburg (DE)
Trypanblau Lösung 0,4 %	T8154	Merck (Sigma-Aldrich), Darmstadt (DE)
Tween® 20 Ph.Eur.	9127.1	Carl Roth, Karlsruhe (DE)
Wasserstoffperoxid 30 % Ph.Eur.	9681.4	Carl Roth, Karlsruhe (DE)
Zitronensäure ≥ 99,5 %, Ph.Eur.	6490.3	Carl Roth, Karlsruhe (DE)

Tabelle 4 Sets.

Produktname	Katalognummer	Hersteller
BD Cytometric Bead Array (CBA) Humane inflammatorische Zytokine	551811	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes (NJ, USA)
FLICA 660 *in vitro* Caspase-1 Detektionsset	9122	ImmunoChemistry Technologies, Bloomington (MN, USA)
Human Afamin DuoSet ELISA	DY8065-05	R&D Systems, Minneapolis (MN, USA)

Human Serpin F1/PEDF DuoSet ELISA	DY1177-05	R&D Systems, Minneapolis (MN, USA)
PE Annexin V Apoptose Detektion Set I	559763	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes (NJ, USA)

Tabelle 5 Kommerziell erworbene Medien & Puffersets.

Produktname	Katalognummer	Hersteller
BD Fixierungs/ Permeabilisierungs-Lösungs Set mit BD GolgiStop™	554715	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes (NJ, USA)
Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung (DPBS)	D8537	Merck (Sigma), Darmstadt (DE)
eBioscience™ Foxp3 / Transkriptionsfaktor Färbepuffer Set	00-5523-00	ThermoFisher Scientific (Invitrogen™), Waltham (MA, USA)
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)	12-722F	Lonza, Basel (CH)
RPMI 1640 Medium	21870076	ThermoFisher Scientific (Gibco™), Waltham (MA, USA)
RPMI 1640 Medium (ohne Glutamin, Phenolrot)	32404014	ThermoFisher Scientific (Gibco™), Waltham (MA, USA)
X-Vivo™ 15	BE02-060F	Lonza, Walkersville (MD, USA)

Tabelle 6 Selbst angesetzte Puffer.

Puffer	Zusammensetzung
PBS (1x PBS)	100 ml 10 x PBS + 900 ml Ampuwa® Plastipur® (pH 7,2)
10 x PBS	409 g NaCl (1,4 M) + 78 g NaH_2PO_4 x 2 H_2O (0,1 M) ad 5 l Ampuwa® Plastipur® (pH 6,6 mit 50 % NaOH)
Einfriermedium	2 ml DMSO + 8 ml HSA 20 %
FACS-Puffer	1 l PBS + 25 ml HSA 20 % (0,5 %) + 2 ml 0,5 M EDTA Lösung pH 8 (1mM) + 100 µl 100 mg/ml Privigen (10 µg/ml)
MACS-Puffer	1l 1x PBS+ 6 ml 0,5 M EDTA Lösung pH 8 (3 mM) + 25 ml HSA 20 % (0,5 %)
PBS-EDTA Puffer	2 ml 0,5 M EDTA Lösung (pH 8,0) (1 mM) + 1 l1x PBS

Tabelle 7 ELISA Stammlösungen und Puffer .

Puffer	Zusammensetzung
di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat (0,2 M)	35,598 g Na_2HPO_4 x 2 H_2O ad 1 l Ampuwa® Plastipur®
Phosphat-Citrat-Puffer (0,05 M; pH 5)	25,7 ml 0,2 M Na_2HPO_4 x 2 H_2O + 24,3 ml 0,1 M Zitronensäure + 50 ml Ampuwa® Plastipur ®
TMB Substratlösung	1 ml TMB-Stammlösung (1 mg/ml) + 9 ml 0,05 M Phosphat-Citrat-Puffer (pH 5)
TMB Stammlösung (1 mg/ml)	10 mg TMB + 10 ml DMSO
TMB Stopplösung (1 M H_3PO_4)	61, 66 ml 85 % ortho-Phosphorsäure + 938,34 ml Ampuwa® Plastipur®
Verdünnungs-/ Blockierungspuffer	1 % BSA (ELISA Qualität) in 1 x PBS pH 7,2
Waschpuffer	0,05 %V/V Tween® 20 in PBS pH 7,2
Zitronensäure (0,1 M)	19,313 g Zitronensäure ad 1 l Ampuwa® Plastipur®

2.1.3. Arzneimittel & Zytokine

Tabelle 8 Experimentell verwendete Arzneimittel.

Produktname	Katalognummer	Hersteller
Cobimetinib (GDC-0973)	S8041	Selleck Chemicals, Houston (TX, USA)
Dabrafenib (GSK2118436)	S2807	Selleck Chemicals, Houston (TX, USA)
Heparin-Natrium-25000-ratiopharm®	03029843 (PZN)	Ratiopharm, Ulm (DE)
Trametinib (GSK1120212)	S2673	Selleck Chemicals, Houston (TX, USA)
Vemurafenib (PLX4032)	S1267	Selleck Chemicals, Houston (TX, USA)

Tabelle 9 Zytokine.

Produktname	Katalognummer	Hersteller
rh IL-1β for preclinical ex vivo use	1411-010	Cellgenix, Freiburg (DE)
rh IL-4	1134004550	ImmunoTools, Friesoythe (DE)
rh IL-6	11340064	ImmunoTools, Friesoythe (DE)
Humanes TNF-α, Premiumgrad	130-094-022	Miltenyi, Bergisch Gladbach (DE)
Leukine® Sargramostim (GM-CSF)	0024-5843-05 (NDC)	Sanofi, Bridgewater (NJ, USA)
PROLEUKIN® S (IL-2)	02238131 (PZN)	Novartis, Basel (CH)
Prostaglandin E_2 (PGE2)	14010	Cayman Chemical, Ann Arbor, (MI, USA)

2.1.4. Antikörper & MikroBeads

Sofern nicht anders angezeigt, war die Reaktivität der verwendeten Antikörper und MikroBeads anti-human.

Tabelle 10 Primäre Antikörper zur Durchflusszytometrie oder Zellstimulation.

Spezifität	Fluorophor	Klon	Wirtsart Isotyp	Dilution	Katalognr.	Hersteller
CD3	unkonjugiert	OKT3	Maus IgG2a, κ	0,5 µg/ml	BE0001-2	Bioxcell, Lebanon (NH, USA)
CD80	unkonjugiert	2D10	Maus IgG1, κ	1:500	305202	BioLegend, San Diego (CA, USA)
CD86	unkonjugiert	BU63	Maus IgG1	1:200	MCA1118T	Bio-Rad, Hercules (CA, USA)
MHC II (HLA-DR)	unkonjugiert	YD1/6 3.4.10	Ratte IgG2a	1:50	MA1-70113	ThermoScientific (Invitrogen™), Waltham (MA, USA)

Tabelle 11 Sekundäre Fluorophor-markierte Antikörper zur Durchflusszytometrie.

Spezifität	Fluorophor	Klon	Wirtsart Isotyp	Dilution	Katalognr.	Hersteller
Anti-Maus IgG (H+L)	R-PE	Polyklonal	Esel IgG ($F(ab')_2$)	1:100	715-116-153	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove (PA, USA)
Anti-Ratte IgG (H+L)	FITC	Polyklonal	Esel IgG ($F(ab')_2$)	1:100	DkxRt-003-LFITC	Dianova, Hamburg (DE)

Tabelle 12 Direktkonjugierte Fluorophor-markierte Antikörper zur Durchflusszytometrie.

Spezifität	Fluorophor	Klon	Wirtsart Isotyp	Dilution	Katalognr.	Hersteller.
Arginase 1 (ARG1)	APC	#658922	Maus IgG2b	1:20	IC8026A	R&D Systems, Minneapolis (MN, USA)
CD3	APC/Fire™ 750	SK7	Maus IgG1, κ	1:20	344840	BioLegend, San Diego (CA, USA)
CD3	FITC	UCHT1	Maus IgG1, κ	1:20	555332	Becton, Dickinson and Company (BD), Franklin Lakes (NJ, USA)
CD4	PE-Vio770	M-T466	REA IgG1	1:20	130-113-227	Miltenyi, Bergisch Gladbach (DE)
CD8	PE	HIT8a	Maus IgG1, κ	1:20	560959	Becton, Dickinson and Company (BD), Franklin Lakes (NJ, USA)
CD8	APC	RPA-T8		1:10	555369	
CD8	BV711	RPA-T8		1:20	563676	
CD11b	FITC	M1/70.15 .11.5	Ratte IgG2b	1:20	130-081-201	Miltenyi, Bergisch Gladbach (DE)
CD11b	PE	ICRF44	Maus, IgG1, κ	1:20	555388	Becton, Dickinson and Company (BD), Franklin Lakes (NJ, USA)
CD14	PerCP	18D11	IgG1	1:10	21620145	ImmunoTools, Friesoythe (DE)
CD15	PE-Vio770	VIMC6	Maus IgM	1:10	130-113-486	Miltenyi, Bergisch Gladbach (DE)
CD15	PE-Cy™7	HI98	Maus IgM	1:10	560827	Becton, Dickinson and Company (BD), Franklin Lakes (NJ, USA)
CD15	APC	HI98	Maus IgM	1:10	21810156	ImmunoTools, Friesoythe (DE)
CD19	APC	HIB19	Maus IgG1, κ	1:20	555415	Becton, Dickinson and Company (BD), Franklin Lakes (NJ, USA)
CD19	FITC	HIB19		1:20	555412	
CD25	PE-Cy™ 5	M-A251	Maus BALB/c IgG1, κ	1:10	555433	
CD33	V450	WM53	Maus	1:30	561157	

			BALB/c IgG1, κ			
CD69	PE	FN50	Maus IgG1, κ	1:20	555531	
CD124 (IL-4Rα)	APC	G077F6	Maus IgG2a, κ	1:20	355006	BioLegend, San Diego (CA, USA)
CD127	Pacific Blue™	A019D5	Maus IgG1, κ	1:10	351306	
CD152 (CTLA-4)	FITC	ANC152.2/8H5	Maus IgG1, κ	1:10	359-040	Ancell, Bayport (MN, USA)
CD152 (CTLA-4)	FITC	4AA3-6B10	Maus IgG2a	1:10	ABIN2144728	antibodies-online, Limerick (PA, USA)
CD152 (CTLA-4)	APC	BNI3	Maus IgG2a			Miltenyi, Bergisch Gladbach (DE)
CD279 (PD-1)	PE	PD1.3.1.3	Maus IgG2b, κ	1:20	130-096-164	
FoxP3	PE	259D	Maus IgG1, κ	1:5	320208	BioLegend, San Diego (CA, USA)
GARP	Alexa Fluor 647	G14D9	Ratte IgG2a, κ	1:5	51-9882-42	Thermo Fisher Scientific (eBioscience) Waltham (MA, USA)
GARP (LRRC32)	APC	REA166	Rekombinantes humanes IgG1	1:20	130-103-820	Miltenyi, Bergisch Gladbach (DE)
Granzym B	V450	GB11	Maus BALB/c IgG1, κ	1:10	561151	Becton, Dickinson and Company (BD), Franklin Lakes (NJ, USA)
HLA-DR	APC/Cyanine 7	L243	Maus IgG2a, κ	1:20	307618	BioLegend, San Diego (CA, USA)
HLA-DR	FITC	AC122	Maus IgG2a, κ	1:20	130-095-295	Miltenyi, Bergisch Gladbach (DE)
IFN-γ	FITC	4S.B3	Maus BALB/c IgG1, κ	1:20	554551	Becton, Dickinson and Company (BD), Franklin Lakes (NJ, USA)

Tabelle 13 Vitalitäts- & Proliferationsfarbstoffe.

Produkt	Fluorophor	Klon	Wirtsart Isotyp	Dilution	Katalognr.	Hersteller
7-AAD Vitalitäts-Färbelösung	7-AAD	/	/	1:100	00-6993	ThermoFisher Scientific (eBioscience™), Waltham (MA, USA)
Fixierbarer Vitalitätsfarbstoff (FVD)	eFluor™ 506	/	/	1:400	65-0866-14	
Ki-67	APC	REA	Rekombi	1:20	130-100-	Miltenyi, Bergisch

		183	nanter humaner IgG1		330	Gladbach (DE)
Vybrant™ CFDA SE Zelltracker Kit	CFDA SE (CFSE)	/	/	1:1000	V12883	ThermoFisher Scientific (Invitrogen™), Waltham (MA, USA)

Tabelle 14 Humane MACS MikroBeads zur magnetischen Zellisolierung.

Produktname	Klon	Wirtsart/ Isotyp	Katalognummer	Hersteller
Anti-CD4 MikroBeads	/	Maus IgG1	130-045-101	Miltenyi, Bergisch Gladbach (DE)
Anti-CD33 MikroBeads	AC104.3E3	Maus IgG1	130-045-501	
Anti-HLA-DR, DP, DQ-Biotin	REA332	Rekombinantes humanes IgG1	130-104-823	
Anti-Biotin UltraPure	/	Maus IgG1	130-105-637	

2.1.5. PCR-Sets & Primer

Tabelle 15 Primer zur RT-qPCR.

Primer	Basensequenz	Hersteller
B2M Vorwärtsprimer (sense) (Haushaltsgen)	5'-ATGAGTATGCCTGCCGTGTGA-3'	Eurofins Genomics, Ebersberg (DE)
B2M Rückwärtsprimer (anti-sense) (Haushaltsgen)	5'-GGCATCTTCAAACCTCCATG-3'	
IL-1beta sense	5'-GGACAAGCTGAGGAAGATGC-3'	
IL-1beta anti-sense	5'-TCGTTATCCCATGTGTCGAA-3'	
IL-18 sense	5'-CTCAGACCTTCCAGATCGCT-3'	
IL-18 anti-sense	5'-GCCGATTTCCTTGGTCAATGA-3'	

Tabelle 16 Sets zur RT-qPCR.

Produktname	Katalognummer	Hersteller
All-in-One cDNA Synthesis SuperMix	B24408	Bimake, Houston (TX, USA)
Biotool™ 2x SYBR Green Fast qPCR Master Mix	B21802	Bimake, Houston (TX, USA)
Fast EvaGreen® qPCR Master Mix	31003-1	Biotium, Fremont (CA, USA)
iScript cDNA Synthese Kit	170-8891	Bio-Rad, Hercules (CA, USA)
peqGOLD Micro RNA Set (Safety Line)	12-6836-02	vwr (peqlab), Lutterworth (UK)

2.1.6. Geräte

Tabelle 17 Verwendete Geräte.

Produktname	Hersteller
Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Foster City (CA, USA)
BD LSR II	Becton, Dickinson and Company (BD), Franklin Lakes (NJ, USA)
BD Accuri C6	
ELx808 Mikroplattenleser	Bio-Tek, Winooski (VT, USA)

Eppendorf® Thermomixer compact	Merck (Sigma Aldrich, T1317-1EA), Darmstadt (DE)
Feinwaage MC1 Analytic AC 210 S	Sartorius, Göttingen (DE)
Heracell 240i Brutschrank	ThermoFisher Scientific, Waltham (MA, USA)
Heraeus™ Fresco™ 17 Mikrozentrifuge	ThermoFisher Scientific, Waltham (MA, USA)
Hidex Sense Beta Plus Mikroplattenleser	Hidex, Turku (FIN)
Mikrozentrifuge, MiniStar silverline	VWR International, Darmstadt (DE)
Multifuge® 3 L-R	Heraeus, Hanau (DE)
Nanodrop™ 2000 Spectralphotometer	ThermoFisher Scientific, Waltham (MA, USA)
Sicherheitswerkbank KS18	ThermoFisher Scientific (Heraeus), Waltham (MA, USA)
SM-LUX Mikroskop	Leitz, Wetzlar (DE)
Thermocycler Uno 0,2 ml Block	VWR International, Darmstadt (DE)
TW12 Wasserbad	Julabo, Seelbach (DE)

2.1.7. Programme

Tabelle 18 Programme zum Betrieb der Geräte und zur Auswertung.

Produktname	Verwendungszweck	Hersteller
Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System Software	PCR	ThermoFisher Scientific, Waltham (MA, USA)
BD Diva software 6.0 & 8.0	LSR II	Becton, Dickinson and Company (BD), Franklin Lakes (NJ, USA)
BD Accuri C6 software	BD Accuri C6	Becton, Dickinson and Company (BD), Franklin Lakes (NJ, USA)
Cytobank software (Cloud-basierte Plattform)	Auswertung der Durchflusszytometrie	Cytobank, Santa Clara (CA, USA)
FCAP Array Version 3.0.19.2091 e	CBA Auswertung	Becton, Dickinson and Company (BD), Franklin Lakes (NJ, USA)
GraphPad Prism 6.07	Statistik	GraphPad Software, San Diego (CA, USA)
Hidex Sense Beta Plus software	Mikroplattenleser	Hidex, Turku (FIN)
KC Junior v1.41.8 software	Mikroplattenleser	Bio-Tek, Winooski (VT, USA)
Microsoft Office 2010	Statistik, Datensammlung	Microsoft, Redmond (WA, USA)
NanoDrop 2000 software 1.2.1	RNA Quantifizierung	ThermoFisher Scientific, Waltham (MA, USA)
Thermocycler Uno software 2.3.0.0	PCR-Cycler	VWR International, Darmstadt (DE)

2.2. Methoden

2.2.1. Studiendesign und -durchführung

2.2.1.1. Studie zum malignen Melanom

Das primäre Ziel der vorliegenden explorativen, nicht verblindeten Beobachtungsstudie war die Definition prädiktiver zellulärer und molekularer Biomarker im peripheren Blut von Melanompatienten unter Checkpoint-Inhibitor Therapie. Dazu wurden die zelluläre Zusammensetzung und das Plasmaproteom des peripheren Blutes der Melanompatienten analysiert (siehe Kapitel 3.1).

Die Studie wurde vom Deutschen Konsortium für Translationale Krebsforschung (DKTK) finanziert und an zwei DKTK Standorten, der Universitätsmedizin Mainz und dem Universitätsklinikum Frankfurt durchgeführt. Die Rekrutierung startete im April 2014 und endete im Januar 2018. Die Patientenrekrutierung und Studienmaterial-Entnahme erfolgte in Kooperation mit dem universitären Zentrum für Tumorerkrankungen (UCT), Mainz und dem UCT Frankfurt. Das Studienprotokoll wurde von der Ethikkommission der Landesärztekammern Rheinland-Pfalz und Hessen genehmigt und gemäß der Erklärung von Helsinki (Erstversion 1964, aktuelle Version 2013) unter Einhaltung der ethischen Prinzipien in der medizinischen Forschung am Menschen durchgeführt (Bearbeitungsnummer 837.226.05 (4884)). Vor Studienbeginn wurde von jedem Patienten eine schriftliche Einverständniserklärung eingeholt. Die Studie schloss Patienten ein, die mindestens 18 Jahre alt waren, die Diagnose malignes Melanom erhalten hatten und vor Beginn einer Checkpoint-Inhibitor Therapie standen. Von der Teilnahme ausgeschlossen wurden Patienten, die virale infektiöse Erkrankungen (wie z. B. Hepatitis, AIDS) aufwiesen. Der primäre klinische Endpunkt der Studie war der Tod des Patienten, der sekundäre ein Therapieabbruch aus gesundheitlichen Gründen.

Die gültige S3-Leitlinie (Februar 2013) empfahl zum Studienbeginn 2014 für Melanompatienten im Stadium IV mit nicht resektierbaren Metastasen eine Ipilimumab Monotherapie (86) und seit Juli 2016 anti-PD-1 Monotherapie mit z. B. Nivolumab und Pembrolizumab oder eine Kombinationstherapie mit Ipilimumab (87). Die Studie rekrutierte 2014 – 2016 Patienten unter Ipilimumab (n = 28) und ab 2016 Patienten unter Nivolumab (n = 2), Pembrolizumab (n =11) und der Kombinationstherapie Ipilimumab/Nivolumab (n = 10). Laut des Applikationsschemas erhielten die Patienten viermal im Abstand von 3 Wochen 3 mg/kg Körpergewicht (KG) Ipilimumab intravenös (i. v.) als Monotherapie. Die Nivolumab Monotherapie wurde im Abstand von 2 Wochen mit 3 mg/kg KG Nivolumab i. v. verabreicht. Die Ipilimumab/Nivolumab Kombinationstherapie wurde viermal im Abstand von 3 Wochen gegeben und bestand aus 1 mg/kg KG Nivolumab i. v., gefolgt von 3 mg/kg KG Ipilimumab intravenös. Unter der

Pembrolizumab Monotherapie wurden im Abstand von 3 Wochen 2 mg/kg KG Pembrolizumab i. v. appliziert.

Ein Follow-up/ Stadienbestimmung erfolgte alle 3 Monate mittels bildgebender Diagnostik. Der Therapieerfolg der Patienten wurde in der Radiologie im Rahmen der zweiten Stadienbestimmung (nach 6 Monaten) durch Computer- und Kernspintomografie ermittelt und durch eine Befundbesprechung der Ärzte festgelegt. Die Patienten wurden in Nicht-Ansprecher (K. A., Kein Ansprechen; progrediente Erkrankung) und Therapieansprecher (A., Ansprechen; komplettes bzw. partielles Ansprechen oder stabile Erkrankung) unterteilt. Als Kontrollgruppe wurden freiwillige, gesunde Spender (GS) rekrutiert.

Als Studienmaterial dienten 2 x 20 ml Vollblut in Einmalspritzen und 7,5 ml Vollblut in einer Lithium-Heparin S-Monovette®, welches vor Therapiebeginn (Zeitpunkt A) sowie 1 bis 3 Wochen nach Therapiebeginn (Zeitpunkt B) den Patienten abgenommen wurde. Die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC, engl. peripheral blood mononuclear cells) und das Plasma wurden via Dichtegradientenzentrifugation am Tag der Entnahme isoliert und bis zur weiteren Analyse bei −80 °C in Einfriermedium in Kryoröhrchen gelagert. Die Analyse des Studienmaterials erfolgte am DKTK Standort Mainz. Das zelluläre Immunomonitoring der Patientenproben erfolgte mittels Durchflusszytometrie.

In einem Teil der Patienten wurden zudem molekulare Biomarker im Plasma und Serum ermittelt. Die Analyse des Plasmaproteoms erfolgte via Hochleistungflüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie durch die Arbeitsgruppe von Stefan Tenzer. In Anschluss wurde das Ergebnis für zwei potenzielle Biomarker via ELISA validiert. Die Konzentration von S100, LDH und den Thrombozyten im Blut wurde routinemäßig in der klinischen Chemie bestimmt.

Die Studie verglich die Daten der gesunden Spender mit Therapieansprechern und Nicht-Ansprechern vor und nach Therapiebeginn. Ein Ausschluss von der Auswertung erfolgte, wenn Patienten die Behandlung nicht antraten, keine Blutentnahme vor Therapiebeginn stattfand oder keine zweite Stadienbestimmung (engl. staging) bzw. keine Nachbeobachtung (engl. follow-up) erfolgte.

2.2.1.2. Studie zur Psoriasis

Die Studie zur Psoriasis untersuchte den Zusammenhang zwischen dem PASI, dem prozentualen Anteil und der Funktion der regulatorischen Immunzellen wie z. B. der MDSC und der Treg im peripheren Blut von Psoriasis Patienten unter topischer und systemischer Therapie (siehe Kapitel 3.3). Die vorgestellten Daten waren Teil einer explorativen, nicht verblindeten Beobachtungsstudie, die im Auftrag von Novartis durch Esther von Stebut-Borschitz und Joanna Wegner geplant und monozentrisch an der Hautklinik der Universitätsmedizin Mainz

durchgeführt wurde. Die Studie wurde von Novartis finanziert. Das Studienprotokoll wurde von der Ethikkommission der Landesärztekammer des Landes Rheinland-Pfalz bewilligt und folgte den Richtlinien der Deklaration von Helsinki (Bearbeitungsnummer 837.065.11 (7607)). Die Studie startete im Mai 2012 und endete im Mai 2018. Joanna Wegner rekrutierte die Patienten. Die teilnehmenden Patienten unterschrieben eine schriftliche Einverständniserklärung.
Die Studie schloss volljährige Patienten ein, die unter einer Form der Psoriasis litten und eine topische oder systemische Therapie erhielten. Schwangere Patienten sowie Patienten mit einer infektiösen, malignen oder anderweitigen Erkrankung, die laut des behandelnden Arztes eine Teilnahme nicht ermöglichte, wurden von der Studie ausgeschlossen. Zudem wurden Patienten ausgeschlossen, die unfähig waren selbstständig über eine Studienteilnahme zu entscheiden. Als systemische Therapie erhielten die rekrutierten Patienten Biologika (Adalimumab, Etanercept, Ustekinumab, Secukinumab) und kleinmolekulare Immunsuppressiva (Fumarate, Cyclosporin A, Methotrexat, Apremilast). Als topische Therapien wurden z. B. Glukokortikoide verabreicht. Entsprechend ihrer Therapie wurden die Patienten der Gruppe „systemische Therapie“ bzw. „topische Therapie“ zugeordnet. Innerhalb dieser Gruppen wurden die Patienten je nach Schweregrad der Erkrankung in „PASI < 10“, „PASI 10 – 20“ und „PASI > 20“ eingeteilt. Als Kontrollgruppe dienten freiwillige, gesunde Spender. Der PASI wurde zum Zeitpunkt der Aufklärung ermittelt. Es wurde einmalig 2 x 20 ml Vollblut in Einmalspritzen und 7,5 ml Vollblut in einer Lithium-Heparin S-Monovette® entnommen. Der prozentuale Anteil der Treg und MDSC an den lebenden PBMC und die funktionelle Kapazität wurden durchflusszytometrisch ermittelt. Die Daten der gesunden Spender und Patienten unter topischer und systemischer Therapie wurden untereinander verglichen und in Bezug zum PASI gesetzt.

2.2.2. Methoden der Zellkultur

2.2.2.1. Isolation des Plasmas und der peripheren mononuklearen Zellen

Die PBMC und das Plasma wurden durch Dichtegradientenzentrifugation des Vollblutes am Tag der Blutentnahme gewonnen. Dazu wurden in einem 50 ml konischen Zentrifugenröhrchen 20 ml Vollblut direkt auf 15 ml einer isotonen Zellseparationslösung mit Ficoll 400® (Polysucrose 400, Dichte 1,077 g/ml) geschichtet. Die Lithium-Heparin S-Monovette® und die Zentrifugenröhrchen wurden für 30 Minuten (min) bei 25 °C und einer Beschleunigung von 400 g (ohne Bremse) zentrifugiert. Durch die Dichtegradientenzentrifugation wurde das Blut entsprechend der Dichte in Schichten aufgetrennt. Nach der Zentrifugation wurden 4,5 ml der obersten Schicht (geringste Dichte), das Plasma, abgenommen und zur weiteren Analyse auf drei 1,5 ml Mikroreaktionsgefäße verteilt. Das Plasma der S-Monovette® wurde durch das Lithium-Heparin Granulat von den anderen Blutbestandteilen getrennt und ebenso

abgenommen. Die Plasmaproben wurden bis zur weiteren Analyse bei −80 °C gelagert.
Die zweite Schicht (Interphase) enthielt die PBMC. Die Interphase ist zu 70 – 100 % mit Lymphozyten angereicht. Die PBMC wurden vorsichtig mit einer 10 ml Messpipette abgenommen, mit kaltem PBS-EDTA-Puffer resuspendiert und bei 350 g, 7 min, 4 °C (Bremse an) zentrifugiert („gewaschen“). Der Überstand über dem Zellhaufen (Pellet) wurde vorsichtig abgeschüttet. Zur Entfernung von Thrombozyten wurde dieser Schritt 5 – 6 Mal wiederholt bis der Überstand klar war. Nach der Zellzahlbestimmung wurden die PBMC bis zur weiteren Analyse bei −80 °C weggefroren oder zum Ansatz in syngenen Suppressionsassays mittels magnetischer Zellisolation weiter aufgearbeitet (siehe Kapitel 2.2.2.4 – 6).

2.2.2.2. Die Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mittels einer Neubauer Improved Zählkammer bestimmt. Dazu wurde das Zellpellet in einem Volumen von 10 ml kaltem PBS-EDTA-Puffer resuspendiert. Trypanblau-PBS wurde aus 1 Teil Trypanblau und 9 Teilen PBS hergestellt (1:10). 10 µl Zellsuspension wurden in einer 96-well Mikrotiter-Rundbodenplatte in 30 µl Trypanblau-PBS 1 zu 4 verdünnt. Ca. 10 µl wurden auf eine Neubauer Improved Zählkammer aufgetragen. Zur Bestimmung der Zellzahl y wurden die Zellen in einem großen Eckquadrat gezählt. Ein Eckquadrat enthält aufgrund der Fläche von 1 mm^2 und der Höhe von 0,1 mm 0,1 mm^3 (0,1 µl) Zellsuspension. Um die Zellzahl in 1 ml zu berechnen, wurde die gezählte Zellzahl mit einem Kammerfaktor von 10^4 multipliziert.

$$Zellzahl = \ Zellzahl\ in\ einem\ großen\ Eckquadrat \times Verdünnung \times Volumen\ [ml] \times Kammerfaktor$$

$$Zellzahl = y\ \times 4\ \times 10 \times 10^4$$

2.2.2.3. Das Einfrieren und Auftauen humaner Zellen

Isolierte PBMC wurden bis zur weiteren Analyse bei −80 °C gelagert. Dazu wurden ca. 10 x 10^6 PBMC in 300 µl Einfriermedium aufgenommen. In einem 2 ml Kryo-Reaktionsgefäß wurden 300 µl Human-Albumin (HSA) 20 % vorgelegt. Die Zellsuspension wurde in das Kryo-Reaktionsgefäß pipettiert und weggefroren.
Zum Auftauen wurde das Kryo-Reaktionsgefäß kurz im Wasserbad erwärmt. 1,5 ml HSA 20 % wurden in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen vorgelegt. Die angetaute Zellsuspension wurde hineingeschüttet, ad 15 ml mit X-Vivo 15 verdünnt und zentrifugiert (6 min, 350 g, 4 °C). Nach dem Abschütten des Überstandes wurden die Zellen in 1,2 ml FACS-Puffer resuspendiert und 200 µl der Zellsuspension wurden in je ein well (Vertiefung) einer 96-well Mikrotiter-Rundbodenplatte pipettiert. Die Platte wurde zentrifugiert (5 min, 400 g, 4 °C), der Überstand

abgenommen, die Zellen in 150 µl FACS-Puffer resuspendiert und erneut zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen für die Durchflusszytometrie gefärbt.

2.2.2.4. Magnetische Isolierung spezifischer Zellpopulationen

Die magnetische Isolierung der $CD4^+$ T-Zellen und der $CD4^-HLA^-DR^-CD33^+$ MDSC zur Verwendung im syngenen Suppressionsassay (siehe Kapitel 2.2.2.6) erfolgte mittels MACS (engl. Magnetic activated cell sorting) MikroBeads.

Alle Schritte erfolgten mit gekühlten (4 °C) Puffern. Die Zellsuspensionen lagerten zwischen den Schritten auf Eis. Die Zellen und MikroBeads wurden 1 min resuspendiert und anschließend 15 min bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert.

Die PBMC wurden in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen mit 2 µl anti-CD4 MikroBeads und 10 µl MACS-Puffer je 10^7 Zellen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in 15 ml MACS-Puffer resuspendiert, zentrifugiert (6 min, 350 g, 4 °C) und in MACS-Puffer auf eine Konzentration von 2 x 10^8 Zellen/ml eingestellt.

An einen metallischen MACS MultiStand wurde ein QuadroMACS Zellseparator magnetisch befestigt und eine MACS LS Säule eingespannt. MACS Säulen verstärken durch die enthaltenen superparamagnetischen Kügelchen das magnetische Feld des Zellseparators und halten die MikroBead-markierten Zellen magnetisch in der Säule zurück (Positivselektion). Vor Gebrauch wurde die LS Säule dreimal mit destilliertem Wasser, 70 % Ethanol und Isopropanol gereinigt und bis zur Verwendung mit MACS-Puffer gespült. Die Zellsuspension wurde auf die LS Säule pipettiert und der Durchlauf aus $CD4^-$ Zellen in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen aufgefangen (Negativisolation). Dazu wurden schrittweise 25 ml MACS-Puffer auf die Säule pipettiert. Durch die Entnahme der Säule aus dem Magnetfeld des QuadroMACS konnten die $CD4^+$ MikroBead-markierten Zellen isoliert werden. Dazu wurde die Säule zweimal mit MACS-Puffer gefüllt. Der MACS-Puffer wurde mit Hilfe des Säulen-Stempels in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen gedrückt. Nach der Bestimmung der Zellzahl wurden die $CD4^+$ T-Zellen mit dem Farbstoff CFSE markiert. Aus dem $CD4^-$ Durchlauf wurden die $HLA\text{-}DR^-CD33^+$ Zellen isoliert. Dafür wurden das Zellpellet des $CD4^-$ Durchlaufs entsprechend des Herstellerprotokolls mit 10 µl anti-HLA-DR-Biotin und 100 µl MACS-Puffer je 10^7 Zellen bei 4 °C für 10 min inkubiert. Nach einem Waschritt mit 2 ml MACS Puffer (10 min, 300 g, 4 °C) wurden die HLA-DR-Biotin-markierten Zellen mit 20 µl anti-Biotin MikroBeads UltraPure und 80 µl MACS-Puffer je 10^7 Zellen inkubiert. Nach einem weiteren Waschschritt wurde die Zellsuspension auf 10^8 Zellen je 500 µl eingestellt. Der $HLA\text{-}DR^-$ Durchlauf (Negativisolation) wurde entsprechend der magnetischen Isolation der $CD4^+$ T-Zellen gewonnen und gezählt. Anschließend wurden die $CD4^-HLA\text{-}DR^-$ Zellen des Durchlaufs mit 5 µl anti-CD33 MikroBeads und 20 µl MACS Puffer je

10^7 Zellen inkubiert. Nach einem Waschschritt mit 50 ml MACS-Puffer (5 min, 350 g, 4 °C) wurden die Zellen auf 10^8 Zellen je 500 µl eingestellt. Die $CD33^+$ Zellen wurden aus der LS Säule gewonnen (Positivisolation). Die $CD4^-HLA\text{-}DR^-CD33^+$ Zellen wurden gezählt und auf 1,6 x 10^7 Zellen/ml in X-Vivo 15 eingestellt.

2.2.2.5. CFSE-Markierung der $CD4^+$ T-Zellen

Um die Zellteilung der $CD4^+$ T-Zellen in einem syngenen Suppressionsassay zu messen, wurden die Zellen mit dem sehr hellen Farbstoff Carboxyfluoresceindiacetat Succinimidylester (CFSE) markiert. CFSE durchdringt die Plasmamembran und bindet kovalent an Amine in und an der Zelle. Mit jeder Zellteilung halbiert sich die Intensität der Gesamtfluoreszenz der Zelle. Diese kann durchflusszytometrisch gemessen werden. Auf diese Weise können mehr als 8 Generationen (Zellteilungen) einer Zelle verfolgt werden. Erreicht das CFSE-Signal die Stärke der Eigenfluoreszenz der Zellen, ist keine weitere Bestimmung der Zellteilung möglich.
Die Medien und Puffer wurden bei 37 °C verwendet. Vor der Markierung wurden die $CD4^+$ T-Zellen in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen in einem Protein-freien Medium (hier PBS) resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (6 min, 350 g, 4 °C) und der Überstand wurde dekantiert (Waschschritt). Das Zellpellet wurde mit 2 ml 1 µM CFSE in 37 °C warmen PBS 1 min resuspendiert und 20 min bei 37 °C im Brutschrank gelagert. Anschließend wurde überschüssiges CFSE durch die Zugabe von 13 ml Protein-haltigem X-Vivo 15 mit 10 % HSA 20 % gebunden. Nach der Zentrifugation wurde die Zellsuspension mit X-Vivo 15 gewaschen. Nach erneuter Suspension in X-Vivo 15 wurde die Zellzahl bestimmt. Die Zellsuspension wurde auf 2 x 10^6 Zellen/ml in X-Vivo 15 eingestellt und bis zur Verwendung im syngenen Suppressionsassay bei 37 °C im Brutschrank gelagert.

2.2.2.6. Der syngene Suppressionsassay

Die suppressive Kapazität der $CD4^-HLA\text{-}DR^-CD33^+$ MDSC auf die Proliferation syngener $CD4^+$ T-Zellen wurde anhand eines Suppressionsassays untersucht. Im TME des malignen Melanoms kann die Proliferation der T-Zellen durch MDSC unterdrückt werden (22). Um dies zu untersuchen, wurden T-Zellen und MDSC aus dem Vollblut eines Melanom-Patienten unter Checkpoint-Inhibitor Therapie bzw. eines gesunden Spenders isoliert.
Der Suppressionsassay wurde in einer 96-well Flachbodenplatte (96 Vertiefungen) in einem Gesamtvolumen von 200 µl durchgeführt. Die T-Zellen wurden durch die Zugabe allogener CD3-depletierter APC und anti-CD3 Antikörper (Klon OKT3, Endkonzentration 0,5 µg/ml im well) zur Proliferation stimuliert. Die CD3-depletierten APC wurden auf 6 x 10^6 Zellen/ml in X-Vivo 15 eingestellt.

Zunächst erfolgte die schrittweise Verdünnung (Titration) der $CD4^-HLA\text{-}DR^-CD33^+$ MDSC. Dazu wurden 100 µl $CD4^-HLA\text{-}DR^-CD33^+$ MDSC (1,6 x 10^6 MDSC) in ein well und 50 µl X-Vivo 15 in die vier folgenden wells pipettiert. 50 µl $CD4^-HLA\text{-}DR^-CD33^+$ MDSC wurden aus dem ersten well abgenommen und ins folgende well pipettiert und resuspendiert. Dieser Schritt wurde bis zum 4. well wiederholt, um die Konzentration der MDSC schrittweise zu halbieren. Die letzten 50 µl MDSC-Zellsuspension wurden verworfen. Nach Abschluss der Titrationsreihe lag in jedem well 50 µl MDSC-Suspension vor. In jedes well wurden 100 µl $CD4^+$ T-Zellen (2 x 10^5) und 50 µl CD3-depletierte APC (1 x 10^5) pipettiert. Der Assay enthielt Titrationsverhältnisse der $CD4^+$ T-Zellen zu MDSC von 4:1 bis 1:4 ($CD4^+$ T-Zellen: MDSC). In die Positivkontrolle „CD4 APC OKT3“ wurden 50 µl X-Vivo, 100 µl $CD4^+$ T-Zellen und 50 µl CD3-depletierte APC pipettiert. Als Negativkontrollen wurden 100 µl MDSC (2 x 10^5) (MDSC OKT3), 50 µl CD3-depletierte APC (APC OKT3) und 100 µl MDSC (2 x 10^5) plus 50 µl CD3-depletierte APC (APC MDSC OKT3) pipettiert. Die wells wurden ad 200 µl X-Vivo 15 pipettiert. Nach 48 Stunden wurde die Flachbodenplatte zentrifugiert (5 min, 400 g, 25 °C), 150 µl Überstand abgenommen und durch frisches X-Vivo 15 ersetzt. Anschließend wurden zur Stimulation der T-Zellen 5 internationale Einheiten (I. E., engl. international units, I. U.) IL-2 pro well pipettiert. Nach 76 Stunden wurden die Zellen des Suppressionsassays zur durchflusszytometrisch Messung mit Fluorophor-markierten Antikörpern gefärbt und am LSR II gemessen.

2.2.2.7. Die Kultivierung und Behandlung dendritischer Zellen

Zur Kultivierung dendritischer Zellen (DC) und anschließenden Behandlung mit Kinase-Inhibitoren wurden PBMC aus einem Blutprodukt (Buffy) der Transfusionszentrale der Universitätsmedizin Mainz durch Dichtegradientenzentrifugation gewonnen. Dazu wurde das Blut in einem 250 ml Becherglas mit 120 ml PBS verdünnt und in vier 50 ml Zentrifugenröhrchen mit je 15 ml Biocoll Zellseparationslösung überschichtet. Die PBMC wurden entsprechend 3.2.2.1 isoliert. Die PBMC wurden in 50 ml PBS aufgenommen. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte 1 zu 10 in Trypanblau-PBS.

Zur Gewinnung von Hitze-inaktiviertem Plasma wurden 30 ml Plasma nach der Dichtegradientenzentrifugation in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen pipettiert. Durch Erhitzung des Plasmas für 30 min im Wasserbad bei 65 °C koagulierten die Proteine. Nach der Zentrifugation (5 min, 3000 g, 4 °C) wurde der Überstand, das Hitze-inaktivierte Plasma, bis zur weiteren Verwendung in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und bei 4 °C gelagert.

Zur Anreicherung von Monozyten mittels Plastikadhärenz wurden 90 x 10^6 PBMC in 15 ml RPMI + 1,5 % Hitze-inaktiviertes Plasma auf eine Petrischale pipettiert und 45 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert (88). Anschließend wurden nicht adhärente Zellen durch 37 °C warmes

PBS abgespült und abgenommen. Um die adhärenten $CD14^+$ Vorläuferzellen in unreife DC auszudifferenzieren, wurden die Zellen mit 15 ml X-Vivo 15 + 1 % Hitze-inaktiviertes Plasma + 100 I. U. /ml IL-4 + 400 I. U./ml GM-CSF supplementiert. Die Zellkultur wurde bei 37 °C im Brutschrank gelagert.

An Tag 2 und 4 wurden 5 ml Medium pro Petrischale abgenommen und durch frisches Medium aus X-Vivo 15 + 1 % Hitze-inaktiviertes Plasma + 100 I. U. /ml IL-4 + 800 I. U./ml GM-CSF ersetzt. An Tag 6 wurden die Petrischalen zur Ablösung der adhärenten unreifen DC (uDC) 10 min auf Eis gestellt. Die uDC wurden durch starkes Spülen mit dem Medium von der Petrischale gelöst. Die uDC Zellsuspension wurde in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen pipettiert, zentrifugiert (5 min, 350 g, 4 °C) und gezählt. Die uDC Zellsuspension wurde auf 0,2 – 0,3 x 10^6 uDC/ml in X-Vivo 15 + 1 % Hitze-inaktiviertes Plasma + 100 I. U. /ml IL-4 + 800 I. U./ml GM-CSF eingestellt. Zur Weiterführung der uDC-Zellkultur wurden ein Drittel der uDC Zellsuspension auf eine 6-well Zellkulturplatte (3 ml/Schale) pipettiert. Zwei Drittel der uDC Zellsuspension wurden zur Ausreifung auf 0,2 – 0,3 x 10^6 uDC/ml in X-Vivo 15 + 1 % Hitze-inaktiviertes Plasma + 100 I. U. /ml IL-4 + 400 I. U./ml GM-CSF eingestellt und auf eine 6-well Zellkulturplatte (3 ml/Schale) pipettiert. Zur Ausreifung der DC wurden die Zytokine IL-1β (10 ng/ml), IL-6 (1000 I. U./ml), TNF-α (10 ng/ml) und PGE_2 (1 µg/ml) dazugegeben. Die DC wurden mit 1 µM BRAF-Inhibitor (wie z. B. Dabrafenib, Vemurafenib) bzw. MEK-Inhibitor (wie z. B. Cobimetinib, Trametinib) behandelt. Dazu wurden die Stammlösungen der Kinase-Inhibitoren (10 mM Inhibitor, gelöst in DMSO) 1 zu 1000 in X-Vivo 15 verdünnt. Es wurden 3 µl Kinase-Inhibitor pro Schale pipettiert. An Tag 8 erfolgte die durchflusszytometrische Analyse der uDC und reifen DC am LSR II.

2.2.2.8. Bestimmung der metabolischen Aktivität der Zellen

Die metabolische Aktivität der uDC wurde mittels eines MTT-Assays kolorimetrisch bestimmt. Bei nicht proliferierenden Zellen wie z. B. den DC kann anhand eines MTT Assays die Sensitivität der Zellen gegenüber einer Substanz bestimmt werden.

Im Assay wird das gelbe, hydrophile 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zu violetten, hydrophoben 1,3,5-Triphenylformazan (Formazan) Kristallen reduziert (89). Die Reaktion wird nicht nur durch das Enzym Succinat-Dehydrogenase in den Mitochondrien katalysiert, sondern erfolgt auch durch die Reaktion von NADH (Nicotinamidadenindinukleotid) zu NADPH (Nicotinamidadenindinukleotidphosphat) im endoplasmatischen Retikulum (90). Der MTT-Assay ist ein relatives Maß der Glykolyserate der Zelle.

Für den MTT-Assay wurden uDC entsprechend 3.2.2.7 kultiviert und an Tag 6 gezählt. Die uDC wurden auf 1 – 5 x 10^5 uDC in 50 µl RPMI ohne Phenolrot eingestellt. In eine 96-Well Flachbodenplatte (96 Vertiefungen) wurden 50 µl Zellsuspension und 50 µl RPMI ohne

Phenolrot je well pipettiert. Die uDC wurden mit 1 µM Dabrafenib bzw. Vemurafenib behandelt. Als Kontrollen dienten unbehandelte uDC (Positivkontrolle) und mit 50 % DMSO behandelte uDC (Negativkontrolle). Jede Behandlung und Kontrolle wurde in Triplikaten pipettiert. Anschließend wurden die uDC 24 bzw. 48 Stunden bei 37 °C im Brutschrank gelagert. Danach wurden die uDC zentrifugiert (5 min, 350 g, 25 °C) und der Überstand wurde abgenommen. Die uDC wurden in 100 µl RPMI ohne Phenolrot resuspendiert, zentrifugiert und der Überstand erneut abgeschüttet. Nach Zugabe von 100 µl RPMI ohne Phenolrot und 10 µl MTT wurden die uDC für 4 Stunden bei 37 °C im Brutschrank gelagert, so dass die Formazan-Kristallbildung durch Violett-Färbung deutlich angezeigt wurde. Durch Zugabe von 100 µl Stopp-Lösung (10 % Triton-X 100 in azidem Isopropanol (0,1 N HCl)) wurde die Reaktion angehalten. Damit das Isopropanol nicht verdampft, wurde die Platte mit Parafilm verschlossen und zur Lösung der Formazan-Kristalle über Nacht bei Raumtemperatur gelagert. Anschließend wurde der MTT Assay kolorimetrisch durch Messung der optischen Dichte (OD) bei 570 nm und einer Referenzwellenlänge von 650 nm am Hidex Sense Beta Plus Mikroplattenleser gemessen.

2.2.3. Methoden der Durchflusszytometrie

In der Durchflusszytometrie werden Fluorophor-markierte Zellen in einem fokussierten Flüssigkeitsstrom, der an einem Laser vorbeigeleitet wird und die Fluorophore zur Fluoreszenz anregt, gemessen. Durchflusszytometer wie z. B. die BD FACS™ (fluorescence-activated cell scanning) Geräte (BD™ LSR II, BD Accuri™ C6) messen die Fluoreszenz Signale durch Fotodioden und wandeln diese in elektrische Signale um. Programme wie z. B. BD FACSDiva™ bzw. BD Accuri™ C6 stellen die Signale in Kontour-, Punktediagrammen und Histogrammen dar. Idealerweise trifft jede Zelle einzeln auf die Laser.

Das Vorwärtsstreulicht (FSC, engl. Forward Scatter) misst das Licht des blauen Lasers (Argon, 488 nm), welches nicht durch die Zelle gestreut wurde und daher vom gegenüberliegenden Detektor, der FSC Diode, aufgefangen wird. Der FSC ist folglich ein Maß der Zellgröße.

Das Seitwärtsstreulicht (SSC, engl. Side Scatter) wird von der SSC Diode gemessen und gibt das an der Zelle im 90° Winkel gebrochene Licht des Argon-Lasers wieder. Das SSC ist ein Maß der Granularität der Zelle.

Anhand der Lage der Zellen im FSC/SSC-Diagramm können T-Zellen als kleine, wenig granuläre Zellen und DC als größere, stärker granuläre Zellen identifiziert werden. Zusätzlich können Zellen durch fluoreszierende Farbstoffe (Vitalitäts-Farbstoffe) und Fluorophor-markierte Antikörper gefärbt werden. Die Fluorophore werden durch die unterschiedlichen Laser angeregt. Das im 90° Winkel emittierte Licht wird über dichromatische Spiegel durch Filter auf die Detektoren (ugs. Kanäle) der entsprechenden Wellenlänge gelenkt. Die Bandpass (BP) Filter

lassen nur Licht innerhalb eines bestimmten Wellenlängenbereichs durch. So lässt der BP 488/10 Licht der Wellenlänge 483 – 493 nm passieren. Die Longpass (LP) Filter lassen nur Licht mit einer gleichen oder größeren Wellenlänge passieren. Der Filter 505 lässt folglich Licht mit einer Wellenlänge von 505 nm oder länger durch (≥ 505 nm) (91).

Tabelle 19 Laserkonfiguration des verwendeten BD LSR II (92)**.**

Laser (Anregungswellenlänge [nm])	**Detektor**	**Longpass (LP)**	**Bandpass (BP)**	**Fluorophor**
Blauer Laser Argon (488 nm)	FSC			
	488E (SSC)		488/10	
	488D	505	530/30	CFSE, FITC
	488C	550	575/26	PE
	488B	685	695/40	7AAD
	488A	735	780/60	PE-Cy7
Violetter Laser Coherent Radius™ 405 (405 nm)	405D		450/50	Pacific Blue, eFluor450
	405C	505	530/30	Amcyan
	405B	630	660/20	BV650
	405A	690	710/50	BV711
Roter Laser Helium-Neon (HeNe) (633 nm)	633C		660/20	APC
	633B	735		APC-Cy7, APC/Fire™ 750, APC-H7

2.2.3.1. Färbung der intrazellulären, intranukleären und Oberflächenmoleküle

Zur durchflusszytometrischen Färbung wurden die Zellen in einer 96-Well Mikrotiter-Rundbodenplatte gefärbt. Zunächst wurden die Zellen in 100 µl FACS-Puffer resuspendiert. Nach einer Zentrifugation (5 min, 400 g, 4 °C) wurde der Überstand entfernt (Waschschritt). Im Folgenden werden die unterschiedlichen Färbungen beschrieben. Im Anschluss an die Färbung wurden die Zellen zur Messung am Durchflusszytometer in 100 µl FACS-Puffer resuspendiert und in Rundboden-Polystyrolröhrchen pipettiert.

Färbung des Vitalitäts-Farbstoffs: Fixable Viability Dye (FVD)

Das Zellpellet wurde in 10 µl der Vitalitäts-Farbstoff-Verdünnung (FVD, 1:200 in destilliertem Wasser) durch Klopfen der Platte resuspendiert und 20 min bei 2 – 8 °C im Dunklen gelagert. Anschließend wurden die Zellen wie oben beschrieben zweimal mit FACS-Puffer gewaschen.

Färbung der Oberflächenmoleküle

Zur Färbung der Oberflächenmoleküle wurden die Fluorophor-markierten Antikörper in den entsprechenden Verdünnungen in FACS-Puffer zu einem Cocktail pipettiert. Für jedes well wurden 10 µl berechnet. Das Zellpellet wurde in 10 µl des Ansatzes resuspendiert, 20 min bei 2 – 8 °C im Dunklen gelagert und wie oben beschrieben zweimal mit FACS-Puffer gewaschen.

Färbung der intrazellulären Moleküle

Zur Fixierung und Permeabilisierung wurden die Zellen in 100 µl BD Fixierungs-/Permeabilisierungs-Lösung (BD Set, # 554715) resuspendiert, 20 min bei 2 – 8 °C im Dunklen gelagert und mit 100 µl BD Permeabilisierungs-/Waschpuffer (# 51-2091KZ, 1:10 Verdünnung in destilliertem Wasser (BD Perm/Wash intrazellulär (IZ) Puffer)) zweimal gewaschen. Zur intrazellulären Färbung (wie z. B. bei IFN-γ) wurde ein Cocktail bestehend aus den intrazellulär zu färbenden Fluorophor-markierten Antikörpern in den entsprechenden Verdünnungen in BD Perm/Wash IZ Puffer angesetzt. Die Zellen wurden in 10 µl des Cocktails resuspendiert, 20 min bei 2 – 8 °C im Dunklen gelagert und wie oben beschrieben zweimal mit FACS-Puffer gewaschen.

Färbung der intranukleären Moleküle

Zur intranukleären Färbung (wie z. B. beim Transkriptionsfaktor Foxp3) wurde zunächst der Fixierungs- und Permeabilisierungspuffer aus 1 Teil Fixierungs-/Permeabilisierungs Konzentrat und 3 Teilen Fixierungs-/Permeabilisierungs-Verdünnungslösung (Thermo Fisher Scientific Set, # 00-5523-00) hergestellt. Zur Fixierung und Permeabilisierung wurden die Zellen in 100 µl des Fixierungs-/Permeabilisierungspuffer resuspendiert und 20 min bei 2 – 8 °C im Dunklen gelagert. Anschließend wurden die Zellen mit 100 µl Permeabilisierungs-/Waschpuffer (1:10 Verdünnung in destilliertem Wasser (Perm/Wash intranukleär (IN) Puffer)) zweimal gewaschen. Entsprechend der intrazellulären Färbung wurde der Cocktail der intranukleär zu färbenden Fluorophor-markierten Antikörper in Perm/Wash IN Puffer angesetzt und die Färbung durchgeführt.

Färbung der DC mit primären und sekundären Antikörpern

Im ersten Schritt wird ein primärer, nicht Fluorophor-markierter Antikörper wie z. B. anti-CD80, welcher aus Mäusen gewonnen wird, an CD80 auf DC gebunden. Im zweiten Schritt wird dieser mit einem sekundären Fluorophor-markierten Antikörper markiert. Dieser sekundäre Antikörper bindet spezifisch an Antikörper, die in Mäusen gebildet wurden.
Zur Doppelfärbung der DC (CD80 + HLA-DR, CD86 + HLA-DR) wurden die DC mit je 10 µl der primären Antikörper CD80 bzw. CD86 (gewonnen aus der Maus) und HLA-DR (gewonnen aus der Ratte) in der entsprechenden Verdünnung in FACS-Puffer resuspendiert. Als Negativkontrolle der Färbung wurden für CD80 und CD86 der Isotyp IgG2b (Maus) und für HLA-DR der Isotyp IgG2a (Ratte) verwendet. Die Färbung erfolgte 15 min bei 4 °C im Dunklen. Nach zweimaligem Waschen mit FACS-Puffer wurden die DC mit jeweils 10 µl der sekundären Antikörper markiert. Der sekundäre Antikörper anti-IgG (Maus) PE bindet an CD80 bzw. CD86; anti-IgG (Ratte) FITC bindet an HLA-DR. Die Verdünnung der sekundären Antikörper wurde in FACS-Puffer angesetzt. Der FACS-Puffer enthielt den 1 zu 100 verdünnten Vitalitäts-Farbstoff 7-Aminoactinomycin D (7-AAD). Die Färbung erfolgte 15 min bei 4 °C im Dunklen. Im Anschluss wurden die DC zweimal mit FACS-Puffer gewaschen und entsprechend der intrazellulären Färbung fixiert.

2.2.3.2. Quantitative Bestimmung der Zytokine anhand des Cytometric Bead Arrays (CBA)

Die quantitative Bestimmung der Zytokine im Überstand der DC Kulturen wurde mittels des Cytometric Bead Arrays (CBA) durchflusszytometrisch gemessen. Die Messung wurde an einem BD Accuri™ C6 Durchflusszytometer mit dem Programm BD Accuri C6 unter Verwendung der BD CBA Kit Messvorlage (engl. template) durchgeführt. Die Analyse der Daten erfolgte durch die Programme BD FCAP Array v3 (Ermittlung der Standardkurve), Microsoft Excel 2010 (Datenzusammenstellung) und GraphPad Prism (Statistische Auswertung).
Die Konzentration der Zytokine IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, TNF-α und IL-12p70 wurde anhand des CBA Sets zur Bestimmung humaner inflammatorischer Zytokine (BD, # 551811) ermittelt. Der CBA funktioniert nach dem Prinzip eines Sandwich-ELISA. Die Zytokine werden durch Zytokin-spezifische Antikörper gebunden, die an Fluorophor-markierten Kügelchen (Capture Beads) befestigt sind. Dazu wurden die Proben und Standards mit einem Mix aus verschiedenen Capture Beads behandelt. Abhängig von der Menge des gebundenen Zytokins bindet der Capture-Bead-Zytokin-Komplex die PE-Detektionsreagenz (PE-markierte Zytokin-spezifische Antikörper). Anhand der spezifischen Intensität des Fluorophors der Capture Beads wurden die

Zytokine unterschieden. Die Konzentration der Zytokine wurde anhand der PE-Fluoreszenzintensität mit Hilfe einer Standardkurve berechnet.
Der CBA wurde mit Ausnahme der folgenden Punkte entsprechend des Handbuches durchgeführt. Bei der Durchführung wurden die Volumina der Proben, der Standards, des Capture Bead Mix und der PE-Detektionsreagenz von 50 µl auf 25 µl halbiert. Der Überstand wurde unverdünnt gemessen. Die Proben und Standards wurden zur Messung in 120 µl statt 300 µl Waschpuffer aufgenommen.

Gewinnung des DC-Kulturüberstandes zur Bestimmung der Zytokinkonzentration

Da den DC zur Ausreifung verschiedene Zytokine zugesetzt wurden, wurden die reifen DC (rDC) an Tag 8 in frischem Medium aufgenommen. Dadurch sollten künstlich erhöhte Proteinkonzentrationen der Zytokine IL-1β, IL-6 und TNF-α in der CBA vermieden werden („Zytokin-Washout“).
An Tag 8 wurden die 6-well Kulturplatten zum Ablösen der rDC 10 min auf Eis gestellt. Durch starkes Spülen mit einer Glaspipette wurden die Zellen von der Platte gelöst. Jedes well wurde in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und zentrifugiert (6 min, 350 g, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen. Anschließend wurden die Zellen in 3 ml frischem Medium (X-Vivo 15 + 1 % Hitze-inaktiviertes Plasma) resuspendiert und auf eine neue 6-well Kulturplatte pipettiert. Die Inhibitoren und DMSO wurden entsprechend Tag 6 pipettiert. Die uDC Kultur wurde unverändert weitergeführt.
An Tag 9 wurden die Kulturplatten wiederum 10 min auf Eis gestellt, die Zellsuspensionen in je ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt, zentrifugiert (6 min, 350 g, 4 °C) und die Überstände in 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert. Die Überstände wurden bis zur CBA bei −20 °C weggefroren. Der restliche Überstand wurde verworfen. Die DC wurden zur weiteren Verwendung mit FACS-Puffer gewaschen.

2.2.3.3. Bestimmung der Apoptose

Die Apoptose der DC wurde unter Verwendung des PE Annexin V Apoptose Detektion Sets I (BD, # 559763) durchflusszytometrisch gemessen. Die Apoptose wurde durch die Bindung von Annexin V an Phosphatidylserin (PS) angezeigt, welches im frühen Stadium der Apoptose nicht nur an der Innenseite der Zellmembran, sondern auch an der Außenseite exprimiert wird. Verliert die Zellmembran im späten Stadium der Apoptose ihre Asymmetrie, dringt Annexin V in die Zelle ein und verstärkt die Fluoreszenz der Zellen durch Bindung von Annexin V an das PS der Membraninnenseiten. Gleichzeitig dringt der Vitalitäts-Farbstoff 7-AAD in die Zellen ein. Daher fluoreszieren Zellen im späten Stadium der Apoptose sowie nekrotische und tote Zellen

doppeltpositiv (Annexin $V^+7\text{-}AAD^+$).

Zur Bestimmung der Apoptose wurden die DC an Tag 9 entsprechend 3.2.3.2 gewonnen und in eine 96-well Mikrotiter-Rundbodenplatte überführt. Jedes well enthielt circa 0,6 – 0,9 x 10^6 DC. Die Platte wurde zentrifugiert (4 min, 350 g, 4 °C) und der Überstand verworfen. Anschließend wurden die DC in 100 µl PBS resuspendiert, zentrifugiert und der Überstand wurde erneut verworfen. Zum Ansetzen des Färbemix wurde der 10 x Bindungspuffer 1 zu 10 in destilliertem Wasser verdünnt (1 x Bindungspuffer). Der Färbemix wurde durch Verdünnung von Annexin V und 7-AAD 1 zu 16 in 1 x Bindungspuffer angesetzt. Die Zellen wurden in 25 µl Annexin-V/7AAD-Färbemix resuspendiert. Die Einzelfärbungen und Kompensationskontrollen wurden ebenfalls 1:16 verdünnt und in 25 µl Einzelfärbung resuspendiert. Die Färbung erfolgte 15 min bei 4 °C im Dunklen. Anschließend wurden 125 µl 1 x Bindungspuffer in jedes well pipettiert und die Proben in 5 ml Rundboden-Polystyrolröhrchen überführt. Die Messung erfolgte innerhalb einer Stunde nach Färbung.

2.2.3.4. Bestimmung der Caspase-1 Aktivität

Die Caspase-1 Aktivität wurde mittels des FLICA 660 *in vitro* Caspase-1 Detektionsset (ImmunoChemistry, # 9122) durchflusszytometrisch ermittelt. Die aktivierte Caspase-1 wurde durch Bindung an Zellmembrangängige Fluoreszenz-markierte Caspase-Inhibitoren (FLICA, Fluorescent Labeled Inhibitors of Caspases) ermittelt.

Dazu wurden uDC an Tag 6 gezählt und 2 x 10^5 uDC in 1 ml X-Vivo 15 + 1 % Hitze-inaktiviertes Plasma in ein 5 ml Rundboden-Polystyrolröhrchen aufgenommen und mit einem Deckel verschlossen. Während der Ausreifung (siehe Kapitel 3.2.2.7) wurden die DC mit 1 µM Vemurafenib bzw. Dabrafenib (+ 1 µl 1 mM Kinase-Inhibitor in DMSO), DMSO (+ 1 µl DMSO, Kinase-Inhibitor-Lösungsmittel-Kontrolle) behandelt. Als Positivkontrolle der Caspase-1 Aktivität wurden THP-1 Zellen mit 5 ng/ml PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat) stimuliert. Dazu wurde die THP-1 Kontrolle mit 0,5 µl einer 10 µg/ml PMA-Lösung versetzt. Als Negativkontrolle wurden unstimulierte THP-1 Zellen verwendet. Als zusätzliche Kontrolle der Färbung wurden ungefärbte DC gemessen. Nach der Stimulation wurden die DC und THP-1 Zellen für 6 Stunden bei 37 °C im Brutschrank gelagert. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (5 min, 350 g, 25 °C) und in 295 µl X-Vivo 15 + 1 % Hitze-inaktiviertes Plasma resuspendiert.

Die Durchführung des FLICA 660 *in vitro* Caspase-1 Detektionssets erfolgte entsprechend des Handbuches. Dazu wurde jedes Röhrchen mit 5 µl der FLICA 660 Arbeitslösung versetzt (1:60 Verdünnung V/V), 45 min im Brutschrank gelagert und alle 15 min resuspendiert. Anschließend wurden die Proben mit 2 ml 1 x Waschpuffer des Sets versetzt, zentrifugiert (5 min, 350 g, 25 °C) und der Überstand mit einer Glas-Pasteurpipette und Unterdruck vorsichtig abgesaugt. Zur

Vitalitäts-Färbung wurden die Proben mit 10 µl 7-AAD (1:10 in 1 x Waschpuffer des Sets) resuspendiert und 20 min bei 4 °C im Dunklen gefärbt. Nach einem Waschschritt mit 1 x Waschpuffer wurden die Zellen fixiert. Dazu wurden die Proben in 300 µl Fixierungspuffer des Sets (1:6 Fixierungspuffer in 1 x Waschpuffer) resuspendiert und für 15 min bei 4 °C im Dunklen gelagert. Nach einem weiteren Waschschritt mit 1 x Waschpuffer wurden die Proben in 100 µl FACS-Puffer aufgenommen. Die Proben wurden bis zur durchflusszytometrischen Messung am BD Accuri C6 auf Eis gelagert.

Kultivierung der THP-1 Zelllinie

Die humane Monozyten-Zelllinie THP-1 wurde mit freundlicher Genehmigung von Ronald E. Unger, Universitätsmedizin Mainz, verwendet. Die THP-1 Zellen sind Suspensionszellen. Die Zellen wurden in komplettem Wachstumsmedium (RPMI 1640 + 2 mM Glutamin + 10 % Fötales Kälberserum (FCS)) in einer 75 mm^2 Zellkulturflasche mit einer Zelldichte von 4 x 10^5 Zellen/ml im Brutschrank (37 °C, 5 % CO_2) kultiviert. Das Medium wurde alle 2 – 3 Tage gewechselt und die Zellen wurden abhängig von der Zelldichte ausgedünnt (93).

2.2.4. Quantitative Analyse der Plasmamoleküle

2.2.4.1. Analyse des Plasmaproteoms

Die Analyse des Plasmaproteoms der Patienten, die an der Studie zur Untersuchung zellulärer und molekularer Biomarker im malignen Melanom unter Checkpoint-Inhibitor Therapie teilnahmen, wurde durch die Arbeitsgruppe von Stefan Tenzer am Institut für Immunologie der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt.

Dazu wurden in niedrigen Konzentrationen vorkommende Plasmaproteine angereichert, indem hoch abundante Proteine aus 10 µl Plasma durch eine Pierce™ Immunoaffinitäts-Zentrifugationssäule (Thermo Fisher Scientific, Bremen, DE, #85165) depletiert wurden. Der Durchlauf wurde in einer Vakuumzentrifuge zentrifugiert (1000 g, RT), lyophilisiert und in Denaturierungspuffer (10 mM Dithiothreitol, 2 M Thiourea, 20 mM Tris-Puffer pH 8, 7 M Urea) aufgenommen. Mittels FASP Technik (Filter Aided Sample Preparation) wurden Proteine mit einem Molekulargewicht größer als 10 kDa im NanoSep Omega 10 kDa cutoff Filter (PALL, Dreieich, DE, #OD010C34) zurückgehalten, aufgereinigt und durch Trypsin in Peptide zersetzt (94). Mittels nanoUPLC (nanoflow ultra-performance liquid chromatography) Umkehrphasen Chromatographie an einem nanoAcquity UPLC System des Hersteller Waters wurden die Peptide separiert (95) und via $UDMS^E$ (Ultra-definition tandem mass spectrometry (E)) an einem angeschlossenen Waters Synapt G2-S Q-IMS-TOF Hybridmassenspektrometer mittels

datenunabhängiger Datenerfassung (DIA) online analysiert (94).
Die Prozessierung der Rohdaten und Datenbanksuche gegen die humane UniProt Proteom-Datenbank wurde mittels der Waters Proteomik Analyseplattform PLGS (ProteinLynx Global SERVER™) durchgeführt. Die Falscherkennungsrate (FDR) wurde auf 1 % limitiert. Die markierungsfreie Quantifizierung erfolgte unter Verwendung der ISOQuant Software (94).
Eine Messgruppe bestand aus zwei Patienten ohne Therapieerfolg und einem Patienten mit Therapieerfolg. Die Zusammensetzung des Proteoms wurde auf Unterschiede hinsichtlich der Parameter Therapieerfolg (Ansprechen/Kein Ansprechen) und Zeitpunkt (vor Therapie/nach Therapie) analysiert.

2.2.4.2. Validierung potenzieller Biomarker via ELISA

Zur Überprüfung der Ergebnisse der Proteomanalyse wurden die Plasmakonzentrationen der potenziellen Biomarker, PEDF (Pigment epithelium-derived factor) und Afamin, via ELISA gemessen. Dazu wurden die ELISA Sets, der Humane Afamin DuoSet ELISA (R&D, #DY8065-05) und der Humane Serpin F1/PEDF DuoSet ELISA (R&D, #DY1177-05), entsprechend des Herstellerprotokolls durchgeführt. Es wurde das Plasma der Patienten der Studie zum malignen Melanom verwendet. Die Plasmaproben wurden für den Afamin ELISA 1 zu 15.000 im Verdünnungspuffer angesetzt; für den PEDF ELISA wurden die Proben 1 zu 40.000 verdünnt. Die verwendeten Puffer wurden selbst angesetzt (siehe 2.1.2). Die ELISA wurden auf 96-Well Nunc MaxiSorp™ Flachbodenplatten durchgeführt und zur Inkubation mit nicht sterilen Polyesterfilmen abgedeckt. Die kolorimetrische Messung wurde an einem Hidex Sense Beta Plus Mikrotiterplattenleser mit der Hidex Software 0.5.25.0 und an einem ELx808 Mikroplattenleser mit dem Programm KC Junior v1.41.8 durchgeführt. Die Messung der OD erfolgte bei 450 nm und bei einer Referenzwellenlänge von 570 nm. Um optische Unvollkommenheiten der Mikrotiterplatte zu berücksichtigen, wurde die OD (450 nm) um die OD OD (570 nm) subtrahiert. Bei jedem ELISA wurden die Standards und eine Pufferkontrolle (Verdünnungspuffer, „Blank“) mitgeführt. Die Proben, Standards und Pufferkontrollen wurden in Duplikaten gemessen. Die Standardkurve wurde mittels einer logistischen Regressionskurve mit 4 Parametern (4PL) berechnet und nicht extrapoliert. Die Berechnung der Standardkurve und die Auswertung der Daten erfolgte mittels GraphPad Prism.

2.2.5. Die quantitative Bestimmung der mRNA

2.2.5.1. Isolation und Quantifizierung der mRNA

Die Isolation der mRNA (messenger RNA) aus DC erfolgte unter Verwendung des peqGOLD Micro RNA Sets (Safety Line) (vwr, peqlab, #12-6836-02). Dazu wurden uDC und rDC entsprechend dem obigen Protokoll zur Kultivierung an Tag 6 mit 1 x 10^6 DC/Schale in 3 ml DC Kulturmedium in einer 6-well Kulturplatte pipettiert. Die DC wurden mit 1 µM Vemurafenib, 1 µM Dabrafenib bzw. der Kontrolle (DMSO, Lösungsmittel der Inhibitoren) stimuliert. Nach 6 bzw. 24 Stunden wurden die DC entsprechend dem obigen Protokoll gewonnen, zentrifugiert (6 min, 350 g, 4°C) und der Überstand wurde weggefroren. Anschließend wurden die DC in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, zentrifugiert, der Überstand verworfen. Die DC wurden in 400 µl RNA Lysis Puffer T (RLT-Puffer) resuspendiert. Sofern die RNA Isolation nicht sofort erfolgte, wurden die DC in RLT-Puffer bei −20 °C weggefroren. Die Isolation der RNA wurde mit Ausnahme der folgenden Schritte entsprechend der Arbeitsanleitung zur „RNA Isolation aus eukaryotischen Zellen“ des Handbuches durchgeführt. Das Zell-lysat wurde in der Säule zur DNA Entfernung 4 min statt 2 min bei 10.000 g zentrifugiert (25 °C). Der optionale Schritt „DNase I Verdau“ wurde nicht durchgeführt. Die Elution der RNA (Schritt 8) erfolgte mit 40 µl sterilem RNase-freiem destilliertem H_2O des Kits.

Die Quantifizierung der RNA erfolgte an einem NanoDrop™ 2000 Spektralphotometer unter Verwendung des Programmes NanoDrop 2000 1.2.1. Zunächst wurde das Programm mit der Kontrolle, 1 µl sterilem RNase-freiem destilliertem H_2O des Kits, kalibriert (Blank-Wert, das Lösungsmittel). Die Absorption wurde bei 260 nm (Nukleinsäuren) und 280 nm (Proteine) gemessen. Anschließend wurde jeweils 1 µl unverdünntes RNA-Eluat der Proben auf den Messkopf pipettiert und 3 Mal gemessen. Der Mittelwert der RNA-Quantifizierung [ng/µl] wurde notiert. Die Reinheit des RNA-Eluats wurde anhand des A260/280-Verhältnisses überprüft.

2.2.5.2. Reverse Transkription (RT) der mRNA zu cDNA

Die reverse Transkription des unter 3.2.5.1 gewonnenen RNA-Eluats zu cDNA (engl. complementary DNA) wurde mit dem iScript cDNA Synthese Kit (Bio-Rad, #170-8891) bzw. dem All-in-One cDNA Synthesis SuperMix (Bimake, #B24408) durchgeführt. Die Proben wurden während der Durchführung entsprechend der Arbeitsanleitungen auf Eis gelagert. Je Reaktion wurden ca. 200 – 500 ng RNA in 20 µl Reaktionsvolumen verwendet. Dazu wurden für das iScript Kit 4 µl 5 x iScript Reaktionsmix, 1 µl iScript reverse Transkriptase und 15 µl RNA in Nuklease-freiem H_2O (RNA-Eluat (200 – 500 ng RNA) + Nuklease-freies H_2O) in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Für das All-in-One Kit wurden 2 µl 5 x qRT SuperMix und 18 µl RNA

in RNase-freies H_2O pipettiert. Die Reaktionsgefäße wurden in einem vwr Thermocycler Uno bei folgenden Programmen inkubiert: iScript Kit: 5 min (25 °C), 30 min (42 °C) zur reversen Transkription und 5 min (85 °C) zur Inaktivierung der reversen Transkriptase bzw. All-in-One Kit: 10 min (25 °C), 30 min (42 °C) und 5 min (85 °C). Nach Abschluss des Programmes wurden die Proben auf 4 °C temperiert. Die Lagerung der cDNA Proben erfolgte bis zur Verwendung bei −20 °C.

2.2.5.3. Quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion (real-time qPCR)

Zur real-time qPCR wurde der Biotool™ 2x SYBR Green Fast qPCR Master Mix (Bimake, #B21802) bzw. Fast EvaGreen® qPCR Master Mix (Biotium, #31003-1) verwendet. Die qPCR wurde an einem Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) durchgeführt. Zur Normalisierung des Fluoreszenz-Reportersignals wurde der hochkonzentrierte ROX (5-Carboxy-Rhodamin-X-Referenzfarbstoff) verwendet. Pro Probe wurde ein Reaktionsvolumen von 20 µl in eine Sapphire 96-well Mikroplatte pipettiert. Die real-time qPCR wurde entsprechend der Arbeitsanleitungen durchgeführt. Das Reaktionsvolumen des Bimake Sets setzte sich aus 10 µl 2x Biotool™ SYBR Green FAST Master Mix, 2 µl cDNA (siehe 3.2.5.2), 1 µl Vorwärtsprimer (1:100 in destilliertem H_2O), 1 µl Rückwärtsprimer (1:100), 0,4 µl ROX Referenzfarbstoff und 5,6 µl destilliertes H_2O (Ampuwa®Plastipur®) zusammen.
Das Reaktionsvolumen des Biotium-Sets setzte sich aus 10 µl 2x Fast EvaGreen Master Mix, 2,2 µl cDNA, 1 µl Vorwärtsprimer (1:100 in destilliertem H_2O), 1 µl Rückwärtsprimer (1:100), 2 µl 10x ROX Referenzfarbstoff und 3,8 µl destilliertes H_2O (Ampuwa®Plastipur®) zusammen
Die Vervielfältigung der cDNA erfolgte anhand des folgenden Programmes. Zur Aktivierung der DNA Polymerase wurde die Platte im PCR System für 5 min (Bimake) bzw. 2 min (Biotium) auf 95 °C erwärmt. Die PCR lief über 40 (Bimake) bzw. 45 Zyklen (Biotium). Die Zyklen bestanden aus einem Denaturierungs- (3 s (Bimake)/ 15 s (Biotium), 95 °C) und Primer-Anlagerungs (Annealing)/-Verlängerungs (Extension)-Schritt (15 s (Bimake)/ 60 s (Biotium), 60 °C). Im letzten Schritt wurde die Schmelzkurve erstellt (15 s (95 °C), 60 s (60 °C), 15 s (95 °C)).
Die relative Quantifizierung der Daten wurde anhand der delta delta Schwellenwert-Methode ($\Delta\Delta$Ct (cycle threshold)-Methode) in Microsoft Excel durchgeführt. Die relative Expression der cDNA wurde mit dem Haushaltsgen B2M berechnet und auf den 6 Stunden-Wert normiert. Die Graphen und Signifikanzen wurden mit GraphPad Prism 6.0 erstellt und berechnet.

2.2.6. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung und Erstellung der Graphen erfolgte unter Verwendung der Software GraphPad Prism 6.07. Die Daten wurden in Microsoft Excel 2010 zusammengestellt. Für die Studien wurden unparametrische ungepaarte zweiseitige Tests wie z. B. der Mann-Whitney und der Kruskal-Wallis Test verwendet und mit Dunn's Mehrfachvergleichs-Test korrigiert. Die Legenden der Abbildungen geben den verwendeten Test an. Da der D'Agostino & Pearson omnibus Normalitätstest nur für einige Kohorten eine Normalverteilung aufwies, wurden unparametrische Test verwendet. Es ist bekannt, dass die interindividuellen Werte in kleinen Gruppen stark variieren. Es wurde ein ungepaarter Test verwendet, da zu einigen Patienten nur Daten zu einem der beiden Zeitpunkte A und B vorlagen.

Die Spezifität und Sensitivität der Parameter wie z. B. LDH wurde nach Fawcett in Microsoft Excel 2010 berechnet (93).

Die Überlebenszeitanalyse untersuchte den Effekt der Messdaten zum Zeitpunkt vor Therapiebeginn auf das Gesamtüberleben der Therapieansprecher und Nicht-Ansprecher. Die Überlebenszeitanalyse wurde mittels der Kaplan-Meier Methode (Log-rank (Mantel-Cox) Test) durchgeführt. Als Gesamtüberleben der Patienten wurde der Zeitraum zwischen Studienbeginn und dem Todestag bzw. dem Tag des letzten Kontaktes gemessen. Das Datum des letzten Kontaktes wurde in der Kaplan-Meier Kurve als zensierter Datenpunkte dargestellt (runder Punkt auf Kurve). Therapieansprecher und Nicht-Ansprecher wurden anhand von Grenzwerten in jeweils zwei Untergruppen geteilt. So wurde das Gesamtüberleben von z. B. Nichtansprechern mit Messwerten über bzw. unter einem Grenzwert untersucht. Als Grenzwerte der Parameter (engl. cutoff) dienten die Mediane der gesunden Spender (wie z. B. bei Prozentsätzen der Zellen) bzw. die Obergrenzen der Normbereiche (wie z. B. bei LDH, S100 und der Thrombozyten-Konzentration).

In der Durchflusszytometrie wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) mit dem Mittelwert (Mean) angegeben. Aufgrund interindividueller Unterschiede wurden die Zellpopulationen in Patienten individuell eingegrenzt.

Sofern nicht anders angegeben, zeigen die Graphen den Median mit Interquartilsabstand. Die einzelnen Datenpunkte zeigen den Messwert eines Versuchs bzw. eines Patienten. Eine horizontale gestrichelte Linie markiert den Median einer Kontrollgruppe wie z. B. den der gesunden Spender bzw. eine Unter- oder Obergrenze eines Normbereiches.

Die statistische Signifikanz wurde durch Asteriske gekennzeichnet ($p \leq 0,05$ *, $p \leq 0,01$ **, $p \leq 0,001$ ***).

3. Ergebnisse

3.1. Immunomonitoring von Melanompatienten unter Checkpoint-Inhibitor Therapie

3.1.1. Statistische Auswertung der Patientencharakteristika

Anhand einer repräsentativen Stichprobe können Aussagen, die über eine kleine Anzahl an Checkpoint-Inhibitor Patienten gemacht werden, auf eine große Zahl dieser Patienten zutreffen. Zur Analyse der Repräsentativität der Studie wurden die Grundcharakteristika der 51 Studienteilnehmer erhoben (Tab. 20). Zusätzlich wurde das typische Ansprechmuster der Checkpoint-Inhibitoren sowie die immunologisch bedingten unerwünschten Ereignisse untersucht (IRAE, immune-related adverse events).

Über die Hälfte der Patienten waren über 65 Jahre alt (Medianwert 69 Jahre). Es nahmen ein Drittel mehr Männer als Frauen an der Studie teil. Aufgrund der geringen Teilnehmerzahl erfolgte keine geschlechts- und altersspezifische Auswertung der Studiendaten. Die Patienten waren kaukasischer Herkunft. 94,1 % der Patienten wiesen ein Melanom im Stadium IV mit nicht resektierbaren Fernmetastasen auf, 5,9 % ein Melanom im Stadium IIIC mit nicht resektierbaren lokoregionären Metastasen und 25,5 % der Patienten Metastasen im zentralen Nervensystem auf (87).

Laut Klassifikation der malignen Melanome wurde das oberflächlich spreitende Melanom (SSM) mit 11,8 % am häufigsten diagnostiziert. Am zweithäufigsten traten das noduläre, amelanotische und Schleimhautmelanom mit jeweils 8 % auf. In 5,9 % der Patienten war der Primärtumor unbekannt und in 47,1 % wurden keine Angaben zum Tumor festgehalten.

Die Mutation des BRAF Protoonkogens wurde in allen Patienten untersucht und war in 27,5 % der Patienten mutiert. Ein Drittel der Patienten wurde auf eine NRAS Mutation getestet, die in 9,8 % der Patienten vorlag.

Die Studie schloss Patienten ohne (68,6 %) und mit systemischer Vortherapie (31,4 %) ein. 2 % der Patienten hatten vor Studienbeginn eine Chemotherapie, 7,8 % eine (andere) Checkpoint-Inhibitor Therapie und 21,6 % einer BRAF-/MEK-Inhibitor Therapie abgeschlossen (Tab. 21). Während der Studie wurden 54,9 % der Patienten mit dem Checkpoint-Inhibitor Ipilimumab, 21,6 % mit Pembrolizumab, 3,9 % mit Nivolumab und 19,6 % mit der Ipilimumab-/Nivolumab Kombinationstherapie behandelt.

Entsprechend der Literatur sprach in dieser Studie ein Drittel der Patienten auf die Checkpoint-Inhibitor Therapie an (56,96): 29, 4 % Therapieansprecher vs. 64,7 % Nicht-Ansprecher. Therapieansprecher sprachen zu 19,6 % partiell an, zeigten zu 7,8 % einen stabilen Krankheitsverlauf und wiesen zu 2 % eine komplette Remission des Tumors auf (97) (Tab. 22).

Nicht-Ansprecher verzeichneten einen progredienten Krankheitsverlauf in Form von Metastasen und Tumorwachstum. Für 5,9 % der Patienten lagen keine Daten zum Therapieerfolg vor.

Tabelle 20 Grundcharakteristika der Patienten.
BRAF, B-Raf Protoonkogen; NRAS, N-Ras Protoonkogen; ZNS, zentrales Nervensystem.

Patientencharakteristika	**n**	**%**
Patienten	51	100,0
Alter [Jahre]		
Median in Jahren (Bereich)	69 (27-86)	
< 65	22	43,1
≥ 65	29	56,9
Geschlecht		
Männer	31	60,8
Frauen	20	39,2
Ethnik		
Kaukasier	51	100,0
Erkrankungsstatus		
Unresektierbarer Tumor Stadium IIIC	3	5,9
Unresektierbarer Tumor Stadium IV	48	94,1
ZNS Metastase	13	25,5
Klassifikation der Erkrankung		
Oberflächlich Spreitendes Melanom (SSM)	6	11,8
Noduläres Melanom	4	7,8
Akrolentiginöses Melanom (ALM)	3	5,9
Amelanotisches Melanom	4	7,8
Schleimhautmelanom	4	7,8
Aderhautmelanom	2	3,9
Lentigo Maligna Melanoma (LMM)	1	2,0
Krebs mit unbekanntem Primärtumor (CUP)	3	5,9
Keine Angaben	24	47,1
BRAF- and NRAS-Status	**BRAF**	**NRAS**
Mutationen	14 (27,5 %)	5 (9,8 %)
Wildtyp	37 (72,5 %)	12 (23,5 %)
Unbekannt	0	34 (66,7 %)

Tabelle 21 Therapien der Patienten.
Erhielt ein Patient vor Studienbeginn zwei verschiedene Checkpoint Inhibitor Therapien, wurden zwei berechnet. Als systemische Vortherapien erhielten Patienten die BRAF-/MEK-Inhibitoren Vemurafenib (n = 5), Pimasertib (1), Dabrafenib + Trametinib (4) und Vemurafenib + Cobimetinib (2) sowie die Checkpoint-Inhibitoren Pembrolizumab (1), Ipilimumab (2) oder Nivolumab (2). Ein Patient erhielt als Vortherapie das Chemotherapeutikum Dacarbazin. Die Patienten erhielten maximal zwei Vortherapien. BRAF, B-Raf Protoonkogen; ECT, Elektrochemotherapie; MEK, Mitogen-aktivierte Proteinkinase; MERIT, engl. Mutanome Engineered RNA Immunotherapy; n, Anzahl der Patienten; TACE, transarterialle Chemoembolisation.

Patientencharakteristika	**n**	**%**
Patienten	51	100
Checkpoint-Inhibitor Therapien in der Studie		
Ipilimumab	28	54,9
Ipilimumab + Nivolumab	10	19,6
Pembrolizumab	11	21,6
Nivolumab	2	3,9
Systemische Vortherapien		
Chemotherapie	1	2,0
BRAF-/MEK-Inhibitor	11	21,6
Checkpoint-Inhibitoren	4	7,8
Anzahl systemischer Vortherapien		
0	35	68,6
1	11	21,6
2	5	9,8
> 2	0	0,0
Vorherige Strahlentherapien		
Radiatio cerebral	3	8,1
Radiatio peripher	5	9,8
Vorherige adjuvante Immuntherapien		
Interferon-Immuntherapie	2	3,9
Individualisierte RNA-Immuntherapie (MERIT)	3	5,9
Vorherige TACE		
Transarterielle Chemoembolisation	2	3,9
Vorherige ECT		
Elektrochemotherapie	1	2,0

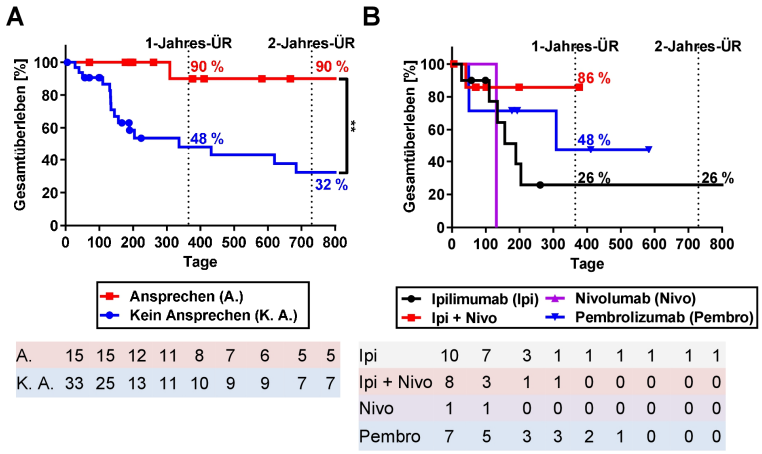
Tabelle 22 Ansprechmuster der Checkpoint-Inhibitor Therapie.
Der Therapieerfolg wurde zur zweiten Durchuntersuchung (Staging) festgelegt. Dazu wurde der Ausbreitungsgrad des Tumors durch einen Radiologen anhand von Computer (CT)- und magnetischer Resonanztomographie (MRT) bestimmt. Das Resultat der Therapie wurde bei drei Patienten als unbekannt eingestuft. Als Gründe dafür wurden ein frühzeitiger Abbruch in Folge unerwünschter Nebenwirkungen, ein Behandlungsortwechsel und Selbsttötung verzeichnet.

Ansprechmuster	**n**	**%**
Patienten	51	100,0
Ansprechen	15	29,4
Komplettes Ansprechen	1	2,0
Partielles Ansprechen	10	19,6
Stabile Erkrankung	4	7,8
Kein Ansprechen	33	64,7
Unbekannt	3	5,9

Tabelle 23 Immunologisch-bedingte unerwünschte Ereignisse (IRAE).
Bei Patienten mit mehreren IRAE wurden die IRAE einzeln gezählt. Die Prozentzahlen beziehen sich auf die n(Total) in der jeweiligen Zeile. IRAE, immunologisch-bedingte unerwünschte Ereignisse (engl. immun-related adverse events).

Immunologisch-bedingte unerwünschte Ereignisse (IRAE)	**n (Patienten)**	**n (Total)**	**%**
Anzahl der Patienten mit IRAE	15	51	29,4
Unter Ipilimumab	7	28	25,0
Unter Ipilimumab + Nivolumab	5	10	50,0
Unter Pembrolizumab	3	11	27,3
Unter Nivolumab	0	2	0,0
Typ der IRAE	**n (IRAE)**		
Anzahl der IRAE	18		100,0
Colitis	8	18	44,4
Pneumonitis	2	18	11,1
Thyreoiditis	3	18	16,7
Hepatitis	1	18	5,6
Hypophysitis	2	18	11,1
Pankreatitis	1	18	5,6
Kardiomyositis	1	18	5,6
Unterbrechung der Therapie durch IRAE	**n (Patienten)**		
Anzahl der Unterbrechungen der Therapien	7	15	46,7
Unter Ipilimumab	5	7	71,4
Unter Ipilimumab + Nivolumab	1	7	14,3
Unter Pembrolizumab	1	7	14,3
Under Nivolumab	0	7	0,0

Die Checkpoint-Inhibitor Therapie führte in 29,4 % der Patienten zu immunologisch bedingten unerwünschten Ereignissen (IRAE, immune-related adverse events) (Tab. 23). Unter Ipilimumab Monotherapie traten in 25 % der Patienten IRAE auf, während unter Ipilimumab/Nivolumab Kombinationstherapie in doppelt so vielen Patienten (50 %) IRAE auftraten. IRAE manifestierten sich in 44,4 % der Fälle als Colitis und in 16,7 % als Thyreoiditis. 46,7 % der Patienten unterbrachen aufgrund der IRAE die Checkpoint-Inhibitor Therapie. Patienten unter Ipilimumab Monotherapie (71,4 %) unterbrachen circa fünfmal häufiger IRAE-bedingt die Therapie als Patienten unter Nivolumab/Ipilimumab Kombinationstherapie (14,3 %). Damit traten unter der Kombinationstherapie mehr IRAE, jedoch weniger folgenschwere IRAE (z. B. Therapieabbruch) als unter der Ipilimumab Monotherapie auf.



A.	15	15	12	11	8	7	6	5	5
K. A.	33	25	13	11	10	9	9	7	7

Ipi	10	7	3	1	1	1	1	1	1
Ipi + Nivo	8	3	1	1	0	0	0	0	0
Nivo	1	1	0	0	0	0	0	0	0
Pembro	7	5	3	3	2	1	0	0	0

Abbildung 7 Überlebenszeitanalyse anhand des Therapieerfolgs und der Checkpoint-Inhibitor Therapie.

Der Tag 0 markiert den Start der Checkpoint-Inhibitor Therapie. 3 Patienten ohne Angaben zum Therapieerfolg wurden von der Analyse ausgeschlossen (n = 3). Für Patienten ohne Todesdatum wurde das Datum der letzten Verlaufskontrolle als Zensurzeitpunkt (runder Punkt) angegeben. **A** Überlebenszeitanalyse anhand des Therapieerfolgs. 33 Patienten sprachen nicht auf die Checkpoint-Therapie an (blaue Linie); 15 Patienten sprachen auf die Therapie an (rote Linie). Die Kaplan-Meier Kurven zeigen einen signifikanten Unterschied (p = 0,0078 **). **B** Überlebenszeitanalyse anhand der Checkpoint-Inhibitor Therapie. Von 26 analysierten Patienten erhielten 10 Patienten Ipilimumab, 1 Patient Nivolumab, 7 Patienten Pembrolizumab und 8 Patienten eine Ipilimumab/Nivolumab Kombinationstherapie. Patienten mit Therapiewechsel (n = 24) nach Studienbeginn sowie Patienten mit fehlender Verlaufskontrolle aufgrund von Behandlungsortwechsel (n = 1) wurden von der Überlebenszeitanalyse ausgeschlossen. Kaplan-Meier Methode, Log rank (Mantel-Cox) Test, p < 0,05 *. A., Ansprechen; Ipi, Ipilimumab; K. A., Kein Ansprechen; Nivo, Nivolumab; ÜR, Überlebensrate; Pembro, Pembrolizumab.

Therapieansprecher lebten signifikant länger als Nicht-Ansprecher (Abb. 7). Die Gesamtüberlebenszeit der aller Studienteilnehmer ergab einen Median von 684 Tagen. Nicht-Ansprecher lebten im Median 336 Tagen (Hazard Ratio (Mantel-Haenszel), Ansprechen vs. Kein Ansprechen, Ratio 3,609; 95 % CI, 1,403 – 9,284). Der Median der Therapieansprecher blieb undefiniert, da bei Studienende mehr als 50 % der Therapieansprecher am Leben waren. Die 2-Jahres-Überlebensrate (ÜR) der Therapieansprecher war mit 90 % circa dreimal so hoch wie die der Nicht-Ansprecher (32 %, p = 0,0078 **).

Der Prozentsatz der Patienten, die 1 Jahr nach Therapiebeginn noch am Leben waren (1-Jahres-Überlebensrate (ÜR)), war unter der Ipilimumab/Nivolumab Kombinationstherapie höher als unter den untersuchten Monotherapien. Die Ipilimumab/Nivolumab Kombinationstherapie zeigte mit 86 % eine circa 3-fach höhere 1-Jahres-ÜR im Vergleich zur Ipilimumab Monotherapie (26 %). Pembrolizumab zeigte mit 48 % eine fast doppelt so hohe 1-Jahres-ÜR im Vergleich zur Ipilimumab Monotherapie (26%). Da nur ein Patient ohne Therapiewechsel eine Nivolumab Monotherapie erhielt, konnten keine näheren Aussagen über Nivolumab getroffen werden.

In der vorliegenden Studie entsprach das Verhältnis der Therapieansprecher zu Nicht-Ansprecher (1 zu 2) der Literatur. Unter der Ipilimumab Monotherapie traten halb so viele IRAE auf wie unter der Ipilimumab/Nivolumab Kombinationstherapie. Die IRAE unter der Ipilimumab Monotherapie führten jedoch circa fünfmal häufiger zu Therapieabbrüchen. Die 1-Jahres-ÜR der Patienten unter Ipilimumab/Nivolumab Kombinationstherapie war dreimal höher als die der Patienten unter Ipilimumab Monotherapie.

3.1.2. Untersuchungen zu zellulären Biomarkern im peripheren Blut *ex vivo*

3.1.2.1. Erhöhtes Lymphozyten-Monozyten-Verhältnis indiziert ein Therapieansprechen

Die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC, peripheral blood mononuclear cells) können anhand der Durchflusszytometrie in zwei große immunologisch wichtige Gruppen unterteilt werden: Lymphozyten und Monozyten. Die Population der Lymphozyten beinhaltet z. B. Tumorantigen-spezifische T-Effektorzellen sowie immunsuppressive regulatorische T-Zellen. Die Population der Monozyten setzt sich unter anderem aus Vorläufern der dendritischen Zellen, Makrophagen und immunsuppressiven myeloiden Suppressorzellen (MDSC, engl. myeloid-derived suppressor cells) zusammen. In der Tumordiagnostik wird das Verhältnis der Lymphozyten zu Monozyten zunehmend als Biomarker für den Grad der chronischen Entzündung (98) und als zellulärer Biomarker der Tumorprognose untersucht (99,100).

In der vorliegenden Arbeit wurden die prozentualen Anteile der Lymphozyten und der Monozyten an den lebenden PBMC durchflusszytometrisch gemessen. Anhand der Größe und Granularität wurden Monozyten im FSC-SSC-Diagramm als große Zellen mit Granula und Lymphozyten als kleine Zellen mit wenigen Granula identifiziert (Abb. 8A). Vor Therapiebeginn (Zeitpunkt A) zeigten Therapieansprecher einen höheren Prozentsatz an Lymphozyten als Nicht-Ansprecher (Abb. 8). Der Prozentsatz der Lymphozyten (69 %) und Monozyten (15 %) in Therapieansprechern vor Therapiebeginn war vergleichbar mit dem in gesunden Spendern (63

% bzw. 18 %). Der Prozentsatz der Lymphozyten vor (50 %) und nach Therapiebeginn (Zeitpunkt B, 51 %) in Nicht-Ansprechern lag niedriger als in gesunden Spendern.

Der Monozyten-Prozentsatz war in Nicht-Ansprechern vor Therapiebeginn (29 %) fast doppelt so hoch verglichen mit Therapieansprechen (15 %) sowie gesunden Spendern (18 %). In Therapieansprechern stieg der Prozentsatz der Monozyten nach der ersten Checkpoint-Inhibitor Gabe von 15 % auf 27 % an und war vergleichbar mit dem in Nicht-Ansprechern, unabhängig vom Zeitpunkt (A, 29 %; B, 26 %).

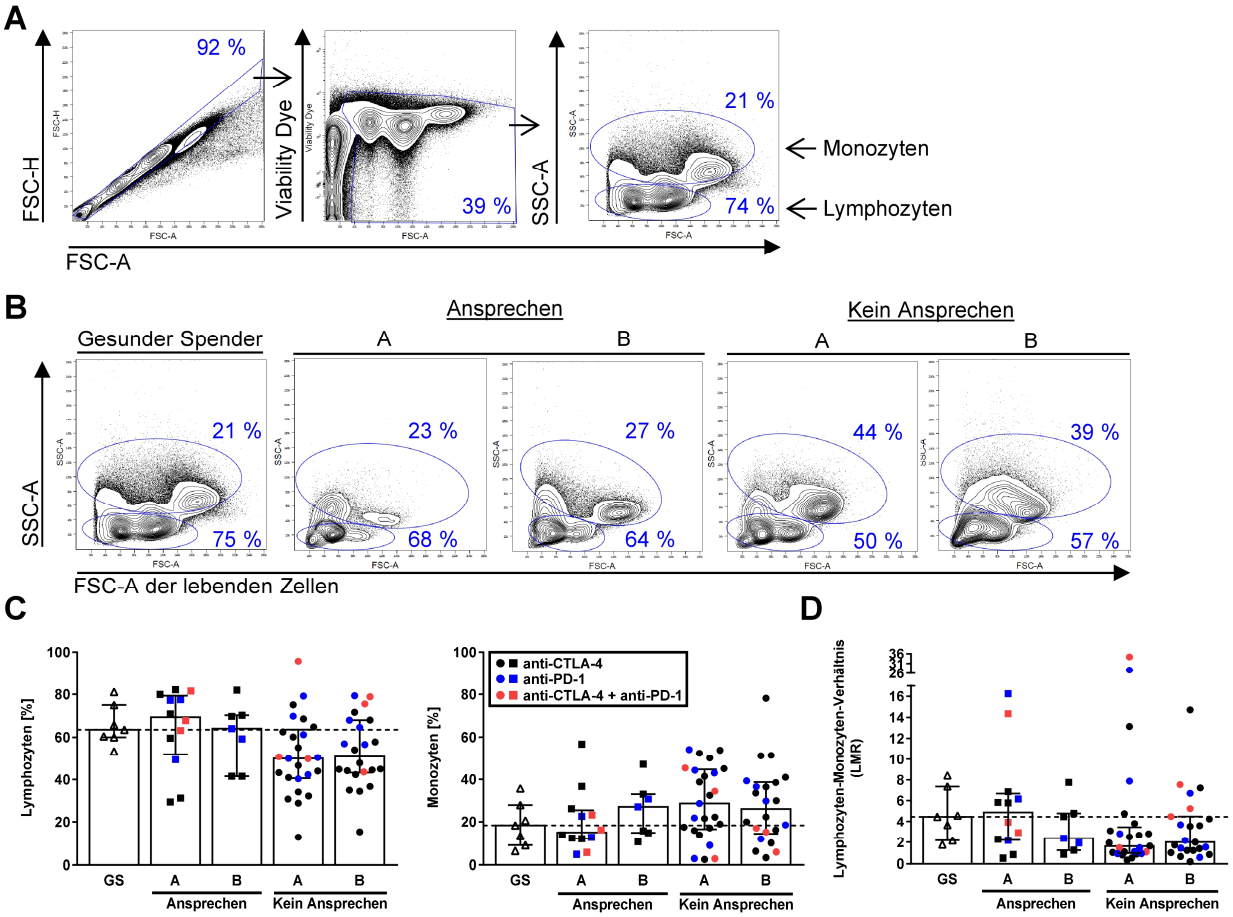


Abbildung 8 Immunomonitoring der Lymphozyten und Monozyten im peripheren Blut.

A Durchflusszytometrische Eingrenzung der Monozyten und Lymphozyten. Die Analyse schloss Dubletten und tote Zellen aus und identifizierte Monozyten und Lymphozyten anhand der Lage im FSC-SSC-Diagramm. Das Beispiel zeigt einen gesunden Spender. **B** Exemplarische durchflusszytometrische Konturdiagramme. Aufgrund interindividueller Unterschiede wurden die Zellpopulationen für jeden Patienten individuell eingegrenzt. Das Konturdiagramm zeigt die Population der lebenden Zellen. **C** Lymphozyten und Monozyten. Der prozentuale Anteil der Monozyten bzw. Lymphozyten an den lebenden Zellen des peripheren Blutes wurde in gesunden Spendern (GS) sowie in Ansprechern und Nicht-Ansprechern der Checkpoint-Inhibitor Therapie vor (Zeitpunkt A) und nach Therapiebeginn (Zeitpunkt B) ermittelt. Die gestrichelte Linie markiert den Median der gesunden Spender (Kontrolle). **D** Lymphozyten-Monozyten-Verhältnis (LMR). Die LMR wurde durch die Division des Prozentsatzes der Lymphozyten in den lebenden Zellen durch den Prozentsatz der Monozyten berechnet. (n(GS) = 7, n(A.) = 7 – 12, n(K. A.) = 22 – 25). Median ± Interquartilsabstand. Kruskal-Wallis Test, $p < 0{,}05$ *. A, Zeitpunkt vor Therapiebeginn; B, Zeitpunkt 1 – 3 Wochen nach Therapiebeginn; CTLA-4, zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Protein 4; FSC, Vorwärtsstreulicht; GS, gesunder Spender; LMR, Lymphozyten-Monozyten-Verhältnis; PD-1, programmiertes Zelltodprotein 1; SSC, Seitwärtsstreulicht.

Das Lymphozyten-Monozyten-Verhältnis (LMR, engl. lymphocyte-to-monocyte ratio) wird in der Klinikroutine als absolute Zellzahl/nL angegeben. In dieser Studie wurde die LMR wie folgt berechnet:

$$LMR = \frac{Lymphozyten\ in\ viablen\ Zellen\ [\%]}{Monozyten\ in\ viablen\ Zellen\ [\%]}$$

Therapieansprecher (4,9) und gesunde Spender (4,4) besaßen vor Therapiebeginn eine vergleichbare LMR (Abb. 8D). Nicht-Ansprecher wiesen vor (1,6) und nach Therapiebeginn (2,0) eine nur halb so hohe LMR auf. Nach Therapiebeginn halbierte sich die LMR der Therapieansprecher (2,4) und war vergleichbar mit der LMR in Nicht-Ansprechern (2,0), da sich der Prozentsatz der Monozyten in Therapieansprechern erhöhte, während der Prozentsatz der Lymphozyten gleich blieb.

In dieser Studie besaßen Therapieansprecher der Checkpoint-Inhibitor Therapie vor Therapiebeginn eine hohe Prozentzahl an Lymphozyten, eine niedrige Prozentzahl an Monozyten und ein hohes Lymphozyten-Monozyten-Verhältnis (LMR) im peripheren Blut im Vergleich zu Nicht-Ansprechern und gesunden Spendern.

3.1.2.2. Erhöhte $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zell-Prozentsätze in Therapieansprechen

Durch tumor-spezifische Antigene aktivierte T-Zellen spielen eine zentrale Rolle in der adaptiven Immunantwort (101–103). Aktivierte zytotoxische $CD8^+$ T-Zellen produzieren Effektorzytokine wie z. B. die Serinprotease Granzym B und das Protein Perforin, welche sie in Granula speichern und bei Bindung einer Zielzelle sezernieren (Exozytose) (104). Freigesetztes Perforin polymerisiert in Anwesenheit von Calcium und formt Poren in der Zellmembran, durch die Granzym B in die Zielzelle eindringen kann. Durch einen porenlosen Mechanismus werden Perforin und Granzym B als Granula von der Zielzelle aufgenommen. Im Zytoplasma und Nukleus angelangt, spaltet und aktiviert Granzym B unter anderem Initiator- und Effektor-Procaspasen, leitet die Apoptose der Zielzelle ein und initiiert die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine an die Umgebung der Zelle (105) .
Via Durchflusszytometrie wurde der prozentuale Anteil der $CD4^+$, $CD8^+$ und $CD8^+GZMB^+$ T-Zellen an den $CD3^+$ T-Zellen im peripheren Blut von gesunden Spendern und Melanompatienten gemessen (Abb. 9).

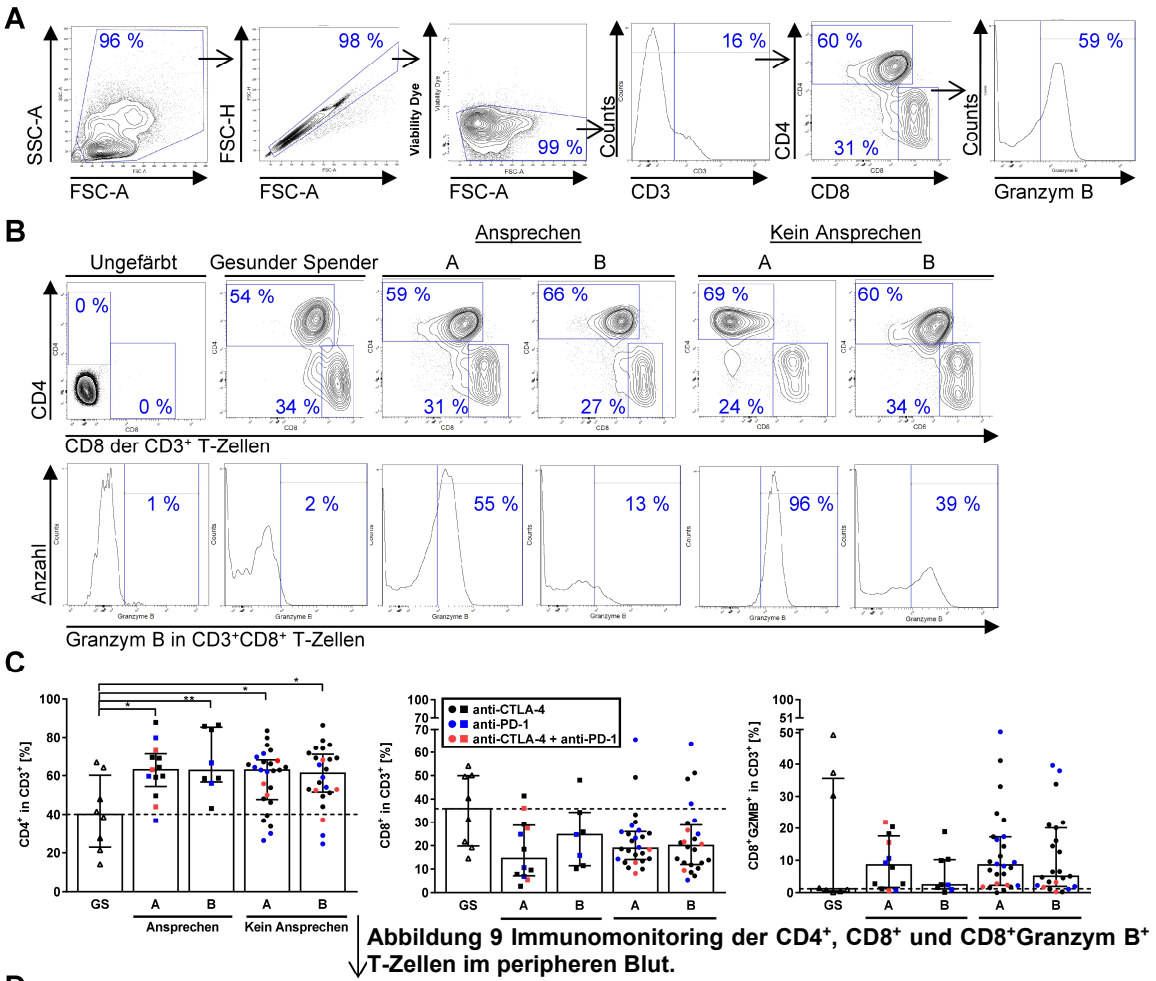


Abbildung 9 Immunomonitoring der CD4⁺, CD8⁺ und CD8⁺Granzym B⁺ T-Zellen im peripheren Blut.

A Durchflusszytometrische Eingrenzung der T-Zellen. Dubletten und tote Zellen wurden von der Analyse ausgeschlossen. Granzym B wurde intrazellular gefärbt. Das Beispiel zeigt einen Patienten mit Therapieerfolg vor Therapiebeginn. **B** Exemplarische durchflusszytometrische Diagramme. Aufgrund interindividueller Unterschiede wurden die Zellpopulationen für jeden Patienten individuell eingegrenzt. Das CD4⁺/CD8⁺-Konturdiagramm zeigt die Population der CD3⁺ Zellen; das CD8⁺GZMB⁺ Histogramm zeigt die Population der CD3⁺CD8⁺ T-Zellen. Das CD8⁺GZMB⁺ Histogramm gibt den prozentualen Anteil der GZMB⁺CD8⁺ T-Zellen an den CD8⁺ T-Zellen an. **C** CD4⁺, CD8⁺ und CD8⁺Granzym B⁺ T-Zellen. Der prozentuale Anteil der T-Zellen an den CD3⁺ Zellen im peripheren Blut wurde in gesunden Spendern (GS) sowie in Ansprechern und Nicht-Ansprechern der Checkpoint-Inhibitor Therapie vor (Zeitpunkt A) und nach Therapiebeginn (Zeitpunkt B) ermittelt. Die gestrichelte Linie markiert den Median der gesunden Spender (n(GS) = 8, n(A.) = 7 – 13, n(K. A.) = 23 – 26; Zweiseitiger One-Way Anova Test mit Tukey's Mehrfachvergleichstest, CD4⁺, p(GS vs. K. A.(A)) = 0,0431, p(GS vs. K. A.(B)) = 0,03, p(GS vs. A.(A)) = 0,0179, p(GS vs. A.(B)) = 0,0078).

D Überlebenszeitanalyse anhand der CD4⁺ T-Zellen. Die Kaplan-Meier Kurve zeigt das prozentuale Gesamtüberleben der Patienten abhängig vom Therapieerfolg und den CD4⁺ T-Zellen. Als Grenzwert wurde der Median der CD4⁺ T-Zellen in gesunden Spendern verwendet (Log-rank (Mantel-Cox, p(> A. vs. > K. A.) = 0,0361 *, p(> A. vs. < K. A.) = 0,0009 ***, p(Vergleich aller Kurven) = 0,0304 *). Median ± Interquartilsabstand. Kruskal-Wallis Test, p < 0,05 *, p < 0,01 **, p < 0,001 ***. A, Zeitpunkt vor Therapiebeginn; A., Ansprechen; B, Zeitpunkt 1 – 3 Wochen nach Therapiebeginn; CTLA-4, zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Protein 4; GS, gesunder Spender; GZMB, Granzym B; K. A., Kein Ansprechen; PD-1, anti-programmiertes Zelltodprotein 1; ÜR, Überlebensrate.

In dieser Studie wiesen Therapieansprecher und Nicht-Ansprecher vor und nach Therapiebeginn signifikant höhere Prozentsätze $CD4^+$ T-Zellen (61 – 63 %) auf als gesunde Spender (40 %) (Abb. 9B/C), wohingegen der Prozentsatz der $CD8^+$ T-Zellen vor und nach Therapiebeginn geringer war. So war Prozentsatz der $CD8^+$ T-Zellen in Therapieansprechern (15 %) und Nicht-Ansprecher (19 %) vor Therapiebeginn verglichen mit gesunden Spendern (36 %) nur halb so hoch. Nach der ersten Checkpoint-Inhibitor Gabe stieg der Prozentsatz der zytotoxischen $CD8^+$ T-Zellen in Therapieansprechern auf 25 % an; in Nicht-Ansprechern blieb der Prozentsatz unverändert (20 %). Der Prozentsatz der $CD8^+GZMB^+$ T-Effektorzellen (8,5 %) war in Therapieansprecher wie Nicht-Ansprecher vor Therapiebeginn im Vergleich zu gesunden Spendern (1,2 %) jedoch deutlich höher. Nach Therapiebeginn sank der prozentuale Anteil der $CD8^+GZMB^+$ T-Effektorzellen in Therapieansprechern um mehr als ein Drittel auf 2,4 %; in Nicht-Ansprechern sank dieser auf 5,1 %.
Um den Effekt der $CD4^+$ T-Zellen auf das Gesamtüberleben zu untersuchen, wurde anhand des Medians der gesunden Spender (Grenzwert ≥ 40 %) eine Überlebenszeitanalyse (Kaplan-Meier Methode) durchgeführt (Abb. 9D). Therapieansprecher und Nicht-Ansprecher mit ≥ 40 % $CD4^+$ T-Zellen im peripheren Blut vor Therapiebeginn lebten länger als Patienten mit ≤ 40 % $CD4^+$ T-Zellen. Therapieansprecher mit ≥ 40 % $CD4^+$ T-Zellen lebten signifikant länger als Nichtansprecher mit ≥ 40 % $CD4^+$ T-Zellen ($p = 0{,}0361$ *) und mit ≤ 40 % $CD4^+$ T-Zellen ($p = 0{,}0009$ ***). Kein Patient mit ≤ 40 % $CD4^+$ T-Zellen lebte nach Studienbeginn länger als zwei Jahre. Die 2-Jahres-Überlebensrate der Therapieansprecher war mit 89 % mehr als doppelt so hoch wie die der Nicht-Ansprecher (38 %). Da der Prozentsatz der $CD8^+$ und $CD8^+GZMB^+$ T-Zellen in den Patienten mehrheitlich über dem Median der gesunden Spender lag, wurden keine Überlebenszeitanalysen durchgeführt.

In dieser Studie besaßen Therapieansprecher vor Therapiebeginn einen erhöhten Prozentsatz $CD4^+$ und $CD8^+GZMB^+$ T-Zellen an den $CD3^+$ PBMC und verzeichneten – anders als Nicht-Ansprecher – einen Anstieg des Prozentsatzes der $CD8^+$ T-Zellen nach der ersten Checkpoint-Inhibitor Gabe. Therapieansprecher mit ≥ 40 % $CD4^+$ T-Zellen lebten signifikant länger als Nicht-Ansprecher.

3.1.2.3. Verstärkte $CD8^+$ und $CD8^+GZMB^+$ T-Zellproliferation indiziert ein Therapieansprechern

Die adaptive Immunantwort wird durch die Proliferation Tumorantigen-spezifischer T-Effektorzellen aufrechterhalten und durch drei Signale initiiert: (i) die Bildung eines Komplexes aus MHC:Peptid und TCR, (ii) die Ko-stimulation über CD80/CD86 und CD28 sowie (iii) die

Stimulation mit Zytokinen. Das DC-Zytokin IL-12 und die Th1-Effektorzytokine IFN-γ und IL-2 fördern autokrin die Proliferation, die Polarisierung der $CD4^+$ Th0-Zellen zu $CD4^+$ Th1-Zellen und die Stimulation zytotoxischer $CD8^+$ T-Zellen (106). Durch das zytotoxische Zytokin Granzym B induzieren $CD8^+GZMB^+$ T-Effektorzellen die Apoptose in Tumorzellen. In dieser Studie besaßen Therapieansprecher nach Therapiebeginn hohe Prozentsätze $CD4^+$ und $CD8^+GZMB^+$ T-Effektorzellen an $CD3^+$ Zellen. Im Folgenden wurde untersucht, ob die T-Zellsubpopulationen sich in der aktiven Phase des Zellzyklus befanden.

Der Zellzyklus wird in die Ruhephase (G_0), die Interphase (G_1, S, G_2) und die Mitose (M) unterteilt. Während der aktiven Phasen der Zellzyklus (Interphase, Mitose) wird der Proliferationsmarker Ki-67 im Zellkern exprimiert (107). Der Prozentsatz der $Ki\text{-}67^+$ proliferierenden Zellen an den $CD4^+$, $CD8^+$ und $CD8^+GZMB^+$ T-Zellen wurde durchflusszytometrisch durch intranukleäre Färbung des Proliferationsmarkers Ki-67 gemessen (Abb. 10A). Die Zellen wurden vor der Messung nicht stimuliert.

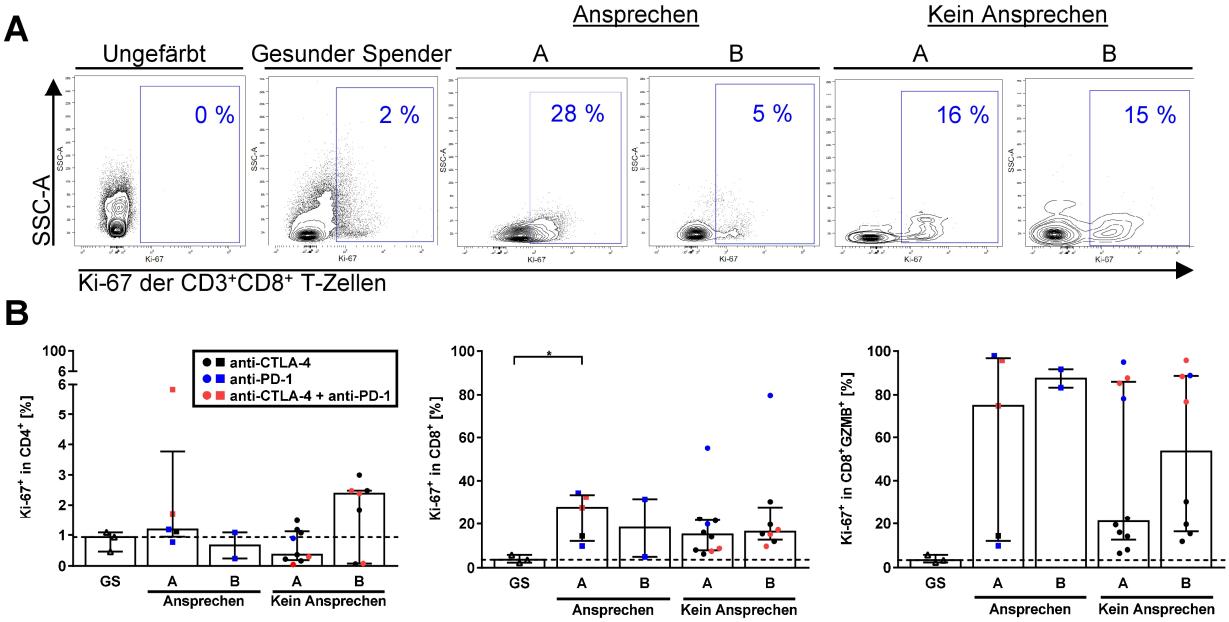


Abbildung 10 Immunomonitoring der Proliferation der $CD4^+$, $CD8^+$ und $CD8^+$Granzym B^+ T Zellen im peripheren Blut.

Die Proliferation wurde anhand der Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 gemessen. Das Protein Ki-67 ist während der aktiven Zellteilung (Interphase, Mitose), nicht jedoch während der ruhenden Phase des Zellzyklus (G_0) nachweisbar. **A** Exemplarische durchflusszytometrische Konturdiagramme. Die Konturdiagramme zeigen die Ki-67 Expression der $CD3^+CD8^+$ T-Zellpopulation. Die T-Zellen wurden entsprechend Abb. 9A identifiziert. Der Proliferationsmarker Ki-67 wurde intranukleär gefärbt. **B** Proliferation der $CD4^+$, $CD8^+$ und $CD8^+$Granzym B^+ T Zellen. Der Prozentsatz der $Ki\text{-}67^+$ Zellen der $CD4^+$, $CD8^+$ und $CD8^+$Granzym B^+ T Zellen im peripheren Blut wurde in gesunden Spendern (GS) sowie in Ansprechern und Nicht-Ansprechern der Checkpoint-Inhibitor Therapie vor (Zeitpunkt A) und nach Therapiebeginn (Zeitpunkt B) ermittelt. Die gestrichelte Linie markiert den Median der gesunden Spender (n(GS) = 3, n(A.) = 7 – 10, n(K. A.) = 7 – 10; $CD8^+$ T-Zellen, p(GS vs. A.(A)) = 0,0499 *; p(GS vs. A.(B)) = 0,0902; $CD8^+GZMB^+$, p(GS vs. K. A.(B)) = 0,0808), p(GS vs. A.(B) = 0,0941). Median ± Interquartilsabstand. Kruskal-Wallis Test, $p < 0,05$ *. A, Zeitpunkt vor Therapiebeginn; A., Ansprechen; B, Zeitpunkt 1 – 3 Wochen nach Therapiebeginn; CTLA-4, zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Protein 4; GS, gesunder Spender; GZMB, Granzym B; Ki-67, Proliferationsmarker-Protein Ki-67; K. A., Kein Ansprechen; PD-1, programmiertes Zelltodprotein 1.

Der Prozentsatz der proliferierenden Ki-67$^+$ CD4$^+$, CD8$^+$ und CD8$^+$GZMB$^+$ T-Zellen in Therapieansprechern und Nicht-Ansprechern war vor Therapiebeginn höher als in gesunden Spendern; der Prozentsatz der Ki-67$^+$ CD4$^+$ T-Zellen in Nicht-Ansprechern war niedriger (Abb. 10).

In Therapieansprechern (1,2 %) proliferierten vor Therapiebeginn dreimal so viele CD4$^+$ T-Zellen wie in Nicht-Ansprechern (0,4 %). Nach der ersten Checkpoint-Inhibitor Gabe (Zeitpunkt B) sank der Prozentsatz der proliferierenden Ki-67$^+$ CD4$^+$ T-Zellen in Therapieansprechern von 1,2 % auf 0,7 % ab. In Nicht-Ansprechern stieg dieser um das 6-fache von 0,4 % auf 2,4 % an.

Die CD8$^+$ T-Zellen (28 %) proliferierten in Therapieansprechern vor Therapiebeginn stärker als in Nicht-Ansprechern (15 %) und gesunden Spendern ($p = 0,0499$ *). Nach der ersten Checkpoint-Inhibitor Gabe nahm der Prozentsatz der proliferierenden Ki-67$^+$ CD8$^+$ T-Zellen in Therapieansprechern ab (18 %); in Nicht-Ansprechern blieb dieser gleich (16 %).

Die Proliferation der CD8$^+$GZMB$^+$ T-Zellen war in Therapieansprechern wie Nicht-Ansprechern deutlich höher als in gesunden Spendern (3,4 %). Therapieansprecher (75 %) zeigten vor Therapiebeginn eine 3-fach höhere Proliferation als Nicht-Ansprecher (21 %). Nach der ersten Checkpoint-Inhibitor Gabe stieg die Proliferation in Therapieansprechern (87 %) und Nicht-Ansprechern (54 %) an. In Nicht-Ansprechern verdoppelte sich der Anteil der proliferierenden CD8$^+$GZMB$^+$ T-Zellen.

Die Studie zeigte, dass Therapieansprecher vor Therapiebeginn eine höhere Proliferation der CD4$^+$ T-Zellen und, insbesondere der CD8$^+$ und CD8$^+$GZMB$^+$ T-Zellen, aufwiesen als Nicht-Ansprecher und gesunde Spender. Nach der ersten Checkpoint-Inhibitor Gabe sank in Therapieansprechern die Proliferation der CD4$^+$ und CD8$^+$ T-Zellen; die Proliferation der CD8$^+$GZMB$^+$ T-Zellen stieg.

3.1.2.4. Erhöhte IFN-γ$^+$ CD4$^+$, CD8$^+$ und CD8$^+$GZMB$^+$ T-Zell-Prozentsätze in Therapieansprechern

Antigen-präsentierende Zellen (APC, engl. antigen-presenting cells) stimulieren Th1-Zellen zur Proliferation und Expression der proinflammatorischen Effektorzytokine IL-2 und Interferon-γ (IFN-γ) (108). IFN-γ stimuliert APC zur Expression des Histokompatibilitätskomplexes (MHC), der prozessierte tumorspezifische Antigene den T-Zellen präsentiert. IL-2 und IFN-γ unterstützen autokrin die Proliferation der Th1-Zellen. Dieser positive Rückkopplungseffekt verstärkt die Immunreaktion. Hier wurde die T-Zellaktivierung anhand des Prozentsatzes der IFN-γ$^+$ Zellen an den CD4$^+$, CD8$^+$ und CD8$^+$GZMB$^+$ T-Zellen intrazellulär durchflusszytometrisch gemessen. Die Zellen wurden vor der Messung nicht stimuliert.

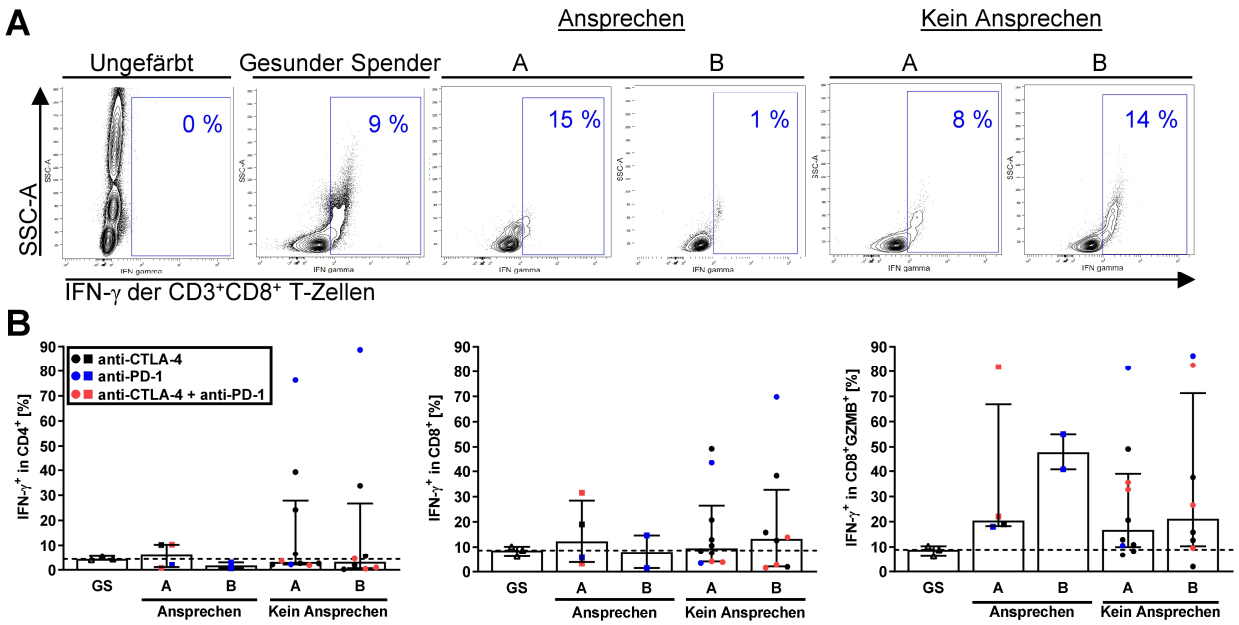


Abbildung 11 Immunomonitoring der Interferon-γ (IFN- γ) produzierenden CD4⁺, CD8⁺ und CD8⁺Granzym B⁺ T Zellen im peripheren Blut.

A Exemplarische durchflusszytometrische Konturdiagramme. Die Konturdiagramme zeigen die IFN-γ Produktion der CD3⁺CD8⁺ T-Zellen. Die T-Zellpopulationen wurden entsprechend Abb. 9A eingegrenzt. IFN-γ wurde intrazellulär gefärbt. **B** IFN-γ Produktion in CD4⁺, CD8⁺ und CD8⁺Granzym B⁺ T Zellen. Der Prozentsatz der proliferierenden Ki-67⁺ Zellen der CD4⁺, CD8⁺ und CD8⁺Granzym B⁺ T Zellen im peripheren Blut wurde in gesunden Spendern (GS) sowie in Ansprechern und Nicht-Ansprechern der Checkpoint-Inhibitor Therapie vor (Zeitpunkt A) und nach Therapiebeginn (Zeitpunkt B) ermittelt. Die gestrichelte Linie markiert den Median der gesunden Spender (n(GS) = 3, n(A.) = 2 – 4, n(K. A.) = 8 – 10; CD8⁺GZMB⁺ T-Zellen, p(GS vs. A.(B)) = 0,1675). Median ± Interquartilsabstand. Kruskal-Wallis Test, p < 0,05 *. A, Zeitpunkt vor Therapiebeginn; A., Ansprechen; B, Zeitpunkt 1 – 3 Wochen nach Therapiebeginn; CTLA-4, zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Protein 4; GS, gesunder Spender; GZMB, Granzym B; IFN-γ, Interferon-γ; PD-1, programmiertes Zelltodprotein 1.

Therapieansprecher vor Therapiebeginn wiesen einen höheren Prozentsatz an IFN-γ⁺ CD4⁺ (6,1 %), CD8⁺ und CD8⁺GZMB⁺ T-Zellen auf als gesunde Spender (IFN-γ⁺CD4⁺ T-Zellen: 4,3 %) (Abb. 11). Nicht-Ansprecher wiesen vor Therapiebeginn (3,1 %) nur halb so viele IFN-γ produzierende CD4⁺ T-Zellen auf wie Therapieansprecher (6,1 %). Nach der ersten Checkpoint-Inhibitor Gabe nahm der Prozentsatz IFN-γ⁺CD4⁺ T-Zellen in Therapieansprechern (1,8 %) um ein Drittel ab; in Nicht-Ansprechern (3,2 %) blieb dieser gleich.

Im Vergleich zum Prozentsatz der IFN-γ⁺CD4⁺ T-Zellen (4,8 %) produzierten doppelt so viele CD8⁺ (8,7 %) und CD8⁺GZMB⁺ T-Zellen (8,9 %) in gesunden Spendern IFN-γ. Therapieansprecher (12,3 %) besaßen vor Therapiebeginn einen höheren Prozentsatz IFN-γ-produzierender CD8⁺ T-Zellen als Nicht-Ansprecher (9,5 %). Nach der ersten Checkpoint-Inhibitor Gabe sank der Prozentsatz IFN-γ⁺CD8⁺ T-Zellen in Therapieansprechern um ein Drittel auf 8,1 %; in Nicht-Ansprecher stieg dieser auf 13,3 %.

Zytotoxische CD8⁺ T-Zellen produzieren die Effektorzytokine Granzym B und IFN-γ. Insgesamt

war der Prozentsatz der IFN-γ produzierenden Zellen an den $CD8^+GZMB^+$ T-Zellen in Patienten höher als in $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen. In Therapieansprecher (20,5 %) produzierten prozentual mehr $CD8^+GZMB^+$ T-Zellen IFN-γ als in Nicht-Ansprechern (16,8 %) und gesunden Spendern (8,9 %). Anders als in $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen steigerte die erste Checkpoint-Inhibitor Gabe den Prozentsatz der IFN-γ produzierenden Zellen an den $CD8^+GZMB^+$ T-Zellen in Therapieansprechern (47,9 %) und in Nicht-Ansprechern (21,2 %).

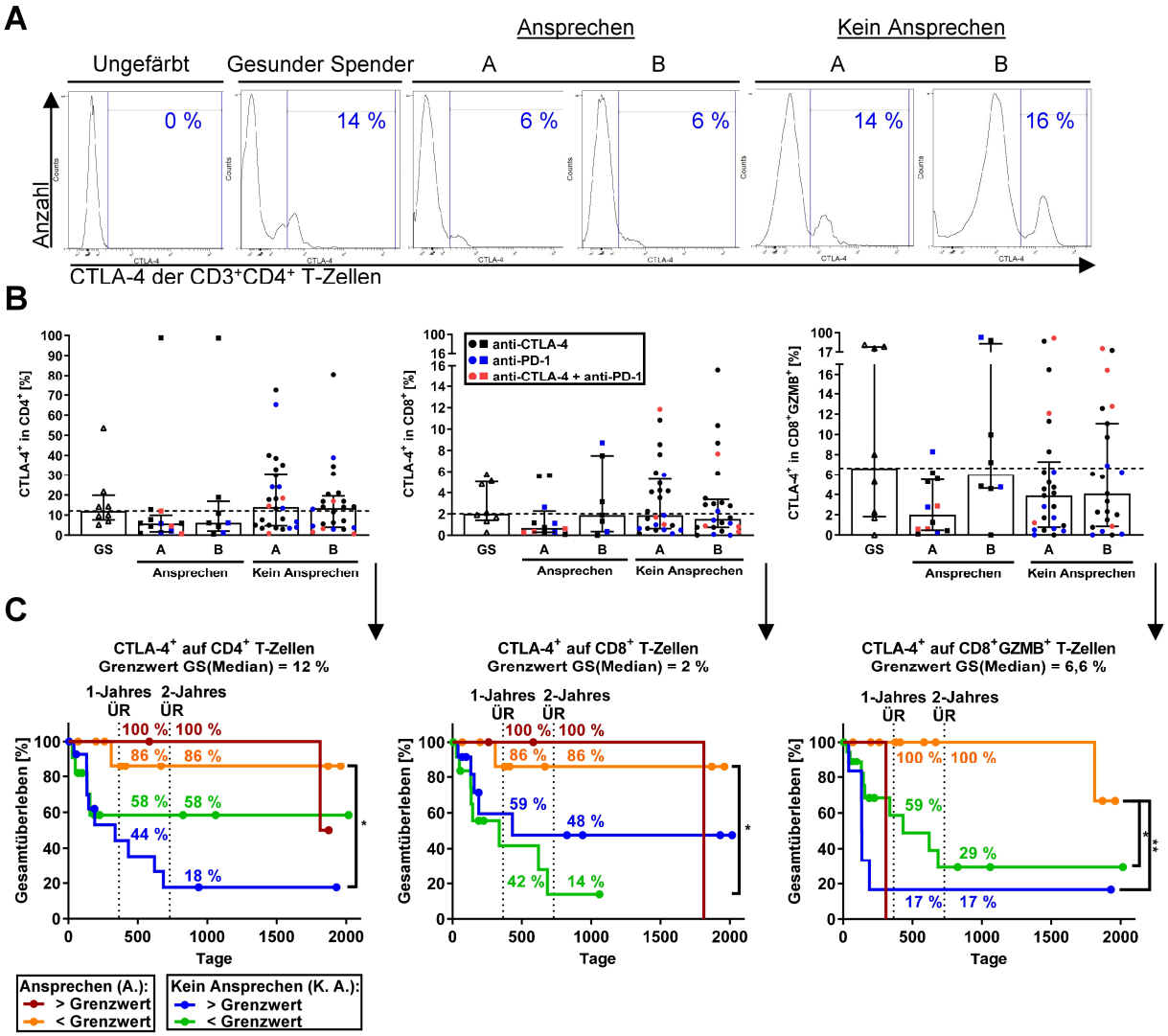
In dieser Studie war der Prozentsatz der IFN-γ produzierenden Zellen an $CD4^+$, $CD8^+$ und, insbesondere an $CD8^+GZMB^+$ T-Zellen, in Therapieansprecher vor Therapiebeginn höher als in Nicht-Ansprechern und gesunden Spendern. Nach der ersten Checkpoint-Inhibitor Gabe nahm der Prozentsatz der IFN-γ^+CD4^+ und IFN-γ^+CD8^+ T-Zellen in Therapieansprechern ab; der Prozentsatz der IFN-$\gamma^+CD8^+GZMB^+$ T-Zellen stieg.

3.1.2.5. Niedrige Prozentsätze der ko-inhibitorischen Checkpoint Moleküle CTLA-4 und PD-1 auf T-Zellen in Therapieansprechern

Laut Bretscher und Cohn benötigt die Aktivierung naiver T-Zellen (i) die Bindung eines APC-MHC(II):Peptid-Komplexes an einen T-Zellrezeptor, (ii) die Bindung eines ko-stimulierenden Rezeptors der T-Zelle an einen ko-stimulierenden Liganden der APC und (iii) die Stimulation durch Zytokine (109). Am besten beschrieben ist der ko-stimulierende Rezeptor/Ligand-Komplex CD28 (T-Zelle):CD80/CD86 (APC). Durch die Bildung eines ko-inhibitorischen Rezeptor/Ligand Komplexes wie z.B. CTLA-4:CD80/CD86 und PD-1 (T-Zelle):PD-L1/L2 (APC) wird die T-Zelle deaktiviert (CTLA-4, zytotoxische T-Lymphozyten-assoziiertes Protein 4; PD-1, programmiertes Zelltodprotein 1). CTLA-4 ist nicht nur ein kompetitiver Antagonist der Liganden CD80/CD86, sondern bindet diese auch mit höherer Affinität als CD28 (110). Nach einer T-Zellaktivierung regulieren T-Zellen die Expression ko-inhibitorischer Checkpoint Moleküle hoch. Dieser negative Rückkopplungeffekt verhindert eine überschießende Immunantwort und spielt eine zentrale Rolle in der Eigentoleranz. Der anti-CTLA-4 Checkpoint-Inhibitor Ipilimumab und die anti-PD-1 Checkpoint-Inhibitoren Nivolumab und Pembrolizumab blockieren die ko-inhibitorischen Checkpoint Moleküle CTLA-4 bzw. PD-1. Die Checkpoint-Inhibitor Therapie unterbindet den negativen Rückkopplungeffekt, so dass aktivierte T-Zellen des Patienten den Tumor länger bekämpfen und durch IFN-γ Produktion weitere T-Zellen aktivieren können.
Durch das chronisch entzündliche Tumormikromilieu exprimieren T-Zellen verstärkt und parallel verschiedene Checkpoint Moleküle. T-Zellen können dadurch Resistenzen gegenüber Checkpoint-Inhibitoren wie z. B. Ipilimumab entwickeln. Da T-Zellen Checkpoint-Inhibitoren infolge einer T-Zellaktivierung hochregulieren, wird dies auch als T-Zellerschöpfung bezeichnet.

„Erschöpfte“ T-Zellen zeichnen sich durch (i) einen geringen Prozentsatz proliferierender Ki-67$^+$ und (ii) Effektorzytokin produzierender IFN-γ^+ T-Zellen sowie (iii) einen hohen Prozentsatz ko-inhibitorischer Checkpoint Molekül exprimierender CTLA-4$^+$ und PD-1$^+$ T-Zellen aus (111). „Erschöpfte“ T-Zellen geben eine schwache adaptive Immunantwort auf den Tumor.

Um das dritte Merkmal der T-Zellerschöpfung, die Expression multipler Checkpoint Moleküle, zu untersuchen, wurde der Prozentsatz der CTLA-4$^+$ und PD-1$^+$ Zellen an den CD4$^+$, CD8$^+$ und CD8$^+$GZMB$^+$ T-Zellen im peripheren Blut durchflusszytometrisch gemessen. CTLA-4 und PD-1 wurden extrazellulär gefärbt (Abb. 12, 13).



> A.	3	3	2	2	0
< A.	10	3	2	2	0
> K. A.	15	4	1	1	0
< K. A.	11	3	2	1	1

> A.	3	2	1	1	0
< A.	9	3	2	2	0
> K. A.	12	4	2	2	1
< K. A.	13	3	1	0	0

> A.	1	0	0	0	0
< A.	11	5	3	3	0
> K. A.	6	1	1	1	0
< K. A.	19	5	2	1	1

Abbildung 12 Immunomonitoring des ko-inhibitorischen Checkpoint Moleküls CTLA-4 (zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Proteins 4) auf $CD4^+$, $CD8^+$ und $CD8^+$Granzym B^+ T-Zellen im peripheren Blut.

A Exemplarische durchflusszytometrische Histogramme. Die Histogramme geben den prozentualen Anteil der CTLA-4^+ Zellen an den $CD4^+$ T-Zellen an. Die T-Zellpopulationen wurden entsprechend Abb. 9A eingegrenzt. CTLA-4 wurde oberflächlich gefärbt. **B** CTLA-4^+ $CD4^+$, $CD8^+$ und $CD8^+$Granzym B^+ T-Zellen. Der Prozentsatz der CTLA-4^+ Zellen der $CD4^+$, $CD8^+$ und $CD8^+$Granzym B^+ T Zellen im peripheren Blut wurde in gesunden Spendern (GS) sowie in Ansprechern und Nicht-Ansprechern der Checkpoint-Inhibitor Therapie vor (Zeitpunkt A) und nach Therapiebeginn (Zeitpunkt B) ermittelt. Die gestrichelte Linie zeigt den Median der gesunden Spender (n(GS) = 8, n(A.) = 7 – 13, n(K. A.) = 23 – 26; $CD4^+$ T-Zellen, p(GS vs. A.(A)) = 0,5189, p(A.(A) vs. K. A.(A)) = 0,1885; $CD8^+$ T-Zellen, p(A.(A) vs. K. A.(A)) = 0,5241; $CD8^+$GZMB$^+$ T-Zellen, p(A.(A) vs. A.(B)) = 0,4426). **C** Überlebenszeitanalyse anhand der CTLA-4^+ T-Zellen. Die Kaplan-Meier Kurve zeigt das prozentuale Gesamtüberleben der Patienten abhängig vom Therapieerfolg und der CTLA-4^+ T-Zellen vor Therapiebeginn. Als Grenzwerte wurden die Mediane der CTLA-4^+ T-Zellen der gesunden Spender verwendet. Die Tabelle gibt die Anzahl der Patienten zu den markierten Zeitpunkten an (Log-rank (Mantel-Cox) Test; $CD4^+$, p(< A. vs. > K. A.) = 0,0132 *; $CD8^+$, p(< A. vs. < K. A.) = 0,015 *; $CD8^+$GZMB$^+$, p(< A. vs. < K. A.) = 0,0154 *, p(< A. vs. > K. A.) = 0,0017 **). Median ± Interquartilsabstand. Kruskal-Wallis Test, $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **. A, Zeitpunkt vor Therapiebeginn; A., Ansprechen; B, Zeitpunkt 1 – 3 Wochen nach Therapiebeginn; CTLA-4, zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Protein 4; GS, gesunder Spender; GZMB, Granzym B; K. A., Kein Ansprechen; PD-1, anti-programmiertes Zelltodprotein 1; ÜR, Überlebensrate.

Therapieansprecher wiesen vor Therapiebeginn geringere Prozentsätze CTLA-4^+ und PD-1^+ $CD4^+$, $CD8^+$ und $CD8^+$GZMB$^+$ T-Zellen als Nicht-Ansprecher auf.

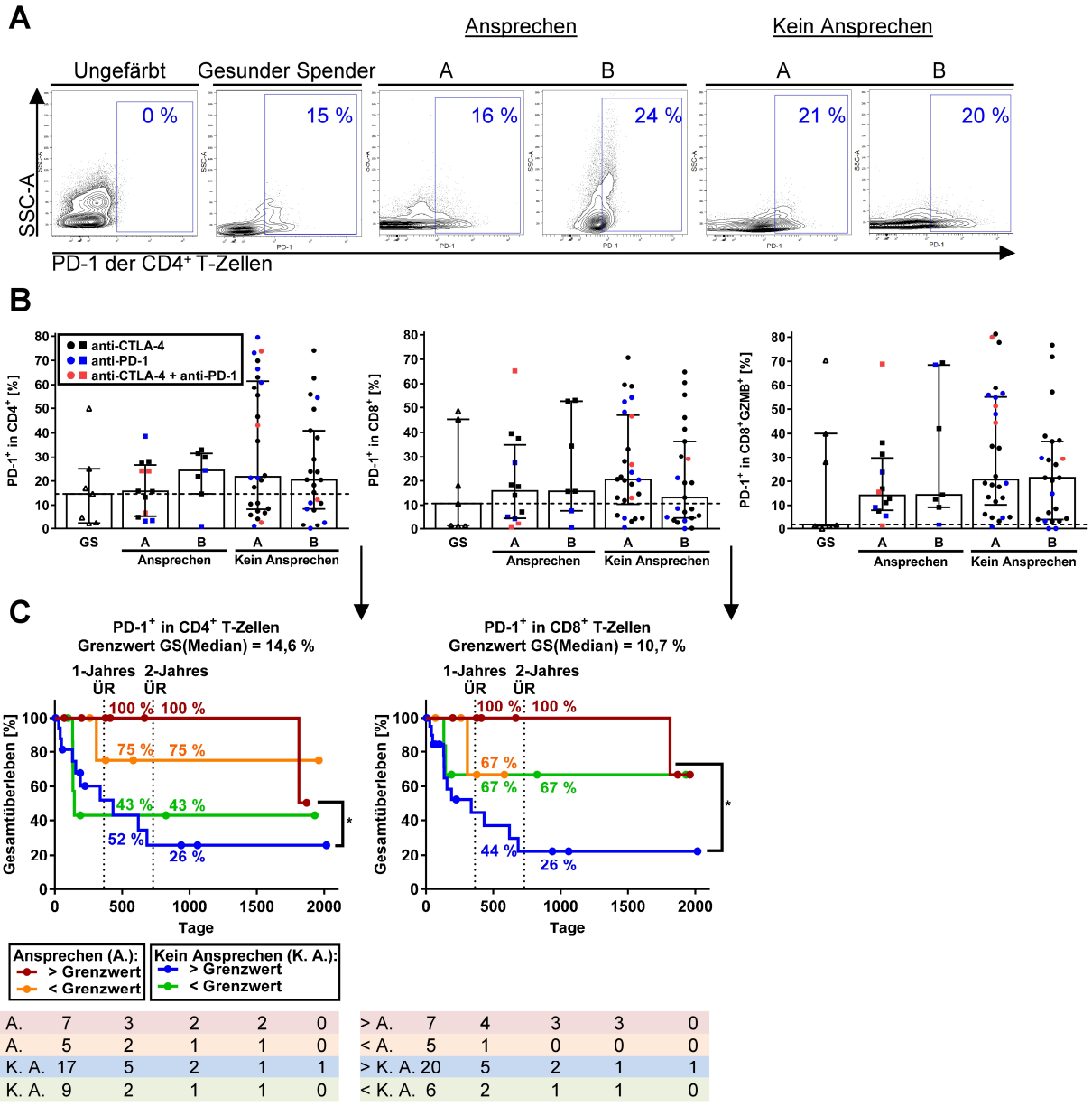
Der Prozentsatz der CTLA-4^+CD4^+ T-Zellen in Therapieansprechern (5,8 %) vor Therapiebeginn war halb so hoch wie in Nicht-Ansprechern (13,9 %) und gesunden Spendern (12 %) (Abb. 12A/B). Nicht-Ansprecher und gesunde Spender wiesen vergleichbare Prozentsätze CTLA-4^+CD4^+ T-Zellen auf. Die erste Checkpoint-Inhibitor Gabe zeigte weder in Therapieansprechern noch in Nicht-Ansprechern einen sichtbaren Effekt auf den Prozentsatz der CTLA-4^+CD4^+ T-Zellen.

Zahlenmäßig wiesen $CD4^+$ T-Zellen eine deutlich höheren Prozentsatz CTLA-4^+ Zellen auf als zytotoxische $CD8^+$ T-Zellen. Im Vergleich zu Therapieansprechern (0,7 %) vor Therapiebeginn war der Prozentsatz CTLA-4^+CD8^+ T-Zellen in gesunden Spendern (2 %) und Nicht-Ansprechern (1,9 %) doppelt so hoch. Nach der ersten Checkpoint-Inhibitor Gabe verdoppelte sich der Prozentsatz der CTLA-4^+CD8^+ T-Zellen in Therapieansprechern (1,9 %); in Nicht-Ansprechern (1,5 %) sank dieser geringfügig.

Therapieansprecher vor Therapiebeginn (2 %) besaßen geringere Prozentsätze CTLA-4^+CD8^+GZMB$^+$ T-Zellen als gesunde Spender (6,6 %) und Nicht-Ansprecher (3,9 %). Nach der ersten Checkpoint-Inhibitor Gabe verdreifachte sich der prozentuale Anteil der CTLA-4^+ Zellen an $CD8^+$GZMB$^+$ T-Zellen in Therapieansprechern (6 %).

Anhand einer Überlebenszeitanalyse (Kaplan-Meier Methode) wurde der Effekt der CTLA-4^+ T-Zellen auf das Gesamtüberleben untersucht (Abb.12C). Patienten mit niedrigeren Prozentsätzen CTLA-4^+ T-Zellen tendierten dazu länger zu leben. Therapieansprecher mit Prozentsätzen ≤ 12 % CTLA-4^+CD4^+ und ≤ 6,6 % CTLA-4^+CD8^+GZMB$^+$ T-Zellen (= Grenzwert, entspricht Median der gesunden Spender) lebten signifikant länger als Nichtansprecher mit höheren Prozentsätzen ($CD4^+$ T-Zellen, $p = 0,0132$ *; $CD8^+$ T-Zellen, $p = 0,015$ *). Insbesondere Nichtansprecher mit

Prozentsätzen der CTLA-4⁺CD4⁺ T-Zellen ≤ 12 % bzw. der CTLA-4⁺CD8⁺GZMB⁺ T-Zellen ≤ 6,6 % wiesen eine 3-fach höhere 2-Jahres- bzw. 1-Jahres-Überlebensrate auf als Nichtansprecher unter den Grenzwert-Prozentsätzen.



> A.	7	3	2	2	0
< A.	5	2	1	1	0
> K. A.	17	5	2	1	1
< K. A.	9	2	1	1	0

> A.	7	4	3	3	0
< A.	5	1	0	0	0
> K. A.	20	5	2	1	1
< K. A.	6	2	1	1	0

Abbildung 13 Immunomonitoring des ko-inhibitorischen Checkpoint Moleküls PD-1 (Programmiertes Zelltodprotein 1) auf CD4⁺, CD8⁺ und CD8⁺Granzym B⁺ T-Zellen im peripheren Blut.

A Exemplarische durchflusszytometrische Konturdiagramme. Die Konturdiagramme geben den Prozentsatz der PD-1⁺ Zellen an den gezeigten CD4⁺ T-Zellen an. Die T-Zellpopulation wurde entsprechend Abb. 9A eingegrenzt. B PD-1⁺ CD4⁺, CD8⁺ und CD8⁺Granzym B⁺ T-Zellen. Der Prozentsatz der PD-1⁺ Zellen der CD4⁺, CD8⁺ und CD8⁺Granzym B⁺ T Zellen im peripheren Blut wurde in gesunden Spendern (GS) sowie in Ansprechern und Nicht-Ansprechern der Checkpoint-Inhibitor Therapie vor (Zeitpunkt A) und nach Therapiebeginn (Zeitpunkt B) ermittelt (n(GS) = 7, n(A.) = 7 – 12, n(K. A.) = 23 – 26; CD4⁺ T-Zellen, p(GS vs. K. A.(A)) = 0,9713; CD8⁺GZMB⁺ T-Zellen, p(GS vs. K. A.(A)) = 0,8906). C Überlebenszeitanalyse anhand der PD-1⁺ T-Zellen. Die Kaplan-Meier Kurve zeigt das prozentuale Gesamtüberleben der Patienten abhängig vom Therapieerfolg und den PD-1⁺ T-Zellen vor Therapiebeginn. Als Grenzwerte (gestrichelte Linie) wurden die Mediane der PD-1⁺ T-Zellen der gesunden Spender verwendet (Log-rank (Mantel-Cox) Test; CD4⁺, p(> A. vs. > K. A.) = 0,0446 *; CD8⁺, p(> A. vs. > K. A.) = 0,0128 *). Die Tabelle gibt die Anzahl der Patienten zu den markierten Zeitpunkten an. Median ± Interquartilsabstand. Kruskal-Wallis Test, $p < 0,05$ *. A, Zeitpunkt vor Therapiebeginn; B, Zeitpunkt 1 – 3 Wochen nach Therapiebeginn; GS, gesunder Spender; GZMB, Granzym B; K. A., Kein Ansprechen; PD-1, anti-programmiertes Zelltodprotein 1; ÜR, Überlebensrate.

Bezüglich des ko-inhibitorischen Checkpoint Moleküls PD-1 wiesen Therapieansprecher vor (15,7 %) Therapiebeginn wie gesunde Spender (14,6 %) geringere Prozentsätze PD-1⁺CD4⁺ T-Zellen auf als Nicht-Ansprecher (21,7 %, Abb. 13A/B). Nach der ersten Checkpoint-Inhibitor Gabe stieg der Prozentsatz der PD-1⁺CD4⁺ T-Zellen in Therapieansprechern (24,3 %) an und war vergleichbar mit dem in Nicht-Ansprechern.

Therapieansprecher besaßen vor Therapiebeginn einen geringen Prozentsatz PD-1⁺CD8⁺ (15,8 %) und PD-1⁺CD8⁺GZMB⁺ T-Zellen (14,1 %) als Nicht-Ansprecher (20,5 % bzw. 20,6 %). Therapieansprecher und Nicht-Ansprecher wiesen höheren Prozentsätze PD-1⁺CD8⁺ (10,7 %) und PD-1⁺CD8⁺GZMB⁺ T-Zellen (1,7 %) als gesunde Spender auf. Nach der ersten Checkpoint-Inhibitor Gabe blieb der Prozentsatz der CD8⁺ und CD8⁺GZMB⁺ T-Zellen in Therapieansprechern gleich. In Nicht-Ansprechern nahm der Prozentsatz der PD-1⁺CD8⁺ T-Zellen von 20,5 % auf 13,1 % ab.

Die Überlebenszeitanalyse zeigte, dass Nicht-Ansprecher mit einem PD-1⁺CD8⁺ T-Zell-Prozentsatz ≤ 10,7 % eine doppelt so hohe 2-Jahres-Überlebensrate aufwiesen wie Nicht-Ansprecher mit ≥ 10,7 %. (Abb. 13C). Therapieansprecher mit einem Prozentsatz PD-1⁺CD4⁺ T-Zellen ≥ 14,6 % und PD-1⁺CD8 PD-1⁺ T-Zellen ≥ 10,7 % wiesen ein signifikant höheres Gesamtüberleben im Vergleich zu Nicht-Ansprechern mit Prozentsätzen oberhalb der Grenzwerte auf.

Die Ergebnisse zeigten, dass Therapieansprecher vor Therapiebeginn einen geringeren Prozentsatz CTLA-4⁺ und PD-1⁺ Zellen an den CD4⁺, CD8⁺ und CD8⁺GZMB⁺ T-Zellen aufwiesen als Nicht-Ansprecher. T-Zellen exprimierten zu einem größeren Prozentsatz PD-1 als CTLA-4. Hohe Prozentsätze CTLA-4⁺ und PD-1⁺ T-Zellen wirkten sich negativ auf das Gesamtüberleben der Nicht-Ansprecher aus.

3.1.2.6. Anstieg des Prozentsatzes aktivierter $CD69^+CD8^+$ und $HLA\text{-}DR^+CD4^+$ T-Zellen nach Therapiebeginn in Therapieansprechern

Stimulierte, proliferierende T-Zellen unterscheiden sich von naiven T-Zellen nicht nur durch die Hochregulation von ko-inhibitorischen Checkpoint Molekülen wie z. B. CTLA-4 und PD-1, sondern auch durch die verstärkte Expression von bestimmten Glykoproteinen wie z. B. CD69, CD25 und HLA-DR. Da diese Glykoproteine in Folge einer Aktivierung der T-Zellen in verschiedenen Zeitabschnitten verstärkt exprimiert werden, werden diese in der Literatur als Aktivierungsmarker der T-Zellen bezeichnet (112).
Innerhalb von 3 bis 12 Stunden nach der Aktivierung der T-Zellen über den TCR-Komplex und den IL-2 Rezeptor (α-Kette) CD25 wird CD69 auf aktivierten T-Zellen bis zu 24 Stunden hochreguliert. Ruhende, nicht aktivierte T-Zellen exprimieren CD25 schwach (113).
24 bis 48 Stunden nach der T-Zellaktivierung via TCR-Komplex wird CD25 auf aktivierten T-Zellen hochreguliert und transient exprimiert. Nach 6-7 Tagen sinkt die CD25 Expression auf den Normalwert ruhender T-Zellen ab. Unter den Lymphozyten weisen unter anderem regulatorische T-Zellen eine konstitutiv hohe CD25 Expression auf (114).
Da T-Zellen den MHC Klasse II Molekül, HLA-DR, erst 3-5 Tage nach Aktivierung hochregulieren, wird HLA-DR als sehr später Aktivierungsmarker bezeichnet (115). Andere Zellpopulationen wie z. B. B-Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen weisen konstitutiv eine starke HLA-DR Expression auf.
Die Aktivierungsmarker der T-Zellen wurden als zusätzlicher Parameter zur Beurteilung der T-Zellerschöpfung und damit der anti-Tumor Immunantwort erhoben. Dazu wurde der prozentuale Anteil der T-Zellen mit dem frühen Aktivierungsmarker CD69, dem späten CD25 und dem sehr späten Aktivierungsmarker HLA-DR an den $CD4^+$, $CD8^+$ und $CD8^+GZMB^+$ T-Zellen durchflusszytometrisch gemessen (Abb. 14). Die Zellen wurden vor der Messung nicht stimuliert.

Therapieansprecher tendierten vor Therapiebeginn zu höheren Prozentsätzen des frühen Aktivierungsmarkers $CD69^+$ auf $CD4^+$ (15 %), $CD8^+$ (4,7 %) und $CD8^+GZMB^+$ T-Zellen (7 %) als Nicht-Ansprecher (CD4/CD8/CD8GZMB: 13,9 %/3,7 %/ 5,2 %) und gesunde Spender. Therapieansprecher und Nicht-Ansprecher zeigten vor und nach Therapiebeginn höhere Prozentsätze $CD69^+$ $CD4^+$, $CD8^+$ und $CD8^+GZMB^+$ T-Zellen als gesunde Spender (Abb. 14A). Gesunde Spender besaßen doppelt so viele $CD69^+CD4^+$ T-Zellen (6 %) verglichen mit $CD69^+CD8^+$ (1,8 %) und $CD69^+CD8^+GZMB^+$ T-Zellen (2,7 %).
Nach der ersten Checkpoint-Inhibitor Gabe blieb der Prozentsatz der $CD69^+CD4^+$ T-Zellen in Therapieansprechern gleich; in Nicht-Ansprechern nahm der Prozentsatz der $CD69^+CD4^+$ T-Zellen von 13,9 % auf 10,6 % ab.

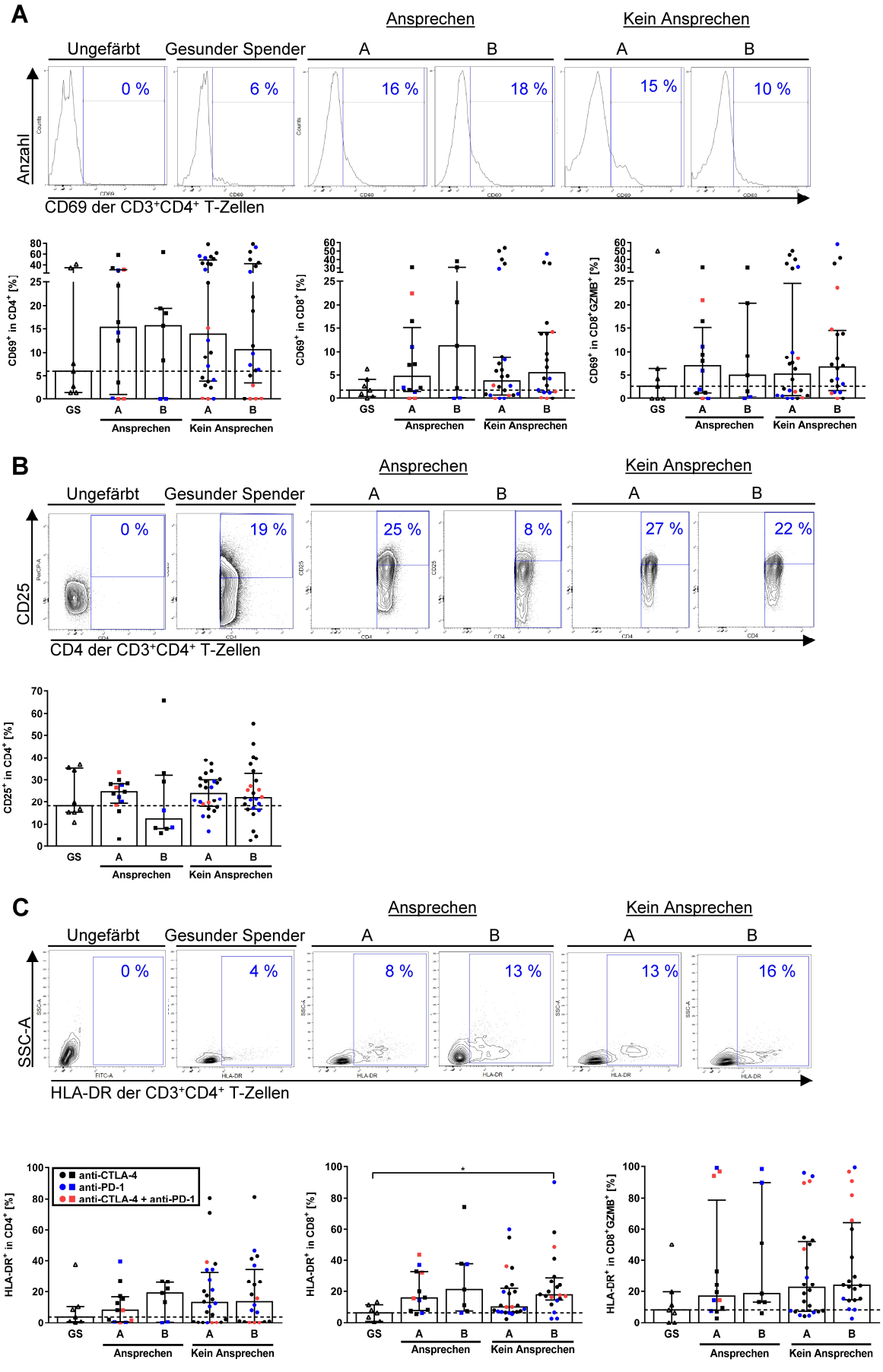

A
Ansprechen
Kein Ansprechen
Ungefärbt
Gesunder Spender
A
B
A
B
0 %
6 %
16 %
18 %
15 %
10 %
Anzahl
CD69 der CD3+CD4+ T-Zellen
CD69+ in CD4+ [%]
CD69+ in CD8+ [%]
CD69+ in CD8+GZMB+ [%]
GS
A
B
A
B
Ansprechen
Kein Ansprechen
B
Ansprechen
Kein Ansprechen
Ungefärbt
Gesunder Spender
A
B
A
B
0 %
19 %
25 %
8 %
27 %
22 %
CD25
CD4 der CD3+CD4+ T-Zellen
CD25+ in CD4+ [%]
GS
A
B
A
B
Ansprechen
Kein Ansprechen
C
Ansprechen
Kein Ansprechen
Ungefärbt
Gesunder Spender
A
B
A
B
0 %
4 %
8 %
13 %
13 %
16 %
SSC-A
HLA-DR der CD3+CD4+ T-Zellen
HLA-DR+ in CD4+ [%]
HLA-DR+ in CD8+ [%]
HLA-DR+ in CD8+GZMB+ [%]
anti-CTLA-4
anti-PD-1
anti-CTLA-4 + anti-PD-1
*
GS
A
B
A
B
Ansprechen
Kein Ansprechen

Abbildung 14 Immunomonitoring der Aktivierungsmarker CD69, CD25 und HLA-DR auf $CD4^+$, $CD8^+$ und $CD8^+$Granzym B^+ T Zellen im peripheren Blut.

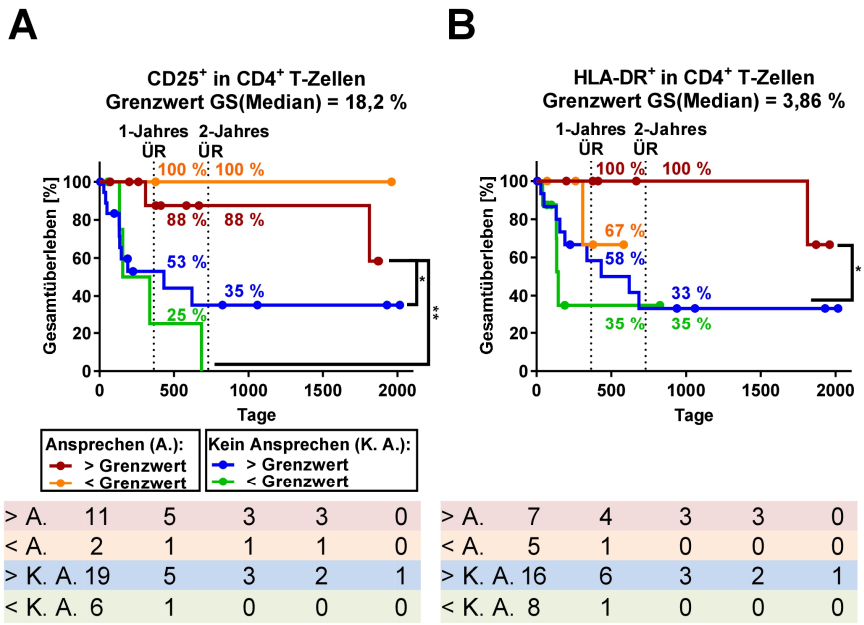
Die Expression der Aktivierungsmarker CD69, CD25 und HLA-DR auf T-Zellen wurde durchflusszytometrisch gemessen. Die exemplarischen Histogramme und Konturdiagramme zeigen die Population der $CD4^+$ T-Zellen, welche entsprechend Abb. 9A eingegrenzt wurden. Die gestrichelten Linien zeigen die Mediane der gesunden Spender. Aufgrund interindividueller Unterschiede wurden die Zellpopulationen für jeden Patienten individuell eingegrenzt. **A** $CD69^+$ T-Zellen. **B** $CD25^+$ T-Zellen. **C** HLA-DR^+ T-Zellen. Der Prozentsatz der $CD69^+$, $CD25^+$ und HLA-DR^+ Zellen der $CD4^+$, $CD8^+$ und $CD8^+$Granzym B^+ T Zellen im peripheren Blut wurde in gesunden Spendern (GS) sowie in Ansprechern und Nicht-Ansprechern der Checkpoint-Inhibitor Therapie vor (Zeitpunkt A) und nach Therapiebeginn (Zeitpunkt B) ermittelt (n(GS) = 7 – 8, n(A.) = 7 – 13, n(K. A.) = 20 – 24; $CD8^+$ T Zellen, p(GS vs. K. A.(A)) = 0,5502, p(GS vs. K. A.(B)) = 0,0201 *, p(GS vs. A.(A)) = 0,182, p(GS vs. A.(B)) = 0,1005; $CD8^+GZMB^+$ T Zellen, p(GS vs. K. A.(B)) = 0,1792). Median ± Interquartilsabstand. Kruskal-Wallis Test, $p < 0,05$ *. A, Zeitpunkt vor Therapiebeginn; A., Ansprechen; B, Zeitpunkt 1 – 3 Wochen nach Therapiebeginn; CTLA-4, anti-zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Protein 4; GS, gesunder Spender; GZMB, Granzym B; HLA-DR, humanes Leukozyten Antigen-DR Isotyp; K. A., Kein Ansprechen; PD-1, anti-programmiertes Zelltodprotein 1.

Der Prozentsatz der $CD69^+CD8^+$ T-Zellen verdoppelte sich in Therapieansprechern von 4,7 % auf 11,3 %; in Nicht-Ansprechern stieg der Prozentsatz nur leicht von 3,7 % auf 5,5 % an. Im Gegensatz zu $CD8^+$ T-Zellen nahm der Prozentsatz der $CD69^+CD8^+GZMB^+$ T-Zellen in Therapieansprechern nach der ersten Checkpoint-Inhibitor Gabe von 7 % auf 4,9 % ab; in Nicht-Ansprechern stieg dieser von 5,2 % auf 6,7 % an.

Der späte Aktivierungsmarker CD25 wurde im Rahmen der Treg-Analyse auf $CD4^+$ T-Zellen untersucht. Im Vergleich zu CD69 (6 %) wurde CD25 auf $CD4^+$ T-Zellen in gesunden Spendern (18,2 %) 3-fach stärker exprimiert (Abb. 14B). In Therapieansprechern (24,7 %) und Nicht-Ansprechern (23,9 %) war der Prozentsatz $CD25^+CD4^+$ T-Zellen vor Therapiebeginn vergleichbar und höher als in gesunden Spendern (18,2 %). Nach der ersten Checkpoint-Inhibitor Gabe halbierte sich der Prozentsatz aktivierter $CD25^+CD4^+$ T-Zellen in Therapieansprechern (12,4 %); in Nicht-Ansprechern (22,1 %) blieb dieser unverändert.

Therapieansprechern und Nicht-Ansprechern besaßen vor und nach Therapiebeginn höhere Prozentsätze des sehr späten Aktivierungsmarkers HLA-DR auf $CD4^+$, $CD8^+$ und $CD8^+GZMB^+$ T-Zellen als gesunde Spender (Abb. 14C).
Im Gegensatz zu CD69 und CD25 war der Prozentsatz aktivierter HLA-DR^+CD4^+ T-Zellen in Therapieansprechern (8,2 %) vor Therapiebeginn geringer als in Nicht-Ansprechern (13,1 %). Verglichen mit $CD4^+$ T-Zellen (3,9 %) zeigten gesunde Spender eine doppelt so starke HLA-DR Expression auf $CD8^+$ (6,3 %) und $CD8^+GZMB^+$ T-Zellen (8,2 %). Nach der ersten Checkpoint-Inhibitor Gabe verdoppelte sich der Prozentsatz der HLA-DR^+CD4^+ T-Zellen in Therapieansprechern (19,1 %); in Nicht-Ansprechern (13,6 %) blieb dieser unverändert. Therapieansprecher (15,7 %) wiesen vor Therapiebeginn einen höheren prozentualen Anteil HLA-DR^+CD8^+ T-Zellen auf als Nicht-Ansprecher (10,1 %) und gesunde Spender (6,3 %). Nach Therapiebeginn stieg der Prozentsatz der HLA-DR^+CD8^+ T-Zellen in Therapieansprechern

(21,1 %) und Nicht-Ansprechern (17,7 %), wodurch Nicht-Ansprecher nach Therapiebeginn signifikant mehr HLA-DR$^+$CD8$^+$ T-Zellen aufwiesen als gesunde Spender (p = 0,0201 *).
Verglichen mit gesunden Spendern (8,2 %) wiesen Therapieansprecher und Nicht-Ansprecher vor und nach Therapiebeginn doppelt so hohe Prozentsätze HLA-DR$^+$CD8$^+$GZMB$^+$ T-Zellen auf. Der Prozentsatz der HLA-DR$^+$CD8$^+$GZMB$^+$ T-Zellen war in Nicht-Ansprechern vor (22,5 %) und nach Therapiebeginn höher als in Therapieansprechern (16,9 %).



> A.	11	5	3	3	0
< A.	2	1	1	1	0
> K. A.	19	5	3	2	1
< K. A.	6	1	0	0	0

> A.	7	4	3	3	0
< A.	5	1	0	0	0
> K. A.	16	6	3	2	1
< K. A.	8	1	0	0	0

Abbildung 15 Überlebenszeitanalyse anhand der Aktivierungsmarker CD25 und HLA-DR auf CD4+ T-Zellen im peripheren Blut.

Die Kaplan-Meier Kurven zeigen das prozentuale Gesamtüberleben der Patienten abhängig vom Therapieerfolg und den CD25$^+$ bzw. HLA-DR$^+$ CD4$^+$ T-Zellen vor Therapiebeginn. Als Grenzwerte (gestrichelte Linie, Abb. 14) wurden die Mediane der gesunden Spender verwendet. Die Tabelle gibt die Anzahl der Patienten zu den markierten Zeitpunkten an. A Überlebenszeitanalyse anhand der CD25$^+$CD4$^+$ T-Zellen (p(> A. vs. > K. A.) = 0,0376 *, p(> A. vs. < K. A.) = 0,0031 **). B Überlebenszeitanalyse anhand der HLA-DR$^+$CD4$^+$ T-Zellen (p(> A. vs. < K. A.) = 0,0135 *). Log-rank (Mantel-Cox) Test, p < 0,05 *. A., Ansprechen; GS, gesunder Spender; HLA-DR, humanes Leukozyten Antigen-DR Isotyp; K. A., Kein Ansprechen; ÜR, Überlebensrate.

Die Überlebenszeitanalyse (Kaplan-Meier Methode) anhand der Prozentsätze der Aktivierungsmarker-exprimierenden CD25$^+$ und HLA-DR$^+$ CD4$^+$ T-Zellen zeigte, dass Therapieansprecher mit Prozentsätzen ≥ 18,2 % CD25$^+$CD4$^+$ T-Zellen bzw. ≥ 3,86 % HLA-DR$^+$CD4$^+$ T-Zellen (= Grenzwert, entspricht Median der gesunden Spender) ein signifikant höheres Gesamtüberleben aufwiesen als Nicht-Ansprecher mit Prozentsätzen unterhalb der Grenzwerte (Abb. 15, CD25 p = 0,0031 **, HLA-DR p = 0,0135 *). Nicht-Ansprecher mit Prozentsätzen ≥ 18,2 % CD25$^+$CD4$^+$ T-Zellen (53 %) wiesen eine doppelt so hohe 1-Jahres-Überlebensrate wie Nicht-Ansprecher unterhalb des Grenzwertes auf (25 %).

In dieser Studie war der prozentuale Anteil aktivierter $CD69^+$, $CD25^+$ und $HLA\text{-}DR^+$ Zellen der $CD4^+$, $CD8^+$ und $CD8^+GZMB^+$ T-Zellen in Therapieansprechern und Nicht-Ansprechern tendenziell höher als in gesunden Spendern. Im Gegensatz zu Nicht-Ansprechern wiesen Therapieansprecher nach der ersten Checkpoint-Inhibitor Gabe eine Verdopplung des Prozentsatzes der $CD69^+CD8^+$ und $HLA\text{-}DR^+CD4^+$ T-Zellen auf; der Prozentsatz der $CD25^+CD4^+$ T-Zellen halbierte sich.

3.1.2.7. Abnahme der regulatorischen T-Zellen (Treg) nach Therapiebeginn in Therapieansprechern

Regulatorische T-Zellen (Treg) supprimieren die Proliferation und die anti-Tumor-Effektormechanismen der $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen (116). Hohe Treg Prozentsätze werden mit Metastasierung, verstärktem Tumorwachstum und damit einem Fortschreiten der Tumorerkrankung verbunden (117). Das antiinflammatorische TME induziert Treg und unterdrückt dadurch die adaptive Immunantwort (118). Im Gegensatz zu murinen Treg ist der Transkriptionsfaktor Foxp3 (Forkhead Protein 3) nicht spezifisch für humane Treg (119). In der vorliegenden Studie wurden Treg anhand der Kombination der Oberflächenmoleküle $CD4^+CD25^+CD127^{low}Foxp3^+$ durchflusszytometrisch identifiziert (Abb. 16A) (120). Anti-CTLA-4 Checkpoint-Inhibitoren wie z. B. Ipilimumab könnten durch Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxität (ADCC) oder zelluläre Phagozytose (ADCP) Treg depletieren (52,53).
Um den Prozentsatz der Treg als zellulären Biomarker und den Effekt der Checkpoint-Inhibitor Therapie zu untersuchen, wurde der prozentuale Anteil der $CD4^+CD25^+CD127^{low}Foxp3^+$ Treg an $CD4^+$ T-Zellen im peripheren Blut der Studienteilnehmer vor und nach Therapiebeginn durchflusszytometrisch bestimmt.

Therapieansprecher (3,4 %) und Nicht-Ansprecher (2,4 %) vor Therapiebeginn wiesen niedrigere Treg Prozentsätze auf als gesunde Spender (3,9 %) (Abb. 16B/C). Nach der ersten Checkpoint-Inhibitor Gabe sank der Prozentsatz der Treg in Therapieansprechern (2,5 %), während dieser in Nicht-Ansprechern stieg (3,9 %).

Die Überlebenszeitanalyse anhand des Prozentsatzes der $CD4^+CD25^+CD127^{low}Foxp3^+$ Treg zeigte, dass die Kaplan-Meier Kurven der Therapieansprecher und Nichtansprecher mit einem Treg Prozentsatz ≤ 3,9 % (= Grenzwert, entspricht Median der gesunden Spender) einen signifikant unterschiedlichen Verlauf aufwiesen ($p = 0{,}0151$ *). Nicht-Ansprecher (69 %) mit einem Treg Prozentsatz ≥ 3,9 % besaßen zwar eine vierfach höhere 2-Jahres-Überlebensrate als Nicht-Ansprecher (17 %) mit einem Treg Prozentsatz ≤ 3,9 % (Abb. 16D), jedoch lebten

Nicht-Ansprecher mit einem Treg Prozentsatz ≤ 3,9 % in dieser Studie länger. Dies kann auf fehlende Nachversorgungsdaten dieser Patienten zurückzuführen sein.

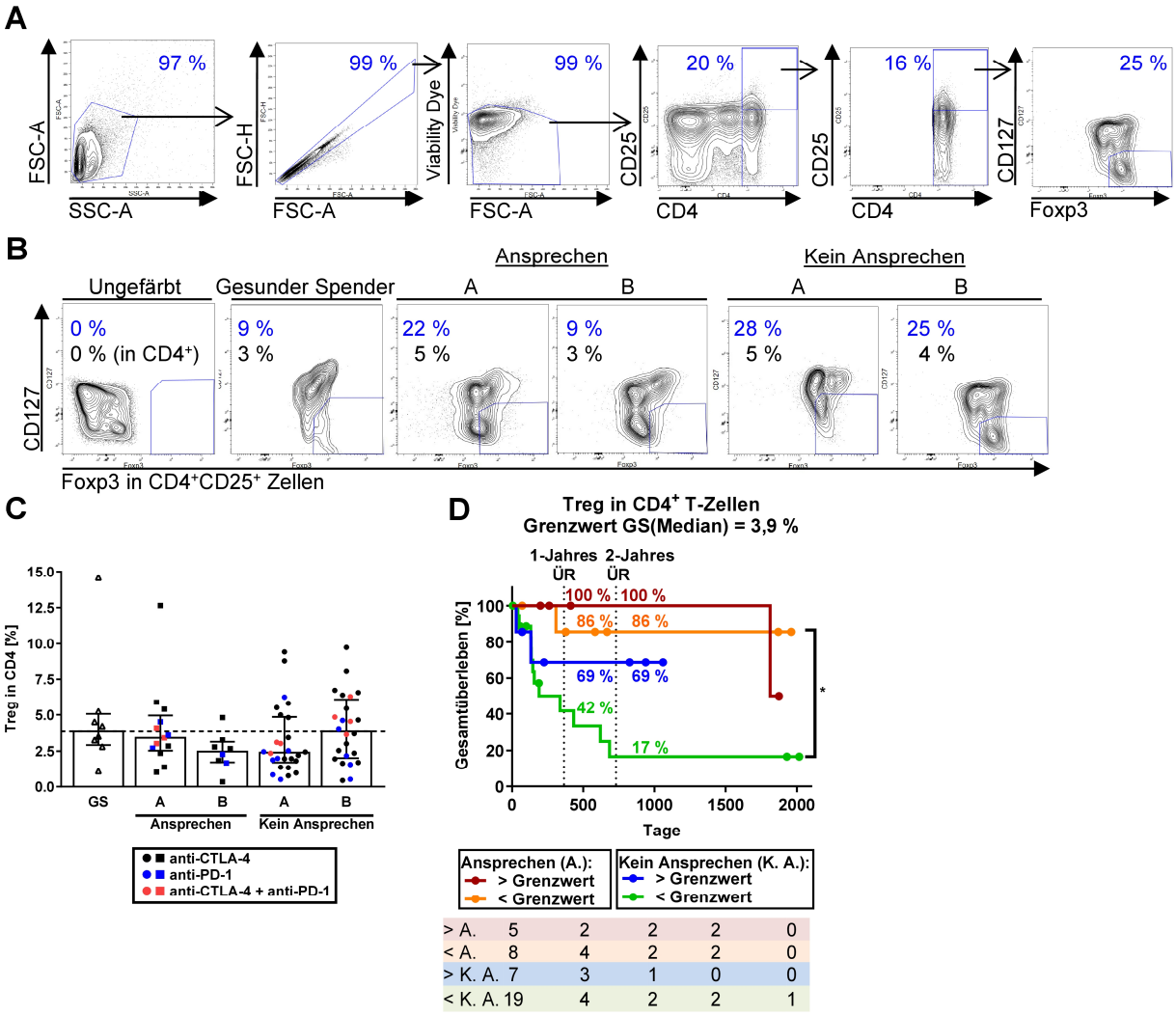


Abbildung 16 Immunomonitoring der regulatorischen T Zellen (Treg) im peripheren Blut.

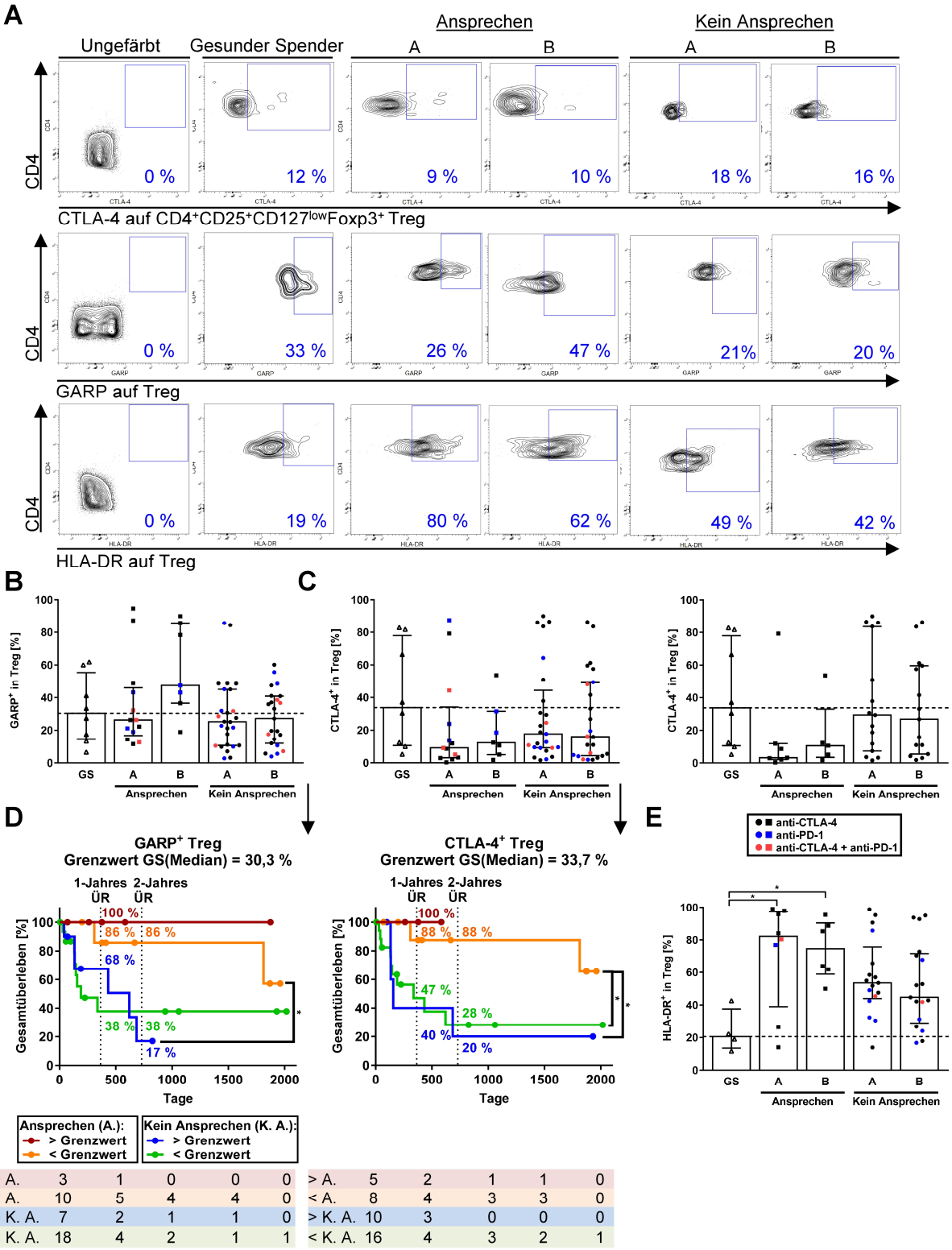
A Durchflusszytometrische Eingrenzung der $CD4^+CD25^+CD127^{low}Foxp3^+$ Treg. Dubletten und tote Zellen wurden von der Analyse ausgeschlossen. Foxp3 wurde intranukleär gefärbt. Das Beispiel zeigt einen Patienten nach Therapiebeginn ohne Therapieerfolg. **B** Exemplarische durchflusszytometrische Konturdiagramme. Die Kontourdiagramme zeigen die Population der $CD4^+CD25^+$ Zellen. Die Prozentzahl in blau gibt den prozentualen Anteil der $CD127^{low}Foxp3^+$ Zellen an der gezeigten Population der $CD4^+CD25^+$ T-Zellen an. Die Prozentzahl in schwarz gibt den prozentualen Anteil der $CD4^+CD25^+CD127^{low}Foxp3^+$ Treg an den $CD4^+$ T-Zellen an. Als Kontrolle dienten gesunde Spender. Aufgrund interindividueller Unterschiede wurden die Zellpopulationen für jeden Patienten individuell eingegrenzt. **C** Treg. Der Prozentsatz der Treg an den $CD4^+$ T Zellen im peripheren Blut wurde in gesunden Spendern (GS) sowie in Ansprechern und Nicht-Ansprechern der Checkpoint-Inhibitor Therapie vor (Zeitpunkt A) und nach Therapiebeginn (Zeitpunkt B) ermittelt (n(GS) = 8, n(A.) = 8 – 13, n(K. A.) = 24 – 26). **D** Überlebenszeitanalyse anhand der Treg. Die Kaplan Meier-Kurve zeigt das prozentuale Gesamtüberleben der Patienten abhängig vom Therapieerfolg und der Treg vor Therapiebeginn. Als Grenzwert (gestrichelte Linie) wurde der Median der Treg der gesunden Spender verwendet. Die Tabelle gibt die Anzahl der Patienten zu den markierten Zeitpunkten an (Log-rank (Mantel-Cox) Test, p(< A. vs. < K. A.) = 0,0151 *). Median ± Interquartilsabstand. Kruskal-Wallis Test, p < 0,05 *. A, Zeitpunkt vor Therapiebeginn; A., Ansprechen; B, Zeitpunkt 1 – 3 Wochen nach Therapiebeginn; CTLA-4, zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Protein 4; Foxp3, Forkhead protein 3; FSC, Vorwärtsstreulicht; GS, gesunder Spender; K. A., Kein Ansprechen; PD-1, programmiertes Zelltodprotein 1; SSC, Seitwärtsstreulicht; Treg, regulatorische T Zellen; ÜR, Überlebensrate.

In dieser Studie nahm der Prozentsatz der $CD4^+CD25^+CD127^{low}Foxp3^+$ Treg an $CD4^+$ T-Zellen in Therapieansprechern nach der ersten Checkpoint-Inhibitor Gabe ab, während dieser in Nicht-Ansprechern zunahm. Niedrige Treg Prozentsätze zeigten unabhängig vom Therapieerfolg einen positiven Effekt auf das Gesamtüberleben der Patienten.

3.1.2.8. Geringe Prozentsätze CTLA-4$^+$ Treg indizieren ein Therapieansprechen unter Ipilimumab

Wie stark regulatorische T-Zellen (Treg) die adaptive Immunantwort (z. B. T-Zellen) supprimieren, ist unter anderem den funktionellen Eigenschaften und dem Treg Prozentsatz an den PBMC abhängig. Humane, aktivierte Treg exprimieren den spezifischen Aktivierungsmarkers GARP (engl. Glykoprotein-A repetitions predominant) (121,122). GARP bindet die latente Form des antiinflammatorische Treg Effektorzytokins TGF-β1, welches durch Metallophosphatasen (MPP) proteolytisch in LAP und aktives TGF-β1 gespalten wird.
$HLA\text{-}DR^+$ Treg induzieren durch einen frühen Zellkontakt-abhängigen Mechanismus die Produktion des Treg Transkriptionsfaktors Foxp3 (14).
Anhand des Prozentsatzes CTLA-4^+ Treg wurde die suppressive Kapazität der Treg indirekt ermittelt (123). Für Treg werden zwei CTLA-4-vermittelte immunsuppressive Mechanismen diskutiert: (i) CTLA-4^+ Treg konkurrieren mit dem ko-stimulierenden Molekül CD28 auf T-Zellen um die Bindung der APC-Liganden CD80/CD86 und (ii) CTLA-4^+ Treg binden an CD80/CD86 und verleiben sich den Ligand ein (Transendozytose) (124). Beide Mechanismen supprimieren die T-Zellaktivierung durch Unterbindung des benötigten zweiten ko-stimulierenden Signals.
Während CTLA-4 in konventionellen T-Zellen (T_{conv}) zu 90 % intrazellulär in Vesikeln vorliegt (Endozytose) und nur nach Aktivierung transient exprimiert wird, präsentieren Treg das Molekül konstitutiv und in höherer Frequenz auf der Zelloberfläche (125,126). Infolgedessen bindet der anti-CTLA-4 Checkpoint-Inhibitor Ipilimumab kompetitiv an konventionelle T-Zellen (T_{conv}) und Treg.
Um den Aktivierungsstatus sowie die suppressive Kapazität der Treg zu bestimmen, wurde der prozentuale Anteil der $GARP^+$, CTLA-4^+ und $HLA\text{-}DR^+$ Treg an allen Treg durchflusszytometrisch gemessen.

Therapieansprechern (26 %) und Nicht-Ansprechern (25 %) wiesen vor Therapiebeginn geringere Prozentsätze $GARP^+$ Treg auf als gesunde Spender (30 %) (Abb. 17A/B). Nach der ersten Checkpoint-Inhibitor Gabe stieg der Prozentsatz in Therapieansprechern (47 %) sichtbar an; in Nicht-Ansprechern (27 %) war dieser gleichbleibend.



> A.	3	1	0	0	0
< A.	10	5	4	4	0
> K. A.	7	2	1	1	0
< K. A.	18	4	2	1	1

> A.	5	2	1	1	0
< A.	8	4	3	3	0
> K. A.	10	3	0	0	0
< K. A.	16	4	3	2	1

Abbildung 17 Immunomonitoring aktivierter GARP$^+$ und suppressiver CTLA-4$^+$ und HLA-DR$^+$ regulatorischer T Zellen (Treg).

Der Prozentsatz der GARP$^+$, CTLA-4$^+$ und HLA-DR$^+$ Zellen an den Treg im peripheren Blut wurde in gesunden Spendern (GS) sowie in Ansprechern und Nicht-Ansprechern der Checkpoint-Inhibitor Therapie vor (Zeitpunkt A) und nach Therapiebeginn (Zeitpunkt B) ermittelt. **A** Exemplarische Konturdiagramme. Die Diagramme zeigen die Population der CD4$^+$CD25$^+$CD127^{low}Foxp3$^+$ Treg, welche gemäß Abb. 16 eingegrenzt wurden. CTLA-4 wurde oberflächlich gefärbt; Foxp3$^+$ wurde intranukleär gefärbt. Als Kontrollpopulation dienten gesunde Spender. Aufgrund interindividueller Unterschiede wurden die Zellpopulationen für jeden Patienten individuell eingegrenzt. **B** GARP$^+$ Treg. (p(A.(B) vs. K. A.(A)) = 0,1328, p(A.(B) vs. K. A.(B)) = 0,1587) **C** CTLA-4$^+$ Treg. Das linke Balkendiagramm zeigt Patienten unter anti-CTLA-4 und anti-PD-1 Therapie. Das rechte Balkendiagramm zeigt Patienten unter anti-CTLA-4 Monotherapie (anti-CTLA-4 Monotherapie, p(K. A.(A) vs. A.(A)) = 0,2962, p(GS vs. A.(A)) = 0,3033). **D** Überlebenszeitanalyse anhand CTLA-4$^+$ und GARP$^+$ Treg. Die Kaplan Meier-Kurven zeigen das prozentuale Gesamtüberleben der Patienten abhängig vom Therapieerfolg und der CTLA-4$^+$ und GARP$^+$ Treg vor Therapiebeginn. Als Grenzwerte (gestrichelte Linie) wurden die Mediane der gesunden Spender verwendet (Log-rank (Mantel-Cox) Test, GARP$^+$ Treg, p(< A. vs. > K. A.) = 0,0333 *; CTLA-4$^+$ Treg, p(< A. vs. > K. A.) = 0,0298 *, p(< A. vs. < K. A.) = 0,0205 *). **E** HLA-DR$^+$ Treg (p(A.(A) vs. GS) = 0,0378 *, p(A.(B) vs. GS) = 0,0388 *, p(K. A.(A) vs. GS) = 0,2268) (n(GS) = 4 – 8, n(A.) = 5 – 13, n(K. A.) = 15 – 26). Median ± Interquartilsabstand. Kruskal-Wallis Test, p < 0,05 *. A, Zeitpunkt vor Therapiebeginn; A., Ansprechen; B, Zeitpunkt 1 – 3 Wochen nach Therapiebeginn; CTLA-4, zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Protein 4; Foxp3, Forkhead protein 3; GARP, Glykoprotein-A repetitions predominant; GS, gesunder Spender; HLA-DR, humanes Leukozyten Antigen-DR Isotyp; K. A., Kein Ansprechen; PD-1, programmiertes Zelltodprotein 1; Treg, regulatorische T Zellen; ÜR, Überlebensrate.

Der Prozentsatz der CTLA-4$^+$ Treg war in Therapieansprechern und Nicht-Ansprechern vor und nach Therapiebeginn sichtbar geringer als in gesunden Spendern (33,7 %) (Abb. 17C). In Therapieansprechern (9 %) wurden vor Therapiebeginn nur halb so viele CTLA-4$^+$ Treg gemessen wie in Nicht-Ansprechern (17,6 %). Nach Therapiebeginn stieg der Prozentsatz der CTLA-4$^+$ Treg in Therapieansprechern (12 %) an und sank in Nicht-Ansprechern (15,9 %).

Im Unterschied zur gebündelten Analyse der Checkpoint-Inhibitor Therapien zeigte die Einzelanalyse der Patienten unter Ipilimumab Monotherapie, dass Therapieansprecher vor (3,2 %) und nach Therapiebeginn (10,5 %) sichtbar geringere Prozentsätze CTLA-4$^+$ Treg aufwiesen als Nicht-Ansprecher (Zeitpunkt A, 29,3 %; B, 26,7 %) und gesunde Spender (33,7 %). Nicht-Ansprechern der Ipilimumab Monotherapie und gesunde Spender besaßen vor Therapiebeginn vergleichbare Prozentsätze CTLA-4$^+$ Treg. Nach der ersten Ipilimumab Gabe verdreifachte sich der Prozentsatz der CTLA-4$^+$ Treg in Therapieansprechern.

Die Überlebenszeitanalyse anhand der GARP$^+$ und CTLA-4$^+$ Treg ergab, dass Therapieansprecher mit einem Prozentsatz ≤ 30,3 % der GARP$^+$ bzw. ≤ 33,7 % CTLA-4$^+$ Treg (= Grenzwert, entspricht Median der gesunden Spender) ein signifikant höheres Gesamtüberleben zeigten als Nichtansprecher oberhalb des Grenzwertes (Abb. 17D, GARP p = 0,0333 *, CTLA-4 p = 0,0298 *). Die 2-Jahresüberlebensrate der Nicht-Ansprecher (38 %) mit ≤ 30,3 % der GARP$^+$ Treg war doppelt so hoch wie die der Nicht-Ansprecher ≥ 30,3 % (17 %). Der Prozentsatz der CTLA-4$^+$ Treg hatte keinen Effekt auf das Gesamtüberleben.

Therapieansprecher besaßen vor (82 %, p (A. vs. GS = 0,0378 *) und nach Therapiebeginn (74,6 %, p (A. vs. GS) = 0,0388 *) mehr HLA-DR$^+$ Treg als gesunde Spender (GS, 20,6 %) und

Nicht-Ansprecher (53,5 %) (Abb. 17E). Nach der ersten Gabe der Checkpoint-Inhibitor Therapie nahm der Prozentsatz HLA-DR$^+$ Treg in Therapieansprechern und Nicht-Ansprechern ab.

In dieser Studie wiesen Therapieansprecher der Ipilimumab Monotherapie vor und nach Therapiebeginn geringere Prozentsätze CTLA-4$^+$ Treg auf als Nicht-Ansprecher und gesunde Spender. Der Prozentsatz der HLA-DR$^+$ Treg war in Therapieansprechern vor und nach Therapiebeginn höher als in Nicht-Ansprechern. Niedrige Prozentsätze GARP$^+$ und CTLA-4$^+$ Treg hatten einen positiven Effekt auf das Gesamtüberleben der Patienten.

3.1.2.9. Erhöhte CD4$^+$, CD8$^+$ und CD8$^+$GZMB$^+$-T-Zell-Treg-Verhältnisse nach Therapiebeginn indizieren ein Therapieansprechen

In Tumorentitäten (wie z. B. Ovarialzell-, invasives Harnblasen-, Kolorektales Karzinom) wird ein hohes T-Zell-Treg-Verhältnis mit einem Therapieerfolg und einem längeren Gesamtüberleben verbunden (127,128). Ein Verhältnis größer als eins weist darauf hin, dass die Anzahl der T-Zellen größer ist als die der Treg. Um den Effekt des T-Zell-Treg-Verhältnisses im peripheren Blut auf den Therapieerfolg der Checkpoint-Inhibitor Therapie zu untersuchen, wurden die Prozentsätze der T-Zellen und Treg durchflusszytometrisch gemessen. In dieser Studie wurde das T-Zell-Treg-Verhältnis mit der folgenden Formel berechnet:

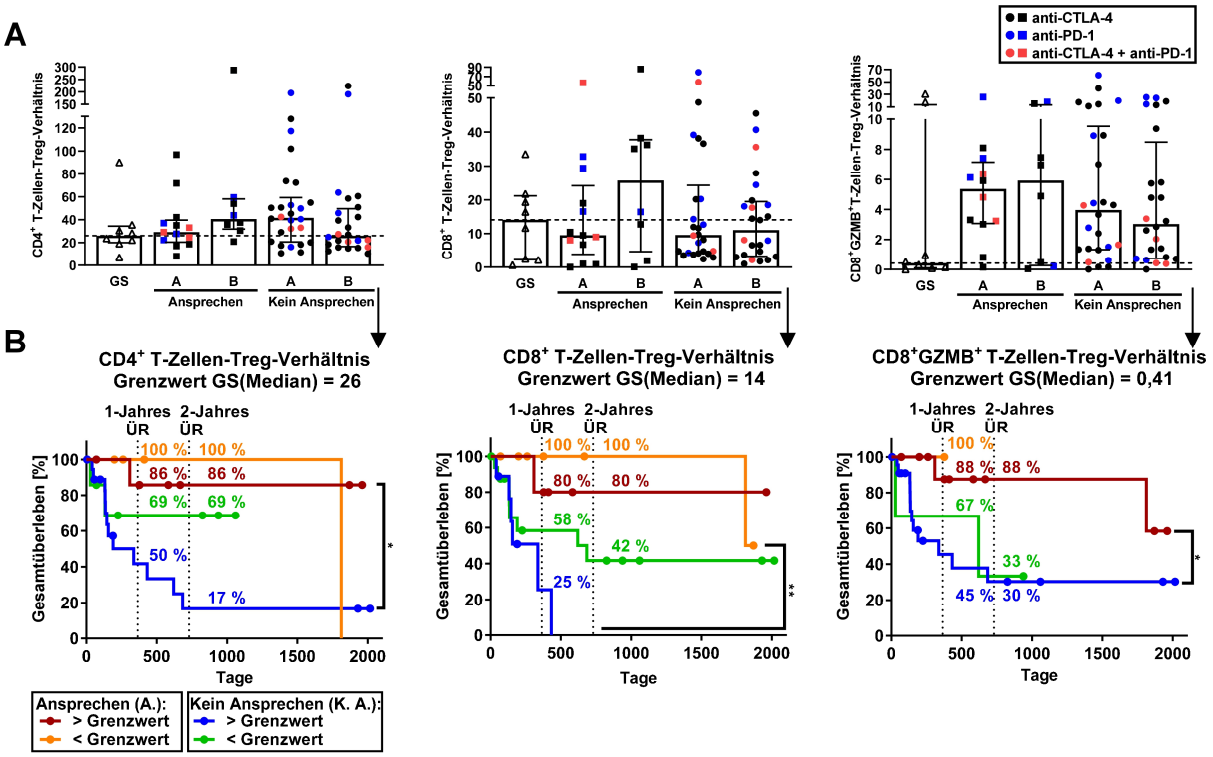
$$T - Zell - Treg - Verhältnis = \frac{T - Zellen\ in\ viablen\ Zellen\ [\%]}{Treg\ in\ viablen\ Zellen\ [\%]}$$

Das CD4$^+$ T-Zell-Treg-Verhältnis der Therapieansprecher (29,1) vor Therapiebeginn war vergleichbar mit dem in gesunden Spendern (26,0); Nicht-Ansprecher (41,7) wiesen vor Therapiebeginn ein höheres CD4$^+$ T-Zell-Treg-Verhältnis auf (Abb. 18A). Nach der ersten Checkpoint-Inhibitor Gabe stieg das CD4$^+$ T-Zell-Treg-Verhältnis in Therapieansprechern (40,6) an, wohingegen es in Nicht-Ansprecher (25,9) nach Therapiebeginn vergleichbar mit dem in gesunden Spender (26,0) war.

Das CD8$^+$ T-Zell-Treg-Verhältnis der Therapieansprecher (9,5) und Nicht-Ansprecher (9,5) war vor Therapiebeginn vergleichbar und geringer als das Verhältnis in gesunden Spendern (14,1). Wie das CD4$^+$ T-Zell-Treg-Verhältnis stieg das CD8$^+$ T-Zell-Treg-Verhältnis in Therapieansprechern (25,7) nach Therapiebeginn an und verdreifachte sich. Dagegen zeigte der Therapiebeginn in Nicht-Ansprechern (11,0) keinen sichtbaren Effekt auf das CD8$^+$ T-Zell-Treg Verhältnis.

Verglichen mit den CD4$^+$ und CD8$^+$ T-Zell-Treg-Verhältnissen zeigte das CD8$^+$GZMB$^+$ T-Zell-Treg-Verhältnis die geringsten Werte. Therapieansprecher (5,4) wiesen vor Therapiebeginn ein höheres CD8$^+$GZMB$^+$ T-Zell-Treg-Verhältnis auf als gesunde Spender (0,4) und Nicht-

Ansprecher (4,0). Nach der ersten Checkpoint-Inhibitor Gabe stieg das $CD8^+GZMB^+$ T-Zell-Treg-Verhältnis in Therapieansprechern geringfügig von 5,4 auf 5,9 an; in Nicht-Ansprechern (3,0) nahm es ab.



> A.	8	4	2	2	0
< A.	4	1	1	1	0
> K. A.	19	4	2	2	1
< K. A.	7	3	1	0	0

> A.	5	2	1	1	0
< A.	7	3	2	2	0
> K. A.	9	0	0	0	0
< K. A.	17	7	3	2	1

> A.	11	5	3	3	0
< A.	1	0	0	0	0
> K. A.	23	5	3	2	1
< K. A.	3	2	0	0	0

Abbildung 18 Immunomonitoring des T Zell-Treg-Verhältnisses.

A T-Zell-Treg-Verhältnis. Die Prozentsätze der T-Zellen und Treg wurden via Durchflusszytometrie gemessen und entsprechend Abb. 9 (T-Zellen) und Abb. 16 (Treg) eingegrenzt. Das T-Zell-Treg-Verhältnis wurde berechnet, indem der prozentuale Anteil der T-Zellen in lebenden PBMC durch den der Treg dividiert wurde. Der Prozentsatz der T-Zell-Treg-Verhältnisse im peripheren Blut wurde in gesunden Spendern (GS) sowie in Ansprechern und Nicht-Ansprechern der Checkpoint-Inhibitor Therapie vor (Zeitpunkt A) und nach Therapiebeginn (Zeitpunkt B) ermittelt (n(GS) = 8, n(A.) = 8 – 13, n(K. A.) = 24 – 26; $CD8^+GZMB^+$/Treg, p(GS vs. A.(A)) = 0,7238). **B** Überlebenszeitanalyse anhand der T-Zell-Treg-Verhältnisse. Die Kaplan Meier-Kurven zeigen das prozentuale Gesamtüberleben der Patienten abhängig vom Therapieerfolg und dem T-Zell-Treg-Verhältnis. Als Grenzwerte (gestrichelte Linie) wurden die Mediane der gesunden Spender verwendet (Log-rank (Mantel-Cox) Test; $CD4^+$/Treg, p(> A. vs. > K. A.) = 0,0151 *; $CD8^+$/Treg, p(< A. vs. > K. A.) = 0,0045 **; $CD8^+GZMB^+$/Treg, p(> A. vs. > K. A.) = 0,0254 *). Median ± Interquartilsabstand. Kruskal-Wallis Test, p < 0,05 *, p < 0,01 **. A, Zeitpunkt vor Therapiebeginn; A., Ansprechen; B, Zeitpunkt 1-3 Wochen nach Therapiebeginn; CTLA-4, zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Protein 4; GS, gesunder Spender; GZMB, Granzym B; K. A., Kein Ansprechen; PD-1, programmiertes Zelltodprotein 1; Treg, regulatorische T Zellen; ÜR, Überlebensrate.

Die Überlebenszeitanalyse anhand der $CD4^+$ und $CD8^+GZMB^+$ T-Zell-Treg-Verhältnisse veranschaulichte, dass Therapieansprecher mit einem Verhältnis ≥ 26 ($CD4^+$-T-Zell-Treg-Verhältnis) bzw. ≥ 0,41 ($CD8^+GZMB^+$ T-Zell-Treg-Verhältnis) ein signifikant höheres Gesamtüberleben aufwiesen als Nicht-Ansprecher oberhalb der Grenzwerte (Abb. 18B, $CD4^+$ p = 0,0151 *, $CD8^+GZMB^+$ p = 0,0254). Nichtansprecher mit einem $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zell-Treg-Verhältnis < 26 bzw. < 14 zeigten eine höhere 2-Jahres-Überlebensrate als Nicht-Ansprecher oberhalb der Grenzwerte.

In dieser Studie stiegen die $CD4^+$, $CD8^+$ und $CD8^+GZMB^+$ T-Zell-Treg-Verhältnisse in Therapieansprechern nach Therapiebeginn an und lagen über dem der gesunden Spender. Im Kontrast dazu nahmen die T-Zell-Treg-Verhältnisse in Nicht-Ansprechern nach Therapiebeginn ab oder blieben unverändert.

3.1.2.10. Niedrige Prozentsätze polymorphonukleärer myeloider Suppressorzellen (PMN-MDSC) in Therapieansprechern

Die T-Zellaktivierung und -proliferation ist ein zentrales Element der Immunreaktion, das durch regulatorische T-Zellen (Treg) und myeloide Suppressorzellen (MDSC) inhibiert werden kann. In Studien gingen erhöhte MDSC Prozentsätze in PBMC mit einem Nicht-Ansprechen und einem fortgeschrittenen Tumorstadium einher (129). In Anlehnung an die durchflusszytometrische Eingrenzung der MDSC von Mandruzzato et al. wurden im Folgenden drei MDSC Subpopulationen im peripheren Blut von Checkpoint-Inhibitor Patienten untersucht (130):
$CD15^-CD14^+CD33^{high}HLA\text{-}DR^{low}$ mononukleäre MDSC (M-MDSC), $CD15^+CD33^+$ polymorphonukleäre MDSC (PMN-MDSC) und $HLA\text{-}DR^{low}CD11b^+CD33^+$ frühe (engl. early) MDSC (E-MDSC) (Abb. 19).
In der vorliegenden Studie wurden die prozentualen Anteile der MDSC-Subpopulationen an der Gesamtzahl der lebenden PBMC durchflusszytometrisch gemessen.

Therapieansprecher und Nicht-Ansprecher wiesen vor und nach Therapiebeginn höhere Prozentsätze der E-MDSC und M-MDSC auf als gesunde Spender (Abb. 20A/B). Die E- und M-MDSC Prozentsätze in Therapieansprecher und Nicht-Ansprecher waren vor Therapiebeginn vergleichbar. Nach der ersten Checkpoint-Inhibitor Gabe stiegen die Prozentsätze der E- und M-MDSC in Therapieansprechern stärker als in Nicht-Ansprechern an. Der Therapiebeginn zeigte keinen sichtbaren Effekt auf den Prozentsatz der M-MDSC in Nicht-Ansprechern.
Therapieansprecher vor Therapiebeginn (0,2 %) besaßen prozentual circa ein Drittel weniger PMN-MDSC als Nicht-Ansprecher (0,5 %) und gesunde Spender (0,6 %). Im Vergleich zum

Prozentsatz der E-MDSC (12,4 %) und M-MDSC (11,8 %) in gesunden Spendern war der Prozentsatz der PMN-MDSC (0,6 %) circa 20-fach niedriger. Nach der ersten Checkpoint-Inhibitor Gabe war der Prozentsatz der PMN-MDSC In Therapieansprechern (0,2 %) unverändert; in Nicht-Ansprechern (0,3 %) nahm der Prozentsatz der PMN-MDSC ab.

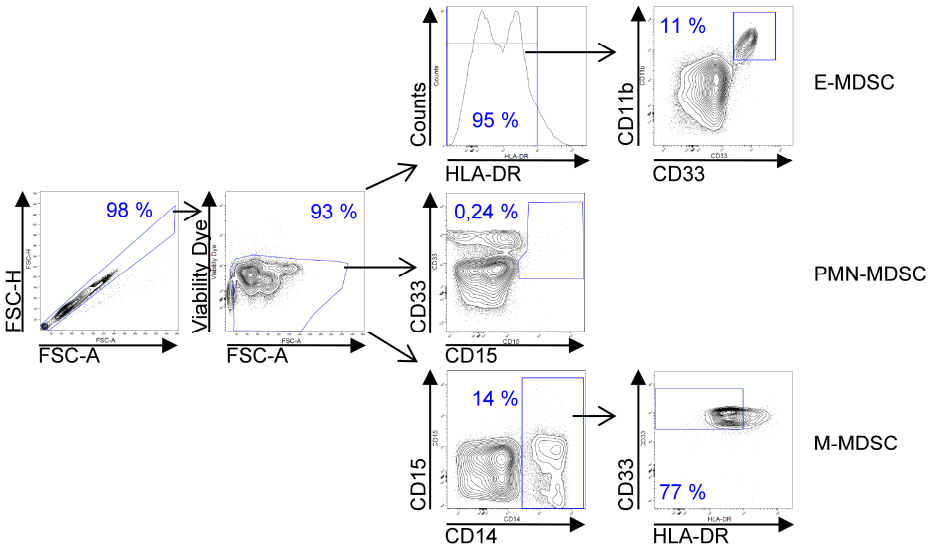


Abbildung 19 Eingrenzung der myeloiden Suppressorzellen (MDSC).

Das Immunomonitoring unterschied drei MDSC-Subpopulationen. Entsprechend der obigen durchflusszytometrischen Eingrenzung wurden $CD15^{-}CD14^{+}CD33^{high}HLA\text{-}DR^{low}$ monozytäre MDSC (M-MDSC), $CD15^{+}CD33^{+}$ polymorphonukleäre MDSC (PMN-MDSC) und $HLA\text{-}DR^{low}CD11b^{+}CD33^{+}$ frühe (engl. early) MDSC (E-MDSC) analysiert. Die Kontur- und Histogramme zeigen die Eingrenzung der MDSC anhand eines Patienten unter Ipilimumab Monotherapie ohne Therapieerfolg vor Therapiebeginn. Dubletten und tote Zellen wurden von der Analyse ausgeschlossen. E-MDSC, frühe (engl. early) MDSC; FSC, Vorwärtsstreulicht; HLA-DR, humanes Leukozyten Antigen-DR Isotyp; MDSC, myeloide Suppressorzellen; M-MDSC, mononukleäre/monozytäre MDSC; PMN-MDSC, polymorphonukleäre MDSC; SSC, Seitwärtsstreulicht.

Um den Effekt der MDSC auf das Gesamtüberleben zu untersuchen, wurde eine Überlebenszeitanalyse (Kaplan-Meier Methode) durchgeführt (Abb. 20C). In Therapieansprechern zeigten E-, PMN- und M-MDSC Prozentsätze oberhalb des Medians der gesunden Spender (Grenzwert) keinen negativen Effekt auf das Gesamtüberleben. Dagegen wiesen Nicht-Ansprecher mit E-, PMN- und M-MDSC Prozentsätzen oberhalb des Grenzwertes ein geringeres Gesamtüberleben auf als Nicht-Ansprecher unterhalb des Grenzwertes. So war die 2-Jahres-Überlebensrate in Nicht-Ansprechern (18 %) mit einem Prozentsatz der E-MDSC ≥ 12,4 % nur halb so hoch verglichen mit Nicht-Ansprechern (48 %) < 12,4 %. Nicht-Ansprecher (55 %) mit einem Prozentsatz der PMN-MDSC < 0,6 % zeigten sogar eine 5-fach höhere 2-Jahresüberlebensrate als Nicht-Ansprecher (11 %) ≥ 0,6 %. Im Gegensatz zu den Prozentsätzen der E- und PMN-MDSC senkte ein M-MDSC Prozentsatz ≥ 11,8 % die 2-Jahres-Überlebensrate in Nicht-Ansprechern nur von 32 % auf 22 % in Nicht-Ansprechern < 11,8 %.

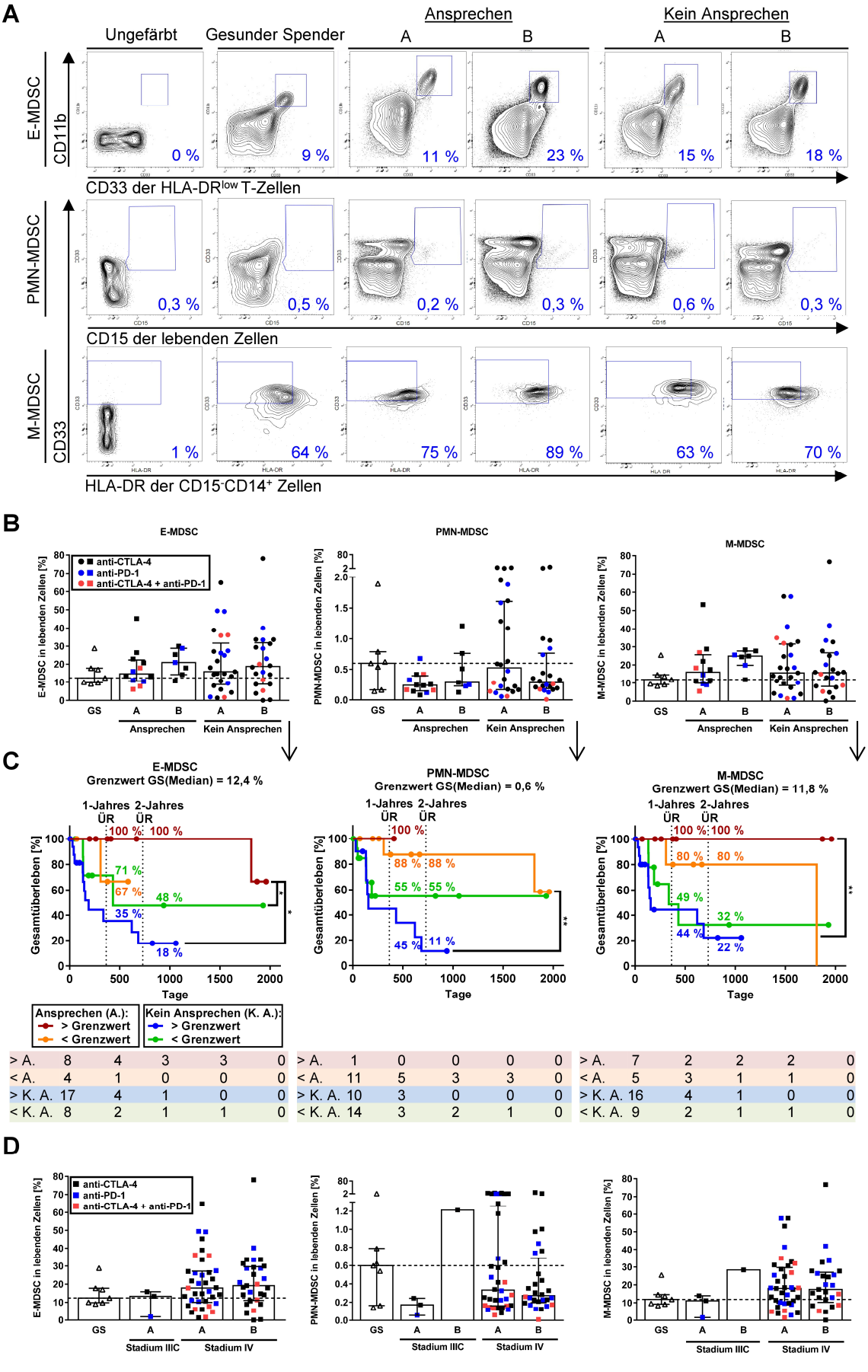

A
Ungefärbt
Gesunder Spender
Ansprechen
Kein Ansprechen
A
B
E-MDSC
CD11b
0 %
9 %
11 %
23 %
15 %
18 %
CD33 der HLA-DRlow T-Zellen
PMN-MDSC
0,3 %
0,5 %
0,2 %
0,3 %
0,6 %
0,3 %
CD15 der lebenden Zellen
M-MDSC
CD33
1 %
64 %
75 %
89 %
63 %
70 %
HLA-DR der CD15-CD14+ Zellen
B
E-MDSC
PMN-MDSC
M-MDSC
anti-CTLA-4
anti-PD-1
anti-CTLA-4 + anti-PD-1
E-MDSC in lebenden Zellen [%]
PMN-MDSC in lebenden Zellen [%]
M-MDSC in lebenden Zellen [%]
GS
A
B
Ansprechen
Kein Ansprechen
C
E-MDSC
Grenzwert GS(Median) = 12,4 %
PMN-MDSC
Grenzwert GS(Median) = 0,6 %
M-MDSC
Grenzwert GS(Median) = 11,8 %
1-Jahres ÜR
2-Jahres ÜR
Gesamtüberleben [%]
Tage
100 %
71 %
67 %
48 %
35 %
18 %
88 %
55 %
45 %
11 %
80 %
49 %
44 %
32 %
22 %
Ansprechen (A.):
> Grenzwert
< Grenzwert
Kein Ansprechen (K. A.):
> Grenzwert
< Grenzwert
> A. 8 4 3 3 0
< A. 4 1 0 0 0
> K. A. 17 4 1 0 0
< K. A. 8 2 1 1 0
> A. 1 0 0 0 0
< A. 11 5 3 3 0
> K. A. 10 3 0 0 0
< K. A. 14 3 2 1 0
> A. 7 2 2 2 0
< A. 5 3 1 1 0
> K. A. 16 4 1 0 0
< K. A. 9 2 1 1 0
D
Stadium IIIC
Stadium IV

Abbildung 20 Immunomonitoring myeloider Suppressorzellen (MDSC) im peripheren Blut.

Entsprechend Abb. 19 unterschied die Studie drei MDSC-Subpopulationen: $CD15^{-}CD14^{+}CD33^{high}HLA\text{-}DR^{low}$ monozytäre MDSC (M-MDSC), $CD15^{+}CD33^{+}$ polymorphonukleäre MDSC (PMN-MDSC) und $HLA\text{-}DR^{low}CD11b^{+}CD33^{+}$ frühe (engl. early) MDSC (E-MDSC). **A** Exemplarische durchflusszytometrische Konturdiagramme der MDSC Prozentsätze. Die E-MDSC Konturdiagramme zeigen die Population viabler $HLA\text{-}DR^{low}$ Zellen. Die PMN-MDSC Konturdiagramme zeigen die Population viabler PBMC. Die M-MDSC Konturdiagramme zeigen die Population viabler $CD14^{+}CD15^{-}$ Zellen. Die Prozentzahlen beziehen sich auf den Anteil der eingegrenzten Zellen an der gezeigten Zellpopulation. Aufgrund interindividueller Unterschiede wurden die Zellpopulationen für jeden Patienten individuell eingegrenzt. Als Kontrolle dienten gesunde Spender. **B** E-, M-, PMN-MDSC. Der Prozentsatz der E-, M- und PMN-MDSC an lebenden PBMC wurde in gesunden Spendern (GS) sowie in Ansprechern und Nicht-Ansprechern der Checkpoint-Inhibitor Therapie vor (Zeitpunkt A) und nach Therapiebeginn (Zeitpunkt B) ermittelt (n(GS) = 7, n(K. A.) = 22 – 25, n(A.) = 7 – 12; PMN-MDSC, p(A.(A) vs. K. A.(A)) = 0,5848; M-MDSC, p(GS vs. A.(B)) = 0,6054). **C** Überlebenszeitanalyse anhand der MDSC-Subpopulationen. Die Kaplan-Meier-Kurven zeigen das prozentuale Gesamtüberleben der Patienten abhängig vom Therapieerfolg und den MDSC-Subpopulationen. Als Grenzwerte (gestrichelte Linie) wurden die Mediane der gesunden Spender verwendet (Log-rank (Mantel-Cox) Test; E-MDSC, p(> A. vs. < K. A.) = 0,044 *, p(> A. vs. > K. A.) = 0,0153 *; PMN-MDSC, p(< A. vs. > K. A.) = 0,003 **; M-MDSC, p(> A. vs. > K. A.) = 0,0024 **). **D** Prozentsätze der MDSC-Subpopulationen in den Tumorstadien IIIC und IV. Aufgrund der geringen Gruppengröße wurde das Stadium IIIC (B) von der statistischen Analyse ausgeschlossen (n(GS) = 7, n(IIIC) = 1 – 3, n(IV) = 25 – 37; PMN-MDSC, p(GS vs. IIIC(A)) = 0,4656, p(IIIC(A) vs. IV(A)) = 0,6361). Median ± Interquartilsabstand, Kruskal-Wallis Test, $p < 0,05$ *, $p > 0,01$ **. A, Zeitpunkt vor Therapiebeginn; A., Ansprechen; B, Zeitpunkt 1 – 3 Wochen nach Therapiebeginn; CTLA-4, zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Protein 4; GS, gesunder Spender; HLA-DR, humanes Leukozyten Antigen-DR Isotyp; E-MDSC, early (frühe) MDSC; K. A., Kein Ansprechen; M-MDSC, monozytäre/mononukleäre myeloide Suppressorzellen; PBMC, mononukleäre Zellen des peripheren Blutes; PD-1, programmiertes Zelltodprotein 1; PMN-MDSC, polymorphonukleäre MDSC; ÜR, Überlebensrate.

Um zu untersuchen, ob die Prozentsätze der MDSC im peripheren Blut mit dem Tumorstadium der Patienten zusammenhängen, wurden die Prozentsätze der MDSC-Subpopulationen nach Tumorstadien unterschieden und verglichen (Abb. 20D). Entsprechend der „S3-Leitlinie zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms“ behandelte die Studie Patienten mit weit fortgeschrittenem Melanom, d. h. im Tumorstadium IIIC (n = 1 – 3) und IV (n = 25 – 37 Patienten), mit Checkpoint-Inhibitoren (131).

Patienten im Stadium IV besaßen vor Therapiebeginn höhere Prozentsätze an E-, PMN- und M-MDSC als Patienten im Stadium IIIC. Patienten im Stadium IV besaßen vor (17,9 %) und nach Therapiebeginn (19,2 %) höhere E-MDSC Prozentsätze als Patienten im Stadium IIIC (13,3 %) und gesunde Spender (12,4 %). Es lagen keine Daten zu den Prozentsätzen der E-MDSC in Patienten im Stadium IIIC nach Therapiebeginn vor. Zudem wiesen Patienten im Stadium IV (18 %) höhere M-MDSC Prozentsätze auf als Patienten im Stadium IIIC (11,1 %) und gesunde Spender (11,8 %). Dagegen war der Prozentsatz der PMN-MDSC in Patienten im Stadium IV (0,3 %) und im Stadium IIIC (0,2 %) vor Therapiebeginn niedriger als in gesunden Spendern (0,6 %). Zum Prozentsatz der M- und PMN-MDSC im Stadium IIIC nach Therapiebeginn lag nur ein Messpunkt vor. Die erste Checkpoint-Inhibitor Gabe beeinflusste den Prozentsatz der E-, PMN- und M-MDSC der Patienten im Stadium IV nicht, während der Prozentsatz der M- und PMN-MDSC in Patienten im Stadium IIIC sichtbar anstieg.

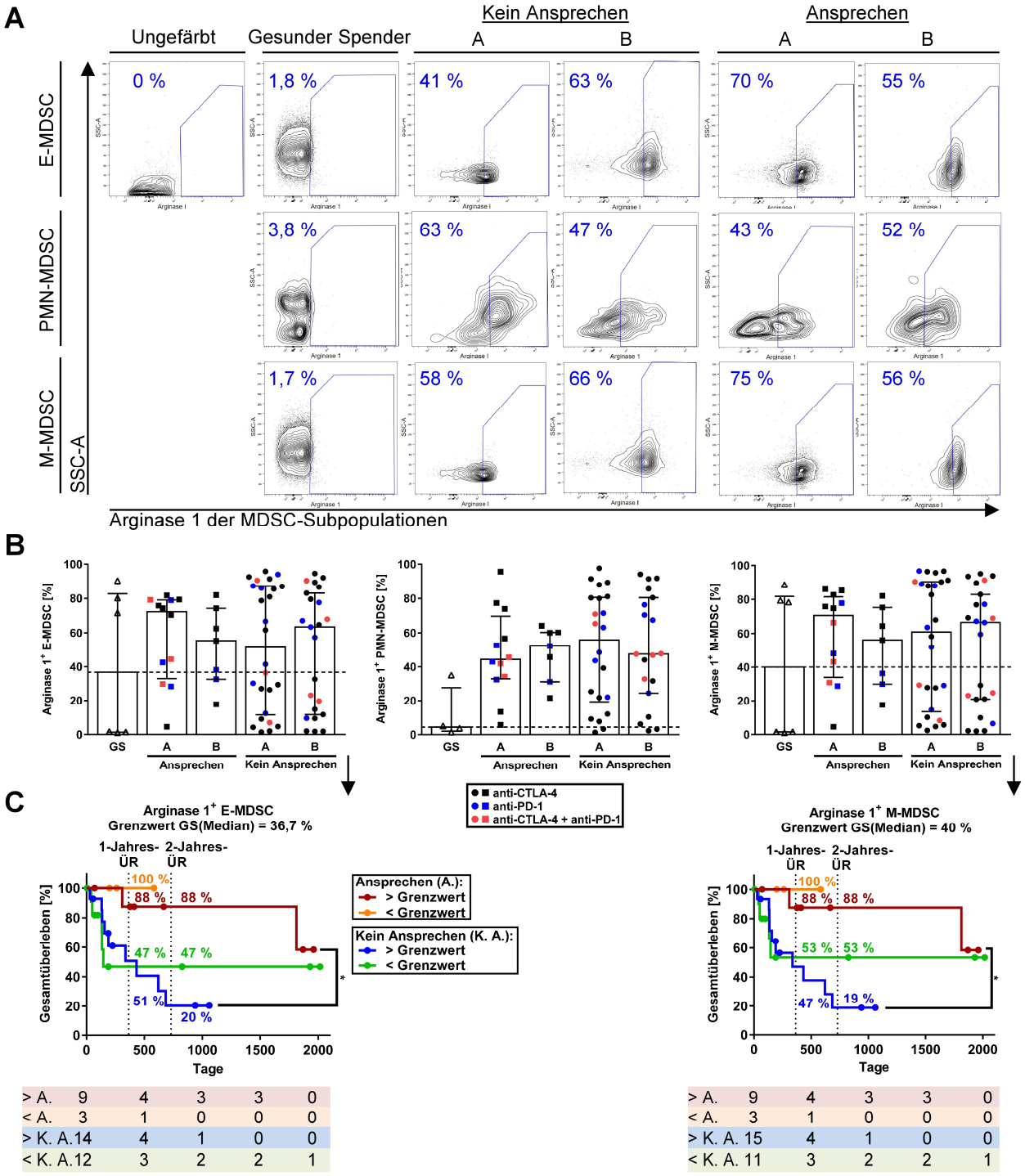
Die Studie zeigte, dass Therapieansprecher vor Therapiebeginn einen niedrigeren Prozentsatz der PMN-MDSC im peripheren Blut aufwiesen als Nicht-Ansprecher, während die Prozentsätze der E- und M-MDSC vergleichbar mit denen in Nicht-Ansprechern waren. Ein hoher Prozentsatz der E-, M- und PMN-MDSC wirkte sich in Nicht-Ansprechern negativ auf das Gesamtüberleben aus. Patienten mit Tumorstadium IV wiesen vor Therapiebeginn höhere E-, M- und PMN-MDSC Prozentsätze auf als Patienten im Stadium IIIC.

3.1.2.11. Abnahme des Prozentsatzes der Arginase 1^+ E- und M-MDSC nach Therapiebeginn indiziert ein Therapieansprechen

MDSC produzieren das L-Arginin konvertierende Enzym Arginase 1, welches die Aminosäure L-Arginin in Ornithin und Urea spaltet. Ornithin wird mit einem verstärkten Wachstum der Tumorzellen in Verbindung gebracht (132). Aufgrund des L-Arginin-Mangels verringern T-Zellen die Translation, die Proteinsynthese, die CD3-zeta Expression auf der T-Zelloberfläche sowie die Glykolyse, welche ein essenzieller Regulator der T-Zellproliferation ist. Die Mitochondrien-Funktion bleibt unbeeinträchtigt (133).
Zur Analyse der suppressiven Kapazität wurde der prozentuale Anteil der Arginase 1^+ MDSC an den MDSC im peripheren Blut der Patienten durchflusszytometrisch bestimmt (Abb. 21).

Der Prozentsatz der Arginase 1^+ E-, PMN- und M-MDSC war in den Patienten unabhängig vom Zeitpunkt und Therapieerfolg höher als in gesunden Spendern (Abb. 21A/B). Therapieansprecher vor Therapiebeginn wiesen einen höheren Prozentsatz der Arginase 1^+ E- und M-MDSC auf als Nicht-Ansprecher. Dagegen war der Prozentsatz der Arginase 1^+ PMN-MDSC in Therapieansprechern (44,3 %) vor Therapiebeginn geringer als in Nicht-Ansprechern (55,8 %) und 9-fach höher als in gesunden Spendern (4,5 %).
Nach der ersten Checkpoint-Inhibitor Gabe nahm der Prozentsatz der Arginase 1^+ E- und M-MDSC in Therapieansprechern ab, während diese in Nicht-Ansprechern anstiegen. Im Kontrast dazu stieg der Prozentsatz der Arginase 1^+ PMN-MDSC in Therapieansprechern nach Therapiebeginn von 44,3 % auf 52,3 % und sank in Nicht-Ansprechern von 55,8 % auf 47,5 %.
Die Überlebenszeitanalyse zeigte, dass Prozentsätze Arginase 1^+ E-MDSC ≥ 36,7 % bzw. Arginase 1^+ M-MDSC ≥ 40 % (= Grenzwert, Median der gesunden Spender) einen negativen Effekt auf das Gesamtüberleben der Therapieansprecher und Nicht-Ansprecher hatten (Abb. 21C). Die 2-Jahres-Überlebensraten der Nicht-Ansprecher mit < 36,7 % Arginase 1^+ E-MDSC bzw. < 40 % Arginase 1^+ M-MDSC M-MDSC (53 %) waren mit 47 % bzw. 53 % mehr als doppelt so hoch wie 20 % bzw. 19 % der Nicht-Ansprecher oberhalb der Grenzwerte. Therapieansprecher mit Arginase 1^+ E-MDSC ≥ 36,7 % bzw. Arginase 1^+ M-MDSC ≥ 40 %

lebten signifikant länger als Nicht-Ansprecher mit diesen Prozentsätzen (E-MDSC p = 0,018 *; M-MDSC p = 0,013 *).



> A.	9	4	3	3	0
< A.	3	1	0	0	0
> K. A.	14	4	1	0	0
< K. A.	12	3	2	2	1

> A.	9	4	3	3	0
< A.	3	1	0	0	0
> K. A.	15	4	1	0	0
< K. A.	11	3	2	2	1

Abbildung 21 Immunomonitoring Arginase 1$^+$ myeloider Suppressorzellen (MDSC) im peripheren Blut.

Entsprechend Abb. 19 unterschied die Studie drei MDSC-Subpopulationen: CD15$^-$CD14$^+$CD33^{high}HLA-DR^{low} monozytäre MDSC (M-MDSC), CD15$^+$CD33$^+$ polymorphonukleäre MDSC (PMN-MDSC) und HLA-DR^{low}CD11b$^+$CD33$^+$ frühe (engl. early) MDSC (E-MDSC). **A** Exemplarische durchflusszytometrische Konturdiagramme der Arginase 1$^+$ MDSC. Die Diagramme zeigen jeweils die Population HLA-DR^{low}CD11b$^+$CD33$^+$ E-MDSC, der CD15$^+$CD33$^+$ PMN-MDSC und der CD15$^-$CD14$^+$CD33^{high}HLA-DR^{low} M-MDSC. Das Enzym Arginase 1 wurde intrazellulär gefärbt. Aufgrund interindividueller Unterschiede wurden die Zellpopulationen für jeden Patienten individuell eingegrenzt. Als Kontrolle dienten gesunde Spender. **B** Arginase 1$^+$ MDSC. Die Prozentsätze der Arginase 1$^+$ Zellen in E-, M- und PMN-MDSC wurden in gesunden Spendern (GS) sowie in Ansprechern und Nicht-Ansprechern der Checkpoint-Inhibitor Therapie vor (Zeitpunkt A) und nach Therapiebeginn (Zeitpunkt B) ermittelt. Die gestrichelte Linie markiert den Median der gesunden Spender (n(GS) = 4 – 6, n(A.) = 7 – 12, n(K. A.) = 19 – 26; Arginase 1$^+$ PMN-MDSC, p(GS vs. K. A.(A)) = 0,1492, p(GS vs. K. A.(B)) = 0,1664, p(GS vs. A.(A)) = 0,3366). **C** Überlebenszeitanalyse anhand der Arginase 1$^+$ MDSC. Die Kaplan-Meier-Kurven zeigen das prozentuale Gesamtüberleben der Patienten abhängig vom Therapieerfolg und den Arginase 1$^+$ MDSC-Subpopulationen. Als Grenzwerte (gestrichelte Linie) wurden die Mediane der gesunden Spender verwendet (Log-rank (Mantel-Cox) Test; E-MDSC, p(> A. vs. > K. A.) = 0,018 *; M-MDSC, p(> A. vs. > K. A.) = 0,013 *). Median ± Interquartilsabstand, Kruskal-Wallis Test, p < 0,05 *. A, Zeitpunkt vor Therapiebeginn; A., Ansprechen; B, Zeitpunkt 1-3 Wochen nach Therapiebeginn; CTLA-4, zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Protein 4; E-MDSC, frühe (engl. early) MDSC; GS, gesunder Spender; M-MDSC, monozytäre MDSC; PD-1, programmiertes Zelltodprotein 1; PMN-MDSC, polymorphonukleare MDSC; SSC, Seitwärtsstreulicht; ÜR, Überlebensrate.

In dieser Studie nahm der Prozentsatz der Arginase 1$^+$ E- und M-MDSC in Therapieansprechern nach der ersten Checkpoint-Inhibitor Gabe ab, während dieser in Nicht-Ansprechern zunahm. Hohe Prozentsätze Arginase 1$^+$ E- und M-MDSC wirkten sich negativ auf das Gesamtüberleben der Patienten aus.

3.1.2.12. MDSC supprimieren die Proliferation, die IFN-γ Produktion und die Aktivierung CD4$^+$ T-Zellen

Im chronisch entzündlichen Milieu wie z. B. dem malignen Melanom differenzieren unreife myeloide Zellen zu myeloiden Suppressorzellen (MDSC), welche in E-, M- und PMN-MDSC Subpopulationen unterteilt werden. Da in der Literatur den E- und M-MDSC eine suppressive Kapazität zugeschrieben wird, aber unterschiedliche Phänotypen der E-, M- und PMN-MDSC Subpopulationen sowie Versuchsprotokolle verwendet werden (134), sind die Ergebnisse zur suppressiven Kapazität der MDSC schwer zu vergleichen. Die vorliegende Arbeit untersuchte CD15$^-$CD14$^+$CD33^{high}HLA-DR^{low} M-MDSC und HLA-DR^{low}CD11b$^+$CD33$^+$ E-MDSC, welche beide die Oberflächenmoleküle CD33$^+$ und HLA-DR^{low} exprimieren. Anders als CD33 wird CD11b nicht nur auf MDSC, sondern auch auf NK-Zellen exprimiert.

Die suppressive Kapazität der CD33$^+$HLA-DR^{low} MDSC wurde in einem syngenen Suppressionsassay untersucht. Dazu wurden CD4$^+$ T-Zellen und CD4$^-$HLA-DR$^-$CD33$^+$ MDSC aus dem peripheren Blut von Melanompatienten und gesunden Spendern magnetisch isoliert. Die CD4$^+$ T-Zellen wurden mit dem Proliferationsmarker Carboxyfluoresceindiacetat Succinimidylester (CFSE) markiert, mit MDSC im Verhältnis 1:4 bis 4:1 (CD4:MDSC) titriert und

mit allogenen CD3-depletierten APC aus gesunden Spendern sowie 0,5 µg/ml anti-CD3 Antikörper stimuliert. Als Negativkontrollen wurden APC, MDSC und APC + MDSC mit anti-CD3 stimuliert. Mit APC und anti-CD3 stimulierte $CD4^+$ T-Zellen dienten als Positivkontrolle. An Tag 4 wurde die suppressive Kapazität der MDSC auf $CD4^+$ T-Zellen anhand (i) der Proliferation, (ii) der IFN-γ Produktion und (iii) der Expression des sehr späten Aktivierungsmarkers HLA-DR durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 22).

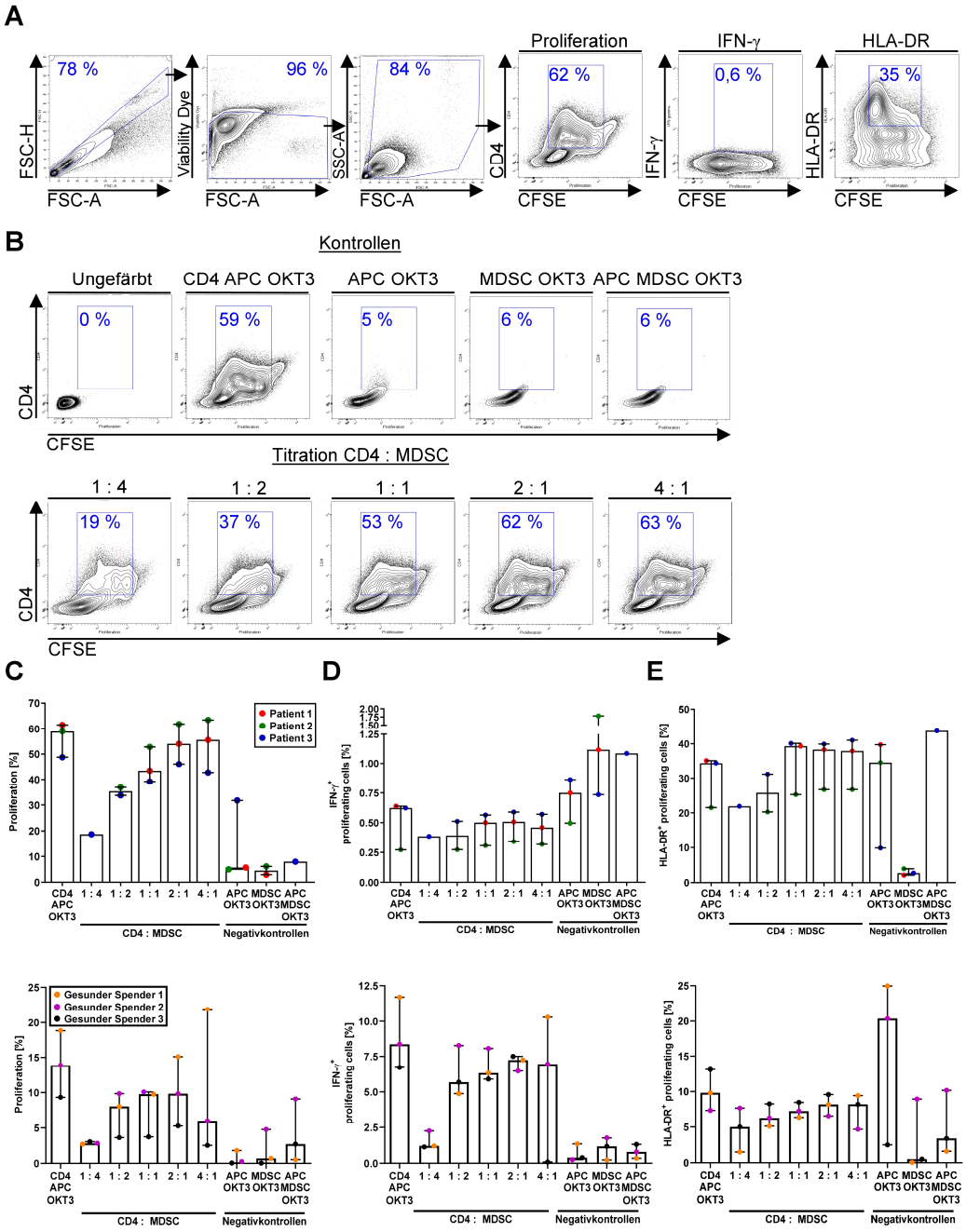


Abbildung 22 Effekt myeloider Suppressorzellen (MDSC) auf die Proliferation syngener CD4⁺ T Zellen.

Für das syngene Suppressionsassay wurden CD4⁺ T-Zellen und CD4⁻HLA-DR⁻CD33⁺ MDSC aus dem peripheren Blut von Checkpoint-Inhibitor Patienten und gesunden Spendern magnetisch isoliert. Die CD4⁺ T-Zellen wurden mit dem Proliferationsmarker CFSE markiert. Die T-Zellen wurden mit MDSC im Verhältnis 1:4 bis 4:1 titriert (CD4: MDSC). Aufgrund der geringen Zahl isolierter MDSC pro Patient konnten nicht alle Proben angesetzt werden. Am Tag des Ansetzens erfolgte die Stimulation mit 0,5 µg/ml anti-CD3 Antikörper (Klon OKT3) und allogenen CD3-depletierten APC aus gesunden Spendern im Verhältnis 1:2 (APC:CD4⁺ T-Zellen). An Tag 2 wurde IL-2 mit einer Endkonzentration von 0,025 I. U./µl hinzugegeben. Die Proliferation wurde an Tag 4 durchflusszytometrisch gemessen. **A** Eingrenzung proliferierender, IFN-γ⁺ und HLA-DR⁺ CD4⁺ T-Zellen. Das Beispiel zeigt Patient 1 (Ipilimumab/Nivolumab Kombinationstherapie mit Therapieerfolg). Dubletten und tote Zellen wurden von der Analyse ausgeschlossen. Zur Bestimmung der intrazellulären IFN-γ Produktion wurden die Zellen für 5 Stunden mit 1 µg/ml Ionomycin und 10 ng/ml PMA stimuliert. Zur Hemmung der Exozytose wurde nach 30 Minuten 7 µl/ml BD Golgi Stop® hinzugegeben. IFN-γ wurde intrazellulär gefärbt. **B** Exemplarische durchflusszytometrische Konturdiagramme der Proliferation der CD4⁺ T-Zellen. Das Beispiel zeigt die Patienten 2 (Nivolumab Monotherapie mit Therapieerfolg) und 3 (Pembrolizumab Monotherapie ohne Therapieerfolg). Die Diagramme zeigen die Population lebender Zellen, die im FSC/SSC-Diagramm eingegrenzt wurden. **C** Effekt syngener MDSC auf die Proliferation CD4⁺ T-Zellen (n(Patient) = 1 – 3, p(CD4 APC OKT3 vs. APC OKT3) = 0,2333, p(CD4 APC OKT3 vs. MDSC OKT3) = 0,3142; n(GS) = 1 – 3, p(CD4 APC OKT3 vs. APC OKT3) = 0,1025, p(CD4 APC OKT3 vs. MDSC OKT3) = 0,4217, p(2 : 1 vs. APC OKT3) = 0,3639). **D** Effekt syngener MDSC auf die IFN-γ Produktion CD4⁺ T-Zellen (GS, p (CD4 APC OKT3 vs. APC OKT3) = 0,2694, p(CD4 APC OKT3 vs. MDSC OKT3) = 0,4221, p(CD4 APC OKT3 vs. APC MDSC OKT3) = 0,3136). **E** Effekt syngener MDSC auf die Expression des Aktivierungsmarkers HLA-DR auf CD4⁺ T-Zellen (Patienten, p(APC MDSC OKT3 vs. MDSC OKT3) = 0,2752, p(MDSC OKT3 vs. CD4:MDSC 4:1) = 0,4288, p(MDSC OKT3 vs. CD4:MDSC 1:1) = 0,5116). Median ± Interquartilsabstand. Kruskal-Wallis Test, $p < 0,05$ *. APC, Antigen-präsentierende Zellen; CFSE, Carboxyfluoresceindiacetat Succinimidylester; GS, gesunde Spender; HLA-DR, humanes Leukozyten Antigen-DR Isotyp; IFN-γ, Interferon-γ; I. U., Internationale Einheiten (engl. Units); MDSC, myeloide Suppressorzellen; PMA, Phorbol-12-myristat-13-acetat.

Die Positivkontrolle der CD4⁺ T-Zellen aus Patienten unter Checkpoint-Inhibitor Therapie (59 % CFSE⁺CD4⁺ T-Zellen) proliferierte im Vergleich zu der aus gesunden Spendern (14 %) viermal stärker (Abb. 22A/B/C). Die Proliferation der CD4⁺ T-Zellen aus Patienten und gesunden Spendern sank mit zunehmendem Titrationsverhältnis der CD4⁻HLA-DR⁻CD33⁺ MDSC. Die stärkste Suppression der Proliferation wurde bei einem CD4-MDSC-Verhältnis von 1:4 gemessen: Die Proliferation der CD4⁺ T-Zellen aus Patienten und gesunden Spendern sank auf 19 % bzw. 3 % ab. Die höchste Proliferation der CD4⁺ T-Zellen aus Patienten wurde bei einem CD4-MDSC-Verhältnis von 4:1 (56 %) und aus gesunden Spendern bei einem CD4-MDSC-Verhältnis von 1:1 und 2:1 gemessen (10 %). Ein CD4-MDSC-Verhältnis von 4:1 aus gesunden Spendern reduzierte die Proliferation auf 6 %.

Die IFN-γ Produktion der CFSE-markierten CD4⁺ T-Zellen war in der Positivkontrolle der gesunden Spender (8,4 %) stärker als die der Patienten (0,6 %) (Abb. 22D). Die Negativkontrollen (0,8-1,1 %) der MDSC aus Patienten wiesen eine höhere IFN-γ Produktion auf als die Positivkontrolle. Die IFN-γ Produktion in CD4⁺ (Patienten-) T-Zellen war nicht messbar.
Die IFN-γ Produktion der CFSE⁺CD4⁺ T-Zellen aus gesunden Spendern fiel mit steigendem Titrationsverhältnis der MDSC ab. Entsprechend der Proliferation wurde die stärkste Suppression der IFN-γ Produktion der CFSE⁺CD4⁺ T-Zellen aus gesunden Spendern bei einem

CD4-MDSC-Verhältnis von 1:4 gemessen (1,2 %). Die höchste IFN-γ Produktion der $CFSE^+CD4^+$ T-Zellen aus gesunden Spendern wurde mit 7,2 % bei einem CD4-MDSC-Verhältnis von 4:1 gemessen.

Der Prozentsatz der HLA-DR^+ CFSE-markierten $CD4^+$ T-Zellen aus Patienten (34,4 %) war dreimal höher als der aus gesunden Spendern (9,8 %) (Abb. 22E). Der Prozentsatz der HLA-DR^+ $CFSE^+CD4^+$ T-Zellen aus Patienten und gesunden Spendern nahm mit steigender MDSC Zellzahl ab. Der geringste Prozentsatz der HLA-$DR^+CFSE^+CD4^+$ T-Zellen aus Patienten und gesunden Spendern wurde bei einem CD4-MDSC-Verhältnis von 1:4 gemessen. Ab einem CD4-MDSC-Verhältnis von 1:1 aus Patienten (39,3 %) bzw. von 2:1 aus gesunden Spendern (8,2 %) erreichte der Prozentsatz der HLA-DR^+ $CFSE^+CD4^+$ T-Zellen ein Plateau. Die Negativkontrollen der APC zeigten hohe Prozentsätze HLA-DR^+ Zellen. APC exprimieren HLA-DR mit prozessierten Antigenen, um T-Zellen zur Proliferation zu stimulieren. Aufgrund der Isolation von HLA-DR^-CD33^+ MDSC war der Anteil HLA-DR^+ Zellen (0,5 – 2,7 %) in dieser Kontrolle gering.

Im syngenen Suppressionsassay supprimierten sowohl HLA-DR^-CD33^+ MDSC aus Melanompatienten, in denen suppressive MDSC aufgrund des Tumormikromilieus primär vorzufinden sind, als auch MDSC aus gesunden Spendern die Proliferation $CD4^+$ T-Zellen und reduzierten den Prozentsatz aktivierter HLA-DR^+ Zellen an den $CD4^+$ T-Zellen. HLA-DR^-CD33^+ MDSC supprimierten die IFN-γ Produktion der $CD4^+$ T-Zellen in gesunden Spendern, während $CD4^+$ T-Zellen aus Patienten – auch ohne MDSC Zusatz – kein IFN-γ produzierten.

3.1.2.13. Tabellarische Zusammenfassung des zellulären Immunomonitoring

Tabelle 24 Tabellarische Zusammenfassung des zellulären Immunomonitoring – Patienten vor Therapiebeginn vs. gesunde Spender.

Der Median der gemessenen Parameter in gesunden Spendern wurden optisch mit dem Median in Melanompatienten verglichen. War ein Parameter in Patienten im Median höher als in gesunden Spendern, wurde relativ zum Unterschied ein positiver, grüner Wert vergeben. In umgekehrter Weise wurde ein negativer, roter Wert vergeben, wenn ein Parameter in Patienten im Median niedriger als in gesunden Spendern war. Die Werte der Heatmap wurden selbstständig nach Augenmaß erhoben.

	Parameter	Therapieerfolg	
		Ansprechen	Kein Ansprechen
Prozentsatz	Lymphozyten	1	-2
	Monozyten	-1	1
Verhältnis	LMR	0,5	-1

	Parameter	$CD4^+$ T-Zellen		$CD8^+$ T-Zellen		CD8 $GZMB^+$ T-Zellen	
		Ansprechen	Kein Ansprechen	Ansprechen	Kein Ansprechen	Ansprechen	Kein Ansprechen
Prozentsatz	T-Zellen	2	2	-2	-1	2	2
T-Zell-Erschöpfung	Ki-67	0,5	-1	2	1	3	1
	IFN-γ	0,5	-0,5	0,5	0	1	1
	CTLA-4	-1	0,5	-1	0	-2	-1
	PD-1	0,5	1	1	2	1	2
T-Zell-Aktivierung	CD69	1	1	1	1	1	0,5
	CD25	1	1				
	HLA-DR	0,5	1	1	0,5	1	2
Verhältnis	T-Zell-Treg-Verhältnis	0,5	1	-1	-1	2	1

	Parameter	Treg	
		Ansprechen	Kein Ansprechen
Prozentsatz	Treg	-0,5	-1
Aktivierung	GARP	-0,5	-0,5
Suppressive Kapazität	HLA-DR	3	2
	CTLA-4	-2	-1

	Parameter	E-MDSC		PMN-MDSC		M-MDSC	
		Ansprechen	Kein Ansprechen	Ansprechen	Kein Ansprechen	Ansprechen	Kein Ansprechen
Prozentsatz	MDSC	0,5	0,5	-1	-0,5	0,5	0,5
Funktion	Arginase 1	2	1	2	3	2	1

Heatmap Legende:

3	viel höher als der Median in gesunden Spendern
2	
1	
0,5	
0	entspricht dem Median der gesunden Spender
-0,5	
-1	
-2	viel niedriger als der Median in gesunden Spendern
	nicht gemessen

Tabelle 25 Tabellarische Zusammenfassung des zellulären Immunomonitoring – Patienten vor Therapiebeginn vs. nach Therapiebeginn.

Stieg der Median eines Parameters infolge des Therapiebeginns an, wurde das Kästchen grün eingefärbt und mit einem Pfeil nach oben versehen. Ein starker Anstieg bzw. Abfall wurde durch zwei Pfeile, ein geringfügiger durch eine Tilde mit einem entsprechenden Pfeil gekennzeichnet. Die Bewertung erfolgte selbstständig nach Augenmaß.

	Parameter	Therapieerfolg	
		Ansprechen	Kein Ansprechen
Frequenz	Lymphozyten	↘	≈
	Monozyten	↗	≈
Verhältnis	LMR	↘	≈

	Parameter	$CD4^+$ T-Zellen		$CD8^+$ T-Zellen		CD8 $GZMB^+$ T-Zellen	
		Ansprechen	Kein Ansprechen	Ansprechen	Kein Ansprechen	Ansprechen	Kein Ansprechen
Prozentsatz	T-Zellen	≈	≈	↗	≈	↘	↘
T-Zell-Erschöpfung	Ki-67	↘	↗↗	↘	≈	↗	↗↗
	IFN-γ	↘	≈	↘	↗	↗↗	↗
	CTLA-4	↗≈	≈	↗	↘	↗	≈
	PD-1	↗	≈	≈	↘	≈	≈
T-Zell-Aktivierung	CD69	≈	↘	↗↗	↗	↘	≈
	CD25	↘	≈				
	HLA-DR	↗	≈	↗	↗	≈	≈
Verhältnis	T-Zell-Treg-Verhältnis	↗	↘	↗↗	≈	↗≈	↘

	Parameter	Treg	
		Ansprechen	Kein Ansprechen
Prozentsatz	Treg	↘	↗
Aktivierung	GARP	↗	≈
Suppressive Kapazität	HLA-DR	↘	↘
	CTLA-4	↗≈	≈

	Parameter	E-MDSC		PMN-MDSC		M-MDSC	
		Ansprechen	Kein Ansprechen	Ansprechen	Kein Ansprechen	Ansprechen	Kein Ansprechen
Prozentsatz	MDSC	↗	↗	≈	↘	↗	≈
Funktion	Arginase 1	↘	↗	↗	↘	↘	↗≈

Legende:

↗	Anstieg nach Therapiebeginn
↘	Abfall nach Therapiebeginn
≈	keine Veränderung nach Therapiebeginn

3.1.3. Untersuchungen zu molekularen Biomarkern im peripheren Blut *ex vivo*

3.1.3.1. S100, LDH sowie Thrombozyten im Normbereich indizieren ein Therapieansprechen

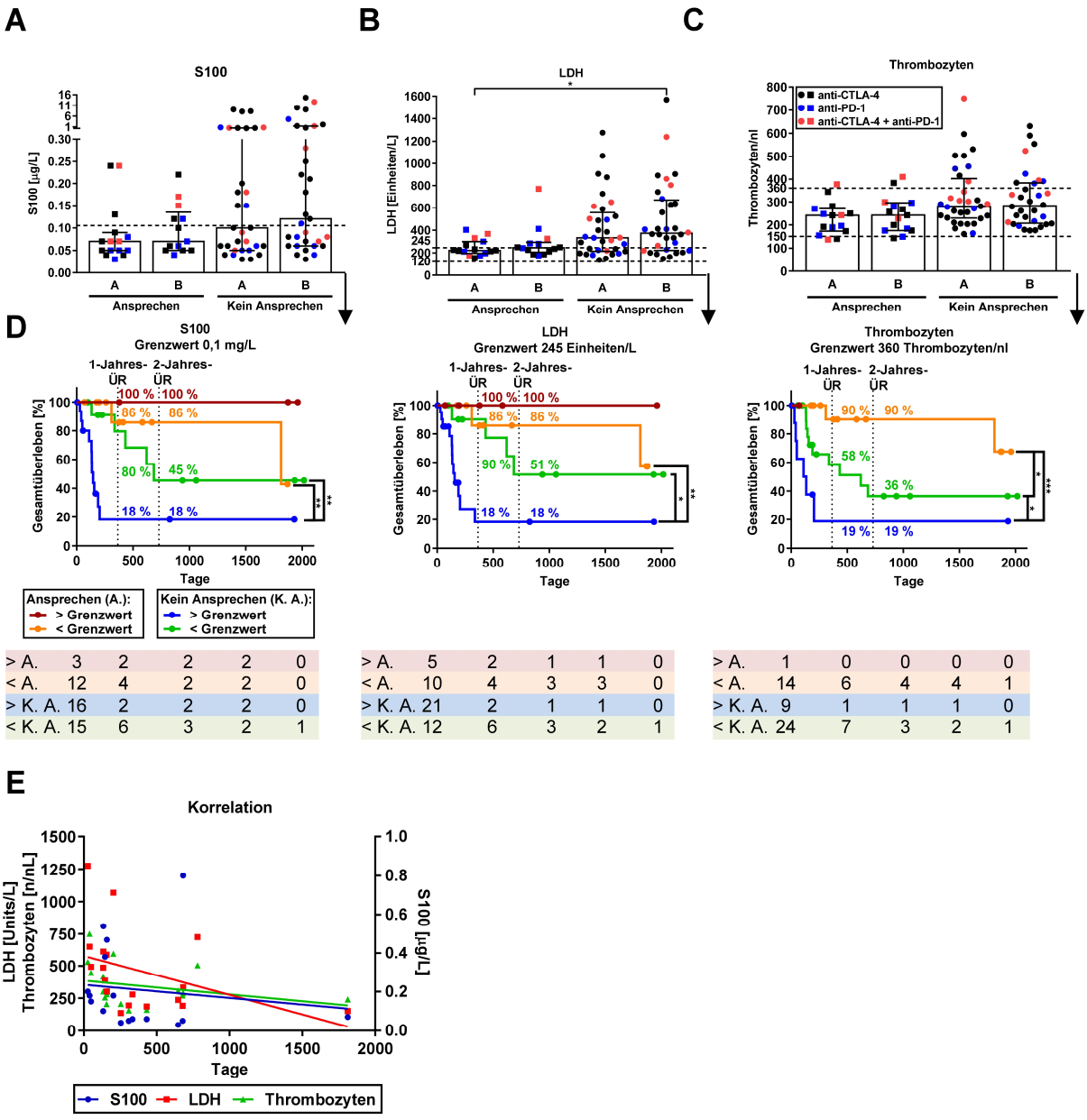
Die S3-Leitlinien des malignen Melanoms empfehlen zur Diagnostik, Prognose und Nachsorge unter anderem die Bestimmung der Biomarker S100B und Lactatdehydrogenase (LDH) im Serum (87,135). Calcium-bindende S100 Proteine (wie z. B. S100A8, S100A9, S100B) können regulierend auf die Differenzierung myeloider Zellen wirken und induzieren über den TLR4/ERK-Signalweg die Zellproliferation (136). Durch Stimulation des RAGE/NFκB-Signalweges kann S100A8 Autophagie induzieren (137). Studien zum malignen Melanom belegen, dass erhöhte S100 und LDH-Werte auf eine schlechte Prognose für den Krankheitsverlauf und ein signifikant kürzeres Gesamtleben hindeuten (138)(139). S100 gilt als verlässlicherer Hinweis für neue Metastasen als LDH (140,141) und als spezifischer Biomarker (S100B) des malignen Melanoms

(142,143). Verschiedene Tumorarten weisen bestimmte S100 Profile auf (136). S100B Werte über 0,1 µg/L im Serum werden als erhöht eingestuft (144); ein weiterer Grenzwert ist 0,3 µg/L S100B (145).
Anders als S100 kommt LDH ubiquitär in den Körperzellen vor und ist neben dem Melanom auch in anderen Tumorarten (wie z. B. Hodenkrebs) hochreguliert (146). In dieser Studie wurde LDH im Serum ab einer Konzentration von 245 Einheiten/L als pathologisch eingestuft. Die physiologische LDH Konzentration im Serum liegt zwischen 120 – 245 Einheiten/L (147).
Da chronische Entzündungen wie z. B. Melanome die Thrombopoiese anregen und Thrombozyten aktivieren (148), wurden in dieser Studie nicht nur S100 und LDH, sondern auch die Thrombozyten-Konzentration als potenzieller molekularer Biomarker im peripheren Blut geprüft. Die S100-, LDH- und Thrombozyten-Konzentrationen wurden im Rahmen der Laborroutine der klinischen Chemie erhoben.

Die Studie zeigte, dass Therapieansprecher vor und nach Therapiebeginn im Median eine geringere S100-Konzentration im Serum aufwiesen als Nicht-Ansprecher (Abb. 23A). Mit einem Serum-S100 von 0,07 µg/L lagen Therapieansprecher vor und nach Therapiebeginn unterhalb des Grenzwertes von 0,1 µg/L und wiesen im Median kein erhöhtes Serum-S100 auf. Dagegen entsprach der Serum-S100 der Nicht-Ansprecher vor Therapiebeginn dem Grenzwert von 0,1 µg/L. Nach Therapiebeginn stieg der Median des Serum-S100 in Nicht-Ansprechern auf 0,12 µg/L an und lag damit über dem Grenzwert. Anhand des Serum-S100 Grenzwertes von 0,1 µg/L wurden in dieser Studie Therapieansprecher mit einer Sensitivität von 80 % und Nicht-Ansprecher mit einer Spezifität von 52 % identifiziert. Ein Serum-S100 < 0,1 µg/L bestätigte ein Therapieansprechen zu 44 % (PPV, positiver prädiktiver Wert). Ein Serum-S100 ≥ 0,1 µg/L bescheinigte zu 84 % ein Nicht-Ansprechen (NPV, negativ prädiktiver Wert).

Entsprechend dem Serum-S100 besaßen Therapieansprecher einen geringeren Serum-LDH als Nicht-Ansprecher, welcher im Median unterhalb des oberen Grenzwertes von 245 Einheiten/L LDH im Serum lag (Abb. 23B). Vor Therapiebeginn besaßen Therapieansprecher im Median einen Serum-LDH von 220 Einheiten/L, während Nicht-Ansprecher einen Serum-LDH von 333 Einheiten/L oberhalb des Grenzwertes von 245 Einheiten/L aufwiesen. Nach Therapiebeginn stieg der Serum-LDH in Therapieansprechern und Nicht-Ansprechern auf im Median 245 bzw. 373 Einheiten/L. In Nicht-Ansprechern war der Serum-LDH nach Therapiebeginn signifikant höher als in Therapieansprechern vor Therapiebeginn (220 Einheiten/L, $p = 0{,}0191$ *). Kein Patient zeigte vor oder nach Therapiebeginn einen Serum-LDH unterhalb des Normbereichs (120 – 245 Einheiten/L). Anhand des Serum-LDH Grenzwertes von 245 Einheiten/L konnten Therapieansprecher mit einer Sensitivität von 67 % und Nicht-Ansprecher mit einer Spezifität

von 64 % erkannt werden. Ein Serum-LDH < 245 Einheiten/L prognostiziert zu 46 % ein Therapieansprechen (PPV). Ein Serum-LDH ≥ 245 Einheiten/L bestätigte Nicht-Ansprecher zu 84 % (NPV).



> A.	3	2	2	2	0
< A.	12	4	2	2	0
> K. A.	16	2	2	2	0
< K. A.	15	6	3	2	1

> A.	5	2	1	1	0
< A.	10	4	3	3	0
> K. A.	21	2	1	1	0
< K. A.	12	6	3	2	1

> A.	1	0	0	0	0
< A.	14	6	4	4	1
> K. A.	9	1	1	1	0
< K. A.	24	7	3	2	1

Abbildung 23 Immunomonitoring der löslichen Biomarker des malignen Melanoms, S100 und LDH, sowie der Thrombozyten-Konzentration im peripheren Blut.

S100, LDH und die Thrombozyten-Konzentration wurden routinemäßig in der klinischen Chemie im peripheren Blut bestimmt. Die horizontalen gestrichelten Linien in den Balkendiagrammen markieren einen Durchschnittswert bzw. schließen den Normbereich des untersuchten Parameters in gesunden, erwachsenen Spendern ein. **A** S100 (n(A.) = 13 – 15, n(K. A.) = 31 – 33; p(K. A.(B) vs. A.(B)) = 0,4921, p(K. A.(B) vs. A.(A)) = 0,0633). **B** LDH (p(K. A.(A) vs. A.(A)) = 0,1337, p(K. A.(B) vs. A.(A)) = 0,0191 *, p(K. A.(B) vs. A.(B)) = 0,2124). **C** Thrombozyten-Konzentration (p(K. A.(A) vs. A.(A)) = 0,06, p(K. A.(A) vs. A.(B)) = 0,2876, p(K. A.(B) vs. A.(A)) = 0,1046, p(K. A.(B) vs. A.(B)) = 0,448). D Überlebenszeitanalyse anhand von S100, LDH und der Thrombozyten-Konzentration. Die Kaplan Meier-Kurven zeigen das Gesamtüberleben der Patienten [%] abhängig vom Therapieerfolg und dem jeweiligen Parameter.

Als Grenzwert wurde der Durchschnittswert bzw. die Obergrenze des Normbereichs verwendet (Log-rank (Mantel-Cox) Test, S100, p(< K. A. vs. > K. A.) = 0,0096 **, p(< A. vs. > K. A.) = 0,001 **; LDH, p(< A. vs. > K. A.) = 0,0027 **, p(< K. A. vs. > K. A.) = 0,0136 *; Thrombozyten, p(< A. vs. > K. A.) = 0,0006 ***, p(< A. vs. < K. A.) = 0,026 *, p(< K. A. vs. > K. A.) = 0,0364 *). E Korrelation des Gesamtüberlebens und der untersuchten Parameter. Die Korrelation schloss nur Patienten (n = 18 (16 K. A., 2 A.)) mit absolutem Gesamtüberleben seit Therapiebeginn (Tag 0 bis Todesdatum) ein. Diese Patienten wurden mit Tumoren im Stadium IV diagnostiziert. Die farbigen Linien zeigen die lineare Regression der Parameter zum Gesamtüberleben (S100 rs = −0,3994; LDH rs = −0,5666; Thrombozyten r = − 0,2777; R^2(Thrombozyten) = 0,07711). Median ± Interquartilsabstand. Kruskal-Wallis Test, p < 0,05 *. A, Zeitpunkt vor Therapiebeginn; A., Ansprechen; B, Zeitpunkt 1 – 3 Wochen nach Therapiebeginn; CTLA-4, zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Protein 4; K. A., Kein Ansprechen; LDH, Lactatdehydrogenase; PD-1, programmiertes Zelltodprotein 1; r, Pearson Korrelationskoeffizient; rs, Spearman Rangkorrelationskoeffizient; S100, S100-Protein.

Therapieansprecher wiesen geringere Thrombozyten-Konzentrationen im Blut als Nicht-Ansprecher auf (Abb. 23C). Die physiologische Thrombozyten-Konzentrationen im peripheren Blut liegen in Erwachsenen zwischen 150 – 360 Thrombozyten/nl (149). Mit 241 bzw. 242 Thrombozyten/nl vor und nach Therapiebeginn wiesen Therapieansprecher im Median Thrombozyten-Konzentrationen unterhalb der Obergrenze des Normbereichs von 360 Thrombozyten/nl auf. Im Vergleich dazu wurden in Nicht-Ansprechern vor und nach Therapiebeginn höhere Thrombozyten-Konzentrationen von im Median 281 bzw. 284 Thrombozyten/nl gemessen. Anhand der Obergrenze des Normbereichs von 360 Thrombozyten/nl wurden Therapieansprecher mit einer Sensitivität von 93 % und Nicht-Ansprecher mit einer Spezifität von 27 % erkannt. Da nur 9 der 48 untersuchten Patienten vor Therapiebeginn eine Thrombozyten-Konzentration ≥ 360 Thrombozyten/nl maßen, wurde der Median der Nicht-Ansprecher vor Therapiebeginn (281 Thrombozyten/nl) als zusätzlicher Grenzwert untersucht. Anhand der Thrombozyten-Konzentration mit einem Grenzwert von 281 Thrombozyten/nl konnte die vorliegende Studie Therapieansprecher mit einer Sensitivität von 80 % und Nicht-Ansprecher mit einer Spezifität von 52 % identifizieren. Eine Thrombozyten-Konzentration < 281 Thrombozyten/nl sagte ein Therapieansprechen zu 42 % (PPV) richtig vorher. Eine Thrombozyten-Konzentration ≥ 281 Thrombozyten/nl bestätigte zu 85 % ein Nicht-Ansprechen (NPV).

Um den Effekt der gemessenen Biomarker auf das Gesamtüberleben zu untersuchen, wurde anhand der Grenzwerte eine Überlebenszeitanalyse durchgeführt (Abb. 23D). Nicht-Ansprecher, in denen vor Therapiebeginn eine S100-, LDH- und Thrombozyten-Konzentration oberhalb der genannten Grenzwerte gemessen wurde, zeigten ein signifikant geringeres Gesamtüberleben als Nicht-Ansprecher unterhalb der Grenzwerte. In Therapieansprechern beeinflusste der Serum-S100 und –LDH das Gesamtüberleben nicht. Über die Thrombozyten-Konzentration konnte diesbezüglich keine Aussage gemacht werden, da nur ein Therapieansprecher vor Therapiebeginn eine Konzentration ≥ 360 Thrombozyten/nl maß.

Der Verlauf der Kaplan-Meier Kurven in Nicht-Ansprechern wurde anhand der Grenzwerte der molekularen Biomarker LDH und S100 sowie der Thrombozyten-Konzentration früher getrennt als durch die vorher untersuchten zellulären Biomarker. In Bezug auf S100 wiesen Nicht-Ansprecher mit Serum-S100 < 0,1 µg/L vor Therapiebeginn eine 4-fach höhere 1-Jahresüberlebensrate auf als Nicht-Ansprecher ≥ 0,1 µg/L.

Anhand von Korrelationskoeffizienten untersuchte die Studie, ob die Konzentration von S100, LDH und den Thrombozyten im Serum vor Therapiebeginn mit dem Gesamtüberleben der Patienten korrelierten (Abb.23E). Dazu wurden die Daten von 16 – 18 Patienten untersucht, deren Gesamtüberleben nach Therapiebeginn (Tag 0) durch ein Todesdatum definiert war. Der Parameter Therapieansprechen wurde nicht in die Analyse einbezogen. Für nicht normalverteilte Daten wie den Serum-S100 und Serum-LDH wurde der Spearman Rangkorrelationskoeffizient (rs) berechnet, während für normalverteilte Daten wie z. B. die Thrombozyten-Konzentration der Pearson-Korrelationskoeffizient (r) berechnet wurde.
Die negativen Korrelationskoeffizienten implizieren, dass das Gesamtüberleben der Patienten mit sinkendem Serum-S100 (rs = −0,3994), Serum-LDH (rs = −0,5666) und sinkender Thrombozyten-Konzentration (r = −0,2777) zunahm. Aufgrund der Normalverteilung der Thrombozytenkonzentration wurde zur Beurteilung des Pearson-Korrelationskoeffizienten r zusätzlich das Bestimmtheitsmaß, r^2, berechnet (r^2 = 0,077). Dieser besagte, dass 7,7 % der Varianz des Gesamtüberlebens bzw. der Thrombozyten-Konzentration mit einer Schwankung in der Thrombozyten-Konzentration bzw. dem Gesamtüberleben zu erklären sind. Das niedrige Bestimmtheitsmaß r^2 sowie die lineare Regression demonstrierten, dass die Thrombozyten-Konzentration vor Therapiebeginn keine Aussage über das Gesamtüberleben der Patienten ermöglichte.
Die Berechnung der p-Werte ergab, dass der Serum-LDH signifikant mit dem Gesamtüberleben korrelierte (p = 0,0142 *, 95 % CI −0,822 bis −0,1208). Die p-Werte der Korrelation des Serum-S100 und der Thrombozyten-Konzentrationen mit dem Gesamtüberleben waren nicht signifikant. Jedoch schlossen die 95 % Konfidenz-Intervalle der Korrelationskoeffizienten des Serum-S100 (rs, 95 % CI −0,7542 bis 0,135) und der Thrombozyten-Konzentration (r, 95 % CI −0659 bis 0,135) Korrelationskoeffizienten ein, die eine biologische Relevanz beider Parameter für das Gesamtüberleben in einer größeren Stichprobe nahelegen.

Die Studie ergab, dass Therapieansprecher vor Therapiebeginn im Median geringere Serumwerte der Biomarker S100 und LDH sowie eine niedrigere Thrombozyten-Konzentration im Blut als Nicht-Ansprecher besaßen. Nicht-Ansprechern mit S100, LDH und der Thrombozyten-Konzentration oberhalb des Normbereiches lebten signifikant kürzer als Nicht-

Ansprecher mit diesen Parametern im Normbereich. Der Serum-LDH korrelierte mit dem Gesamtüberleben.

3.1.3.2. Analyse molekularer Biomarker im peripheren Blut von Patienten unter Ipilimumab Monotherapie

Molekulare Biomarker wie LDH und S100 besitzen den Vorteil, dass sie schnell, routinemäßig in der klinischen Chemie und ohne Eingriffe im Blut bestimmt werden können (139). In der Checkpoint-Inhibitor Therapie mangelt es bisher an prädiktiven, spezifischen Biomarkern, die ein Ansprechen auf die Therapie vorhersagen. Die Identifikation potenzieller Biomarker ist umso wichtiger, da nur ein Teil der Patienten auf die Checkpoint-Inhibitor Therapien anspricht, die Therapien starke Nebenwirkungen induzieren können und sehr kostspielig sind. Um mögliche Kandidaten potenzieller prädiktiver Biomarker in dieser Studie zu untersuchen, wurde in einem Trainingsset das Proteom der Plasmaproben von 12 Ipilimumab Patienten (4 Therapieansprecher (2 aus MZ, 2 aus FFM), 8 Nicht-Ansprecher (4 aus MZ, 4 aus FFM)) zum Zeitpunkt vor Therapiebeginn und nach Therapiebeginn via nanoUPLC UDMS^E analysiert und verglichen. Die nanoUPLC UDMS^E sowie die statistische Auswertung wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Stefan Tenzer durchgeführt. Die Validierung der Biomarker-Kandidaten via ELISA erfolgte selbstständig.

Insgesamt wurden 634 verschiedene Proteine in der Fraktion geringfügig vorkommender, nicht immun-reaktiver Proteine des Plasmas gefunden (LAP, low abundant proteins). Die Analyse identifizierte sowohl einmalig gemessene Proteine als auch Proteine mit einer Häufigkeit von 10^5 je Probe. Die Häufigkeit der Proteine in den Proben wurde anhand einer Korrelationsmatrix miteinander korreliert (Anhang 1).

Insgesamt zeigte die Zusammensetzung des Proteoms der Frankfurter Kohorte geringere interindividuelle Unterschiede als die der Mainzer Kohorte. So wurden in der Frankfurter Kohorte (Korrelationskoeffizient r = 0,75 – 1) geringere interindividuelle Unterschiede zwischen den Nicht-Ansprechern ermittelt als in der Mainzer Kohorte (r = 0,34 – 1). Innerhalb der Therapieansprecher wurden für beide Kohorten geringere Unterschiede berechnet (r(A., FFM) = 0,77 – 1; r(A., MZ) = 0,87 – 1).

Die Messungen waren reproduzierbar (Anhang 2). Um die Reproduzierbarkeit der Daten zu gewährleisten, wurde jede Probe dreimal aufgereinigt und jede Aufreinigung wiederum als Triplikat analysiert. Die sich daraus ergebenden neun Messungen wurden anhand einer Korrelationsmatrix auf ihre Reproduzierbarkeit hin untersucht. Exemplarisch ergab sich für den

Vergleich der Aufreinigungen an Zeitpunkt A eines Mainzer Patienten ein Korrelationskoeffizient von r = 0,96 – 0,99. Die Triplikate einer Aufreinigung zeigten ein r = 0,98 – 1.

Tabelle 26 Unterschiede ausgewählter Proteine im Plasma der Therapieansprecher (A.) und Nicht-Ansprecher (N. A.) der Mainzer und Frankfurter Studienkohorten anhand der p-Werte.

Eine Proteomanalyse via nanoUPLC UDMS^{E} identifizierte und quantifizierte die Proteine im Plasma von 12 Ipilimumab Patienten (Trainingset). Um lösliche prädiktive Biomarker zu identifizieren, wurde das Proteom der Therapieansprecher (A.) und der Nicht-Ansprecher (N. A.) verglichen. Die Tabelle zählt 13 potentielle prädiktive Biomarker auf, deren (i) Konzentration sich in Therapieansprechern signifikant zu der Nicht-Ansprechern unterschied oder (ii) die bereits in Zusammenhang mit Tumorerkrankungen stehen. Die Signifikanz wurde anhand eines zweiseitigen homoskedastischer T-Test ermittelt und in der Tabelle als p-Wert der jeweiligen Proteine in der Mainzer Kohorte (MZ), der Frankfurter Kohorte (FFM) und in der gesamten Studienpopulation angegeben. Nachträglich via ELISA validierte Proteine wurden in fetter Schrift hervorgehoben. A., Ansprechen; FFM, Frankfurt; HDL, Lipoprotein mit hoher Dichte (engl. high density lipoprotein); K. A., Kein Ansprechen; LDL, Lipoprotein niederer Dichte (engl. Low density lipoprotein); MZ, Mainz; nanoUPLC, nanoflow Ultra-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. nanoflow ultra-performance liquid chromatography); ns, nicht signifikant; UDMS^{E}, engl. ultra-definition tandem mass spectrometry (E); VLDL, Lipoprotein sehr niederer Dichte (engl. very low density lipoprotein).

Protein (engl.)	**Gen**	**Funktion**	**MZ (A. vs. K. A.)**	**FFM (A. vs. K. A.)**	**MZ & FFM (A. vs. K. A.)**
Cadherin-1	CDH1	Calcium-abhängige Zelladhäsionsprotein	2,0787E-13	0,00022	0,00022
Keratin, type II cytoskeletal 3	KRT3	Zytoskeletales, mikrofibrillares Keratin II (neutral bis basisch)	7,4292E-10	n. s.	n. s.
Scavenger receptor cysteine-rich type 1	CD163	Akute Phase regulierter Rezeptor	2,0994E-08	0,00244	0,00244
Apolipoprotein C-II	APOC2	Komponent von Chylomikronen, VLDL, HDL und LDL	1,176E-07	n. s.	n. s.
Pantetheinase	VNN1	Amidohydrolase, spaltet Panthothensäure	6,8103E-06	0,00194	0,00194
Secreted phosphoprotein 24	SPP24	Knochenumbau (Endopeptidase Inhibitor Aktivität)	4,4436E-05	n. s.	n. s.
Aminopeptidase N	ANPEP	Aminopeptidase zur Verdauung von Peptiden	0,00071	n. s.	n. s.
CD5 antigen-like	CD5L	Schlüsselregulator der Lipidsynthese	0,00098	0,05384 (n. s.)	n. s.
Pigment epithelium-derived factor	**SERPINF1/ PEDF**	**Neurotrophisches Protein, Inhibitor der Angiogenese**	**0,00542**	**0,00108**	**0,00542**
Complement factor H-related protein 3	CFHR3	Regulierung des Komplementsystems	0,09368 (n. s.)	0,05541 (n. s.)	n. s.
Complement factor H-related protein 1	CFHR1	Regulierung des Komplementsystems	0,51192 (n. s.)	0,00088	n. s.
Serum amyloid A-2 protein	SAA2	Apolipoprotein des HDL Komplex, akute Phase Reaktionspartner	0,63232 (n. s.)	0,06162 (n. s.)	n. s.
Afamin	**AFM**	**Vitamin E-Transporter**	**0,01099**	**0,31064 (n. s.)**	**n. s.**

Das Proteom wurde auf signifikante Differenzen zwischen den Therapieansprechern und Nicht-Ansprechern innerhalb der Kohorten (Mainz, Frankfurt) und in der gesamten Studienpopulation untersucht (Tabelle 26). Aufgrund eines signifikant unterschiedlichen Vorkommens in Therapieansprechern und Nicht-Ansprechern sowie ihrer Relevanz in Tumorerkrankungen, wurden die Ergebnisse der Proteine PEDF (Pigment epithelium-derived factor) und Afamin via Sandwich ELISA validiert (150,151,160,152–159).

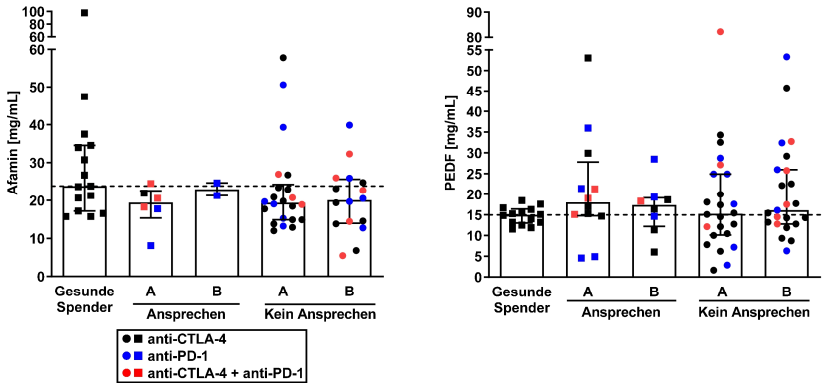


Abbildung 24 Immunomonitoring der Proteine Afamin und PEDF im Plasma.

Die Konzentration der Proteine Afamin und PEDF wurden anhand kommerziell erhältlicher Sandwich ELISA im Plasma von gesunden Spendern und Melanompatienten gemessen (n(GS) = 14 – 15, n(A.) = 2 – 12, n(K. A.) = 16 – 24), Afamin, p(K. A.(A) vs. GS) = 0,5771, p(K. A.(B) vs. GS) = 0,6053). Median ± Interquartilsabstand. Kruskal-Wallis Test, p < 0,05 *. A, Zeitpunkt vor Therapiebeginn; A., Ansprechen; B, Zeitpunkt 1 – 3 Wochen nach Therapiebeginn; CTLA-4, zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Protein 4; ELISA, enzymatisches Immunadsorptionsverfahren; GS, gesunde Spender; K. A., Kein Ansprechen; PD-1, programmiertes Zelltodprotein 1; PEDF, Pigment-Epithel-Faktor.

Dem Protein PEDF werden anti-angiogene und anti-kanzerogene Eigenschaften zugeschrieben (161,162). Die signifikanten Unterschiede zwischen Therapieansprechern und Nichtansprechern konnten im PEDF ELISA nicht bestätigt werden (Abb. 24). Im ELISA war die PEDF-Konzentration im Plasma der Therapieansprecher (18 mg/ml) im Median höher als in Nicht-Ansprechern (15 mg/ml) und gesunden Spendern (15 mg/ml). Der Therapiebeginn hatte weder in Therapieansprechern noch in Nicht-Ansprechern einen Effekt auf die PEDF-Konzentration.
Afamin ist ein Vitamin E-bindendes Protein aus der Familie der Albumine und wurde als Biomarker im Ovarialzellkarzinom untersucht (163,164). Therapieansprecher (19 mg/ml) und Nicht-Ansprecher (19 mg/ml) vor Therapiebeginn besaßen vergleichbare Afamin-Konzentrationen im Plasma, während gesunde Spender (24 mg/ml) niedrigere Afamin-Konzentrationen aufwiesen.

In dieser Studie wurden anhand einer Proteomanalyse eines Trainingssets aus 12 Ipilimumab-Patienten 13 potenzielle prädiktive Biomarker zur Identifikation der Therapieansprecher unter Ipilimumab Monotherapie ermittelt. Die Validierung via ELISA lehnte die Proteine Afamin und PEDF als Biomarker ab. Die 11 weiteren Proteine sind in Folgestudien zu untersuchen.

3.2. Untersuchungen zum Einfluss von BRAF und MEK-Inhibitoren auf dendritische Zellen (DC) *in vitro*

In Melanompatienten führen Monotherapien mit BRAF- und MEK-Inhibitoren durch Mutationen im BRAF/MEK/ERK-Signalweg nach circa 6 Monaten zu erworbenen Resistenzen (165)(166). Unter einer BRAF-/MEK-Inhibitor Kombinationstherapie traten Resistenzen seltener auf (48,167).

3.2.1. BRAF-Inhibitoren induzieren die Expression von CD80 und CD86 auf reifen DC stärker als der MEK-Inhibitor Trametinib

BRAF- und MEK-Inhibitoren hemmen den BRAF/MEK/ERK-Signalweg nicht nur in schnell proliferierenden Zellen, sondern auch in Immunzellen wie z. B. dendritischen Zellen (DC) (168,169). DC sind professionelle Antigen-präsentierende Zellen. Reife DC aktivieren und stimulieren T-Zellen zur Proliferation, indem reife DC (anders als unreife DC) spezifische Tumorantigene mittels MHC-II:Peptid-Komplexen mit einer langen Halbwertszeit präsentieren. Zudem exprimieren reife DC verstärkt CD80 und CD86, die Liganden des ko-stimulierenden Rezeptors CD28 auf T-Zellen.

Im folgenden Experiment wurde untersucht, welchen Effekt BRAF- und MEK- Inhibitoren auf die Ausreifung der DC *in vitro* besitzen. Dazu wurden humane unreife DC *in vitro* mit einem Cocktail aus proinflammatorischen Zytokinen und in Anwesenheit von 1 µM Dabrafenib, Vemurafenib oder Trametinib ausgereift und kultiviert. Gleichzeitig wurden die DC mit BRAF- bzw. MEK-Inhibitor versetzt. Es wurden die BRAF-Inhibitoren Dabrafenib und Vemurafenib und der MEK-Inhibitor Trametinib verwendet. Als Referenzwert diente eine äquivalente Dosis des Lösungsmittels der Inhibitoren, 0,1 % Dimethylsulfoxid (DMSO). Nach 48 Stunden wurden die Zellen geerntet und durchflusszytometrisch auf die Expression der CD28-Liganden CD80 und CD86 untersucht. Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI (Mittelwert)) wurde auf den Referenzwert DMSO normalisiert.

Unbehandelte und Vemurafenib-behandelte reife DC exprimierten CD80 signifikant stärker als mit DMSO-behandelte reife DC (Abb. 25 (170), p (ø) = 0,0071 **, p (VEM) = 0,0383 *). Dabrafenib- und Trametinib-behandelte reife DC wiesen eine vergleichbare CD80 Expression wie DMSO-behandelte reife DC auf.

Unbehandelte sowie Vemurafenib-behandelte reife DC exprimierten CD86 stärker als DMSO-behandelte reife DC, während die CD86 Expression der Dabrafenib-behandelte DC CD86 vergleichbar mit der von DMSO-behandelten reifen DC war. Gemessen am DMSO Referenzwert halbierte der MEK-Inhibitor Trametinib die CD86 Expression auf reifen DC. Der Unterschied der

CD86 Expression der Vemurafenib- und Trametinib-behandelten reifen DC war signifikant (p = 0,0051 **).

Die Analyse zeigte, dass der BRAF-Inhibitor Vemurafenib die Expression von CD80 und CD86 auf reifen DC erhöhte und so einen reiferen DC Phänotyp induzierte, während Dabrafenib dies nicht tat. Der MEK-Inhibitor Trametinib senkte die CD86 Expression auf reifen DC.

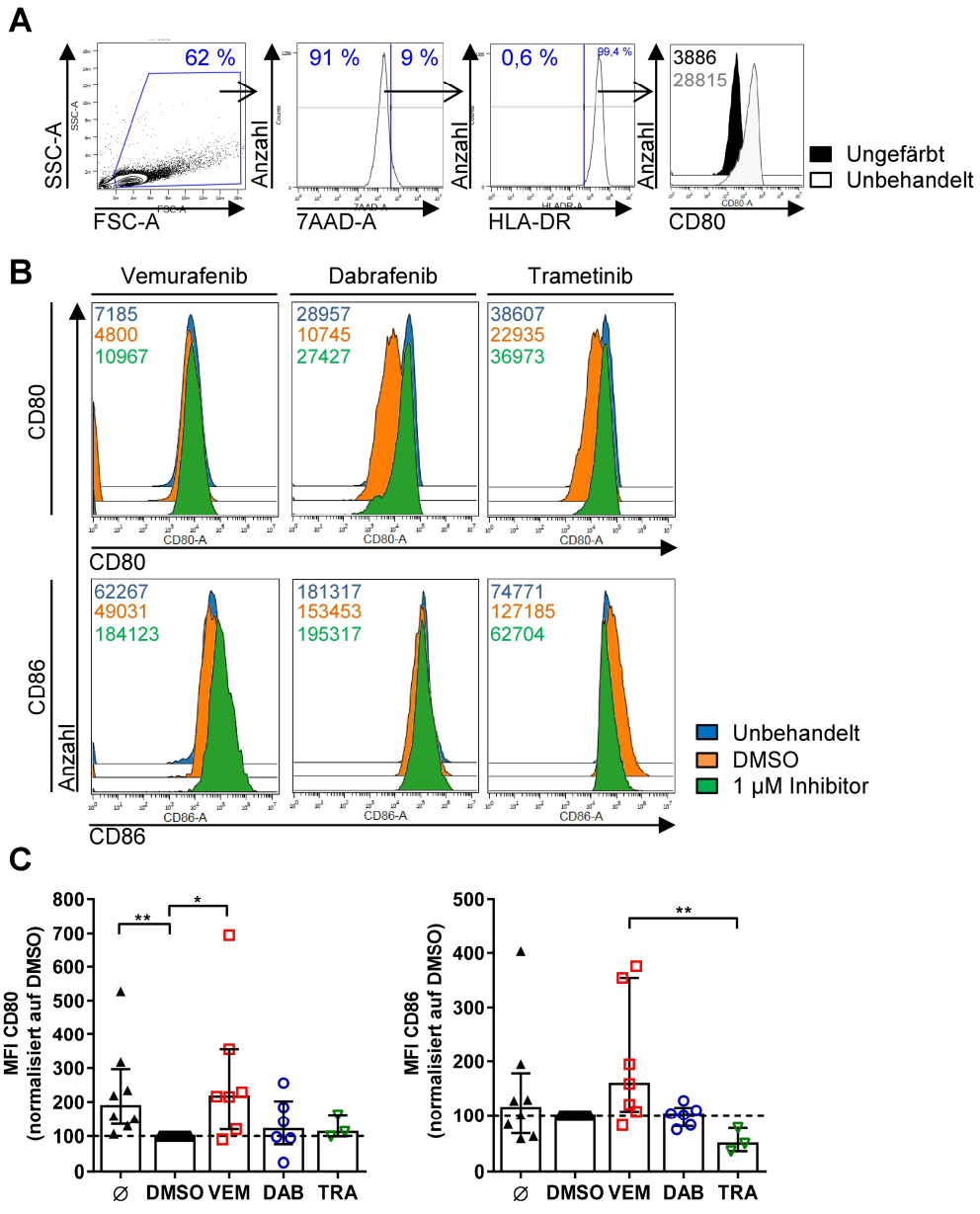


Abbildung 25 Effekt der BRAF-Inhibitoren Vemurafenib und Dabrafenib und des MEK-Inhibitors Trametinib auf die Ausreifung dendritischer Zellen *in vitro*.

Aus dem Blut gesunder Spender wurden humane mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) gewonnen. Die Monozyten wurden mit Hilfe von Plastikadhärenz isoliert und mit IL-4 und GM-CSF inkubiert um die Bildung dendritischer Zellen (DC) zu induzieren. Zur Ausreifung der DC wurde an Tag 6 ein Zytokincocktail aus IL-1β, IL-4, IL-6, GM-CSF, PGE2 und TNF-α gegeben. Zusätzlich wurde die Kultur mit 1 µM BRAF/MEK-Inhibitor (Vemurafenib, Dabrafenib, Trametinib) supplementiert. An Tag 8 wurden die reifen DC geerntet und analysiert. **A** Exemplarische durchflusszytometrische Eingrenzung reifer DC. Tote Zellen wurden von der Analyse ausgeschlossen. **B** Exemplarische durchflusszytometrische Histogramme zur CD80 und CD86 Expression auf reifen DC. Das Histogramm zeigt die Population lebender HLA-DR$^+$ Zellen. Die Zahlen geben den Mittelwert der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) der HLA-DR$^+$ Zellen an. **C** CD80$^+$ und CD86$^+$ Expression auf reifen DC . Der Mittelwert der MFI wurde auf das Lösungsmittel der Inhibitoren, DMSO, normalisiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte (Ø) und mit DMSO behandelte reife DC. Die gestrichelte Linie markiert die DMSO Kontrolle (n(ø) = 8, n(DMSO) = 14, n(VEM) = 7, n(DAB) = 6, n(TRA) = 3; CD80, p = 0,0032 **, p(VEM vs. DMSO) = 0,0383 *, p(DMSO vs. Ø) = 0,0071 **; CD86, p = 0,0078 **, p(TRA vs. VEM) = 0,0051 **, p(TRA vs. Ø) = 0,1006, p(VEM vs. DMSO) = 0,1268). Median ± Interquartilsabstand. Kruskal-Wallis Test, p < 0,05 *, p < 0,01 **. Ø, unbehandelt; BRAF, B-Raf Protoonkogen; DAB, Dabrafenib; DC, dendritische Zellen; DMSO, Dimethylsulfoxid; GM-CSF, Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor; HLA-DR, humanes Leukozytenantigen DR Isotyp; IL, Interleukin; MEK, Mitogen-aktivierte Proteinkinase; MFI, mittlere Fluoreszenzintensität; PBMC, mononukleäre Zellen des peripherin Blutes (engl. peripheral blood mononuclear cells); PGE2, Prostaglandin E2; TNF-α, Tumornekrosefaktor alpha; TRA, Trametinib; VEM, Vemurafenib.

3.2.2. Einfluss der BRAF-Inhibitoren Vemurafenib und Dabrafenib auf die Viabilität, Apoptose und Nekrose dendritischer Zellen

Hohe Dosen der BRAF- und MEK-Inhibitoren besitzen einen zytotoxischen Effekt und induzieren die Apoptose in Melanomzellen (171,172). In der frühen Phase der Apoptose wird das Phospholipid Phosphatidylserin (PS), welches in gesunden Zellen auf der inneren Seite der Plasmamembran lokalisiert ist, an die extrazelluläre Seite der Plasmamembran transferiert. Die Translokation des PS lockt Fresszellen (Makrophagen) an, welche die PS-exprimierenden Zellen phagozytieren. Apoptotische Zellen können durch Färbung mit Annexin V, welches hochaffin an PS bindet, erkannt werden. Anders als in nekrotischen Zellen ist die Plasmamembran in der frühen Apoptose intakt. Spät apoptotische und nekrotische Zellen besitzen dagegen eine permeable, nicht intakte Plasmamembran und werden durch den Viabilitätsfarbstoff 7-AAD gefärbt. Anhand der Färbung der Zellen mit 7-AAD und Annexin V wurde hier durchflusszytometrisch zwischen lebenden (PS-7$^-$AAD$^-$), früh apoptotischen (PS$^+$7-AAD$^-$) und spät apoptotischen, nekrotischen (PS$^+$7-AAD$^+$) Zellen unterschieden.

Um den zytotoxischen Effekt der BRAF-Inhibitoren Vemurafenib und Dabrafenib auf DC zu untersuchen, wurden DC mit 1 µM BRAF-Inhibitor ausgereift bzw. inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 26 (170)). Als Kontrolle diente eine äquivalente Dosis des Lösungsmittels der Inhibitoren DMSO. Unreife DC (uDC) wurden nach 48 Stunden, reife DC (rDC) nach 72 Stunden untersucht.

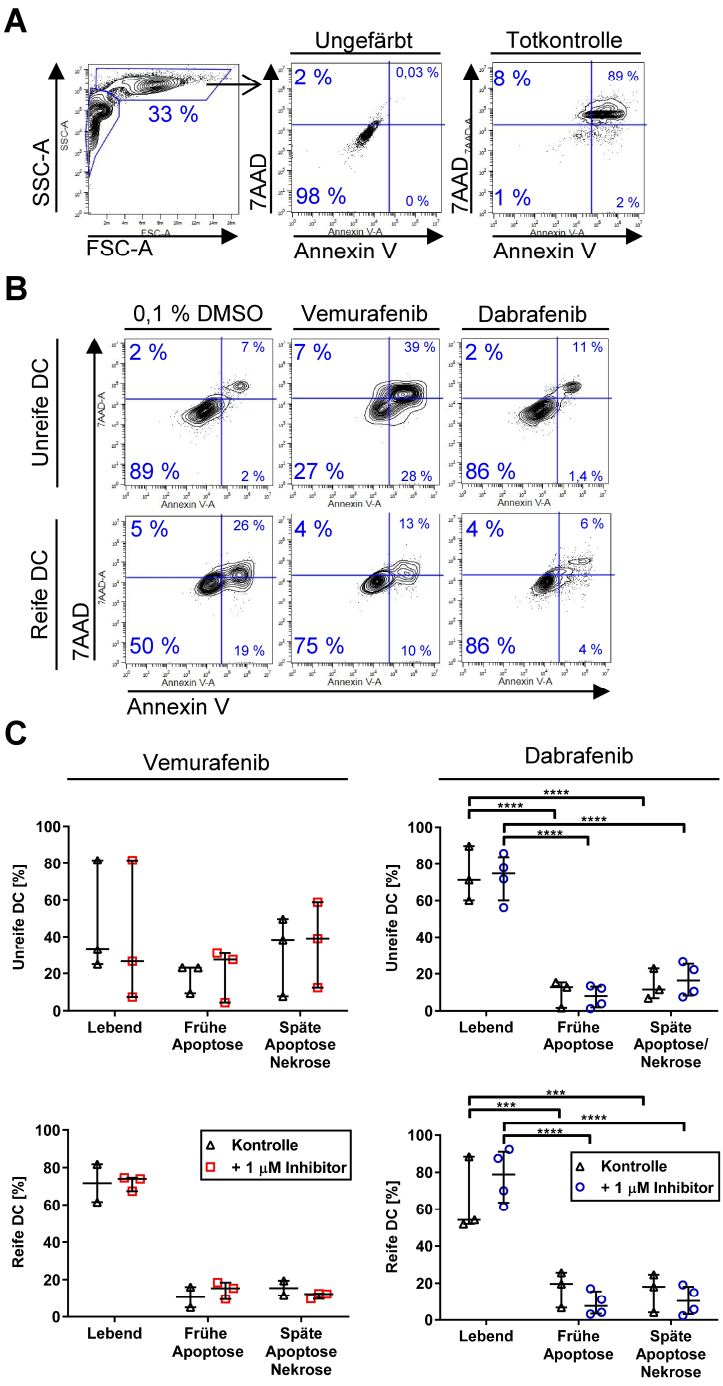


Abbildung 26 Effekt der BRAF-Inhibitoren Vemurafenib und Dabrafenib auf die Viabilität dendritischer Zellen in vitro.

Die DC wurden wie in Abb. 25 beschrieben kultiviert. An Tag 6 wurden alle DC mit 1 µM BRAF-Inhibitor (Vemurafenib, Dabrafenib) versetzt. An Tag 8 wurden die unreifen DC geerntet und analysiert. Das Medium der reifen DC wurde gewechselt (Medium ohne Zytokine) und mit 1 µM BRAF-Inhibitor versetzt. An Tag 9 wurden die reifen DC geerntet. Die Analyse der Viabilität erfolgte durchflusszytometrisch durch die Färbung mit dem Lebend-Tod-Farbstoff 7-AAD und dem Apoptosemarker Annexin V. Es wurden lebende Zellen (7-AAD$^-$Annexin V$^-$), Zellen in der frühen Apoptose (7-AAD$^-$, Annexin V$^+$) und Zellen in der späten Apoptose/Nekrose (7-AAD$^+$Annexin V$^+$) unterschieden. Als Kontrolle wurde das Lösungsmittel der BRAF-Inhibitoren, DMSO, verwendet. **A** Durchflusszytometrische Eingrenzung lebender, apoptotischer und nekrotischer Zellen. Zelldebri wurden von der Analyse ausgeschlossen. Das Konturdiagramm zeigt eine ungefärbte Kontrolle und die Totkontrolle. **B** Exemplarische durchflusszytometrische Konturdiagramme zur Viabilität, Apoptose und Nekrose. **C** Viabilität, Apoptose und Nekrose unreifer und reifer DC unter BRAF-Inhibitoren (n(VEM) = 3, n(DAB) = 4; reife DC Kontrolle, p(Lebend vs. frühe Apoptose) = 0,0005 ***, p(Lebend vs. späte Apoptose) = 0,0007 ***). Median ± Interquartilsabstand. Zweiseitiger ANOVA-Test, Multipler t-test (Holm-Sidak Methode), p < 0,05 *, p < 0,0001 ****. 7-AAD, Lebend-Tot-Farbstoff 7-Amino-Actinomycin; Annexin V, Apoptosemarker; BRAF, B-Raf Protoonkogen; DC, dendritische Zelle; DMSO, Dimethylsulfoxid; FSC, Vorwärtsstreulicht; SSC, Seitwärtsstreulicht.

Für Vemurafenib-behandelte uDC wurde eine geringfügig niedrigere Viabilität (27 %) und ein höherer Anteil von uDC in der frühen Apoptose (28 %) gemessen als in DMSO-behandelten uDC (Abb. 26 (170)). Hier ist anzumerken, dass die Messergebnisse der uDC eine hohe Streuung abbildeten. In Vemurafenib-behandelten rDC stieg der Anteil der lebenden (74 %) und früh apoptotischen uDC (15 %) schwach an, während der Anteil spät apoptotischer/nekrotischer uDC (12 %) sank.

Dabrafenib-behandelte uDC wiesen einen höheren Anteil lebender (75 %) und spät apoptotischer/nekrotischer uDC (16 %) sowie einen geringeren Anteil von uDC in der frühen Apoptose (8 %) auf als DMSO-behandelten uDC. In rDC stieg aufgrund der Dabrafenib Behandlung der Anteil der lebenden rDC (79 %) an, während der Anteil der früh apoptotischen (8 %) und spät apoptotischen/nekrotischen rDC (10 %) sank. Der Anteil lebender uDC und rDC war unabhängig von der Behandlung (DMSO, Dabrafenib) signifikant höher als der Anteil früh apoptotischer und nekrotischer uDC und rDC.

Das Experiment zeigte, dass die BRAF-Inhibitoren Vemurafenib und Dabrafenib keinen signifikanten Effekt auf die Viabilität, Apoptose und Nekrose unreifer und reifer DC im Vergleich zur DMSO Kontrolle vermittelten. Dabrafenib erhöhte tendenziell die Viabilität und senkte den Anteil früh apoptotischer uDC und rDC, während Vemurafenib den Anteil früh apoptotischer uDC und rDC tendenziell erhöhte.

3.2.3. Die BRAF-Inhibitoren Vemurafenib und Dabrafenib erhöhen initial die metabolische Aktivität unreifer DC

Aufgrund der starken Proliferation besitzen Tumorzellen einen erhöhten Energiebedarf. Anders als in gesunden Zellen wird der Energiebedarf nicht durch verstärkte oxidative Phosphorylierung gedeckt, sondern durch eine verstärkte Glykolyse (173). Diese Umstellung des Metabolismus der Tumorzellen, der auch in aktivierten Immunzellen beobachtet werden kann, wird nach ihrem Entdecker „Warburg Effekt“ genannt (71). Infolge einer BRAF Mutation wird die oxidative Phosphorylierung in Mitochondrien angeregt, so dass der Citratzyklus verstärkt mit Pyruvat versorgt wird (174). Neben dem Citratzyklus, der die Tumorzelle in der Bildung von Makromolekülen unterstützt, versorgen die Mitochondrien die Zelle mit NADPH, welches zur *de novo* Fettsäuresynthese verwendet wird. In Tumorzellen wurde beobachtet, dass BRAF-Inhibitoren die oxidative Phosphorylierung durch Förderung der Bildung von Mitochondrien wieder ankurbeln und damit zu einer erhöhten Stresstoleranz und besseren Versorgung des Tumors führen können (175). In ruhenden DC erfolgt die Energiegewinnung durch oxidative Phosphorylierung.

Um zu untersuchen, welchen Effekt die BRAF-Inhibitoren Vemurafenib und Dabrafenib auf den Metabolismus der unreifen DC (uDC) haben, wurde die metabolische Aktivität der Mitochondrien in uDC anhand der Umsetzung von NADPH mittels eines MTT Assays nach 24 und 48 Stunden kolorimetrisch gemessen. Die Messdaten wurden auf die mit Medium supplementierte Kontrolle normalisiert.

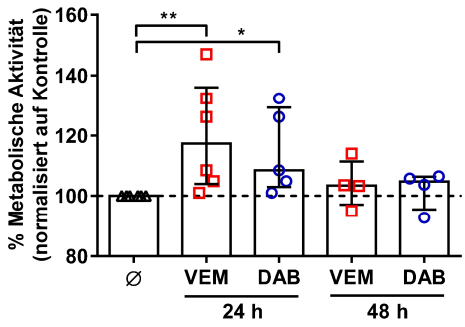


Abbildung 27 Effekt der BRAF-Inhibitoren Vemurafenib und Dabrafenib auf die metabolische Aktivität unreifer dendritischer Zellen *in vitro*.

Die DC wurden wie in Abb. 25 beschrieben kultiviert. Die Kultur der unreifen DC wurde an Tag 6 mit 1 µM BRAF-Inhibitor (Vemurafenib, Dabrafenib) supplementiert. Die Kontrolle wurde mit Medium supplementiert (Ø). Nach 24 und 48 Stunden wurden die Zellen geerntet. Anhand der Umsetzung von MTT wurde die metabolische Aktivität der Zellen kolorimetrisch analysiert. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 570 nm und der Referenzwellenlänge 650 nm gemessen. Jeder Wert wurde in Triplikaten bestimmt. Als Blindwert (engl. blank) diente Medium ohne Zellen. Der Graph zeigt die Messwerte normalisiert auf die Medium-Kontrolle (n(Ø) = 6, n(VEM) = 4 - 6, n(DAB) = 4 - 5; p(Ø vs. VEM) = 0,0051 **; p(Ø vs. DAB) = 0,0219 *). Die gestrichelte Linie markiert die Medium-Kontrolle. Median ± Interquartilsabstand. Kruskal-Wallis Test, $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **. Ø, Medium-Kontrolle, BRAF, B-Raf Protoonkogen; DAB, Dabrafenib; DC, dendritische Zelle; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid; VEM, Vemurafenib.

Im Vergleich zur Medium Kontrolle stieg in Vemurafenib- und Dabrafenib-behandelten uDC die metabolische Aktivität der Zellen nach 24 Stunden signifikant an (Abb. 27 (170); p(VEM) = 0,0313 *, p(DAB) = 0,0219 *). Dieser Effekt war in Vemurafenib-behandelten uDC (117 %) stärker als in Dabrafenib-behandelten uDC (108 %).
Nach 48 Stunden wiesen mit Vemurafenib- (103 %) und Dabrafenib-behandelte uDC (105 %) eine vergleichbare metabolische Aktivität auf, die nur geringfügig höher war als die der Medium Kontrolle.

Anhand der Umsetzung von NADPH im MTT Assay zeigte das Experiment, dass BRAF-Inhibitoren, insbesondere Vemurafenib, nach 24 Stunden die metabolischen Aktivität (oxidative Phosphorylierung der Mitochondrien) in unreifen DC steigern.

3.2.4. Vemurafenib induziert die Produktion von IL-1β, IL-12p70 und TNF-α in reifen DC

Proinflammatorische Zytokine nehmen eine ambivalente Rolle ein, indem sie die Immunantwort in der akuten Entzündung unterstützen, im Tumor jedoch eine chronische Entzündung und dadurch ein inhibitorisches Tumormikromilieu aufrechterhalten. Unsere Daten zeigten, dass die BRAF-Inhibitoren Vemurafenib und Dabrafenib die metabolische Aktivität unreifer DC signifikant steigerten. Um zu untersuchen, welchen Effekt BRAF- und MEK-Inhibitoren auf die Zytokinexpression der DC besitzen, wurden DC 48 Stunden in Anwesenheit von BRAF/MEK-

Inhibitoren ausgereift. Die Zytokine wurden 24 Stunden nach Zytokin-Wash out und erneuter Zugabe von BRAF/MEK-Inhibitoren mittels Cytometric Bead Array (CBA) durchflusszytometrisch analysiert (IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, IL12p70, TNF-α) (Abb.28A (170)).

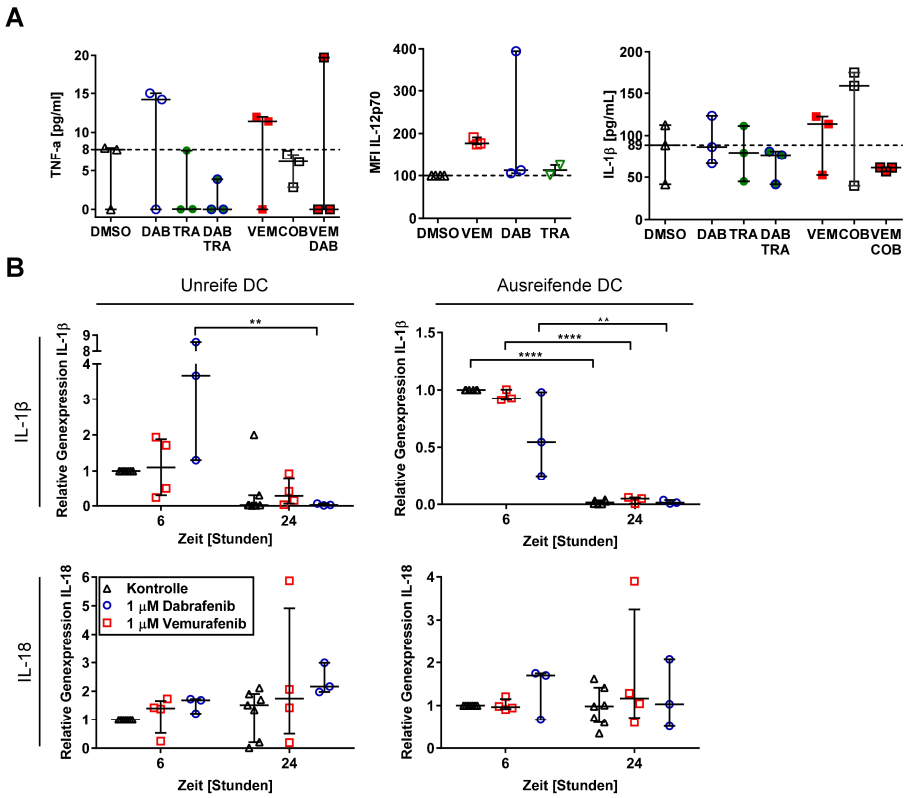


Abbildung 28 Effekt der BRAF- und MEK-Inhibitoren auf die TNF-α, IL-12p70, IL-1β und IL-18 Zytokinproduktion in dendritischen Zellen *in vitro*.

Die DC wurden entsprechend Abb. 25 kultiviert. An Tag 6 wurden die DC mit 1 µM BRAF-Inhibitor (Vemurafenib, Dabrafenib) bzw. 0,001 µM MEK-Inhibitor (Cobimetinib, Trametinib) supplementiert. Zur Ausreifung erhielten die DC zusätzlich einen Zytokincoktail. **A** Direkte Analyse der Zytokine TNF-α, IL-12p70 und IL-1β in reifen DC via BD Cytometric Bead Array (CBA). An Tag 8 wurden die rDC in frisches Medium (+ Inhibitoren) auf eine neue Platte umgesetzt, um die Zytokine des Reifungscocktails aus dem Überstand zu entfernen. Nach 24 Stunden wurde der Überstand abgenommen. Die Konzentration der Zytokine im Überstand wurde via CBA durchflusszytometrisch bestimmt. Als Kontrolle wurde das Lösungsmittel der Inhibitoren, DMSO, verwendet. Die IL-12p70 Expression wurde auf die DMSO Kontrolle normalisiert. Die gestrichelte Linie gibt den Median in Anwesenheit von DMSO an (n(DMSO) = 3 – 4, n(DAB) = 3, n(TRA) = 2 – 3, n(DAB + TRA) = 3, n(VEM) = 3, n(COB) = 3, n(VEM + COB) = 3). **B** Indirekte Analyse der Zytokine IL-1β und IL-18 in DC via RT-qPCR. An Tag 6 wurden die unreifen DC und DC mit Zytokincocktail (ausreifende DC) 6 und 12 Stunden nach Ansetzen der Kultur geerntet und in Lysepuffer bei −20 °C bis zur Analyse weggefroren. Als Kontrolle wurde die DC Kultur mit Medium supplementiert. Die relative Genexpression der Zytokine IL-1β und IL-18 wurde auf die Kontrolle nach 6 Stunden normalisiert. B2M wurde als Haushaltsgen verwendet (n(Kontrolle) = 6 – 7, n(DAB) = 3, n(VEM) = 3 – 4; Unreife DC IL-1β, p(DAB 6 h vs DAB 24 h) = 0,0033 **; ausreifende DC IL-1β, p(Kontrolle 6 h vs. Kontrolle 24 h) < 0,0001 ****, p(DAB 6 h vs. DAB 24 h) = 0,0014 **, p(VEM 6 h vs. VEM 24 h) < 0,0001****). Median ± Interquartilsabstand. Zweiseitiger ANOVA, Multipler t-test (Holm-Sidak Methode), p < 0,05 *, p < 0,01 **, p < 0,001 ***, p < 0,0001 ****. B2M, beta-2-Mikroglobulin; BRAF, B-Raf Protoonkogen; CBA, Zytokin-Bead-Messverfahren (engl. Cytometric Bead Array); COB, Cobimetinib; DAB, Dabrafenib; DC, dendritische Zelle; DMSO, Dimethylsulfoxid; IL, Interleukin; MEK, Mitogen-aktivierte Proteinkinase; RT-qPCR, Reverse Transkription-quantitative Polymerasekettenreaktion; TNF-α, Tumornekrosefaktor-α; TRA, Trametinib; VEM, Vemurafenib.

Der CBA des Kulturüberstandes der rDC ergab, dass Vemurafenib, Dabrafenib und Trametinib keinen signifikanten Einfluss auf die Konzentration von IL-6, IL-8 und IL-10 ausübten (Daten nicht gezeigt).

TNF-α ist ein endogenes Pyrogen und unterstützt die systemische Entzündung. Im Tumor ist TNF-α dereguliert und fördert die Bildung eines inhibitorischen Tumormikromilieus.

Die BRAF-Inhibitoren Vemurafenib und Dabrafenib erhöhten TNF-α um 46 % und 82 % im Vergleich zur DMSO Kontrolle im Kulturüberstand behandelter rDC (Abb. 28A (170)), während die MEK-Inhibitoren Trametinib und Cobimetinib TNF-α reduzierten. Cobimetinib senkte TNF-α um 21 % verglichen mit der DMSO Kontrolle, während Trametinib-behandelte rDC kein TNF-α mehr produzierten. Reife DC, die mit gleichzeitig mit BRAF- und MEK-Inhibitoren (VEM + COB, DAB + TRA) behandelt wurden, produzierten ebenfalls kein TNF-α.

Das proinflammatorische Zytokin IL-12p70 initiiert und unterstützt die T-Zellimmunantwort. Verglichen mit der DMSO Kontrolle stieg IL-12p70 im rDC Kulturüberstand unter Vemurafenib um 77 % an. Unter Dabrafenib und Trametinib erhöhte sich IL-12p70 dagegen nur um 12 %.

Ein wichtiger Mediator der Entzündung ist IL-1β. Als Bestandteil des Zytokincocktails zur DC Ausreifung differenziert IL-1β uDC zu rDC aus und induziert die Produktion der DC-Reifungszytokine IL-6 und PGE_2.

Die Anwesenheit von Dabrafenib (−3 %) und Trametinib (−10 %) reduzierte den IL-1β Gehalt im Kulturüberstand der rDC verglichen mit der DMSO Kontrolle. Die Kombination des BRAF-Inhibitors Dabrafenib und des MEK-Inhibitors Trametinib hatte einen synergistischen Effekt und reduzierte die IL-1β Konzentration um 14 %. Dagegen steigerte der BRAF-Inhibitor Vemurafenib die IL-1β Produktion in rDC im Vergleich zur DMSO Kontrolle um 28 %. Unter dem MEK-Inhibitor Cobimetinib stieg IL-1β im Median um 79 % von 89 pg/ml auf 159 pg/ml. Im Kontrast dazu senkte die Kombination Vemurafenib + Cobimetinib IL-1β (61 pg/ml) im Kulturüberstand auf 69 % der DMSO Kontrolle (89 pg/ml).

Um den Effekt der BRAF-Inhibitoren auf Zytokine der IL-1 Superfamilie genauer zu untersuchen, wurde die mRNA der Zytokine IL-1β und IL-18 mittels RT-qPCR in uDC und rDC analysiert (Abb. 28B). Dafür wurden uDC 6 und 24 Stunden mit 1 µM BRAF-Inhibitor inkubiert. DC wurden in Anwesenheit des Reifungscocktails 6 und 24 Stunden ausgereift, geerntet und lysiert.

Dabrafenib reduzierte die relativen Genexpression von IL-1β in ausreifenden DC nach 6 Stunden um die Hälfte im Vergleich zur Medium Kontrolle (Abb. 28B (170)), während Dabrafenib die relativen IL-1β Genexpression in uDC nach 6 Stunden induzierte um ein 4-faches induzierte. Die Reduktion der IL-1β mRNA war in der CBA nicht zu beobachten. Die relative IL-1β Genexpression war nach 24 Stunden in der Medium Kontrolle, den Dabrafenib- und Vemurafenib-behandelten uDC und ausreifenden DC kaum noch messbar (uDC, p (DAB 6 h vs.

DAB 24 h) = 0,0033 **; ausreifende DC, p (DAB 6 h vs. DAB 24 h) = 0,0014 **).
Die relative Genexpression von IL-18 stieg in Anwesenheit der BRAF-Inhibitoren Vemurafenib und Dabrafenib in uDC nach 6 und 24 Stunden an. In Dabrafenib-behandelten ausreifenden DC stieg die relative Genexpression von IL-18 nach 6 Stunden an. Nach 24 Stunden war die relative IL-18 Genexpression in Dabrafenib- und Vemurafenib-behandelten ausreifenden DC vergleichbar mit der Medium Kontrolle.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Vemurafenib-behandelte reife DC höhere Konzentrationen der proinflammatorischen Zytokine TNF-α, IL-12p70 und IL-1β im Kulturüberstand aufwiesen als DMSO-behandelte reife DC, während Dabrafenib-behandelte reife DC primär TNF-α erhöhten. Dagegen war die relative Genexpression von IL-1β in Vemurafenib- und Dabrafenib-behandelten ausreifenden DC geringer. Jedoch induzierten Vemurafenib und insbesondere Dabrafenib die relative Genexpression von IL-1β und IL-18 in unreifen DC. In ausreifenden DC induzierte Dabrafenib die relative Genexpression von IL-18.

3.2.5. BRAF-Inhibitoren induzieren eine Caspase-1 Aktivität im Inflammasom

Freigesetzte proinflammatorische Zytokine unterstützen im Tumor die Aufrechterhaltung der chronischen Entzündung. Sterbende Zellen setzen bei Verlust der Membranintegrität den Zellinhalt samt Zytokinen unkontrolliert frei (176). In gesunden Zellen wird die unkontrollierte Freisetzung der Zytokine durch den antiinflammatorischen Mechanismus der Apoptose oder Autophagie verhindert. Via RT-qPCR konnte gezeigt werden, dass die BRAF-Inhibitoren Vemurafenib und (insbesondere) Dabrafenib nach 6 Stunden Inkubation die relative Genexpression der Zytokine IL-1β und IL-18 in uDC induzierten. Pro-IL-1β und -IL-18 werden durch Caspase-1 Aktivität (Interleukin-Konvertierendes Enzym, ICE) in ihre aktive Form umgewandelt. Caspase-1 Aktivität ist ein indirektes Maß für die Aktivität des Inflammasoms und kann einen programmierten, lytischen Zelltod via Pyroptose einleiten, welcher Zytokine unkontrolliert freisetzt (177).
Um zu untersuchen, ob die BRAF-Inhibitor-vermittelte Induktion von IL-1β und IL-18 in DC mit einer Caspase-1 Induktion einhergeht, wurde die Aktivität der Caspase-1 nach 6 Stunden Inkubation mit BRAF-Inhibitoren in uDC und ausreifenden DC (mit Zytokincocktail zur DC Ausreifung) mittels eines FLICA 660 Caspase-1 Assays durchflusszytometrisch gemessen.

Entsprechend der erhöhten relativen Genexpression der Zytokine IL-1β und IL-18 nach 6 Stunden in Vemurafenib- und Dabrafenib-behandelten uDC, stieg die Caspase-1 Aktivität in Vemurafenib- und Dabrafenib-behandelten uDC und rDC im Vergleich zur DMSO Kontrolle an (Abb. 29 (170)). Unreife DC exprimierten aktivierte Caspase-1 stärker als ausreifende DC.

Unreife DC zeigten in Anwesenheit von Vemurafenib eine 33 % stärkere und in Anwesenheit von Dabrafenib eine 96 % stärkere Caspase-1 Aktivität als die DMSO Kontrolle. Die Caspase-1 Aktivität stieg in ausreifenden Vemurafenib-behandelten DC um 25 % und in Dabrafenib-behandelten DC um 32 %. Dieses Ergebnis unterstützt die Beobachtung, dass Dabrafenib die relative Genexpression von IL-1β und IL-18 in uDC stärker induzierte als in ausreifenden DC.

Die Daten zeigten, dass die BRAF-Inhibitoren Vemurafenib und Dabrafenib die Caspase-1 Aktivität und indirekt die Aktivität des Inflammasoms in unreifen DC und ausreifenden DC induzierten.

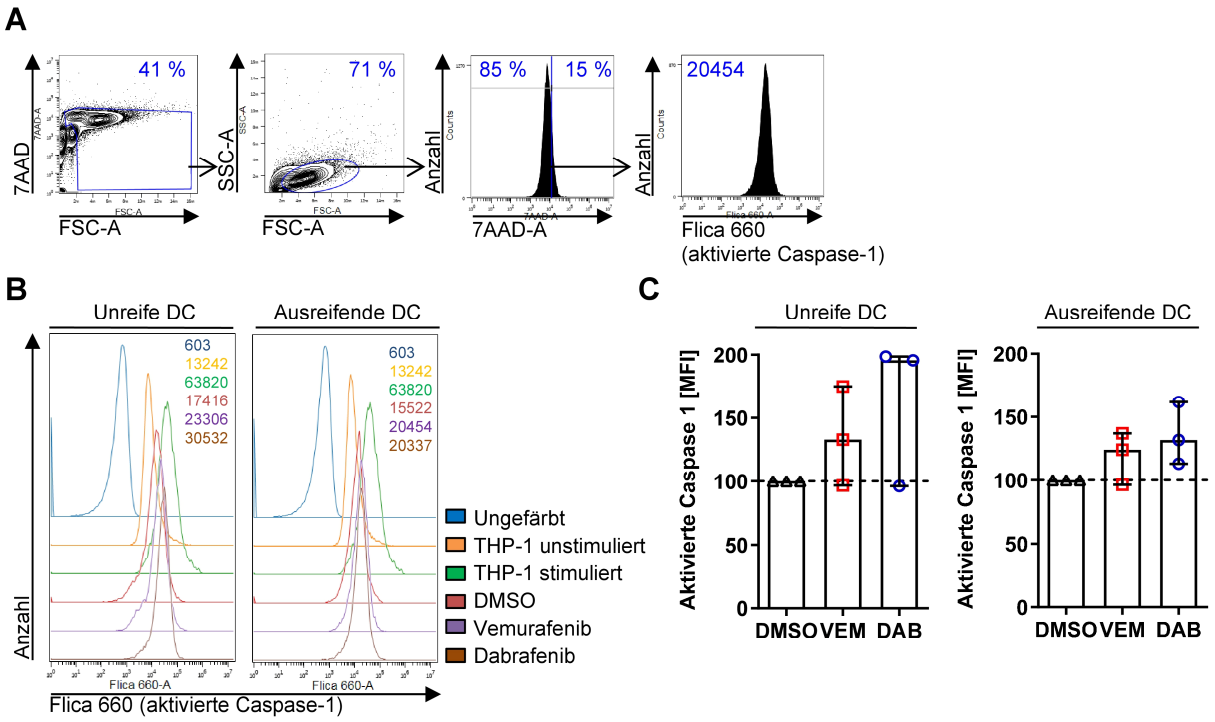


Abbildung 29 Effekt der BRAF-Inhibitoren Vemurafenib und Dabrafenib auf die Caspase-1 Aktivität in dendritischen Zellen *in vitro*.

Die DC wurden entsprechend Abb. 25 kultiviert. An Tag 6 wurden die DC nach 6 Stunden geerntet. Die Caspase-1 Aktivität wurde anhand des FLICA® 660 Caspase-1 Assay Kit (ImmunoChemistry) durchflusszytometrisch gemessen. Aktivierte Caspase-1 wurde an eine hellrote fluoreszierenden Caspase-1 Inhibitor Detektionssonde (FLICA 660) gebunden. **A** Exemplarische durchflusszytometrische Eingrenzung der Caspase-1$^+$ DC. **B** Exemplarische Histogramme der Caspase-1 Expression in DC. Als Negativkontrollen dienten ungefärbte DC und unstimulierte THP-1 Zellen (humane monozytäre Zelllinie). Mit 5 ng/ml PMA stimulierte THP-1 dienten als Positivkontrolle. **C** Aktivierte Caspase-1 in DC. Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) der aktivierten Caspase-1 in DC. Als Kontrolle wurden die DC mit dem Lösungsmittel der Inhibitoren, DMSO, supplementiert. Die Daten wurden auf die DMSO Kontrolle normalisiert (n(DMSO/VEM/DAB) = 3; reife DC, p(DMSO vs. DAB) = 0,2065). Median ± Interquartilsabstand. Kurskal-Wallis Test. BRAF, B-Raf Protoonkogen; DAB, Dabrafenib; DC, dendritische Zelle; DMSO, Dimethylsulfoxid; FLICA, Fluoreszenz-markierte Inhibitoren der Caspase-1; PMA, Phorbol-12-myristat-13-acetat; THP-1, monozytäre Zelllinie aus Patienten mit akuter monozytischer Leukämie; VEM, Vemurafenib.

3.3. Immunomonitoring in der Autoimmunität – Psoriasis *ex vivo*

Psoriasis ist eine chronisch entzündliche Autoimmunerkrankung der Haut, Gelenke und Nägel. Im Kontrast zum malignen Melanom liegt in Psoriasis-Patienten eine T-Zellhyperaktivität vor. Wie bereits beschrieben spielen immunsuppressive Immunzellen wie Treg und MDSC eine zentrale Rolle in der Regulation der inflammatorischen Immunantwort. Patienten mit Psoriasis weisen im peripheren Blut einen erhöhte prozentualen Anteil der Treg an den PBMC auf, welche mit dem Schweregrad der Erkrankung korrelieren (178). Im Gegensatz zu gesunden Spendern sind Treg aus Psoriasis-Patienten weniger aktiviert und zeigen eine geringere immunsuppressive Aktivität (179). Aktuelle Forschungen wiesen vergleichbare Ergebnisse für $CD15^{-}CD14^{-}HLA\text{-}DR^{low}CD33^{hi}$ immunsuppressive M-MDSC auf (180). Die Rolle der immunsuppressiven E-MDSC Subpopulation in der Psoriasis ist weniger erforscht. Um zu untersuchen, welchen Effekt die topische und systemische Therapie der Psoriasis auf regulatorische Immunzellen wie Treg und MDSC hat, wurde der Prozentsatz der MDSC und Treg an lebenden PBMC sowie der funktionelle Phänotyp der Treg in Zusammenhang mit dem Schweregrad der Psoriasis analysiert.

Tabelle 27 Patientencharakteristika der Psoriasis Studie.
Die Angaben zum Alter und Geschlecht der gesunden Studienteilnehmer waren unvollständig. n, Anzahl; n. a., nicht angegeben; PASI, Psoriasis Schweregrad (engl. Psoriasis Area and Severity Index).

Patienten-charakteristika	**n (Gesunde Spender)**	**n (Patienten)**	**n (Topische Therapie)**	**n (Systemische Therapie)**	**PASI**
Patienten	23	111	31	80	
Alter [Median in Jahren (Min-Max)]	32 (24-52)	51 (18-82)	48 (19-82)	52 (18-82)	
Geschlecht					
Männer	5	74	22	52	
Frauen	10	37	9	28	
Psoriasis					
Psoriasis vulgaris		85	26	59	0 - 45,8
Psoriasis arthritis		16	3	13	0 - 30,2
PASI < 10		76	7	69	
PASI 10 - 20		14	12	2	
PASI > 20		11	10	1	
Psoriasis pustulosa		7	1	6	n. a.
Nagelpsoriasis		3	1	2	n. a.

Dazu wurden 111 an Psoriasis erkrankte Patienten sowie als Kontrollgruppe 23 gesunde Spender rekrutiert (Tabelle 27). Gesunde Spender waren im Mittel 32 Jahre (24 – 52 Jahre, Min-Max Bereich), Patienten unter topischer Therapie 48 Jahre (19 – 82 Jahre) und unter systemischer Therapie 52 Jahre (18 – 82 Jahre) alt. Die Angaben zum Alter und Geschlecht der gesunden Spender waren unvollständig. 85 Patienten litten an Psoriasis vulgaris.
In dieser Studie litten 77 % der Patienten an vulgaris, 14 % an Psoriasis-Arthritis (PsA), 6 % an Psoriasis pustulosa und 3 % an einer Nagelpsoriasis.
69 % der Psoriasis vulgaris, 81 % der PsA Patienten, 86 % der Psoriasis pustulosa und 33 % der Patienten mit einer Nagelpsoriasis erhielten eine systemische Therapie. Alle anderen Patienten erhielten eine topische Therapie. Mit einem Anteil von 72 % (80/111 Patienten) wurde die systemische Therapie im Vergleich zur topischen Therapie mehr als dreimal so häufig verordnet. Der Schweregrad der Psoriasis wurde anhand des „Psoriasis Area and Severity Index“ (PASI) bestimmt und reicht von 0 bis 72 (82). In dieser Studie erreichten Patienten mit Psoriasis vulgaris einen PASI von 0 bis 45,8. Der PASI von Patienten mit PsA reichte von 0 bis 30,2. Zum PASI unter Psoriasis pustulosa und Nagelpsoriasis lagen keine Angaben vor.
24 % der Patienten mit Psoriasis vulgaris und PsA wiesen unter topischer Therapie einen milden Erkrankungsgrad auf (PASI < 10), 41 % einen moderaten (PASI 10 – 20) und 35 % einen schweren Erkrankungsgrad (PASI >20). Dagegen waren Patienten unter systemischer Therapie zu 96 % mit einem mildem Erkrankungsgrad (PASI < 10) belastet. Nur in 1 % bzw. 3 % der Patienten unter systemischer Therapie wurde ein PASI > 20 bzw. PASI 10 – 20 ermittelt.

3.3.1. Die systemische Therapie erhöht den Prozentsatz HLA-DR$^+$ und aktivierter GARP$^+$ regulatorischer T-Zellen

In der Psoriasis liegt ein Ungleichgewicht zwischen immunreaktiven T-Effektorzellen (Teff) und regulatorischen T-Zellen (Treg) zu Gunsten der Teff vor. Die Mehrzahl der Psoriasis-Therapien behandelt die Symptome und blockiert die Freisetzung der Effektorzytokine durch Teff. Treg supprimieren Teff unter anderem durch Treg Effektorzytokine wie z. B. TGFβ1. Die latente Form des TGFβ1 wird auf aktivierten Treg durch den Rezeptor GARP exprimiert (121,122). Zudem weisen HLA-DR$^+$ Treg eine hohe suppressive Kapazität auf, da HLA-DR durch einen Zellkontakt-abhängigen Mechanismus den Treg Transkriptionsfaktor Foxp3 hochreguliert (14).
Um den Effekt einer topischen und systemischen Therapie auf Treg im peripheren Blut von Psoriasis-Patienten zu analysieren, wurde der Prozentsatz der CD4$^+$CD25$^+$CD127$^-$Foxp3$^+$ Treg an CD4$^+$ T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt (Abb. 30 (181)). Die funktionellen Eigenschaften der Treg wurden anhand der Prozentsätze der HLA-DR$^+$ und GARP$^+$ Treg ermittelt.

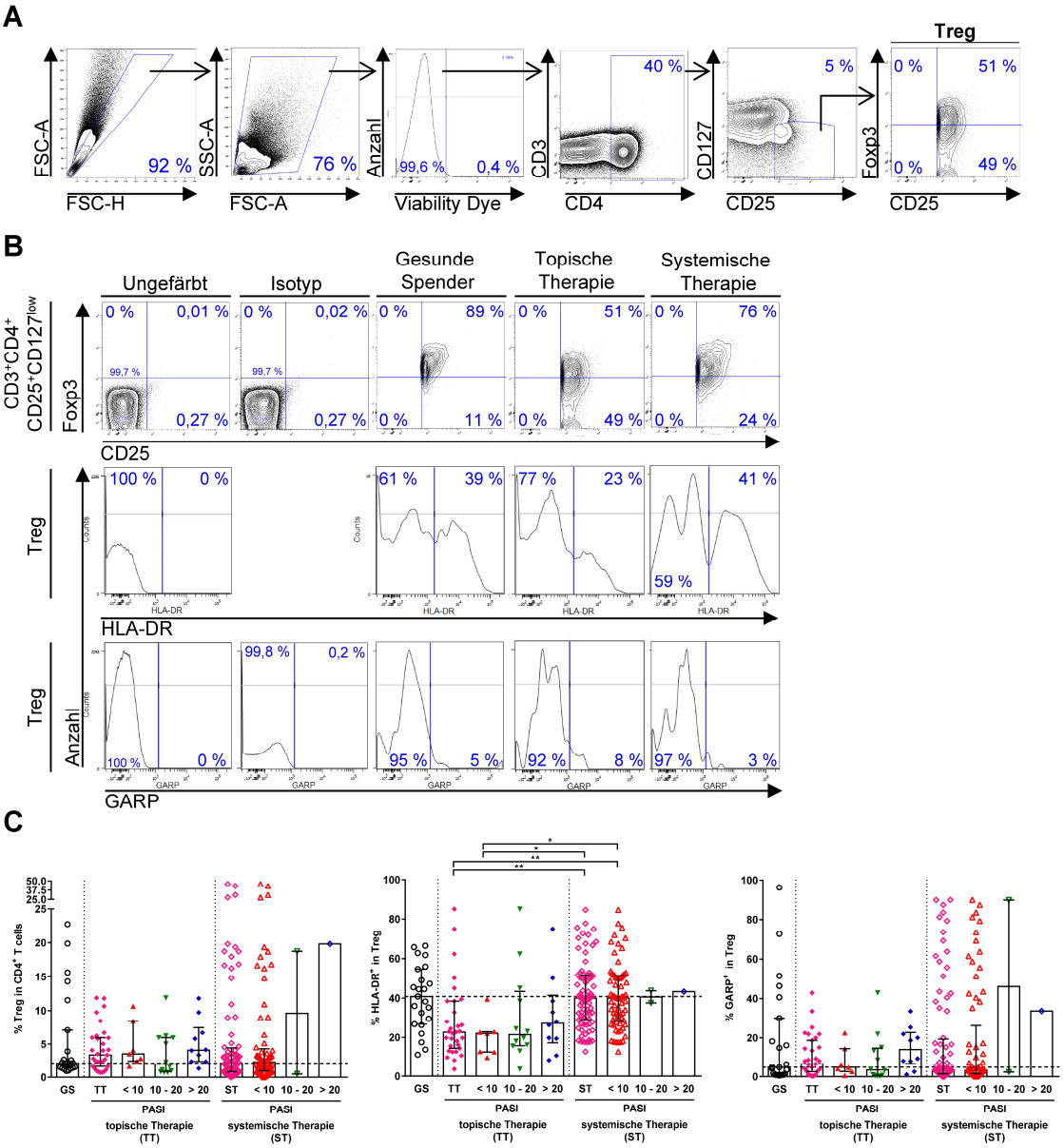


Abbildung 30 Prozentsatz und Phänotyp der regulatorischen T Zellen (Treg) im peripheren Blut von Psoriasis-Patienten in Abhängigkeit vom Schweregrad der Psoriasis und der Therapie.

Die Patienten wurden innerhalb des Therapieschemas (TT/ST) in Untergruppen gemäß des Schweregrades der Psoriasis (PASI) unterteilt. Die suppressive Aktivität der Treg wurde anhand der HLA-DR Expression bestimmt; die Aktivität der Treg wurde anhand des Treg Aktivierungsmarker GARP gemessen. **A** Exemplarische durchflusszytometrische Eingrenzung der Treg. Das Beispiel zeigt einen Patienten unter topischer Therapie. Treg wurden als $CD3^+CD4^+CD127^-CD25^+Foxp3^+$ Zellen definiert. **B** Exemplarische durchflusszytometrische Diagramme der Treg, $HLA\text{-}DR^+$ und $GARP^+$ Treg. Die Konturdiagramme zeigen die Population der $CD3^+CD4^+CD25^+CD127^{low}$ zur Eingrenzung der Treg. Die Histogramme zeigen die Treg-Population. Der Isotyp zeigt die FSC/SSC-Population gefärbt mit dem IgG1-Isotypen für CD25 bzw. GARP. Als Kontrolle dienten gesunde Spender. **C** Prozentsätze der Treg sowie $HLA\text{-}DR^+$ und $GARP^+$ Treg. Die gestrichelte Linie gibt den Median der gesunden Spender an. (n-Zahlen siehe Tabelle 6; $HLA\text{-}DR^+$ Treg, p(GS vs. TT) = 0,0907, p(TT vs. ST) = 0,0012 **, p(TT vs. ST, < 10) = 0,0022 **, p(TT, < 10 vs. ST) = 0,039 *, p(TT, < 10 vs. ST < 10) = 0,0461 *). Median ± Interquartilsabstand. Kruskal-Wallis Test, $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **. Foxp3, forkhead box P3; GARP, engl. glycoprotein A repetitions predominant; GS, gesunder Spender; HLA-DR, humanes Leukozytenantigen-DR Isotyp; PASI, engl. Psoriasis Area and Severity Index; ST, systemische Therapie; Treg, regulatorische T Zellen; TT, topische Therapie.

Im Vergleich zu gesunden Spendern (2,1 %) wurden für Psoriasis-Patienten unter topischer Therapie (TT, 3,3 %) im Median höhere Treg Prozentsätze ermittelt, während Psoriasis-Patienten unter systemischer Therapie (ST, 2,1 %) Treg Prozentsätze vergleichbar mit denen in gesunden Spendern (2,1 %) aufwiesen (Abb. 30 (181)).

Die Analyse der funktionellen Eigenschaften der Treg ergab, dass gesunde Spender (40,8 %) und Psoriasis-Patienten unter systemischer Therapie (40 %) nicht nur vergleichbare Prozentsätze an Treg, sondern auch vergleichbare Prozentsätze HLA-DR$^+$ Treg besaßen. In Psoriasis-Patienten unter topischer Therapie wurden deutlich geringere Prozentsätze HLA-DR$^+$ Treg gemessen (22,6 %) als in gesunden Spendern (40,8 %). Die Prozentsätze der HLA-DR$^+$ Treg in Psoriasis-Patienten unter systemischer und topischer Therapie unterschieden sich signifikant ($p = 0,0012$ **).

Psoriasis-Patienten unter systemischer Therapie (3,2 %) wiesen im Median geringere Prozentsätze GARP$^+$ Treg auf als gesunde Spender (4,7 %), während Psoriasis-Patienten unter topischer Therapie (6,4 %) höhere Prozentsätze GARP$^+$ Treg verglichen mit gesunden Spendern besaßen.

Bezogen auf den PASI ergab die vorliegende Studie, dass Psoriasis-Patienten unter topischer Therapie mit einem schweren Erkrankungsgrad (PASI > 20) im Median höhere Prozentsätze an Treg, HLA-DR$^+$ Treg und GARP$^+$ Treg aufzeigten als solche mit einem milden (PASI < 10) und moderaten (PASI 10 – 20) Erkrankungsgrad. In Psoriasis-Patienten unter topischer Therapie mit einem moderaten Erkrankungsgrad (PASI 10 – 20) wurden im Median geringere Prozentsätze an Treg, HLA-DR$^+$ Treg und GARP$^+$ Treg ermittelt als in Patienten mit einem milden Erkrankungsgrad (PASI < 10).

Derweil trat in 96 % der Psoriasis-Patienten unter systemischer Therapie ein milder Erkrankungsgrad (PASI < 10) auf. Aufgrund geringer Fallzahlen konnte eine Analyse der Prozentsätze der Treg, HLA-DR$^+$ Treg und GARP$^+$ Treg in Psoriasis-Patienten unter systemischer Therapie in moderaten und schweren Erkrankungsgraden nicht durchgeführt werden.

In dieser Studie wiesen Psoriasis-Patienten unter systemischer Therapie und gesunde Spender vergleichbare Prozentsätze an Treg und HLA-DR$^+$ Treg auf, während Psoriasis-Patienten unter topischer Therapie höhere Treg Prozentsätze und geringere Prozentsätze HLA-DR$^+$ Treg maßen als gesunde Spender. Psoriasis-Patienten unter systemischer Therapie wiesen niedrigere Prozentsätze GARP$^+$ Treg auf als gesunde Spender, während Psoriasis-Patienten unter topischer Therapie höhere Prozentsätze GARP$^+$ Treg maßen. Psoriasis-Patienten unter

topischer Therapie mit PASI > 20 zeigten höhere Prozentsätze an Treg, HLA-DR$^+$ Treg und GARP$^+$ Treg als solche mit PASI 10 – 20 und PASI < 10.

3.3.2. Die M- und E-MDSC Prozensätze korrelieren positiv mit dem Psoriasis Area Severity Index (PASI)

Myeloide Suppressorzellen (MDSC) wurden nicht nur in malignen Erkrankungen, sondern auch in chronisch entzündlichen immunologisch-vermittelten Erkrankungen wie der Psoriasis nachgewiesen (182). In der Literatur wiesen Patienten mit Psoriasis erhöhte Prozentsätze CD14$^+$HLA-DR$^{low/-}$ M-MDSC in PBMC und in der erkrankten Haut auf (180). Im Tumor induzieren MDSC einen regulatorischen Phänotyp in T-Effektorzellen (183). Zudem gibt es Hinweise, dass CD14$^+$HLA-DR$^{low/-}$ M-MDSC Treg anlocken (184). Sowohl für M- als auch für E-MDSC wurden immunsuppressive Eigenschaften beobachtet (22). MDSC könnten daher eine wichtige Rolle zur Wiederherstellung des Gleichgewichtes zwischen regulatorischen und immunreaktiven T-Zellen spielen. Anders als in malignen Erkrankungen sind die Subpopulationen der MDSC in der Psoriasis wenig erforscht.

Um den Effekt einer topischen und systemischen Therapie auf MDSC im peripheren Blut von Psoriasis-Patienten zu analysieren, wurden die Prozentsätze der CD14$^+$CD124$^+$ M-MDSC, CD14$^+$CD15$^-$CD33^{hi}HLA-DR^{low} M-MDSC und der Lin$^-$HLA-DR^{low}CD11b$^+$CD33$^+$ E-MDSC in den PBMC durchflusszytometrisch gemessen (Abb. 31 (181)).

Im Vergleich zu gesunden Spendern (0,5 %) wiesen Psoriasis-Patienten unter topischer Therapie einen 12-fach höheren Prozentsatz CD14$^+$CD124$^+$ M-MDSC (6 %) auf (Abb. 31 (181)), während Psoriasis-Patienten unter systemischer Therapie (0,1 %) deutlich niedrigere Prozentsätze CD14$^+$CD124$^+$ M-MDSC aufwiesen. Der Unterschied zwischen topischer und systemischer Therapie war signifikant (p = 0,0014 **).

Entsprechend der Prozentsätze der CD14$^+$CD124$^+$ M-MDSC wurde für die Subpopulation der CD14$^+$CD15$^-$CD33^{hi}HLA-DR^{low} M-MDSC in Psoriasis-Patienten unter topischer Therapie (4,1 %) ein höherer Prozentsatz ermittelt als in gesunden Spendern (3,1 %), während Psoriasis-Patienten unter systemischer Therapie (6,7 %) einen doppelt so hohen Prozentsatz CD14$^+$CD15$^-$CD33^{hi}HLA-DR^{low} M-MDSC aufwiesen.

Im Vergleich zu gesunden Spendern (0,9 %) maßen Psoriasis-Patienten unter topischer (1,5 %) sowie systemischer Therapie (1,6 %) höhere Prozentsätze Lin$^-$HLA-DR^{low}CD11b$^+$CD33$^+$ E-MDSC.

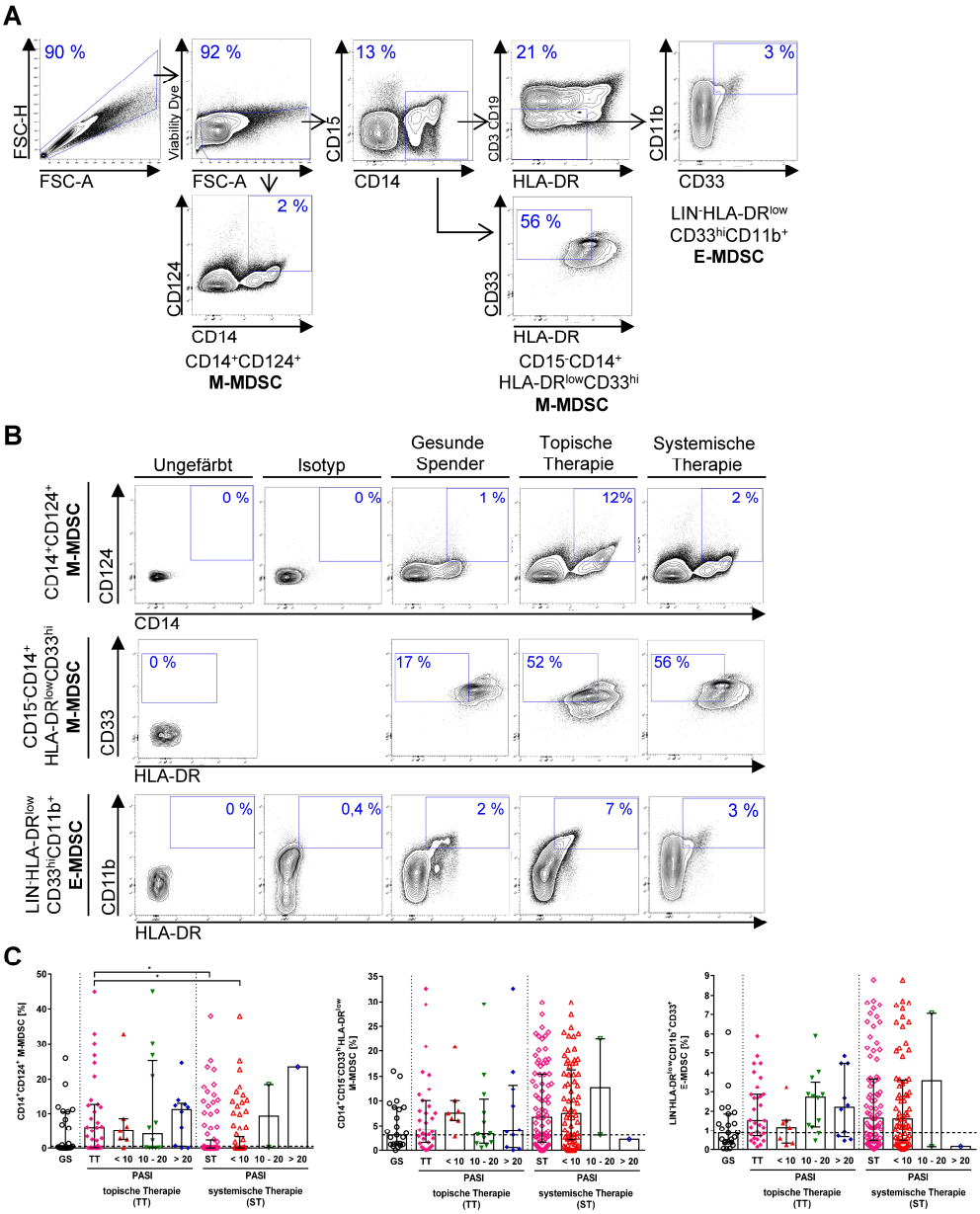


Abbildung 31 Die Prozentsätze der myeloiden Suppressorzellen (MDSC) im peripheren Blut von Psoriasis-Patienten in Abhängigkeit vom Schweregrad der Erkrankung und der Therapie.

A Exemplarische durchflusszytometrische Eingrenzung der MDSC. Das Beispiel zeigt einen Patienten unter systemischer Therapie. Es wurde der Prozentsatz der $CD14^+CD124^+$ monozytäre/mononukleäre MDSC (M-MDSC), $CD15^-CD14^+CD33^{high}HLA\text{-}DR^{low}$ M-MDSC und $LIN^-HLA\text{-}DR^{low}CD11b^+CD33^+$ E-MDSC gemessen. Als spezifische Zelltypmarker, LIN (engl. lineage), wurden CD3, CD14, CD15 und CD19 zusammengefasst. **B** Exemplarische durchflusszytometrische Konturdiagramme der MDSC-Subpopulationen. Die Beschriftung der Reihen zeigt die im Konturdiagramm definierte MDSC-Subpopulation. Das Diagramm der $CD14^+CD124^+$ M-MDSC zeigt die Population viabler Zellen. Das Diagramm der $CD15^-CD14^+CD33^{high}HLA\text{-}DR^{low}$ M-MDSC zeigt die Population viabler $CD14^+CD15^-$ Zellen. Das Diagramm der E-MDSC zeigt die Population lebender $LIN^-HLA\text{-}DR^{low}$ Zellen. Die Ungefärbt- und die Isotypen-Kontrolle zeigt die Singulett-Population. Die Prozentzahlen geben den prozentualen Anteil der eingegrenzten Zellen an der dargestellten Population an. Der Isotyp zeigt IgG2a für CD124 bzw. IgG1 für CD11b. Als Kontrolle dienten gesunde Spender. **C** MDSC-Frequenzen. Die Balkendiagramme zeigen den Prozentsatz der MDSC-Subpopulationen an lebenden PBMC. Die gestrichelte Linie gibt den Median der gesunden Spender an. (n-Zahlen siehe Tabelle 6; $CD14^+CD124^+$ M-MDSC, p(ST vs. TT) = 0,0367 *, p(ST,< 10 vs. TT) = 0,0493 *; E-MDSC, p(GS vs. TT, 10-20) = 0,5773, p(GS vs. ST) = 0,7834). Median ± Interquartilsabstand. Kruskal-Wallis Test, $p < 0,05$ *. GS, gesunder Spender; E-MDSC, early (frühe) MDSC; HLA-DR, humanes Leukozytenantigen-DR Isotyp; LIN, spezifische Zelltypmarker (engl. Lineage); MDSC, myeloide Suppressorzellen; M-MDSC, monozytäre/mononukleäre MDSC; PASI, Psoriasis Area and Severity Index; ST, systemische Therapie; TT, topische Therapie.

Die Analyse der MDSC Prozentsätze in Zusammenhang mit dem PASI ergab, dass Psoriasis-Patienten unter topischer Therapie mit einem milden Erkrankungsgrad (PASI < 10; 6 %) einen geringfügig höheren Prozentsatz $CD14^{+}CD124^{+}$ M-MDSC besaßen als jene mit einem moderaten Erkrankungsgrad (PASI 10 – 20; 4,1 %), während Psoriasis-Patienten mit einem schweren Erkrankungsgrad (PASI > 20; 11,2 %) deutlich höhere Prozentsätze maßen.
Psoriasis-Patienten unter topischer Therapie mit einem milden Erkrankungsgrad (4,1 %) besaßen höhere Prozentsätze $CD14^{+}CD15^{-}CD33^{hi}HLA\text{-}DR^{low}$ M-MDSC als jene mit einem moderaten Erkrankungsgrad (3,3 %). Psoriasis-Patienten mit einem schweren Erkrankungsgrad (3,9 %) wiesen einen geringfügig höheren Prozentsatz $CD14^{+}CD15^{-}CD33^{hi}HLA\text{-}DR^{low}$ M-MDSC auf.
Der Prozentsatz der $Lin^{-}HLA\text{-}DR^{low}CD11b^{+}CD33^{+}$ E-MDSC lag in Psoriasis-Patienten unter topischer Therapie mit einem milden Erkrankungsgrad bei 1,2 %, mit einem moderaten bei 2,7 % und mit einem schwerem Erkrankungsgrad bei 2,2 %.

Die Analyse zeigte, dass die Prozentsätze der $CD14^{+}CD15^{-}CD33^{hi}HLA\text{-}DR^{low}$ M-MDSC und $Lin^{-}HLA\text{-}DR^{low}CD11b^{+}CD33^{+}$ E-MDSC im peripheren Blut von Psoriasis-Patienten unabhängig von der Therapie höher waren als in gesunden Spendern. Psoriasis-Patienten unter topischer Therapie wiesen signifikant höhere Prozentsätze $CD14^{+}CD124^{+}$ M-MDSC auf im Vergleich zur systemischen Therapie. Psoriasis-Patienten unter topischer Therapie mit einem schweren Erkrankungsgrad (PASI > 20) wiesen hohe Prozentsätze $CD14^{+}CD124^{+}$ M-MDSC und mit PASI ≥ 10 hohe Prozentsätze $Lin^{-}HLA\text{-}DR^{low}CD11b^{+}CD33^{+}$ E-MDSC auf.

4. Diskussion

Die vorliegende Dissertation untersuchte die Modulation von Immunantworten durch Systemtherapien in verschiedenen immunologisch vermittelten Krankheitsbildern (Tumor versus Autoimmunität) anhand der Checkpoint-Inhibitor Therapien zur Behandlung des malignen Melanoms, des Effekts der BRAF- und MEK-Inhibitoren auf dendritische Zellen sowie anhand der Gegenüberstellung der topischen und systemischen Therapien in der Autoimmunität am Beispiel der Psoriasis.

4.1. Checkpoint-Inhibitoren – Ein starkes Immunsystem für ein starkes Therapieansprechen

In Deutschland rangierte das maligne Melanom 2018 (1-Jahres Prävalenz) auf Platz 7 der häufigsten Tumorentitäten (185), verzeichnete 2018 eine globale Inzidenzrate von 3,1 (per 100.000, ASR) – Tendenz steigend – und (186) eine Mortalitätsrate von 0,63 (per 100.000, ASR) (186). 90 % der Todesfälle der Patienten mit Hauttumoren sind auf das maligne Melanom zurückzuführen (32). Das Beispiel Australien verdeutlicht die Dringlichkeit der Entwicklung neuer Therapien: Von 1982 bis 2018 stieg die Inzidenzrate von 27 auf 51 pro 100.000 Menschen (187). Die Hauptgründe der steigenden Inzidenzraten sind eine längere Lebensdauer und das Altern der Gesellschaft (188). Präventionsmaßnahmen und effektive Frühdiagnosen hielten die Mortalitätsrate im genannten Zeitraum weitgehend konstant (32,188). Nichtsdestotrotz, im fortgeschrittenen Stadium des malignen Melanoms besitzen Patienten eine schlechte Prognose mit geringem Langzeitüberleben.

Zur Behandlung des malignen Melanom bewährten sich in der CheckMate 067 Studie monoklonale Antikörper, sogenannte Checkpoint-Inhibitoren, mit Ansprechraten (engl. ORR, objective response rate) von 58 %, 44 % und 19 % in der Ipilimumab-/Nivolumab Kombinationstherapie, Nivolumab- und Ipilimumab Monotherapie (57). In der Keynote-001 Studie erreichte Pembrolizumab in therapienaiven Patienten eine ORR von 52 % (189). Checkpoint-Inhibitoren blocken die ko-inhibitorischen Checkpoint Moleküle CTLA-4 (Ipilimumab) und PD-1 (Nivolumab, Pembrolizumab). Nach einer Aktivierung exprimieren T-Zellen verstärkt Checkpoint Moleküle. Das Ziel der Checkpoint-Inhibitor Therapie ist es, diesen negativen Rückkopplungseffekt zu hemmen, die Checkpoint Moleküle auf T-Zellen zu blocken, eine kontinuierliche Aktivierung und Proliferation der T-Zellen aufrecht zu halten und damit die anti-Tumor Immunantwort der Patienten zu stärken (190).

Prädiktive Biomarker identifizieren Ansprecher und Nicht-Ansprecher einer Therapie und fehlen derzeit für die Checkpoint-Inhibitor Therapie. Prädiktive Biomarker erkennen Nicht-Ansprecher bei Therapiebeginn – nicht 6 Monate später bei der 2. Stadienbestimmung –, indizieren einen

Therapiewechsel auf z. B. Kinase-Inhibitoren und ersparen den Patienten unnötige schwere Nebenwirkungen der Checkpoint-Inhibitoren.

Anders als bei molekularen zielgerichteten Therapien (wie z. B. BRAF-/MEK-Inhibitoren) und Chemotherapien (191) werden Nicht-Ansprecher der Checkpoint-Inhibitor Therapie aufgrund des differenzierten Ansprechmusters spät erkannt: So gibt es schnelle, langsame (mit einem stabilen Krankheitsverlauf) und späte Therapieansprecher (mit einem initialen Pseudoprogress) und Nicht-Ansprecher.

Starke, immunologisch-bedingte, z. T. lebensbedrohliche Nebenwirkungen (IRAE) der Checkpoint-Inhibitoren wie z. B. eine Colitis können zum Therapieabbruch führen (192). In der vorliegenden Studie erlitten 16 % der Patienten eine Colitis und 18 % bzw. 10 % der Ipilimumab bzw. Ipilimumab-/Nivolumab Kombinationstherapie Patienten brachen wegen IRAE die Therapie ab. In der CheckMate 067 Studie erkrankten nur 11 – 13 % an einer Colitis und 16 % bzw. 42 % brachen die Studie ab (57). Die CheckMate067 Studie ist aufgrund der Teilnehmerzahl (n(Ipilimumab/Nivolumab) = 313; n(Ipilimumab) = 311) aussagekräftiger als die vorliegende Studie (n = 51).

Die Checkpoint Moleküle CTLA-4 und PD-1 wurden auf unterschiedlichen Immunzellen nachgewiesen (51). Um ein Ansprechen auf die untersuchten Checkpoint-Inhibitor Therapien mittels prädiktiver zellulärer oder molekularer Biomarker vorherzusagen, wurden in der vorliegenden Studie Immunzellpopulationen im peripheren Blut von Melanompatienten (Therapieansprecher vs. Nicht-Ansprecher) vor Beginn einer Checkpoint-Inhibitor Therapie (Zeitpunkt A) und 1 bis 3 Wochen später (Zeitpunkt B) verglichen. Dazu wurden die Prozentsätze und funktionellen Eigenschaften der T-Zellen, regulatorischen T-Zellen (Treg) und myeloiden Suppressorzellen (MDSC) durchflusszytometrisch gemessen, molekulare Biomarker der Laborroutine der klinischen Chemie entnommen und das Plasmaproteom der Patienten via nanoUPLC UDMS^{E} verglichen und analysiert.

In diese Studie zeichneten sich Therapieansprecher vor Therapiebeginn durch hohe Lymphozyten-Monozyten-Verhältnisse (LMR), hohe Prozentsätze $CD4^+$ und $CD8^+GZMB^+$ T-Zellen, hohe Prozentsätze proliferierender, IFN-γ^+ $CD4^+$, $CD8^+$ und $CD8^+GZMB^+$ T-Zellen und niedrige Prozentsätze der Checkpoint Moleküle CTLA-4^+ und PD-1^+ auf T-Zellen aus; Nicht-Ansprecher besaßen hohe Prozentsätze PD-1^+ $CD8^+$ und $CD8^+GZMB^+$ T-Zellen. Nach der ersten Checkpoint-Inhibitor Gabe sank der Prozentsatz der proliferierenden, IFN-γ^+ in $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen in Therapieansprechern, während dieser Prozentsatz in $CD8^+GZMB^+$ T-Zellen stieg.

Die Aktivierungsmarker CD69, CD25, und HLA-DR auf $CD4^+$, $CD8^+$ und $CD8^+GZMB^+$ T-Zellen erwiesen sich nicht als prädiktive Biomarker.

In Bezug auf immunsuppressive Zellen zeichneten sich Therapieansprecher vor Therapiebeginn durch hohe $CD8^+GZMB^+$ T-Zell-Treg-Verhältnisse, niedrige Prozentsätze $CTLA\text{-}4^+$ Treg und Arginase 1^+ PMN-MDSC aus. Nach der ersten Checkpoint-Inhibitor Gabe nahm in Therapieansprechern der Prozentsatz der Treg, Arginase 1^+ E- und M-MDSC ab.
Im Blut der Therapieansprecher wurden niedrigere S100, LDH und Thrombozyten-Konzentrationen als in Nicht-Ansprechern gemessen.
Die Ergebnisse deuteten darauf hin, dass der Erfolg einer Checkpoint-Inhibitor Therapie unter anderem mit (i) dem Grad der T-Zellerschöpfung, (ii) dem Prozentsatz der Treg und (iii) der Arginase 1 Produktion der M- und E-MDSC zusammenhängt.
In der Studie wiesen Therapieansprecher vor Therapiebeginn und gesunde Spender im peripheren Blut zahlenmäßig mehr Lymphozyten als Monozyten (hohe LMR) auf, während Nicht-Ansprecher eine deutlich geringere LMR verzeichneten. Martens et al. ermittelten für Therapieansprecher vor Therapiebeginn vergleichbare Ergebnisse (193). Martens et al. verglichen die LMR in Melanompatienten unter Ipilimumab Monotherapie vor Therapiebeginn und 2 sowie 8 Wochen später (193). Nach Therapiebeginn stieg die LMR in Therapieansprechern an und ging mit einem längeren Gesamtüberleben einher. Im Gegensatz dazu stellte die vorliegende Studie in Therapieansprechern eine Abnahme der LMR 1 – 3 Wochen nach Therapiebeginn fest. Die Studie von Martens et al. besitzt aufgrund der Teilnehmerzahl (n = 209) eine höhere Aussagekraft.
Die vorliegende Studie legt nahe, dass eine hohe LMR vor Therapiebeginn ein Therapieansprechen ankündigt. Die oben genannten Daten von Martens et al. unterstützen dies. Eine hohe LMR impliziert einen hohen Prozentsatz an Lymphozyten (wie z. B. Tumorantigen spezifischen T-Zellen) im Verhältnis zu einem geringen Prozentsatz an monozytären Zellen (wie z. B. immunsuppressiven MDSC). Infolge der Checkpoint-Inhibitor Therapie könnten diese Tumorantigen spezifischen T-Zellen länger aktiviert bleiben und proliferieren, die anti-Tumor Immunantwort der Patienten stärken, die LMR erhöhen und ein Therapieansprechen ermöglichen (193).
In der durchgeführten Studie setzten sich die Lymphozyten in Therapieansprechern und Nicht-Ansprechern vor Therapiebeginn aus 63 % $CD4^+$, 15 – 19 % $CD8^+$ und 9 % $CD8^+GZMB^+$ T-Zellen zusammen. Der hohe Prozentsatz der $CD4^+$ und $CD8^+GZMB^+$ T-Zellen in Patienten gegenüber gesunden Spendern, unterstreicht die Wichtigkeit der $CD4^+$ T-Zellen. Damit unterstützt die Studie Untersuchungen im Mausmodell, die zeigten, dass die anti-CTLA-4 Therapie (wie z. B. Ipilimumab) durch einen CD4-vermittelten Mechanismus gegen B16-BL6 Melanome schützt (194). Aktuelle Forschungen zum CDR3 Spectratyping und zur TCR Sequenzierung weisen darauf hin, dass eine hohe Klonalität der $CD4^+$ T-Zellen im peripheren

Blut mit einem längeren Gesamtüberleben einhergeht (195). Infolge der hohen Mutationsrate des malignen Melanom könnten Neoantigene mittels der TCR-Diversität zur Bildung einer Vielzahl von Tumorantigen-spezifischen T-Zellen führen (196). Der Aspekt genetischer prädiktiver Biomarker wurde in der vorliegenden Studie nicht untersucht und sollte im Rahmen zukünftiger Studien verfolgt werden.

In Therapieansprechern wurde nach der ersten Checkpoint-Inhibitor Gabe eine Zunahme der $CD8^+$ T-Zellen verzeichnet, während der Prozentsatz der $CD4^+$ T-Zellen unabhängig vom Therapieerfolg unverändert blieb. Martens et al. sowie andere Studien beobachteten sowohl einen Anstieg der $CD4^+$ als auch der $CD8^+$ T-Zellen (193,197,198). Die vorliegende Studie impliziert, dass der beobachtete hohen Prozentsätze der $CD8^+$ T-Zellen von Martens et al. auf eine Steigerung der Proliferation und IFN-γ Expression der $CD8^+GZMB^+$ T-Zellen zurückzuführen ist (199).

Langanhaltende, schwache Aktivierungssignale durch Tumorantigene wie z. B. im chronisch entzündlichen Tumormikromilieu (TME, engl. tumor microenvironment) „erschöpfen“ T-Zellen (engl. T cell exhaustion) (200). Erschöpfte T-Zellen zeichnen sich durch eine (i) niedrige Proliferation, (ii) niedrige IFN-γ Expression und (iii) eine verstärkte Expression multipler Checkpoint Moleküle aus (111,201). In der vorliegenden Studie wiesen Therapieansprecher vor Therapiebeginn im peripheren Blut weniger „erschöpfte“ T-Zellen auf als Nicht-Ansprecher: Therapieansprecher besaßen (i) höhere Prozentsätze proliferierender, (ii) IFN-γ exprimierender sowie (iii) geringere Prozentsätze der Checkpoint Moleküle CTLA-4^+ und PD-1^+ auf $CD4^+$, $CD8^+$ und insbesondere $CD8^+GZMB^+$ T-Zellen als Nicht-Ansprecher. Diese Ergebnisse unterstützen Beobachtungen von Baitsch et al., welche einen weniger „erschöpften“ Phänotyp für zirkulierende T-Zellen ermittelten als für Tumor-infiltrierende Lymphozyten (202). Eine starke prätherapeutische Immunantwort deutete auf ein Therapieansprechen hin (72,203).

Das Ziel der Checkpoint-Inhibitor Therapie ist es, die Immunantwort durch eine verstärkte Proliferation, IFN-γ Produktion und Reduktion der Expression der ko-inhibitorischen Checkpoint Moleküle zu steigern. Vor allem $CD8^+$ T-Zellen erhalten durch eine anti-PD-1 Therapie einen Proliferations-Schub (204). In der vorliegenden Studie verstärkte die Checkpoint-Inhibitor Therapie die Proliferation und IFN-γ Produktion in Granzym B-produzierenden $CD8^+$ T-Zellen, jedoch nicht in $CD8^+$ $GZMB^-$ T-Zellen.

In der vorliegenden Studie stieg in Therapieansprechern der Prozentsatz der „erschöpften“ $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen nach Therapiebeginn an, während in Nicht-Ansprechern z. B. der Prozentsatz der ko-inhibitorischen Checkpoint Moleküle CTLA-4 und PD-1 auf $CD4^+$ T-Zellen gleich blieb und auf $CD8^+$ T-Zellen sogar abnahm. Beobachtungen von Kunert et al. unterstützen das Ergebnis: In Therapieansprechern wurde nach anti-PD-1 Therapie keine

Reduktion der erschöpften $CD4^+$ T-Zellen festgestellt, während in Nicht-Ansprechern die Expression der Checkpoint Moleküle auf $CD4^+$ T-Zellen abnahm (111). Dies impliziert, dass Therapieansprecher infolge einer Checkpoint-Inhibitor-induzierten T-Zellaktivierung die ko-inhibitorischen Checkpoint Moleküle PD-1 und CTLA-4 auf T-Zellen hochregulierten (negativer Rückkopplungseffekt), während Nicht-Ansprecher aufgrund einer schwachen T-Zellaktivierung die Checkpoint Moleküle gleichbleibend exprimierten. 3 Wochen nach Beginn einer Ipilimumab Therapie beobachteten Pico de Coaña et al. einen initialen Anstieg der $CD4^+PD\text{-}1^+$ T-Zellen in Melanompatienten, welcher nach 8 Wochen wieder zurückging (205).
In dieser Studie waren Therapieansprecher 1 – 3 Wochen nach Therapiebeginn anhand (i) eines initialen Anstiegs der Checkpoint Moleküle CTLA-4 und PD-1, (i) einer Reduktion der Proliferation und (iii) einer Reduktion der IFN-γ Produktion in $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen von Nicht-Ansprechern zu unterscheiden. Zukünftige Studien mit größeren Teilnehmerzahlen könnten diese Ergebnisse bestätigen.

Aufgrund hoher Endozytose-Raten liegt das Checkpoint Molekül CTLA-4 in ruhenden T-Zellen primär intrazellulär vor und wird nur transient und schwach auf der Oberfläche exprimiert. Dagegen exprimieren Treg CTLA-4 konstitutiv und stark (125). Die vorliegende Studie verdeutlichte dies: In Therapieansprechern war der Prozentsatz der $CTLA\text{-}4^+$ Treg durchschnittlich doppelt so hoch verglichen mit dem Prozentsatz der $CTLA\text{-}4^+CD4^+$ T-Zellen.
Im peripheren Blut sind $CD4^+$ T-Zellen in höheren Prozentsätzen vorzufinden als Treg (206). Die konstitutive CTLA-4 Expression auf Treg macht diese zu kompetitiven Zielzellen der anti-CTLA-4 Therapie (207). Die Bindung eines Liganden wie z. B. CD80 an CTLA-4 auf Treg führt zur Treg Aktivierung, TGF-β1 Produktion und Suppression von T-Zellen. Wird CTLA-4 auf Treg durch einen anti-CTLA-4 Checkpoint-Inhibitor wie Ipilimumab blockiert, könnten CTLA-4-vermittelte Suppressionsmechanismen der Treg gehemmt werden (208). Zwei Effektormechanismen der anti-CTLA-4 Checkpoint-Inhibitoren werden diskutiert:
(i) Aktivierung der adaptiven Immunabwehr - Durch die Blockade des Checkpoint Moleküls CTLA-4 auf T-Zellen wird die Proliferation und Aktivierung der T-Zellen verstärkt und (ii) Aktivierung der angeborenen Immunabwehr - Durch die Bindung an CTLA-4 auf tumorspezifischen Treg werden diese via Antikörperabhängiger Zell-vermittelter Zytotoxizität (ADCC) und Antikörperabhängiger Zell-vermittelter Phagozytose (ADCP) durch z. B. Makrophagen depletiert (124).
Der erste Mechanismus konnte in der vorliegenden Studie anhand T-Zellaktivierung mit anschließendem negativen Rückkopplungseffekt (Hochregulation der Checkpoint Moleküle CTLA-4 und PD-1 auf $CD4^+$ T-Zellen) nach Beginn einer Checkpoint-Inhibitor Therapie

beobachtet werden. Diese Beobachtung sowie der Anstieg der „erschöpften“ $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen in Therapieansprechern unterstützt den Checkpoint-Inhibitor Wirkmechanismus der T-Zellaktivierung und Proliferation.

In Übereinstimmung mit dem zweiten Wirkmechanismus, der Depletion der Treg, wurde in der vorliegenden Studie eine Abnahme des Prozentsatzes der Treg in PBMC in Therapieansprechern beobachtet, während der Prozentsatz der Treg in Nicht-Ansprechern stieg. Aufgrund der ADCC/ADCP wäre anzunehmen, dass der Prozentsatz der CTLA-4^+ Treg infolge einer Therapie mit anti-CTLA-4 Checkpoint-Inhibitoren wie Ipilimumab abnimmt. In der vorliegenden Studie wurden in Therapieansprechern der Ipilimumab Monotherapie jedoch schon vor Therapiebeginn deutlich geringere Prozentsätze CTLA-4^+ Treg verglichen mit Nicht-Ansprechern gemessen, welche nach Therapiebeginn sogar geringfügig anstiegen. Folglich konnte die obige Annahme nicht bestätigt werden.

Laut Du et al. ist die Treg Depletion primär im TME zu beobachten, nicht jedoch im peripheren Blut, wie es die vorliegende Studie untersuchte (208). Romano et al. beobachteten eine Treg Depletion in Ipilimumab-behandelten humanen Zellen *in vitro* innerhalb weniger Stunden (209), während Sharma et al. nach 5 – 18 Wochen in einer Tumorbiopsie keine Treg Depletion mehr nachweisen konnten (53). Entsprechend konnte in der vorliegenden Studie keine Depletion der CTLA-4^+ Treg 1 – 3 Wochen nach der Ipilimumab Behandlung im peripheren Blut von Melanompatienten beobachtet werden.

Die ADCC/ADCP wird durch aktivierende Antikörper Checkpoints wie z.B. den Rezeptoren FcγRIIa und FcγRIIIa vermittelt, die an Antikörper des IgG-Typs wie z. B. monoklonale Antikörper (Checkpoint-Inhibitoren) binden (210). Vargas et al. konnten zeigen, dass Melanompatienten mit einem hochaffinen Allel des FcγRIIIa (V158) unter Ipilimumab Monotherapie ein längeres Gesamtüberleben aufwiesen (211). Eine retrospektive Studie könnte den Polymorphismus der Fγc-Rezeptoren in der vorliegenden Studienpopulation ermitteltn und mit dem Therapieerfolg abgleichen.

Die Checkpoint-Inhibitor Therapie soll die adaptive Immunantwort verstärken. Nach Therapiebeginn nahm in der vorliegenden Studie der Prozentsatz aktivierter GARP$^+$ Treg und suppressiven HLA-DR^+ Treg in Therapieansprechern zu. Demzufolge wäre die Immunantwort in Therapieansprechern nach Therapiebeginn geschwächt. Einer größere Studie sollte diese Daten validieren und untersuchen, ob sich die Funktion und die Prozentzahl der Treg im peripheren Blut und im TME unterscheiden.

Die chronische Entzündung im Tumor hemmt die Ausdifferenzierung myeloider Vorläuferzellen zu Makrophagen und dendritischen Zellen und unterstützt die Ansammlung unreifer myeloider

Zellen wie z. B. die Aktivierung und Ausbreitung myeloider Suppressorzellen (MDSC) (27,212). In der durchgeführten Studie konnte dies anhand eines hohen Prozentsatzes $CD14^{+}CD15^{-}CD33^{+}HLA\text{-}DR^{low}$ M-MDSC und $HLA\text{-}DR^{low}CD11b^{+}CD33^{+}$ E-MDSC in Melanompatienten im Stadium IV beobachtet werden, während für gesunde Spender und Patienten im Tumorstadium IIIC geringere Prozentsätze ermittelt wurden.

Damit unterstützt die Studie Jordan et al., die höhere Prozentsätze von $Lin^{-/low}$(CD3, CD19, CD56)$CD11b^{+}HLA\text{-}DR^{-/low}CD14^{+}CD33^{+}$ MDSC in Stadium IV verglichen mit Stadium I ermittelten (119). Meyer et al. beobachteten, dass Melanompatienten höhere Prozentsätze Lin^{-}(CD3, CD19, CD56)$CD14^{+}HLA\text{-}DR^{-}$ M-MDSC als gesunde Spender aufwiesen (212).

Im Kontrast zu den Studien von Meyer et al. und Retseck et al. wurden in der vorliegenden Studie in Therapieansprechern und Nicht-Ansprechern vergleichbare Prozentsätze der E- und M-MDSC gemessen, während sowohl Meyer als auch Retseck in Therapieansprechern geringere M-MDSC Prozentsätze als in Nicht-Ansprecher maßen (212,213).

Die Ergebnisse der verschiedenen Studien führten abhängig vom Phänotyp der untersuchten M-MDSC Population, der Checkpoint-Inhibitor Therapie und den verglichenen Zeitpunkten zu unterschiedlichen Aussagen. Dies soll anhand der Beobachtungen zu Therapieeffekten auf den Prozentsatz der MDSC veranschaulicht werden.

So ergaben die kumulierten Daten der Checkpoint-Inhibitoren in der vorliegenden Studie einen Anstieg der Prozentsätze der E- und $CD14^{+}CD15^{-}CD33^{+}HLA\text{-}DR^{low}$ M-MDSC in Therapieansprechern 1 – 3 Wochen nach Therapiebeginn, wogegen die E- und M-MDSC Prozentsätze in Nicht-Ansprechern unverändert blieben. Dagegen registrierten Meyer et al. 20 Tage nach Beginn einer Ipilimumab-Therapie keine Veränderungen der Prozentsätze der $Lin^{-}CD14^{+}HLA\text{-}DR^{-}$ M-MDSC (212), wogegen Pico de Coaña et al. eine Reduktion der $HLA\text{-}DR^{-/low}CD14^{+}$ M-MDSC in Therapieansprechern ermittelten (205). Währenddessen machten Retseck et al. 3 Monate nach der ersten Ipilimumab-Gabe in Therapieansprechern und Nicht-Ansprechern einen Anstieg der $HLA\text{-}DR^{+/low}CD14^{+}$ M-MDSC wie die vorliegende Studie (213). In Hinblick auf die vielfältigen Ergebnisse der Literatur und der vorliegenden Studie ließen die Prozentsätze der E- und M-MDSC allein keine Aussage über den Therapieerfolg der Checkpoint Inhibitor Therapie zu. Zukünftige Studien sollten die funktionellen Unterschiede der MDSC-Subpopulationen im peripheren Blut und im TME erarbeiten.

Polymorphonukleäre (PMN) Zellen wie z. B. Neutrophile und PMN-MDSC können unter anderem durch Förderung der Angiogenese das Tumorwachstum unterstützen (27). So wurden in der vorliegenden Studie vor Therapiebeginn in Nicht-Ansprechern mit Tumorprogression hohe Prozentsätze $CD15^{+}CD33^{+}$ PMN-MDSC verglichen mit Therapieansprechern gemessen. Jordan

et al. beobachteten ebenfalls höhere Prozentsätze $Lin^{-/low}$(CD3, CD19, CD56)$CD11b^{+}$HLA-$DR^{-/low}CD33^{+}CD14^{-}CD15^{+}$ PMN-MDSC in therapienaiven progredienten Patienten verglichen mit Patienten mit stabilem Melanom (119).

In der vorliegenden Studie sank der prozentuale Anteil der $CD15^{+}CD33^{+}$ PMN-MDSC in PBMC in Nicht-Ansprechern nach Therapiebeginn ab, während dieser in Therapieansprechern unverändert blieb. Dagegen beobachteten Pico de Coaña et al. eine Reduktion der Lin^{-}HLA-DR^{-} $CD15^{+}CD33^{+}CD11b^{+}$ PMN-MDSC in Therapieansprechern.

Im Vergleich zu gesunden Spendern wiesen Melanompatienten in der vorliegenden Studie niedrigere Prozentsätze der PMN-MDSC auf, während Jordan et al. höhere Prozentsätze der PMN-MDSC in Melanompatienten maßen. In der vorliegenden Studie lagen in Melanompatienten im Stadium IV vor Therapiebeginn nur ein Zehntel der von Jordan et al. gemessenen PMN-MDSC Prozentsätze vor, während der PMN-MDSC Prozentsatz in gesunden Spendern in beiden Studien vergleichbar war. Im Unterschied zu Jordan et al. waren die Patientenproben der vorliegenden Studie aufgrund der längeren Studiendauer circa 1 – 2 Jahre länger bei −80 °C gefroren, während für die Proben der gesunden Spender in beiden Studien eine vergleichbare maximale Lagerungszeit von 1,5 Jahren angenommen werden kann. Infolge der Kryokonservierung wird das Oberflächenmolekül CD15 auf $CD15^{+}CD33^{+}$ PMN-MDSC herunterreguliert (120). Demnach unterscheiden sich die Studienergebnisse aufgrund der Dauer der Kryokonservierung der Proben sowie der unterschiedlichen gemessenen PMN-MDSC Phänotypen. In zukünftigen Studien sollte die Lagerzeit der Proben der Patienten und der gesunden Spender vergleichbar sein. Zudem ist zur Metaanalyse von Studien eine Vereinheitlichung des Phänotyps der MDSC Subpopulationen essentiell.

Die vorliegende Studie bestätigte Beobachtungen, welche einen hohen Prozentsatz HLA-$DR^{low}CD11b^{+}CD33^{+}$ E-MDSC bzw. HLA-$DR^{-/low}CD14^{+}$ M-MDSC mit einem kürzeren Gesamtüberleben der Patienten korrelierten (205)(214). Ergänzend zeigte die vorliegende Studie dies auch für $CD15^{+}CD33^{+}$ PMN-MDSC. Zusätzlich zu bisherigen Studien bezog die Überlebenszeitanalyse nicht nur den Parameter Gesamtüberleben, sondern auch den Therapieerfolg mit ein: Hohe Prozentsätze der E-, M- und PMN-MDSC vor Therapiebeginn beeinflussten das Gesamtüberleben der Nicht-Ansprecher negativ, wohingegen dies in Therapieansprechern nicht der Fall war.

Infolge der Reduktion der Zellkontakt-vermittelnden Rezeptoren CD44 und CD62L auf T-Zellen senken MDSC die T-Zellextravasation und damit die T-Zellinfiltration in das Gewebe sowie in den Tumor (27). Obwohl eine starke T-Zellinfiltration der Tumore ausschlaggebend für ein Therapieansprechen der Checkpoint-Inhibitor Therapie ist (215), ließen die Prozentsätze der

MDSC Subpopulationen für sich allein betrachtet in dieser Studie keine Aussage über den Therapieerfolg zu.

Abhängig vom Phänotyp, dem Messverfahren sowie der gemessenen Parameter (wie z. B. Hemmung der Proliferation, IFN-γ Zytokin Expression) werden für die MDSC Subpopulationen in der Literatur unterschiedliche suppressive Mechanismen und Kapazitäten der T-Zellfunktionen berichtet (134)(216). So depletiert das MDSC Effektorenzym Arginase 1 die Aminosäure L-Arginin, indem es dieses in Ornithin und Urea spaltet. Der Stoffwechsel in T-Zellen unter Arginin-Mangel verläuft vermehrt über die Glykolyse statt über die oxidative Phosphorylierung, reduziert die Synthese der TCR-ζ Kette und damit die Proliferation der T-Effektorzellen sowie die anti-Tumor Immunantwort (217).
In der vorliegenden Studie wurden erhöhte Prozentsätze Arginase 1^+ E-, PMN- und M-MDSC in den PBMC der Melanompatienten verglichen mit den gesunden Spendern gemessen. Im Gegensatz zu Nicht-Ansprechern wiesen Therapieansprecher geringere Prozentsätze Arginase 1^+ PMN-MDSC auf. Infolge der immunsuppressiven Kapazität der MDSC korrelierten hohe MDSC Prozentsätze negativ mit dem Gesamtüberleben der Nicht-Ansprecher.
Nach Therapiebeginn sank der Prozentsatz der Arginase 1^+ E- und M-MDSC in Therapieansprechern, während der Prozentsatz in Nicht-Ansprechern stieg. Pico de Coaña et al. beobachteten ebenfalls eine Reduktion des Prozentsatzes der Arginase 1^+ MDSC nach Therapiebeginn (205). Dieser Effekt könnte in Therapieansprechern eine starke anti-Tumor Immunantwort, die T-Zellinfiltration des Tumors und damit ein Therapieansprechen begünstigen. Hohe Prozentsätze zytotoxischer $CD8^+$ T-Effektorzellen im peripheren Blut und im TME spielen eine zentrale Rolle in der anti-Tumor Immunantwort (218). Dufait et al. zeigten, dass eine MDSC-induzierte Immunsuppression der $CD8^+$ T-Zellen auch über Granzym B und Perforin vermittelt werden kann (219). Im Maus-Modell wuchsen Tumore, die durch Injektion von MDSC (gewonnen aus Perforin/GZMB Knock-out (KO) Mäusen) und B16F10 Melanomzellen gesetzt wurden, langsamer als solche, die durch Injektion von Wildtyp-MDSC (gewonnen aus Wildtyp-Mäusen) mit Melanomzellen gesetzt wurden. Die Beobachtung wurde dadurch erklärt, dass MDSC aus Wildtyp-Mäusen über den Perforin/GZMB Signalweg eine Apoptose in $CD8^+$ T-Zellen induzierten, wodurch die anti-Tumor Immunantwort in dieser Maus-Kohorte geringer ausfiel und die Tumore schneller wuchsen. Zukünftige Studien sollten daher die Prozentsätze der MDSC in Kombination mit denen der $CD8^+$/$CD8^+GZMB^+$ T-Zellen als prognostischen Biomarker der Immuntherapie untersuchen.

In Übereinstimmung mit der Literatur wurden in den untersuchten Therapieansprechern geringere Serumwerte der prognostischen Biomarker des malignen Melanoms, LDH und S100,

gemessen als in Nicht-Ansprechern (220,221). Zudem wiesen Therapieansprecher vor und nach Therapiebeginn geringere Thrombozyten-Konzentrationen im Blut als Nicht-Ansprecher auf. Niedrige Konzentrationen dieser Parameter wirkten sich positiv auf das Gesamtüberleben aus. Eine niedrige Thrombozyten-Konzentration könnte somit auf ein Therapieansprechen hindeuten und einen potenziellen prädiktiven Biomarker der Checkpoint-Inhibitor Therapien darstellen. Die Thrombozyten-Konzentration ist ein interessanter prädiktiver Biomarker, da sie routinemäßig in der klinischen Chemie schnell und leicht ermittelt werden kann. Eine hohe Thrombozyten-Konzentration wird auch in anderen Tumorentitäten (wie z. B. Magen-/ Brustkrebs, nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom (NSCLC)) mit einer schlechten Prognose verbunden (222–225). Eine Thrombozyten-Konzentration unterhalb des Normbereichs, eine Thrombozytopenie, ist eine seltene hämatologische IRAE der Checkpoint-Inhibitoren, die sich in Form einer autoimmunhämolytischen Anämie (AIHA) oder einer idiopathischen thrombozytopenischen Purpura (ITP) äußern kann (226,227).
In der Literatur korrelierten IRAE mit starken Schweregraden mit einem klinischen Nutzen der Patienten unter Checkpoint-Inhibitor Therapie (221). In Therapieansprechern werden starke IRAE durch einen hohen Prozentsatz zytotoxischer $CD8^+$ T-Effektorzellen und damit einer starken Immunantwort begünstigt. Aufgrund der geringen Studiengröße konnte dies in der vorliegenden Studie nicht beobachtet und näher analysiert werden.
Die Proteomanalyse ergab, dass das Vitamin E-bindende Albumin Afamin, welches im Serum von Patienten mit Ovarialkarzinom reduziert ist, auch in Melanompatienten erniedrigt war (228). Nach der ersten Checkpoint-Inhibitor Gabe stieg Afamin in Therapieansprechern auf den Median der gesunden Spender an, während der Wert in Nicht-Ansprechern unverändert blieb. Zukünftige Studien sollten Afamin als prognostischen Biomarker des malignen Melanoms untersuchen.

Die vorliegende Studie besitzt aufgrund der niedrigen Fallzahlen eine eingeschränkte Aussagekraft und muss durch Studien mit höheren Fallzahlen validiert und verifiziert werden. Wie bei Meyer et al. wurden in der vorliegenden Studie hohe inter-individuelle Unterschiede zwischen den Patienten beobachtete (212). Zur Ermittlung aussagekräftiger Ergebnisse ist daher eine große Studienpopulation zu empfehlen.
Die Aussage verschiedener Studien variiert unter anderem aufgrund der Lagerungsbedingungen (frische vs. Aufgetaute PBMC) und -dauern der Proben. Da die Kryokonservierung die Expression bestimmter Biomarker wie z. B. CD15 auf PMN-MDSC sowie die enzymatische Aktivität potenzieller molekularer Biomarker senken kann (229), ist die Analyse frischer PBMC zu empfehlen.

Da die Fallzahl je Checkpoint-Inhibitor zu gering war, wurden die Ergebnisse der Checkpoint-Inhibitoren zusammengefasst. Obwohl anhand der farblichen Kodierung der Therapien kaum sichtbare Differenzen verzeichnet werden konnten, sollten die Therapien aufgrund der unterschiedlichen Zielmoleküle und Wirkmechanismen der anti-CTLA-4 und anti-PD-1 Checkpoint-Inhibitoren in zukünftigen Studien getrennt analysiert werden. Zukünftige Studien sollten weitere Checkpoint Moleküle, wie z.B. TIM-3 untersuchen.
Da Checkpoint Moleküle wie PD-1 und ihre Liganden PD-L1/2 nicht nur auf T-Zellen, sondern auch auf Treg, Melanomzellen (230) und, wie von Pico de Coaña et al. und anderen diskutiert, MDSC (231,232) exprimiert werden, sollten zukünftige Studien mögliche Nebenwirkungen durch z. B. Depletion (via ADCC) dieser Zellpopulationen untersuchen.
Anhand einer Kinetik der Prozentsätze der untersuchten Zellpopulationen in Therapieansprechern mit stabiler Erkrankung und einem verspäteten Ansprechen im Vergleich zu Nicht-Ansprechern, könnten prognostische Biomarker identifiziert werden. So berichteten Martens et al. von verspäteten (8 – 14 Wochen nach Therapiebeginn) Zunahmen der $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen, die auf ein Therapieansprechen hinwiesen (193).

Nicht nur Melanompatienten, sondern auch Patienten mit Nierenzellkarzinom, Dickdarm- und Brustkrebs profitieren von potenziellen prädiktiven und prognostischen Biomarkern der Checkpoint-Inhibitor Therapie (233–236). Durch die Sequenzierung der Protein-kodierenden Gene des Genoms (WES, Whole exome sequencing) korrelierten Studien eine hohe Tumormutationslast (TMB) mit einem verstärkten klinischen Nutzen der Therapie (237,238). Anhand von Flüssigbiopsien wurden hohe Mengen Zell-frei zirkulierender Tumor-DNA (ctDNA) mit einer hohen Tumorlast bzw. erworbenen Resistenz korreliert (239).
Als Biomarker der Checkpoint-Inhibitor Therapie werden Tumore mit starker T-Zellinfiltration und PD-L1 Expression, einer hohen TMB mit immunogenen Neoantigenen, Mutationen in der Expression immunregulierender Gene und unter anderem epigenetische Methylierungen der Checkpoint Molekül-Promotorregion sowie das Darmmikrobiom untersucht (240)(85). Anhand einer blutbasierten Nukleinsäureanalytik mittels Flüssigbiopsien könnte ein Teil der oben genannten Parameter in Patienten routinemäßig bestimmt werden.
Neben prädiktiven Biomarkern wird auch an neuen Trägersystemen für Checkpoint-Inhibitoren geforscht. Eine lokalisierte und retardierte Freisetzung soll den Einsatz geringerer Dosen ermöglichen. Um IRAE und Effekte auf nicht-anvisierte Zellen zu vermeiden, werden Applikationen mit kontrollierter Freisetzung via Nanopartikel, Biomaterial- und transdermaler Trägersysteme entwickelt (241). Schmid et al. entwickelten Antikörper-funktionalisierte Nanopartikel, mit deren Hilfe TLR7/8-Agonisten an zirkulierende $PD\text{-}1^+CD8^+$ T-Zellen andockten,

und so den Prozentsatz der Tumor-infiltrierenden $CD8^+$ T-Zellen erhöhten sowie eine nachfolgende anti-PD-1 Therapie begünstigten (242).

Insgesamt demonstrierte die Studie, dass die Zusammensetzung der Immunzellen im peripheren Blut vor Beginn einer Checkpoint-Inhibitor Therapie entscheidend für das Therapieansprechen war. Als wichtige zelluläre prädiktive Biomarker in Therapieansprechern wurden in dieser Studie (i) ein hohes Lymphozyten-Monozyten-Verhältnis, insbesondere (ii) ein hoher Prozentsatz IFN-γ-produzierender, proliferierender $CD8^+$ T-Zellen und $CD8^+GZMB^+$ T-Zellen, (iii) niedrige Prozentsätze immunsuppressiver $CTLA\text{-}4^+$ Treg sowie (iv) Arginase 1^+ PMN-MDSC im Vergleich zu Nicht-Ansprechern ermittelt. Nach Therapiebeginn wiesen Therapieansprecher einen Anstieg erschöpfter $PD\text{-}1^+CTLA\text{-}4^+$ IFN-γ^-Ki-67^- $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen sowie eine Abnahme der Prozentsätze immunsuppressiver Treg, E- und M-MDSC auf. Anhand von Überlebenszeitanalysen veranschaulichte die Studie, dass hohe Prozentsätze immunsuppressiver Zellen (wie z. B. E-, PMN-MDSC und Treg) vor Therapiebeginn, vor allem in Nicht-Ansprechern, einen negativen Effekt auf das Gesamtüberleben hatten.
Die Studie bestätigte die bekannten molekularen Biomarker des malignen Melanoms, LDH und S100, und ergänzte diese um einen neuen potenziellen Biomarker, die Thrombozyten-Konzentration.
Die Studie verdeutlichte, dass Immuntherapien wie Checkpoint-Inhibitoren ein arbeitsfähiges Immunsystem stärken. Patienten mit einem starken prä-therapeutischen Immunsystem profitieren somit besonders von Checkpoint-Inhibitoren. Patienten mit „schwachem Immunsystem“ könnte eine sequentielle Kombinationstherapie unterstützen: (1) Zielgerichtete Therapien (wie z. B. BRAF-/MEK-Inhibitoren) greifen den Tumor an, versorgen APC mit Neoantigenen und stimulieren $CD4^+$ T-Zellen zur IFN-γ-Produktion und zytotoxische $CD8^+$ T-Zellen zur Granzym B Produktion. (2) Checkpoint-Inhibitoren verstärken die Proliferation der aktivierten T-Zellen.

4.2. BRAF- vs. MEK-Inhibitoren – BRAF-Inhibitoren unterstützen die anti-Tumor Immunantwort dendritischer Zellen

In circa 50 % aller Melanome liegt eine $BRAF^{V600}$ Mutation vor (243). $BRAF^{V600}$-mutierte Melanome im Stadium IV sind laut S3-Leitlinien mit einer BRAF/MEK-Inhibitor Kombinationstherapie oder mit Checkpoint-Inhibitoren (anti-PD-1 Mono- oder anti-PD-1/CTLA-4 Kombinationstherapie) zu behandeln (32). Die COMBI-d Studie verzeichnete unter der Kombinationstherapie des BRAF-Inhibitors Dabrafenib mit dem MEK-Inhibitor Trametinib im fortgeschrittenen BRAF-mutierten Melanom eine Ansprechrate von 69 % (Median PFS (Progressions-freies Überleben) = 11 Monate; Median OS = 25,1 Monate) (48). Der anti-PD-1

Checkpoint-Inhibitor Pembrolizumab wies in der KEYNOTE-001 Studie im BRAF-mutierten Melanom nur eine Ansprechrate von 19 % auf (Median PFS = 3,5 – 5,5 Monate; Median OS = 23,8 Monate) (244). Um die Entwicklung von Resistenzen zu verringern und dadurch die PFS und OS zu verlängern, untersuchen aktuelle Studien die Dreifachkombination aus BRAF/MEK- und Checkpoint-Inhibitoren (Dabrafenib/Trametinib/Pembrolizumab) (189). Immuntherapien wie z. B. Checkpoint-Inhibitoren benötigen zur Wirkung ein funktionierendes Immunsystem. In der BRAF/MEK-Inhibitor Therapie spielen DC als APC, die Tumorantigene präsentieren, tumorspezifische $CD8^+$ T-Zellen primen und zur klonalen Expansion anregen, eine zentrale Rolle (245,246). Checkpoint-Inhibitoren verstärken die T-Zellproliferation durch die Blockade ko-inhibitorischer Checkpoint Moleküle wie z. B. PD-1 und CTLA-4 auf T-Zellen (247,248).
Um die Eignung der BRAF- und MEK-Inhibitoren für neue Kombinationstherapien festzustellen, wurde der Frage nachgegangen, ob BRAF- und MEK-Inhibitoren das Potenzial besitzen den DC-vermittelten induzierten Tumorzelltod (ICD, immunogenic cell death) zu unterstützen. Dazu wurde der Effekt von BRAF- und MEK-Inhibitoren auf die Expression ko-stimulierender Checkpoint Moleküle, die Zytokinproduktion, die Viabilität und die metabolische Aktivität in humanen DC *in vitro* kolorimetrisch und durchflusszytometrisch untersucht.

Die Untersuchungen ergaben, dass die BRAF-Inhibitoren Vemurafenib und Dabrafenib anders als der MEK-Inhibitor Trametinib die Expression der ko-stimulierenden Moleküle CD80 und CD86 auf reifen DC (rDC) verstärkten, die Viabilität, Apoptose und Nekrose reifer und unreifer DC nicht beeinflussten, nach 24 Stunden die metabolische Aktivität in unreifen DC verstärkten und die Expression aktivierter Caspase-1 in unreifen und reifen DC verstärkten. Vemurafenib, induzierte die Produktion der Zytokine IL-12p70, TNF-α und IL-1β in reifen DC, während der MEK-Inhibitor Trametinib die Produktion der Zytokine IL-1β und TNF-α reduzierte und die von IL-12p70 verstärkte. Vemurafenib und Dabrafenib verstärkten die relative Genexpression von IL-1β und IL-18 in unreifen DC. Sowohl BRAF- als auch MEK-Inhibitoren übten keinen Effekt auf die Produktion der Zytokine IL-6, IL-8 und IL-10 aus.
Die Ergebnisse deuteten darauf hin, dass BRAF-Inhibitoren, insbesondere Vemurafenib, DC *in vitro* in der Ausbildung der Antigen-präsentierenden Eigenschaften unterstützt. In MEK-Inhibitoren war dieser Effekt weniger ausgeprägt. Demzufolge wären BRAF-Inhibitoren den MEK-Inhibitoren in einer Kombinationstherapie mit Immuntherapeutika vorzuziehen.

Die BRAF-Inhibitoren Vemurafenib und Dabrafenib regulierten die Expression der Ko-Stimulatoren CD80 und CD86 auf reifen DC (rDC) hoch, während der MEK-Inhibitor Trametinib diese reduzierte.
Das Ergebnis bestätigte damit Untersuchungen von Hong et al. (249) und Ott et al. (250). Ott et

al. zeigten, dass Vemurafenib den Ko-Stimulator CD80 auf rDC hochregulierte; der MEK-Inhibitor U0126 senkte wie hier Trametinib die CD80 Expression auf DC. Ott et al. beobachteten keinen Effekt von Vemurafenib auf CD86, während Vemurafenib in der vorliegenden Studie CD86 hochregulierte.

Reife DC sind effektive APC, die mit Hilfe der ko-stimulatorischen Moleküle T-Zellen zur Proliferation stimulieren und so die adaptive anti-Tumor Immunantwort im Patienten induzieren (251). Die Daten implizieren, dass BRAF-Inhibitoren, insbesondere Vemurafenib, die adaptive Immunantwort durch Hochregulation der Ko-Stimulatoren stärker fördern als MEK-Inhibitoren.

Die Studie ist bedingt aussagekräftig, da dieser Effekt nur an drei Kinase-Inhibitoren *in vitro* untersucht wurde und neben DC z. B. auch Makrophagen und B-Zellen zu den APC gehören (252).

Um das Ergebnis zu überprüfen sollten zukünftige Studien den Effekt weiterer BRAF- und MEK-Inhibitoren sowie deren klinisch angewandte Kombinationen auf den Reifungsprozess und die Ko-Stimulatoren der DC (CD80, CD86) und Signalwege (p38, ERK1/2, JNK) untersuchen (253). Ein translationales und daher aussagekräftigeres Ergebnis würde der Vergleich des DC Phänotyps im peripheren Blut von Melanompatienten vor und nach Therapie mit BRAF-, MEK- und einer BRAF/MEK-Kombinationstherapie ergeben.

Vemurafenib und Dabrafenib wirkten sich nicht signifikant auf die Viabilität, Apoptose und Nekrose unreifer (uDC) und reifer DC aus.

Die Studie bekräftigt, dass BRAF-Inhibitoren keinen Effekt auf den Prozentsatz der DC (249) und die Viabilität von PBMC besitzen (254). In Übereinstimmung mit der vorliegenden Studie konnten Ott et al. anhand einer Annexin V Färbung durchflusszytometrisch zeigen, dass Vemurafenib keinen Effekt auf den Prozentsatz apoptotischer DC *in vitro* hatte (250). Hoojikaas et al. beobachteten im murinen Modell, dass die Tumorregression durch BRAF-Inhibitoren nicht durch Apoptose oder Nekrose der Tumorzellen, sondern durch einen zytostatischen Effekt, der Hemmung Tumorzellproliferation, zustande kommt (255).

Untersuchungen von Comin-Anduix et al. offenbarten, dass die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) von Vemurafenib in humanen PBMC zwischen 50 bis 150 µM liegt (254). Vemurafenib besitzt im Patienten eine steady state Plasmakonzentration von 80 µM (47,256) und ist zu 99 % *in vivo* an Serumproteine gebunden (256). Daraus ergab sich eine theoretische Konzentration von 0,8 µM freiem Vemurafenib im Patienten-Plasma. In dieser Studie wurde Vemurafenib mit einer Konzentration von 1 µM *in vitro* eingesetzt. Comin-Anduix et al. fanden, dass 1 µM Vemurafenib nur auf sensitive $BRAF^{V600E}$ mutierte Melanomzellen zytotoxisch wirkte. Dies impliziert, dass die *in vitro* verwendete Konzentration von 1 µM Vemurafenib, die einer

Näherung der Plasmakonzentration entsprach, weit unter der zytotoxischen Konzentration von DC läge. Da das DC Kulturmedium mit 10 % FCS versetzt war, ist anzunehmen, dass die Konzentration an freiem Vemurafenib im Medium aufgrund von Proteinbindung noch geringer war. In zukünftigen Studien sollte daher die Konzentration an freiem Vemurafenib im Medium bestimmt werden. Zudem wäre die Ermittlung Immunzell-spezifischer IC_{50}, insbesondere für DC, durch Viabilitäts- sowie Funktionstests anhand von Proliferationstests ($CD4^+CD25^-$ T-Zellen + DC) aussagekräftiger.

Vemurafenib und Dabrafenib steigerten die metabolische Aktivität in unreifen DC nach 24 Stunden.

Da die DC Kulturen unter Verwendung von PBMC aus gesunden Spendern angesetzt wurden, ist davon auszugehen, dass es sich um $BRAF^{Wildtyp\ (WT)}$ DC handelte. Die Ergebnisse unterstützen Untersuchungen von Delgado-Goni et al., die eine Aktivierung des mitochondrialen Metabolismus und damit eine Reduktion der glykolytischen Aktivität in $BRAF^{V600}$-mutierten humanen Melanomzelllinien, jedoch nicht in $BRAF^{WT}$ humanen Melanomzelllinien zeigten (257). Die Steigerung der metabolischen Aktivität kann anhand des Phänomens der paradoxen Aktivierung erklärt werden. Dies besagt, dass BRAF-Inhibitoren in Wildtyp-Zellen, wie den untersuchten DC, durch RAF Dimerisierung zur paradoxen Aktivierung des MAPK Signalweges und damit einer Verstärkung des Metabolismus führen (258).

Eine weitere Erklärung liefern Studien von Hardeman et al., die für Zellen mit geringer Glucoseverfügbarkeit eine hohe Sensitivität gegenüber BRAF-Inhibitoren nachweisen konnten (259). Melanomzellen benötigen aufgrund hoher Proliferationsraten große Mengen Glucose und reagieren daher sensitiv auf BRAF-Inhibitoren. Da durch die BRAF-Inhibitoren weder eine reduzierte Viabilität noch eine eingeschränkte metabolische Aktivität in den untersuchten DC *in vitro* festzustellen war, ist anzunehmen, dass die untersuchten DC über eine ausreichende Glucoseversorgung verfügten und dadurch nicht sensitiv auf die BRAF-Inhibitoren reagierten.

Die geringe Sensitivität der DC legt nahe, dass in DC anders als in Melanomzellen die metabolische Glykolyse durch die oxidative Phosphorylierung der mitochondrialen Atmung die Versorgung mit Glucose sicherstellt (260). Eine erhöhte metabolische Aktivität der DC unter Vemurafenib und Dabrafenib könnte durch eine Hochregulation der Zytokinproduktion und der Expression der ko-stimulierenden Moleküle CD80/CD86 erklärt werden (250).

Die Aussagekraft der Ergebnisse ist dadurch limitiert, dass im Versuch X-Vivo 15 (17,5 mM Glucose (261)) als DC Kulturmedium verwendet wurde. Der physiologische Nüchternblutzuckerspiegel im Menschen liegt bei 3,5 – 5,5 mM (262). Dies impliziert, dass die untersuchten DC möglicherweise aufgrund einer hyperphysiologischen Glucose-Konzentration

im Kulturmedium weniger sensitiv gegenüber Vemurafenib reagierten. Um den Effekt der BRAF-Inhibitoren auf die metabolische Aktivität und damit auf die Glykolyse zu ermitteln, sollten zukünftige Studien daher Kulturmedien mit physiologischen Glucose-Konzentrationen verwenden.

Die Experimente legten nahe, dass der BRAF-Inhibitor Vemurafenib *in vitro* die Produktion der Zytokine IL-1β, IL-12p70 und TNF-α in reifen DC hochreguliert, während Dabrafenib primär TNF-α und IL-18 induziert. Der MEK-Inhibitor Trametinib senkte die Produktion der Zytokine IL-1β und TNF-α. Weder BRAF- noch MEK-Inhibitoren beeinflussten die Produktion der Zytokine IL-6, IL-8 und IL-10.
Damit stehen die Ergebnisse bezüglich IL12p70 und TNF-α, mit Ausnahme der Abnahme von TNF-α unter Trametinib, im Widerspruch zur Studie von Ott et al. (250). Entsprechend der hier beobachteten *in vitro* Ergebnisse, ermittelten Hong et al. im Serum von BRAF-behandelten Melanompatienten eine zellunspezifische Erhöhung von TNF-α und indifferente IL-6, IL-8 und IL-10 Spiegel (249). Dagegen beobachteten Hong et al. keinen Einfluss der BRAF-Inhibitoren auf die Zytokine IL-12p70 und IL-1β, während in den hier durchgeführten Versuchen die IL-1β und IL-12p70 Produktion Vemurafenib-vermittelt stieg.
TNF-α fördert über den NFκB-Signalweg die DC Ausreifung und über die anti-apoptotischen Proteine Bcl-2/Bxl-xL die DC Viabilität (263). Aktivierte DC stimulieren mittels IL-12 naïve T-Zellen zur Proliferation. Eine Vemurafenib-induzierte Hochregulation beider Zytokine wird durch vorherige Beobachtungen wie die verstärkte Expression der ko-stimulierenden Moleküle CD80/86 auf Vemurafenib-behandelten rDC und die erhöhte metabolische Aktivität in Vemurafenib-behandelten unreifen DC unterstützt. Im Kontrast dazu reduzierte der MEK-Inhibitor Trametinib die TNF-α Produktion und senkte die CD86 Expression auf reifen DC. Dies impliziert, dass der BRAF-Inhibitor Vemurafenib – anders als MEK-Inhibitor Trametinib – die APC-Funktion der rDC IL-12p70 und TNF-α-vermittelt verstärkt, die Proliferation zytotoxischer $CD8^+$ T-Effektorzellen stimuliert und damit die anti-Tumor Immunantwort unterstützt. (264).
Aufgrund des aktivierten MAPK Signalweges regulieren Melanomzellen das proinflammatorische Zytokin IL-6 und das antiinflammatorische Zytokin IL-10 hoch (265). Gemeinsam mit TGF-β hemmt IL-10 die Produktion von IL-12 in DC sowie die Proliferation zytotoxischer $CD8^+$ Effektorzellen. Die BRAF-Inhibitoren Dabrafenib und Vemurafenib hemmen selektiv die $BRAF^{V600}$ Mutation (266,267). Da anzunehmen ist, dass keine BRAF-Mutation in den untersuchten DC vorlag, erfolgte keine selektive Hemmung des MAPK Signalwegs, so dass eine BRAF-Inhibitor Behandlung keinen Einfluss auf die Produktion der Zytokine IL-6 und IL-10 in den analysierten DC zeigte.

Das Zytokin IL-8 kann im Tumor durch Hypoxia und Zytokinstimulation (TNF-α, IL-1β) über den NFκB- und p38MAPK-Signalweg induziert werden und fördert das Tumorwachstum und die Metastasierung (268–270). Obwohl die Zytokine TNF-α und IL-1β unter Vemurafenib Behandlung hochreguliert wurden und eine paradoxe Aktivierung des MAPK-Signalweg nicht ausgeschlossen ist, übten weder BRAF- noch MEK-Inhibitoren einen Effekt auf die IL-8 Produktion in DC aus.

In Tumorzellen wird IL-1β durch die Hochregulation des MAPK Signalweges verstärkt und führt durch COX-2 Induktion in TAF (Tumor-assoziierte Fibroblasten) zur PD-L1/L2-vermittelten T-Zellsuppression (271). Der MEK-Inhibitor Trametinib hemmt den MAPK Signalweg und könnte dadurch IL-1β im Kulturüberstand behandelter reifer DC reduziert haben. Vemurafenib erhöhte IL-1β im Kulturüberstand reifer DC, während Dabrafenib keinen Effekt zeigte. Entsprechend IL-6, IL-8 und IL-10 wäre aufgrund der selektiven Wirkung der BRAF-Inhibitoren auf $BRAF^{V600}$-mutierte Zellen kein MAPK-Signalweg-vermittelter Effekt auf die Zytokinproduktion in Wildtyp-DC zu erwarten. Die IL-1β Induktion könnte aufgrund einer Vemurafenib-vermittelten paradoxen Aktivierung des MAPK-Signalweges verursacht worden sein. Die Vemurafenib-vermittelte Induktion von TNF-α und der Rezeptoren CD80/86 Expression unterstützen diese Erklärung.

Vemurafenib-behandelte ausreifende DC regulierten die relative Genexpression von IL-18 hoch. Die aktive Form der Zytokine IL-1β und IL-18 entsteht mittels Caspase-1 durch eine Aktivierung des Inflammasoms (272). IL-1β kann als DAMP (damage-associated molecular patterns) einen ICD (engl. immunogenic cell death) in Tumorzellen induzieren (273). Dies impliziert, dass Vemurafenib via IL-1β und IL-18 die anti-Tumor Immunität durch einen DC-vermittelten Tumorzelltod unterstützen könnte.

Die Ergebnisse könnten durch Wiederholungsversuche in ihrer Aussagekraft gesteigert und durch zusätzliche Analysen der involvierten Signalwege (wie z. B. der Transkriptionsfaktoren NFκB, STAT4, STAT3, HIFα) bestätigt werden. Nicht alle Zytokine wurden sowohl auf mRNA Ebene (indirekt) als auch auf Proteinebene (direkt) nachgewiesen (wie z. B. IL-18). IL-1β und IL-18 wurden aufgrund einer möglichen Aktivierung des Inflammasoms zusätzlich auf mRNA Ebene untersucht. Zukünftige Studien sollten zusätzlich den Effekt der BRAF-/MEK-Inhibitoren auf das tolerogene Zytokin TGF-β und das IL-12-deregulierende, MDSC-stimulierende Zytokin Prostaglandin E2 (PGE2) untersuchen. Unterschiedliche Versuchsprotokolle der *in vitro* Kultivierung und Ausreifung humaner DC beeinflussen den Phänotyp und die funktionellen Eigenschaften der DC. Ein Vergleich der Daten mit Literaturangaben sollten daher auch die Versuchsprotokolle mit einbeziehen.

Die Studie demonstrierte, dass BRAF-Inhibitoren in unreifen und reifen DC Caspase-1 und damit das Inflammasom aktivierten.
Dabrafenib inhibiert die Proliferation von $BRAF^{V600}$-mutierten Melanomzellen unter anderem via Caspase-3 und-7 (267). Vemurafenib induziert die ROS-Produktion, senkt das Mitochondrien-Potenzial und induziert PUMA- und BIM-vermittelt via Caspase-3 eine Apoptose in Melanomzellen (172,274). ATP im Tumor passiv durch nekrotische Zellen oder aktiv durch apoptotische Zellen freigesetzt. Ghiringhelli et al. beobachteten, dass ATP das NLRP3 Inflammasom und Caspase-1 aktiviert und die Konzentration von IL-1β erhöht (275).
Die via RT-qPCR gemessene erhöhte relative Genexpression von IL-1β und IL-18 in unreifen DC könnte daher durch proteolytische Spaltung via Caspase-1 induziert worden sein. Dies impliziert, dass Vemurafenib Caspase-1-vermittelt die IL-1β Produktion in DC induziert, via IL-1β und TNF-α Induktion die DC Ausreifung unterstützt und damit zur anti-Tumor Immunantwort beiträgt.
Im Gegensatz zu Caspase-3/7 induziert Caspase-1 keinen kontrollierten (Apoptose), sondern einen inflammatorischen Zelltod (Pyroptosis), welcher sich durch eine unkontrollierte Zelllyse und die Freisetzung zellulärer Bestandteile sowie IL-1β und IL-23 auszeichnet (176). Es wird diskutiert, dass dadurch IL-17-produzierende γδ T-Zellen und $CD8^+$ αβ T-Zellen rekrutiert, aktiviert und zur IFN-γ Produktion polarisiert werden und so die anti-Tumor Immunantwort unterstützen (276,277). Um dies zu bestätigen, sollten zukünftige Studien zusätzlich den Effekt von BRAF-Inhibitoren auf IL-23 ermitteln, die Aktivität von Caspase-3 und -7 messen sowie deren zelluläre Substrate (DNA Leiter zum Nachweis zersetzter genomischer DNA) und mögliche DAMPs (wie z. B. ATP, ROS), die als Induktoren des NLRP3 Inflammasoms dienen könnten, bestimmen.

Aktuelle und zukünftige Therapien untersuchen die Kombinationen von BRAF-/MEK-Inhibitoren und Immuntherapien, um durch die Verbindung zweier Therapieansätze und Mechanismen höhere und längere Ansprechraten zu erzielen (278). Laufende Studien untersuchen derzeit nicht nur die Kombination von BRAF-/MEK-Inhibitoren mit (i) Checkpoint-Inhibitoren (wie z. B. anti-PD-1, anti-CTLA-4, anti-CD137, IL-1-Blocker), sondern auch mit (ii) adoptivem T-Zelltransfer und (iii) Zytokinen (IL-2, IFNα2b) (279). Eine Herausforderung neuer Studien wird es sein die Dosierung, die passende Kombination, den optimalen Zeitpunkt des Therapiebeginns und die Reihenfolge/Sequenz der Therapien aufeinander abzustimmen. Zudem ist zu beachten, dass neben dem erhofften Synergismus der Wirkeffekte, auch eine Addition der toxischen Nebenwirkungen zu erwarten ist. Da besonders ein vorhandenes, intaktes Immunsystem von den Immuntherapien via Aktivierung von $CD8^+$ T-Effektorzellen profitiert, sind solche Kinase-

Inhibitoren zu bevorzugen, die keinen negativen Effekt auf T-Zellstimulierende APC wie z. B. DC zeigen.

Die durchgeführten Experimente ergaben, dass BRAF-Inhibitoren, insbesondere Vemurafenib, (i) die Expression der ko-stimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 auf DC verstärken, (ii) die Viabilität, Apoptose und Nekrose nicht beeinflussen, (iii) die metabolische Aktivität in unreifen DC steigern und (iv) die Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL12p70, TNF-α, (IL-1β) in reifen DC und IL-18 in unreifen DC anheben. Der MEK-Inhibitor Trametinib senkte dagegen die Expression der ko-stimulatorischen Moleküle und erhöhte nur die IL12p70 Produktion. Insgesamt unterstützte der $BRAF^{V600}$-spezifische Inhibitor Vemurafenib reife DC in ihrer Rolle als T-Zell-stimulierende APC. Selektive Kinase-Inhibitoren mit hoher Spezifität und Avidität weisen aufgrund geringer unspezifischer Nebeneffekte sowohl weniger toxische Nebenwirkungen als auch ein größeres therapeutisches Fenster auf (249). Bezugnehmend auf die Versuchsergebnisse sind daher $BRAF^{V600}$-spezifische-Inhibitoren wie z. B. Vemurafenib gegenüber MEK-Inhibitoren in einer Kombinationstherapie aus Kinase-Inhibitoren und Immuntherapeutika zu präferieren.

4.3. Regulatorische Immunzellen in der Psoriasis – Funktionelle Qualität vor Quantität

Psoriasis (Schuppenflechte) ist eine chronische, inflammatorische, rezidivierende Autoimmunerkrankung der Haut (280,281). Die Psoriasis steht aufgrund ihrer hohen und steigenden Prävalenz, der folgenreichen Komorbidität und der eingeschränkten Lebensqualität aktuell vermehrt im Fokus der Forschung. Die Prävalenz der Psoriasis liegt zwischen von 0,09 % in Tansania (282) und 11,43 % in Norwegen (283) (Deutschland, 2,53 % (284)). Laut WHO litten 2016 circa 100 Millionen Menschen weltweit an Psoriasis (75). Zu den Komorbiditäten der Psoriasis zählen unter anderem systemische Entzündungen und kardiovaskuläre Erkrankungen (wie z. B. ischämische Herzerkrankungen, Schlaganfall), die zur Haupttodesursache in Deutschland gehören (285). Statistisch erkranken 20 – 30 % der Psoriasis-Patienten zusätzlich an Psoriasis arthritis (PsA) (286); in der vorliegenden Studie litten 14 % an PsA. Die Lebensqualität der Psoriasis-Patienten wird durch Stigmatisierung und psychische Erkrankungen wie z. B. Depressionen beeinträchtigt.

Die Pathogenese der Psoriasis basiert auf einer Autoimmunreaktion (280)(287). DC in der Dermis präsentieren Autoantigene, aktivieren T-Zellen, induzieren eine autoantigen-spezifischen T-Zellhyperproliferation und die Produktion inflammatorischer Zytokine in T-Zellen (288)(289). In gesunden Patienten wird das Immunsystem durch antiinflammatorische Zytokine und

regulatorische Immunzellen im Gleichgewicht, der Homöstase, gehalten (290). Aktuelle Therapien blockieren direkt oder indirekt durch Eingriff in die Signalkaskade die Produktion inflammatorischer Zytokine, um die T-Zellhyperproliferation zu regulieren (291). Die suppressive Kapazität regulatorischer T-Zellen ist in Psoriasis-Patienten durch Reduktion des Foxp3 Signalweges eingeschränkt (292). Yang et al. beobachteten, dass Treg aus Psoriasis-Patienten im Gegensatz zu Treg aus gesunden Spendern eine allogene Proliferation psoriatrischer T-Effektorzellen nicht supprimierten (293). Zudem wiesen Cao (294) und Soler et al. (180) 2016 eine reduzierte suppressive Kapazität in mononukleären myeloiden Suppressorzellen (wie z. B. M-MDSC) nach.

Aufgrund der hohen Prävalenz und Schwere der Folgeerkrankungen der Psoriasis ging die vorliegende Studie den Fragen nach, (i) welchen Effekt topische und systemische Therapien auf regulatorische Zellen des peripheren Blutes wie MDSC und Treg zeigen und, ob (ii) diese Effekte in Abhängigkeit zum Schweregrad der Erkrankung (PASI) stehen. Dazu wurden der Prozentsatz der Treg an $CD4^+$ T-Zellen, die suppressive Kapazität und Aktivität der Treg sowie die Prozentsätze verschiedener MDSC Populationen im peripheren Blut von Psoriasis-Patienten mit unterschiedlichen Schweregraden unter systemischer wie topischer Therapie durchflusszytometrisch ermittelt. Als translationales Ziel untersuchte die Studie Treg und MDSC Prozentsätze auf ihr Potenzial als prognostische Biomarker der Psoriasis.

Die Daten ergaben, dass der Prozentsatz der Treg an $CD4^+$ T-Zellen im peripheren Blut der Psoriasis-Patienten sowohl unabhängig vom Schweregrad der Psoriasis als auch vom Therapieregime war und dem Prozentsatz der Treg in gesunden Spendern glich. Ebenso verhielt es sich mit dem Prozentsatz aktivierter $GARP^+$ Treg.
Die suppressive Kapazität der Treg, gemessen als HLA-DR^+ Treg, war in Psoriasis-Patienten unter systemischer Therapie vergleichbar mit der in gesunden Spendern und signifikant höher als in Patienten unter topischer Therapie. Psoriasis-Patienten unter topischer Therapie mit PASI > 20 wiesen höhere Prozentsätze an Treg, $GARP^+$ und HLA-DR^+ Treg auf als Psoriasis-Patienten mit PASI < 10 oder PASI 10 – 20.
Die Auswertung der MDSC Subpopulationen zeigte eine Erhöhung der $CD14^+CD15^-CD33^{hi}$HLA-DR^{low} M-MDSC und Lin^-HLA-$DR^{low}CD11b^+CD33^+$ phänotypisch unreifen (engl. early) E-MDSC verglichen mit gesunden Spendern, unabhängig vom Therapieregimen. $CD14^+CD124^+$ M-MDSC waren in Psoriasis-Patienten unter topischer Therapie signifikant höher als unter systemischer Therapie. Patienten unter topischer Therapie mit einem schweren Erkrankungsgrad (PASI > 20) wiesen höhere Prozentsätze $CD14^+CD124^+$ M-MDSC und mit PASI ≥ 10 höhere Prozentsätze Lin^-HLA-$DR^{low}CD11b^+CD33^+$ E-MDSC auf.

Die Studie ergab, dass (i) die Therapieregime (topisch vs. systemisch) einerseits keinen Effekt auf die Prozentsätze, sondern vielmehr auf die Phänotyp-assoziierte Funktion der Treg besaßen, (ii) die Prozentsätze der $CD14^+CD15^-CD33^{hi}HLA\text{-}DR^{low}$ M-MDSC und $Lin^-HLA\text{-}DR^{low}CD11b^+CD33^+$ E-MDSC in Psoriasis-Patienten erhöht waren und (iii) Psoriasis-Patienten unter topischer Therapie mit PASI > 20 höhere Prozentsätze an $CD14^+CD124^+$ M-MDSC, Treg, $GARP^+$ und $HLA\text{-}DR^+$ Treg aufwiesen als Patienten mit PASI < 20.
Als potenzielle prognostische Biomarker taten sich die Prozentsätze der $HLA\text{-}DR^+$ Treg, $CD14^+CD124^+$ M-MDSC und $Lin^-HLA\text{-}DR^{low}CD11b^+CD33^+$ E-MDSC hervor.

Naive T-Zellen differenzieren unter dem Zytokin TGF-β und der Stimulation des T-Zellrezeptors (TCR) zu peripheren Treg aus. Die Transkription des Transkriptionsfaktors NFAT und des Proteins Smad3 wird erhöht, NFAT und Smad3 binden an die Promotorregion CNS1 des Treg Transkriptionsfaktors Foxp3 und induzieren die Foxp3 Expression (295,296). Das proinflammatorischen Zytokinmilieu (IL-6, IL-21, IL-23, TGF-β) reguliert in Treg den Transkriptionsfaktor RORγt hoch, durch welchen Treg in IL-17-produzierende IL-17/Treg und schließlich in Th17 Zellen umgewandelt werden. Dadurch nimmt der Prozentsatz der suppressiven $Foxp3^+$ Treg ab und die chronische Entzündung der Psoriasis wird durch proinflammatorische Th17 Zellen begünstigt (297,298).
In der vorliegenden Studie besaßen gesunde Spender und Psoriasis-Patienten unter systemischer Therapie vergleichbare Treg Prozentsätze an $CD4^+$ T-Zellen.
Die Prozentsätze der Treg in Psoriasis-Patienten variierten (299,300). Auf der einen Seite stehen die vorliegenden Ergebnisse im Widerspruch zur Studie von Owczarczyk et al., welche einen Anstieg der Treg Prozentsätze unter Therapie verzeichneten (292). Auf der anderen Seite bestätigte die vorliegende Studie Ergebnisse von Saito et al. (301) und Furuhashi et al. (302).
Im Folgenden werden zwei Erklärungsansätze für die aktuell vorgelegte Studie diskutiert: Zum einen könnte sich der Treg Prozentsatz in gesunden Spendern und in therapienaiven Psoriasis-Patienten nur vernachlässigbar unterscheiden, zum anderen könnte eine Therapie-vermittelte Normalisierung des Treg Prozentsatzes stattgefunden haben.
Die erste Erklärung impliziert, dass in Psoriasis-Patienten unter Hyperproliferation der T-Zellen keine Gegensteuerung zur überschießenden Immunreaktion z. B. in Form einer vermehrten Einwanderung von Treg in die psoriatrischen Läsionen stattfindet. Dies würde die Dysregulation der Homöostase des Immunsystems erklären, die wiederum zum Krankheitsbild der Psoriasis führt. Die zweite Erklärung veranschaulicht die erste Schwäche der Studie. Durch das Fehlen der Kontrollgruppe therapienaiver Patienten konnte kein direkter Vorher-nachher Therapieeffekt ermittelt werden. So wurde in der Literatur unter systemischer Therapie mit Etanercept eine

Normalisierung der Treg Aktivität im peripheren Blut beobachtet (303). In dieser Studie erhielten nur 10 von 111 Patienten Etanercept als systemische Therapie. Der Treg Prozentsatz von 2 % in Etanercept-Patienten entsprach dem Prozentsatz in gesunden Spendern. Dies könnte implizieren, dass hier unabhängig vom Therapieregime/Medikament eine Normalisierung der Treg Prozentsätze erfolgte.

Die zweite Schwäche der Untersuchungen betrifft die Art der Messung des Therapieeffektes unter topischer Therapie. Lokal auftretende quantitative wie funktionelle Veränderungen der Immunzellen der Haut spiegeln sich unter Umständen nicht systemisch im peripheren Blut wieder (292). Folglich konnte die durchgeführte Studie den Therapieeffekt unter topischer Therapie nicht eindeutig beurteilen und ist diesbezüglich auf die systemische Therapie limitiert. Diese Einschränkung wäre durch eine zusätzliche Analyse der topisch behandelten Hautläsionen zu beheben.

Zur weiteren Analyse erhob die Studie die Hypothese, dass die topische Therapie nur vernachlässigbare systemische Effekte im peripheren Blut zeigt. Demnach wäre der Treg Prozentsatz unter topischer Therapie vergleichbar mit dem in therapienaiven Patienten. Da weder die topische („therapienaive“), noch die systemische Therapie die Treg Prozentsätze beeinflusste, wies dies auf die erste Erklärung hin: Die Treg Prozentsätze im peripheren Blut von gesunden Spendern und Psoriasis-Patienten sind vergleichbar und wurden weder durch topische noch durch systemische Therapien beeinflusst.

Das Ergebnis könnte durch zukünftige Studien mit Hilfe einer Kontrollgruppe therapienaiver Patienten bestätigt werden. Eine zusätzliche Erhebung der Treg Prozentsätze in Hautläsionen und gesunden Hautarealen würde zudem einen direkten Vergleich zu den Treg Prozentsätzen im peripheren Blut ermöglichen. Für gesunde Hautareale wurden sowohl höhere Treg Prozentsätze als in psoriatrischen Läsionen (304) als auch geringere beschrieben (305).

Derzeitige Forschungsarbeiten führen als Ursache variierender Studienergebnisse die verschiedenen Phasen (akute vs. chronische Psoriasis), Typen und Therapien der Psoriasis an (292,306). Zur diskutierten Studie lagen keine Angaben zu den Phasen der Psoriasis-Patienten vor. Bezüglich der Typen ist zu erwähnen, dass 77 % der Patienten am gleichen Psoriasis-Typ, der Psoriasis vulgaris, litten. Die vorliegende Studie verglich den Gesamteffekt der topischen und systemischen Therapien und nicht den Effekt der einzelnen Medikamente.

In Hinblick auf den Schweregrad der Erkrankung (PASI) konnte die Studie keinen grundsätzlichen Zusammenhang mit dem Prozentsatz der Treg an $CD4^+$ T-Zellen in PBMC nachweisen. Jedoch tendierten Patienten unter topischer Therapie mit einem hohen PASI (> 20) zu einem höheren Treg Prozentsatz als Patienten mit niedrigem PASI (< 10).

Die Studie bestätigt daher Ergebnisse von Zhang et al., die einen Anstieg Foxp3$^+$ Treg im peripheren Blut mit steigendem PASI beobachteten (300). Zeitgleich stieg der Prozentsatz der Th17-Zellen an. Interessanterweise kehrte sich diese Korrelation in den Läsionen der Haut um. Die Umkehrung der Korrelation verdeutlicht die Wichtigkeit der Entnahme von Hautproben (300). Im Kontrast dazu fanden Karamehic et al. ab einem PASI > 12 geringere Treg Prozentsätze (299).
Ein Anstieg der Treg Prozentsätze mit steigendem Schweregrad der Erkrankung (PASI) impliziert, dass das Immunsystem der Psoriasis-Patienten versucht der zunehmenden T-Zellhyperproliferation entgegenzuwirken, indem es Treg im peripheren Blut hochreguliert. Ein Anstieg der Treg könnte auch damit erklärt werden, dass Treg daran gehindert werden vom peripheren Blut in die psoriatrischen Läsionen abzuwandern.
Patienten unter systemischer Therapie wiesen überwiegend schwächere Erkrankungsgrade (PASI < 10) auf. Ein Therapieansprechen würde den niedrigen PASI erklären. Da die Anzahl der Psoriasis-Patienten unter systemischer Therapie mit starkem Erkrankungsgrad (< 20) sehr gering war (n = 3), konnte ein Therapieeffekt auf den PASI Wert unter systemischer Therapie nicht analysiert werden.

Die Studie ermittelte in Psoriasis-Patienten unter topischer Therapie niedrige Prozentsätze stark suppressiver HLA-DR$^+$ Treg, während die Prozentsätze unter systemischer Therapie höher und vergleichbar mit denen in gesunden Spendern waren.
Sugiyama et al. maßen im allogenen Proliferationsassay eine höhere suppressive Kapazität für CD4$^+$CD25^{high} Zellen aus gesunden Spendern als für solche aus therapienaiven Psoriasis-Patienten (179). Gesunde Spender wiesen höhere Prozentsätze HLA-DR$^+$ Treg auf als therapienaive Psoriasis-Patienten (179). Die vorliegende Studie bestätigte diese Beobachtung für Psoriasis-Patienten unter topischer Therapie. Dies könnte auf die lokale Wirkung der topischen Therapie zurückzuführen sein.
Psoriasis-Patienten unter systemischer Therapie wiesen vergleichbare Prozentsätze an Treg und suppressiven HLA-DR$^+$ Treg wie gesunde Spender auf. Tran et al. konnten zeigen, dass TGF-β induzierte Treg die T-Zellproliferation *in vitro* nicht supprimierten (307,308). Eine mögliche Normalisierung des Prozentsatzes der HLA-DR$^+$ Treg unter systemischer Therapie auf den Prozentsatz der gesunden Spender deutete darauf hin, dass die Treg Dysfunktion behoben wurde. Die vermehrte Expression des Transkriptionsfaktors Foxp3 ist entscheidend für die Entwicklung immunsuppressiver Eigenschaften in Treg (309,310). In Psoriasis-Patienten wäre demnach nicht der Prozentsatz der Treg, sondern vielmehr deren Funktionalität beeinträchtig. Die vorliegende Studie impliziert folglich ein systemisches Therapieansprechen, durch dass die

Funktionalität der Treg wiederhergestellt und der PASI der Psoriasis-Patienten gesenkt wurde. Zukünftige Studien könnten dies durch die Messung der Prozentsätze der RORγt$^+$ Treg und der Foxp3$^+$ Treg in Psoriasis Patienten (therapienaive vs. systemische Therapie) und gesunden Spendern untersuchen. Ein syngener oder allogener Suppressionsassay mit CD4$^+$CD25$^-$ T-Zellen und Treg, die vor und nach systemischer Therapie aus Psoriasis-Patienten gewonnen werden, könnte suppressive Kapazität der Treg validieren. Das Ergebnis wäre bestätigt, wenn die Treg nach systemischer Therapie die T-Zellproliferation stärker supprimieren als die Treg vor Therapie.

Unter topischer Therapie tendierten HLA-DR$^+$ Treg mit steigendem Schweregrad der Erkrankung (PASI) zuzunehmen. Die Studie zeigte erstmals diesen Zusammenhang unter Therapie. Sugiyama et al. zeigten erhöhte Prozentsätze stark suppressiver Treg in therapienaiven Psoriasis-Patienten (179); der PASI der Patienten wurde nicht angegeben.
Die vorliegende Studie impliziert, dass das Immunsystem mit steigendem Erkrankungsgrad nicht den Prozentsatz der Treg generell, sondern insbesondere stark suppressive Treg systemisch hochreguliert, um der steigenden T-Zellhyperproliferation entgegenzuwirken.
In den topisch therapierten psoriatrischen Hautläsionen sollte diese Tendenz lokal ermittelt werden, da anzunehmen ist, dass der Therapieeffekt lokal stärker ausgeprägt ist als im peripheren Blut.

Psoriasis-Patienten unter systemischer Therapie wiesen niedrigere Prozentsätze aktivierter GARP$^+$ Treg verglichen mit gesunden Spendern auf, während unter topischer Therapie höhere Prozentsätze gemessen wurden. Die Prozentsätze der GARP$^+$ Treg waren unabhängig vom Schweregrad der Erkrankung (PASI).
Dieser Zusammenhang wurde durch die Studie erstmals aufgeführt. Aufgrund des chronisch-entzündlichen Milieus der Psoriasis können TGF-β-vermittelt Foxp3$^+$ Treg mit schwacher suppressiver Kapazität induziert werden (307). Laut Wang et al. exprimieren TGF-β-induzierte Foxp3$^+$ Treg nicht zwangsläufig den Treg Aktivierungsmarkers GARP (311). So wiesen gesunde Spender und Psoriasis-Patienten unter systemischer Therapie zwar vergleichbare Prozentsätze Foxp3$^+$ Treg auf. Der Prozentsatz GARP$^+$ Treg war in gesunden Spendern jedoch höher als in Psoriasis-Patienten unter systemischer Therapie. Der niedrige Prozentsatz GARP$^+$ Treg und starke interindividuelle Unterschiede zwischen den Patienten erschwerten den Vergleich.
In der Literatur wird diskutiert, dass eine niedrige GARP Expression auf Treg auf eine Instabilität des Treg Phänotyps hindeuten könnte (312). Demnach besäßen Psoriasis-Patienten unter systemischer Therapie im Vergleich zu gesunden Spendern einen instabileren Treg Phänotyp. Diese Beobachtung unterstützt die Beobachtung, dass Treg in Psoriasis-Patienten mangelhafte

funktionelle Eigenschaften besitzen.
GARP bindet latentes TGF-β, wodurch TGF-β durch proteolytische Spaltung oder Konformationsänderung aktiviert wird (20,311). Als proinflammatorisches Zytokin unterstützt TGF-β das Krankheitsbild der Psoriasis. Vor diesem Hintergrund würde eine niedrige GARP Expression auf Treg in Psoriasis-Patienten unter Systemtherapie zu einer reduzierten GARP-vermittelten Aktivierung von latentem TGF-β führen und nicht zum chronisch entzündlichen Mikromilieu der Psoriasis und der Entwicklung von Th17 Zellen beitragen. Die Rolle der $GARP^+$ Treg ist in weiterführenden Studien anhand der involvierten Signalwege und Effektorzytokine (wie z. B. STAT5/Foxp3, STAT3/RORγt) zu untersuchen.

Aufgrund des chronisch entzündlichen Milieus der Psoriasis wird die Myelopoiesis verstärkt, fördert eine pathologische Differenzierung der unreifen myeloiden Zellen, die Einwanderung und die Aktivierung immunsuppressiver MDSC (313–317). Auf die untersuchten MDSC Subpopulationen soll hier aufgrund unterschiedlicher bisheriger Studienlage und Funktion im Einzelnen eingegangen werden.
Unter systemischer Therapie war der Prozentsatz der $CD14^+CD124^+$ M-MDSC vergleichbar mit dem in gesunden Spendern, während Psoriasis-Patienten unter topischer Therapie einen signifikant höheren Prozentsatz der $CD14^+CD124^+$ M-MDSC aufwiesen.
In der Literatur liegen bisher keine Daten zum Prozentsatz der $CD14^+CD124^+$ M-MDSC in PBMC in Psoriasis-Patienten vor. Laut Youn et al. zeigten $CD124^-$ und $CD124^+$ MDSC, die aus tumortragenden Mäusen isoliert wurden, keinen Unterschied in ihrer suppressiven Kapazität (318). Die Autoren schlossen daraus, dass CD124 nicht in den regulatorischen Mechanismus der MDSC involviert ist. Demnach würden Psoriasis-Patienten von einem Anstieg der $CD14^+CD124^+$ M-MDSC nicht profitieren, da diese keinen suppressiven Effekt auf die T-Zellhyperproliferation ausüben würden.
Der überwiegend niedrige PASI (PASI < 10) und die Beobachtung, dass die Prozentsätze der $HLA\text{-}DR^+$ Treg unter systemischer Therapie vergleichbar mit denen in gesunden Spendern waren, legen nahe, dass Psoriasis-Patienten unter systemischer Therapie auf die Therapie ansprachen. Da die Prozentsätze der $CD14^+CD124^+$ M-MDSC unter systemischer Therapie vergleichbar mit denen in gesunden Spendern waren, könnte dies einen Therapieeffekt darstellen. Die Tendenz zu geringeren Prozentsätzen $CD14^+CD124^+$ M-MDSC bei einem PASI < 10 im Vergleich zu PASI > 20 unter topischer Therapie stützt diese Vermutung.
Aufgrund ihrer funktionellen Plastizität können unreife myeloide Zellen wie z. B. MDSC zu anderen Zellen differenzieren und durch Zytokin-/ Chemokinproduktion Monozyten, Neutrophile sowie (dysregulierter) Treg rekrutieren, um dadurch das chronisch entzündliche Milieu der

Psoriasis aufrecht zu erhalten (319–321). Sofern die $CD14^+CD124^+$ M-MDSC dem Mikromilieu der Psoriasis förderlich sind, wäre eine Reduktion der $CD14^+CD124^+$ MDSC in Psoriasis-Patienten unter systemischer Therapie ein Zeichen des Therapieerfolgs.
Dieser Therapieeffekt könnte anhand funktioneller Untersuchungen bezüglich der Zytokinproduktion (z. B. CCR5, TGF-β, IL-1β, IL-8, IL-23, IL-17) und der Transkriptionsfaktoren in therapienaiven und Psoriasis-Patienten unter systemischer Therapie eingehender untersucht werden. Ein Suppressionsassay mit $CD4^+$ T-Zellen und $CD14^+CD124^+$ MDSC aus therapienaiven Psoriasis-Patienten bzw. Psoriasis-Patienten unter systemischer Therapie könnte die suppressive Kapazität der MDSC untersuchen.

$CD15^-CD14^+CD33^{hi}HLA\text{-}DR^{low/-}$ M-MDSC waren in Psoriasis-Patienten, insbesondere unter systemischer Therapie, verglichen mit gesunden Spendern hochreguliert.
Dieses Ergebnis bestätigt Studien, die erhöhte Prozentsätze $HLA\text{-}DR^{low/-}CD14^+$ M-MDSC in PBMC von Psoriasis-Patienten ermittelten (180,294). Die Population der $HLA\text{-}DR^{low/-}CD14^+$ M-MDSC wurde in dieser Studie entsprechend den Empfehlungen zur Vereinheitlichung der durchflusszytometrischen Eingrenzung der MDSC durch weitere Oberflächenmoleküle ($CD15^-CD33^{hi}$) genauer definiert (130). Da $CD14^+CD15^-HLA\text{-}DR^{-/low}$ M-MDSC im Tumormikromilieu suppressive Eigenschaften aufweisen, könnte ein Anstieg dieser MDSC die T-Zellhyperproliferation via IL-17/Arginase 1 und iNOS/IFN-γ Signalweg supprimieren, den PASI senken und damit ein Therapieansprechen implizieren (134,321).
Entsprechend tendierten Psoriasis-Patienten in der vorliegenden Studie mit geringem PASI zu hohen Prozentsätzen $CD14^+HLA\text{-}DR^{low}CD15^-CD33^{hi}$ M-MDSC. Der Prozentsatz der $HLA\text{-}DR^{low/-}CD14^+$ M-MDSC verhielt sich damit gegenläufig zum Prozentsatz der immunsuppressiven Treg, welche mit steigendem PASI anstiegen. Dagegen beobachteten Soler et al., dass hohe Prozentsätze $HLA\text{-}DR^{low/-}CD14^+$ M-MDSC und mit einem hohen PASI korrelierten (180). Die Ergebnisse könnten aufgrund der Messung zweier unterschiedlicher MDSC-Subpopulationen, $CD14^+HLA\text{-}DR^{low}$ ($CD15^-CD33^{hi}$) M-MDSC vs. $HLA\text{-}DR^{low/-}CD14^+$ M-MDSC, differieren.
Funktionelle Untersuchungen von Soler et al. demonstrierten, dass $CD14^+HLA\text{-}DR^{low/-}$ M-MDSC aus Psoriasis-Patienten die Proliferation autologer $CD8^+$ T-Zellen schwächer supprimierten als M-MDSC aus gesunden Spendern (180). Folglich würden MDSC wie Treg in der Psoriasis eine verminderte suppressive Kapazität besitzen, wodurch Patienten von einer Einwanderung dysregulierter $CD15^-CD14^+CD33^{hi}HLA\text{-}DR^{low/-}$ M-MDSC weniger profitieren würden. Dies könnte erklären, wieso unter systemischer Therapie nur ein leichter Anstieg der $CD15^-CD14^+CD33^{hi}HLA\text{-}DR^{low/-}$ M-MDSC Prozentsätze zu beobachten war.
Im murinen Modell konnten Schlecker et al. zeigen, dass M-MDSC in CC5-abhängiger Weise

Treg rekrutieren (184). Psoriatrische MDSC können einen regulatorischen Phänotyp in T-Effektorzellen induzieren (180,183). Andere Studien demonstrierten, dass IL-23 produzierende psoriatrische MDSC mit Hilfe der gesteigerten Treg Prozentsätze die Differenzierung zu IL-17/Treg und Th17 Zellen begünstigen (294,322). In der vorliegenden Studie konnte kein Zusammenhang zwischen dem Prozentsatz der $CD15^{-}CD14^{+}CD33^{hi}HLA\text{-}DR^{low/-}$ M-MDSC und dem Prozentsatz der Treg beobachtet werden.
Zukünftige Studien sollten die Zytokinproduktion und die suppressive Kapazität der $CD15^{-}CD14^{+}CD33^{hi}HLA\text{-}DR^{low/-}$ M-MDSC bestimmen. Dies könnte eine Therapie-induzierte Wiederherstellung der suppressiven Kapazität der $CD15^{-}CD14^{+}CD33^{hi}HLA\text{-}DR^{low/-}$ MDSC bestätigen.

Psoriasis-Patienten unter systemischer und topischer Therapie besaßen höhere Prozentsätze $Lin^{-}HLA\text{-}DR^{low}CD11b^{+}CD33^{+}$ E-MDSC als gesunde Spender.
In der Literatur lagen keine Daten zu Prozentsätzen der E-MDSC Subpopulation in PBMC aus Psoriasis-Patienten vor. Ein hoher Prozentsatz der „frühen“, unreifen $Lin^{-}HLA\text{-}DR^{low}CD11b^{+}CD33^{+}$ E-MDSC bestätigt Beobachtungen, denen zufolge das chronisch inflammatorische Milieu der Psoriasis die Myelopoiesis fördert und unreife zelluläre Phänotypen induziert (323). Sowohl für E-MDSC als auch M-MDSC wurden im Tumormikromilieu suppressive Eigenschaften dokumentiert (134).
Ein hoher Prozentsatze immunsuppressiver E-MDSC könnte der überschießenden Immunreaktion der Psoriasis entgegenwirken. So wiesen Psoriasis-Patienten unter topischer Therapie mit PASI > 20 erhöhte E-MDSC Prozentsätze auf als Psoriasis-Patienten mit PASI < 10.

In der vorliegenden Studie fehlte Kontrollgruppe unbehandelter, therapienaiver Patienten. Durch diese Gruppe hätte ein Vorher-nachher-Therapieeffekt besser beschrieben werden können.
Da die Probenentnahme zu unterschiedlichen Zeitpunkten erfolgte, sind sowohl Patienten zu Therapiebeginn als auch solche, die schon länger eine Therapie erhielten, in die Studie eingeschlossen worden. Daher ist anzunehmen, dass die Therapieeffekte in den Psoriasis-Patienten unterschiedlich stark ausgeprägt waren.
Es war nicht bekannt, ob die Patienten sich in der akuten oder chronischen Phase der Psoriasis befanden. Die Studie gibt den durchschnittlichen Prozentsatz der Zellpopulation in PBMC aus Psoriasis-Patienten unter topischer und systemischer Therapie an.

Ein wichtiger Ansatzpunkt für zukünftige Therapien bleibt die Neutralisierung inflammatorischer Zytokine (74). Neue monoklonale Antikörper senken nicht nur die T-Zellhyperproliferation,

sondern modulieren auch die Treg Dysregulation sowie das proinflammtorische Milieu der Psoriasis. Seit 2019 ist der anti-IL23p19 humanisierte monoklonale Antikörper (IgG1 Isotyp) Risankizumab (Skyrizi®) auf dem Markt, welcher durch IL-23 Blockade die Induktion der IL-17/Treg hemmt (324). Bimekizumab, ein humanisierter monoklonaler Antikörper zur Blockade des Zytokins IL17A/F wird in einer Phase III Studie (NCT03766685) zur Behandlung der Psoriasis vulgaris untersucht. Durch die IL-17-Blockade wird die Th17 Antwort und die IL17/Treg Induktion gesenkt. 2018 erweiterte die EMA die Zulassung von Certolizumab Pegol (Cimzia®) auf Psoriasis vulgaris. Cimzia ist ein humanisiertes Fab'-Fragment, das an Polyethylenglykol (PEG) gebunden ist, und mildert durch Blockade von TNF-α das proinflammatorischen Milieu der Psoriasis (325). Im murinen Modell mit Proteoglykan-induzierter Arthritis (PGIA) konnte durch adoptiven Transfer von Knochenmarks-MDSC die T-Zellantwort und die Produktion proinflammatorischer Zytokine (wie z. B. IFN-γ, IL-17, TNF-α) reduziert werden (326). Da die T-Zellaktivierung durch PD-L1$^+$ MDSC inhibiert werden konnte, wird der Einsatz von anti-PD-L1 Checkpoint-Inhibitoren in der Psoriasis diskutiert (327). Dagegen spricht, dass Immuntherapeutika dermatologische Komplikationen als Nebenwirkung aufweisen (328).

Die durchgeführte Studie deutete darauf hin, dass Lin$^-$HLA-DR^{low}CD11b$^+$CD33$^+$ E-MDSC und CD15$^-$CD14$^+$CD33^{hi}HLA-DR$^{low/-}$ M-MDSC durch die Psoriasis-induzierte Notfall-Myelopoiesis und aufgrund ihrer immunsuppressiven Eigenschaften in Psoriasis-Patienten hochreguliert waren. Die Studienergebnisse legen nahe, dass die suppressive Kapazität der Treg in Psoriasis-Patienten unter systemischer Therapie wiederhergestellt wurde.
Psoriasis-Patienten unter topischer Therapie mit PASI > 20 wiesen höhere Prozentsätze an Treg, GARP$^+$ Treg, HLA-DR$^+$ Treg, CD14$^+$CD124$^+$ M-MDSC und Lin$^-$HLA-DR^{low}CD11b$^+$CD33$^+$ E-MDSC auf als Patienten mit PASI < 10 und sollten in weiterführenden Untersuchungen als potenzielle prognostische Marker der Psoriasis untersucht werden.
Die vorliegenden Studienergebnisse verdeutlichen, dass zur erfolgreichen Therapie nicht nur eine quantitative Steigerung, sondern vor allem auch eine Wiederherstellung der immunsuppressiven Funktionen der Treg und MDSC nötig ist.

5. Zusammenfassung

Bei immunologisch vermittelten Krankheitsbildern, wie Tumor- und Autoimmunerkrankungen spielt das immunologische Mikromilieu eine wesentliche Rolle für den Krankheitsverlauf, die Therapiewahl und den Verlauf von Biomarkern. Das maligne Melanom verursacht 90 % der Hautkrebs-Toten in Deutschland, steigt in seiner Inzidenz und wird mit Checkpoint-Inhibitoren und Kinase-Inhibitoren behandelt(42,43,46). Um Therapieansprecher und Nicht-Ansprecher der Checkpoint-Inhibitoren früh zu erkennen, wurden in der vorliegenden Studie prädiktive (i) zelluläre und (ii) molekulare Biomarker im peripheren Blut von Melanompatienten untersucht:

Bei Therapieansprechern waren vor Therapiebeginn (i) die Lymphozyten, bestehend aus IFN-γ^+, proliferierenden $CD4^+$ und zytotoxischen $CD8^+GZMB^+$ T-Effektorzellen, erhöht und die Zahl der immunsuppressiven Zellen, gemessen als regulatorische T-Zellen (Treg) und Arginase 1^+ polymorphonukleäre myeloide Suppressorzellen (PMN-MDSC), erniedrigt. (ii) Die Therapieansprecher wiesen im peripheren Blut niedrige Konzentrationen an molekularen Tumormarkern wie z. B. LDH und S100 sowie an Thrombozyten auf.

Der Kinase-Inhibitor (Vemurafenib, Dabrafenib bzw. Trametinib) hemmte *in vitro* BRAF- bzw. MEK-Kinasen, bremste die unkontrollierte Zellteilung der Melanomzellen und aktivierte gesunde dendritische Zellen (DC). So exprimierten reife DC verstärkt die ko-stimulierenden Moleküle CD80/CD86 (Durchflusszytometrie). Unreife DC regulierten im MTT-Assay den Metabolismus und gemäß CBA, RT-qPCR die Produktion der Zytokine IL-12p70 und TNF-α hoch. Unreife und reife DC waren unvermindert viabel, steigerten aber die Aktivität des proinflammatorischen Enzyms Caspase-1 (Inflammasom) und die Transkription der Zytokine IL-1β und IL-18. Diese Ergebnisse befürworten eine sequenzielle Kombinationstherapie des malignen Melanoms mit Kinase- und Checkpoint-Inhibitoren: (i) Kinase-Inhibitoren hemmen das Tumorwachstum, steigern die Freisetzung von Neoantigenen und unterstützen DC in der Aktivierung Tumorantigen-spezifischer T-Zellen. (ii) Checkpoint-Inhibitoren verstärken die Zellteilung der T-Zellen und damit die Anti-Tumor Immunantwort.

Bei Autoimmunerkrankungen, wie der Psoriasis, drosseln immunsuppressive Zellen wie Treg und MDSC die überschießende Immunantwort. In der vorliegenden Studie bei Patienten mit Psoriasis stellte die systemische Therapie (Biologika, Immunsuppressiva) die suppressive Kapazität der Treg ($HLA\text{-}DR^+$, $GARP^+$) im peripheren Blut der Patienten wieder her. Die frühen (early) E-MDSC und $CD15^-CD14^+CD33^{hi}HLA\text{-}DR^{low/-}$ mononukleären MDSC (M-MDSC) blieben unvermindert hoch. $CD14^+CD124^+$ M-MDSC und E-MDSC korrelierten positiv mit dem PASI (Psoriasis Area and Severity Index). Bei der Psoriasis spielt die regulatorische Kapazität der Treg und MDSC eine wichtige Rolle ein.

6. Literaturverzeichnis

1. Eisenbarth SC. Dendritic cell subsets in T cell programming: location dictates function. Nat Rev Immunol. 2019;19(2):89–103.
2. Fucikova J, Palova-Jelinkova L, Bartunkova J, Spisek R. Induction of Tolerance and Immunity by Dendritic Cells: Mechanisms and Clinical Applications. Front Immunol. 2019 Oct 29;10:2393.
3. Kumar B V, Connors TJ, Farber DL. Human T Cell Development, Localization, and Function throughout Life. Immunity. 2018;48(2):202–13.
4. Corthay A. A Three-cell Model for Activation of Naïve T Helper Cells. Scand J Immunol. 2006 Aug 1;64(2):93–6.
5. Jetten AM. Retinoid-related orphan receptors (RORs): critical roles in development, immunity, circadian rhythm, and cellular metabolism. Nucl Recept Signal. 2009/04/03. 2009;7:e003–e003.
6. Kalia V, Sarkar S. Regulation of Effector and Memory CD8 T Cell Differentiation by IL-2—A Balancing Act . Vol. 9, Frontiers in Immunology . 2018. p. 2987.
7. Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B. CD4 +T cells: Differentiation and functions. Camara NOS, editor. Clin Dev Immunol. 2012;2012:925135.
8. Golubovskaya V, Wu L. Different Subsets of T Cells, Memory, Effector Functions, and CAR-T Immunotherapy. Cancers (Basel). 2016 Mar 15;8(3):36.
9. Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, et al. The Orphan Nuclear Receptor RORγt Directs the Differentiation Program of Proinflammatory IL-17+ T Helper Cells. Cell. 2006;126(6):1121–33.
10. Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA. CD4 + CD25 high Regulatory Cells in Human Peripheral Blood . J Immunol. 2001 Aug 1;167(3):1245–53.
11. Boyce, Christopher; Lane, Cynthia; Hingorani, Ravi; McIntyre, Catherine; Ruitenberg, Joyce; Ghanekar S. Human Regulatory T-Cell Isolation and Measurement of Function. San Jose, CA, USA: BD Pharmingen, BD Biosciences; 2010. p. 1–20.
12. Lee W, Lee GR. Transcriptional regulation and development of regulatory T cells. Exp Mol Med. 2018 Mar 9;50(3):e456–e456.
13. Shevyrev D, Tereshchenko V. Treg Heterogeneity, Function, and Homeostasis . Vol. 10, Frontiers in Immunology . 2020. p. 3100.
14. Schaier M, Seissler N, Becker LE, Schaefer SM, Schmitt E, Meuer S, et al. The extent of HLA-DR expression on HLA-DR(+) Tregs allows the identification of patients with clinically relevant borderline rejection. Transpl Int. 2013 Mar;26(3):290–9.
15. Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. J Exp Med. 1998 Jul;188(2):287–96.
16. Togashi Y, Shitara K, Nishikawa H. Regulatory T cells in cancer immunosuppression - implications for anticancer therapy. Nat Rev Clin Oncol. 2019 Jun;16(6):356–71.
17. Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: the master regulator of immunity to infection. J Immunol. 2008 May;180(9):5771–7.
18. Andersson J, Tran DQ, Pesu M, Davidson TS, Ramsey H, O'Shea JJ, et al. CD4+FoxP3+ regulatory T cells confer infectious tolerance in a TGF-β–dependent manner . J Exp Med. 2008 Aug 18;205(9):1975–81.
19. Shevach EM. Garp as a therapeutic target for modulation of T regulatory cell function. Vol. 21, Expert Opinion on Therapeutic Targets. 2017. p. 191–200.
20. Tran DQ, Andersson J, Wang R, Ramsey H, Unutmaz D, Shevach EM. GARP (LRRC32) is essential for the surface expression of latent TGF-beta on platelets and activated FOXP3+ regulatory T cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Aug;106(32):13445–50.

21. Talmadge JE, Gabrilovich DI. History of myeloid-derived suppressor cells. Nat Rev Cancer. 2013 Oct;13(10):739–52.

22. Veglia F, Perego M, Gabrilovich D. Myeloid-derived suppressor cells coming of age. Nat Immunol. 2018 Feb 18;19(2):108–19.

23. Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. Nat Rev Immunol. 2012 Mar;12(4):253–68.

24. Bronte V, Brandau S, Chen S-H, Colombo MP, Frey AB, Greten TF, et al. Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. Nat Commun. 2016 Jul 6;7:12150.

25. Dumitru CA, Moses K, Trellakis S, Lang S, Brandau S. Neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: immunophenotyping, cell biology and clinical relevance in human oncology. Cancer Immunol Immunother. 2012;61(8):1155–67.

26. Mandruzzato S, Brandau S, Britten CM, Bronte V, Damuzzo V, Gouttefangeas C, et al. Toward harmonized phenotyping of human myeloid-derived suppressor cells by flow cytometry: results from an interim study. Cancer Immunol Immunother. 2016;

27. Groth C, Hu X, Weber R, Fleming V, Altevogt P, Utikal J, et al. Immunosuppression mediated by myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) during tumour progression. Br J Cancer. 2019;120(1):16–25.

28. Bennett JA, Rao VS, Mitchell MS. Systemic bacillus Calmette-Guérin (BCG) activates natural suppressor cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1978 Oct;75(10):5142–4.

29. Pawelec G, Verschoor CP, Ostrand-Rosenberg S. Myeloid-Derived Suppressor Cells: Not Only in Tumor Immunity . Vol. 10, Frontiers in Immunology . 2019. p. 1099.

30. Rigel DS. Epidemiology of melanoma. Semin Cutan Med Surg. 2010 Dec;29(4):204–9.

31. MacKie RM, Hauschild A, Eggermont AMM. Epidemiology of invasive cutaneous melanoma. Ann Oncol. 2009 Aug 1;20(suppl_6):vi1–7.

32. Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe A. Leitlinienprogramm Onkologie: Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms, Langversion 3.1, AWMF Registernummer: 032/024OL [Internet]. Leitlinienprogramm Onkologie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (AWMF), Deutschen Krebsgesellschaft e.V. (DKG) und Deutschen Krebshilfe (DKH). 2018 [cited 2019 Jul 14]. p. 1–275. Available from: http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leit-linien/melanom/

33. Elwood JM, Jopson J. Melanoma and sun exposure: an overview of published studies. Int J cancer. 1997 Oct;73(2):198–203.

34. Lin JY, Fisher DE. Melanocyte biology and skin pigmentation. Nature. 2007 Feb 21;445:843.

35. Deutsches Institut für Medizinische Dokumentation und Information (DIMDI) im Auftrag des Bundesministeriums für Gesundheit (BMG) unter Beteiligung der Arbeitsgruppe ICD des Kuratoriums für Fragen der Klassifikation im Gesundheitswesen (KKG). ICD-10-GM Version 2019, Systematisches Verzeichnis, Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme, 10. Revision, Stand: 21.September 2018. Köln; 2018.

36. Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, Patel HN, Busam KJ, Kutzner H, et al. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. N Engl J Med. 2005 Nov;353(20):2135–47.

37. Maertens O, Johnson B, Hollstein P, Frederick DT, Cooper ZA, Messiaen L, et al. Elucidating distinct roles for NF1 in melanomagenesis. Cancer Discov. 2013 Mar;3(3):338–49.

38. Leonardi GC, Falzone L, Salemi R, Zanghì A, Spandidos DA, Mccubrey JA, et al. Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy (Review). Int J Oncol. 2018/02/27. 2018 Apr;52(4):1071–80.

39. Chappell WH, Steelman LS, Long JM, Kempf RC, Abrams SL, Franklin RA, et al. Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR Inhibitors: Rationale and Importance to Inhibiting

These Pathways in Human Health. Oncotarget. 2011 Mar 4;2(3):135–64.

40. 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. 2017 Nov;67(6):472–92.

41. Balch CM, Gershenwald JE, Soong S-J, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. J Clin Oncol. 2009 Dec;27(36):6199–206.

42. European Medicines Agency. Zelboraf : EPAR - Summary for the public. London; 2018.

43. European Medicines Agency. Yervoy : EPAR - Product information. London; 2019.

44. Lovly CM, Dahlman KB, Fohn LE, Su Z, Dias-Santagata D, Hicks DJ, et al. Routine Multiplex Mutational Profiling of Melanomas Enables Enrollment in Genotype-Driven Therapeutic Trials. PLoS One. 2012 Apr 20;7(4):e35309.

45. European Medicines Agency. Cotellic : EPAR - Summary for the public. London; 2015.

46. European Medicines Agency. Mekinist: EPAR - Medicine overview. London; 2018.

47. Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, Ribas A, McArthur GA, Sosman JA, et al. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. N Engl J Med. 2010 Aug;363(9):809–19.

48. Long G V, 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. 2015 Aug 1;386(9992):444–51.

49. 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. 2014 Nov 16;372(1):30–9.

50. Ascierto PA, McArthur GA, Dréno B, Atkinson V, Liszkay G, Di Giacomo AM, et al. Cobimetinib combined with vemurafenib in advanced BRAFV600-mutant melanoma (coBRIM): updated efficacy results from a randomised, double-blind, phase 3 trial. Lancet Oncol. 2016;17(9):1248–60.

51. Marin-Acevedo JA, Dholaria B, Soyano AE, Knutson KL, Chumsri S, Lou Y. Next generation of immune checkpoint therapy in cancer: new developments and challenges. J Hematol Oncol. 2018;11(1):39.

52. Ha D, Tanaka A, Kibayashi T, Tanemura A, Sugiyama D, Wing JB, et al. Differential control of human Treg and effector T cells in tumor immunity by Fc-engineered anti-CTLA-4 antibody. Proc Natl Acad Sci U S A. 2019 Jan;116(2):609–18.

53. Sharma A, Subudhi SK, Blando J, Scutti J, Vence L, Wargo J, et al. Anti-CTLA-4 Immunotherapy Does Not Deplete FOXP3(+) Regulatory T Cells (Tregs) in Human Cancers. Clin Cancer Res. 2019 Feb;25(4):1233–8.

54. European Medicines Agency. Opdivo : EPAR - Product Information. London; 2019.

55. European Medicines Agency. Keytruda : EPAR - Product Information. London; 2019.

56. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Cowey CL, Lao CD, et al. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. N Engl J Med. 2015 Jul;373(1):23–34.

57. Wolchok JD, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Rutkowski P, Grob J-J, Cowey CL, et al. Overall Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. N Engl J Med. 2017 Oct;377(14):1345–56.

58. European Medicines Agency. European Medicines Agency (EMA) [Internet]. 2019 [cited 2019 Aug 5]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en

59. BURNET M. Cancer; a biological approach. I. The processes of control. Br Med J. 1957 Apr;1(5022):779–86.

60. Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, Smyth MJ. New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape. Curr Opin Immunol. 2014

Apr;27:16–25.

61. Iorgulescu JB, Braun D, Oliveira G, Keskin DB, Wu CJ. Acquired mechanisms of immune escape in cancer following immunotherapy. Genome Med. 2018;10(1):87.

62. Sade-Feldman M, Jiao YJ, Chen JH, Rooney MS, Barzily-Rokni M, Eliane J-P, et al. Resistance to checkpoint blockade therapy through inactivation of antigen presentation. Nat Commun. 2017 Oct;8(1):1136.

63. Zaretsky JM, Garcia-Diaz A, Shin DS, Escuin-Ordinas H, Hugo W, Hu-Lieskovan S, et al. Mutations Associated with Acquired Resistance to PD-1 Blockade in Melanoma. N Engl J Med. 2016 Sep;375(9):819–29.

64. Gao J, Shi LZ, Zhao H, Chen J, Xiong L, He Q, et al. Loss of IFN-gamma Pathway Genes in Tumor Cells as a Mechanism of Resistance to Anti-CTLA-4 Therapy. Cell. 2016 Oct;167(2):397-404.e9.

65. Benci JL, Xu B, Qiu Y, Wu TJ, Dada H, Twyman-Saint Victor C, et al. Tumor Interferon Signaling Regulates a Multigenic Resistance Program to Immune Checkpoint Blockade. Cell. 2016 Dec;167(6):1540-1554.e12.

66. Spranger S, Bao R, Gajewski TF. Melanoma-intrinsic beta-catenin signalling prevents anti-tumour immunity. Nature. 2015 Jul;523(7559):231–5.

67. Peng W, Chen JQ, Liu C, Malu S, Creasy C, Tetzlaff MT, et al. Loss of PTEN Promotes Resistance to T Cell–Mediated Immunotherapy. Cancer Discov. 2016 Feb 1;6(2):202 LP – 216.

68. Trunzer K, Pavlick AC, Schuchter L, Gonzalez R, McArthur GA, Hutson TE, et al. Pharmacodynamic effects and mechanisms of resistance to vemurafenib in patients with metastatic melanoma. J Clin Oncol. 2013 May;31(14):1767–74.

69. Van Allen EM, Wagle N, Sucker A, Treacy DJ, Johannessen CM, Goetz EM, et al. The genetic landscape of clinical resistance to RAF inhibition in metastatic melanoma. Cancer Discov. 2014 Jan;4(1):94–109.

70. Hugo W, Shi H, Sun L, Piva M, Song C, Kong X, et al. Non-genomic and Immune Evolution of Melanoma Acquiring MAPKi Resistance. Cell. 2015 Sep;162(6):1271–85.

71. Warburg O. On the origin of cancer cells. Science (80-). 1956;

72. Tumeh PC, Harview CL, Yearley JH, Shintaku IP, Taylor EJM, Robert L, et al. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. Nature. 2014 Nov;515(7528):568–71.

73. Spranger S, Gajewski TF. Mechanisms of Tumor Cell–Intrinsic Immune Evasion. Annu Rev Cancer Biol. 2018 Mar 4;2(1):213–28.

74. Rønholt K, Iversen L. Old and New Biological Therapies for Psoriasis. Int J Mol Sci. 2017 Nov 1;18(11):2297.

75. World Health Organization. Global report on Psoriasis. Glob Rep Psoriasis. 2016;

76. AMBOSS GmbH. AMBOSS - Psoriasis vulgaris [Internet]. [cited 2019 Sep 13]. Available from: https://www.amboss.com/de/wissen/psoriasis_vulgaris

77. Rendon A, Schäkel K. Psoriasis Pathogenesis and Treatment. Int J Mol Sci. 2019 Mar 23;20(6):1475.

78. Sewerin P, Brinks R, Schneider M, Haase I, Vordenbäumen S. Prevalence and incidence of psoriasis and psoriatic arthritis. Ann Rheum Dis. 2019 Feb 1;78(2):286 LP – 287.

79. Nestle FO, Kaplan DH, Barker J. Psoriasis. N Engl J Med. 2009 Jul 30;361(5):496–509.

80. Gunter NV, Yap BJM, Chua CLL, Yap WH. Combining Understanding of Immunological Mechanisms and Genetic Variants Toward Development of Personalized Medicine for Psoriasis Patients . Vol. 10, Frontiers in Genetics . 2019. p. 395.

81. Boehncke W-H, Schön MP. Psoriasis. Lancet. 2015 Sep;386(9997):983–94.

82. Alexander Nast, Lasse Amelunxen, Matthias Augustin, Wolf-Henning Boehncke, Corinna Dressler, Matthew Gaskins, Peter Härle, Bernd Hoffstadt, Joachim Klaus, Joachim Koza, Ulrich Mrowietz, Hans-Michael Ockenfels, Sandra Philipp, Kristian Reich, Thomas Rosenb TW. S3 - Leitlinie zur Therapie der Psoriasis vulgaris. 2017.

83. Bruck J, Dringen R, Amasuno A, Pau-Charles I, Ghoreschi K. A review of the mechanisms of action of dimethylfumarate in the treatment of psoriasis. Exp Dermatol. 2018 Jun;27(6):611–24.

84. Li J, Byrne KT, Yan F, Yamazoe T, Chen Z, Baslan T, et al. Tumor Cell-Intrinsic Factors Underlie Heterogeneity of Immune Cell Infiltration and Response to Immunotherapy. Immunity. 2018 Jul 17;49(1):178-193.e7.

85. Havel JJ, Chowell D, Chan TA. The evolving landscape of biomarkers for checkpoint inhibitor immunotherapy. Nat Rev Cancer. 2019 Mar;19(3):133–50.

86. Pflugfelder, A.; Kochs, C; Czeschik, C; Schadendorf DGC. Malignes Melanom - S3-Leitlinie „Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms“. AWMF-Regis. Berlin: Leitlinienprogramm Onkologie; 2013. 1–89 p.

87. Eigentler T, Mühlenbein C, Garbe C, Schadendorf D. S3-Leitlinie zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms. 2016;Version 2.:1–241.

88. El-Sahrigy SA, Mohamed NA, Talkhan HA, Rahman AMA. Comparison between magnetic activated cell sorted monocytes and monocyte adherence techniques for in vitro generation of immature dendritic cells: an Egyptian trial. Cent J Immunol. 2015;40(1):18–24.

89. van Meerloo J, Kaspers GJL, Cloos J. Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay BT - Cancer Cell Culture: Methods and Protocols. In: Cree IA, editor. Totowa, NJ: Humana Press; 2011. p. 237–45.

90. van Tonder A, Joubert AM, Cromarty AD. Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. BMC Res Notes. 2015;8(1):47.

91. BD Biosciences. Introduction to Flow Cytometry: A Learning Guide. 11th-11032nd–0 ed. San Jose; 2002. 1–58 p.

92. BD Biosciences. BD LSR II User’s Guide. June 2007. San Jose, USA; 2007. 32–35 p.

93. Fawcett T. An introduction to ROC analysis. Pattern Recognit Lett. 2006;27(8):861–74.

94. Distler U, Kuharev J, Navarro P, Tenzer S. Label-free quantification in ion mobility-enhanced data-independent acquisition proteomics. Nat Protoc. 2016 Apr;11(4):795—812.

95. Distler U, Kuharev J, Navarro P, Levin Y, Schild H, Tenzer S. Drift time-specific collision energies enable deep-coverage data-independent acquisition proteomics. Nat Methods. 2014 Feb;11(2):167–70.

96. Marconcini R, Spagnolo F, Stucci LS, Ribero S, Marra E, Rosa F De, et al. Current status and perspectives in immunotherapy for metastatic melanoma. Oncotarget. 2018 Jan 3;9(15):12452–70.

97. Tarhini A, Lo E, Minor DR. Releasing the Brake on the Immune System: Ipilimumab in Melanoma and Other Tumors. Cancer Biother Radiopharm. 2010;

98. Yang Y-T, Jiang J-H, Yang H-J, Wu Z, Xiao Z-M, Xiang B-D. The lymphocyte-to-monocyte ratio is a superior predictor of overall survival compared to established biomarkers in HCC patients undergoing liver resection. Sci Rep. 2018;8(1):2535.

99. Gebhardt C, Sevko A, Jiang H, Lichtenberger R, Reith M, Tarnanidis K, et al. Myeloid Cells and Related Chronic Inflammatory Factors as Novel Predictive Markers in Melanoma Treatment with Ipilimumab. Clin Cancer Res. 2015 Dec;21(24):5453–9.

100. Failing JJ, Yan Y, Porrata LF, Markovic SN. Lymphocyte-to-monocyte ratio is associated with survival in pembrolizumab-treated metastatic melanoma patients. Melanoma Res. 2017;27(6).

101. den Haan JMM, Arens R, van Zelm MC. The activation of the adaptive immune system: Cross-talk between antigen-presenting cells, T cells and B cells. Immunology Letters. 2014.

102. Moon JJ, Chu HH, Pepper M, McSorley SJ, Jameson SC, Kedl RMM, et al. Naive CD4+ T Cell Frequency Varies for Different Epitopes and Predicts Repertoire Diversity and Response Magnitude. Immunity. 2007;

103. Kwok WW, Tan V, Gillette L, Littell CT, Soltis MA, LaFond RB, et al. Frequency of Epitope-Specific Naive CD4 $^{+}$ T Cells Correlates with Immunodominance in the Human Memory Repertoire. J Immunol. 2012 Mar 15;188(6):2537–44.

104. Nowacki TM, Kuerten S, Zhang W, Shive CL, Kreher CR, Boehm BO, et al. Granzyme B production distinguishes recently activated CD8+ memory cells from resting memory cells. Cell Immunol. 2007;

105. Andrade F, Roy S, Nicholson D, Thornberry N, Rosen A, Casciola-Rosen L. Granzyme B Directly and Efficiently Cleaves Several Downstream Caspase Substrates: Implications for CTL-Induced Apoptosis. Immunity. 1998 Apr;8(4):451–60.

106. Saravia J, Chapman NM, Chi H. Helper T cell differentiation. Cell Mol Immunol. 2019;16(7):634–43.

107. Palutke M, Tabaczka PM, Kukuruga DL, Kantor NL. A method for measuring lymphocyte proliferation in mixed lymphocyte cultures using a nuclear proliferation antigen, Ki-67, and flow cytometry. Am J Clin Pathol. 1989 Apr;91(4):417–21.

108. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annu Rev Immunol. 1989;7:145–73.

109. Bretscher P, Cohn M. A theory of self-nonself discrimination. Science (80-). 1970;

110. Collins A V, Brodie DW, Gilbert RJC, Iaboni A, Manso-Sancho R, Walse B, et al. The interaction properties of costimulatory molecules revisited. Immunity. 2002;

111. Kunert A, Basak EA, Hurkmans D, Klaver Y, van Brakel M, Oostvogels A, et al. Identifying t cell profiles that associate with clinical response to anti-PD-1 treatment in non-small cell lung carcinoma (NSCLC) patients. J Clin Oncol. 2018 May 20;36(15_suppl):e21239–e21239.

112. Shipkova M, Wieland E. Surface markers of lymphocyte activation and markers of cell proliferation. Clinica Chimica Acta. 2012.

113. Reddy M, Eirikis E, Davis C, Davis HM, Prabhakar U. Comparative analysis of lymphocyte activation marker expression and cytokine secretion profile in stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures: an in vitro model to monitor cellular immune function. J Immunol Methods. 2004;293(1):127–42.

114. Starska K, Głowacka E, Kulig A, Lewy-Trenda I, Bryś M, Lewkowicz P. The role of tumor cells in the modification of T lymphocytes activity - The expression of the early CD69+, CD71+ and the late CD25+, CD26+, HLA/DR+ activation markers on TCD4+ and CD8+ cells in squamous cell laryngeal carcinoma. Part I. Folia Histochem Cytobiol. 2011;

115. Holling TM, Schooten E, Van Den Elsen PJ. Function and regulation of MHC class II molecules in T-lymphocytes: Of mice and men. Hum Immunol. 2004;

116. Schmidt A, Oberle N, Krammer PH. Molecular mechanisms oftreg-mediatedt cell suppression. Frontiers in Immunology. 2012.

117. Najafi M, Farhood B, Mortezaee K. Contribution of regulatory T cells to cancer: A review. Journal of Cellular Physiology. 2019.

118. Schupp J, Krebs FK, Zimmer N, Trzeciak E, Schuppan D, Tuettenberg A. Targeting myeloid cells in the tumor sustaining microenvironment. Cellular Immunology. 2017;

119. Roncarlo MG, Gregori S. Is FOXP3 a bona fide marker for human regulatory T cells? European Journal of Immunology. 2008.

120. Duggleby R, Danby RD, Madrigal JA, Saudemont A. Clinical grade regulatory CD4+ T cells (Tregs): Moving toward cellular-based immunomodulatory therapies. Frontiers in Immunology. 2018.

121. Probst-Kepper M, Balling R, Buer J. FOXP3: Required but Not Sufficient. The Role of GARP (LRRC32) as a Safeguard of the Regulatory Phenotype. Curr Mol Med. 2012;

122. Probst-Kepper M, Geffers R, Kröger A, Viegas N, Erck C, Hecht HJ, et al. GARP: A key receptor controlling FOXP3 in human regulatory T cells. J Cell Mol Med. 2009;

123. Stumpf M, Zhou X, Chikuma S, Bluestone JA. Tyrosine 201 of the cytoplasmic tail of CTLA-4 critically affects T regulatory cell suppressive function. Eur J Immunol. 2014 Jun;44(6):1737–46.

124. Tang F, Du X, Liu M, Zheng P, Liu Y. Anti-CTLA-4 antibodies in cancer immunotherapy: Selective depletion of intratumoral regulatory T cells or checkpoint blockade? Cell Biosci. 2018;

125. Walker LSK. EFIS Lecture: Understanding the CTLA-4 checkpoint in the maintenance of immune homeostasis. Immunology Letters. 2017.

126. Walker LSK, Sansom DM. Confusing signals: recent progress in CTLA-4 biology. Trends Immunol. 2015;

127. Baras AS, Drake C, Liu JJ, Gandhi N, Kates M, Hoque MO, et al. The ratio of CD8 to Treg tumor-infiltrating lymphocytes is associated with response to cisplatin-based neoadjuvant chemotherapy in patients with muscle invasive urothelial carcinoma of the bladder. Oncoimmunology. 2016;

128. Preston CC, Maurer MJ, Oberg AL, Visscher DW, Kalli KR, Hartmann LC, et al. The ratios of CD8+ T cells to CD4+CD25+ FOXP3+ and FOXP3- T cells correlate with poor clinical outcome in human serous ovarian cancer. PLoS One. 2013;

129. Weber R, Fleming V, Hu X, Nagibin V, Groth C, Altevogt P, et al. Myeloid-Derived Suppressor Cells Hinder the Anti-Cancer Activity of Immune Checkpoint Inhibitors. Front Immunol. 2018 Jun 11;9:1310.

130. Mandruzzato S, Brandau S, Britten CM, Bronte V, Damuzzo V, Gouttefangeas C, et al. Toward harmonized phenotyping of human myeloid-derived suppressor cells by flow cytometry: results from an interim study. Cancer Immunol Immunother. 2016 Feb 4;65(2):161–9.

131. Pflugfelder A, Kochs C, Blum A, Capellaro M, Czeschik C, Dettenborn T, et al. Malignes melanom S3-leitlinie “Diagnostik, therapie und nachsorge des melanoms.” JDDG - J Ger Soc Dermatology. 2013;

132. Rodriguez PC, Ochoa AC, Al-Khami AA. Arginine Metabolism in Myeloid Cells Shapes Innate and Adaptive Immunity . Vol. 8, Frontiers in Immunology . 2017. p. 93.

133. Caldwell RW, Rodriguez PC, Toque HA, Narayanan SP, Caldwell RB. Arginase: A Multifaceted Enzyme Important in Health and Disease. Physiol Rev. 2018;

134. Veglia F, Perego M, Gabrilovich D. Myeloid-derived suppressor cells coming of age. Nat Immunol. 2018;19(2):108–19.

135. Brenner AK, Bruserud Ø. S100 Proteins in Acute Myeloid Leukemia. Neoplasia (United States). 2018.

136. Donato R, Cannon BR, Sorci G, Riuzzi F, Hsu K, Weber DJ, et al. Functions of S100 proteins. Curr Mol Med. 2013;

137. Leclerc E, Vetter SW. The role of S100 proteins and their receptor RAGE in pancreatic cancer. Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease. 2015.

138. Weide B, Elsässer M, Büttner P, Pflugfelder A, Leiter U, Eigentler TK, et al. Serum markers lactate dehydrogenase and S100B predict independently disease outcome in melanoma patients with distant metastasis. Br J Cancer. 2012 Jul 10;107(3):422–8.

139. Lim SY, Lee JH, Diefenbach RJ, Kefford RF, Rizos H. Liquid biomarkers in melanoma: Detection and discovery. Molecular Cancer. 2018.

140. Lukanidin E, Sleeman JP. Building the niche: The role of the S100 proteins in metastatic growth. Seminars in Cancer Biology. 2012.

141. Chen B, Miller AL, Rebelatto M, Brewah Y, Rowe DC, Clarke L, et al. S100A9 Induced

inflammatory responses are mediated by distinct damage associated molecular patterns (DAMP) receptors in vitro and in vivo. PLoS One. 2015;

142. Blessing K, Sanders DSA, Grant JJH. Comparison of immunohistochemical staining of the novel antibody melan- A with S100 protein and HMB-45 in malignant melanoma and melanoma variants. Histopathology. 1998;

143. Gaynor R, Irie R, Morton D, Herschman HR, Jones P, Cochran A. S100 PROTEIN: A MARKER FOR HUMAN MALIGNANT MELANOMAS? Lancet. 1981;

144. Kruijff S, Bastiaannet E, Kobold ACM, van Ginkel RJ, Suurmeijer AJH, Hoekstra HJ. S-100B concentrations predict disease-free survival in stage III melanoma patients. Ann Surg Oncol. 2009 Dec;16(12):3455–62.

145. Henze G, Dummer R, Joller-Jemelka HI, Boni R, Burg G. Serum S100--a marker for disease monitoring in metastatic melanoma. Dermatology. 1997;194(3):208–12.

146. Marshall C, Enzerra M, Rahnemai-Azar AA, Ramaiya NH. Serum tumor markers and testicular germ cell tumors: a primer for radiologists. Abdom Radiol. 2019 Mar 11;44(3):1083–90.

147. Livesey A, Garty F, Shipman AR, Shipman KE. Lactate dehydrogenase in dermatology practice. Clin Exp Dermatol. 2019 Nov 21;n/a(n/a).

148. Rachidi S, Kaur M, Lautenschlaeger T, Li Z. Platelet count correlates with stage and predicts survival in melanoma. Platelets. 2019 Nov 17;30(8):1042–6.

149. Balduini CL, Noris P. Platelet count and aging. Haematologica. 2014 Jun 1;99(6):953 LP – 955.

150. Christou N, Perraud A, Blondy S, Jauberteau M-O, Battu S, Mathonnet M. E-cadherin: A potential biomarker of colorectal cancer prognosis. Oncol Lett. 2017/04/20. 2017 Jun;13(6):4571–6.

151. Wolff RK, Hoffman MD, Wolff EC, Herrick JS, Sakoda LC, Samowitz WS, et al. Mutation analysis of adenomas and carcinomas of the colon: Early and late drivers. Genes Chromosomes Cancer. 2018/04/30. 2018 Jul;57(7):366–76.

152. Fujimura T, Sato Y, Tanita K, Kambayashi Y, Otsuka A, Fujisawa Y, et al. Serum Level of Soluble CD163 May Be a Predictive Marker of the Effectiveness of Nivolumab in Patients With Advanced Cutaneous Melanoma. Front Oncol. 2018 Nov 19;8:530.

153. Shiraishi D, Fujiwara Y, Horlad H, Saito Y, Iriki T, Tsuboki J, et al. CD163 is required for protumoral activation of macrophages in human and murine sarcoma. Cancer Res. 2018;

154. Borgquist S, Butt T, Almgren P, Shiffman D, Stocks T, Orho-Melander M, et al. Apolipoproteins, lipids and risk of cancer. Int J cancer. 2016 Jun;138(11):2648–56.

155. Giessner C, Millet V, Mostert KJ, Gensollen T, Vu Manh T-P, Garibal M, et al. Vnn1 pantetheinase limits the Warburg effect and sarcoma growth by rescuing mitochondrial activity. Life Sci alliance. 2018 Jul 23;1(4):e201800073–e201800073.

156. Lao L, Shen J, Tian H, Yao Q, Li Y, Qian L, et al. Secreted Phosphoprotein 24 kD Inhibits Growth of Human Prostate Cancer Cells Stimulated by BMP-2. Anticancer Res. 2016 Nov;36(11):5773–80.

157. Schreiber CL, Smith BD. Molecular Imaging of Aminopeptidase N in Cancer and Angiogenesis. Contrast Media Mol Imaging. 2018;2018:5315172.

158. Burgueno-Bucio E, Mier-Aguilar CA, Soldevila G. The multiple faces of CD5. J Leukoc Biol. 2019 May;105(5):891–904.

159. Rogers LM, Mott SL, Smith BJ, Link BK, Sahin D, Weiner GJ. Complement-Regulatory Proteins CFHR1 and CFHR3 and Patient Response to Anti-CD20 Monoclonal Antibody Therapy. Clin Cancer Res. 2017 Feb;23(4):954–61.

160. Lin H-Y, Tan G-Q, Liu Y, Lin S-Q. The prognostic value of serum amyloid A in solid tumors: a meta-analysis. Cancer Cell Int. 2019 Mar 20;19:62.

161. N.G. N, M.L. D, B. J, E. V, O. D, A. U, et al. Melanoma cells block PEDF production in fibroblasts to induce the tumor-promoting phenotype of cancer-associated fibroblasts. In: Cancer Research.

2016.

162. Plebanek MP, Angeloni NL, Vinokour E, Li J, Henkin A, Martinez-Marin D, et al. Pre-metastatic cancer exosomes induce immune surveillance by patrolling monocytes at the metastatic niche. Nat Commun. 2017 Nov 6;8(1):1319.

163. Melmer A, Fineder L, Lamina C, Kollerits B, Dieplinger B, Braicu I, et al. Plasma concentrations of the vitamin E-binding protein afamin are associated with overall and progression-free survival and platinum sensitivity in serous ovarian cancer - A study by the OVCAD consortium. Gynecol Oncol. 2013;

164. Dieplinger H, Dieplinger B. Afamin - A pleiotropic glycoprotein involved in various disease states. Clinica Chimica Acta. 2015.

165. Sosman JA, Kim KB, Schuchter L, Gonzalez R, Pavlick AC, Weber JS, et al. Survival in BRAF V600–Mutant Advanced Melanoma Treated with Vemurafenib. N Engl J Med. 2012 Feb 23;366(8):707–14.

166. Kakadia S, Yarlagadda N, Awad R, Kundranda M, Niu J, Naraev B, et al. Mechanisms of resistance to BRAF and MEK inhibitors and clinical update of US Food and Drug Administration-approved targeted therapy in advanced melanoma. Onco Targets Ther. 2018 Oct 17;Volume 11:7095–107.

167. Larkin J, Ascierto PA, Dreno B, Atkinson V, Liszkay G, Maio M, et al. Combined vemurafenib and cobimetinib in BRAF-mutated melanoma. N Engl J Med. 2014 Nov;371(20):1867–76.

168. Miyazawa M, Ito Y, Kosaka N, Nukada Y, Sakaguchi H, Suzuki H, et al. Role of MAPK signaling pathway in the activation of dendritic type cell line, THP-1, induced by DNCB and $NiSO_4$. J Toxicol Sci. 2008;

169. Savoia P, Fava P, Casoni F, Cremona O, Savoia P, Fava P, et al. Targeting the ERK Signaling Pathway in Melanoma. Int J Mol Sci. 2019 Mar 25;20(6):1483.

170. Hajek E, Krebs F, Bent R, Haas K, Bast A, Steinmetz I, et al. BRAF inhibitors stimulate inflammasome activation and interleukin 1 beta production in dendritic cells. Oncotarget. 2018 Jun 19;9(47):28294–308.

171. Liu L, Mayes PA, Eastman S, Shi H, Yadavilli S, Zhang T, et al. The BRAF and MEK Inhibitors Dabrafenib and Trametinib: Effects on Immune Function and in Combination with Immunomodulatory Antibodies Targeting PD-1, PD-L1, and CTLA-4. Clin Cancer Res. 2015 Apr 1;21(7):1639 LP – 1651.

172. Bauer D, Werth F, Nguyen HA, Kiecker F, Eberle J. Critical role of reactive oxygen species (ROS) for synergistic enhancement of apoptosis by vemurafenib and the potassium channel inhibitor TRAM-34 in melanoma cells. Cell Death &Amp; Dis. 2017 Feb 2;8:e2594.

173. Ward PS, Thompson CB. Metabolic Reprogramming: A Cancer Hallmark Even Warburg Did Not Anticipate. Cancer Cell. 2012.

174. Kaplon J, Zheng L, Meissl K, Chaneton B, Selivanov VA, Mackay G, et al. A key role for mitochondrial gatekeeper pyruvate dehydrogenase in oncogene-induced senescence. Nature. 2013 Jun 19;498(7452):109–12.

175. Vazquez F, Lim J-H, Chim H, Bhalla K, Girnun G, Pierce K, et al. PGC1α Expression Defines a Subset of Human Melanoma Tumors with Increased Mitochondrial Capacity and Resistance to Oxidative Stress. Cancer Cell. 2013 Mar;23(3):287–301.

176. Fink SL, Cookson BT. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. Infect Immun. 2005 Apr;73(4):1907–16.

177. Malik A, Kanneganti T-D. Inflammasome activation and assembly at a glance. J Cell Sci. 2017 Dec 1;130(23):3955–63.

178. Zhang L, Li Y, Yang X, Wei J, Zhou S, Zhao Z, et al. Characterization of Th17 and FoxP3(+) Treg Cells in Paediatric Psoriasis Patients. Scand J Immunol. 2016 Mar;83(3):174–80.

179. Sugiyama H, Gyulai R, Toichi E, Garaczi E, Shimada S, Stevens SR, et al. Dysfunctional Blood and Target Tissue CD4+CD25high Regulatory T Cells in Psoriasis: Mechanism Underlying Unrestrained Pathogenic Effector T Cell Proliferation. J Immunol. 2014;

180. Soler DC, Young AB, Fiessinger L, Galimberti F, Debanne S, Groft S, et al. Increased, but Functionally Impaired, CD14+ HLA-DR–/low Myeloid-Derived Suppressor Cells in Psoriasis: A Mechanism of Dysregulated T Cells. J Invest Dermatol. 2016;

181. Wegner J, Krebs F, Tuettenberg A von SE. Treg activation status depends on psoriasis therapy regime. J der Dtsch Dermatologischen Gesellschaft. 2020;manuscript accepted.

182. Soler DC, McCormick TS. Expanding the List of Dysregulated Immunosuppressive Cells in Psoriasis. Journal of Investigative Dermatology. 2016.

183. Serafini P, Mgebroff S, Noonan K, Borrello I. Myeloid-derived suppressor cells promote cross-tolerance in B-cell lymphoma by expanding regulatory T cells. Cancer Res. 2008;

184. Quack C, Falk CS, Umansky V, Eva Schlecker A, Stojanovic A, Eisen C, et al. Tumor-Infiltrating Monocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells Mediate CCR5-Dependent Recruitment of Regulatory T Cells Favoring Tumor Growth. J Immunol by guest. 2017;

185. GCO Cancer Today W. estimated number of prevalent cases (1-year) Europe, Germany, both sexes, all ages [Internet]. Cancer Today - International Agency for Research on Cancer. 2018 [cited 2019 Jul 17]. Available from: http://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars?v=2018&mode=cancer&mode_population=countries&population=900&populations=908_276&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=1&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_item

186. Today WGC. Estimated number of new cases in 2018, worldwide, both sexes, all ages [Internet]. Cancer Today - International Agency for Research on Cancer. 2018 [cited 2019 Jul 17]. Available from: http://gco.iarc.fr/today/online-analysis-table?v=2018&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=5&group_

187. Australian Institute of Health and Welfare 2019. Cancer Data in Australia: Melanoma of the skin (C43). 2018.

188. Whiteman DC, Green AC, Olsen CM. The Growing Burden of Invasive Melanoma: Projections of Incidence Rates and Numbers of New Cases in Six Susceptible Populations through 2031. J Invest Dermatol. 2016 Jun;136(6):1161–71.

189. Merck Sharp & Dohme Corp. A Study of the Safety and Efficacy of Pembrolizumab (MK-3475) in Combination With Trametinib and Dabrafenib in Participants With Advanced Melanoma (MK-3475-022/KEYNOTE-022) [Internet]. ClinicalTrials.gov, NCT02130466. 2019 [cited 2019 Jul 14]. Available from: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02130466

190. Granier C, De Guillebon E, Blanc C, Roussel H, Badoual C, Colin E, et al. Mechanisms of action and rationale for the use of checkpoint inhibitors in cancer. ESMO open. 2017;2(2):e000213.

191. Hodi FS, Hwu W-J, Kefford R, Weber JS, Daud A, Hamid O, et al. Evaluation of Immune-Related Response Criteria and RECIST v1.1 in Patients With Advanced Melanoma Treated With Pembrolizumab. J Clin Oncol. 2016 May;34(13):1510–7.

192. Anderson R, Rapoport BL. Immune Dysregulation in Cancer Patients Undergoing Immune Checkpoint Inhibitor Treatment and Potential Predictive Strategies for Future Clinical Practice. Front Oncol. 2018;8:80.

193. Martens A, Wistuba-Hamprecht K, Yuan J, Postow MA, Wong P, Capone M, et al. Increases in Absolute Lymphocytes and Circulating CD4+ and CD8+ T Cells Are Associated with Positive Clinical Outcome of Melanoma Patients Treated with Ipilimumab. Clin Cancer Res. 2016 Oct;22(19):4848–58.

194. Simpson TR, Li F, Montalvo-Ortiz W, Sepulveda MA, Bergerhoff K, Arce F, et al. Fc-dependent

depletion of tumor-infiltrating regulatory T cells co-defines the efficacy of anti–CTLA-4 therapy against melanoma. J Exp Med. 2013 Aug 26;210(9):1695 LP – 1710.

195. Arakawa A, Vollmer S, Tietze J, Galinski A, Heppt M V, Bürdek M, et al. Clonality of CD4+ Blood T Cells Predicts Longer Survival With CTLA4 or PD-1 Checkpoint Inhibition in Advanced Melanoma . Vol. 10, Frontiers in Immunology . 2019. p. 1336.

196. Yarchoan M, Hopkins A, Jaffee EM. Tumor Mutational Burden and Response Rate to PD-1 Inhibition. Vol. 377, The New England journal of medicine. United States; 2017. p. 2500–1.

197. Wistuba-Hamprecht K, Martens A, Heubach F, Romano E, Geukes Foppen M, Yuan J, et al. Peripheral CD8 effector-memory type 1 T-cells correlate with outcome in ipilimumab-treated stage IV melanoma patients. Eur J Cancer. 2017 Mar;73:61–70.

198. Subrahmanyam PB, Dong Z, Gusenleitner D, Giobbie-Hurder A, Severgnini M, Zhou J, et al. Distinct predictive biomarker candidates for response to anti-CTLA-4 and anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients. J Immunother cancer. 2018 Mar;6(1):18.

199. Lu C, Klement JD, Ibrahim ML, Xiao W, Redd PS, Nayak-Kapoor A, et al. Type I interferon suppresses tumor growth through activating the STAT3-granzyme B pathway in tumor-infiltrating cytotoxic T lymphocytes. J Immunother cancer. 2019 Jun;7(1):157.

200. Hashimoto M, Kamphorst AO, Im SJ, Kissick HT, Pillai RN, Ramalingam SS, et al. CD8 T Cell Exhaustion in Chronic Infection and Cancer: Opportunities for Interventions. Annu Rev Med. 2018 Jan 29;69(1):301–18.

201. Okoye IS, Houghton M, Tyrrell L, Barakat K, Elahi S. Coinhibitory Receptor Expression and Immune Checkpoint Blockade: Maintaining a Balance in CD8(+) T Cell Responses to Chronic Viral Infections and Cancer. Front Immunol. 2017;8:1215.

202. Baitsch L, Baumgaertner P, Devêvre E, Raghav SK, Legat A, Barba L, et al. Exhaustion of tumor-specific CD8+ T cells in metastases from melanoma patients. J Clin Invest. 2011 Jun 1;121(6):2350–60.

203. Yuan J, Gnjatic S, Li H, Powel S, Gallardo HF, Ritter E, et al. CTLA-4 blockade enhances polyfunctional NY-ESO-1 specific T cell responses in metastatic melanoma patients with clinical benefit. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008/12/12. 2008 Dec 23;105(51):20410–5.

204. Im SJ, Hashimoto M, Gerner MY, Lee J, Kissick HT, Burger MC, et al. Defining CD8+ T cells that provide the proliferative burst after PD-1 therapy. Nature. 2016/08/02. 2016 Sep 15;537(7620):417–21.

205. de Coaña YP, Wolodarski M, Poschke I, Yoshimoto Y, Yang Y, Nyström M, et al. Ipilimumab treatment decreases monocytic MDSCs and increases CD8 effector memory T cells in long-term survivors with advanced melanoma. Oncotarget. 2017 Mar 28;8(13):21539–53.

206. Correll A, Tuettenberg A, Becker C, Jonuleit H. Increased regulatory T-cell frequencies in patients with advanced melanoma correlate with a generally impaired T-cell responsiveness and are restored after dendritic cell-based vaccination. Exp Dermatol. 2010 Aug 1;19(8):e213–21.

207. Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakaguchi N, et al. Immunologic Self-Tolerance Maintained by Cd25⁺Cd4⁺Regulatory T Cells Constitutively Expressing Cytotoxic T Lymphocyte–Associated Antigen 4. J Exp Med. 2000 Jul 17;192(2):303 LP – 310.

208. Du X, Tang F, Liu M, Su J, Zhang Y, Wu W, et al. A reappraisal of CTLA-4 checkpoint blockade in cancer immunotherapy. Cell Res. 2018;28(4):416–32.

209. Romano E, Kusio-Kobialka M, Foukas PG, Baumgaertner P, Meyer C, Ballabeni P, et al. Ipilimumab-dependent cell-mediated cytotoxicity of regulatory T cells ex vivo by nonclassical monocytes in melanoma patients. Proc Natl Acad Sci. 2015 May 12;112(19):6140 LP – 6145.

210. Teige I, Mårtensson L, Frendéus BL. Targeting the Antibody Checkpoints to Enhance Cancer Immunotherapy–Focus on FcγRIIB . Vol. 10, Frontiers in Immunology . 2019. p. 481.

211. Arce Vargas F, Furness AJS, Litchfield K, Joshi K, Rosenthal R, Ghorani E, et al. Fc Effector Function Contributes to the Activity of Human Anti-CTLA-4 Antibodies. Cancer Cell. 2018 Apr;33(4):649-663.e4.

212. Meyer C, Cagnon L, Costa-Nunes CM, Baumgaertner P, Montandon N, Leyvraz L, et al. Frequencies of circulating MDSC correlate with clinical outcome of melanoma patients treated with ipilimumab. Cancer Immunol Immunother. 2014 Mar;63(3):247–57.

213. Retseck J, Nasr A, Lin Y, Lin H, Mendiratta P, Butterfield LH, et al. Long term impact of CTLA4 blockade immunotherapy on regulatory and effector immune responses in patients with melanoma. J Transl Med. 2018;16(1):184.

214. Sade-Feldman M, Kanterman J, Klieger Y, Ish-Shalom E, Mizrahi O, Saragovi A, et al. Clinical significance of circulating CD33+CD11b+HLA-DR- myeloid cells in Stage-IV melanoma patients treated with ipilimumab. Clin Cancer Res. 2016 Jan 1;clincanres.3104.2015.

215. Teng MWL, Ngiow SF, Ribas A, Smyth MJ. Classifying Cancers Based on T-cell Infiltration and PD-L1. Cancer Res. 2015 Jun;75(11):2139–45.

216. Lang S, Bruderek K, Kaspar C, Höing B, Kanaan O, Dominas N, et al. Clinical relevance and suppressive capacity of human MDSC subsets. Clin Cancer Res. 2018 Jan 1;clincanres.3726.2017.

217. Geiger R, Rieckmann JC, Wolf T, Basso C, Feng Y, Fuhrer T, et al. L-Arginine Modulates T Cell Metabolism and Enhances Survival and Anti-tumor Activity. Cell. 2016 Oct 20;167(3):829-842.e13.

218. Colligan SH, Tzetzo SL, Abrams SI. Myeloid-driven mechanisms as barriers to antitumor CD8(+) T cell activity. Mol Immunol. 2020 Feb;118:165–73.

219. Dufait I, Pardo J, Escors D, De Vlaeminck Y, Jiang H, Keyaerts M, et al. Perforin and Granzyme B Expressed by Murine Myeloid-Derived Suppressor Cells: A Study on Their Role in Outgrowth of Cancer Cells. Cancers (Basel). 2019 Jun;11(6).

220. Dick J, Lang N, Slynko A, Kopp-Schneider A, Schulz C, Dimitrakopoulou-Strauss A, et al. Use of LDH and autoimmune side effects to predict response to ipilimumab treatment. Immunotherapy. 2016 Sep;8(9):1033–44.

221. Rosner S, Kwong E, Shoushtari AN, Friedman CF, Betof AS, Brady MS, et al. Peripheral blood clinical laboratory variables associated with outcomes following combination nivolumab and ipilimumab immunotherapy in melanoma. Cancer Med. 2018 Mar;7(3):690–7.

222. Li N, Diao Z, Huang X, Niu Y, Liu T, Liu Z-P, et al. Increased platelet distribution width predicts poor prognosis in melanoma patients. Sci Rep. 2017 Jun 7;7(1):2970.

223. Zhang X, Cui M-M, Fu S, Li L-L, Liu Y-S, Liu Z-P, et al. Platelet distribution width correlates with prognosis of gastric cancer. Oncotarget. 2017 Mar 21;8(12):20213–9.

224. Cui M-M, Li N, Liu X, Yun Z-Y, Niu Y, Zhang Y, et al. Platelet distribution width correlates with prognosis of non-small cell lung cancer. Sci Rep. 2017 Jun;7(1):3456.

225. Takeuchi H, Abe M, Takumi Y, Hashimoto T, Kobayashi R, Osoegawa A, et al. The prognostic impact of the platelet distribution width-to-platelet count ratio in patients with breast cancer. PLoS One. 2017;12(12):e0189166.

226. Shiuan E, Beckermann KE, Ozgun A, Kelly C, McKean M, McQuade J, et al. Thrombocytopenia in patients with melanoma receiving immune checkpoint inhibitor therapy. J Immunother Cancer. 2017 Dec 21;5(1):8.

227. Le Roy A, Kempf E, Ackermann F, Routier E, Robert C, Turpin A, et al. Two cases of immune thrombocytopenia associated with pembrolizumab. Eur J Cancer. 2016 Feb;54:172–4.

228. Jackson D, Craven RA, Hutson RC, Graze I, Lueth P, Tonge RP, et al. Proteomic profiling identifies afamin as a potential biomarker for ovarian cancer. Clin Cancer Res. 2007 Dec;13(24):7370–9.

229. Sacchi A, Tumino N, Grassi G, Casetti R, Cimini E, Bordoni V, et al. A new procedure to analyze

polymorphonuclear myeloid derived suppressor cells in cryopreserved samples cells by flow cytometry. PLoS One. 2018 Aug 30;13(8):e0202920–e0202920.

230. Laurent S, Queirolo P, Boero S, Salvi S, Piccioli P, Boccardo S, et al. The engagement of CTLA-4 on primary melanoma cell lines induces antibody-dependent cellular cytotoxicity and TNF-alpha production. J Transl Med. 2013 May;11:108.

231. Zhan X, Hu S, Wu Y, Li M, Liu T, Ming S, et al. IFN-gamma decreased the suppressive function of CD33(+)HLA-DR(low) myeloid cells through down-regulation of PD-1/PD-L2 signaling pathway. Mol Immunol. 2018 Feb;94:107–20.

232. Pico de Coana Y, Masucci G, Hansson J, Kiessling R. Myeloid-derived suppressor cells and their role in CTLA-4 blockade therapy. Cancer Immunol Immunother. 2014 Sep;63(9):977–83.

233. Basu A, Rafatnia A, Manoli H, Danenberg G, Epstein AL, Pinski JK. MDSC clinical assay for cancer detection and monitoring in urothelial carcinoma. J Clin Oncol. 2018 Feb 10;36(5_suppl):TPS110–TPS110.

234. Wang Y, Schafer CC, Hough KP, Tousif S, Duncan SR, Kearney JF, et al. Myeloid-Derived Suppressor Cells Impair B Cell Responses in Lung Cancer through IL-7 and STAT5. J Immunol. 2018 Jul;201(1):278–95.

235. Zhang S, Ma X, Zhu C, Liu L, Wang G, Yuan X. The Role of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Patients with Solid Tumors: A Meta-Analysis. PLoS One. 2016 Oct 25;11(10):e0164514.

236. Jordan KR, Amaria RN, Ramirez O, Callihan EB, Gao D, Borakove M, et al. Myeloid-derived suppressor cells are associated with disease progression and decreased overall survival in advanced-stage melanoma patients. Cancer Immunol Immunother. 2013/09/27. 2013 Nov;62(11):1711–22.

237. Nathanson T, Ahuja A, Rubinsteyn A, Aksoy BA, Hellmann MD, Miao D, et al. Somatic Mutations and Neoepitope Homology in Melanomas Treated with CTLA-4 Blockade. Cancer Immunol Res. 2017 Jan;5(1):84–91.

238. Chan TA, Yarchoan M, Jaffee E, Swanton C, Quezada SA, Stenzinger A, et al. Development of tumor mutation burden as an immunotherapy biomarker: utility for the oncology clinic. Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol. 2019 Jan 1;30(1):44–56.

239. Gray ES, Rizos H, Reid AL, Boyd SC, Pereira MR, Lo J, et al. Circulating tumor DNA to monitor treatment response and detect acquired resistance in patients with metastatic melanoma. Oncotarget. 2015 Dec;6(39):42008–18.

240. Darvin P, Toor SM, Sasidharan Nair V, Elkord E. Immune checkpoint inhibitors: recent progress and potential biomarkers. Exp Mol Med. 2018;50(12):165.

241. Riley RS, June CH, Langer R, Mitchell MJ. Delivery technologies for cancer immunotherapy. Nat Rev Drug Discov. 2019 Mar;18(3):175–96.

242. Schmid D, Park CG, Hartl CA, Subedi N, Cartwright AN, Puerto RB, et al. T cell-targeting nanoparticles focus delivery of immunotherapy to improve antitumor immunity. Nat Commun. 2017 Nov;8(1):1747.

243. Akbani R, Akdemir KC, Aksoy BA, Albert M, Ally A, Amin SB, et al. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. Cell. 2015;161(7):1681–96.

244. Robert C, Ribas A, Wolchok JD, Hodi FS, Hamid O, Kefford R, et al. Anti-programmed-death-receptor-1 treatment with pembrolizumab in ipilimumab-refractory advanced melanoma: a randomised dose-comparison cohort of a phase 1 trial. Lancet. 2014;384(9948):1109–17.

245. Murgaski A, Bardet PMR, Arnouk SM, Clappaert EJ, Laoui D. Unleashing Tumour-Dendritic Cells to Fight Cancer by Tackling Their Three A's: Abundance, Activation and Antigen-Delivery. Cancers (Basel). 2019 May;11(5).

246. Veglia F, Gabrilovich DI. Dendritic cells in cancer: the role revisited. Curr Opin Immunol. 2017 Apr;45:43–51.

247. Hargadon KM, Johnson CE, Williams CJ. Immune checkpoint blockade therapy for cancer: An overview of FDA-approved immune checkpoint inhibitors. Int Immunopharmacol. 2018 Sep;62:29–39.

248. Seidel JA, Otsuka A, Kabashima K. Anti-PD-1 and Anti-CTLA-4 Therapies in Cancer: Mechanisms of Action, Efficacy, and Limitations. Front Oncol. 2018;8:86.

249. Hong DS, Vence L, Falchook G, Radvanyi LG, Liu C, Goodman V, et al. BRAF(V600) inhibitor GSK2118436 targeted inhibition of mutant BRAF in cancer patients does not impair overall immune competency. Clin Cancer Res. 2012 Apr;18(8):2326–35.

250. Ott PA, Henry T, Baranda SJ, Frleta D, Manches O, Bogunovic D, et al. Inhibition of both BRAF and MEK in BRAF(V600E) mutant melanoma restores compromised dendritic cell (DC) function while having differential direct effects on DC properties. Cancer Immunol Immunother. 2013 Apr;62(4):811–22.

251. Kambayashi T, Laufer TM. Atypical MHC class II-expressing antigen-presenting cells: can anything replace a dendritic cell? Nat Rev Immunol. 2014 Nov;14(11):719–30.

252. Hughes CE, Benson RA, Bedaj M, Maffia P. Antigen-Presenting Cells and Antigen Presentation in Tertiary Lymphoid Organs. Front Immunol. 2016 Nov 7;7:481.

253. Brutkiewicz RR. Cell Signaling Pathways That Regulate Antigen Presentation. J Immunol. 2016 Oct;197(8):2971–9.

254. Comin-Anduix B, Chodon T, Sazegar H, Matsunaga D, Mock S, Jalil J, et al. The oncogenic BRAF kinase inhibitor PLX4032/RG7204 does not affect the viability or function of human lymphocytes across a wide range of concentrations. Clin Cancer Res. 2010 Dec 15;16(24):6040–8.

255. Hooijkaas A, Gadiot J, Morrow M, Stewart R, Schumacher T, Blank CU. Selective BRAF inhibition decreases tumor-resident lymphocyte frequencies in a mouse model of human melanoma. Oncoimmunology. 2012 Aug 27;1(5):609–17.

256. Zhang W, Heinzmann D, Grippo JF. Clinical Pharmacokinetics of Vemurafenib. Clin Pharmacokinet. 2017 Sep;56(9):1033–43.

257. Delgado-Goni T, Miniotis MF, Wantuch S, Parkes HG, Marais R, Workman P, et al. The BRAF Inhibitor Vemurafenib Activates Mitochondrial Metabolism and Inhibits Hyperpolarized Pyruvate-Lactate Exchange in BRAF-Mutant Human Melanoma Cells. Mol Cancer Ther. 2016 Dec;15(12):2987–99.

258. Poulikakos PI, Zhang C, Bollag G, Shokat KM, Rosen N. RAF inhibitors transactivate RAF dimers and ERK signalling in cells with wild-type BRAF. Nature. 2010 Mar;464(7287):427–30.

259. Hardeman KN, Peng C, Paudel BB, Meyer CT, Luong T, Tyson DR, et al. Dependence On Glycolysis Sensitizes BRAF-mutated Melanomas For Increased Response To Targeted BRAF Inhibition. Sci Rep. 2017 Feb;7:42604.

260. Fischer GM, Vashisht Gopal YN, McQuade JL, Peng W, DeBerardinis RJ, Davies MA. Metabolic strategies of melanoma cells: Mechanisms, interactions with the tumor microenvironment, and therapeutic implications. Pigment Cell Melanoma Res. 2018 Jan;31(1):11–30.

261. Medvec AR, Ecker C, Kong H, Winters EA, Glover J, Varela-Rohena A, et al. Improved Expansion and In Vivo Function of Patient T Cells by a Serum-free Medium. Mol Ther Methods Clin Dev. 2018 Mar;8:65–74.

262. Guemes M, Rahman SA, Hussain K. What is a normal blood glucose? Arch Dis Child. 2016 Jun;101(6):569–74.

263. Maney NJ, Reynolds G, Krippner-Heidenreich A, Hilkens CMU. Dendritic cell maturation and survival are differentially regulated by TNFR1 and TNFR2. J Immunol. 2014 Nov;193(10):4914–23.

264. Ruffell B, Chang-Strachan D, Chan V, Rosenbusch A, Ho CMT, Pryer N, et al. Macrophage IL-10 blocks CD8+ T cell-dependent responses to chemotherapy by suppressing IL-12 expression in

intratumoral dendritic cells. Cancer Cell. 2014 Nov;26(5):623–37.

265. Luo Y, Zheng SG. Hall of Fame among Pro-inflammatory Cytokines: Interleukin-6 Gene and Its Transcriptional Regulation Mechanisms. Front Immunol. 2016;7:604.

266. Yang H, Higgins B, Kolinsky K, Packman K, Go Z, Iyer R, et al. RG7204 (PLX4032), a selective BRAFV600E inhibitor, displays potent antitumor activity in preclinical melanoma models. Cancer Res. 2010 Jul;70(13):5518–27.

267. King AJ, Arnone MR, Bleam MR, Moss KG, Yang J, Fedorowicz KE, et al. Dabrafenib; Preclinical Characterization, Increased Efficacy when Combined with Trametinib, while BRAF/MEK Tool Combination Reduced Skin Lesions. PLoS One. 2013 Jul 3;8(7):e67583.

268. Ivison SM, Wang C, Himmel ME, Sheridan J, Delano J, Mayer ML, et al. Oxidative stress enhances IL-8 and inhibits CCL20 production from intestinal epithelial cells in response to bacterial flagellin. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2010 Sep;299(3):G733-41.

269. Waugh DJJ, Wilson C. The interleukin-8 pathway in cancer. Clin Cancer Res. 2008 Nov;14(21):6735–41.

270. Yuan A, Chen JJW, Yao P-L, Yang P-C. The role of interleukin-8 in cancer cells and microenvironment interaction. Front Biosci. 2005 Jan;10:853–65.

271. Khalili JS, Liu S, Rodriguez-Cruz TG, Whittington M, Wardell S, Liu C, et al. Oncogenic BRAF(V600E) promotes stromal cell-mediated immunosuppression via induction of interleukin-1 in melanoma. Clin Cancer Res. 2012 Oct;18(19):5329–40.

272. Hargadon KM. Strategies to Improve the Efficacy of Dendritic Cell-Based Immunotherapy for Melanoma. Front Immunol. 2017 Nov 20;8:1594.

273. Martin SJ. Cell death and inflammation: the case for IL-1 family cytokines as the canonical DAMPs of the immune system. FEBS J. 2016 Jul 1;283(14):2599–615.

274. Mielczarek-Lewandowska A, Sztiller-Sikorska M, Osrodek M, Czyz M, Hartman ML. 17-Aminogeldanamycin selectively diminishes IRE1α-XBP1s pathway activity and cooperatively induces apoptosis with MEK1/2 and BRAFV600E inhibitors in melanoma cells of different genetic subtypes. Apoptosis. 2019;24(7):596–611.

275. Ghiringhelli F, Apetoh L, Tesniere A, Aymeric L, Ma Y, Ortiz C, et al. Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1β–dependent adaptive immunity against tumors. Nat Med. 2009 Oct 20;15(10):1170–8.

276. Sutton CE, Lalor SJ, Sweeney CM, Brereton CF, Lavelle EC, Mills KHG. Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. Immunity. 2009 Aug;31(2):331–41.

277. Ma Y, Aymeric L, Locher C, Mattarollo SR, Delahaye NF, Pereira P, et al. Contribution of IL-17-producing gamma delta T cells to the efficacy of anticancer chemotherapy. J Exp Med. 2011 Mar;208(3):491–503.

278. Mackiewicz J, Mackiewicz A. BRAF and MEK inhibitors in the era of immunotherapy in melanoma patients. Contemp Oncol (Poznan, Poland). 2018 Mar;22(1A):68–72.

279. Ilieva KM, Correa I, Josephs DH, Karagiannis P, Egbuniwe IU, Cafferkey MJ, et al. Effects of BRAF mutations and BRAF inhibition on immune responses to melanoma. Mol Cancer Ther. 2014 Dec;13(12):2769–83.

280. Gudjonsson JE, Johnston A, Sigmundsdottir H, Valdimarsson H. Immunopathogenic mechanisms in psoriasis. Clin Exp Immunol. 2004 Jan;135(1):1–8.

281. Sukhov A, Adamopoulos IE, Maverakis E. Interactions of the Immune System with Skin and Bone Tissue in Psoriatic Arthritis: A Comprehensive Review. Clin Rev Allergy Immunol. 2016 Aug;51(1):87–99.

282. Gibbs S. Skin disease and socioeconomic conditions in rural Africa: Tanzania. Int J Dermatol. 1996;

283. Danielsen K, Olsen AO, Wilsgaard T, Furberg AS. Is the prevalence of psoriasis increasing? A 30-year follow-up of a population-based cohort. Br J Dermatol. 2013;

284. Schäfer I, Rustenbach SJ, Radtke M, Augustin J, Glaeske G, Augustin M. Epidemiologie der Psoriasis in Deutschland - Auswertung von Sekundärdaten einer gesetzlichen Krankenversicherung. Gesundheitswesen. 2011;

285. Germany | Institute for Health Metrics and Evaluation. Germany - Global burden of disease: A country profile [Internet]. 2018 [cited 2019 Jun 30]. Available from: http://www.healthdata.org/germany

286. Alinaghi F, Calov M, Kristensen LE, Gladman DD, Coates LC, Jullien D, et al. Prevalence of psoriatic arthritis in patients with psoriasis: A systematic review and meta-analysis of observational and clinical studies. J Am Acad Dermatol. 2019;

287. Lowes MA, Suárez-Fariñas M, Krueger JG. Immunology of psoriasis. Annu Rev Immunol. 2014;32:227–55.

288. Gallais Sérézal I, Classon C, Cheuk S, Barrientos-Somarribas M, Wadman E, Martini E, et al. Resident T Cells in Resolved Psoriasis Steer Tissue Responses that Stratify Clinical Outcome. J Invest Dermatol. 2018;

289. Georgescu S-R, Tampa M, Caruntu C, Sarbu M-I, Mitran C-I, Mitran M-I, et al. Advances in Understanding the Immunological Pathways in Psoriasis. Int J Mol Sci. 2019 Feb 10;20(3):739.

290. Smigiel KS, Srivastava S, Stolley JM, Campbell DJ. Regulatory T-cell homeostasis: steady-state maintenance and modulation during inflammation. Immunol Rev. 2014 May 1;259(1):40–59.

291. Woo YR, Cho DH, Park HJ. Molecular Mechanisms and Management of a Cutaneous Inflammatory Disorder: Psoriasis. Int J Mol Sci. 2017 Dec 11;18(12):2684.

292. Owczarczyk-Saczonek A, Czerwińska J, Placek W. The role of regulatory T cells and anti-inflammatory cytokines in psoriasis. Acta Dermatovenerologica Alpina, Pannonica Adriat. 2018;

293. Yang L, Li B, Dang E, Jin L, Fan X, Wang G. Impaired function of regulatory T cells in patients with psoriasis is mediated by phosphorylation of STAT3. J Dermatol Sci. 2016;

294. Cao LY, Chung JS, Teshima T, Feigenbaum L, Cruz PD, Jacobe HT, et al. Myeloid-Derived Suppressor Cells in Psoriasis Are an Expanded Population Exhibiting Diverse T-Cell–Suppressor Mechanisms. J Invest Dermatol. 2016;

295. Lee W, Lee GR. Transcriptional regulation and development of regulatory T cells. Exp &Amp; Mol Med. 2018 Mar 9;50:e456.

296. Xu L, Kitani A, Strober W. Molecular mechanisms regulating TGF-B-induced Foxp3 expression. Mucosal Immunology. 2010.

297. Mercadante ER, Lorenz UM. Breaking free of control: How conventional T cells overcome regulatory T cell suppression. Frontiers in Immunology. 2016.

298. Volpe E, Servant N, Zollinger R, Bogiatzi SI, Hupe P, Barillot E, et al. A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses. Nat Immunol. 2008 Jun;9(6):650–7.

299. Karamehic J, Zecevic L, Resic H, Jukic M, Jukic T, Ridjic O, et al. Immunophenotype Lymphocyte of Peripheral Blood in Patients with Psoriasis. Med Arch. 2014;

300. Zhang J, Lin Y, Li C, Zhang X, Cheng L, Dai L, et al. IL-35 Decelerates the Inflammatory Process by Regulating Inflammatory Cytokine Secretion and M1/M2 Macrophage Ratio in Psoriasis. J Immunol. 2016;

301. Saito C, Maeda A, Morita A. Bath-PUVA therapy induces circulating regulatory T cells in patients with psoriasis. J Dermatol Sci. 2009;

302. Furuhashi T, Saito C, Torii K, Nishida E, Yamazaki S, Morita A. Photo(chemo)therapy Reduces Circulating Th17 Cells and Restores Circulating Regulatory T Cells in Psoriasis. PLoS One. 2013;

303. P. Q, M. B, R. P, E. B, S. C, E. B, et al. Th1, Th2, Th17 and regulatory T cell pattern in psoriatic patients: Modulation of cytokines and gene targets induced by etanercept treatment and correlation with clinical response. Dermatology. 2011;

304. Fujimura T, Okuyama R, Ito Y, Aiba S. Profiles of Foxp3+ regulatory T cells in eczematous dermatitis, psoriasis vulgaris and mycosis fungoides. Br J Dermatol. 2008;

305. Keijsers RRMC, Van Der Velden HMJ, Van Erp PEJ, De Boer-Van Huizen RT, Joosten I, Koenen HJPM, et al. Balance of Treg vs. T-helper cells in the transition from symptomless to lesional psoriatic skin. Br J Dermatol. 2013;

306. Nedoszytko B, Lange M, Sokołowska-Wojdyło M, Renke J, Trzonkowski P, Sobjanek M, et al. The role of regulatory T cells and genes involved in their differentiation in pathogenesis of selected inflammatory and neoplastic skin diseases. Part II: The Treg role in skin diseases pathogenesis. Postep dermatologii i Alergol. 2017/10/31. 2017 Oct;34(5):405–17.

307. Tran DQ, Ramsey H, Shevach EM. Induction of FOXP3 expression in naive human CD4+FOXP3 T cells by T-cell receptor stimulation is transforming growth factor-beta dependent but does not confer a regulatory phenotype. Blood. 2007 Oct;110(8):2983–90.

308. Shevach EM, Tran DQ, Davidson TS, Andersson J. The critical contribution of TGF-beta to the induction of Foxp3 expression and regulatory T cell function. Eur J Immunol. 2008 Apr;38(4):915–7.

309. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. Nat Immunol. 2003 Apr;4(4):330–6.

310. von Boehmer H, Nolting J. What turns on Foxp3? Vol. 9, Nature immunology. United States; 2008. p. 121–2.

311. Wang R, Kozhaya L, Mercer F, Khaitan A, Fujii H, Unutmaz D. Expression of GARP selectively identifies activated human FOXP3+ regulatory T cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Aug;106(32):13439–44.

312. Sadlon T, Brown CY, Bandara V, Hope CM, Schjenken JE, Pederson SM, et al. Unravelling the molecular basis for regulatory T-cell plasticity and loss of function in disease. Clin Transl Immunol. 2018 Feb 27;7(2):e1011–e1011.

313. Wu L, Du H, Li Y, Qu P, Yan C. Signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3C) promotes myeloid-derived suppressor cell expansion and immune suppression during lung tumorigenesis. Am J Pathol. 2011;

314. Wu C Te, Hsieh CC, Lin CC, Chen WC, Hong JH, Chen MF. Significance of IL-6 in the transition of hormone-resistant prostate cancer and the induction of myeloid-derived suppressor cells. J Mol Med. 2012;

315. Kitamura H, Ohno Y, Toyoshima Y, Ohtake J, Homma S, Kawamura H, et al. Interleukin-6/STAT3 signaling as a promising target to improve the efficacy of cancer immunotherapy. Cancer Sci. 2017 Oct;108(10):1947–52.

316. Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. Nat Rev Immunol. 2009 Mar;9(3):162–74.

317. Takizawa H, Boettcher S, Manz MG. Demand-adapted regulation of early hematopoiesis in infection and inflammation. Blood. 2012 Mar;119(13):2991–3002.

318. Youn J-I, Nagaraj S, Collazo M, Gabrilovich DI. Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. J Immunol. 2008;

319. Tcyganov E, Mastio J, Chen E, Gabrilovich DI. Plasticity of myeloid-derived suppressor cells in cancer. Curr Opin Immunol. 2018 Apr;51:76–82.

320. Consonni FM, Porta C, Marino A, Pandolfo C, Mola S, Bleve A, et al. Myeloid-Derived Suppressor Cells: Ductile Targets in Disease. Front Immunol. 2019 May 3;10:949.

321. Schlecker E, Stojanovic A, Eisen C, Quack C, Falk CS, Umansky V, et al. Tumor-Infiltrating

Monocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells Mediate CCR5-Dependent Recruitment of Regulatory T Cells Favoring Tumor Growth. J Immunol. 2012;

322. Hoechst B, Gamrekelashvili J, Manns MP, Greten TF, Korangy F. Plasticity of human Th17 cells and iTregs is orchestrated by different subsets of myeloid cells. Blood. 2011;

323. Ilkovitch D, Ferris LK. Myeloid-derived suppressor cells are elevated in patients with psoriasis and produce various molecules. Mol Med Rep. 2016;

324. European Medicines Agency. Skyrizi : EPAR - Product Information. London; 2019.

325. European Medicines Agency. Cimzia : EPAR - Product Information. London; 2019.

326. Kurkó J, Vida A, Ocskó T, Tryniszewska B, Rauch TA, Glant TT, et al. Suppression of proteoglycan-Induced autoimmune arthritis by myeloid-Derived suppressor cells generated in vitro from murine bone marrow. PLoS One. 2014;

327. Nam S, Lee A, Lim J, Lim J-S. Analysis of the Expression and Regulation of PD-1 Protein on the Surface of Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSCs). Biomol Ther (Seoul). 2019 Jan;27(1):63–70.

328. Khunger M, Calabrese C, Kontzias A, Velcheti V. To Treat or Not to Treat: Role of Immunotherapy in Patients with Concomitant Diagnosis of Advanced-Stage Non-Small Cell Lung Cancer and Psoriasis. Vol. 12, Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer. United States; 2017. p. e147–9.

7. Anhang

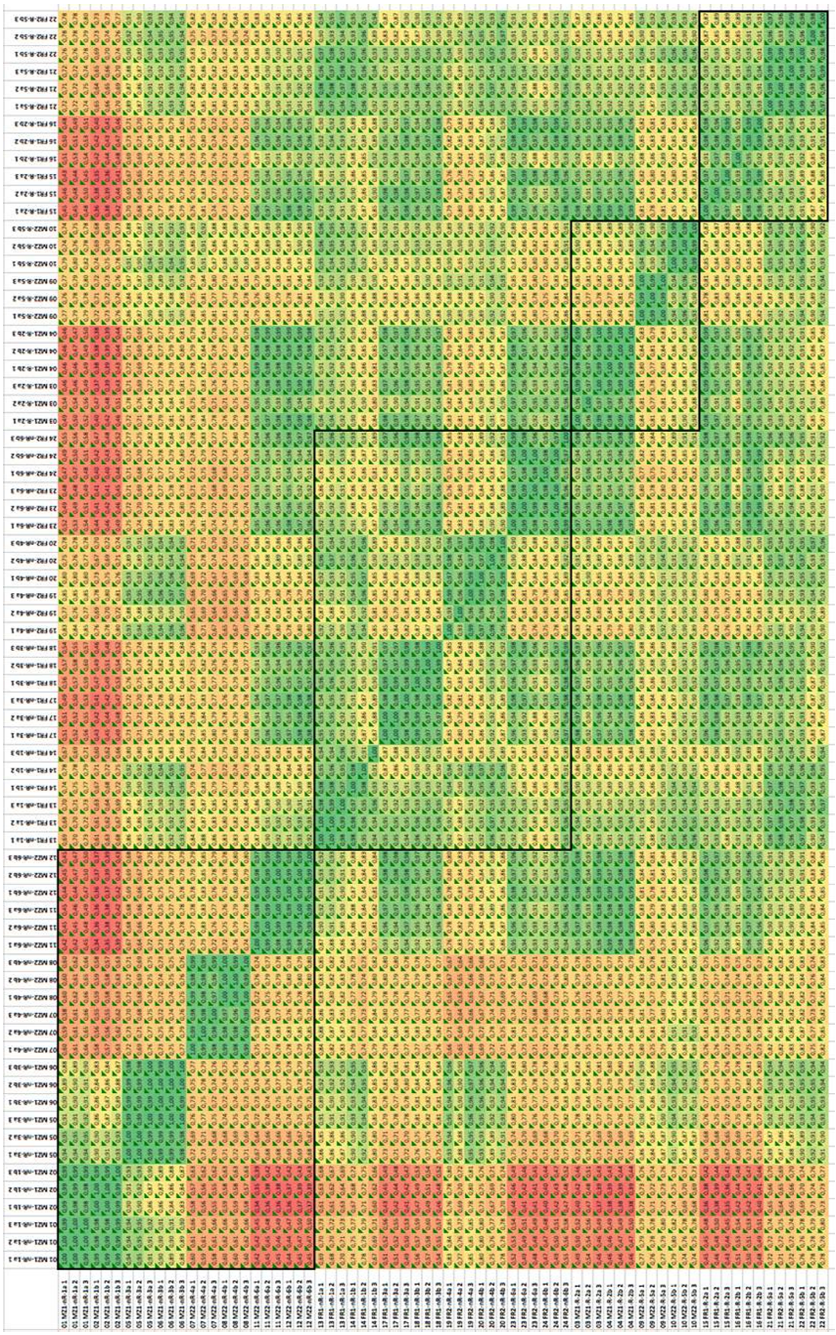


Abbildung 32 Korrelationsmatrix zur Zusammensetzung der Serumproteine in Patienten des Trainingssets. Das Trainingsset analysierte das Proteom von 4 Ipilimumab Therapieansprechern (n(MZ)/ n(FFM) = 2) und 8 Nichtansprechern (n(MZ)/ n(FFM) = 4) aus den Studienzentren Mainz und Frankfurt via nanoUPLC UDMSE. Es wurden jeweils Serumproben vor und nach Therapiebeginn gemessen. Die Korrelationsmatrix berechnete den Peason Korrelationskoeffizienten r, welcher die Zusammensetzung des Proteoms zweier Proben miteinander verglich.

	2015-56-01 JK008 BE1 1 1	2015-56-01 JK008 BE1 1 2	2015-56-01 JK008 BE1 1 3	2015-56-02 JK008 BE1 2 1	2015-56-02 JK008 BE1 2 2	2015-56-02 JK008 BE1 2 3	2015-56-03 JK008 BE1 3 1	2015-56-03 JK008 BE1 3 2	2015-56-03 JK008 BE1 3 3	2015-56-04 JK008 BE2 1 1	2015-56-04 JK008 BE2 1 2	2015-56-04 JK008 BE2 1 3	2015-56-05 JK008 BE2 2 1	2015-56-05 JK008 BE2 2 2	2015-56-05 JK008 BE2 2 3	2015-56-06 JK008 BE2 3 1	2015-56-06 JK008 BE2 3 2	2015-56-06 JK008 BE2 3 3
2015-56-01 JK008 BE1 1 1	1,00	0,98	0,98	0,97	0,97	0,97	0,98	0,98	0,97	0,97	0,96	0,96	0,97	0,96	0,95	0,96	0,96	0,96
2015-56-01 JK008 BE1 1 2	0,98	1,00	0,98	0,97	0,97	0,97	0,98	0,98	0,98	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,96	0,96	0,97	0,97
2015-56-01 JK008 BE1 1 3	0,98	0,98	1,00	0,96	0,97	0,97	0,97	0,98	0,99	0,96	0,97	0,97	0,97	0,96	0,96	0,96	0,96	0,97
2015-56-02 JK008 BE1 2 1	0,97	0,97	0,96	1,00	0,98	0,98	0,97	0,96	0,96	0,97	0,96	0,96	0,96	0,96	0,95	0,96	0,96	0,96
2015-56-02 JK008 BE1 2 2	0,97	0,97	0,97	0,98	1,00	0,98	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,96	0,96	0,96	0,95	0,96	0,96	0,97
2015-56-02 JK008 BE1 2 3	0,97	0,97	0,97	0,98	0,98	1,00	0,97	0,97	0,97	0,96	0,97	0,96	0,97	0,96	0,96	0,96	0,96	0,97
2015-56-03 JK008 BE1 3 1	0,98	0,98	0,97	0,97	0,97	0,97	1,00	0,98	0,98	0,97	0,97	0,95	0,97	0,96	0,95	0,96	0,96	0,96
2015-56-03 JK008 BE1 3 2	0,98	0,98	0,98	0,96	0,97	0,97	0,98	1,00	0,99	0,97	0,97	0,97	0,97	0,96	0,96	0,96	0,97	0,97
2015-56-03 JK008 BE1 3 3	0,97	0,98	0,99	0,96	0,97	0,97	0,98	0,99	1,00	0,96	0,97	0,97	0,97	0,96	0,96	0,96	0,96	0,97
2015-56-04 JK008 BE2 1 1	0,97	0,97	0,96	0,97	0,97	0,96	0,97	0,97	0,96	1,00	0,98	0,97	0,98	0,97	0,96	0,97	0,98	0,97
2015-56-04 JK008 BE2 1 2	0,96	0,97	0,97	0,96	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,98	1,00	0,98	0,97	0,98	0,98	0,97	0,98	0,98
2015-56-04 JK008 BE2 1 3	0,96	0,97	0,97	0,96	0,96	0,96	0,95	0,97	0,97	0,97	0,98	1,00	0,97	0,97	0,97	0,97	0,98	0,97
2015-56-05 JK008 BE2 2 1	0,97	0,97	0,97	0,96	0,96	0,97	0,97	0,97	0,97	0,98	0,97	0,97	1,00	0,98	0,97	0,97	0,98	0,97
2015-56-05 JK008 BE2 2 2	0,96	0,97	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,97	0,98	0,97	0,98	1,00	0,97	0,97	0,98	0,97
2015-56-05 JK008 BE2 2 3	0,95	0,96	0,96	0,95	0,95	0,96	0,95	0,96	0,96	0,96	0,98	0,97	0,97	0,97	1,00	0,96	0,97	0,98
2015-56-06 JK008 BE2 3 1	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,96	1,00	0,98	0,98
2015-56-06 JK008 BE2 3 2	0,96	0,97	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,97	0,96	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,97	0,98	1,00	0,98
2015-56-06 JK008 BE2 3 3	0,96	0,97	0,97	0,96	0,97	0,97	0,96	0,97	0,97	0,97	0,98	0,97	0,97	0,97	0,98	0,98	0,98	1,00

Abbildung 33 Korrelationsmatrix zur Reproduzierbarkeit der Zusammensetzung der Serumproteine des Trainingssets.

Um die Reproduzierbarkeit der Daten zu untersuchen, wurde jede Probe dreimal aufgereinigt und jeweils in Triplikaten via nanoUPLC UDMSE gemessen (9 Messungen je Zeitpunkt). Die Korrelationsmatrix vergleicht exemplarisch die Zusammensetzung der Proteine eines Patienten des Mainzer Studienzentrums zu den Zeitpunkten A und B. Als Maß der Korrelation wurde der Pearson Korrelationskoeffizient (r) berechnet. Der Vergleich der Triplikate der Aufreinigungen ergab Korrelationskoeffizienten zwischen 0,96 0,99. Die Triplikate der Messung einer aufgereinigten Probe ergaben Korrelationskoeffizienten zwischen 0,98 - 1.

8. Publikationen & Konferenzen

Publikationen

Wegner J*, Krebs F*, Tuettenberg A, von Stebut E. Treg activation status depends on psoriasis therapy regime. JDDG, 2020. Manuskript akzeptiert. * geteilte Erstautorschaft

Hajek E, Krebs F, Bent R, Haas K, Bast A, Steinmetz I, Wilden S, Tuettenberg A, Grabbe S, Bros M. BRAF inhibitors stimulate inflammasome activation and interleukin 1 beta production in dendritic cells. *Oncotarget*, 2018; 9: 28294-28308.

Schupp J*, Krebs FK*, Zimmer N*, Trzeciak E, Schuppan D, Tuettenberg A. Targeting myeloid cells in the tumor sustaining microenvironment. *Cellular Immunology*, 2017; doi: 10.1016/j.cellimm.2017.10.013. * geteilte Erstautorschaft

Luther N, Shahneh F, Brähler M, Krebs F, Jäckel S, Subramaniam S, Stanger C, Schönfelder T, Kleis-Fischer B, Reinhardt C, Probst HC, Wenzel P, Schäfer K, Becker C. Innate Effector-Memory T-Cell Activation Regulates Post-Thrombotic Vein Wall Inflammation and Thrombus Resolution. Circulation Research, 2016; 119(12):1286-1295.

Konferenzen – Posterbeiträge

Krebs F, Zimmer S, Mitzel-Rink H, Steinbrink K, Meissner M, Tenzer S, Grabbe S, Loquai C, Tuettenberg A. Evaluation of potential biomarkers for checkpoint inhibitor therapy in malignant melanoma. *8. ADF Winter School*, Zugspitze, 2019.

Krebs F, Tsimpaki T, Wegner J, Tenzer S, Grabbe S, Tuettenberg A. Evaluation of potential novel biomarkers in immune mediated diseases. 45. Tagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF), Zürich, 2018.

Krebs F, Mitzel-Rink H, Schach A, Behling J, Meissner M, Tenzer S, Grabbe S, Loquai C, Tuettenberg A. Immunomonitoring peripheral blood and plasma of malignant melanoma patients in the course of immunotherapy. 47. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie (DGFI), Erlangen, 2017.

Krebs F, Mitzel-Rink H, Schach A, Behling J, Weid F, Meissner M, Tenzer S, Grabbe S, Loquai C, Tuettenberg A. Effects of monoclonal antibody immunotherapy on peripheral blood of malignant melanoma patients. 27. Tagung der Arbeitsgemeinschaft für Dermatologische Onkologie (ADO), Mainz, 2017.

Krebs F, Mitzel-Rink H, Jetter A, Behling J, Wickert D, Lang B, Hahn S, Meissner M, Tenzer S, Grabbe S, Loquai C, Tuettenberg A. Investigating immunosuppressive regulatory T cells (Treg) and myeloid-derived suppressor cells (MDSC) in checkpoint inhibitor therapy of malignant melanoma. 44. Tagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF), Göttingen, 2017.

Krebs F, Mitzel-Rink H, Jetter A, Behling J, Wickert D, Lang B, Hahn S, Meissner M, Tenzer S, Grabbe S, Loquai C, Tuettenberg A. Evaluation of novel predictive marker molecules in malignant melanoma immunotherapy. 14. Tagung der Gesellschaft für Krebs-Immuntherapie (CIMT), Mainz, 2016.

Krebs F, Hajek E, Hahn SA, Grabbe S, Bros M, Tuettenberg A. Effect of Ras-Raf-Pathway inhibitors on the immunephenotype of dendritic cells during melanoma therapy. 43. Tagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF), Wien, 2016.

Wegner J, Krebs FK, Tuettenberg A, von Stebut E. Frequency of plasmacytoid cells (pDC), myeloid-derived suppressor cells (MDSC) and T regulatory cells (T cell) in peripheral blood of patient with psoriasis. 43. Tagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF), Wien, 2016.

Krebs F, Uenal Oe, Hahn SA, Hajek E, Bros M, Grabbe S, Tuettenberg A. Phenotypical changes of melanoma cells ad T cells subsets providing a loophole for relapse in Vemurafenib therapy. 25. Tagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Onkologie (ADO), München, 2015.

Konferenzen – Vorträge

Krebs F, Hahn S, Mitzel H, Jetter A, Behling J, Wickert D, Lang B, Meissner M, Tenzer S, Grabbe S, Loquai C, Tuettenberg A (Referent). Novel prognostic marker proteins for malignant melanoma immunotherapy. 26. Tagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Onkologie (ADO), Essen, 2016.

Krebs F, Mitzel-Rink H, Jetter A, Behling J, Wickert D, Lang B, Hahn S, Meissner M, Tenzer S, Grabbe S, Loquai C, Tuettenberg A. Exploring therapy outcome – Linking immunosuppressive cells and novel biomarkers to response to malignant melanoma immunotherapy. 46. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie (DGFI), Hamburg, 2016.

9. Danksagung

Mein Dank gilt allen, die mich auf dem Weg der Dissertation begleitet haben. Mein besonderer Dank gilt Andrea Tüttenberg für die Organisation der Projekte, die Betreuung meiner Dissertation, den Einsatz für die Rekrutierung neuer Patienten, Diskussionen der Daten, Ideen und Tipps zur Auswertung und Experimenten. Mein Dank gilt Prof. Irene Krämer und Prof. Stefan Tenzer für die Unterstützung im Thesis Advisory Commitee (TAC)-Meeting. Als Lehrende, Prüferin und Schauspielerin an der Lehre der Klinischen Pharmazie (OSCE-Prüfung, Bedside Teaching, Triade-Seminare) teilzunehmen, hat mir viel Spaß gemacht.

Im Rahmen der Checkpoint-Inhibitor Studie möchte ich mich vor allem bei den Teams des UCT Mainz und Frankfurt und den Studienambulanzen bedanken, die sich für die Rekrutierung, Aufklärung und Blutentnahmen der Patienten Zeit genommen haben. Heidrun [redacted] und Sophia Zimmer danke ich für die Zusammenstellung der Patientendaten und Sophias Unterstützung im Labor. Stellvertretend für das UCT Frankfurt möchte ich Prof. Markus Meissner für den Einsatz im Probentransport und Dr. Özistanbullu für die Zusammenstellung der Frankfurter Patientendaten danken. Hervorzuheben sind hier die freiwilligen gesunden Studienteilnehmer, die tapfer im Angesicht der Nadel ihr Blut gespendet haben.

Dem Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) Heidelberg möchte ich für mein Stipendium und die Finanzierung der Checkpoint-Inhibitor Studie im Rahmen des Deutschen Konsortiums für Translationale Krebsforschung (DKTK) danken. Dank der Prof. Rochelmeyer-Stiftung der JGU Mainz konnte das Projekt auch auf der Zielgerade weiterlaufen.

Ich möchte auch meinen Kooperationspartnern danken: Der AG Tenzer für die Analyse des Plasmaproteoms, der AG Grabbe/Bros und der AG Stebut für die spannenden Projekte zu BRAF-/MEK-Inhibitoren bzw. der Psoriasis. Matthias Bros und [redacted] möchte ich für die gute Zusammenarbeit, Tipps und interessanten Diskussionen danken. Esther von Stebut-Borschitz und Joanna Wegner möchte für die gute Zusammenarbeit im Labor, bei der Datenanalyse und für den Blick aus Sicht der Autoimmunität bedanken.

Einen großen Dank an meine Kollegen der AG Tüttenberg und der Hautklinik Mainz! Kein Virus, keine sommerliche Hitze, kein Wasserrohrbruch konnte euch den Humor nehmen! Marie und Fatemeh – Kaffee, Kuchen & das offene Ohr. Niklas und Jonathan – Nicht ohne mein Team. NRPJJF – Detektivbüro für Immunologie, herrenlose Brotdosen und Socken auf Fenstersimsen, Anlaufstelle für Mäuse und Herberge aussortierter Pflanzen, Kaffeemaschinen-Verschleißer und Tomatengärtner. Fall abgeschlossen.

10. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und ohne unerlaubte Hilfsmittel oder fremde Hilfe angefertigt habe.

Mainz, den Franziska Kirsten Krebs

11. Tabellarischer Lebenslauf

Name	:	Franziska Kirsten Krebs
Geburtsdatum	:	02.05.1986
Geburtsort	:	Kaltenkirchen

Akademische Ausbildung

Jan 2015 – Mai 2020	Promotion im Fach Pharmazie an der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
Jan 2014 – Dez 2014	Diplomarbeit im Fach Pharmazie an der Martin Luther-Universität, Halle-Wittenberg
12. Dezember 2013	Approbation als Apothekerin
Nov 2012 – Okt 2013	Praktisches Jahr 1. Hälfte: Apotheke an der Jahnhöhe, Würzburg; 2. Hälfte: Zytostatika-Abteilung der Apotheke des Universitätsklinikums, Würzburg
April 2008 – Okt 2012	Studium der Pharmazie an der Julius-Maximilians Universität, Würzburg
Okt 2006 – März 2008	Studium der Nanostrukturtechnik an der Julius-Maximilians Universität, Würzburg
Aug 1996 – Mai 2005	Abitur an der Auguste-Viktoria-Schule, Itzehoe

Berufserfahrung

Seit Nov 2018	Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Kerstin Steinbrink in der Hautklinik der Universitätsmedizin Mainz
Seit Juli 2018	Apothekerin in der farma-plus Apotheke im Kaufland Oppenheim
Feb 2014 – Dez 2014	Apothekerin in der Apotheke Dr. Jörgens, Wiesbaden, Nordenstadt
Jan 2014	Apothekerin in der Hechtapotheke, Mainz
Nov 2013 – Dez 2013	Chemisch-Technische Assistentin bei Bergische Elektrochemie, Wuppertal

Mainz, den 13.05.2020